

Применение спектральных методов для исследования родопсина — рецептора, сопряженного с G-белком. III. Эффект осмотического давления

© А.В. Струц^{1,2,3}, А.В. Бармасов^{1,2}, М.Ф. Brown³

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
194100 Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 Санкт-Петербург, Россия

³ University of Arizona,
Tucson, AZ 85721, USA

e-mail: struts@arizona.edu

Поступила в редакцию 28.10.2022 г.

В окончательной редакции 06.01.2023 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

Обобщены результаты исследований рецептора, сопряженного с G-белком, родопсина с использованием осмотического давления. Несмотря на установленное присутствие небольшого количества структурной воды в этих рецепторах, влияние объемного растворителя (воды) на их функционирование остается малоизученным. Исследования с применением осмотического давления позволили получить уникальные данные о роли воды в активации родопсина. Обнаружено, что осмолиты в зависимости от их молекулярного веса сдвигают равновесие в сторону либо активного (низкомолекулярные осмолиты), либо неактивного состояния (высокомолекулярные). Экспериментально показано, что примерно 80 молекул воды попадают в родопсин при его активации. Это является необходимым условием активации, и в случае блокирования входа воды в белок, например, высокомолекулярными осмолитами или дегидратацией рецептор не переходит в активное состояние. Полученные результаты позволяют предложить новую модель активации рецепторов, сопряженных с G-белком, в которой протеин набухает и частично разворачивается при переходе в активное состояние. Таким образом, вода действует как мощный модулятор функционирования родопсина-подобных белков.

Ключевые слова: мембраны, оптическая спектроскопия, рецепторы, сопряженные с G-белком, родопсин, сигнальная трансдукция.

DOI: 10.21883/OS.2023.01.54549.4261-22

Введение

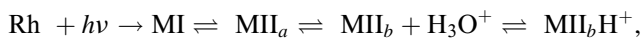
Настоящая работа представляет собой третью часть серии работ авторов по изучению родопсина с использованием спектральных методов [1,2]. Здесь обобщены результаты исследований с применением осмотического давления. Рецепторы, сопряженные с G-белками, вовлечены в регулирование многих процессов в организмах позвоночных посредством передачи сигнала через клеточную мембрану. Так как нарушение функционирования сигнальных путей приводит к многочисленным заболеваниям, они являются объектами действия многих лекарственных препаратов, предназначенных для регулирования их активности [3–6]. Рецепторы представляют собой трансмембранные белки, и в настоящее время после существенного прогресса в методах их кристаллизации структуры многих рецепторов были исследованы методом рентгеноструктурного анализа [7–9]. Хотя рентгеноструктурный анализ предоставил значительный объем информации о строении рецепторов в различных состояниях, включая активное состояние, специфические особенности условий метода (низкие температуры,

значительная дегидратация и отсутствие естественного мембранного окружения) не позволяют дать полную картину функционирования рецепторов. Так, недавние исследования родопсина (рецептора темного зрения) методами малоуглового и упругого нейтронного рассеяния [10,11] свидетельствуют, что протеин набухает за счет поглощения воды при переходе в активное состояние. Это подтверждается также молекулярно-динамическими (МД) расчетами [12,13]. Кроме того, исследование методом широкоугового рентгеновского рассеяния [14] указывает, что при относительно высоких температурах (20°C) структурные изменения родопсина при активации могут быть существенно больше, чем выявлено рентгеноструктурным анализом. В связи с этим необходимы количественные данные об изменении объема родопсина в активном состоянии. В настоящей работе мы представляем анализ исследований родопсина с использованием осмотического давления, которые идеально подходят для выяснения количества поглощаемой или выделяемой воды в процессе активации, и обсуждаем роль воды в этом процессе, которая неожиданно

оказалась значительно более важной, нежели просто роль среды для клеточных компонентов.

Оценка изменения гидратации родопсина при активации

Активация родопсина происходит после поглощения фотона 11-*цис*-ретиналем и его изомеризации в полностью *транс*-конформацию. Общая схема реакции активации родопсина может быть описана следующей временной последовательностью [15–18]:



где Rh — родопсин в темновом состоянии с 11-*цис*-ретиналем, ковалентно связанным с родопсином через протонированное основание Шиффа, MI — преактивное состояние с полностью *транс*-ретиналем и протонированным основанием Шиффа, MII_a — состояние с депротонированным основанием Шиффа еще в неактивной конформации, MII_b — активное состояние, MII_bH⁺ — активное состояние, дополнительно стабилизированное протонированным остатком Glu¹³⁴. Следует отметить, что последние четыре состояния заполняют энергетический ландшафт и находятся в динамическом равновесии после фотоактивации, которое может быть смещено за счет изменения условий окружающей среды (рН, температуры или состава мембраны) [17,19–21]. Состояния MII_b характеризуются поворотом цитоплазматического конца трансмембранной спирали 6 (ТМН6) в сторону от остальной части спиральной связки, который открывает связывающую полость (центр) для G-белка трансдуцина. Это активирующее движение спирали 6 вместе с удлинением спирали 5 свидетельствует об увеличении объема рецептора и внутренней гидратации [7,11,18,22,23].

Применение протокола осмотического стресса использовалось для измерения изменений количества молекул воды, связанных с функциональной активностью водорастворимых ферментов, таких как гемоглобин [24], гексокиназа [25], аденозиндезаминаза [26], а также мембранных белков: калиевые каналы [27], аламецитин [28], натриевые каналы [29], цитохром с оксидазой [30]. В случае мембранных белков следует также учитывать взаимодействие воды с мембранными липидами. Изменения активности воды влияют на упаковку ацильных цепей фосфолипидов [31], толщину двойного слоя мембраны [32,33], кривизну ее слоев [20] и коэффициент латеральной диффузии фосфолипидов [34].

Ранее влияние гидратации на активацию родопсина и на упаковку ацильных цепей в мембране диска наружного сегмента палочек изучалось с использованием глицерина, сахарозы и осмолитов стахиозы [35] (рис. 1). Константа равновесия для перехода от неактивного MI к активному MII состоянию, $K_{\text{eq}} = [\text{MII}]/[\text{MI}]$, рассчитывалась по полосам поглощения MI и MII, рис. 1, а. На

вкладке рис. 1, а приведены спектры поглощения родопсина в дисковых мембранах до и после засветки [36]. Во-первых, разностные спектры (4)–(1), (3)–(1) и (4)–(3), соответствующие 100%-содержанию родопсина и оксима ретиная, $f_1 = 1$, незасвеченной, f_2 , и засвеченной, f_3 , фракциям, моделировались, используя следующую функцию [36]:

$$\begin{aligned} A(\lambda)_n = & f_n A_{\text{ox}} \left\{ \exp\left(-\left[\left(\frac{1}{\lambda} - \frac{1}{\lambda_{\text{ox}}}\right) / W_{\text{ox},l}\right]^{P_{\text{ox},l}}\right)\right\} \\ & + \exp\left(-\left[\left(\frac{1}{\lambda} - \frac{1}{\lambda_{\text{ox}}}\right) / W_{\text{ox},h}\right]^{P_{\text{ox},h}}\right)\right\} \\ & - f_n A_{\text{rho}} \left\{ \exp\left(-\left[\left(\frac{1}{\lambda} - \frac{1}{\lambda_{\text{rho}}}\right) / W_{\text{rho},l}\right]^{P_{\text{rho},l}}\right)\right\} \\ & + \exp\left(-\left[\left(\frac{1}{\lambda} - \frac{1}{\lambda_{\text{rho}}}\right) / W_{\text{rho},h}\right]^{P_{\text{rho},h}}\right)\right\}, \end{aligned} \quad (1)$$

где A_i — поглощение компонента i на длине волны максимального поглощения λ_i , $W_{i,j}$ и $P_{i,j}$ характеризуют ширину и показатель степени компонента i на длинах волн ниже ($j = l$) и выше ($j = h$) максимума. После определения параметров, характеризующих спектры родопсина и оксима ретиная, из разностных спектров (2)–(1), (2)–(3) и (2)–(4) вычли вклад этих компонентов и получили спектры, содержащие только профили поглощения состояний MI и MII. Последние три разностные спектра почти аналогичны друг другу. Они моделировались, используя функцию, аналогичную функции (1), и затем усреднялись, чтобы получить окончательный спектр равновесного состояния MI-MII (рис. 1, а) [36]. Изменение количества молекул воды, связанных с белком, при активации, ΔN_w , определяется наклоном зависимости величины $\ln K_{\text{eq}}$ от концентрации осмолитов [37] (рис. 1, б):

$$\ln K_{\text{eq}} = -\Delta N_w \frac{[\text{osmolal}]}{55.6}. \quad (2)$$

Осмоляльность растворов определяли с помощью осмометра давления паров.

Кроме того, анализ спада анизотропии флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГ) в рамках модели вращательной диффузии показал, что угловая ширина ориентационного распределения ДФГ относительно нормали к мембране сужается при повышенной осмоляльности. Ориентационная свобода ДФГ характеризовалась параметром f_v [38] (рис. 1, с), который определяется как

$$f_v = \frac{1}{2f(\theta)_{\text{max}}}. \quad (3)$$

Функция углового распределения $f(\theta)$ задается как

$$f(\theta) = N^{-1} \exp[\lambda_2 P_2(\cos \theta) + \lambda_4 P_4(\cos \theta)],$$

где $P_2(\cos \theta)$ и $P_4(\cos \theta)$ — полиномы Лежандра 2-го и 4-го порядков, а N — нормировочная постоянная. Концентрационные зависимости $\ln K_{\text{eq}}$ и f_v показывают, что осмоляльность раствора увеличивает равновесную

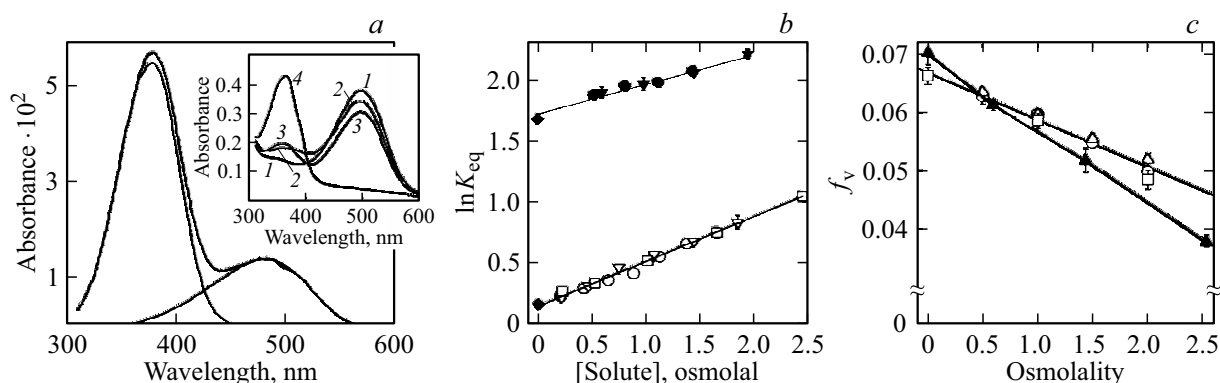


Рис. 1. (a) Пример разностного спектра равновесных состояний MI и MII родопсина в умеренно обработанных ультразвуком дисковых мембранах при pH 7.0 и $T = 30^{\circ}\text{C}$ с рассчитанными индивидуальными спектрами для MI (правая компонента спектра) и MII (левая компонента; см. текст). На вкладке показаны спектры поглощения родопсина, из которых был получен вышеуказанный спектр. Спектр (1) был измерен до засветки, спектр (2) — после частичной засветки образца, спектр (3) — после добавления гидроксиламина, спектр (4) — после полной засветки в присутствии гидроксиламина. (b) Эффект осмолитов на константу равновесия K_{eq} неактивного и активного состояний при 20 и 35°C; наклон каждой линии равен $-\Delta N_w/55.6$, где ΔN_w — изменение числа молекул воды в частях белка, недоступных осмолитам: (O) глицерин, 20°C; (Δ) сахароза, 20°C; (\square) стахиоза, 20°C; (\bullet) глицерин, 35°C; (\blacktriangle) сахароза, 35°C; (\blacklozenge) контроль, при обеих температурах. (c) Влияние осмоляльности на параметр f_v при 20 и 35°C: (O) глицерин, 20°C; (Δ) сахароза, 20°C; (\square) стахиоза, 20°C; (\blacktriangle) сахароза, 35°C. Рисунок адаптирован из работ [35,36].

концентрацию MII и одновременно увеличивает упаковку ацильных цепей в мембране, что противоречит ранее опубликованным наблюдениям [39].

Согласно рис. 1, b, смещение равновесия метародопсина к активному состоянию MII осмолитами означает, что это состояние менее гидратировано. Было подсчитано, что при переходе от MI к MII при 20°C выделяется 20 молекул воды, а при 35°C выделяется 13 молекул воды [35]. Следует отметить, что рентгеноструктурные исследования не чувствительны к движению объемной воды при активации рецептора, и выявляют лишь несколько структурных молекул воды, присутствующих в неактивном темновом и активном состояниях родопсина. Напротив, молекулярно-динамические расчеты [12] показали приток около 80 молекул воды в родопсин, связанный с его активирующим движением спиралей. Кроме того, исследования рассеяния нейтронов показали, что радиус инерции сечения родопсина и гидратация увеличиваются в процессе активации [10,11]. В связи с этим возникает вопрос: является ли активное состояние MII более или менее гидратированным по сравнению с неактивным темновым состоянием?

Является ли MI или MII более гидратированным?

Чтобы разрешить это противоречие между результатами различных методов (вода поглощается или выходит из рецептора при активации), влияние гидратации на активацию родопсина было изучено с использованием ряда полимерных осмолитов с различной молекулярной массой [40] (рис. 2). Водорастворимые полимеры (полиэтиленгликоль, PEG) были выбра-

ны для контроля гидратации родопсина из-за относительно высокого осмотического давления (Π), которое может быть достигнуто (> 10 МПа). Долю активного состояния MII контролировали с помощью УФ и видимой спектроскопии (рис. 2, a). Разностные спектры (засвеченное минус темновое состояние) родопсина в дисковых мембранах (рис. 2, a) моделировались как линейная комбинация базисных разностных спектров состояний MI $\Delta A_{\text{MI}}(\lambda)$ и MII $\Delta A_{\text{MII}}(\lambda)$, полученных при pH 9.5 и 10°C или pH 5 и 21°C соответственно: $\Delta A(\lambda) = (1 - \theta)\Delta A_{\text{MI}}(\lambda) + \theta\Delta A_{\text{MII}}(\lambda)$. Доля состояния MII, θ , использовалась как подгоночный параметр и определялась либо из моделирования разностных спектров поглощения засвеченного состояния, либо рассчитывалась из точки пересечения разностным спектром оси абсцисс, λ_0 : $\theta = (\lambda_0 - \lambda_{\text{MI}})/(\lambda_{\text{MII}} - \lambda_{\text{MI}})$, где λ_{MI} и λ_{MII} — длины волн, при которых базисные разностные спектры состояний MI и MII пересекают ось абсцисс соответственно [40,41]. Кривые pH-титрования родопсина прямо показывают, как полимерные осмолиты обратимо сдвигают равновесие метародопсина либо в неактивное (закрытое) состояние MI, либо в активное (открытое) состояние MII (рис. 2, b, c). Для такого белка, как родопсин, по закону действующих масс обратное смещение равновесия в неактивное состояние MI означает, что в прямом направлении (переход из состояния MI в состояние MII) происходит приток воды в рецептор. Почти линейные изотермы для различных осмолитов (зависимость $\ln K$ от Π , рис. 2, c), показывают отрицательный наклон для осмолитов с большой молярной массой (M_T) (PEG 1500 и PEG 400), но положительный наклон для малых осмолитов (PEG 300 и PEG 200). Таким образом, осмолиты с большой молярной массой благоприятствуют неактивному состоянию MI (закры-

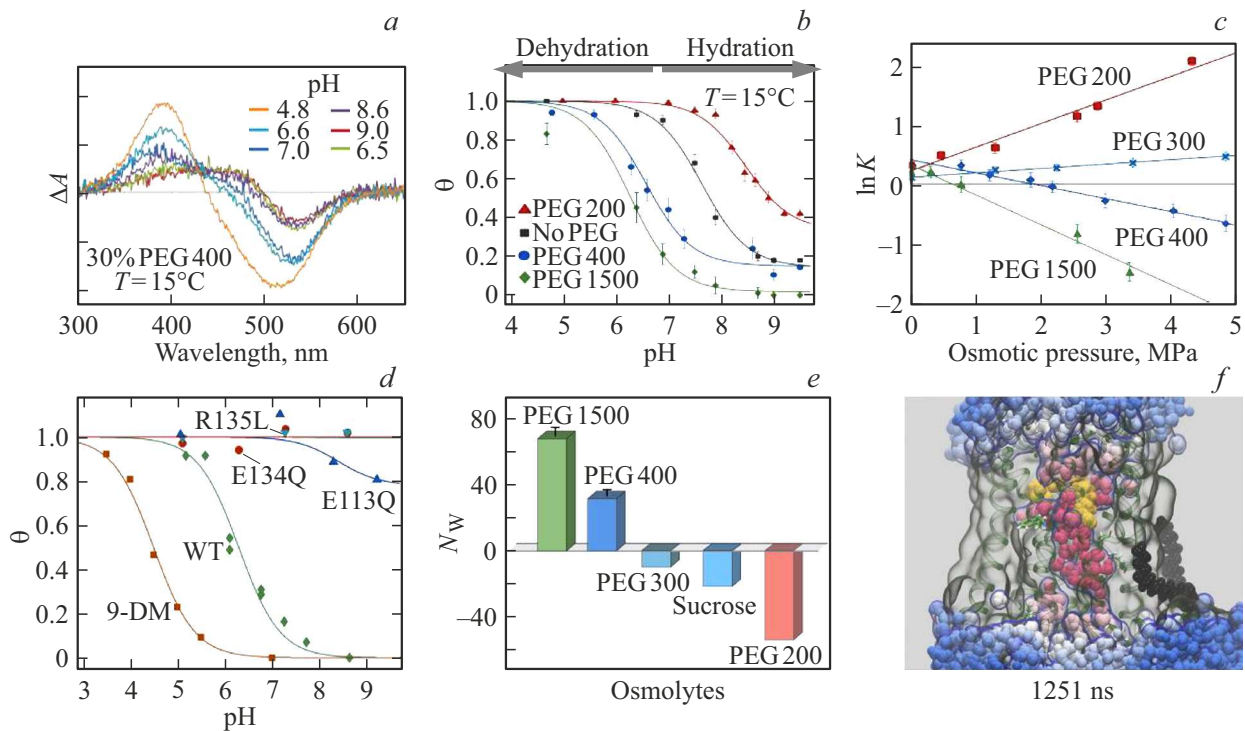


Рис. 2. (a) Примеры разностных оптических спектров поглощения родопсина (засвеченное минус темновое состояния). (b) Зависимость доли активного состояния МП (θ) от pH, показывающая эффект контролируемой гидратации ($T = 15^\circ\text{C}$) для осмолитов различной молекулярной массы (M_r) (30–35% масс полиэтиленгликоль, PEG). (c) График зависимости натурального логарифма отношения фракций метародопсинов I и II (МП/МИ), $\ln K$, от осмотического давления (Π) для различного размера осмолитов PEG (pH 7.4, $T = 15^\circ\text{C}$). (d) Сравнение зависимостей доли активного состояния МП (θ) от pH для природного родопсина (WT) в естественных ретинальных дисковых мембранах (РДМ) при $T = 0^\circ\text{C}$ с мутантами E113Q, R135L и E134Q в искусственных фосфатидилхолиновых мембранах ($T = 10^\circ\text{C}$) и с родопсином, регенерированным с аналогом ретиналя, являющимся антагонистом с отсутствующей метильной группой в положении углерода C9 (9-desmethylretinal, 9-DM) в РДМ ($T = 20^\circ\text{C}$) [42–44]. (e) Кажущееся число (N_w) молекул воды, поглощенное или выделенное при активации родопсина для осмолитов PEG и сахарозы. (f) Снимок из молекулярно-динамических расчетов родопсина на 1.25 ms после изомеризации ретиналя *in silico* [12]. Молекулы воды (показаны красным цветом) заполняют центр связывания трансдуцина и канал, соединяющий этот центр с лигандом ретиналем. Рисунок из работы [40].

той конформации). С другой стороны, небольшие осмолиты увеличивают долю активного (открытого) состояния МП в соответствии с предыдущей работой [35]. Однако, поскольку наблюдается вывод воды крупными осмолитами и при этом происходит сдвиг равновесия в неактивное состояние МИ, можно сделать вывод, что активное состояние МП более гидратировано.

Мы предполагаем, что противоположный вывод статьи [35] основан на использовании относительно небольших осмолитов, которые проникают в полость связывания трансдуцина (G-белка родопсина) и не могут полностью вывести воду из рецептора. По той же причине количество молекул воды, попадающих в рецептор при активации, следует рассчитывать для самых крупных осмолитов, полностью исключенных из родопсина. Константа равновесия между состояниями МИ и МП ($K = [\text{МП}]/[\text{МИ}]$) зависит от осмотического давления Π как

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial \Pi}\right)_T = -\frac{\Delta V^\circ}{RT}, \quad (4)$$

где $\Delta V^\circ \approx N_w \bar{V}_w$ — стандартное изменение избыточного (парциального) объема воды начального и конечного состояний, число молекул воды равно N_w , \bar{V}_w — парциальный молярный объем воды. Таким образом, мы оцениваем приток воды при фотоактивации примерно в 80 молекул воды. Для частично исключенных полимеров ($< \text{PEG } 400$), которые могут проникать в полости белка, кажущееся изменение объема определяется выражением $\Delta V_{\text{app}} = \Delta V^\circ(1 - P)$, где P — коэффициент разделения между раствором и белком. Это означает уменьшение кажущегося гидратированного объема родопсина при активации в присутствии малых осмолитов. Однако мы наблюдали отрицательное значение ΔV_{app} для малых осмолитов (сахароза, PEG 200, рис. 2, e). Очевидно, отрицательный кажущийся гидратированный объем связан не с реальным притоком или выводом воды, как для крупных осмолитов, а со сдвигом равновесия метародопсина в активное состояние МП.

Одно из возможных объяснений изменения знака ΔV_{app} для малых осмолитов состоит в том, что эта

тенденция связана с взаимодействием малых осмолитов с липидами, поскольку осмотическое взаимодействие с белком снижается при частичном или полном проникновении осмолитов в полость связывания трансдуцина. В этом случае дегидратация мембраны увеличивает ее толщину, как показано методами твердотельной ^2H ЯМР-спектроскопии [32,33]. Дегидратация также может привести к большей величине отрицательной спонтанной кривизны монослоя, как описано в модели гибкой поверхности мембраны [20]. Оба эффекта будут способствовать образованию активного состояния МП в липидных бислоях [20,45,46]. Кроме того, экспериментальные исследования родопсина в мицеллах додецилмальтозида (ДДМ) методом ЭПР с использованием спиновых меток, расположенных в определенных участках белка [47], показали, что небольшой осмолит сахараза смещает равновесие в сторону компонента МI. Поскольку смещение к МП отсутствует в системе, солюбилизированной детергентом, это свидетельствует о роли липидного двойного слоя в стабилизации активного состояния в присутствии небольших осмолитов. Однако с другой стороны, возросшие параметры порядка сегментарного движения липидов в случае увеличения толщины бислоя мембраны могут свидетельствовать о сниженной гибкости липидов, что, как правило, подавляет активацию родопсина. Следовательно, влияние липидов может быть сложным, и результирующий эффект не очевиден и требует дальнейших исследований. Другие факторы также следует учитывать для малых осмолитов.

Частичное проникновение малых осмолитов в белок может также отводить воду из более мелких внутренних полостей, связанных с переходом МI—МП [6,7,48,49]. Одним из примеров являются недавние эксперименты по прямой гидратации, отслеживающие связанную воду с помощью инфракрасной спектроскопии в опсине и мутанте E134Q, которые позволяют предположить, что Glu¹³⁴ консервативного мотива E(D)RY представляет собой центр гидратации на границе раздела белок-липид, который дегидратируется при переходе от МI_b в состояние МI_b • H⁺ [50]. Локальная дегидратация небольших участков белка, таких как эти, согласуется со стабилизацией МП небольшими осмолитами [35] (рис. 1, b, 2, b, c).

Переход в состояние МП также можно объяснить специфическим взаимодействием малых осмолитов с полостью связывания трансдуцина. Известно, что специфические взаимодействия PEG—белок обратно пропорциональны размеру PEG [51]. Тем не менее мы не наблюдали существенного связывания малых осмолитов с родопсином (см. ниже).

Для исследования роли различных функциональных групп в активации белка часто используют мутации по этим группам (мутагенез). На рис. 2, d приведены кривые титрования для мутантов E113Q, R135L и E134Q, стабилизирующих активное состояние рецептора, а также родопсина, регенерированного с аналогом ретиналя с

отсутствующей метильной группой в положении углерода C9 (9-desmethylretinal, 9-DM) [42–44], который благоприятствует сдвигу в неактивное состояние. Очевидно, что эффект мутаций E113Q, R135L и E134Q схож с влиянием малых осмолитов, а замена 11-*цис*-ретиналя на 9-DM-ретиналь воздействует на активацию так же, как большие осмолиты. Однако каковы механизмы влияния этих столь различных факторов? Действие мутаций E113Q, R135L и E134Q связано с нарушением первого (в случае E113Q) и второго (в случае R135L и E134Q) ионных замков, стабилизирующих неактивную конформацию родопсина вследствие нейтрализации аминокислотных остатков Glu¹¹³, Asp¹³⁵ и Glu¹³⁴. 9-DM-ретиналь из-за отсутствия метильной группы, по-видимому, не способен поддерживать положение и ориентацию β -ионного кольца между спиралями 5 и 6, необходимые для активирующего поворота спирали 6. Действие осмолитов в основном базируется на осмотическом взаимодействии с связывающим сайтом трансдуцина в родопсине. Отметим также, что влияние pH на сдвиг равновесия между МI и МП связано с протонированием Glu¹³⁴ и основания Шиффа (см. ниже), а изменение температуры — с изменением вклада энтропии в свободную энергию фотоактивированного родопсина. Таким образом, механизмы воздействия различных факторов на активацию отличаются, однако в конечном счете влияние всех факторов сводится к изменению свободной энергии фотопродукта.

Влияние гидратации на связывание G-белка с родопсином

Было установлено, что повышенная гидратация способствует связыванию C-концевой α -спирали G-белка трансдуцина с родопсином, тогда как обезвоживание вызывает его отделение [40]. На рис. 3 представлена зависимость доли активного состояния МП в нативной мембране диска сетчатки от концентрации аналога C-концевого пептида трансдуцина (аминокислотная последовательность ILENLKDVGLF) в присутствии различных осмолитов. Данный пептид обладает высокой аффинностью связывания с родопсином и стабилизирует при связывании активное состояние МП. Сопоставление изотерм связывания (рис. 3, a, b) показало, что более крупные полимеры (PEG 1500 и PEG 400) снижают аффинность связывания на порядок. Это означает, что взаимодействие крупных осмолитов и пептида трансдуцина с белком является конкурентным. Для более мелких осмолитов ($M_r < 400$ Da) эффект отсутствует (вкладка на рис. 3, a). Таким образом малые осмолиты не конкурируют за связывание родопсина с пептидом трансдуцина и, следовательно, не связываются. Детальный анализ показывает, что для больших осмолитов константа связывания пептида коррелирует с протонированием Glu¹³⁴ консервативного мотива последовательности E(D)RY. Следовательно, вода не только управляет равновесием

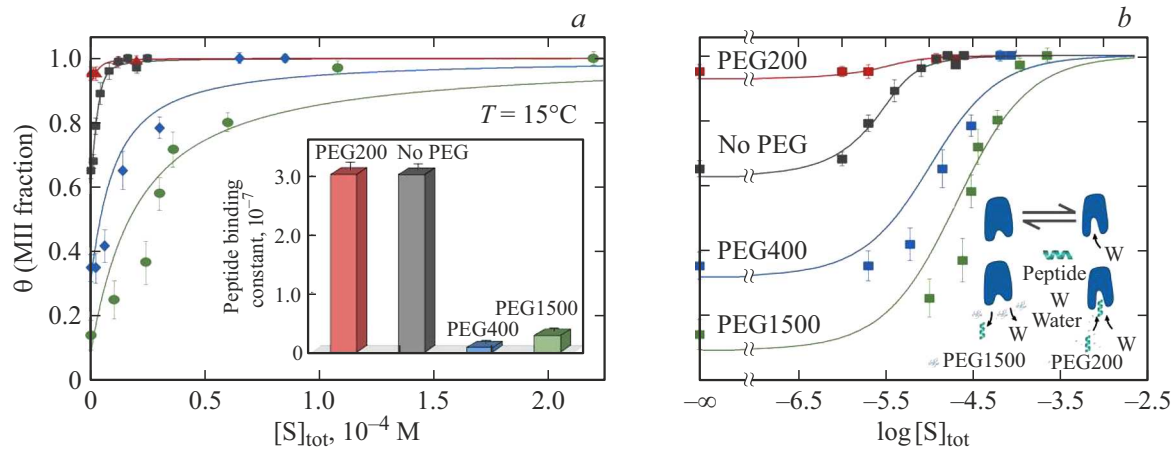


Рис. 3. (а) Зависимость доли активного состояния (θ) в природных ретиальных дисковых мембранах от общей концентрации ($[S]_{\text{tot}}$) аналога С-терминального пептида трансдуцина (рН 7.4, $T = 15^\circ\text{C}$). Экспериментальные данные аппроксимируются изотермой с одним центром связывания трансдуцина. Вкладка: влияние осмолитов различной молекулярной массы на константу связывания пептида. (б) Зависимость доли активного состояния (θ) от логарифма концентрации пептида $\log[S]_{\text{tot}}$. Вкладка иллюстрирует как аналог пептида трансдуцина конкурирует с большими осмолитами (PEG 400, PEG 1500) за взаимодействие с родопсином, в то время как малый осмолит PEG 200 не влияет на это взаимодействие. Рисунок из работы [40].

между активным и неактивным состояниями рецептора [52], но также влияет на связывание G-белка.

Расширенные исследования осмотического стресса

Дальнейшие исследования осмотического стресса проводились для расширенного диапазона значений рН, концентраций осмолитов и молекулярных масс. На рис. 4 показано, что влияние рН на активацию родопсина в диапазоне рН от 3 до 10 может быть описано феноменологическим уравнением Гендерсона–Хассельбаха, включающим два значения pK_A и щелочную конечную точку. Состояния родопсина отличаются наличием протонированного или депротонированного основания Шиффа (PSB или SB, обозначено нижним индексом, в то время как верхний индекс указывает заряд относительно MI, рис. 4, а). Более низкое значение pK_A (обозначено „Schiff base pK_A “ на рис. 4, а) отражает протонирование основания Шиффа при малых значениях рН, что снижает кажущуюся фракцию МП, обнаруживаемую с помощью УФ и видимой спектроскопии. Более высокая pK_A (обозначена „Glu¹³⁴ pK_A “) отражает протонирование Glu¹³⁴ в мотиве E(D)RY при понижении рН, которое дополнительно стабилизирует активную конформацию МП. Щелочная конечная точка при больших значениях рН соответствует субсостояниям МП, которые сохраняются при высоких температурах, даже когда Glu¹³⁴ полностью депротонирован. Как видно из рис. 4, б, малые осмолиты благоприятствуют образованию активного состояния как за счет сдвига значений pK_A в щелочную область, так и за счет повышения щелочной конечной точки. В то же время дегидратирующие осмолиты большой молекулярной массы уменьшают популяцию депротонированного

состояния МП, сдвигая значение pK_A в кислотную область, а также понижая щелочную конечную точку.

Увеличение диапазона концентраций и молекулярных масс осмолитов выявило эффекты сжимаемости для крупных осмолитов и эффекты насыщения для малых осмолитов соответственно. На рис. 5, а показано, что зависимость $\ln K$ и соответственно молярного объема гидратации для больших осмолитов от осмотического давления не является линейной, поэтому необходимо учитывать второй член в вириальном разложении $\ln K$ по осмотическому давлению:

$$\ln K = \ln K^\circ - \left(\frac{\Delta V^\circ}{RT}\right)\Pi + \left(\frac{1}{2}\Delta C\right)\Pi^2. \quad (5)$$

Сопоставление экспериментальных данных с этой квадратичной функцией дает изменение объема гидратации белка ΔV° между MI и MP и количество гидратирующих молекул воды на моль родопсина N_w в стандартных условиях (нулевое осмотическое давление). Используя соотношение $\Delta V^\circ \approx N_w \bar{V}_w$ для перехода MI–MP, где \bar{V}_w — парциальный молярный объем воды, для больших осмолитов PEG с молярной массой от 1000 до 6000 Da было рассчитано увеличение от 80 до 100 молекул воды при переходе в активное состояние МП. Изменение второго вириального коэффициента ΔC порядка 0.1 МПа⁻², по-видимому, соответствует изменениям осмотической сжимаемости на ~ 0.01 МПа⁻¹.

Осмолиты с малой молекулярной массой (PEG 200–PEG 600) влияют на родопсин по-другому: при малых концентрациях они проникают в связывающий карман трансдуцина и сдвигают $\ln K$ к состоянию МП. Однако при более высоких концентрациях наблюдается эффект насыщения, выше которого равновесие смещается обратно к MI, что похоже на

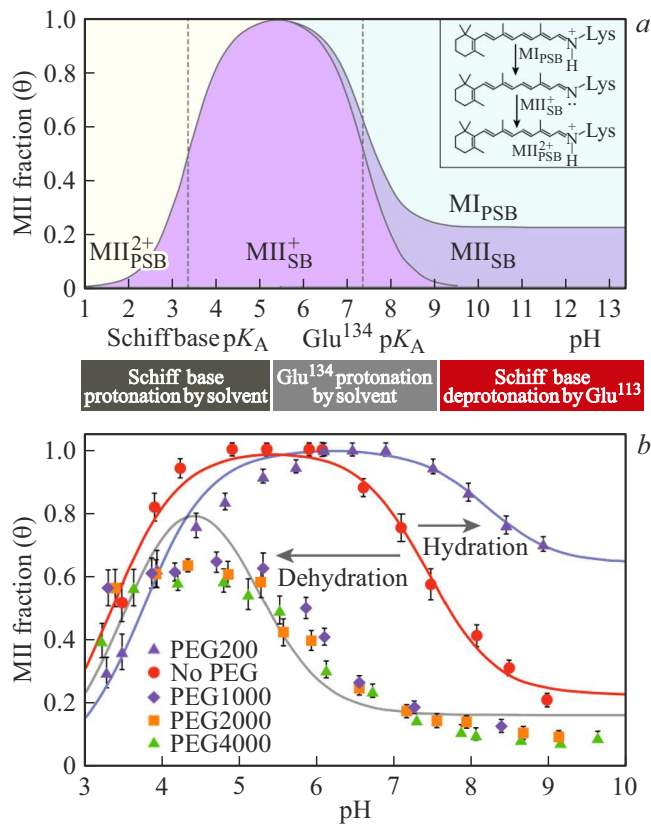


Рис. 4. (а) Влияние рН на активацию родопсина. Более низкая pK_A (обозначена „Schiff base pK_A “ на рисунке) отражает протонирование основания Шиффа. Более высокая pK_A (обозначена „Glu¹³⁴ pK_A “) отражает протонирование Glu¹³⁴, которое стабилизирует полностью активное состояние МII. (b) Осмотический стресс от осмолитов с большой молекулярной массой (50% масс при $T = 15^\circ\text{C}$) изменяет величину pK_A глутамата 134 с 7.4 до 5.2, уменьшая долю состояния МII. При 30% w/w PEG 200 ($T = 15^\circ\text{C}$) pK_A глутамата 134 максимально сдвинута к рН 8.2, благоприятствуя образованию активного состояния МII. Рисунок из работы [41].

поведение больших осмолитов. С увеличением PEG диапазон сдвига к активному состоянию сужается. Мы уже обсуждали выше причины, по которым малые осмолиты могут сдвигать равновесие метародопсина к активному состоянию. Что касается эффекта насыщения, то очевидно, что при малых концентрациях осмолиты проникают в полость связывания трансдуцина без ограничений. Однако при увеличении концентрации они не могут иметь одинаковое пространственное распределение внутри и снаружи полости связывания из-за ее (полости) ограниченных размеров. Следовательно, внешняя концентрация становится больше внутренней, и они начинают оказывать такой же осмотический стресс на белок, как и крупные осмолиты. Такой универсальный тренд для больших и малых осмолитов дополнительно подтверждает справедливость нашего заключения о гидратации родопсина при активации.

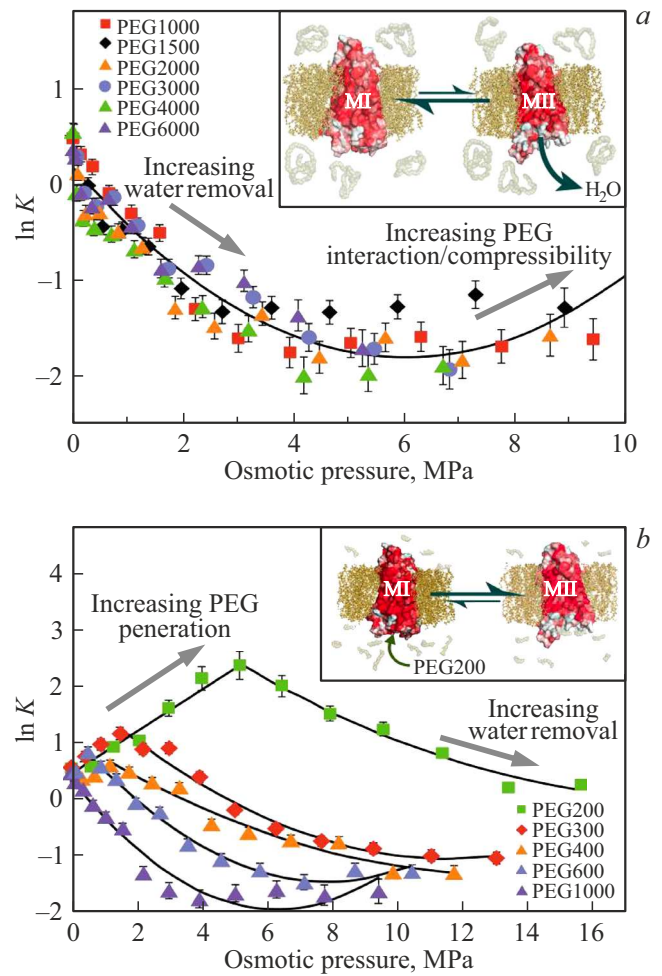


Рис. 5. Зависимости натурального логарифма константы равновесия состояний MI и MII ($K = [\text{MII}]/[\text{MI}]$) от осмотического давления для больших (а) и малых (b) осмолитов демонстрируют различие их воздействия на протеин, однако показывают сходный (универсальный) тренд для полимеров, исключенных из родопсина при больших концентрациях; $T = 15^\circ\text{C}$. Вкладка (а): равновесие MI–MII сдвинуто к неактивному состоянию MI вследствие дегидратации родопсина большими осмолитами, которые полностью исключены из протеина. Вкладка (b): малые осмолиты проникают в связывающий карман G-белка и стабилизируют активное состояние МII. Рисунок из работы [41].

Отметим, что высокое гидростатическое давление так же, как осмотический стресс, сдвигает равновесие метародопсина в сторону неактивного состояния [53]. Однако механизмы их воздействия совершенно различны. Гидростатическое давление приводит к изменению молярного объема протеина (т.е. плотности), но не к изменению числа молекул воды в рецепторе. Увеличение плотности может включать проникновение молекул воды в малые пустоты или их (пустот) коллапс или альтернативно сольватную оболочку высокой плотности по сравнению с объемной водой [54]. Напротив, в случае осмотического давления происходит изменение гидратации белка

через (виртуальную) поверхность Гиббса, отделяющую внутренний объем родопсина от наружной объемной воды. Таким образом, два способа дополняют друг друга, позволяя получить более полную картину активации родопсина в гидратированной липидной мембране. По аналогии с эффектом давления на сворачивание белков МІ можно считать более плотно упакованным состоянием, в котором минимизирован объем пустот и объем растворителя во внутренних пустотах, в то время как МІІ является менее плотным состоянием с увеличенным содержанием воды в сформированном кармане для связывания трансдуцина.

Однако возникает вопрос: почему при высоких концентрациях осмолитов большой молекулярной массы, когда проявляется эффект сжимаемости протеина, он приводит к сдвигу в активное состояние, тогда как гидростатическое сжатие сдвигает равновесие в сторону неактивного состояния? Во-первых, следует подчеркнуть, что сложно дать однозначную интерпретацию второму вириальному коэффициенту в формуле (5). Если основной вклад в него вносит сжимаемость, которая связана с флуктуациями гидратированного объема протеина, то знак коэффициента указывает, что сжимаемость увеличивается при переходе в активное состояние МІІ. Большие флуктуации объема состояния МІІ хорошо согласуются с моделью гидратированного разбухшего протеина в активном состоянии. Альтернативный вклад во второй вириальный коэффициент возможно связан с взаимодействиями осмолитов с протеином, благоприятствующими сдвигу равновесия метародопсина в активное состояние, например, как указывалось выше, с центром гидратации Glu¹³⁴. Для больших осмолитов при низких концентрациях преобладающим является сдвиг равновесия в неактивное состояние, но по мере увеличения концентрации осмолитов они могут больше проникать в связывающий карман трансдуцина в родопсине, и вышеуказанные взаимодействия осмолитов с протеином могут усиливаться. Таким образом, комбинация изменения сжимаемости и специфических взаимодействий осмолитов с протеином могут вносить вклад во второй вириальный коэффициент ΔC в нелинейном члене формулы (5).

Роль гидратации в активации родопсина и трансдуцина

Биологическая значимость рассмотренных результатов состоит в том, что приток воды внутрь белка обеспечивает поглощение протона глутаматом 134 консервативного мотива ERY, что дает субсостояние МІІ_bH⁺ с высокой гидратацией и высоким сродством к трансдуцину. Открытие центра связывания G-белка позволяет связывать Gt•GDP с помощью $\alpha 5$ -спирали С-конца трансдуцина. Однако для обеспечения высокой скорости активации трансдуцина он не может оставаться

прочно связанным. G-белок должен быстро высвободиться после замены нуклеотидов. Мы предполагаем, что цикл гидратации–дегидратации вместе с тепловыми колебаниями спиралей родопсина способствуют высокой скорости связывания и высвобождения G-белка. Связывание трансдуцина дегидратирует родопсин и сдвигает равновесие к неактивному состоянию МІ. Кроме того, замена GTP на GDP приводит к диссоциации субъединиц трансдуцина G $\beta\gamma$ и локальной дегидратации родопсина по аналогии с большими полимерными осмолитами, что дает частично гидратированное субсостояние МІІ_b. В результате трансдуцин катализирует собственное высвобождение, выталкивая субъединицу Ga•GTP из связывающего кармана родопсина.

Заключение

Результаты, обсуждаемые в настоящей статье, показывают, что активация родопсина связана с крупномасштабными изменениями внутренней гидратации белка. Они однозначно свидетельствуют о поступлении 80–100 молекул воды в белок при переходе из неактивного состояния МІ в активное состояние МІІ. Мы описываем противоположное влияние больших и малых осмолитов на установившееся после фотоактивации равновесие метародопсина, когда растворенные вещества с большой молярной массой, полностью исключенные из родопсина, дегидратируют белок. Они смещают равновесие к неактивному состоянию, тогда как малые осмолиты проникают в полость связывания трансдуцина и увеличивают долю активного состояния. Кроме того, было показано, что гидратация влияет на взаимодействие рецептора с G-белком, где в зависимости от степени гидратации сродство (аффинность) связывания трансдуцина может изменяться на порядок. Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на функционирование родопсина, где вода действует как мощный аллостерический модулятор активации родопсина и его взаимодействия с белком-эффектором.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке грантов Национального научного фонда США (СHE1904125 и MCB1817862) и Национальных институтов здравоохранения США (EY012049 и EY026041) (М.Ф.Б.). А.В.С. выражает благодарность за частичную поддержку грантом Санкт-Петербургского государственного университета 51142660. А.В.С. и А.В.Б. поддерживались грантом Российского фонда фундаментальных исследований 16-04-00494А.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A.B. Струц, A.B. Бармасов, M.F. Brown. *Опт. и спектр.*, **118**, 742 (2015). DOI: 10.7868/S0030403415050244
- [2] A.B. Струц, A.B. Бармасов, M.F. Brown. *Опт. и спектр.*, **120**, 298 (2016). DOI: 10.7868/S0030403416010207
- [3] N.R. Latorraca, A.J. Venkatakrishnan, R.O. Dror. *Chem. Rev.*, **117**, 139 (2017). DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00177
- [4] D. Hilger, M. Masureel, B.K. Kobilka. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 4 (2018). DOI: 10.1038/s41594-017-0011-7
- [5] W.I. Weis, B.K. Kobilka. *Annu. Rev. Biochem.*, **89**, 897 (2018). DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-033910
- [6] A.J. Venkatakrishnan, A.K. Ma, R. Fonseca, N.R. Latorraca, B. Kelly, R.M. Betz, R.O. Dror. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **116**, 3288 (2019). DOI: 10.1073/pnas.1809251116
- [7] H.-W. Choe, Y.J. Kim, J.H. Park, T. Morizumi, E.F. Pai, N. Krauß, O.P. Ernst. *Nature*, **471**, 651 (2011). DOI: 10.1038/nature09789
- [8] S.G.F. Rasmussen, H.-J. Choi, J.J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P.S. Chae, B.K. Kobilka. *Nature*, **469**, 175 (2011). DOI: 10.1038/nature09648
- [9] Y. Kang, X.E. Zhou, X. Gao, Y. He, W. Liu, A. Ishchenko, H.E. Xu. *Nature*, **523**, 561 (2015). DOI: 10.1038/nature14656
- [10] U.R. Shrestha, S.M.D.C. Perera, D. Bhowmik, U. Chawla, E. Mamontov, M.F. Brown, X.-Q. Chu. *J. Phys. Chem. Lett.*, **7**, 4130 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpcclett.6b01632
- [11] S.M.D.C. Perera, U. Chawla, U.R. Shrestha, D. Bhowmik, A.V. Struts, S. Qian, M.F. Brown. *J. Phys. Chem. Lett.*, **9**, 7064 (2018). DOI: 10.1021/acs.jpcclett.8b03048
- [12] N. Leioatts, B.M. Mertz, K. Martínez-Mayorga, T.D. Romo, M.C. Pitman, S.E. Feller et al. *Biochemistry*, **53**, 376 (2014). DOI: 10.1021/bi4013947
- [13] L.A. Salas-Estrada, N. Leioatts, T.D. Romo, A. Grossfield. *Biophys. J.*, **114**, 355 (2018). DOI: 10.1016/j.bpj.2017.11.021
- [14] E. Malmerberg, P.H.M. Bovee-Geurts, G. Katona, X. Deupi, D. Arnlund, C. Wickstrand, R. Neutze, *Sci. Signal.*, **8**, ra26 (2015). DOI: 10.1126/scisignal.2005646
- [15] E. Zaitseva, M.F. Brown, R. Vogel. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 4815 (2010). DOI: 10.1021/ja910317a
- [16] B. Knierim, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, W.L. Hubbell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 20290 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0710393104
- [17] M. Mahalingam, K. Martínez-Mayorga, M.F. Brown, R. Vogel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 17795 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0804541105
- [18] C. Altenbach, A.K. Kusnetzow, O.P. Ernst, K.P. Hofmann, W.L. Hubbell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 7439 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0802515105
- [19] O. Soubias, K. Gawrisch. *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 234 (2012). DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.08.034
- [20] M.F. Brown. *Annu. Rev. Biophys.*, **46**, 379 (2017). DOI: 10.1146/annurev-biophys-070816-033843
- [21] S.D.E. Fried, J.W. Lewis, I. Szundi, K. Martínez-Mayorga, M. Mahalingam, R. Vogel, M.F. Brown. *Biophys. J.*, **120**, 440 (2021). DOI: 10.1016/j.bpj.2020.11.007
- [22] Z. Salamon, Y. Wang, M.F. Brown, H.A. Macleod, G. Tollin. *Biochemistry*, **33**, 13706 (1994). DOI: 10.1021/bi00250a022
- [23] Z. Salamon, M.F. Brown, G. Tollin. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 213 (1999). DOI: 10.1016/S0968-0004(99)01394-8
- [24] M.F. Colombo, D.C. Rau, V.A. Parsegian. *Science*, **256**, 655 (1992). DOI: 10.1126/science.1585178
- [25] C. Reid, R.P. Rand. *Biophys. J.*, **72**, 1022 (1997). DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78754-X
- [26] G.D. Dzingeski, R. Wolfenden. *Biochemistry*, **32**, 9143 (1993). DOI: 10.1021/bi00086a020
- [27] J. Zimmerberg, F. Benzanilla, V.A. Parsegian. *Biophys. J.*, **57**, 1049 (1990). DOI: 10.1016/S0006-3495(90)82623-0
- [28] I. Vodanoy, S.M. Bezrukov, V.A. Parsegian. *Biophys. J.*, **65**, 2097 (1993). DOI: 10.1016/S0006-3495(93)81245-1
- [29] M.D. Rayner, J.G. Starkus, P.C. Ruben, D.A. Alicata. *Biophys. J.*, **61**, 96 (1992). DOI: 10.1016/S0006-3495(92)81819-2
- [30] J.A. Kornblatt, G. Hui Bon Hoa. *Biochemistry*, **29**, 9370 (1990). DOI: 10.1021/bi00492a010
- [31] J.Y.A. Lehtonen, K.J. Kinnunen. *Biophys. J.*, **66**, 1981 (1994). DOI: 10.1016/s0006-3495(94)80991-9
- [32] K.J. Mallikarjunaiah, A. Leftin, J.J. Kinnun, M.J. Justice, A.L. Rogozea, H.I. Petrache, M.F. Brown. *Biophys. J.*, **100**, 98 (2011). DOI: 10.1016/j.bpj.2010.11.010
- [33] T.R. Molugu, S. Lee, M.F. Brown. *Chem. Rev.*, **117**, 12087 (2017). DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00619
- [34] T. McCown, E. Evans, S. Diehl, H.C. Wiles. *Biochemistry*, **20**, 3134 (1981). DOI: 10.1021/bi00514a023
- [35] D.C. Mitchell, B.J. Litman. *Biochemistry*, **38**, 7617 (1999). DOI: 10.1021/bi990634m
- [36] M. Straume, D.C. Mitchell, J.L. Miller, B.J. Litman. *Biochemistry*, **29**, 9135 (1990). DOI: 10.1021/bi00491a006
- [37] V.A. Parsegian, R.P. Rand, D.C. Rau. *Meth. Enzymol.*, **259**, 43 (1995). DOI: 10.1016/0076-6879(95)59039-0
- [38] M. Straume, B.J. Litman. *Biochemistry*, **26**, 5113 (1987). DOI: 10.1021/bi00390a033
- [39] B.J. Litman, D.C. Mitchell. *Biomembranes*, Ed. by A. Lee (Jai Press, Greenwich, CT, 1996). V. 2A. P. 1–32.
- [40] U. Chawla, S.M.D.C. Perera, S.D.E. Fried, A.R. Eitel, B. Mertz, N. Weerasinghe, M.F. Brown. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **60**, 2288 (2021). DOI: 10.1002/anie.202003342
- [41] S.D.E. Fried, K.S.K. Hewage, A.R. Eitel, A.V. Struts, N. Weerasinghe, S.M.D.C. Perera, M.F. Brown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **119**, e2117349119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2117349119
- [42] R. Vogel, S. Lüdeke, F. Siebert, T.P. Sakmar, A. Hirshfeld, M. Sheves. *Biochemistry*, **45**, 1640 (2006). DOI: 10.1021/bi052196r
- [43] R. Vogel, M. Mahalingam, S. Lüdke, T. Huber, F. Siebert, T.P. Sakmar. *J. Mol. Biol.*, **380**, 648 (2008). DOI: 10.1016/j.jmb.2008.05.022
- [44] J. Standfuss, E. Zaitseva, M. Mahalingam, R. Vogel. *J. Mol. Biol.*, **380**, 145 (2008). DOI: 10.1016/j.jmb.2008.04.055
- [45] A.V. Botelho, T. Huber, T.P. Sakmar, M.F. Brown. *Biophys. J.*, **91**, 4464 (2006). DOI: 10.1529/biophysj.106.082776
- [46] Y. Wang, A.V. Botelho, G.V. Martinez, M.F. Brown. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 7690 (2002). DOI: 10.1021/ja0200488
- [47] C.J. López, M.R. Fleissner, Z. Guo, A.K. Kusnetzow, W.L. Hubbell. *Protein Sci.*, **18**, 1637 (2009). DOI: 10.1002/2fpro.180
- [48] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, M. Miyano. *Science*, **289**, 739 (2000). DOI: 10.1126/science.289.5480.739

- [49] T.E. Angel, S. Gupta, B. Jastrzebska, K. Palczewski, M.R. Chance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **106**, 14367 (2009). DOI: 10.1073/pnas.0901074106
- [50] A. Sandoval, S. Eichler, S. Madathil, P.J. Reeves, K. Fahmy, R.A. Böckmann. Biophys. J., **111**, 79 (2016). DOI: 10.1016/j.bpj.2016.06.004
- [51] I.A. Shkel, D.B. Knowles, M.T. Record Jr. Biopolymers, **103**, 517 (2015). DOI: 10.1002/bip.22662
- [52] U. Chawla, S.M.D.C. Perera, A.V. Struts, M.C. Pitman, M.F. Brown. Biophys. J., **110**, 83a (2016). DOI: 10.1016/j.bpj.2015.11.508
- [53] A.A. Lamola, T. Yamane, A. Zipp. Biochemistry, **13**, 738 (1974). <https://pubs.acs.org> DOI: 10.1021/bi00701a016
- [54] D.R. Martin, D.V. Matyushov. J. Phys. Chem. Lett., **6**, 407 (2015). DOI: 10.1021/jz5025433