

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

---

Биологический факультет

*На правах рукописи*

**ЧУРЮМОВА Валерия Александровна**

**ИЗУЧЕНИЕ  $Ca^{2+}$ /РЕКОВЕРИН-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ  
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ РОДОПСИНА, КАТАЛИЗИРУЕМОГО  
РОДОПСИНКИНАЗОЙ**

03.00.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в отделе сигнальных систем клетки НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор П.П. Филиппов

кандидат химических наук, старший научный сотрудник И.И. Сенин

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор Н.Н. Чернов

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Е.Н. Иомдина

**Ведущая организация:**

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 г. в \_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д.501.001.71 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, большая биологическая аудитория (ББА).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат биологических наук

М.В. Медведева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ионы кальция служат универсальным регулятором самых разнообразных процессов, протекающих в живой клетке. Воздействие ионов кальция на эти процессы в большинстве случаев опосредовано  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими белками. За связывание ионов кальция у большинства  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков отвечает специальная структура, получившая название “EF-hand”. Многие из белков, содержащих EF-hand-структуру, служат сенсорами ионов кальция для различных мишеней в клетках различных типов, например, в нейронах. Так, в настоящее время известно более сорока представителей EF-hand-содержащих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков, специфичных для нервной ткани, которые составляют семейство нейрональных  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров (neuronal calcium sensors, NCS). Белки семейства нейрональных  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров выполняют регуляторную роль в отношении различных внутриклеточных белков-мишеней таких, как: протеинкиназы, гуанилатциклазы, аденилатциклазы и ионные каналы. Изменение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  определяет компартиментализацию (раствор/мембрана) многих белков этого семейства, что в свою очередь модулирует их взаимодействие с сигнальными партнерами.

Типичным представителем семейства нейрональных  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров является рековерин, высокоспецифичный для фоторецепторных клеток сетчатки, представляющих собой высокоспециализированные нейроны. Функция рековерина в фоторецепторной клетке заключается в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции десенситизации фотоактивированного рецептора (родопсина) путём его фосфорилирования, катализируемого ферментом родопсинкиназой. При высокой концентрации ионов кальция рековерин находится в комплексе с фоторецепторной мембраной и взаимодействует с родопсинкиназой, что приводит к ингибированию фермента. Тогда как при низких концентрациях катиона комплекс родопсинкиназа-рековерин диссоциирует и ингибирование снимается. Процесс  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого ингибирования фосфорилирования родопсина происходит на фоторецепторной мембране при непосредственном взаимодействии рековерина и родопсинкиназы.

Актуальность данной работы обусловлена тем, что в настоящее время отсутствует полная информация о механизме  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого взаимодействия рековерина и его внутриклеточной мишени родопсинкиназы, а также роли фосфолипидного матрикса фоторецепторной мембраны в функционировании этих белков.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – изучение механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции фосфорилирования родопсина родопсинкиназой. В соответствии с этой целью в работе решались следующие задачи.

- Выявление сайтов родопсинкиназы и рековерина, ответственных за взаимодействие этих двух белков.

- Изучение влияния состава фоторецепторной мембраны на регуляцию фосфорилирования родопсина.

Научная новизна и практическая значимость работы. В настоящей работе выявлен участок молекулы родопсинкиназы, принимающий участие во взаимодействии с ее внутриклеточным регулятором рековерином. Установлено, что заполнение  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего центра EF2 рековерина ионами кальция непосредственно контролирует экспонирование гидрофобного “кармана” и миристоильного остатка, и, как следствие, взаимодействие рековерина с его мишенью – родопсинкиназой. Продемонстрировано влияние изменения содержания холестерина в составе фоторецепторных мембран на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое связывание рековерина с мембранами. Показано, что повышение концентрации холестерина в составе мембран увеличивает способность рековерина ингибировать родопсинкиназу в результате сдвига полумаксимального эффекта ингибирования в сторону низких концентраций свободного  $\text{Ca}^{2+}$  и рековерина.

Практическая ценность работы заключается в том, что рековерин является одним из ключевых белков-регуляторов процесса фототрансдукции в фоторецепторной клетке, нарушение которого приводит к целому ряду зрительных патологий. Понимание молекулярных механизмов передачи зрительного сигнала необходимо для разработки эффективных методов лечения заболеваний зрения.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на заседании кафедры биохимии биологического факультета МГУ, на семинарах отдела сигнальных систем клетки НИИФХБ МГУ, на 7-й Пущинской конференции молодых ученых (Пущино, 2003), международной конференции “Рецепция и внутриклеточная сигнализация” (Пущино, 2005) и на XVIII международной зимней молодежной научной школе “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии” (Москва, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы. Материал иллюстрирован 37 рисунками и 4 таблицами. Библиографический указатель включает 209 цитированных работ.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Родопсинкиназа, или GRK1, фермент, фосфорилирующий родопсин, представляет собой первую обнаруженную протеинкиназу семейства GRK [Lorenz et al., 1991]. Как и другие представители этого семейства протеинкиназ, родопсинкиназа фосфорилирует только сти-

мулированную (светоактивированную) форму родопсина (Rho\*). На основании первичной структуры фермента и гомологии с другими представителями семейства Ser/Thr-протеинкиназ в молекуле родопсинкиназы (RK) выделяют три основных домена: центральный каталитический домен (RK<sub>184-454</sub>), ограниченный N- и C- концевыми регуляторными доменами (соответственно RK<sub>1-183</sub> и RK<sub>455-561</sub>). C-концевой домен родопсинкиназы содержит СААХ-мотив (CysValLeuSer<sup>561</sup>), который служит сигналом для присоединения фарнезильной группы к остатку цистеина, и сайты аутофосфорилирования (Ser<sup>448</sup>, Thr<sup>489</sup>).

Регуляция родопсинкиназы происходит при участии Ca<sup>2+</sup>-связывающего белка рековерина, специфично экспрессирующегося в клетках сетчатки. Молекула рековерина содержит 4 потенциальных Ca<sup>2+</sup>-связывающих центра типа EF-hand, из которых только два, а именно второй и третий (EF2 и EF3 соответственно) способны связывать ионы кальция. Основными следствиями связывания ионов кальция с рековерином, белком, в котором функционирует “Ca<sup>2+</sup>-миристоильный переключатель” (calcium-myristoyl switch), является: а) экспонирование гидрофобного “кармана” рековерина и б) экспонирование миристоильного остатка, ковалентно присоединенного к N-концевому остатку рековерина. Это придает рековерину способность Ca<sup>2+</sup>-зависимым образом взаимодействовать с фоторецепторными мембранами и ингибировать его внутриклеточную мишень – родопсинкиназу.

Предыдущие исследования [Klenchin et al., 1995] показали, что ингибирование родопсинкиназы под действием рековерина происходит при непосредственном взаимодействии этих двух белков. Однако механизм этого взаимодействия изучен не был, в частности, оставались неизвестными структурные участки, ответственные за связывание рековерина с его внутриклеточной мишенью. Кроме того, не было исследовано влияние фосфолипидного окружения (состава фоторецепторных мембран) на функционирование рековерина и родопсинкиназы. Используя мутантные формы рековерина и рекомбинантные фрагменты родопсинкиназы, мы попытались ответить на эти вопросы в настоящей работе.

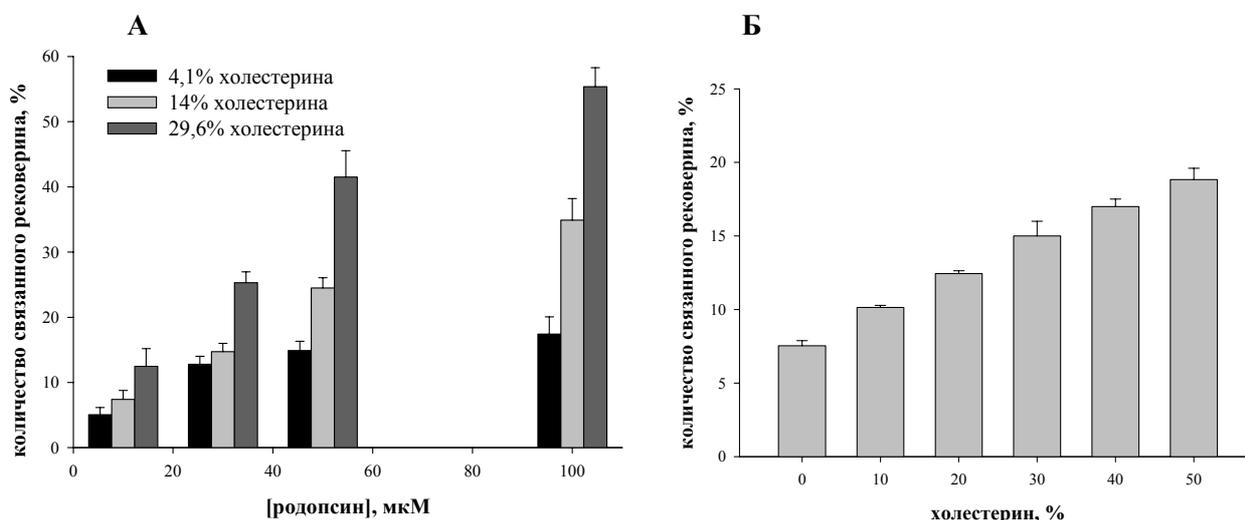
## **1. Влияние содержания холестерина фоторецепторных мембран на взаимодействие рековерина с мембранами и регуляцию фосфорилирования родопсина.**

Большинство процессов, имеющих отношение к фототрансдукции и ее регуляции, происходят непосредственно на мембране. Поэтому в основе обнаруженной способности рековерина ингибировать родопсинкиназную активность может лежать как прямое взаимодействие рековерина с родопсинкиназой, так и механизмы, вовлекающие фоторецепторную мембрану.

Известно, что в мембране фоторецепторных дисков, содержащихся в наружных сегментах палочки (НСП), обнаружена пространственная гетерогенность содержания холесте-

рина. Так, на новообразованные диски у основания НСП (базальные диски) приходится подавляющая часть массы холестерина, что составляет приблизительно 30% от общего количества липидов, в то время как на диски у окончания НСП (апикальные диски) – всего лишь 5% [Boesze-Battaglia et al., 1990]. К моменту начала настоящей работы имелись данные, указывающие на пространственную неоднородность процессов передачи сигнала в НСП. Обнаружено, что ответ на единичный фотон, регистрируемый на конце НСП, имеет меньшую амплитуду, чем ответ, регистрируемый у его основания [Schnapf, 1983]. Можно предположить, что эти различия кинетики фоторецепторной мембраны и, в частности, различным содержанием холестерина.

Для изучения влияния холестерина на регуляцию фосфорилирования светоактивированного родопсина мы получили фоторецепторные мембраны с различным содержанием холестерина: от 4,1 до 29,6%; при том, что нативные мембраны НСП содержат в среднем 14% холестерина. С использованием полученных мембран мы провели измерение влияния содержания холестерина на взаимодействие миристоилированного рековерина с мембранами НСП и фосфолипидными везикулами при насыщающих концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ . (Исследование немистоилированных форм не проводилось, т.к. они с фоторецепторными мембранами не взаимодействуют.) В результате установлено, что с увеличением содержания холестерина от 4,1% до 29,6% количество рековерина, связанного с мембранами НСП, повышается (рис. 1А).



**Рис. 1.** Связывание рековерина с фоторецепторными мембранами и фосфолипидными везикулами, содержащими различное количество холестерина.

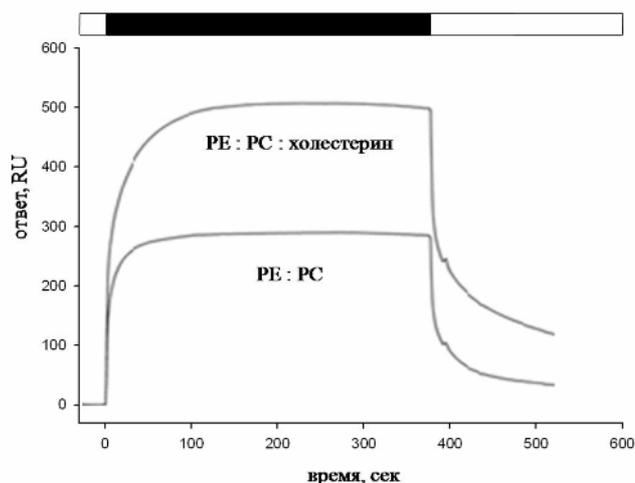
Далее мы исследовали взаимодействие рековерина с фосфолипидными везикулами, содержащими фосфатидилэтаноламин (PE) и фосфатидилхолин (PC) в соотношении 50:50 с градиентом содержания холестерина (5-50%) при насыщающих концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ . Обна-

ружено, что связывание рековерина с фосфолипидными везикулами увеличивается при возрастании концентрации холестерина по сравнению с везикулами, не содержащими холестерин (рис. 1Б).

Таким образом, результаты нашего исследования взаимодействия рековерина с фоторецепторными мембранами и фосфолипидными везикулами, содержащими различные концентрации холестерина, позволяют сделать вывод о том, что связывание рековерина с мембранами зависит от содержания в них холестерина.

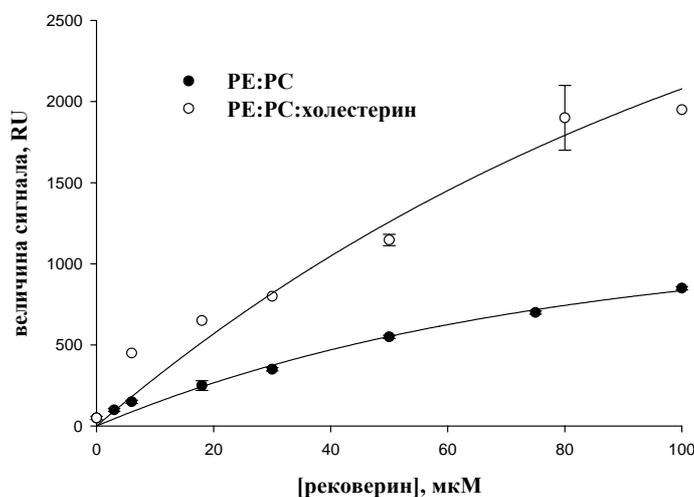
Для подтверждения полученных результатов по влиянию холестерина на взаимодействие рековерина с мембранами мы использовали альтернативный метод – спектроскопию поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR). С помощью метода SPR мы исследовали влияние холестерина на взаимодействие рековерина с иммобилизованным фосфолипидным бислоем. В этих экспериментах мы использовали систему “рековерин - искусственная фосфолипидная мембрана”. В этой системе искусственный липидный бислой образует однородную поверхность на SPR-чипе и присутствует в неподвижной фазе в течение хода эксперимента, в то время как рековерин находится в составе растворимой фазы, подвижной относительно иммобилизованного липидного бислоя.

Для иммобилизации на гидрофобный сенсорный чип мы приготовили смесь фосфолипидов двух типов: а) PE и PC (50:50) и б) PE, PC и холестерина (25:25:50). Полученные чипы использовали для измерения взаимодействия рековерина с иммобилизованными липидами в присутствии насыщающей концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . При иммобилизации смеси липидов, содержащей холестерин, максимальная амплитуда сигнала связывания возросла приблизительно в 2 раза по сравнению с сигналом в отсутствие холестерина (рис. 2).



**Рис. 2.** SPR-сенсограммы, отражающие взаимодействие рековерина с иммобилизованным липидным бислоем. Концентрация  $\text{CaCl}_2$  составляла 200 мкМ, рековерина – 5 мкМ. Полоса над сенсограммами обозначает период времени, в течение которого в подвижной фазе отсутствует (не закрашено) и присутствует (закрашено черным) рековерин.

Варьирование концентрации реоверина в условиях насыщающих концентраций ионов кальция привело к такому же результату: в присутствии холестерина максимальная амплитуда сигнала связывания была в 2 раза выше, чем без него (рис. 3).



**Рис. 3.** Зависимость связывания реоверина с иммобилизованным липидным бислоем от концентрации белка. Липидный бислой содержал PE:PC в соотношении 50:50 или PE:PC:холестерин в соотношении 25:25:50.

Далее мы изучили зависимость ингибирования активности родопсинкиназы от концентрации реоверина и  $Ca^{2+}$  при различных концентрациях холестерина в мембранах НСП. Полумаксимальная константа ингибирования ( $K_{50}$ ) родопсинкиназы составила 6,6 мкМ реоверина в присутствии мембран НСП с исходным содержанием холестерина, равным 14%. В то время как в присутствии мембран НСП, содержащих 29,6% холестерина, значение  $K_{50}$  составляло 4,5 мкМ реоверина (таблица 1). Изменение содержания холестерина в мембранах НСП также оказывает влияние на зависимость ингибирования родопсинкиназы от концентрации ионов кальция: при увеличении концентрации холестерина от 4,1% до 29,6% величина  $K_{50}$  для ионов кальция сдвигается в область более низких значений концентрации свободного кальция ( $[Ca^{2+}]_f$ ), а именно уменьшается от 4,31 мкМ до 0,82 мкМ  $[Ca^{2+}]_f$  (таблица 1).

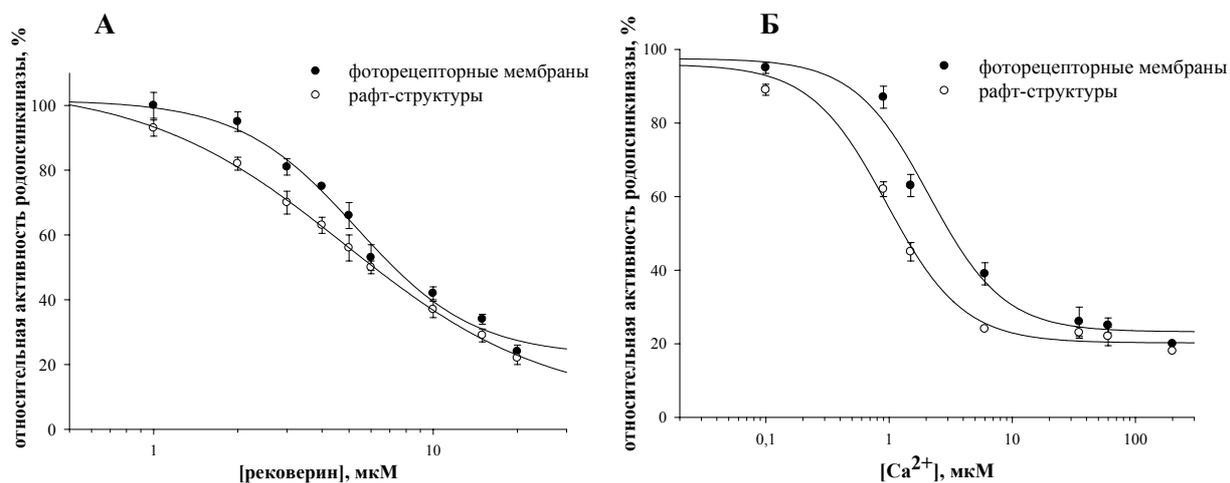
**Таблица 1.** Зависимость активности родопсинкиназы от концентрации реоверина и свободного кальция при различном содержании холестерина в мембранах.

	Содержание холестерина в мембране НСП		
	4,1%	14%	29,6%
$K_{50}$ [реоверин]	10,4 мкМ	6,6 мкМ	4,5 мкМ
$K_{50}$ $[Ca^{2+}]_f$	4,31 мкМ	2,43 мкМ	0,82 мкМ

В настоящее время в литературе широко обсуждается влияние специфических мембранных доменов, нерастворимых в детергенте, (так называемых, рафт-структур) на процес-

сы, имеющие отношение к клеточной сигнализации [Nair et al., 2002]. Рафт-структуры, обнаруженные в НСП, характеризуются высоким содержанием холестерина [Martin et al., 2005]. Наши результаты, демонстрирующие увеличение сродства реоверина к мембранам с повышенным содержанием холестерина, указывают на возможность нахождения реоверина и родопсинкиназы в составе рафт-структур. Поскольку мы показали что,  $Ca^{2+}$ -зависимое ингибирование родопсинкиназы усиливается при условии высокого содержания холестерина в мембранах НСП, можно предположить, что этот процесс происходит более эффективно в рафт-структурах, чем в мембранах вне этих структур. Для подтверждения нашего предположения мы сравнили ингибирование активности родопсинкиназы в присутствии фоторецепторных мембран и рафт-структур, изолированных из мембран НСП.

Из графика зависимости активности родопсинкиназы от концентрации реоверина, представленного на рисунке 4А, следует, что ингибирование родопсинкиназы в присутствии рафт-структур происходит при немного меньших концентрациях реоверина по сравнению с мембранами НСП ( $K_{50} = 4,9$  мкМ в рафт-структурах и  $5,3$  мкМ в фоторецепторных мембранах). Однако при исследовании зависимости активности родопсинкиназы от концентрации  $Ca^{2+}$  мы обнаружили существенный сдвиг  $K_{50}$  в сторону низких концентраций  $Ca^{2+}$  в присутствии рафт-структур (рис. 4Б). Это говорит о том, что  $Ca^{2+}$ -зависимое ингибирование реоверином фосфорилирования родопсина более эффективно в рафт-структурах по сравнению с нативными фоторецепторными мембранами ( $K_{50} = 0,76$  мкМ в рафт-структурах и  $1,91$  мкМ в фоторецепторных мембранах).



**Рис. 4.** Зависимость активности родопсинкиназы от концентрации реоверина (А) и  $Ca^{2+}$  (Б) в присутствии фоторецепторных мембран и рафт-структур.

Полученные нами данные говорят о том, что а) высокая концентрация холестерина способствует связыванию реоверина с мембранами и б) холестерин увеличивает эффективность ингибирования активности родопсинкиназы реоверином.

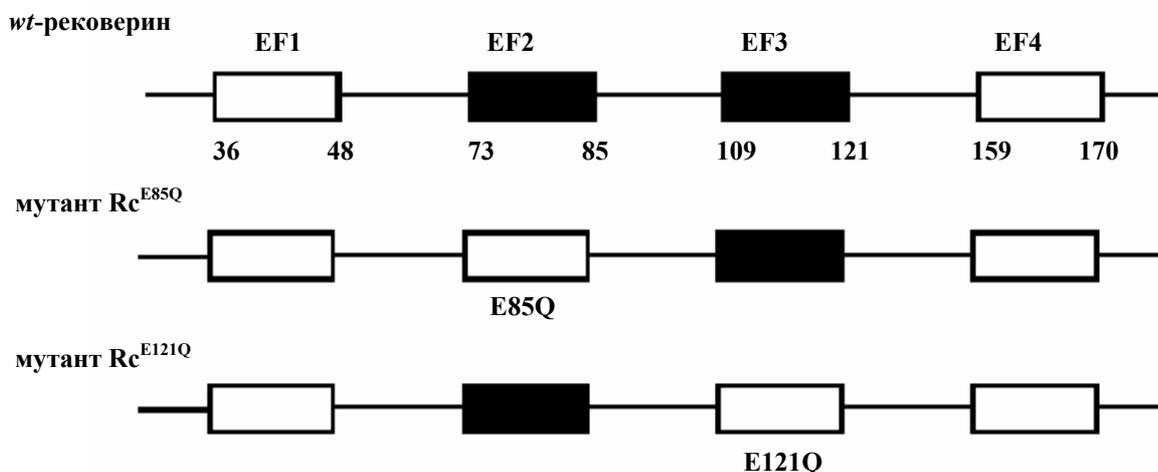
В одной из последних работ по изучению светозависимой транслокации сигнальных белков в фоторецепторной клетке обнаружены факты, указывающие на наличие градиента концентрации рековерина в НСП [Strissel et al., 2005]. В этой работе показано, что более высокая концентрация рековерина присутствует в базальной части НСП, т.е. градиент концентрации рековерина в НСП аналогичен таковому в случае холестерина. В соответствии с нашими данными можно полагать, что именно градиент концентрации холестерина в мембранах НСП обуславливает наблюдаемый градиент концентрации рековерина. Как уже было сказано выше, в НСП существует градиент концентрации холестерина: для базальных дисков до 30%, для апикальных – до 5%. По нашим данным, эффективность ингибирования родопсинкиназной активности рековерином также является гетерогенным процессом, т.к. в базальной части НСП эффективность ингибирующего действия рековерина выше, чем в апикальной области в результате сдвига значения полумаксимального эффекта ингибирования фермента в сторону низких концентраций свободного  $Ca^{2+}$  и рековерина. Результаты наших экспериментов, полученные в условиях *in vitro*, объясняют описанные ранее наблюдения *in vivo* [Schnapf, 1983] о том, что выключение передачи светового сигнала в базальной части НСП происходит медленнее, чем в их апикальной области.

## **2. Исследование роли $Ca^{2+}$ -связывающих центров рековерина в ингибировании родопсинкиназы.**

К началу настоящей работы в нашей лаборатории были получены две мутантные формы рековерина, у которых не функционировал один из двух работающих в рековерине дикого типа (*wt*-рековерине)  $Ca^{2+}$ -связывающих центров (рис. 5). Это – мутант Rc<sup>E85Q</sup>, у которого не функционирует центр EF2 вследствие замены остатка глутаминовой кислоты в 85-м положении на остаток глутамина, и мутант Rc<sup>E121Q</sup>, у которого не функционирует центр EF3 из-за аналогичной замены в 121-м положении. В дальнейшем при изучении мутантных форм рековерина с модифицированными  $Ca^{2+}$ -связывающими центрами было показано, что заполнение  $Ca^{2+}$ -связывающих центров катионами происходит последовательно. Сначала заполняется центр EF3 и лишь затем – центр EF2, при этом координация катионов центром EF3 является необходимым условием для последующего связывания ионов кальция в центре EF2. Механизм последовательного заполнения  $Ca^{2+}$ -связывающих центров ионами кальция функционирует только в миристоилированном рековерине и не действует в его немиристоилированной форме [Permyakov et al., 2000, Senin et al., 2002].

Рековерин действует как  $Ca^{2+}$ -сенсор родопсинкиназы, ингибируя ее при относительно высоких концентрациях катиона. Связывание ионов кальция с молекулой рековерина приводит к экспонированию его гидрофобного “кармана”, в результате чего рековерин ста-

новится способным взаимодействовать с родопсинкиназой и ингибировать этот фермент [Tachibanaki et al., 2000]. Как уже было сказано выше, молекула рековерина содержит два функционирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центра, в то же время роль каждого из этих центров в ингибировании родопсинкиназы оставалась неустановленной. Казалось бы, ответ на этот вопрос мог быть получен с использованием мутантов рековерина, один из которых способен связывать ионы кальция во втором  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем центре, а другой – в третьем  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем центре. Однако из-за того, что в миристоилированном рековерине функционирует вышеописанный механизм последовательного заполнения  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров ионами кальция, миристоилированный мутант  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$  с нефункционирующим третьим  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром ионы кальция вообще не связывает [Senin et al., 2002]. Поскольку в немиристоилированном рековерине связывание ионов кальция с его  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими центрами происходит независимо [Ames et al., 1995], мы попытались ответить на вопрос о роли каждого из двух  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров рековерина в экспонировании его гидрофобного “кармана” и, соответственно, в ингибировании родопсинкиназы, используя немиристоилированные формы мутантов рековерина  $\text{Rc}^{\text{E85Q}}$  (содержит “испорченный” центр EF2) и  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$  (содержит “испорченный” центр EF3).

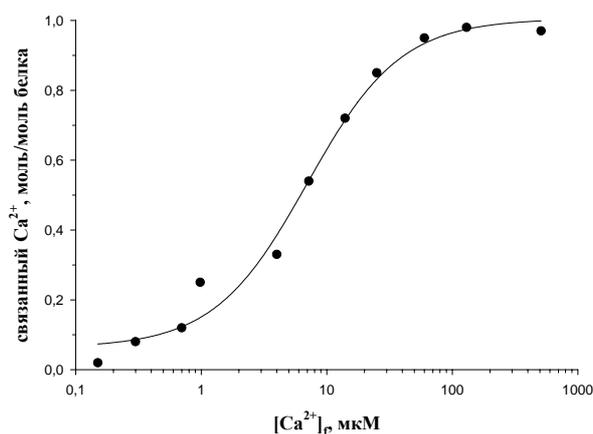


**Рис. 5.** Схема локализации  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров в *wt*-рековерине и его мутантах по второму (мутант  $\text{Rc}^{\text{E85Q}}$ ) и третьему (мутант  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$ ) центрам типа EF-hand. Центры, способные (■) и не способные (□) связывать  $\text{Ca}^{2+}$ , обозначены прямоугольниками.

Ранее было показано, что немиристоилированная форма мутанта  $\text{Rc}^{\text{E85Q}}$ , который содержит “испорченный”  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий центр EF2, способна связывать ионы кальция за счет  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего центра EF3 [Weiergraber et al., 2003]. Используя радиоактивный изотоп  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , мы показали, что немиристоилированная форма мутанта рековерина  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$ , не-

смотря на то, что в ней присутствует “испорченный”  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий центр EF3, способна, в отличие от миристоилированной форма этого мутанта, связывать ионы кальция за счет  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего центра EF2 (рис. 6). При этом величина константы диссоциации ( $K_D$ ) для ионов кальция составила 6,4 мкМ, что совпадает со значением  $K_D$  для  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего центра EF2 в рековерине дикого типа по данным в работе [Ames et al., 1995].

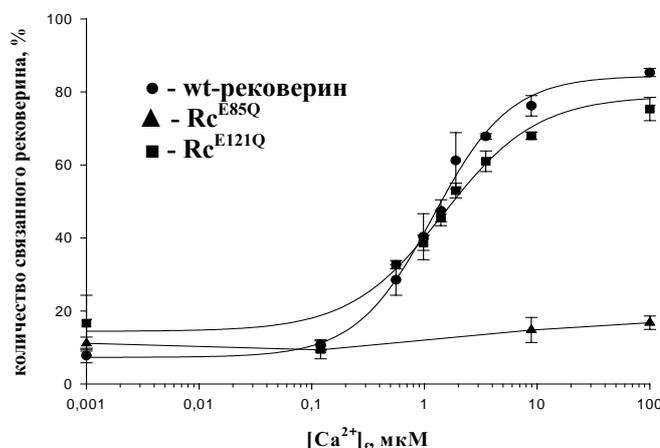
Показателем экспонирования гидрофобного “кармана” рековерина может служить его способность взаимодействовать с гидрофобным носителем фенилсефарозой [Polans et al., 1991]. В связи с этим мы исследовали связывание немиристоилированных форм мутантов рековерина  $\text{Rc}^{\text{E85Q}}$  и  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$  и рековерина дикого типа с фенилсефарозой. Исследуемые формы рековерина инкубировали в присутствии суспензии фенилсефарозы в диапазоне  $[\text{Ca}^{2+}]_f$  от 10 нМ до 100 мкМ; степень связывания указанных форм рековерина с носителем определяли по количеству белка, оставшегося в растворе после осаждения фенилсефарозы.



**Рис. 6.** Связывание  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  с немиристоилированной формой мутанта  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$ .

Как было показано ранее [Senin et al., 2002], миристоилированный *wt*-рековерин  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым образом взаимодействует с фенилсефарозой, тогда как миристоилированные мутанты  $\text{Rc}^{\text{E85Q}}$  и  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$  такой способностью не обладают. Это говорит о том, что оба мутанта в присутствии ионов кальция не экспонируют гидрофобные аминокислотные остатки, необходимые для взаимодействия с гидрофобной матрицей. Используя немиристоилированные формы рековерина, мы показали, что немиристоилированный *wt*-рековерин способен, подобно миристоилированной форме белка,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым образом взаимодействовать с фенилсефарозой (рис. 7). Оказалось, что немиристоилированный мутант  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$ , несмотря на отсутствие в нем функционального центра EF3, взаимодействует с фенилсефарозой аналогично *wt*-рековерину. При этом взаимодействие происходит в том же диапазоне  $[\text{Ca}^{2+}]_f$ , что и при заполнении катионом нативного  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего центра EF2 в *wt*-рековерине. В от-

личие от мутанта  $Rc^{E121Q}$ , немиристоилированный  $Rc^{E85Q}$ , хотя и связывает ионы кальция за счет центра EF3, с фенилсефарозой не взаимодействует.

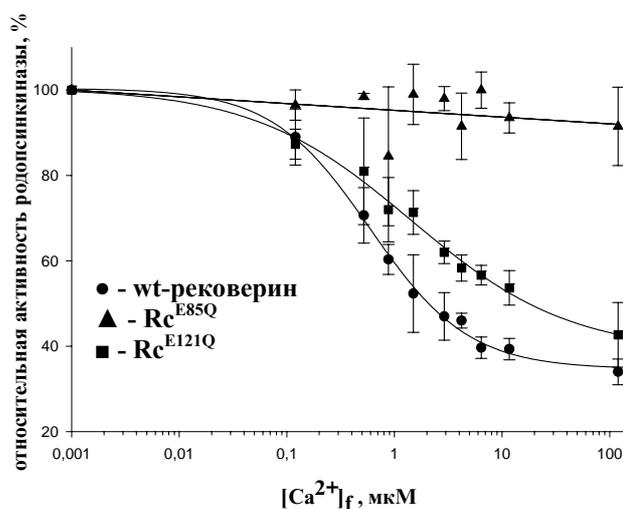


**Рис. 7.**  $Ca^{2+}$ -зависимое связывание немиристоилированных форм рековерина с фенилсефарозой. За 100% принято общее количество рековерина в пробе. Величина  $K_{50}$  для рековерина дикого типа составила 1,19 мкМ, для  $Rc^{E121Q}$  – 1,48 мкМ.

Следовательно, можно сделать вывод, что заполнение ионами кальция центра EF2, но не EF3, определяет способность рековерина взаимодействовать с фенилсефарозой и что координация ионов кальция именно в  $Ca^{2+}$ -связывающем центре EF2 необходима для экспонирования гидрофобного “кармана” рековерина. Этот вывод в свою очередь предполагает, что координация ионов кальция в  $Ca^{2+}$ -связывающем центре EF2 необходима для придания рековерину способности ингибировать родопсинкиназу. Правильность этого предположения подтвердили наши последующие эксперименты по исследованию способности немиристоилированных форм *wt*-рековерина и мутантов  $Rc^{E85Q}$  и  $Rc^{E121Q}$  ингибировать родопсинкиназу  $Ca^{2+}$ -зависимым образом.

В этих экспериментах активность родопсинкиназы измеряли по включению радиоактивного фосфата [ $\gamma^{32}P$ ]-АТФ в родопсин в реконструированной системе, содержащей отмытые мочевиной фоторецепторные мембраны, очищенную родопсинкиназу и исследуемые формы рековерина. Концентрацию свободного кальция варьировали в диапазоне от 1 нМ до 100 мкМ. Как следует из рис. 8, немиристоилированный мутант  $Rc^{E121Q}$ , который содержит “испорченный”  $Ca^{2+}$ -связывающий центр EF3 и, соответственно, координирует ионы кальция только за счет  $Ca^{2+}$ -связывающего центра EF2 способен ингибировать родопсинкиназу  $Ca^{2+}$ -зависимым образом. При этом величина  $K_{50}$  по  $Ca^{2+}$  для данного мутанта близка к таковой для *wt*-рековерина, хотя и несколько сдвинута в область более высоких концентраций ионов кальция. В то же время, немиристоилированный мутант  $Rc^{E85Q}$ , в котором “испорчен”  $Ca^{2+}$ -

связывающий центр EF2 и который координирует ионы кальция только за счет  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего центра EF3, не способен ингибировать родопсинкиназу.



**Рис. 8.**  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое ингибирование активности родопсинкиназы немиристоилированными формами *wt*-рековерина и мутантами  $\text{Rc}^{\text{E85Q}}$  и  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$ . За 100% принята активность родопсинкиназы в отсутствие рековерина. Величина  $K_{50}$  для рековерина дикого типа составила 0,8 мкМ, для  $\text{Rc}^{\text{E121Q}}$  – 3 мкМ.

Таким образом, описанные эксперименты прямо показывают, что именно связывание ионов кальция в  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем центре EF2 обеспечивают взаимодействие рековерина с родопсинкиназой и ее ингибирование.

### 3. Выявление сайтов родопсинкиназы, ответственных за ее взаимодействие с рековерином.

Биохимические эксперименты на препаратах НСП *in vitro* продемонстрировали, что рековерин ингибирует фосфорилирование родопсина, взаимодействуя с родопсинкиназой [Klenchin et al., 1995, Senin et al., 2005]. Можно предположить два механизма ингибирования. Согласно первому механизму, рековерин непосредственно действует на каталитическую активность родопсинкиназы, взаимодействуя с ее каталитическим доменом. Согласно второму, рековерин стерически препятствует формированию фермент-субстратного комплекса родопсинкиназы с фотоактивированным родопсином, не затрагивая активный центр фермента. В предыдущих работах показано, что родопсинкиназа в присутствии рековерина теряет способность фосфорилировать светоактивированный родопсин. При этом рековерин не оказывает влияния на процесс фосфорилирования родопсинкиназой 11-членного пептидного субстрата, гомологичного фрагменту родопсина, который содержит сайты фосфорилирования. Эти данные предполагают, что рековерин блокирует участок родопсинкиназы, необходимый

для узнавания светоактивированного родопсина, не оказывая влияние на каталитическую активность фермента как такового. Рековерин ингибирует родопсинкиназу посредством взаимодействия с участком, удаленным от каталитического центра, следовательно, потенциальными сайтами связывания рековерина могут быть участки, находящиеся в регуляторных N- и C-концевых доменах родопсинкиназы.

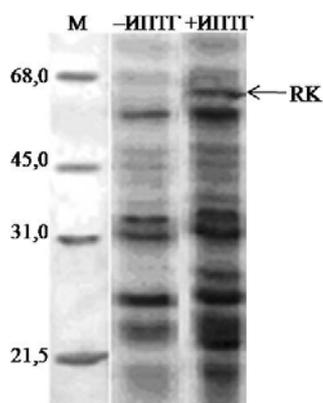
Целью настоящего раздела работы было выяснение локализации участков родопсинкиназы, отвечающих за ее взаимодействие с рековерином. Для ответа на этот вопрос нами была получена рекомбинантная родопсинкиназа, а также рекомбинантные фрагменты фермента, соответствующие его N-концевому (RK<sub>1-183</sub>) и C-концевому (RK<sub>455-561</sub>) доменам, и изучено их взаимодействие с рековерином.

### 3.1. Клонирование, идентификация и экспрессия полноразмерного гена родопсинкиназы и фрагментов гена родопсинкиназы.

Исходная конструкция, предположительно содержащая полноразмерный ген родопсинкиназы, была любезно предоставлена доктором М. Ахтаром (Department of Biochemistry, University of Southampton, United Kingdom). На первом этапе работы нами было проведено секвенирование гена и показано, что предоставленная кДНК соответствует гену родопсинкиназы.

Для проведения экспрессии гена родопсинкиназы нами была выбрана система экспрессии под контролем РНК-полимеразы фага Т7, предложенная Студиером [Studier et al., 1986]. С этой целью ген родопсинкиназы клонировали в вектор рТ7-7, содержащий последовательность промотора фага Т7, и трансформировали полученной конструкцией клетки штамма *E.coli* BL21 (DE3), в хромосоме которых имеется последовательность гена Т7 РНК-полимеразы под контролем *lac*-промотора. Наличие *lac*-промотора позволяет индуцировать экспрессию гена Т7 РНК-полимеразы и, как следствие, гена, клонированного в рТ7-7, добавлением в культуральную среду синтетического аналога лактозы изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозида (ИПТГ).

Электрофореграмма экстракта клеток *E.coli* BL21(DE3) после проведения аналитической экспрессии полноразмерного гена родопсинкиназы, представленная на рис. 9, демонстрирует наличие белка с кажущейся молекулярной массой  $\sim 67$  кДа, соответствующего родопсинкиназе. Уровень экспрессии полноразмерной родопсинкиназы в клетках *E.coli*, как следует из электрофореграммы, оказался невысоким. Последующие попытки выделения рекомбинантного белка были безрезультатными из-за низкого уровня экспрессии. Вследствие этого для проведения экспериментов нами было принято решение получить рекомбинантные фрагменты родопсинкиназы, соответствующие ее доменам.

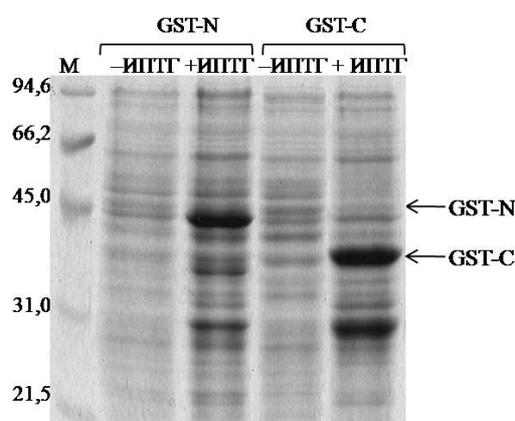


**Рис. 9.** Экспрессия полноразмерного гена родопсинкиназы. Экстракт клеток *E.coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pT7-7-RK, до индукции ИПТГ (-ИПТГ) и после индукции 0,1 мМ ИПТГ (+ИПТГ). «М» – стандарты молекулярной массы.

Для получения рекомбинантных фрагментов родопсинкиназы нами был выбран плазмидный вектор pGEX5x-1 (Amersham Biosciences), содержащий ген глутатион S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) из *Schistosoma japonicum*. Данная экспрессионная система позволяет проводить экспрессию генов в виде химерных белков, слитых в рамке считывания с глутатион S-трансферазой (GST), что облегчает выделение белков из клеточного экстракта с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном глутатионе [Smith, Johnson, 1988]. Нами были получены генетические конструкции, которые содержат фрагменты гена родопсинкиназы, кодирующие N-концевой домен (pGEX5x-1-N) и C-концевой домен (pGEX5x-1-C), слитые в рамке считывания с геном GST. Экспрессию генов химерных белков проводили в прокариотической системе с использованием штамма *E. coli* BL21. После индукции экспрессии генов с помощью ИПТГ образование белков анализировали с помощью SDS-электрофореза экстрактов клеток (рис. 10). Данные, приведенные на рис. 10, указывают на образование рекомбинантных белков с молекулярной массой около 45 кДа и 38 кДа, что соответствует молекулярным массам белков, соответствующих N- и C- концевым доменам родопсинкиназы, экспрессирующимся в одной рамке считывания с GST (GST-N и GST-C).

Уровень экспрессии генов GST-N и GST-C оказался достаточно высоким, но основная часть данных белков накапливалась в форме нерастворимых телец включения. Причиной образования нерастворимых белков может быть как очень высокий уровень экспрессии генов, так и восстановление дисульфидных связей в белках [Lobel et al., 2001]. Для увеличения образования растворимой формы белков нами был проведен ряд экспериментов по оптимизации условий экспрессии, направленных на уменьшение скорости трансляции по следующим параметрам: температуре роста клеток в диапазоне 20-37°C, оптической плотности клеточной культуры в диапазоне  $A_{600}$  от 0,5 до 1 до индукции и времени индукции в диапазоне от 30 минут до 3 часов. Однако любые попытки увеличить выход растворимой формы белка на

стадии биосинтеза в бактериальных клетках не привели к успеху – количества растворимого химерного белка не превышали 100 мкг на 1 литр среды, в результате чего выделение химерных белков из клеточного экстракта оказалось невозможным. По этой причине нами было принято решение о выделении рекомбинантных белков GST-N и GST-C из образующихся телец включения. Мы опробовали действие ряда детергентов: Тритона X-100, Твина-80 и лаурилсаркозина натрия на примере выделения GST-N. При этом было установлено, что наибольшее количество экстрагируемого химерного белка GST-N получается при солюбилизации телец включения в растворе, содержащем 1,5% лаурилсаркозин натрия и 2% Тритона X-100. Поэтому в дальнейшем мы использовали именно эти детергенты для выделения фрагментов родопсинкиназы, слитых в рамке считывания с GST.



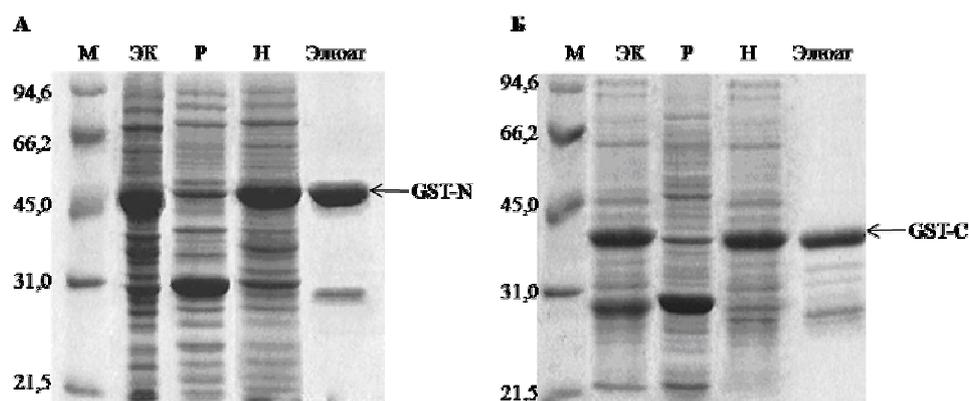
**Рис. 10.** Экспрессия рекомбинантных генов GST-N и GST-C. Экстракт клеток *E.coli* BL21, трансформированных плазмидой pGEX5x-1-N (GST-N) и pGEX5x-1-C (GST-C), до индукции ИПТГ (-ИПТГ) и после индукции 0,1 мМ ИПТГ (+ИПТГ). «М» – стандарты молекулярной массы.

С учетом полученных данных нами был разработан и оптимизирован метод получения и выделения химерных белков GST-N и GST-C, продуцируемых *E. coli* в виде нерастворимых телец включения. Метод состоит из следующих процедур: первая экстракция – удаление растворимых белков в нативных условиях, вторая экстракция – выделение нерастворимых белков в присутствии 1,5% лаурилсаркозина натрия и 2% Тритона X-100 и последующая очистка химерных белков на иммобилизованном глутатионе. Фракции белков после каждой стадии выделения анализировали методом SDS-электрофореза (рис. 11).

### 3.2. Выявление доменов и сайтов родопсинкиназы, ответственных за ее взаимодействие с рековерином.

Следующим этапом нашей работы было установление доменов родопсинкиназы, ответственных за ее взаимодействие с рековерином. С этой целью мы использовали следующие

щую систему. К суспензии глутатионсефарозы, на которой предварительно иммобилизовали очищенный химерный белок, содержащий GST, добавляли реверин при конечной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в системе, равной 2 мМ. После инкубации реакционной смеси в течение 1 часа при 4°C глутатионсефарозу трижды промывали буфером, содержащим 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Затем белки элюировали с помощью 1% SDS и полученные фракции анализировали методом SDS-электрофореза.



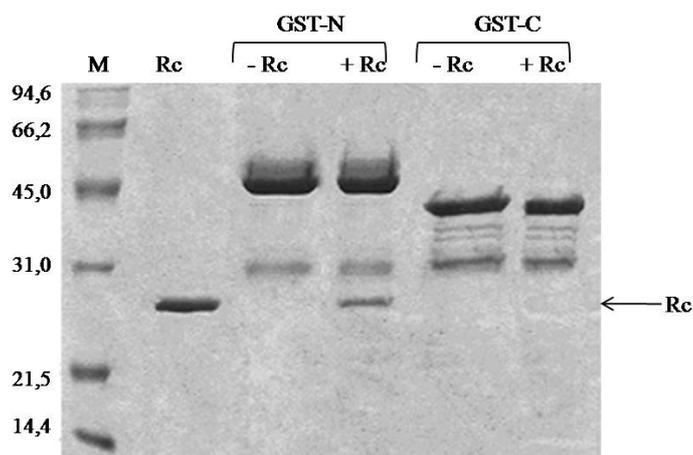
**Рис. 11.** Выделение и очистка рекомбинантных белков GST-N (А) и GST-C (Б). «М» – стандарты молекулярной массы, «ЭК» – экстракт клеток *E. coli* BL21, «Р» - фракция растворимых внутриклеточных белков, «Н» – фракция нерастворимых внутриклеточных белков, солюбилизированных в растворе, содержащем 1,5% лаурилсаркозин натрия и 2% Тритон X-100, «Элюат» – фракция белков после хроматографической очистки на глутатионсефарозе, элюирование 10 мМ глутатионом.

Перед началом исследования взаимодействия белков GST-N и GST-C с реверинном с использованием описанной системы, мы провели контрольные эксперименты по изучению взаимодействия GST с реверинном, из которых однозначно следует, что рекомбинантный белок GST сам по себе с реверинном не взаимодействует. Таким образом, данная система может быть использована для изучения взаимодействия белков GST-N и GST-C с реверинном.

Результаты эксперимента по связыванию химерных белков GST-N и GST-C с реверинном представлены на рис. 12. Как видно из представленных данных, N-концевой домен родопсинкиназы в составе химерного белка взаимодействует с реверинном. Напротив, взаимодействия между С-концевым доменом родопсинкиназы и реверинном не наблюдается.

Для более точной локализации участка N-концевого домена родопсинкиназы, вовлеченного во взаимодействие с реверинном, мы провели исследования с использованием синтетических пептидных фрагментов родопсинкиназы RK<sub>11-26</sub> и RK<sub>2-16</sub>. Смысл эксперимента заключался в выяснении способности данных пептидных фрагментов конкурировать с им-

мобилизованным N-концевым доменом родопсинкиназы за связывание с рековерином. Выбор пептидов обусловлен нашими предварительными результатами, из которых следует, что фрагмент родопсинкиназы  $^{23}\text{Asp-}^{471}\text{Pro}$ , полученный путем ограниченного протеолиза фарнезилированного белка в присутствии Asp-N-эндопротеиназы, теряет способность взаимодействовать с рековерином. Из этого следует, что во взаимодействие с рековерином вовлечен участок 1-23 регуляторного N-концевого домена родопсинкиназы.

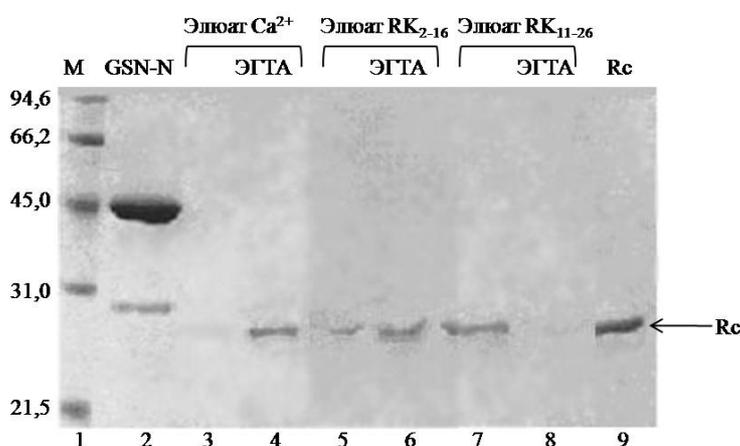


**Рис. 12.** Взаимодействие химерных белков GST-N и GST-C с рековерином. «М» – стандарты молекулярной массы; «Rc» – очищенный препарат рековерина; «-Rc» – фракция белков элюированных с глутатионсефарозы 1% SDS в отсутствие рековерина в инкубационной смеси; «+Rc» – фракция белков элюированных с глутатионсефарозы 1% SDS в присутствии рековерина в инкубационной смеси.

Эксперимент проводили в соответствии со следующей схемой. К суспензии глутатионсефарозы, на которую предварительно иммобилизовали очищенный химерный белок GST-N, добавляли рековерин при конечной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в системе 2 мМ. После инкубации реакционной смеси в течение 1 часа при 4°C глутатионсефарозу трижды промывали буфером, содержащим 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Элюирование рековерина проводили одним из трех буферов, содержащих: (а) 1 мМ пептид RK<sub>11-26</sub>, (б) 1 мМ пептид RK<sub>2-16</sub> или (в) 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (в качестве контроля, чтобы исключить неспецифическое элюирование рековерина). Для определения количества рековерина, оставшегося связанным с иммобилизованным N-концевым доменом родопсинкиназы после элюирования в каждом из трех экспериментов, препарат глутатионсефарозы обрабатывали буфером, содержащим 2 мМ ЭГТА.

На рис. 13 представлены результаты по  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимому связыванию рековерина с N-концевым доменом родопсинкиназы в присутствии и в отсутствие пептидных фрагментов родопсинкиназы RK<sub>2-16</sub> и RK<sub>11-26</sub>.

Как следует из рис. 13, рековерин взаимодействует с N-концевым доменом родопсинкиназы в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  (дорожка 3), тогда как при последующем элюировании буфером, содержащим ЭГТА, рековерин диссоциирует из комплекса с фрагментом родопсинкиназы (дорожка 4). Добавление синтетического пептида, соответствующего аминокислотным остаткам 11-26 родопсинкиназы ( $\text{RK}_{11-26}$ ), полностью предотвращает взаимодействие рековерина с иммобилизованным N-концевым доменом родопсинкиназы (дорожка 7), т.к. последующая обработка ЭГТА не приводит к дополнительному элюированию рековерина (дорожка 8). Однако добавление пептида  $\text{RK}_{2-16}$  практически не влияет на взаимодействие между рековерином и N-концевым доменом родопсинкиназы (дорожка 5), о чем свидетельствует значительное количество рековерина во фракции белков после элюции ЭГТА (дорожка 6).



**Рис. 13.** Конкуренция между химерным белком GST-N и пептидами  $\text{RK}_{11-26}$  и  $\text{RK}_{2-16}$  за взаимодействие с рековерином.

Таким образом, на основании наблюдаемой в ходе эксперимента конкуренции между фрагментом N-концевого домена  $\text{RK}_{11-26}$  и целым N-концевым доменом родопсинкиназы за взаимодействие с рековерином можно заключить, что участок  $\text{RK}_{11-26}$  регуляторного N-концевого домена родопсинкиназы вносит основной вклад во взаимодействие родопсинкиназы и рековерина.

## ВЫВОДЫ

1. Сродство рековерина к фоторецепторным мембранам возрастает при увеличении в них концентрации холестерина.
2. Повышение содержания холестерина в фоторецепторных мембранах приводит к уменьшению уровня фосфорилирования содержащегося в них родопсина вследствие усиления  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого ингибирования родопсинкиназы рековерином.
3. Связывание ионов кальция с  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром рековерина EF2, но не EF3, обуславливает экспонирование неполярных боковых цепей гидрофобного “кармана” белка и тем самым –  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое ингибирование родопсинкиназы.
4. За взаимодействие родопсинкиназы с рековерином отвечает регуляторный N-концевой домен фермента, причем основной вклад вносит ее фрагмент RK<sub>11-26</sub>.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ваганова С.А., Сенин И.И., Чурюмова В.А., Зинченко Д.В., Заргаров А.А., Липкин В.М., Koch K.-W. Механизм  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого ингибирования реCOVERином фосфорилирования светоактивированного родопсина, катализируемого родопсинкиназой. *Тезисы докладов VI чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова. Москва - Пущино, 25 ноября – 2 декабря, 2002, с.78.*
2. Чурюмова В.А., Ваганова С.А., Зинченко Д.В., Заргаров А.А., Сенин И.И. Белковый дизайн  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего белка реCOVERина: создание искусственного кальций-связывающего участка в молекуле реCOVERина. *Тезисы докладов 7-й Пущинской конференции молодых ученых. Пущино, 14-18 апреля, 2003, с. 390*
3. Senin I.I., Hoppner-Heitmann D., Polkovnikova O.O., Churumova V.A., Tikhomirova N.K., Philippov P.P., Koch K.-W. Recoverin and rhodopsin kinase activity in detergent-resistant membrane rafts from rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 2004; v. 279 (47); p. 48647-53.
4. Senin I.I., Hoppner-Heitmann D., Polkovnikova O.O., Churumova V.A., Tikhomirova N.K., Philippov P.P., and Koch K.-W. Recoverin and rhodopsin kinase activity in detergent-resistant membrane rafts from rod outer segments. *8th European symposium on calcium binding proteins in normal and transformed cells. Cambridge, UK, 30 July - 2 August, 2004, p. 83.*
5. Komolov K.E., Zinchenko D.V., Churumova V.A., Vaganova S.A., Weiergraber O.H., Senin I.I., Philippov P.P., Koch K.-W. One of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites of recoverin exclusively controls interaction with rhodopsin kinase. *Biol. Chem.* 2005; v. 386 (3); p. 285-289.
6. Чурюмова В.А., Комолов К.Е., Сенин И.И., Филиппов П.П., Koch K.-W. Роль  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров реCOVERина в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции родопсинкиназы. *Тезисы докладов международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 6 – 9 июня, 2005, с. 220-222.*
7. Чурюмова В.А., Сенин И.И., Hoppner-Heitmann D., Тихомирова Н.К., Филиппов П.П., Koch K.-W. Изучение влияния содержания холестерина в составе фоторецепторных мембран на процесс фосфорилирования родопсина, катализируемый родопсинкиназой. *Тезисы докладов XVIII международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7 – 10 февраля, 2006, с.70.*

8. Weiergraber O.H., Senin I.I., Zernii E.Y., Churumova V.A., Kovaleva N.A., Nazipova A.A., Permyakov S.E., Permyakov E.A., Philippov P.P., Granzin J., Koch K.-W. Tuning of a neuronal calcium sensor. *J. Biol. Chem.* 2006; v. 281 (49); p. 37594-37602.
9. Senin I.I., Churumova V.A., Philippov P.P., Koch K.-W. Membrane binding of the neuronal calcium sensor recoverin - modulatory role of the charged carboxy-terminus. *BMC Biochem.* 2007; v. 22; p. 24.
10. Komolov K.E., Senin I.I., Kovaleva N.A., Christoph M., Churumova V.A., Grigoriev I.I., Philippov P.P., Koch K.-W. Mechanism of rhodopsin kinase regulation by recoverin. *13<sup>th</sup> International conference on retinal proteins*. Barcelona, June 15 – 19, 2008, p. 101.