



УДК 577.1

ВЛИЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ОТЩЕПЛЕНИЯ С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА РОДОПСИНА НА ЕГО СПОСОБНОСТЬ АКТИВИРОВАТЬ ЗРИТЕЛЬНЫЙ КАСКАД

© 2002 г. К. Е. Комолов, И. И. Сенин, П. П. Филиппов[#]*Отдел энзимологии, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 28.02.2001 г. Принята к печати 19.04.2001 г.

Исследована роль С-концевого домена родопсина в процессе активации трансдуцина. Получены формы родопсина с удаленными 9-, 12- или 19-членными С-концевыми фрагментами с помощью обработки трипсином, термолизинном и Asp-N-эндопротеиназой, соответственно. Показано, что удаление трипсином 9-членного фрагмента никак не сказывается на каталитической активности рецептора, тогда как укорочение родопсина с С-конца термолизинном на 12 а.о. повышает его активность примерно в 1.5 раза. Отщепление Asp-N-эндопротеиназой 19 а.о. (т.е. укорочение еще на 7 С-концевых а.о.) практически не сказывается на величине эффекта, вызванного удалением термолизинном 12 а.о. с С-конца рецептора. Полученные данные позволяют предположить, что область С-концевого фрагмента родопсина между сайтами расщепления С-конца трипсином и термолизинном (Val337–Ser338–Lys339) ингибирует передачу сигнала от родопсина следующему компоненту зрительного каскада.

Ключевые слова: фоторецепция; зрительный каскад; родопсин; протеолиз; фосфорилирование; cGMP-фосфодиэстераза.

ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы, сопряженные с G-белками, образуют самое большое семейство мембранных белков, отвечающих за передачу внешних сигналов к внутриклеточным мишеням. Сигналы, воспринимаемые этими рецепторами, исключительно многообразны – это свет, запахи, нейротрансмиттеры, гормоны и пептиды. Зрительный родопсин, или просто родопсин, обеспечивающий восприятие светового сигнала в палочках сетчатки позвоночных животных, – типичный сопряженный с G-белком рецептор, полипептидная цепь которого, состоящая из 348 а.о., 7 раз пересекает фоторецепторную мембрану. Фрагменты молекулы родопсина, находящиеся в мембране, представлены α -спиралями, содержащими преимущественно гидрофобные аминокислотные остатки, тогда как N- и С-концевые участки молекулы и петли, соединяющие ее трансмембранные фрагменты, богаты полярными аминокислотами.

Основная часть родопсина палочек сетчатки сосредоточена в мембранах уникальных замкнутых структур, фоторецепторных дисков, локали-

зованных в наружных сегментах палочек. Молекула родопсина ориентирована в мембране дисков таким образом, что ее N-конец и петли, соединяющие II и III, IV и V, VI и VII трансмембранные фрагменты, обращены во внутридискное пространство и с цитоплазмой не контактируют. В то же время С-конец молекулы родопсина и три петли, соединяющие I и II, III и IV, V и VI трансмембранные фрагменты, экспонированы в цитоплазму и в той или иной степени участвуют во взаимодействии с цитоплазматическими белками, вовлеченными в передачу и регуляцию зрительного сигнала. Предполагается, что С-концевой фрагмент заякорен в мембране за счет пальмитоилированных остатков Cys322 и Cys323, в результате чего – в дополнение к трем упомянутым – образуется четвертая цитоплазматическая петля.

К настоящему времени удалось установить не только общую схему работы зрительной сигнальной машины, но и то, как устроены и взаимодействуют друг с другом ее отдельные детали [1, 2]. Передача светового сигнала начинается с поглощения кванта света хромофорной группой родопсина – 11-цис-ретиналем, ковалентно присоединенным к белковой части молекулы родопсина, опсину. Светоактивированный хромофор изомеризуется в полностью-транс-ретиналь, причем различным стадиям фоточикла соответствуют

Сокращения: Rho³⁴⁸ – нативный родопсин; Rho³³⁹, Rho³³⁶ и Rho³²⁹ – формы родопсина, соответственно, без 9, 12 и 19 С-концевых аминокислотных остатков; ФДЭ – фосфодиэстераза cGMP; НСП – наружные сегменты палочек сетчатки.
[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-50-17; факс: (095) 939-09-78; эл. почта: ppph@genebee.msu.ru).

разные интермедиаты родопсина. Один из них, Мета II-родопсин, является той активной формой родопсина, которая инициирует передачу сигнала в зрительном каскаде, включающем, помимо родопсина, G-белок трансдуцин и эффекторный фермент сGMP-фосфодиэстеразу (ФДЭ). В результате ФДЭ активируется и гидролизует вторичный мессенджер сGMP, цитоплазматическая концентрация которого снижается, что в свою очередь приводит к ряду последующих электрофизиологических событий и в конечном счете – к поступлению зрительной информации в головной мозг. По завершении передачи сигнала компоненты зрительного каскада должны быть переведены в неактивное состояние, что и происходит благодаря функционированию специальных механизмов, один из которых – фосфорилирование светоактивированного родопсина родопсинкиназой, приводящее к десенситизации зрительного рецептора.

Важнейшим событием при переходе от “темнового” родопсина к его активированной форме, Мета II-родопсину, является увеличение доступности некоторых цитоплазматических доменов зрительного рецептора для его основных сигнальных партнеров – трансдуцина и родопсинкиназы. Получено большое число данных, что во взаимодействии с трансдуцином принимают участие вторая, третья и четвертая цитоплазматические петли родопсина [3–7]. Родопсинкиназа связывается с этими же доменами родопсина [3, 4, 8], но фосфорилирует С-концевой фрагмент родопсина [9], в котором присутствует до девяти потенциальных сайтов фосфорилирования – остатков серина и треонина [10].

Первые – и насколько нам известно, они же и последние – данные по влиянию протеолиза родопсина в составе фоторецепторных мембран на его способность активировать зрительный каскад были представлены в трех работах, опубликованных около 20 лет назад [11–13]. В сообщении [11] была продемонстрирована заметная активация родопсина вследствие обработки фоторецепторных мембран термолизиним. Авторы другой работы [12], использовавшие для этих целей трипсин, термолизин и папаин, нашли, что все три протеиназы повышают активирующую способность родопсина. В третьей работе [13] было показано, что протеолиз родопсина трипсином и карбоксипептидазой Y не влияет или слабо влияет на его каталитическую эффективность. Дальнейшего развития эти исследования не получили, и имеющиеся противоречия в цитируемых работах не были устранены до сих пор.

В настоящей работе мы попытались разрешить указанные противоречия и исследовали влияние удаления С-концевого домена родопсина на светозависимую активацию зрительного кас-

када. С помощью протеолитических ферментов нами были удалены 9, 12 или 19 а.о. с С-конца молекулы родопсина и показано, что две последние формы родопсина более эффективно активируют зрительный каскад по сравнению с нативным зрительным рецептором.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку ранее было установлено, что трипсин, термолизин и Asp-N-эндопротеиназа удаляют с С-конца молекулы родопсина, соответственно, 9, 12 и 19 а.о. [14–16], мы использовали перечисленные протеиназы для получения соответствующих укороченных форм зрительного рецептора.

Электрофоретическая подвижность полученных форм относительно нативного родопсина тем больше, чем меньше их молекулярная масса (рис. 1), определенная в вышеупомянутых работах [14–16]. Заметим, что препарат, полученный путем протеолиза термолизиним, содержит также примесь нативного родопсина, которая, однако, не может быть удалена увеличением времени инкубации, поскольку при более длительном действии термолизина на родопсин наблюдается не только отщепление С-концевого фрагмента родопсина, но и деградация других его цитоплазматических доменов.

С-Концевой фрагмент содержит девять потенциальных сайтов фосфорилирования, представленных остатками серина и треонина [10]. В экспериментальных условиях удается достичь включения не более семи фосфатных остатков [17]. Невозможность фосфорилирования всех девяти потенциальных участков, видимо, обусловлена тем, что два остатка из девяти, а именно Thr319 и Thr320, менее доступны, так как они входят в состав предполагаемой четвертой цитоплазматической петли [18].

Как видно из рис. 2, количество радиоактивного фосфата, включенного в родопсин под действием родопсинкиназы, максимально для нативного родопсина (Rho³⁴⁸). Количество метки, включенной в формы родопсина, которые лишены трех сайтов фосфорилирования (Ser343, Thr342 и Thr340) под действием трипсина (Rho³³⁹) или четырех сайтов (Ser343 и Ser338, Thr340 и Thr342) под действием термолизина (Rho³³⁶), соответственно снижено. Отсутствие прямой пропорциональной зависимости между количеством удаленных сайтов фосфорилирования и снижением включения метки в родопсин объясняется разной каталитической активностью родопсинкиназы в отношении разных сайтов, из которых наиболее эффективно фосфорилируется Ser338 [16]. Форма родопсина Rho³²⁹, у которой под действием Asp-N-эндопротеиназы отщеплены 19 концевых аминокислотных остатков и, соответственно, отсутствуют все доступные сайты фосфорилирова-

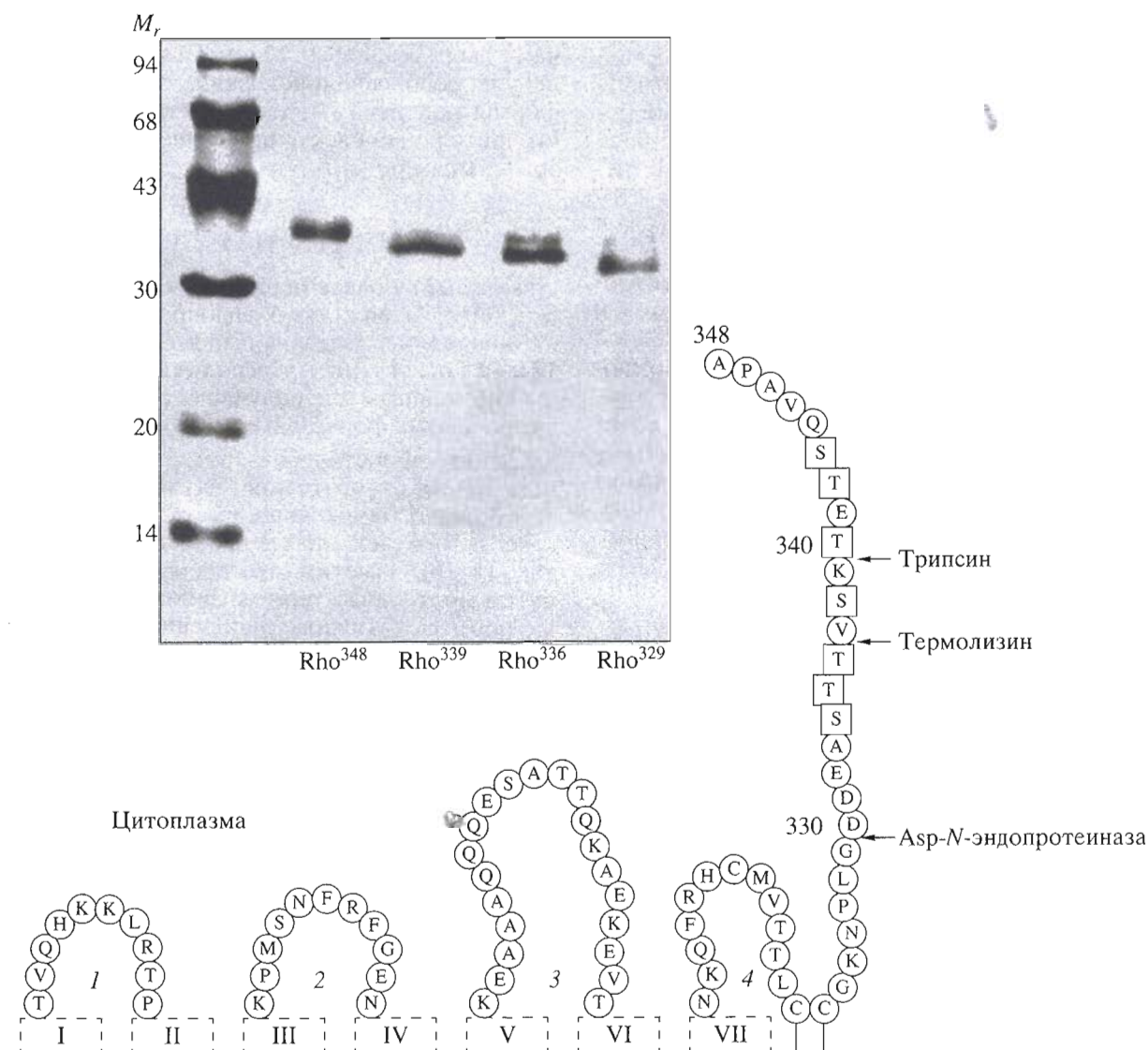


Рис. 1. SDS-электрофорез родопсина до и после протеолитического отщепления его С-концевого фрагмента трипсином (Rho^{339}), термолизинном (Rho^{336}) или Asp-N-эндопротеиназой (Rho^{329}) (слева – маркеры молекулярных масс). На рисунке также показана схема расположения цитоплазматических участков родопсина с указанием места действия упомянутых протеолитических ферментов. I–VII – трансмембранные α -спиральные участки; 1–4 – цитоплазматические петли; \square – доступные сайты фосфорилирования родопсина родопсинкиназой.

ния (в дополнение к сайтам, отщепленным термолизинном, это – Thr335, Thr336 и Ser334), практически не фосфорилируется.

Таким образом, полученные нами результаты электрофоретического анализа и определения уровня фосфорилирования форм родопсина с протеолитически отщепленными С-концевыми фрагментами находятся в соответствии с литературными данными [14–16] по первичной структуре этих форм.

Далее нами была определена эффективность полученных форм родопсина с укороченным С-концом в процессе активации зрительного каскада. Измерение проводили в ячейке для измерения

pH среды, в которую были добавлены фоторецепторные мембраны – нативные или обработанные одной из вышеупомянутых протеиназ, – отмытые от трансдуцина и ФДЭ гипотоническим буфером, и экстракт наружных сегментов палочек сетчатки, содержащий трансдуцин и ФДЭ. Реакцию инициировали освещением, активируя родопсин, и через него – остальные компоненты зрительного каскада, т.е. трансдуцин и ФДЭ. Происходящий при этом гидролиз cGMP непрерывно регистрировали по уменьшению pH среды, поскольку при гидролизе этого циклического нуклеотида под действием ФДЭ происходит выброс протона [19].

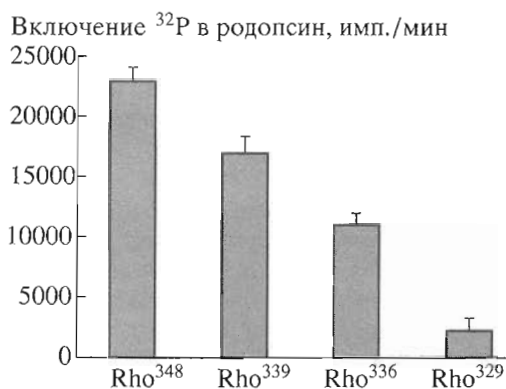


Рис. 2. Включение радиоактивного ^{32}P в родопсин под действием родопсинкиназы до и после протеолитического отщепления его С-концевого фрагмента (результаты даны за вычетом включения ^{32}P в родопсин в темноте).

Показано, что в такой системе гидролиз сGMP происходит строго светозависимым образом (рис. 3), причем интенсивность света была подобрана так, чтобы засвеченным оказалось менее 0.001% от общего количества родопсина. Такой уровень засвечивания родопсина позволяет, с одной стороны, достичь достаточно высокой для достоверного измерения скорости гидролиза сGMP, с другой стороны, этот уровень попадает в диапазон линейной зависимости скорости гидролиза сGMP от количества засвеченного родопсина. По завершении такого тестового измерения каждая проба освещалась дополнительно так, чтобы достичь полного обесцвечивания родопсина. Уровень гидролиза сGMP в этих условиях (активность зрительного каскада не лимитирована родопсином) был максимально возможным для данной пробы; принимая этот уровень за 100%, можно было нормировать скорости гидролиза сGMP в различных пробах при тестовом освещении.

Как следует из рис. 3, каталитическая эффективность формы родопсина, укороченной на 9 С-концевых аминокислотных остатков под действием трипсина (Rho³³⁹), не отличается от таковой для нативного родопсина. Однако отщепление термолизином 12 С-концевых аминокислотных остатков родопсина (Rho³³⁶) (т.е. укорочение всего лишь на 3 а.о. по сравнению с Rho³³⁹) приводит к 1.5-кратному увеличению его эффективности как активатора зрительного каскада. В то же время отщепление Asp-N-эндопротеиназой 19 С-концевых аминокислотных остатков (т.е. добавочное – по сравнению с термолизином – укорочение еще на 7 а.о. (Rho³²⁹)) вызывает лишь незначительное дополнительное увеличение каталитической эффективности родопсина. Заметим, что это увеличение, возможно, обусловлено не укорочением полипептидной цепи родопсина на 7 а.о.,

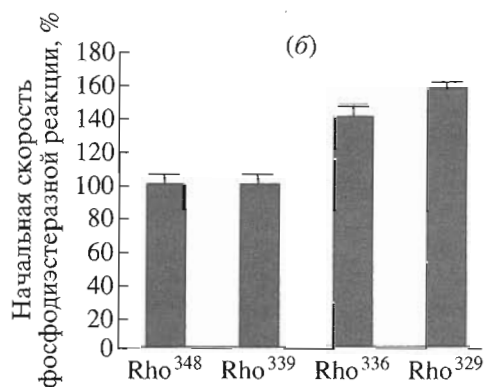
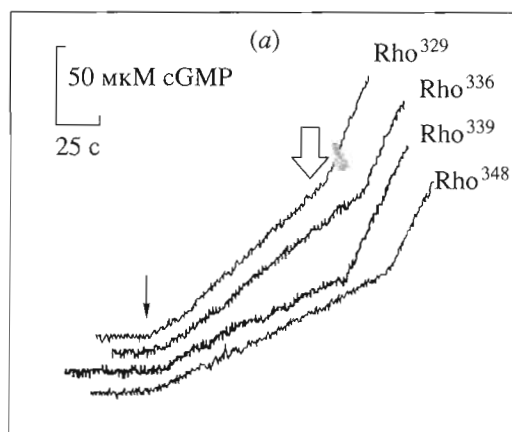


Рис. 3. Эффект протеолитического удаления 9-, 12- и 19-членных фрагментов с С-конца родопсина на начальную скорость фосфодиэстеразной реакции: (а) – запись хода гидролиза сGMP в системе, реконструированной из экстракта НСП и фоторецепторных мембран, необработанных (Rho³⁴⁸) или обработанных (Rho³³⁹, Rho³³⁶ и Rho³²⁹) протеиназами (стрелками показан момент вспышки, вызывающей ненасыщающее (↑) или насыщающее (↓) обесцвечивание родопсина); (б) – начальные скорости фосфодиэстеразной реакции после вспышки, вызывающей ненасыщающее обесцвечивание родопсина, представлены в виде диаграммы, где за 100% принято значение начальной скорости фосфодиэстеразной реакции в системе, содержащей необработанные протеиназами фоторецепторные мембраны (Rho³⁴⁸).

а отсутствием примеси нативного, менее активного родопсина в препарате, полученном действием Asp-N-эндопротеиназы, по сравнению с препаратом, полученным действием термолизина, где эта примесь присутствует (см. рис. 1).

Таким образом, удаление 3 а.о. (Val337, Ser338, Lys339), находящихся между Thr336 и Thr340, в наибольшей степени увеличивает эффективность родопсина как активатора зрительного каскада. Этот результат, особенно в контексте данных о конкурентном ингибировании светозависимой GTP-азной активности трансдукции 8-членным [20] и 14-членным [21] пептидами, соответствующими по последовательности фрагментам 332–339 и

325–339 родопсина, позволяет полагать, что С-концевая последовательность родопсина способна взаимодействовать с трансдуцином и что указанный нами 3-членный фрагмент 337–339 является критичным для этого взаимодействия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и ферменты: Трис, акриламид, бисакриламид, $MgCl_2$, дитиотреит, EGTA, EDTA, cGMP, GTP, сахарозу, трипсин и Asp-N-эндопротеиназу (Sigma); HEPES и ингибитор трипсина из сои (Fluka); термолизин и SDS (Serva). Все остальные реактивы отечественного производства, максимально доступной чистоты.

Выделение НСП из замороженных при $-70^\circ C$ бычьих сетчаток проводили при слабом красном освещении согласно [22]; полученные препараты НСП замораживали и хранили при $-70^\circ C$.

Получение экстракта НСП, содержащего трансдуцин и ФДЭ, проводили согласно [13]. Замороженные НСП суспендировали в гипотоническом буфере (10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 2 мМ EDTA и 2 мМ дитиотреит, далее – буфер А) и центрифугировали на аэрофуге “Beckman” в течение 10 мин при 130000 g. Полученный осадок промывали этим же буфером еще 2 раза, супернатанты объединяли, концентрировали в течение 10 мин при 2000 g на мембранных конусах Centriflo (Amicon) до объема исходной суспензии НСП и использовали в этот же день в экспериментах по активации зрительного каскада родопсином. Отмытый от растворимых белков осадок мембран, содержащих родопсин, хранили в виде осадка при $-20^\circ C$.

Протеолиз родопсина трипсином [13] осуществляли путем инкубации фоторецепторных мембран (см. предыдущий раздел), отмытых в гипотонических условиях, в реакционной смеси следующего состава: 10 мМ HEPES (рН 7.5), 115 мМ NaCl, 0.15 мМ $CaCl_2$, 0.1 мМ EDTA, родопсин (1 мг/мл) и трипсин (20 мг/мл). Реакцию проводили в течение 5 ч в полной темноте при $25^\circ C$ и останавливали ее добавлением в пробу ингибитора трипсина из сои в буфере А; весовое соотношение ингибитор–трипсин 5 : 1 (1000 ед. ингибитора : 1 ед. трипсина). После остановки реакции мембраны пятикратно отмывали от трипсина и белкового ингибитора буфером А, содержащим фенолметилсульфонилфторид, суспендировали в этом же буфере и хранили при $-20^\circ C$. Контрольные фоторецепторные мембраны обрабатывали аналогичным образом за исключением того, что в инкубационную смесь перед добавлением трипсина был внесен его ингибитор.

Протеолиз родопсина термолизинном [4] проводили путем инкубации фоторецепторных мембран (см. выше), отмытых в гипотонических ус-

ловиях, в реакционной смеси следующего состава: 15 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 5.6 мМ $CaCl_2$, 0.4 мМ дитиотреит, родопсин (2.6 мг/мл) и термолизин (0.21 мг/мл). Реакцию проводили в течение 30 мин в полной темноте при $25^\circ C$ и останавливали ее добавлением EDTA до конечной концентрации 50 мМ. Отмывание мембран от термолизина проводили так же, как и в случае трипсина (см. предыдущий раздел). Контрольные фоторецепторные мембраны обрабатывали аналогичным образом за исключением того, что в инкубационную смесь перед добавлением термолизина был внесен EDTA.

Протеолиз родопсина Asp-N-эндопротеиназой [8] осуществляли путем инкубации фоторецепторных мембран (см. выше), отмытых в гипотонических условиях, в реакционной смеси следующего состава: 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), родопсин (6 мг/мл) и Asp-N-эндопротеиназа (0.008 мг/мл). Реакцию проводили в течение 16 ч в полной темноте при $25^\circ C$ и останавливали ее добавлением EDTA и дитиотреита до конечной концентрации 1 мМ каждого. Отмывание мембран от протеиназы проводили так же, как и в случае трипсина. Контрольные фоторецепторные мембраны обрабатывали аналогичным образом за исключением того, что в инкубационную смесь перед добавлением Asp-N-эндопротеиназы были внесены EDTA и дитиотреит.

Концентрацию родопсина определяли после растворения фоторецепторных мембран в 1% гексадецилтриметиламмонии по величине оптического поглощения раствора при λ 500 нм до и после обесцвечивания родопсина. Молярный коэффициент поглощения родопсина при λ 500 нм принимали равным 42000 [23].

SDS-электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [24] в 12.5% ПААГ в присутствии 0.1% SDS.

Фосфорилирование родопсина проводили в реакционной смеси следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ (удельная активность $4\text{--}10 \times 10^5$ имп./мин нмоль), 10 мкМ родопсин и 50–100 нМ родопсинкиназа. Реакционную смесь готовили в темноте, реакцию начинали освещением пробы лампой накаливания до полного обесцвечивания родопсина. Время реакции – 60 мин. По окончании реакции в пробу добавляли 20-кратный избыток 10% трихлоруксусной кислоты, после чего мембраны осаждали центрифугированием (в течение 10 мин при 5000 g), радиоактивный супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 100% трихлоруксусной кислоте; процедуру отмывания повторяли 3–4 раза до отсутствия в супернатанте радиоактивности. Затем супернатант сливали и включе-

ние ^{32}P в родопсин определяли методом жидкостно-сцинтилляционного счета [25].

Активность ФДЭ [19] определяли по закислению среды, которое происходит вследствие гидролиза сGMP, при помощи рН-чувствительного микроэлектрода с выходом на компьютер, при температуре 25°C в условиях инфракрасного освещения. Состав реакционной смеси (общий объем 500 мкл): 20 мМ HEPES (рН 7.5), 100 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 , 0.5 мМ GTP, 0.8 мМ сGMP, 5 мкМ родопсин и гипотонический экстракт НСП (объем варьировал от 30 до 100 мкл в зависимости от активности ФДЭ). Реакцию начинали освещением при помощи фотовспышки. Для достижения необходимой степени обесцвечивания препаратов вспышка аттенюировалась нейтральными светофильтрами с известным пропусканием; светофильтры были предварительно откалиброваны. Скорость гидролиза сGMP в реакционной смеси линейно зависела от степени обесцвечивания родопсина в диапазоне от 0 до 0.005% (ненасыщающие вспышки), поэтому в экспериментах использовали ненасыщающую вспышку, попадающую в этот линейный диапазон (менее 0.001% обесцвеченного родопсина). Для получения насыщающего обесцвечивания, при котором скорость гидролиза сGMP в реакционной смеси была максимальной, использовали неаттенюированную вспышку ($R_{\text{ho}}^*/R_{\text{ho}} \sim 0.1$) или освещение лампой накаливания (мощность 100 Вт). Из полученных кривых находили следующие параметры: V_0 – начальная скорость после ненасыщающей вспышки и V_{max} – скорость гидролиза после насыщающего обесцвечивания. Величины V_0 и V_{max} определяли как тангенс угла наклона линейного участка при записи реакции гидролиза сGMP, соответственно, в ответ на ненасыщающую и насыщающую вспышки. Полученные значения V_0 выражали в процентах по отношению к значениям V_{max} , измеренным затем в этой же пробе после ее насыщающего освещения.

Авторы благодарны профессору М. Актару (Университет Саутгемптона, Англия) за плодотворную дискуссию. Работа поддержана грантами Wellcome Trust, РФФИ (№ 00-04-48332), Минпромнауки РФ (“Международные проекты”) и федеральной программы “Интеграция”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Филиппов П.П., Аршавский В.Ю., Дижур А.М. Биохимия зрительной рецепции. Итоги науки и техники. Биологическая химия. М.: ВИНТИ, 1987.
2. Philippov P.P., Arshavsky V.Yu., Dizhoor A.M. // Sov. Sci. Rev. Physico-Chem. Biol. 1990. V. 9. P. 243–307.
3. Cai K., Klein-Seerharaman J., Hwa J., Hubbell W.L., Khorana H.G. // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 12893–12898.
4. Kuhn H., Hargrave P.A. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 2410–2417.
5. Franke R.R., Sakmar T.P., Oprian D.D., Khorana H.G. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 2119–2122.
6. Konig B., Arendt A., McDowell J.H., Kahlert M., Hargrave P.A., Hofmann K.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6878–6882.
7. Franke R.R., Koenig B., Sakmar T.P., Khorana H.G., Hofmann K.P. // Science. 1990. V. 250. P. 123–125.
8. Palczewski K., Buczilko J., Kaplan M.W., Polans A.S., Crabb J.W. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 12949–12955.
9. Sale G.J., Towner P., Akhtar M. // Biochem. J. 1978. V. 175. P. 421–430.
10. Овчинников Ю.А., Абдулаев Н.Г., Фейгина М.Ю., Артамонов И.Д., Золотарев А.С., Костина Н.В., Богачук А.С., Мирошников А.И., Мартынов В.И., Куделин А.Б. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. С. 1424–1427.
11. Sitaramayya A., Liebman P.A. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 1205–1209.
12. Aton B., Litman B.J. // Exp. Eye Res. 1984. V. 38. P. 547–559.
13. Miller J.L., Dratz E.A. // Vision Res. 1984. V. 24. P. 1509–1521.
14. Hargrave P.A., Fong S.L. // J. Supramol. Struct. 1977. V. 6. P. 559–570.
15. Овчинников Ю.А., Абдулаев Н.Г., Фейгина М.Ю., Артамонов И.Г., Богачук А.С. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. С. 1331–1340.
16. Ohguro H., Palczewski K., Ericsson L.H., Walsh K.A., Johnson R.S. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 5718–5724.
17. Wilden U., Kuhn H. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 3014–3022.
18. Ovchinnikov Y., Abdulaev N., Bogachuk A. // FEBS Lett. 1988. V. 28. P. 1–5.
19. Liebman P., Evanczuk T. // Methods Enzymol. 1982. V. 81. P. 532–542.
20. Takemoto D., Morrison D., Davis L., Takemoto L. // Biochem. J. 1986. V. 235. P. 309–312.
21. Phillips W., Cerione R. // Biochem. J. 1994. V. 299. P. 351–357.
22. Kuhn H., Dreyer W.J. // FEBS Lett. 1972. V. 20. P. 1–6.
23. Aton B.R., Litman B.J., Jackson M.L. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 1737–1741.
24. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
25. Senin I.I., Dean K.R., Zargarov A.A., Akhtar M., Philippov P.P. // Biochem. J. 1997. V. 321. P. 551–555.

The Effect of Proteolytic Removal of the C-Terminal Fragment of Rhodopsin on Its Ability to Activate Visual Cascade

K. E. Komolov, I. I. Senin, and P. P. Filippov[#]

[#]Phone: +7 (095) 939-5017; fax: +7 (095) 939-0978; e-mail: ppph@genebee.msu.ru

Department of Enzymology, Belozerskii Research Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

The role of the C-terminal domain of rhodopsin in the activation of transducin was studied. The treatment of photoreceptor membranes with trypsin, thermolysin, and Asp-N-endoprotease led to the respective rhodopsin species devoid of 9, 12-, or 19-aa C-terminal fragments. It was shown that the removal of 9-aa fragment by trypsin does not affect the catalytic activity of the receptor, whereas the thermolysin-induced truncation of the rhodopsin C-terminus by 12 aa about 1.5-fold enhances its activity. The Asp-N-endoprotease-assisted removal of 19 aa (i. e., the shortening by seven more C-terminal aa) virtually unchanges the rhodopsin catalytic activity compared to the preparation truncated with thermolysin. These results suggest that the part of the rhodopsin C-terminal fragment between the sites of its cleavage by trypsin and thermolysin (Val337–Ser338–Lys339) inhibits the signal transduction from rhodopsin to the next component of visual cascade. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cGMP phosphodiesterase, phosphorylation, photoreception, proteolysis, rhodopsin, visual cascade