

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

---

Биологический факультет

*На правах рукописи*

Дергоусова Елена Александровна

**ВЛИЯНИЕ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ  $\alpha$ 1-СУБЪЕДИНИЦЫ Na,K-АТФазы НА  
СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА**

03.01.04 Биохимия

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Лопина Ольга Дмитриевна

Москва, 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Структура и функции Na,K-АТФазы.....	11
1.1.1. Молекулярная организация Na,K-АТФазы.....	11
1.1.2. Изоформы Na,K-АТФазы.....	15
1.1.3. Каталитический цикл и конформации Na,K-АТФазы.....	19
1.1.4. Механизм работы Na,K-АТФазы.....	20
1.1.5. Протеолиз, как метод изучения Na,K-АТФазы.....	23
1.1.6. Кардиотонические стероиды.....	27
1.1.7. Функции Na,K-АТФазы.....	30
1.1.8. Na,K-АТФаза и белки-партнёры.....	34
1.1.8.1. Гамма-субъединица.....	34
1.1.8.2. Цитоскелет (анкирин, аддуцин, тубулиновый цитоскелет).....	37
1.1.8.3. Src-киназа.....	38
1.1.8.4. Кавеолы.....	39
1.1.8.5. Мелиттин и мелиттин-подобные белки.....	40
1.1.8.6. Hsp70.....	41
1.2. Регуляция активности Na,K-АТФазы и роль посттрансляционных модификаций этого фермента.....	43
1.2.1. Регуляция работы Na,K-АТФазы путем фосфорилирования.....	43
1.2.2. Окислительный стресс.....	46
1.2.3. Глутатион.....	47
1.2.4. Механизмы глутатионирования белков.....	49
1.2.5. Цистеиновые остатки Na,K-АТФазы и других белков.....	52
1.2.6. S-глутатионирование Na,K-АТФазы.....	58
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	62
2.1. Получение очищенного препарата Na,K-АТФазы.....	62
2.2. Определение концентрации белка.....	63
2.3. Определение активности Na,K-АТФазы.....	63
2.4. Электрофорез в полиакриламидном геле.....	64
2.5. Иммуноблоттинг.....	65
2.6. Глутатионирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы.....	66
2.7. Деглутатионирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы.....	66

2.7.1. Получение препарата очищенной Na,K-АТФазы в присутствии восстановителей...	66
2.7.2. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием ферментативной системы.....	66
2.7.3. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием химических восстановителей.....	67
2.8. Трипсинолиз Na,K-АТФазы.....	67
2.9. Масс-спектрометрический анализ.....	68
2.10. Изотермическая калориметрия титрования (ИКТ).....	68
2.11. Глутатионирование в клеточной культуре и иммунопреципитация.....	69
2.12. Статистические методы обработки результатов.....	70
2.13. Использованные реактивы.....	70
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	71
3.1. Характеристика препарата Na,K-АТФазы из солевых желёз утки.....	71
3.2. Глутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы.....	73
3.2.1. Глутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы <i>in vitro</i> .....	73
3.2.2. Глутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы, находящейся в различных конформациях.....	74
3.2.3. Глутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы <i>in situ</i> .....	76
3.3. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы.....	77
3.3.1. Получение препарата очищенной Na,K-АТФазы в присутствии восстановителей...77	
3.3.2. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием ферментативной системы.....	78
3.3.3. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием химических восстановителей.....	80
3.3.4. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием химических восстановителей в присутствии денатурирующих агентов.....	82
3.3.5. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы в составе микросом с использованием химических восстановителей в присутствии денатурирующих агентов...84	
3.3.6. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы на PVDF мембране с использованием химических восстановителей.....	84
3.3.7. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием химических восстановителей в присутствии денатурирующих агентов при высоких температурах.....	85
3.3.8. Иные модификации SH-групп $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы и их восстановление химическими восстановителями.....	87

3.3.9. Идентификация цистеиновых остатков $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы, поддающихся и не поддающихся деглутатионированию.....	88
3.4. Ограниченный трипсинолиз $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы.....	90
3.4.1. Трипсинолиз $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы в присутствии 150 мМ KCl.....	91
3.4.2. Трипсинолиз $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы в присутствии 150 мМ NaCl.....	92
3.4.3. Трипсинолиз $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы в присутствии 0,5 мМ убаина.....	94
3.5. Влияние степени глутатионирования Na,K-АТФазы на ее связывание с лигандами.....	96
3.5.1. Связывание Na, K-АТФазы с убаином.....	96
3.5.2. Связывание Na, K-АТФазы с Hsp70.....	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100
ВЫВОДЫ.....	104
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	127

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

5-IAF – (5-iodoacetamidofluorescein) 5-иодацетамидфлуоресцеин  
ADP – аденозинтрифосфат  
ATP – аденозинтрифосфат  
cAMP – циклический аденозинмонофосфат  
DMEM – Dulbecco's modified eagle medium  
ECL – (enhanced chemiluminescence) метод визуализации конъюгированных с пероксидазой хрена антител с помощью хемилюминисценции  
FAD – флавинадениндинуклеотид  
FITC – флуоресцеинизотиоцианат  
FRET – (Förster resonance energy transfer) фёрстеровский перенос энергии  
Grx – глутаредоксин  
GSH – восстановленный глутатион;  
GSSG – окисленный глутатион;  
GTP – гуанозинтрифосфат  
Hsp70 – (hit shock protein) белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа  
MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация-времяпролётная tandemная масс-спектрометрия  
MOPS – 3-морфолинопропансульфоновая кислота  
NADPH – никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный  
NOS – NO-синтаза  
PBST – фосфатно-солевой буфер с добавлением Tween 20  
Pi – неорганический фосфат  
PKC – протеинкиназа C  
PKG – протеинкиназа G  
PKA – протеинкиназа A  
PMSF – фенилметансульфонилфторид  
PVDF – поливинилиденфторид  
RNS – (reactive nitrogen species) активные формы азота  
ROS – (reactive oxygen species) активные формы кислорода  
SDS – (sodium dodecyl sulfate) додецилсульфат натрия  
TCEP – (tris(2-carboxyethyl)phosphine) трис-2-карбоксииэтилфосфин  
Trx – тиоредоксин  
 $\beta$ -МЭ –  $\beta$ -меркаптоэтанол  
BCA – бычий сывороточный альбумин  
ДТТ – дитиотреитол  
ИКТ – изотермическая калориметрия титрования  
кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота  
кРНК – кодирующая рибонуклеиновая кислота  
M1,...M10 – трансмембранные домены  
ПААГ – полиакриламидный гель  
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан  
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы.

Na,K-АТРаза представляет собой трансмембранный гетероолигомерный фермент, осуществляющий перенос ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через мембрану против их электрохимического градиента. Функциональная единица Na,K-АТРаза состоит в основном из двух полипептидных цепей – каталитической  $\alpha$ -субъединицы и регуляторной  $\beta$ -субъединицы. В некоторых тканях присутствует третья субъединица ( $\gamma$ ), относящаяся к семейству белков FXYD и выполняющая регуляторную функцию. Фермент относится к АТРадам Р-типа и представлен несколькими тканеспецифичными изоформами.

Na,K-АТРаза была открыта в 1957 году датским ученым Йенсом Кристианом Скоу (Jens Christian Scou), который, изучая феномен ионной асимметрии на мембранах клеток нервов краба, обнаружил, что при разных соотношениях ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  изменяется АТРазная активность гомогената нервов. В опубликованной статье он сообщил, что обнаружил ферментную систему, ответственную за асимметричное распределение ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  на мембране возбудимых клеток; он назвал ее Na,K-зависимой Mg-активируемой АТРазой [цит. по обзору Scheiner-Bobis, G., 2002]. За это открытие в 1997 г. Скоу получил Нобелевскую премию по химии. Хотя как фермент Na,K-АТРаза была открыта в конце 50-х, связанные с ней эффекты были описаны и в более ранних работах. Например, в 1941 году Роберт Дин (Robert Dean) предложил термин «натриевый насос» для описания процесса переноса ионов натрия против их градиента, механизм которого ещё не был известен. Сам факт переноса ионов был установлен в экспериментах с радиоактивным натрием, добавляемым в среду, который мог обмениваться с нерадиоактивным натрием, находящимся внутри нервных волокон [цит. по обзору Scheiner-Bobis G., 2002]. А в 1954 г. Шатцман описал эффект группы соединений – сердечных гликозидов, заключающийся в подавлении АТРа-зависимого переноса ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через мембрану эритроцитов. Выдерживая клетки в среде с этими соединениями, Шатцман обнаружил, что концентрации катионов натрия и калия по обе стороны мембраны уменьшаются. Эти результаты позволили предположить, что изменение концентраций ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  может происходить вследствие подавления активного транспорта катионов, в нормальных условиях компенсирующего его утечку [цит. по обзору Болдырев А.А., 1998].

В клетке Na,K-АТРаза выполняет множество функций – она участвует в поддержании потенциала на возбудимой мембране, отвечает за регуляцию клеточного объёма; создавая ионный градиент, она обеспечивает сопряжённый транспорт целого ряда соединений и ионов. Было показано, что Na,K-АТРаза инициирует ряд сигнальных каскадов. Установлено, что при взаимодействии  $\alpha 1$ -субъединицы фермента с сердечным

гликозидом убаином, активность Na,K-АТФазы подавляется, но при этом она получает возможность связываться с рядом белков-партнёров. Таким образом, через взаимодействие с убаином и другими сердечными гликозидами может происходить регуляция активности фермента, а также передача сигнала в клетку. Это привело к возникновению представления о том, что сердечные гликозиды, синтезируемые в организме животных в надпочечниках и гипоталамусе, выполняют функцию гормонов, мишенью которых является Na,K-АТФаза [Schoner, W., 2002].

Регуляция функции Na,K-АТФазы осуществляется и через различные молекулярные процессы, в частности, за счет её посттрансляционной модификации. Наиболее исследованным процессом посттрансляционной модификации является фосфорилирование. Установлено, что в зависимости от того, по какому остатку  $\alpha$ 1-субъединицы фермента происходит фосфорилирование и какие протеинкиназы его осуществляют, наблюдается либо активация, либо ингибирование ферментативной активности. Кроме того, возможно перераспределение Na,K-АТФазы во внутриклеточных компартментах.

В последнее время значительное внимание уделяется проблеме окислительного стресса и роли антиоксидантов. Одним из естественных антиоксидантных соединений является глутатион (трипептид  $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин). В цитоплазме клетки его концентрация может достигать 10 мМ. При окислении между двумя молекулами трипептида образуется S-S связь с формированием гексапептида (окисленный глутатион). Глутатион способен вступать в реакцию с окисленными или нитрозированными SH-группами молекул белков, приводя к их глутатионилированию. Такая модификация белков может вызывать обратимое в условиях клетки ингибирование ферментов, так как связанный с остатком цистеина глутатион удаляется при помощи клеточных систем деглутатионилирования с использованием ферментов глутаредоксина и глутатионредуктазы. Помимо ингибирования ферментативной активности такая модификация способна защищать SH-группы белка от дальнейшего необратимого окисления.

За последние годы в ряде работ было показано, что значительное количество белков в клетке даже при нормальном окислительно-восстановительном потенциале подвержены глутатионилированию, к таким ферментам относится и Na,K-АТФаза. Было установлено, что её  $\alpha$ -субъединица выделяется из ткани уже в глутатионилированном состоянии (исходное глутатионилирование). Инкубация препарата Na,K-АТФазы с высокими концентрациями окисленного глутатиона приводит к дополнительному увеличению степени глутатионилирования фермента и падению его активности.

Методами масс-спектрометрического анализа и компьютерного моделирования было показано, что увеличение степени глутатионилирования четырёх SH-групп  $\alpha 1$ -субъединицы, находящихся в актуаторном (Cys244) и нуклеотид-связывающем (Cys454, 458, 459) доменах фермента, может приводить к ингибированию Na,K-АТРазы [Petrushanko, I.Y., et al., 2012; Мэн С. и соавт., 2014; Petrushanko, I.Y., et al., 2017]. Это дополнительное глутатионилирование, следствием которого является ингибирование ферментативной активности, было названо «регуляторным», поскольку после удаления глутатиона с соответствующих цистеиновых остатков активность фермента восстанавливается. Функциональное значение дополнительного глутатионилирования других остатков цистеина, а также исходного глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТРазы не установлены.

Таким образом, **целью данного исследования** стало выявление влияния исходного и дополнительного глутатионилирования  $\alpha 1$ -субъединицы на функции Na,K-АТРазы.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить максимально глутатионилированный и деглутатионилированный препараты Na,K-АТРазы из солевых желёз утки и определить влияние глутатионилирования на активность фермента.
2. Исследовать влияние глутатионилирования на устойчивость  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы к действию трипсина.
3. Исследовать влияние глутатионилирования на связывание Na,K-АТРазы с кардиотоническим стероидом убаином и белком-партнёром Hsp70.

#### **Научная новизна.**

Полученные в ходе исследований результаты расширяют существующие представления о роли глутатионилирования  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы. Впервые показано, что *in vitro* при использовании сильных химических восстановителей невозможно полностью удалить глутатион, связанный с  $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТРазы, как с нативного, так и с денатурированного фермента. Частично деглутатионилированный препарат Na,K-АТРазы в большей степени подвержен трипсинолизу, чем фермент, имеющий исходное глутатионилирование, который выделяется из тканей с нормальным окислительно-восстановительного состоянием. Установлено, что трипсинолиз  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы, связанной с кардиотоническим стероидом убаином, осуществляется быстрее, чем трипсинолиз фермента в присутствии ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Впервые показана зависимость степени дополнительного глутатионилирования от

конформации фермента. Установлено также, что глутатионилирование  $\alpha 1$ -субъединицы не влияет на связывание фермента с убаином и белком Hsp70.

**Научно-практическим значением** настоящей работы является вклад в понимание процессов регулирования функций Na,K-АТРазы путем модификации глутатионом остатков цистеина ее каталитической субъединицы и физиологической роли этих процессов при изменении окислительно-восстановительного статуса организма.

#### **Личный вклад автора.**

Автором были получены препараты Na,K-АТРазы с разной степенью глутатионилирования цистеиновых остатков, проведён анализ этих препаратов биохимическими методами, подготовлены препараты для масс-спектрометрического анализа, проведены эксперименты по ограниченному трипсинолизу с анализом полученных триптических фрагментов. Кроме того, автор проводил также эксперименты по связыванию Na,K-АТРазы с убаином и Hsp70 методом изотермической калориметрии титрования (ИКТ). Автор проводил обработку экспериментальных данных и подготовку материалов для публикаций.

#### **Связь с государственными программами.**

Работа была поддержана грантами РФФИ (№ 12-04-00403, № 15-04-08832), РНФ (№ 14-14-01152).

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Часть SH-групп цитоплазматических доменов  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы, выделенной из солевых желез утки (около 8 остатков), содержит связанный глутатион (исходное глутатионилирование). Связанный глутатион невозможно удалить полностью даже в присутствии сильных химических восстановителей в денатурирующих условиях.
2.  $\alpha 1$ -Субъединица Na,K-АТРазы, находящейся в конформации E1, наиболее доступна для дополнительного глутатионирования окисленным глутатионом. В конформации E2P фермент менее подвержен дополнительному глутатионилированию, чем в конформациях E1 и E2.
3. Частичное деглутатионилирование уменьшает устойчивость  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы к трипсинолизу в E1- и E2-конформациях. Характер трипсинолиза дополнительно глутатионилированного препарата варьирует в зависимости от конформации белка. Связывание убаина ускоряет трипсинолиз по сравнению с таковым, происходящим с E1- и E2-конформациями.

4. Степень глутатионилирования  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы достоверно не изменяет параметров, характеризующих связывание фермента с кардиотоническим стероидом убаином и белком-партнёром Hsp70.

#### **Апробация работы.**

Результаты диссертационной работы были представлены на научных семинарах кафедры биохимии биологического факультета МГУ и научных конференциях: 10<sup>th</sup> International Congress «Cell Volume Regulation: Novel Therapeutic Targets & Pharmacological Approaches» (Россия, Москва, 2013); 14<sup>th</sup> International Conference "Na,K-ATPase and related transport ATPases: Structure, mechanism, cell biology, health and disease" (Нидерланды, 2014); V съезд физиологов СНГ и биохимиков России (Россия, Сочи-Дагомыс, 2016).

#### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК, и 3 публикации в сборниках научных конференций.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структура и функции Na,K-АТРаза

#### 1.1.1. Молекулярная организация Na,K-АТРаза

Na,K-АТРаза (Na,K – зависимая, Mg – активируемая аденозинтрифосфатфосфо-гидролаза [КФ 3.6.1.37]) переносит ионы  $\text{Na}^+$  из клетки и ионы  $\text{K}^+$  в клетку против их электрохимического градиента, используя в качестве движущей силы энергию, освобождаемую при гидролизе АТФ [Lingrel, J.B., 1992]. Таким образом, Na,K-АТРаза, интегральный белок плазматической мембраны клеток животных, формирует градиент ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , используемый в дальнейшем другими мембранными ферментами для выполнения таких процессов, как сопряжённый транспорт (перенос нейротрансмиттеров, аминокислот, сахаров, нуклеотидов, ионов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  и др.), участвует в передаче электрического сигнала (Na,K-АТРаза участвует в создании потенциал покоя на мембранах и поддерживает способность нервных клеток к возбуждению). Na,K-АТРаза играет важную роль в поддержании объёма клетки, её гомеостатического баланса, генерации тепла, внутриклеточной регуляции рН. В почках фермент участвует в реабсорбции  $\text{Na}^+$  и воды [Rossier, B.C., et al., 1987].

Na,K-АТРаза в большом количестве представлена в плазматической мембране возбудимых тканей, таких как мозг, скелетная мускулатура, сердечная мышца, а также в эпителии почек и других органов, где она участвует в трансклеточном переносе ионов. В остальных тканях она присутствует в умеренных количествах [Mobasheri, A., et al., 2000].

Na,K-АТРаза принадлежит к классу АТРаза Р-типа, которые обеспечивают активный перенос катионов, таких как  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cd}^{2+}$  через мембрану, гидролизую при этом АТФ до АДФ и неорганического фосфата [Fagan, M.J., and Saier, M.H., Jr, 1994]. В процессе переноса субстратов все АТРаза Р-типа подвергаются конформационным изменениям, все они содержат в значительной степени гомологичные трансмембранные каталитические субъединицы, в структуре которых есть участки связывания АТФ, переносимых катионов и, в некоторых случаях, участок связывания специфического ингибитора. Помимо Na,K-АТРаза в суперсемейство АТРаза Р-типа входят Са-АТРаза плазматических мембран и эндоплазматического ретикулума, Н,К-АТРаза слизистой оболочки желудка, Н-АТРаза растений и другие [Mobasheri, A., et al., 2000].

При сравнении каталитической субъединицы Na,K-АТРаза с другими АТРазами Р-типа – Н,К-, Са-, Н- и Na-насосами – было выявлено, что общая гомология первичной последовательности невысока, она составляет 17-24% за исключением Н,К-АТРаза, гомология первичной последовательности  $\alpha$ -субъединицы этого фермента и  $\alpha 1$ -

субъединицы Na,K-АТФазы достигает 63% [Mobasheri, A., et al., 2000; Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988]. В то же время третичная структура всех этих АТФаз, а также расположение трансмембранных доменов относительно активных центров, очень схожа. В процессе гидролиза АТФ у всех АТФаз Р-типа образуется интермедиат, у которого фосфорилирован остаток аспартата активного центра. Фосфорилирование-дефосфорилирование АТФазы, а также связывание с ней ионов, приводит к челночной смене двух конформаций фермента, названных E1 и E2 [Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988]. Участки с самой большей гомологией находятся вблизи фосфорилируемого аминокислотного остатка (Asp385), расположенного в нуклеотид-связывающем домене, и в некоторых трансмембранных доменах. Наибольшая вариабельность наблюдается в N-концевом домене каталитических субъединиц АТФаз Р-типа. Предполагается, что именно эти участки отвечают за «узнавание» катионов [Mobasheri, A., et al, 2000].

АТФазы Р-типа были обнаружены как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Na,K-АТФаза присутствует только у высших эукариот, относящихся к царству животных [Lingrel, J.B., 1992]. Помимо позвоночных, она обнаружена у ракообразных [Baxter-Lowe, L.A., et al., 1989], а также присутствует у гидры [Canfield, V.A., et al., 1992] и плоских червей [Pardon, R.S., and Noel, F., 1994; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998].

Функциональный протомер молекулы Na,K-АТФазы состоит из двух основных полипептидных цепей –  $\alpha$  (каталитической) и  $\beta$  (регуляторной). В некоторых тканях присутствует третья субъединица –  $\gamma$ , относящаяся к семейству белков FXFD и выполняющая регуляторную функцию.  $\alpha$ -Субъединица имеет молекулярную массу в 110-112 кДа и отвечает за каталитические и транспортные функции. Именно эта субъединица содержит участки связывания АТФ, катионов и специфического ингибитора уабаина [Lingrel, J.B., and Kuntzweiler, T., 1994; Mercer, R.W., 1993; Pedemonte, C.H., and Kaplan, J.H., 1990; Pressley, T.A., 1996; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998].

В 80-х годах было обнаружено, что  $\alpha$ -субъединица Na,K-АТФазы имеет минимум 8 трансмембранных сегментов. Наличие этих структур было предсказано на основе гидрофобных индексов участков полипептидной цепи. При этом пять первых трансмембранных сегментов M1-M5 имели индекс гидрофобности  $>2,0$ , а ещё три – более 1,5. Присутствие 4-х трансмембранных сегментов со стороны N-конца полипептидной цепи было подтверждено и другими методами, включая ограниченный трипсинолиз, мечение фоточувствительными аналогами уабаина и фосфорилирование. Однако ни один из этих методов не мог точно показать, сколько трансмембранных доменов находится в N-концевой части полипептидной цепи: 2, 4 или 6 [Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988]. Позднее было установлено, что  $\alpha$ -субъединица Na,K-АТФазы формирует 10

трансмембранных доменов. N- и C-концы белка находятся в цитоплазме, как и активный центр с АТФ-связывающим участком. [Lingrel, J.B., 1992]. Большая и малая цитоплазматические петли, расположенные между трансмембранными фрагментами М2 и М3, и М4 и М5, соответственно, формируют три домена: нуклеотид-связывающий, фосфорилируемый и актуаторный (рис. 1).

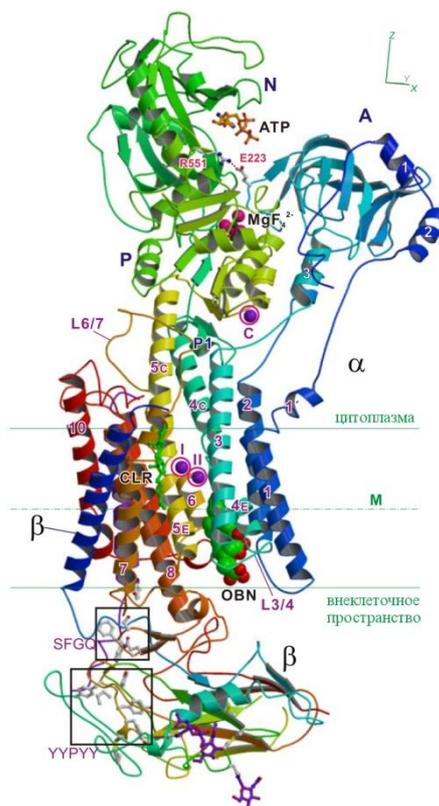


Рис. 1. Строение Na,K-АТФазы и её расположение в мембране. На рисунке представлена модель Na,K-АТФазы из ректальных желёз акулы в комплексе с  $MgF_4^{2-}$ , убаином и ионами  $K^+$ . Синим цветом обозначена N-концевая часть  $\alpha$ 1-субъединицы и актуаторный домен (A), зелёным цветом - нуклеотид-связывающий домен (N), жёлто-зелёным - фосфорилируемый домен (P). Тёмно-синим цветом обозначена  $\beta$ -субъединица. Ионы  $K^+$  представлены фиолетовыми, а  $MgF_4^{2-}$  - розовыми шариками [Toyoshima, C., et al., 2011].

$\beta$ -Субъединица является сильно гликозилированным белком с молекулярной массой от 40 до 60 кДа (в зависимости от степени модификации в различных тканях) формирующим 1 трансмембранный домен.  $\beta$ -Субъединица играет регуляторную роль [Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998]. В отличие от  $\alpha$ -субъединицы, большая часть которой экспонирована в цитоплазму, основная часть  $\beta$ -субъединицы находится во внеклеточном пространстве [Arystarkhova, E., et al., 1995]. Внеклеточный N-конец  $\beta$ -субъединицы имеет три дисульфидных связи (рис. 2) [Mobasher, A., et al., 2000]. По некоторым данным эта субъединица необходима для правильного встраивания Na,K-АТФазы в мембрану (в

клетках позвоночных), она также изменяет сродство сродства фермента к ионам  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  [Geering, K., et al., 1996].

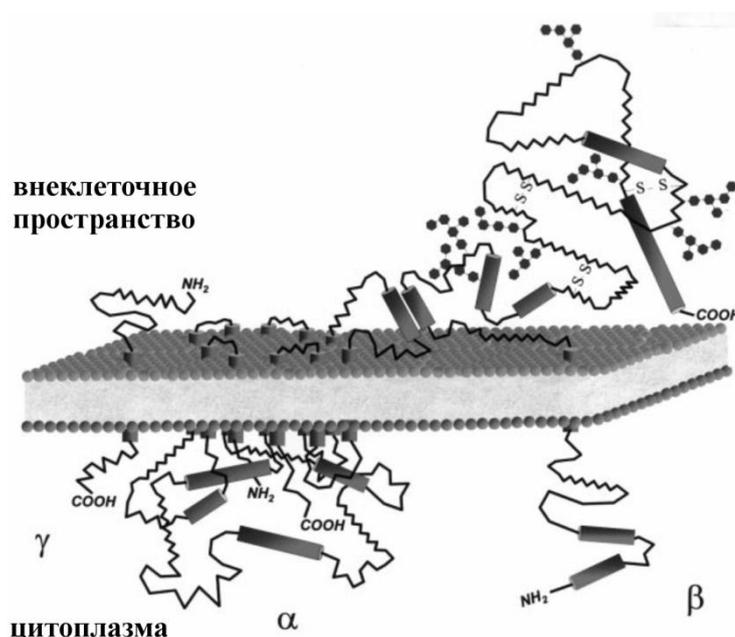


Рис. 2. Трёхмерная модель Na,K-АТФазы.  $\alpha$ -Субъединица пересекает мембрану 10 раз, N- и C-концевые фрагменты полипептидной цепи экспонированы в цитозоль.  $\beta$ -субъединица пересекает мембрану один раз, в цитозоль экспонирована её N-концевая часть. На рисунке отмечены S-S связи в структуре  $\beta$ -субъединицы и восемь потенциальных участков N-гликозилирования. Цилиндрами обозначены участки полипептидной цепи, которые формируют  $\alpha$ -спирали, а зигзагообразными линиями –  $\beta$ -складчатые структуры.  $\gamma$ -Субъединица пересекает мембрану один раз, её C-концевая часть экспонирована в цитозоль [Mobasher, A., et al., 2000].

Связывание  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы с  $\beta$ -субъединицей приводит к конформационным изменениям в обеих субъединицах. При этом по сравнению с одной  $\alpha$ -субъединицей наблюдается повышение устойчивости фермента к протеолизу в целом и к трипсинолизу в частности. В отсутствие  $\beta$ -субъединицы время полужизни  $\alpha$ -субъединицы составляет всего 2 ч, в то время как для протомера  $\alpha\beta$  время полужизни увеличивается до 20 ч. Без  $\beta$ -субъединицы  $\alpha$ -субъединица не способна изменять конформацию и связывать лиганды. Ассоциация  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц происходит уже в эндоплазматическом ретикулуме [Geering, K., et al., 1996; Geering, K., 1991].

Хотя минимальная функциональная единица фермента представляет собой протомер  $\alpha\beta$ , согласно данным ряда работ фермент может образовывать олигомер, формируя дипротомеры  $(\alpha\beta)_2$  и тетрапротомеры  $(\alpha\beta)_4$ . Было показано, что с использованием комплекса фенантролина с медью (II) можно зафиксировать образование  $\alpha$ - $\alpha$  димеров за счет формирования дисульфидных связей, что позволяет предполагать наличие физического взаимодействия  $\alpha$ -субъединиц [Periyasamy, S.M., et al., 1983a].

Позднее было показано, что возможно образование ковалентной связи между  $\alpha 1$ -полипептидом и его триптийским фрагментом с молекулярной массой 64 кДа (Ala 439 – до С конца), индуцируемое фосфорилированием фермента по Asp369 [Ganjeizadeh, M., et al., 1994]. Методом перекрестной иммунопреципитации было установлено, что взаимодействие между  $\alpha$ -субъединицами осуществляется за счет связывания цитоплазматических доменов (фрагменты полипептидной цепи, расположенные между Gly554 – Pro785) [Koster, J.C., et al., 1995]. В работах Коста и коллег было показано, что  $\alpha 1$ -субъединица Na,K-АТФазы может взаимодействовать с изолированным нуклеотид-связывающим доменом Na,K-АТФазы в присутствии Mg-АТФ и Mg-ADP, хотя в последнем случае связывание менее прочное. Однако подобное взаимодействие не наблюдалось в отсутствие субстратов или в присутствии только ионов  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  или  $K^+$  [Costa, C.J., et al., 2003].

Несомненно, возникает вопрос, необходима ли олигомеризация для работы АТФазы, или это результат случайных взаимодействий фермента при его латеральной диффузии в плоскости мембраны. В соответствии с результатами, полученными в различных работах, было установлено, что АТФаза функционирует и в виде димера  $\alpha_2\beta_2$ , и в виде тетрамера  $\alpha_4\beta_4$ , в некоторых мембранных препаратах в виде протомеров  $\alpha\beta$ , которые, тем не менее, могут находиться в непосредственной близости друг от друга. И, хотя это может и не влиять на активность фермента, не исключено, что подобное расположение является необходимым для выполнения определенных функций, например, для взаимодействия с белками-партнёрами [Yudowski, G.A., et al., 2000; Costa, C.J., et al., 2003] или для обеспечения регуляции ферментативной активности.

### **1.1.2. Изоформы Na,K-АТФазы**

Каждая субъединица Na,K-АТФазы представлена несколькими изоформами. Для  $\alpha$ -субъединицы выявлены четыре изоформы  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ , а для  $\beta$ -субъединицы три –  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 3$ . Различные изоформы субъединиц Na,K-АТФазы кодируются разными генами. [Fambrough, D.M., 1988; Levenson, R., 1994; Sweadner, K.J., 1989; Sweadner, K.J., 1991]. Впервые существование разных изоформ Na,K-АТФазы было открыто Кэтлин Свиднер (Kathleen Sweadner). Она обнаружила наличие в тканях мозга второй изоформы  $\alpha$ -субъединицы фермента, помимо уже известной почечной ( $\alpha 1$ ). При электрофорезе  $\alpha 2$ -субъединица имела меньшую подвижность, кроме того, она обладала большей чувствительностью к убаину [Sweadner, K.J., 1979]. В дальнейшем были открыты ещё две изоформы этой субъединицы –  $\alpha 3$  и  $\alpha 4$  [Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998].

Для изоформ обеих субъединиц Na,K-АТФазы характерна тканеспецифичность. При этом в некоторых тканях присутствуют по несколько изоформ каждой субъединицы. Например, в мозге были обнаружены  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  изоформы  $\alpha$ -субъединицы, тогда как в почках и лёгких – только  $\alpha 1$  (в почках  $\alpha 2$ -субъединица выявлена в ничтожных количествах). В скелетной мускулатуре присутствуют  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  изоформы, но  $\alpha 2$  является преобладающей [Lingrel, J.B., 1992; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998]. В сердце присутствуют  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -изоформы. Характерной для почек является комбинация  $\alpha 1\beta 1$ . Содержание других изоформ, перечисленных выше, в этих тканях не превышает 0,1%. Вместе с тем,  $\alpha 1$  и  $\beta 1$ , помимо почек, присутствуют и во многих других тканях, в то время как другие изоформы характеризуются большей тканеспецифичностью. Например,  $\alpha 4$  изоформа обнаружена только в семенниках (работы проводились на крысах) [Shamraj, O.I., and Lingrel, J.B., 1994],  $\alpha 2$  превалирует в адипоцитах, мышечной ткани, сердце и мозге [Sweadner, K.J., et al., 1994; Peng, L., et al., 1997; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998]. В отличие от других изоформ, экспрессия  $\alpha 2$  является инсулин-зависимой [Russo, J.J., and Sweadner, K.J., 1993; Mobasheri, A., et al., 2000].  $\alpha 3$ -Субъединица характерна для нервных тканей [Sweadner, K.J., et al., 1994; Peng, L., et al., 1997].

Так как  $\alpha 1\beta 1$  – это единственный изофермент Na,K-АТФазы, который можно выделить в чистом виде, то большая часть исследований, в частности, анализ кристаллической структуры, взаимодействие с ингибиторами и белками-партнёрами, проводились именно с использованием этой изоформы.

Для фермента из крысы было показано, что разные изоформы  $\alpha$ -субъединицы немного различаются по длине:  $\alpha 1$ -субъединица имеет 1024 аминокислотных остатка,  $\alpha 2$  – 1021,  $\alpha 3$  – 1014 и  $\alpha 4$  – 1028. Среди разных видов степень гомологичности  $\alpha$ -субъединицы очень высока. Для  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  изоформ она составляет 92%, а для  $\alpha 3$  – более 96%. При этом  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ -изоформы очень схожи между собой (минимально гомология между этими субъединицами составляет 87%), тогда как  $\alpha 4$  имеет степень гомологии с  $\alpha 1$  только 78%. Наибольшая структурная вариабельность наблюдается в N-концевой части фермента, внеклеточной части между трансмембранными фрагментами 1 и 2, где находится участок связывания уабаина, и во внутриклеточной части полипептидной цепи между аминокислотными остатками 403 и 503. В то же время наибольшая гомология наблюдается в центральной части большой цитоплазматической петли (в фосфорилируемом и нуклеотид-связывающем доменах); а также в гидрофобных трансмембранных доменах и C-концевой части полипептидной цепи (рис. 3). Четвертичная структура изоформ также идентична [Levenson, R., 1994; Lingrel, J.B., and

Kuntzwieler, T., 1994; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998; Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988].

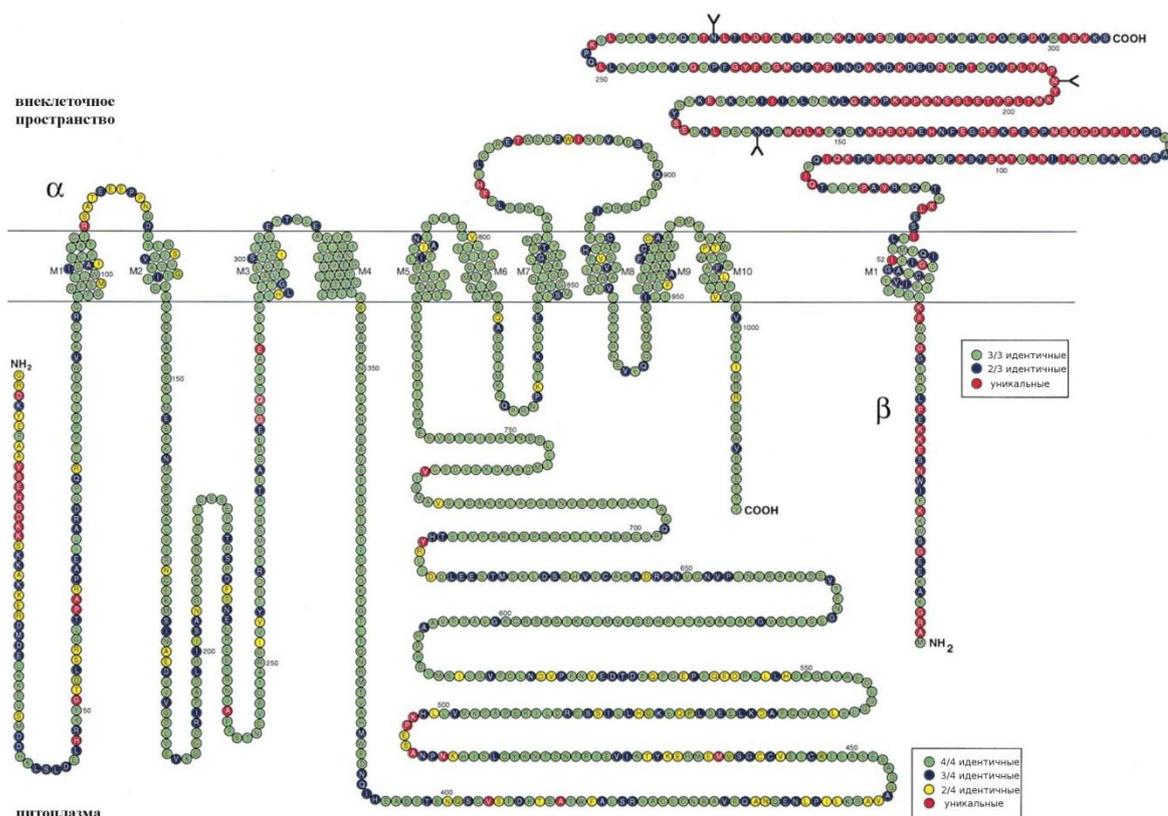


Рис. 3. Схематичное изображение  $\alpha 1\beta 1$ -изоформы Na,K-АТФазы крысы. Зелёным цветом показаны консервативные, а синим, жёлтым и красным цветами переменные остатки для четырёх изоформ  $\alpha$ -субъединицы ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ) и трёх изоформ  $\beta$ -субъединицы ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) [Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998].

В процессе развития организма соотношение изоформ в тканях может изменяться. Например, в сердце крысы  $\alpha 1$ -субъединица присутствует в течение всей жизни, тогда как  $\alpha 3$ - превалирует только на пренатальной стадии развития, замещаясь затем на  $\alpha 2$ -изоформу [Orlowski, J., and Lingrel, J.B., 1988].

Примечательно, что у грызунов изофермент, включающий  $\alpha 1$ -субъединицу устойчив к убаину, тогда как таковой, содержащий  $\alpha 2$ - и  $\alpha 3$ - характеризуется меньшей устойчивостью [Berrebi-Bertrand, I., et al., 1990]. При этом  $\alpha 1$ -изоформа грызунов отличается от  $\alpha 1$ -субъединицы других млекопитающих всего на два аминокислотных остатка, расположенных во внеклеточном участке между первым и вторым трансмембранными доменами [Jewell, E.A., and Lingrel, J.B., 1991]. Именно это приводит к изменению константы диссоциации для убаина на два порядка, не влияя на другие свойства изоформы [Periyasamy, S.M., et al., 1983b].

Разные изоформы  $\alpha$ -субъединицы проявляют различную устойчивость к трипсинолизу:  $\alpha 3$ -субъединица оказалась более устойчива к воздействию трипсина, чем

$\alpha 2$  [Urayama, O., and Sweadner, K.J., 1988]. Выявить, в чём причина функциональных различий изоформ, оказалось не так просто. Хотя и есть ткани, в которых присутствует только  $\alpha 1$ -изоформа, и ткани, в которых обнаруживается только  $\alpha 2$ - или только  $\alpha 3$ -изоформы, при исследовании препарата из ткани, содержащей несколько изоформ, наблюдают обычно суммарный эффект. Например, было установлено, что Na,K-АТРаза мозга имеет большее сродство к ионам  $\text{Na}^+$ , чем АТРаза почек. Но какая из изоформ фермента приводит к подобному эффекту –  $\alpha 2$ - или  $\alpha 3$ -, сказать сложно [Skou, J.C., 1962; Sweadner, K.J., 1985]. Для установления вклада каждой изоформы были проведены эксперименты на ферменте из крысы, экспрессированном в клетках линии HeLa. В этих экспериментах  $\alpha 2$ - и  $\alpha 3$ -изоформы были изменены методом точечного мутагенеза, что сделало их нечувствительными к убаину. В присутствии 1 мкМ убаина активность собственной Na,K-АТРаза клеток подавляется, что позволяет измерить характеристики мутантных  $\alpha 2$ - и  $\alpha 3$ - изоформ, экспрессируемых в культуре. Установлено, что ферменты, содержащие  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ -изоформы, имеют примерно одинаковое сродство к ионам  $\text{Na}^+$  ( $K_{0.5} \sim 3,5 \text{ mM}$ ), а сродство  $\alpha 3$ -изоформы к ионам  $\text{K}^+$  несколько снижено по сравнению со сродством  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ -изоформ [Jewell, J., and Lingrel, J.B., 1991; Mobasher, A., et al., 2000; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998].

Помимо различных изоформ отдельных субъединиц Na,K-АТРаза были обнаружены и модифицированные варианты классических изоформ. Например, в гладкой мускулатуре сосудов собаки была обнаружена укороченная в С-концевой области  $\alpha 1$ -изоформа с молекулярной массой около 65 кДа (554 аминокислоты, является продуктом альтернативного сплайсинга РНК, кодирующей  $\alpha 1$ -изоформу) [Medford, R.M., et al., 1991]. Помимо этого, укороченные варианты  $\alpha 1$ -изоформы были выявлены в эмбрионах *Xenopus laevis* [Burgener-Kairuz, P., et al., 1991; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998]. Более короткие транскрипты, кодирующие  $\alpha 1$ - и  $\beta 1$ -изоформы, были обнаружены в эпителии сетчатки человека [Ruiz, A., et al., 1995].

Изоформы  $\beta$ -субъединицы, как и  $\alpha$ -субъединицы являются тканеспецифичными:  $\beta 2$  была обнаружена в скелетной мускулатуре [Lavoie, L., et al., 1997], эпифизе [Shyjan, A.W., et al., 1990] и нервной ткани [Peng, L., et al., 1997], тогда как  $\beta 3$  присутствует в семенниках, сетчатке, печени и лёгких [Malik, N., et al., 1996; Peng, L., et al., 1997; Arystarkhova, E., and Sweadner, K.J., 1997; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998].  $\beta 1$ -Изоформа, как и  $\alpha 1$ , является наиболее распространённой и присутствует практически во всех тканях.

Все  $\beta$ -изоформы Na,K-АТРаза сильно гликозилированы.  $\beta 1$ -субъединица млекопитающих имеет 3 участка N-гликозилирования. Для  $\beta 2$  количество и расположение

участков видоспецифично. Любопытно, что изофермент, содержащий мутантные  $\beta$ -субъединицы, не подвергающиеся гликозилированию, также обладает активностью и имеет обычную чувствительность к убаину и субстратам. В то же время у такого белка меняется способность к ассоциации с  $\alpha$ -субъединицей и увеличивается чувствительность к протеолизу [Geering, K., 1991; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998]. Показано, что  $\beta 1$  имеет три дисульфидных связи. При этом гомологичные остатки цистеинов обнаружены также в  $\beta 2$ - и в  $\beta 3$ -изоформах. При замене всего одного остатка цистеина из этих шести,  $\beta$ -субъединица теряет способность к правильной ассоциации с  $\alpha$ -субъединицей [Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998].

Важную роль в функционировании фермента в разных тканях играет разнообразие вариантов ассоциации между разными изоформами  $\alpha$  и  $\beta$ . Для эпифиза характерны  $\alpha 1\beta 2$ - и  $\alpha 3\beta 2$ -изоферменты [Shyjan, A.W., et al., 1990], а для светочувствительных клеток сетчатки - комбинация  $\alpha 3\beta 2$  [Schneider, B.G., and Kraig, E., 1990; Schneider, B.G., et al., 1991; Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998]. Разные  $\beta$ -изоформы по-разному модулируют аффинность Na,K-АТФазы к ионам  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . С использованием линии клеток насекомых Sf-9 (ovary of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*) было установлено, что кажущееся сродство фермента к ионам  $\text{Na}^+$  убывает в ряду:  $\alpha 2\beta 2 > \alpha 2\beta 1 > \alpha 1\beta 1 = \alpha 3\beta 2 > \alpha 3\beta 1$ . Сродство к ионам  $\text{K}^+$  изменяется в следующем порядке:  $\alpha 1\beta 1 > \alpha 2\beta 1 = \alpha 2\beta 2 > \alpha 3\beta 1 = \alpha 3\beta 2$ . Значения  $K_m$  для АТФ у изоферментов, содержащих  $\alpha 2$ - и  $\alpha 3$ -изоформы сходны и приблизительно в четыре раза ниже, чем величина  $K_m$  для изофермента  $\alpha 1\beta 1$ . Эти данные соответствуют результатам, полученным на клетках HeLa [Jewell, E.A., and Lingrel, J.B., 1991]. Единственное отличие заключается в сродстве  $\alpha 3$ -изоформы к ионам  $\text{K}^+$  – в клетках насекомых оно понижено.  $\alpha 3\beta 1$ - и  $\alpha 3\beta 2$ -изоферменты имеют высокую,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$  среднюю, а  $\alpha 1\beta 1$ -изофермент низкую чувствительность к убаину. Таким образом, разнообразие изоформ  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц Na,K-АТФазы позволяет модулировать работу фермента в разных тканях.

### 1.1.3. Каталитический цикл и конформации Na,K-АТФазы

Установлено, что в результате ограниченного протеолиза Na,K-АТФазы в зависимости от присутствия ионов  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ , появляются различные фрагменты. Эти данные позволили предположить, что расположение доменов фермента может изменяться относительно друга в зависимости от его конформации: вследствие смены конформаций в разных условиях для протеаз становятся доступными разные протеолитические участки на полипептидной цепи [Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988]. В итоге для Na,K-АТФазы были описаны две основные конформации, обладающие высоким сродством либо к ионам  $\text{Na}^+$  (E1), либо  $\text{K}^+$  (E2) (рис. 4). Позднее было установлено, что в среде, лишенной ионов

$\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , около 70 % фермента находится в E1-конформации. При добавлении ионов  $\text{K}^+$  наблюдается переход фермента из конформации E1 в конформацию E2. Помимо самих ионов активатором этого перехода служит также АТФ, который увеличивает сродство фермента к ионам  $\text{Na}^+$  и уменьшает сродство к ионам  $\text{K}^+$  [Repke, K.R., and Schon, R., 1992; Skou, J.C., and Esmann, M., 1992; Болдырев А.А., 2008].

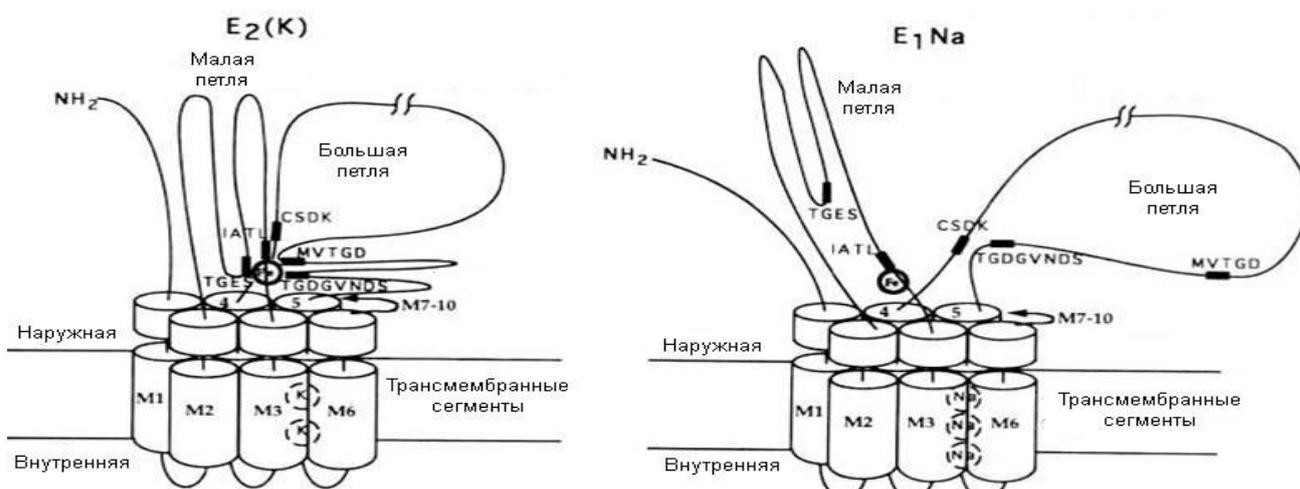


Рис 4. Две конформации Na,K-АТФазы. E1 – конформация, обладающая большим сродством к ионам  $\text{Na}^+$ ; E2 – конформация, обладающая большим сродством к ионам  $\text{K}^+$  [Болдырев А.А., 2008].

Эти конформации имеют и различное сродство к нуклеозидтрифосфатам: E1-конформация имеет большее сродство к АТФ ( $K_d$  около 0,1 мкМ), тогда как для насыщения центра связывания на E2-изоформе требуются миллимолярные концентрации АТФ [Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988].

Помимо этих двух конформаций выделяют ещё фосфоконформацию (E2P), фосфорилированную по остатку аспарагиновой кислоты активного центра. Эта конформация отлична от E2, которую фермент принимает в присутствии ионов  $\text{K}^+$ , и именно в этой конформации происходит связывание убаина и ряда белков-партнёров Na,K-АТФазы. Таким образом, эта конформация может играть важную роль в передаче клеточного сигнала, инициируемого связыванием сердечных гликозидов.

#### 1.1.4. Механизм работы Na,K-АТФазы

Каталитический цикл Na,K-АТФазы представляет собой смену конформаций при связывании с лигандами (Mg-АТФ) и с переносом ионов через мембрану по механизму пинг-понг (модель Альбертса-Поста). Катионы перемещаются через канал, образуемый полипептидной цепью  $\alpha$ -субъединицы АТФазы (рис. 5). При этом вокруг катиона

происходит формирование энергетического барьера (калитки), которая открывается и закрывается при фосфорилировании – дефосфорилировании фермента.

В ходе каталитического цикла Na,K-АТФазы сначала связывает три иона  $\text{Na}^+$  с цитоплазматической стороны мембраны при участии ряда отрицательно заряженных карбонильных групп аминокислотных остатков, находящихся в углублении между трансмембранными доменами. Было установлено, что большинство этих аминокислотных остатков принадлежат к трансмембранным доменам 4, 5 и 6 [Lingrel, J.V., and Kuntzweiler, T., 1994]. Позднее, на основе атомной модели Са-АТФазы, содержащей  $\text{Ca}^{2+}$ , связанный с активным центром (аналог конформации E1 для Na,K-АТФазы), и в конформации, свободной от катионов (аналог E2-конформации), было установлено расположение катион-связывающих участков Na,K-АТФазы. Первый участок связывания  $\text{Na}^+$  (I) на E1-конформации формируется кислородными атомами аминокислотных остатков трёх спиралей – M5 (Asn783; Glu786), M6 (Thr814; Asp815) и M8 (Gln930). Участок II сформирован тремя карбонильными остатками и четырьмя кислородными атомами (Asp811 и Asp815 спирали M6 и Val329, Ala330, Val332 и Glu334 спирали M4). В формировании участка III принимают участие карбонильные группы остатков Gly813 и Thr814 (спираль M6), гидроксильная группа Tyr778 (спираль M5) и карбоксильная группа Glu961 (спираль M9) [Ogawa, H., and Toyoshima, C., 2002]. При этом третий участок связывания  $\text{Na}^+$  формируется только после связывания катионов в участках I и II.

При связывании с Na,K-АТФазой ионы  $\text{Na}^+$  подвергаются дегидратации, а фермент со связанными ионами  $\text{Na}^+$  стабилизируется в E1-конформации. Эта конформация имеет высокое сродство к молекулам АТФ и ионам  $\text{Na}^+$ . После связывания ионов осуществляется перенос концевой фосфорильной группы АТФ на остаток аспарагиновой кислоты активного центра  $\alpha$ -субъединицы (Asp369 для  $\alpha$ 1-изоформы) с образованием ацилфосфатной ковалентной связи [Post, R.L., and Kume, S., 1973; Nishigaki, I., et al., 1974; Kuntzweiler, T.A., et al., 1995]. Помимо Asp369 в данном процессе участвуют аминокислотные остатки Lys501 и Asp586. Первый из них важен для связывания нуклеотида, а второй, предположительно, координирует ион  $\text{Mg}^{2+}$ , связывание которого необходимо для реакции гидролиза [Farley, R.A., et al., 1997]. После фосфорилирования молекулы фермента образуется интермедиат E1-P, а ADP выходит из активного центра фермента в цитоплазму. Ионы  $\text{Na}^+$  оказываются окклюдированными (запертыми) внутри канала, они не могут выйти ни в цитоплазму, ни во внеклеточное пространство, то есть, калитка в канале оказывается закрытой как со стороны цитоплазмы, так и со стороны внеклеточной среды (рис. 5).

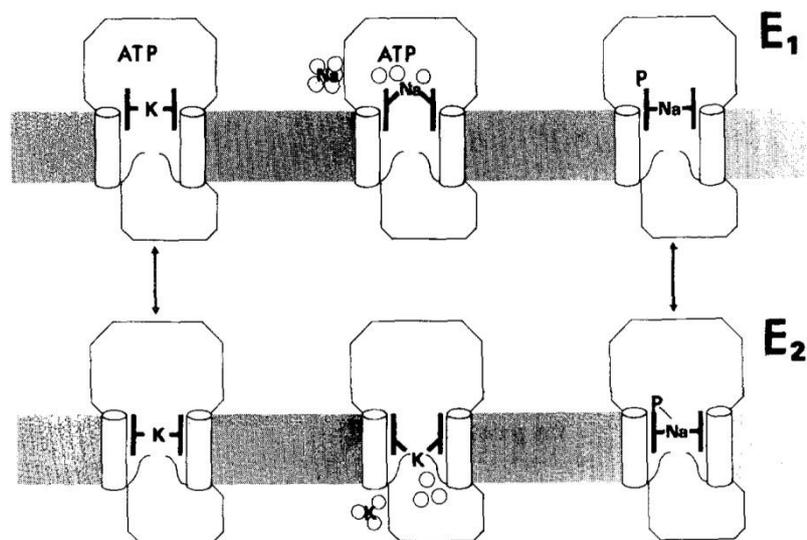


Рис. 5. Схема, описывающая прохождение ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через канал, сформированный  $\alpha$ -субъединицей Na,K-АТРаза [Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988].

Затем фосфорилированная Na,K-АТРаза переходит в конформационное состояние E<sub>2</sub>P, имеющее низкое сродство к ионам  $\text{Na}^+$  и высокое к ионам  $\text{K}^+$ . При этом происходит перемещение аминокислотных остатков, несущих карбонильные группы с координированными катионами, ближе к внеклеточной стороне мембранной части фермента. Далее происходит смена окклюированного состояния канала на открытое: калитка открывается с внеклеточной стороны, освобождая три иона  $\text{Na}^+$ , вслед за чем следует связывание двух ионов внеклеточного  $\text{K}^+$ . Были установлены два участка связывания ионов  $\text{K}^+$ . Участок I формируется атомами кислорода аминокислотных остатков спиралей M5 (Ser782, Glu786), M6 (Asp811, Asp815) и M8 (Gln930), а участок II – кислородными и иминогруппами скелета спирали M4 (Val329, Ala330, Val332), аминокислотными остатками спирали M5 (Asn783, Glu786) и спирали M6 (Asp811) [Ogawa, H., and Toyoshima, C., 2002].

Связывание ионов  $\text{K}^+$  сопровождается гидролизом ацилфосфатной связи, вследствие чего происходит освобождение неорганического фосфата, и фермент принимает конформацию E<sub>2</sub>. Затем, в свою очередь, происходит окклюзия ионов  $\text{K}^+$ , и их дальнейший перенос и освобождение в цитоплазму, что становится возможным за счет открывания калитки со стороны цитоплазмы. После диссоциации ионов  $\text{K}^+$  от центра связывания, их место занимают ионы  $\text{Na}^+$ , конформер E<sub>2</sub> переходит в конформер E<sub>1</sub>.

Этот процесс значительно стимулируется АТФ, который, связываясь в центре низкого сродства, повышает сродство фермента к ионам  $\text{Na}^+$  и снижает к ионам  $\text{K}^+$ . Таким образом,  $\text{Na}^+$  транспортируется из клетки, а  $\text{K}^+$  – в клетку (рис.6) [Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988; Mobasheri, A., et al., 2000].

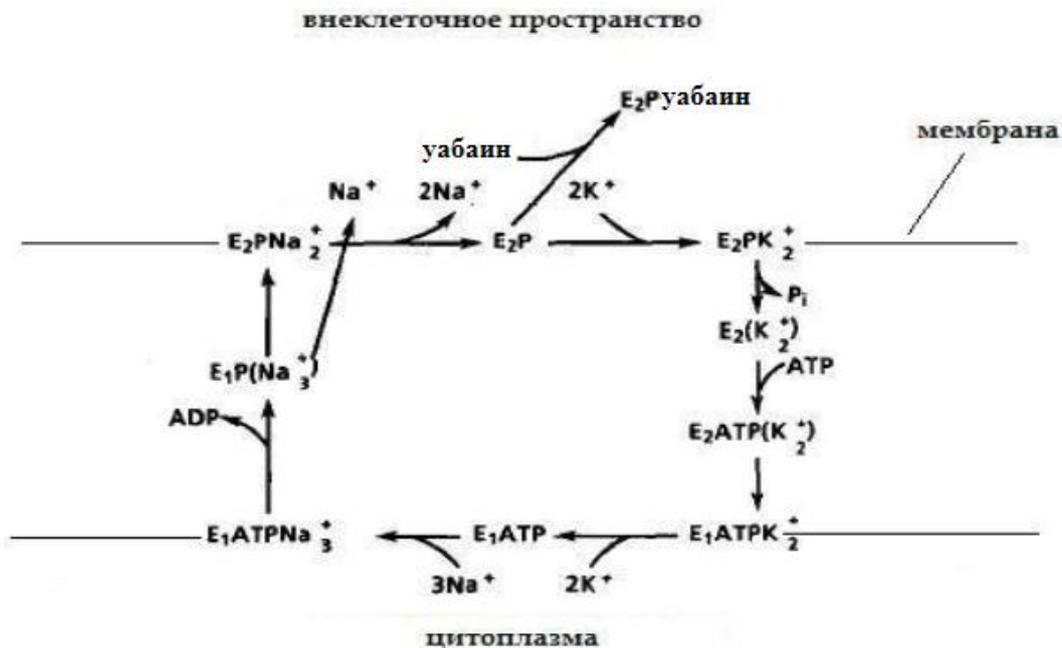


Рис. 6. Каталитический цикл Na,K-АТФазы. Модифицированная схема Альберса-Поста. E1 и E2 – различные конформационные состояния Na,K-АТФазы [Lingrel, J.V., and Kuntzweiler, T., 1994].

Было показано, что на скорость переноса катионов Na,K-АТФазой может влиять потенциал на мембране. При насыщающих концентрациях АТФ лимитирующей стадией реакции становится переход E1P-E2P. Было установлено, что в этих условиях потенциал на мембране величиной -180 мВ увеличивает скорость переноса на 30%. При низких концентрациях АТФ этот эффект исчезает – в этой ситуации лимитирующей становится другая стадия переноса: а именно, переход E2[K2] – АТФ-E1[K2] [Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988].

### 1.1.5. Протеолиз как метод изучения Na,K-АТФазы

Ограниченный протеолиз является одним из широко используемых методов анализа общей структуры и конформаций белков. Очень часто для этих целей используют трипсин и химотрипсин. Обе протеазы расщепляют только  $\alpha$ -субъединицу фермента, не затрагивая ее  $\beta$ -субъединицу [Giotta, J.K., 1975]. Одни из первых работ по протеолизу Na,K-АТФазы были проведены Питером Йоргенсеном (Peter Jørgensen). Именно в ходе этих экспериментов было показано, что Na,K-АТФаза имеет несколько конформаций. А

точнее, тогда были обнаружены две конформации: E1 – конформация с большим сродством к ионам  $\text{Na}^+$  и E2 – конформация с большим сродством к ионам  $\text{K}^+$ .

Протеолиз можно условно разделить на первичный и вторичный. Первичный – это разделение большой полипептидной цепи под действием протеаз на меньшие полипептидные цепи, а вторичный протеолиз рассматривается как протеолиз продуктов первичного протеолиза на ещё более мелкие фрагменты. Интенсивность протеолиза зависит от ионной силы среды, соотношения трипсин:белок, а также от времени инкубации.

В классических работах Йоргенсена было показано, что при первичном химотрипсинолизе в E1-конформации происходит разрыв пептидной связи у Leu266, что приводит к мгновенной потере ферментативной активности. Трипсин осуществляет быстрый протеолиз рядом с Lys30 и более медленный у Arg262, приводя к двухфазной кривой инактивации фермента. При этом способность связывать АТФ теряется только при гидролизе пептидной связи, расположенной рядом со вторым остатком. В результате происходит накопление фрагмента протеолиза с кажущейся молекулярной массой 78 кДа и минорных фрагментов, которые появляются также в результате химотрипсинолиза [Jorgensen, P.L., and Collins, J.H., 1986; Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988]. При длительном протеолизе наблюдается накопление фрагментов с молекулярной массой 44, 37, 23 и 15 кДа. Эти эксперименты были проведены на препаратах Na,K-АТФазы из почек кролика и почек свиньи при соотношении трипсин : Na,K-АТФаза = 1: 25, 1:20) [Jorgensen, P.L., 1977].

E2-конформация оказалась более устойчивой к действию химотрипсина, трипсин же производит более быстрое расщепление по связям рядом с Arg438 и далее с Lys30. Трипсинолиз в среде с KCl понижает способность фермента связывать АТФ в 6-8 раз быстрее, чем в присутствии NaCl. В растворе KCl связывание АТФ идёт параллельно с накоплением триптических фрагментов. Первичный трипсинолиз в среде с KCl даёт триптические фрагменты с молекулярной массой 58 и 48-46 кДа, а более длительный – 42 и 38 кДа (при соотношении трипсин : АТФаза = 1:25) [Jorgensen, P.L., 1977; Jorgensen, P.L., 1975]. Кроме того, в присутствии NaCl протеолиз идёт медленнее, чем в присутствии KCl. Вместе с тем, при трипсинолизе в среде с KCl около 90-95% фермента остаётся связанным с мембраной, в то время как трипсинолиз в присутствии NaCl приводит к большему выходу части фермента из мембраны [Jorgensen, P.L., 1975].

При первичном трипсинолизе Na,K-АТФазы из почек собаки в присутствии 150 мМ NaCl или KCl наблюдают следующее. В присутствии NaCl протеолиз приводит к образованию триптического фрагмента с молекулярной массой 77 кДа и минорных

пептидов; в среде с KCl – полипептидов с молекулярной массой 58 и 41 кДа. Было показано, что более длительный протеолиз в среде с KCl приводит к расщеплению остатка с молекулярной массой 41 кДа до остатка с молекулярной массой 37 кДа и минорных пептидов. При трипсинолизе в NaCl фрагмент с молекулярной массой 77 кДа расщепляется до триптических фрагментов с кажущейся молекулярной массой 58 и 41 кДа. Химотрипсин как в среде с Na<sup>+</sup>, так и в среде с K<sup>+</sup> даёт 2 пептида с молекулярными массами 40 и 35 кДа [Castro, J., and Farley, R.A., 1979].

Чарльз Уинтер (Charles Winter) при проведении трипсинолиза фермента из почек собаки при соотношении трипсин : АТРаза = 1:10 в присутствии Na<sup>+</sup> наблюдал появление остатка с молекулярной массой 85 кДа. Одновременно с этим фермент терял чувствительность к убаину. K<sup>+</sup>-конформация давала фрагменты с молекулярной массой 52 и 67 кДа [Winter, C.G., 1978].

Добавление АТФ в среду, содержащую KCl, приводит к появлению протеолитических фрагментов, которые характерны для трипсинолиза в среде с NaCl. Если в среду с NaCl добавить АТФ и MgCl<sub>2</sub>, наблюдается обратная ситуация: происходит накопление протеолитических фрагментов, специфичных для трипсинолиза в среде с KCl. При трипсинолизе препарата Na,K-АТФазы, полностью лишённого мембран и деструктурированного, деградация полипептидной цепи идёт очень быстро и приводит к образованию очень мелких фрагментов, при этом полностью теряется зависимость от присутствия ионов Na<sup>+</sup> или K<sup>+</sup> в среде [Jorgensen, P.L., 1975; Collins, J.H., et al., 1983].

Усиленный и длительный протеолиз (1 ч, 37°C, соотношение трипсин:АТРаза=1:5) как в среде с NaCl, так и с KCl, приводит к появлению фрагментов с кажущейся молекулярной массой около 19-20 кДа. Дальнейшие исследования показали, что это часть  $\alpha$ -субъединицы (названная доменом), обеспечивающая ионную окклюзию и состоящая из трансмембранных фрагментов M7-M10. Любопытен тот факт, что его дальнейший протеолиз идёт с разной скоростью в среде с NaCl и KCl, а также зависит от источника фермента. Инкубация Na,K-АТФазы с трипсином в присутствии NaCl приводит к более быстрой деградации 19 кДа фрагмента, чем в присутствии KCl. Было высказано предположение, что это может быть связано с влиянием ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> на саму протеазу. Действительно, трипсин сам способен связываться с мембранами, при этом даже 4х-кратное промывание не приводит к его удалению. При небольших концентрациях трипсина его сложно детектировать с помощью SDS-ПААГ, но его присутствие видно по воздействию на АТРаза. При этом выяснилось, что K<sup>+</sup> в большей степени способствует освобождению трипсина от мембраны. Это позволяет заключить, что в присутствии Na<sup>+</sup> ассоциация трипсина с мембраной может быть усилена, что вполне может способствовать

более интенсивной триптической атаке на участки протеолиза, расположенные вблизи мембраны [Mahmmoud, Y.A., 2005].

Этим же свойством трипсина можно объяснить и разную чувствительность к трипсинолизу данного фрагмента из разных источников. В частности, 19 кДа фрагмент из ректальных желёз акулы намного чувствительнее к трипсину, чем препарат из почек кролика. Инкубация фермента из ректальных желёз акулы в среде с ионами  $\text{Na}^+$  приводит к полной деградации этого фрагмента. Одновременно с этим было показано, что степень ассоциации трипсина с мембранами в препарате из акулы была значительно выше, чем для препарата из кролика. На это могла повлиять разница в липидном составе мембраны: в липидном бислое мембран из акулы содержится 60% холестерина, тогда как в мембране почек кролика только 16% [Mahmmoud, Y.A., 2005].

Стивен Карлиш (Steven Karlish) и его коллеги, проводя длительный трипсинолиз Na,K-АТФазы из почек свиньи в присутствии ионов  $\text{Rb}^+$  (аналог  $\text{K}^+$ ) и  $\text{Ca}^{2+}$  добились получения 19 кДа фрагмента. Они установили, что этот фрагмент устойчив к трипсинолизу в присутствии в среде ионов  $\text{Rb}^+$ , но в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Фрагмент с молекулярной массой 19 кДа был способен связывать как  $\text{Rb}^+$ , так и  $\text{Na}^+$ . При дальнейшем трипсинолизе в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , но в отсутствие  $\text{Rb}^+$  происходит быстрая деградация 19 кДа фрагмента с потерей способности связывать  $\text{Rb}^+$ . В среде без  $\text{Rb}^+$  19 кДа фрагмент гидролизуется до очень мелких пептидов, а в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  из него образуется 13 кДа фрагмент и также теряется способность связывать  $\text{Rb}^+$  [Karlish, S.J., et al., 1990].

Сходный эксперимент на препарате Na,K-АТФазы из солевых желёз *S. Acanthias* был проведён Микаэлем Эссманом (Mikael Essman) и коллегами. Na,K-АТФазу подвергали трипсинолизу при соотношении трипсин:белок = 1:1,8 в течение 60 мин при 23°C в 10 мМ NaCl или RbCl. При протеолизе очищенного препарата Na,K-АТФазы из ректальных желёз акулы в среде, содержащей KCl или его аналог RbCl, наблюдается накопление фрагмента с кажущейся молекулярной массой 19 кДа, что соответствует данным, полученным в работе Карлиша и коллег на препарате из почек. В присутствии NaCl наблюдается полная деградация фермента. С помощью антител к определённым эпитопам было подтверждено, что остаток с кажущейся молекулярной массой 19 кДа содержит трансмембранные домены M7-M10. Фрагменты, содержащие трансмембранные домены M1/M2 и M3/M4, оказались одинаковыми как при трипсинолизе в присутствии ионов  $\text{Na}^+$ , так и в присутствии ионов  $\text{Rb}^+$ . Кроме того, было показано, что при 37°C части мембранных доменов могут выходить из мембраны, тем самым открывая новые участки для трипсинолиза [Esmann, M., et al., 2006].

В работе Кэти Гириг (Käthi Geering) было показано, что на трипсинолиз  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТРазы помимо ионов и лигандов влияет её ассоциация с  $\beta$ -субъединицей. Протомер  $\alpha\beta$  более устойчив к протеолизу, чем чистая  $\alpha$ -субъединица. Последняя деградирует на 80% после 5 минутной инкубации микросом при температуре 4°C и соотношении трипсин/белок = 0,01. Добавление лигандов (NaCl, KCl, Mg<sup>2+</sup>, убаин) не изменяет наблюдаемой картины. В то же время для  $\alpha\beta$ -протомеров ситуация была другая: в целом фермент показал большую устойчивость к протеолизу – потребовался трипсинолиз в течение 1 ч при 25°C, чтобы увидеть заметные следы деградации фермента. Данная работа была проведена на ооцитах лягушки, трансфицированных кРНК  $\alpha$ -субъединицы и протомера  $\alpha+\beta$ . Для Na,K-АТРазы, экспрессированной в таких условиях, было показано, что в присутствии KCl фермент является более устойчивым к трипсинолизу, чем в присутствии NaCl и убаина. (В тоже время, протеолиз Na,K-АТРазы из почек кролика идёт быстрее в KCl, чем в NaCl [Jorgensen, P.L., 1975]). Кажущиеся молекулярные массы триптических фрагментов также отличались от фрагментов, полученных в работах на почках: 68 кДа – в NaCl и 63 кДа – в KCl. Помимо Na<sup>+</sup> (E1-) и K<sup>+</sup> (E2-конформация), в данной работе проводили протеолиз в среде с убаином, который индуцирует переход фермента в конформацию E2-убаин. При этом наблюдали накопление фрагмента с молекулярной массой 41 кДа [Geering, K., 1996].

Таким образом, путь, по которому идёт протеолиз Na,K-АТРазы, зависит от конформации белка, от наличия  $\beta$ -субъединицы, и, отчасти, от источника фермента.

### 1.1.6. Кардиотонические стероиды

Классическими ингибиторами Na,K-АТРазы являются кардиотонические стероиды, среди которых наиболее известен хорошо растворимый в воде убаин. Кардиотонические стероиды, или сердечные гликозиды, представляют собой стероидные O-гликозиды, имеющие в 17-м положении ненасыщенный цикл:  $\gamma$ -лактонный цикл с пятью атомами углерода (карденелиды) или  $\sigma$ -лактонный с шестью углеродными атомами (буфадиенолиды). Углеводная цепь карденелидов, обычно состоящая из 1-5 моносахаридов, находится в 3 $\beta$ -положении. Большинство буфадиенолидов является агликонами, то есть, они не содержат молекулы сахара в 3-м положении циклопентанфенантренового ядра (рис. 7). Формулы наиболее известных представителей семейства кардиотонических стероидов, а именно: убаина, маринобуфагенина и дигоксина, представлены на рис. 7.

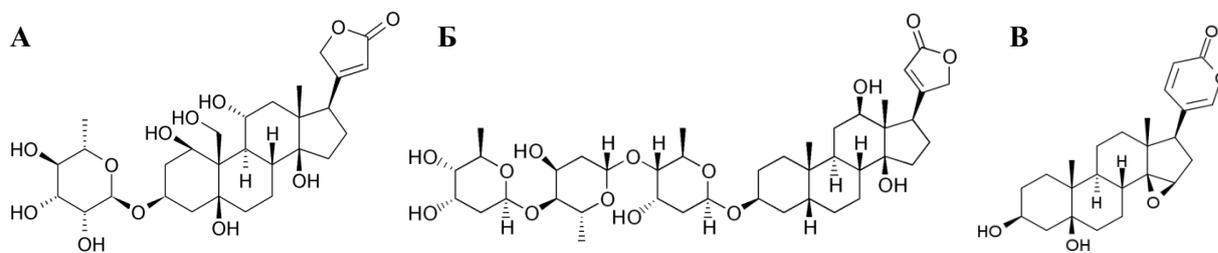


Рис. 7. Структурные формулы кардиотонических стероидов: убаина (А), дигоксина (Б) и маринобуфагенина (В).

В организме человека и животных карденелиды и буфадеинолиды вырабатываются в гипоталамусе и коре надпочечников, и поступают в кровь в субмикромольных концентрациях в ответ на воздействие различных биологически активных соединений, таких как ангиотензин II, ацетилхолин, вазопрессин, катехоламины, а также в ответ на изменение окружающих условий, например, при наступлении гипоксии [Bagrov, A.Y., et al., 2009a]. Связывание кардиотонических стероидов с Na,K-АТФазой приводит к ингибированию её активности, а также к её ассоциации с некоторыми белками, такими как EGRF (epidermal growth factor receptor) или кавеолы, что приводит к инициации сигнальных каскадов [Xie, Z., and Askari, A., 2002; Bogdanova, A., et al., 2016].

В связывании убаина с Na,K-АТФазой участвует ряд аминокислотных остатков  $\alpha$ -субъединицы, находящихся как во внеклеточном пространстве, так и в трансмембранных областях, формирующих небольшое углубление между петлями M1-M2, M3-M4, M5-M6 и M9-M10 (рис. 8) [Pierre, S.V., and Xie, Z., 2006].

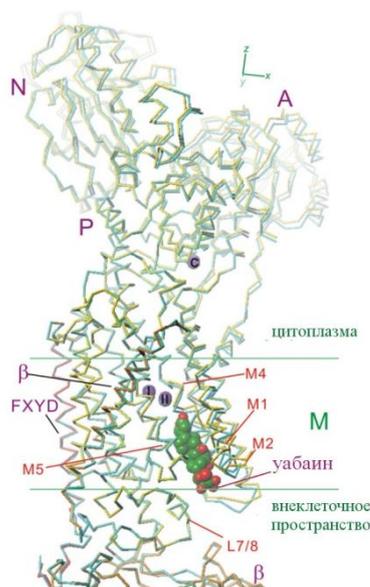


Рис 8. Кристаллическая структура Na, K-АТФазы из ректальных желез акулы, содержащей связанную молекулу убаина. А, N, P - цитоплазматические домены; сиреневые шарики с обозначениями I, II и с - ионы  $K^+$ , зелёные и красные шарики - молекула убаина [Ogawa, H., et al., 2009].

Чувствительность изофермента Na,K-АТРазы к сердечным гликозидам определяется изоформой каталитической субъединицы:  $\alpha 3$ -изоформа является наиболее чувствительной,  $\alpha 2$ - занимает промежуточное положение, а  $\alpha 1$ - отличается минимальной чувствительностью. Необходимо отметить и существование видовых различий в чувствительности Na,K-АТРазы к кардиотоническим стероидам, минимальной чувствительностью характеризуется Na,K-АТРаза грызунов.

Механизм ингибирования Na,K-АТРазы кардиотоническими стероидами является достаточно сложным. В соответствии с принятой моделью убаин, связываясь с ферментом с внеклеточной стороны мембраны, приводит к «парализации» движений функциональных доменов и «фиксирует» фермент в конформации E2-убаин [Pierre, S.V., and Xie, Z., 2006].

Помимо убаина в плазме крови человека были обнаружены и другие кардиотонические стероиды. Одним из них является маринобуфагенин (3,5-дигидрокси-14,15-эпокси-буфаденолид) [Bagrov, A.Y., et al., 1998; Fedorova, O.V., et al., 1998]. Оба кардиотонических стероида представляют собой вазоконстрикторы [Bagrov, A.Y., and Fedorova, O.V., 1998]. Следует отметить, что вазоконстрикция является следствием взаимодействия кардиотонических стероидов с Na,K-АТРазой, поскольку никаких других белков, связывающих эти соединения, до сих пор не обнаружено, невзирая на длительные и тщательно проведенные исследования.

Убаин и маринобуфагенин одинаково ингибируют гидролитическую активность Na,K-АТРазы эпителиальных клеток почки (значения IC50 составляют около 1 мкМ) [Akimova, O.A., et al., 2005]. И убаин, и маринобуфагенин связываются с Na,K-АТРазой в одной и той же области между трансмембранными спиралями, однако центр связывания маринобуфагенина находится ближе к поверхности мембраны. Согласно построенной молекулярной модели ядро молекулы маринобуфагенина располагается примерно на 5 ангстрем ближе к выходу из связывающей полости, чем ядро молекулы убаина. Вероятно, именно этим обусловлена разница в конформационной зависимости связывания Na,K-АТРазы и кардиотонических стероидов: убаин может связаться с  $\alpha$ -субъединицей фермента только когда она находится в E2-конформации, в то время как маринобуфагенин способен связываться с ферментом, находящимся и в E1-, и в E2-конформации. Данные, полученные методом измерения флуоресценции  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы, меченой флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и 5-иодацетамидфлуоресцеином (5-IAF) по остаткам нуклеотид-связывающего домена (Lys501 и Cys457 соответственно), а также методом ИКТ (изотермической калориметрии титрования), подтвердили, что связывание убаина и

маринобуфагенина переводит фермент в разные конформации [Klimanova, E.A., et al., 2015].

Любопытен тот факт, что в зависимости от концентрации, убаин может как запускать пролиферацию клеток, так и приводить к их гибели. Например, при инкубации клеток HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) в присутствии 1-3 нМ убаина в течение 24 – 72 ч наблюдается увеличение клеточной пролиферации на 20 – 50%, в то время как большая концентрация кардиотонического стероида подавляет рост и вызывает гибель клеток [Тверской А.М. и соавт., 2016]. Точный механизм запуска убаином проапоптотических каскадов пока полностью не изучен, но были получены данные о том, что в клетках линии HUVEC убаин запускает активацию каспазы 3 и каспазы 2, что приводит к активации Rock-1 и Rock-2 киназ через протеолитическое расщепление их неактивных форм-предшественников. Параллельно происходит интернализация белков, отвечающих за клеточную адгезию, что приводит к откреплению клеток от подложки [Ark, M., et al., 2010]. На клетках нейробластомы линии SH-SY5Y и клетках глиобластомы линии LN299 было показано, что убаин подавляет экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-XL. Так как эти белки связываются с проапоптотическими факторами Bad и Bax и препятствуют формированию пор в наружной мембране митохондрий, то снижение их содержания в клетке приводит к тому, что Bad и Bax формируют поры и способствуют выходу цитохрома С в цитозоль. Затем цитохром С может стимулировать активацию каспазы 3 через активацию каспазы 9. Воздействие убаина на клетки приводит также к фосфорилированию белка p53, который принимает участие в остановке клеточного цикла и запуске апоптоза [Kulikov, A., et al., 2007; Chen, D., et al., 2014].

Интересен тот факт, что действие убаина является как тканеспецифичным, так и специфичным по отношению к дифференцированности клеток. Например, убаин в концентрации 3 нМ в течение 24 ч запускает апоптоз в линии клеток почки больных аутосомальным доминантным поликистозом (autosomal dominant polycystic kidney disease), но не приводит к гибели здоровых клеток [Venugopal, J., and Blanco, G., 2016].

Таким образом, помимо ингибирования Na,K-АТФазы кардиотонические стероиды выполняют регуляторную роль, запуская некоторые сигнальные каскады клетки через взаимодействие с  $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТФазы и последующую инициацию ее взаимодействия с белками сигнального каскада.

### **1.1.7. Функции Na,K-АТФазы**

Na,K-АТФаза представляет собой один из многофункциональных белков клетки. Важной функцией этого фермента является создание трансмембранного градиента ионов

$\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  на плазматической мембране. Содержание Na,K-АТФазы в мембранах различных тканей варьирует от нескольких молекул на квадратный микрометр в эритроцитах до нескольких тысяч молекул на квадратный микрометр в эпителии нефрона и клеток возбудимых тканей. В возбудимых тканях Na,K-АТФаза играет важную роль в создании потенциала покоя. Открытие натриевых и калиевых каналов при прохождении потенциала действия вызывает деполяризацию мембраны. Сразу же после проведения сигнала Na,K-АТФаза начинает выполнять компенсаторную работу по восстановлению градиента  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  [Лопина О.Д., 2001]. В почках Na,K-АТФаза обеспечивает реабсорбцию  $\text{Na}^+$  из первичной мочи, находящейся в нефронах, что необходимо для его трансэпителиального переноса [Rossier, B.C., et al., 1987].

Создаваемый Na,K-АТФазой градиент может использоваться ионными переносчиками (системы вторичного активного транспорта). В частности, в мышцах и в нервной ткани градиент  $\text{Na}^+$  используется Na/Ca-обменником: при повышении концентрации внутриклеточного  $\text{Na}^+$  обменник переносит натрий из клетки наружу, а ионы  $\text{Ca}^{2+}$  – внутрь клетки. Повышение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в сердце и в гладкой мускулатуре сосудов в свою очередь усиливает сокращение. Na/H-обменник производит обмен внутриклеточного протона на внеклеточный натрий, тем самым регулируя pH внутри и снаружи клеток. Градиент  $\text{Na}^+$  используется также для транспорта через мембрану таких соединений, как аминокислоты, глюкоза, нуклеотиды [Лопина О.Д., 2001].

Помимо этого Na,K-АТФаза является инициатором ряда сигнальных каскадов клетки. Например, чувствительная к действию убаина и окислению  $\alpha 3$ -изоформа Na,K-АТФазы, присутствующая в нервной ткани, может выполнять функции сенсора активных форм кислорода (ROS) [Болдырев А.А., 2008]. Показано, что эндогенные ROS способны вызвать эндоцитоз Na,K-АТФазы [Zhang, L., et al., 2008]. Через убаин-чувствительные изоформы могут проходить гормональные сигналы. Например, у мышей с мутантной  $\alpha 2$ -изоформой, в которой были заменены аминокислотные остатки, отвечающие за чувствительность Na,K-АТФазы к убаину, устранялась способность к повышению артериального давления в ответ на введение адренкортикотропного гормона [Болдырев А.А., 2008].

Передача сигнала Na,K-АТФазой может осуществляться как через регуляцию соотношения одновалентных ионов в клетке, так и при помощи взаимодействия фермента с белками-партнёрами, зачастую опосредованного кардиотоническими стероидами. Сердечные гликозиды, связываясь с Na,K-АТФазой, с одной стороны, «отключают» её как ионный насос, а с другой стороны, переводят её в конформацию, необходимую для

взаимодействия с рядом белков, участвующих в передаче сигнала, таких, например, как Src-киназа и кавеолин. На культурах кардиомиоцитов было показано, что при гипертрофии сердца наблюдаются оба феномена (рис. 9) [Xie, Z., and Askari, A., 2002].

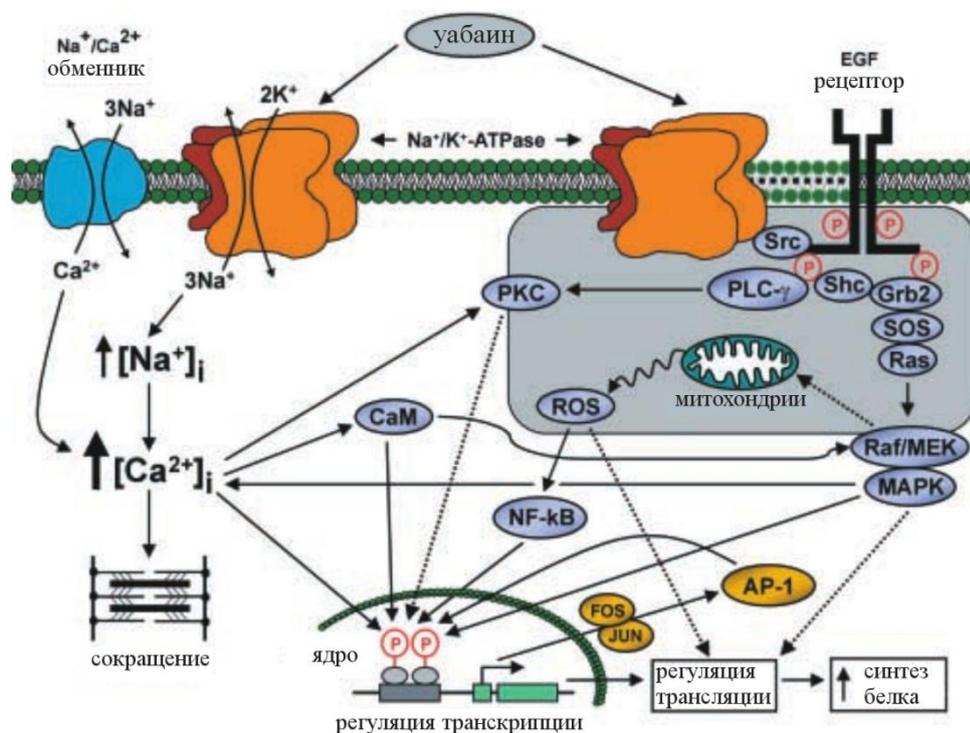


Рис. 9. Схема передачи сигнала через Na,K-АТФазу в кардиомиоцитах. В сером прямоугольнике – та часть каскада, на которую не влияют изменения в концентрациях ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  [Xie, Z., and Askari, A., 2002].

При взаимодействии убаина с Na,K-АТФазой кардиомиоцитов вследствие ингибирования фермента изменяется соотношение ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , что приводит, в свою очередь, к существенному увеличению концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванному работой Na/Ca-обменника. Параллельно происходит активация Src-киназы, фосфорилирующей ряд белков клетки, включая EGF-рецептор, что приводит к перемещению белков Shc, Grb2, Sos и Ras к плазматической мембране. Активация Ras запускает сигнальный каскад, приводящий к накоплению ROS в митохондриях и к активации p42/44 MAPK через Ras/Raf/MAPK киназный каскад. Последний процесс также требует повышения концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и активации PKC под действием убаина. Активные формы кислорода, в свою очередь, активирует NF- $\kappa$ B, что стимулирует транскрипцию ряда генов, отвечающих за рост и дифференциацию клеток [Xie, Z., and Askari, A., 2002; Prassas, I., and Diamandis, E.P., 2008]. Таким образом, можно выделить две функциональных популяции Na,K-АТФазы – ионный насос и белок, выполняющий функцию рецептора кардиотонических стероидов.

Было установлено, что наличие разных изоформ  $\alpha$ -субъединицы ( $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\alpha 3$ - и  $\alpha 4$ -) необходимо для нормальной жизнедеятельности организма. В ряде экспериментов были предприняты попытки создания мутантных животных, не имеющих одной из этих изоформ. Животные, лишённые  $\alpha 1$ -изоформы, не развивались далее фазы бластомера. Это показывает, что  $\alpha 1$ - является необходимой уже на первой стадии эмбрионального развития [James, P.F., et al., 1999; Barcroft L.C., et al., 2004]. Животные, лишённые  $\alpha 2$ -изоформы, погибали сразу после рождения из-за асинхронной работы нейронов дыхательного центра [Moseley, A.E., et al., 2003]. Животные, лишённые  $\alpha 3$ -изоформы также погибали сразу после рождения, но причина не была выявлена [Moseley, A.E., et al., 2007]. Животные с недостаточным количеством  $\alpha 2$ - и  $\alpha 3$ -изоформ оказались жизнеспособны, но дефицит фермента вызывал определённые изменения. Например, при дефиците  $\alpha 2$ - наблюдалось усиление сокращений сердечной мышцы [James, P.F., et al., 1999], скелетной мускулатуры [He, S., et al., 2001] и повышение тонуса сосудов [Zhang, J., et al., 2005]. Более того, у животных, дефицитных по  $\alpha 2$ - или  $\alpha 3$ -изоформам наблюдали отклонения в поведении. Например, животные, содержащие мутантную  $\alpha 2$ -изоформу, демонстрировали большую тревожность, чем животные дикого типа. А недостаток  $\alpha 3$ - приводил к снижению скорости обучения на начальных этапах [Lingrel, J.B., et al., 2007].

Были описаны заболевания, связанные с дефицитом  $\alpha$ -изоформ у людей. При нехватке  $\alpha 2$  развивается наследственная гемиплегическая мигрень второго типа (Familial Hemiplegic Migraine Headache type 2) [De Fusco, M., et al., 2003; Pierelli, F., et al., 2006]. С дефицитом  $\alpha 3$ -изоформы связан паркинсонизм с нарушением тонуса со стремительным развитием (Rapid-Onset Dystonia Parkinsonism) [de Carvalho Aguiar, P., et al., 2004].

Таким образом, Na,K-АТРаза является белком, который работает не только как ионная помпа, но и как рецептор. Кроме того, фермент выполняет ряд тканеспецифичных функций. Функция Na,K-АТРаза как рецептора была открыта сравнительно недавно, но её значимость очень велика. Обнаружено много белков-партнёров, которые, взаимодействуя с  $\alpha$ -субъединицей, запускают клеточные каскады, приводящие как к клеточной пролиферации или выживанию в неблагоприятных условиях, так и наоборот, к апоптозу или некрозу в зависимости от типа ткани и состояния окружающей среды. Дисфункция Na,K-АТРаза способна привести к развитию ряда заболеваний, но, вместе с тем, Na-насос может послужить в качестве мишени для лекарственных препаратов при лечении многих болезней, например сердечной недостаточности или некоторых видов опухолей.

### 1.1.8. Na,K-АТРаза и белки-партнёры

#### 1.1.8.1. Гамма-субъединица

В некоторых тканях, например, в почечных канальцах, Na,K-АТРаза выделяется совместно с третьей субъединицей, которая получила название  $\gamma$ -субъединицы [Therien, A.G., et al., 1997]. Более того, фермент кристаллизуется совместно с этой субъединицей [Morth, J.P., et al., 2007].

$\gamma$ -Субъединица довольно хорошо изучена и является членом семейства белков FXYD. В это семейство, помимо самой  $\gamma$ -субъединицы (FXYD2), входят фосфолемман (FXYD1), белки Mat-8 (mammary tumor, 8 kDa) (FXYD3), CNIF (channel-inducing factor) (FXYD4), FXYD7 и другие [Beguín, P., et al., 1997; 2002; Attali, B., et al., 1995; Sweadner, K.J., and Rael, E., 2000]. Белки семейства FXYD имеют один трансмембранный домен и FXYD-последовательность. Они выполняют функцию регуляторов ионных транспортёров, некоторые из них могут самостоятельно формировать ионные каналы [Minor, N.T., et al., 1998; Moorman, J.R., et al., 1992; 1995]. Например, было показано, что при экспрессии  $\gamma$ -субъединицы в клетках насекомых Sf-9 появляется неселективный ионный ток, обусловленный, в первую очередь, перемещением через мембрану  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  [Minor, N.T., et al., 1998]. При экспрессии в ооцитах лягушки белка CNIF наблюдали возникновение  $\text{K}^+$  тока [Attali, B., et al., 1995]. Но достоверных данных о формировании этими белками ионных каналов пока не получено. Вместе с тем, для фосфолеммана было установлено формирование самостоятельных цвиттерионных каналов, способных, в зависимости от условий, проводить либо ионы  $\text{Cl}^-$  [Moorman, J.R., et al., 1992; 1995], либо, чаще при гиперполяризации, ионы  $\text{K}^+$  [Kowdley, G.C., et al., 1997].

$\gamma$ -Субъединица состоит из 58-70 аминокислотных остатков (6,5-14 кДа) и формирует один трансмембранный домен [Mercer, R.W., et al., 1993]. N-концевая часть её полипептидной цепи обращена во внеклеточное пространство, она несёт суммарный отрицательный заряд, в то время как C-концевая последовательность является положительно заряженной.  $\gamma$ -Субъединица, в отличие от  $\beta$ -субъединицы, не содержит гликозильных остатков [Therien, A.G., et al., 1997; Mobasher, A., et al., 2000]. В её состав входят два остатка цистеина (40 и 42), для Cys42 характерно глутатионилирование [Vibert, S., et al., 2011].

Обнаружены две изоформы  $\gamma$ -субъединицы, которые являются результатом альтернативного сплайсинга одной кДНК:  $\gamma\alpha$  (7184 Да) и  $\gamma\beta$  (7338,9 Да) [Beguín, P., et al., 1997; Sweadner, K.J., and Rael, E., 2000; Kuster, B., et al., 2000; Pu, H.X., et al., 2001]. Гомология  $\gamma$ -субъединицы среди млекопитающих составляет 93%, а при сравнении с земноводными (ооциты лягушки) – 76% [Mercer, R.W., et al., 1993; Beguín, P., et al., 1997].

Сама по себе  $\gamma$ -субъединица не является необходимым компонентом ни для структурного или функционального созревания Na,K-АТФазы, ни для формирования стабильного  $\alpha\beta$ -комплекса и активации фермента [Scheiner-Bobis, G., and Farley, R.A., 1994; Geering, K., et al., 1996; Beguin, P., et al., 1997; Mobasher, A., et al., 2000]. Тем не менее, было показано, что при экспрессии  $\alpha$  и  $\gamma$ -субъединиц в клетках насекомых SF-9 и ооцитах лягушки, а также в клетках нефрона наблюдается совместное расположение  $\gamma$ -субъединиц и  $\alpha\beta$ -комплексов на мембране. Более того, методом иммунопреципитации было подтверждено их взаимодействие между собой [Mercer, R.W., et al., 1993; Minor, N.T., et al., 1998; Beguin, P., et al., 1997]. Методом молекулярных сшивок также было продемонстрировано, что  $\gamma$ -субъединица может взаимодействовать как с  $\alpha$ -, так и с  $\beta$ -субъединицей. На основе этих данных было выдвинуто предположение, что внеклеточный домен  $\gamma$ -субъединицы располагается вблизи участка взаимодействия  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц [Fuzesi, M., et al., 2005]. Интересен тот факт, что при экспрессии в клетках насекомых SF-9,  $\gamma$ -субъединица способна самостоятельно доставляться и встраиваться в мембрану независимо от других субъединиц. В то же время в ооцитах лягушки при экспрессии одной  $\gamma$ -субъединицы, только около 15% белка встраивается в мембрану, остальные 85% экспрессированной  $\gamma$ -субъединицы остаются интернализированными. Только при формировании  $\alpha\beta$ -комплекса происходит её встраивание в мембрану [Minor, N.T., et al., 1998; Beguin, P., et al., 1997; Mobasher, A., et al., 2000]. Таким образом, можно сказать, что  $\gamma$ -субъединица является белком-партнёром Na,K-АТФазы.

Взаимодействие  $\gamma$ -субъединицы с АТФазой осуществляется через FXYD-мотив на N-концевой части белка, а так же через положительно заряженные остатки на C-конце [Beguin, P., et al., 2001]. Регуляторные свойства  $\gamma$ -субъединицы по отношению к Na,K-АТФазе проявляются в увеличении сродства АТФазы к ионам  $\text{Na}^+$  при высоких концентрациях ионов  $\text{K}^+$  [Pu, H.X., et al., 2001; Therien, A.G., et al., 1999; Beguin, P., et al., 1997], в понижении сродства к внутриклеточным ионам  $\text{Na}^+$  и повышении сродства к внеклеточным ионам  $\text{K}^+$  при высоком отрицательном потенциале на мембране [Arystarkhova, E., et al., 1999; Beguin, P., et al., 2001; Geering, K., et al., 2003], а также в увеличении сродства к АТФ [Therien, A.G., et al., 1997; 1999] и стабилизации E1-конформации фермента [Therien, A.G., et al., 1997; Minor et al., 1998]. В некоторых работах было показано, что при удалении  $\gamma$ -субъединицы от  $\alpha\beta\gamma$ -комплекса наблюдается снижение активности фермента [Therien, A.G., et al., 1997; Cortes, V.F., et al., 2006]. В то же время в других исследованиях был обнаружен обратный эффект [Mahmoud, Y.A., et al., 2000].

Джонс (Jones) и коллеги высказали предположение о том, что  $\gamma$ -субъединица необходима в предимплантационный период раннего эмбрионального развития. Они

провели ряд экспериментов на трофоэктодерме мышинной бластулы. С использованием антител против  $\gamma$ -субъединицы было показано, что в клетках происходит повышенная экспрессия  $\gamma$ -субъединицы и её накопление в апикальных и базолатеральных мембранах клеток. Остановка экспрессии  $\gamma$ -субъединицы приводила к задержке образования впячивания в развивающемся бластомере. Эти и предыдущие работы демонстрируют, что Na,K-АТРаза является не только ферментом «домашнего хозяйства», вовлечённым в ионный гомеостаз, но и участником морфогенеза в ходе эмбрионального развития [Jones, D.H., et al., 1997; Mobasher, A., et al., 2000].

Помимо самой  $\gamma$ -субъединицы с Na,K-АТРазой способны взаимодействовать и другие белки семейства FXYD, в частности, фосфолемман (FXYD1), CNIF (FXYD4), FXYD7 и FXYD10 [Begu, P., et al., 2001; Geering, K., et al., 2003; Shinoda, T., et al., 2009]. Было показано, что при взаимодействии Na,K-АТРаза с CNIF происходит повышение сродства фермента к ионам  $\text{Na}^+$ , расположенным как вне, так и внутри клетки, и понижение сродства к внеклеточным ионам  $\text{K}^+$  [Begu, P., et al., 2001; Geering, K., et al., 2003]. Белок CNIF экспрессируется в почках и кишечнике, характерно, что  $\gamma$ -субъединица экспрессируется преимущественно в клетках толстой восходящей петли, то CNIF – в клетках собирательной трубочки, что может играть регуляторную роль [Attali, B., et al., 1995]. Белок FXYD7 экспрессируется в мозге, где он способен взаимодействовать только с  $\alpha 1\beta 1$ - гетеродимером, снижая за счет этого сродство фермента к ионам  $\text{K}^+$ . Любопытен тот факт, что при совместной экспрессии в ооцитах лягушки белок FXYD7 может взаимодействовать с  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  и  $\alpha 3\beta 1$  гетеродимерами, но не с  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$  гетеродимерами [Begu, P., et al., 2002].

Фосфолемман экспрессируется в клетках сердца и скелетной мускулатуры. Методом совместной иммунопреципитации было показано, что в сердечной ткани он преимущественно взаимодействует с  $\alpha 1$ -изоформой, и меньше с  $\alpha 2$ , в то же время в скелетной мускулатуре фосфолемман взаимодействует исключительно с  $\alpha 1$ -изоформой. Он уменьшает сродство Na-насоса к внутриклеточному  $\text{Na}^+$  [Geering, K., et al., 2003]. Кроме того, была обнаружена форма фосфолеммана, способная связываться с микротрубочками и обеспечивать прикрепление Na,K-АТРаза к цитоскелету [Kelly, C.E., et al., 2004]. В препарате Na,K-АТРаза из солевых желёз утки также был обнаружен FXYD-белок, похожий на фосфолемман и тоже связывающийся и с АТРазой, и с микротрубочками [Якушев С.С. и соавт., 2008]. FXYD10 или фосфолемман-подобный белок (PLMS) экспрессируется в ректальных железах акулы и также взаимодействует с Na,K-АТРазой. При этом было показано, что его удаление от фермента вследствие

фосфорилирования приводит к повышению активности АТРаза [Mahmmoud, Y.A., et al., 2000].

Таким образом, практически все белки семейства FXYD способны связываться с Na,K-АТРазой и модулировать её работу. Так как экспрессия данных белков тканеспецифична, и их влияние на Na,K-АТРазу различается, это позволяет осуществлять тонкую регуляцию работы фермента в зависимости от ткани и выполняемых ею функций.

#### **1.1.8.2. Цитоскелет (анкирин, аддуцин, тубулиновый цитоскелет)**

Важную роль в регуляции функции Na,K-АТРаза является ее связывание с цитоскелетом. В кардиомиоцитах фермент взаимодействует с фосфолепманом, который, в свою очередь, связывается с микротрубочками цитоскелета, причем этот процесс регулируется фосфорилированием фосфолепмана [Geering, K., et al., 2003; Kelly, C.E., et al., 2004]. В эпителии почек Na,K-АТРаза связана со спектрином, и далее с актиновым цитоскелетом через белок анкирин [Nelson, W.J., and Veshnock, P.J., 1987; Morrow, J.S., et al., 1989; Nelson, W.J., et al., 1991]. Взаимодействие Na-насоса с анкирином происходит с помощью двух участков связывания, находящихся в цитоплазматическом домене  $\alpha$ -субъединицы [Rubtsov, A.M., and Lopina, O.D., 2000]. Именно благодаря этой связи происходит правильное расположение Na,K-АТРаза в базолатеральной клеточной мембране в эпителии почечных канальцев, что необходимо для обеспечения трансэпителиального транспорта  $\text{Na}^+$  в почках. В других типах эпителия, например, в секреторном, Na,K-АТРаза находится на апикальной мембране [Mobasheri, A., et al., 2000]. Было показано, что помимо анкирина, Na,K-АТРаза может связываться с мономерным актином. В последовательности полипептида  $\alpha$ -субъединицы было обнаружено два участка, которые очень похожи на последовательность актин-связывающего домена миозина II. Примечательно, что данный участок был выявлен у трёх из четырёх изоформ  $\alpha$ -субъединицы [Cantiello, H.F., 1995; Mobasheri, A., et al., 2000]. Кроме того, Na,K-АТРаза связывается с ещё одним компонентом цитоскелета – белком аддуцином [Torielli, L., et al., 2008]. При этом в условиях низкого содержания АТФ (микромольные концентрации) аддуцин способен модулировать активность АТРаза, ускоряя смену конформаций E2  $\rightarrow$  E1. Предположительно, аддуцин связывается с Na-насосом в тех же участках, что и анкирин [Ferrandi, M., et al., 1999].

Взаимодействие Na,K-АТРаза с цитоскелетом играет важную роль для поляризованных клеток. Это позволяет распределять фермент между базальными, апикальными и латеральными мембранами, что важно для создания направленного тока ионов.

### 1.1.8.3. Src-киназа

Семейство Src-киназ представлено 52-62 кДа мембранными тирозинкиназами, не ассоциированными с рецепторами (нерецепторными). Они участвуют в ряде сигнальных каскадов, начинающихся с фосфорилирования тирозина в ответ на связывание различных внеклеточных лигандов. Src-киназы имеют, по крайней мере, три домена для взаимодействия с белками-партнёрами: SH3-домен взаимодействует с полипролиновыми участками, SH2-домен – с фосфорилированными остатками тирозина, а киназный домен взаимодействует с нуклеотидами и фосфорилирует субстрат [Brown, M.T., and Cooper, J.A., 1996].

Src-киназа считается одним из белков-партнёров Na,K-АТФазы, так как было показано, что ингибирование Na,K-АТФазы убаином коррелирует с увеличением уровня аутофосфорилирования Src-киназы и запуском Src-зависимого сигнального каскада [Haas, M., et al., 2002; Gable, M.E., et al., 2014]. Но, в то же время, вопрос о том, есть ли между данными белками физическое взаимодействие, остаётся спорным.

Взаимодействие между Src и Na,K-АТФазой под действием убаина было показано методом иммунопреципитации на лизатах клеток линии LC-PK1 в работе Хааса (Haas) и коллег. Связывание Src и Na,K-АТФазы зависело от концентрации Src и времени инкубации [Haas, M., et al., 2002]. В работе Тиана (Tian) и соавторов были получены аналогичные результаты при иммунопреципитации *in vitro* рекомбинантной Src с Na,K-АТФазой из почек свиньи в присутствии детергента. На клетках LC-PK1 был также проведён анализ методом FRET (Förster resonance energy transfer), который показал, что Na,K-АТФаза и Src-киназа действительно локализованы в одних местах мембраны и находятся поблизости друг от друга. Кроме того, в данной работе было показано, что взаимодействие АТФазы только с убаином, но не с другими ингибиторами, приводит к запуску сигнального каскада [Tian, J., et al., 2006]. В то же время, последнее наблюдение было оспорено в работе Гейбл (Gable) и коллег. Они повторили эксперимент *in vitro* с АТФазой из почек кролика и Src, и обнаружили, что ванадат увеличивает аутофосфорилирование Src так же, как и убаин. Более того, при ингибировании Na,K-АТФазы олигомицином в Na<sup>+</sup>-среде, наблюдается аналогичный эффект на Src [Gable, M.E., et al., 2014]. Эта работа полностью подтверждает результаты более ранней работы Вайганда (Weigand) и коллег, в которой также была показана активация Src-киназы при ингибировании Na,K-АТФазы ванадатом. Более того, в этой работе было показано, что активация Src зависит не от самой Na,K-АТФазы, а от соотношения ATP/ADP. Кроме того, известно, что ADP ингибирует Src. Таким образом, была выдвинута альтернативная гипотеза, согласно которой Na,K-АТФаза и Src-киназа конкурируют за ATP. В том случае,

когда АТРаза активна, она потребляет большую долю АТФ и, кроме того, её работа приводит к накоплению АДФ, что, в свою очередь, ингибирует Src-киназу. Ингибирование Na,K-АТРаза изменяет соотношение АТФ/АДФ, что и приводит к активации Src [Weigand, К.М., et al., 2012]. Поддерживают эту гипотезу и результаты, полученные в работе Йозефа (Yosef) и коллег. Они установили, что Src киназа может фосфорилировать  $\alpha 1$ -субъединицу Na,K-АТРаза по Tyr142, но физического взаимодействия между ферментами обнаружено не было [Yosef, E., et al., 2016].

Таким образом, исходя из имеющихся данных, можно предположить, что Na,K-АТРаза участвует в убаин-индуцируемом Src-киназном каскаде, но механизм передачи сигнала пока остаётся не доказанным.

#### **1.1.8.4. Кавеолыны**

Кавеолы – микродомены плазматической мембраны, выглядящие как колбообразные выпячивания разного размера. Эти области насыщены холестерином, гликофинголипидами и сфингомиелином, именно в них высоко содержание рецепторов, киназ, фосфатаз, белков цитоскелета. Кавеолыны – структурные белки, ассоциированные с мембраной, имеющие молекулярную массу 21 – 24 кДа. Они являются опознавательным знаком кавеол. Эти белки непосредственно взаимодействуют с холестерином, а также с рядом белков, участвующих в сигнальных каскадах и имеющих соответствующие участки связывания, что обеспечивает их концентрирование в кавеолах. Одним из таких белков является и Na,K-АТРаза. В последовательности  $\alpha 1$ -субъединицы было обнаружено два участка связывания кавеолина, расположенные в 1 и 10 трансмембранных доменах [Morrill, G.A., et al., 2012]. Связывание Na,K-АТРаза с кавеолинами регулируется убаином, а также Src-киназой. В свою очередь, комплекс Na,K-АТРаза/кавеолин становится частью сигналосомы, инициирующей передачу сигнала внутрь клетки [Wang, H., et al., 2004; Pierre, S.V., and Xie, Z., 2006]. На основе ряда данных было выдвинуто предположение, что Na,K-АТРаза может непосредственно связывать некоторые гормоны, например прогестерон, что, в свою очередь, может приводить к интернализации кавеол, содержащих комплекс Na,K-АТРаза/кавеолин, тем самым вызывая деполяризацию мембран [Morrill, G.A., et al., 2005].

Следовательно, взаимодействие с кавеолинами важно для выполнения Na,K-АТРазой её рецепторных функций, в частности, для формирования сигналосомы, а также для регуляции плотности расположения Na-насоса на мембране клетки путём интернализации фермента в составе кавеол.

#### 1.1.8.5. Мелиттин и мелиттин-подобные белки

С Na,K-АТФазой и другими АТФазами Р-типа связывается мелиттин – токсический пептид из пчелиного яда. Это амфифильный пептид с молекулярной массой 2,8 кДа, состоящий из 26 аминокислот: NH<sub>2</sub>–Gly–Ile–Gly–Ala–Val–Leu–Lys–Val–Leu–Thr–Thr–Gly–Leu–Pro–Ala–Leu–Ile–Ser–Trp–Ile–Lys–Arg–Lys–Arg–Gln–Gln–COOH

Молекула мелиттина формирует две  $\alpha$ -спирали: с N-концевой части – гидрофобную, а с С-концевой – амфифильную. Мелиттин обладает цитотоксическим действием – он встраивается в мембрану и формирует поры, через которые может проходить вода и различные соединения [Dempsey, С.Е., 1990]. Кроме того, мелиттин способен напрямую взаимодействовать с рядом белков, поскольку его первичная последовательность имитирует мотив, обеспечивающий белок-белковые взаимодействия [Долгова Н.В. и соавт., 2007].

Мелиттин взаимодействует с кальмодулином, киназой лёгких цепей миозина, АТФазами Р-типа и рядом других белков. На Н,К-АТФазе был выявлен участок, с которым связывается мелиттин. Это последовательность MI/LDPPR, входящая в последовательность M(603)DPPRAT  $\alpha$ -субъединицы Н,К-АТФазы [Cuppoletti, J., and Abbott, A.J., 1990]. Сходная последовательность MI(591)LDPPRKE есть во всех изоформах  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы [Лопина О.Д., 2001; Долгова Н.В. и соавт., 2007].

Связываясь с Na,K-АТФазой в среде, лишённой ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, мелиттин ингибирует активность фермента. Однако при добавлении KCl в среду инкубации до добавления мелиттина активность Na,K-АТФазы сохраняется. Было установлено, что связывание  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы с K<sup>+</sup> и мелиттином характеризуется конкурентными отношениями: ингибированная активность принадлежит молекулам АТФазы, связавшим мелиттин, а не заингибированная – молекулам АТФазы, связавшим ионы K<sup>+</sup> [Cuppoletti, J., and Abbot, A.J., 1990; Yang, S., et al., 2001]. Методом оценки флуоресценции FITC-меченной Na,K-АТФазы было установлено, что при связывании мелиттина фермент переходит в конформацию, сходную с E2, которую назвали E2-мелиттиновой конформацией [Cuppoletti, J., and Abbot, A.J., 1990]. Помимо ингибирования, мелиттин способен инициировать агрегацию Na,K-АТФазы, но, вместе с тем, процессы ингибирования и агрегации, происходящие параллельно, не зависят друг от друга [Shorina, E.A., et al., 2004].

В слизистой оболочке желудка кролика был обнаружен белок, имеющий молекулярную массу 67 кДа и окрашивающийся антителами на мелиттин – он характеризуется наличием мелиттин-подобного участка и связывается с  $\alpha$ -субъединицей Na,K-АТФазы. Примечательно то, что этот белок взаимодействует с Na,K-АТФазой как в

присутствии ионов  $\text{Na}^+$ , так и в присутствии ионов  $\text{K}^+$ , но в среде с убаином количество молекул  $\alpha$ -субъединицы, взаимодействующей с мелиттин-подобным белком, существенно возрастает [Долгова Н.В. и соавт., 2007]. Было установлено, что данный белок связывается с ферментом по тому же участку, что и мелиттин (последовательность DPPRA, находящаяся в цитоплазматической петле  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы, остатки 591-775) [Каманина Ю.В. и соавт., 2016]. Функции данного белка пока не установлены, но известно, что он не единственный белок с мелиттин-подобными детерминантами, способный связываться с Na,K-АТФазой, что свидетельствует о существовании широкого спектра белков-партнёров фермента.

Кроме того, было обнаружено, что в число белков, окрашивающихся антителами на мелиттин, входит и белок-шаперон Hsp70 (рис. 10) [личное сообщение Каманиной Ю.В., неопубликованные данные], что может свидетельствовать о том, что Hsp70 также может иметь в своей структуре мелиттин-подобный участок.

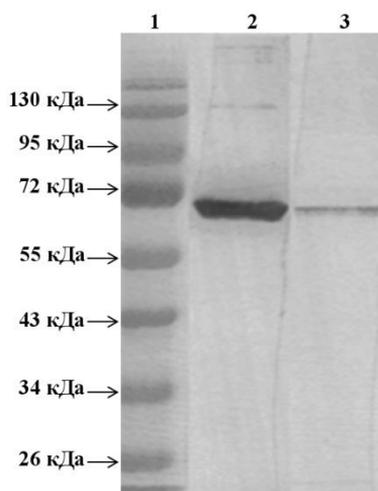


Рис. 10. Окрашивание мелиттин-подобного белка с молекулярной массой 67 кДа, выделенного из почек мыши (3), и Hsp70 (2) антителами на мелиттин [личное сообщение Каманиной Ю.В., неопубликованные ранее данные]

#### 1.1.8.6. Hsp70

Белок Hsp70 принадлежит к семейству 70 кДа шаперонов, отличающихся большой консервативностью во всех организмах. Члены семейства HSP70 контролируют многие клеточные процессы, связанные с белками, такие как сворачивание полипептидной цепи в процессе трансляции, встраивание белка в органеллы, восстановление конформации агрегированных белков, участие в сборке белковых комплексов. Внеклеточные HSP70 выполняют защитные и иммуномодулирующие функции.

Представители семейства HSP70 – мономерные белки, присутствующие в клеточных мембранах всех компартментов эукариотических клеток, содержащих АТФ

[Gehrmann, M., et al., 2005; Multhoff, G., and Hightower, L.E., 1996], а также и во внеклеточной среде [Pockley, A.G., et al., 2014]. Представители этого семейства были обнаружены у бактерий и архей [Lindquist, S., and Craig, E.A., 1988]. Связывание белков с шаперонами HSP70 опосредовано белками ко-шаперонами.

Семейство HSP70 человека включает в себя 13 продуктов генов, отличающихся по уровню экспрессии, внутриклеточному распределению и аминокислотной последовательности [Brocchieri, L., et al., 2008]. Основные шапероны, участвующие в ответе на стресс, это Hsp70-1 (HspA1A или Hsp70) и Hsp70-2 (HspA2B), аминокислотная последовательность которых различается на 2 аминокислотных остатка [Daugaard M., et al., 2007; Radons, J., 2016].

Белки семейства HSP70 высококонсервативны и имеют общую доменную структуру: 44 кДа N-концевой нуклеотид-связывающий домен, гидролизующий АТФ, средний домен, имеющий чувствительные к протеазам участки, и 28 кДа С-концевой субстрат-связывающий домен, который взаимодействует с полипептидными цепями. Нуклеотид-связывающий домен содержит в себе четыре субдомена: (IA, IB, IIA, IIB), окружающие АТФ-связывающий центр [Flaherty, K.M., et al., 1990]. Субстрат-связывающий домен разделяется на N-концевой  $\beta$ -складчатый и С-концевой  $\alpha$ -спиральный субдомены [Zhu, X., et al., 1996]. Эукариотические цитозольные HSP70 имеют С-концевую область с большим содержанием глицина и пролина, содержащую мотив EFVD, участвующий в связывании ко-шаперонов и других HSP (рис. 11) [Hartl, 1996; Radons, J., 2016].



Рис. 11. Схема доменного строения некоторых представителей семейства HSP70 [Radons, J., 2016].

В нормальных условиях белки HSP70 участвуют в сворачивании транслируемых белков, их переносе и сборке мультибелковых комплексов [Hartl, F.U., 1996], они выполняют также защитную функцию, в частности, ренатурируют деструктурированные белки [Sharma, S.K., et al., 2010]. Комплекс Hsp70 с димерным Hsp40 и факторами обмена нуклеотидов узнаёт деструктурированные белки, связывает их и осуществляет АТФ-зависимое разворачивание полипептидной цепи с последующим спонтанным

сворачиванием. Если этот механизм не срабатывает, то рефолдинг может осуществляться с помощью комплексов, содержащих Hsp90 и малые белки теплового шока, или гетеродимера Hsp70/Hsp110 [Finka, A., et al., 2015; Mattoo, R.U., and Goloubinoff, P., 2014]. Кроме того, белки семейства HSP70 защищают клетку от апоптоза: Hsp70 блокирует выход из митохондрий и последующую активацию фактора Bax [Stankiewicz, A.R., et al., 2005; Yang, X., et al., 2012] и препятствует формированию DISC – сигнального комплекса, индуцирующего смерть клетки (DISC – death-inducing signaling complex) [Guo, F., et al., 2005; Radons, J., 2016].

В условиях стресса индуцируется синтез пяти белков семейства HSP70 (HspA1A, HspA1B, HspA6, HspA7 и HspA14). Этот процесс регулируется на уровне транскрипции факторами теплового шока (heat shock factors, HSF) [Pirkkala, L., et al., 2001]. В нормальных условиях синтез Hsp70 (HspA1A) может быть индуцирован транскрипционными факторами, предположительно STAT1/3 и NF-IL6 [Stephanou, A., and Latchman, D.S., 2005; Radons, J., 2016].

С Na,K-АТФазой Hsp70 связывается как в нормальных, и в неблагоприятных условиях. В последнем случае доля Na,K-АТФазы, связанной с шапероном, возрастает. Этот эффект наблюдался на клетках линии LLC-PK1 в модели стресса, вызванного снижением уровня АТФ. При этом Hsp70 препятствует диссоциации Na,K-АТФазы от цитоскелета [Riordan, M., et al., 2005].

Подобный эксперимент проводился и *in vivo*: крысы содержали на низкобелковой диете, что вызывало снижение уровня АТФ. В свою очередь, это приводило к эндоцитозу Na,K-АТФазы в клетках наружной медуллы почек (в клетках коры почек этого эффекта не наблюдали). При этом возрастал уровень Hsp70 и количество Na,K-АТФазы, связанной с ним. При подавлении синтеза шаперона наблюдали повышенную диссоциацию АТФазы от мембраны [Ruete, M.C., et al., 2008]. Эти данные подтверждают наличие регуляторных и защитных функции шаперона.

## **1.2. Регуляция активности Na,K-АТФазы и роль посттрансляционных модификаций этого фермента**

### **1.2.1. Регуляция работы Na,K-АТФазы путем фосфорилирования**

Регуляция активности Na,K-АТФазы может осуществляться различным образом. Можно выделить медленный механизм, который опосредован влиянием на транскрипцию генов, кодирующих субъединицы АТФазы, встраиванием фермента из эндосом в плазматическую мембрану, а также воздействием на утилизацию (протеолиз) уже имеющегося фермента. Быстрый механизм регуляции – это прямое модулирование

активности фермента, встроенного в мембрану. Он осуществляется с использованием ряда эффекторов: убаина, ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , концентрация которых может существенно изменяться в клетке, а также за счет фосфорилирования фермента протеинкиназами [Bertorello, A.M., and Katz, A.L., 1993; Cornelius, F., and Logvinenko, N., 1996; Ewart, H.S., and Klip, A., 1995; McDonough, A.A., and Farley, R.A., 1993]. Примечательно, что различные киназы, фосфорилируя фермент, могут как активировать, так и ингибировать его. Эффект зависит как от типа ткани, так и от изоформ  $\text{Na,K-ATPase}$ , входящих в ее состав. Например, повышение содержания  $\text{cAMP}$  в клетке может привести к ингибированию  $\text{Na,K-ATPase}$  в толстом сегменте восходящей части петли Генле и в собирательной трубчатке, но к ее активации в проксимальных извитых канальцах. В этом процессе, важную роль играет РКА, осуществляющая фосфорилирование  $\alpha$ -субъединицы по остатку Ser943(938), находящемуся в цитозольном участке между сегментами М8 и М9. Фосфорилирование  $\text{Na,K-ATPase}$  может привести, в зависимости от изоформы  $\alpha$ -субъединицы, к снижению сродства  $\text{Na}$ -связывающего участка к ионам  $\text{Na}^+$ , что, в свою очередь, приводит к подавлению активности фермента [Einholm, A.P., et al., 2016]. Было показано, что фосфорилирование по указанному выше остатку серина приводит к подавлению активности  $\alpha 1\beta 1$  и  $\alpha 2\beta 1$  изоформы, в то время как активность  $\alpha 3\beta 1$  изофермента возрастает [Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998; Муртазина Д.А. и соавт., 2001; Bogdanova, A., et al., 2016].

Регуляция работы  $\text{Na,K-ATPase}$  за счет фосфорилирования фермента РКС осуществляется следующим образом. Во-первых, фосфорилирование  $\text{Na,K-ATPase}$  РКС является видоспецифичным [Feschenko, M.S., and Sweadner, K.J., 1994; 1995; Mobasher, A., et al., 2000]. Во-вторых, влияние фосфорилирования  $\text{Na,K-ATPase}$  под действием РКС является тканеспецифичным: фосфорилирование фермента РКС по Ser18 (крыса) может приводить как к ингибированию активности фермента, так и к его активации. Это обусловлено не только представленными в ткани изоформами  $\text{Na,K-ATPase}$ , но и изоформами РКС. Например, фосфорилирование фермента, находящегося во внутриклеточных компартментах, РКС $\beta$  по Ser11 и Ser18 приводит к встраиванию его в плазматическую мембрану. Но при этом фосфорилирование лишь по одному из этих остатков для этого процесса недостаточно. Фосфорилирование фермента РКС $\zeta$  по Ser 18, индуцированное дофамином, приводит к ингибированию  $\text{Na,K-ATPase}$ . В клетках почечного эпителия данная модификация приводит к клатрин-зависимой интернализации фермента. В итоге наблюдается снижение суммарной  $\text{ATPase}$  активности [Chibalin, A.V., et al., 1999; Efendiev, R., et al., 2000; Monasher, A., et al., 2000]. Необходимо

заметить, что присутствие остатка серина в восемнадцатом положении  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы видоспецифично. Он обнаружен в почках крысы, но отсутствует в ферменте из клеток эпителия почек свиньи, собаки [Лопина О.Д., 2001]. Вместе с тем  $\alpha 2$ -изоформа не имеет ни Ser11, ни Ser18, что делает её нечувствительной к фосфорилированию указанными изоформами РКС [Bogdanova, A., et al., 2016].

Фосфорилирование  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы под действием РКС и РКА приводит к ингибированию активности фермента катехоламинами в почках. В проксимальном сегменте нефрона регуляция осуществляется через рецепторы двух типов: DA1 и DA2 (РКС- и РКА-зависимое ингибирование Na,K-АТФазы соответственно). В дистальных сегментах в этот процесс вовлечены только рецепторы типа DA1. Судя по имеющимся данным, РКС обеспечивает долгосрочную регуляцию через интернализацию фермента, а РКА участвует в быстром ответе [Cortes, V.F., et al., 2006].

Интересен тот факт, что все РКС имеют обогащённую цистеинами последовательность, консервативную во всех изозимах. Именно эта последовательность делает фермент редокс-чувствительным [Newton, A.C., 1995]. Окисление этих цистеинов приводит к временной активации фермента, но, вместе с тем, делает его нечувствительным к ионам  $Ca^{2+}$  и диацилглицеролу [Gopalakrishna, R., and Anderson, W.B., 1989]. Цистеины этого участка могут образовывать S-S связь с трипептидом глутатионом. При этом изоформы  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , и  $\zeta$  инактивируются [Ward, N.E., et al., 1998, 2000; Chu, F., et al., 2001]. Помимо глутатионилирования эти остатки цистеинов могут подвергаться нитрозилированию [Choi, H., et al., 2011]. Снижение уровня GSH в клетке приводит к ингибированию РКС  $\alpha$ ,  $\beta I$  и  $\beta II$  и к активации  $\delta$  и  $\epsilon$  изоформ [Domenicotti, C., et al., 2000]. При гипоксии эпителиальных клеток альвеол происходит активация атипичных изозимов РКС, которые фосфорилируют  $\alpha$ -субъединицу Na,K-АТФазы, запуская её интернализацию в составе клатриновых везикул [Dada, L.A., et al., 2003; Bogdanova, A., et al., 2016].

Регуляция активности Na,K-АТФазы осуществляется и другими протеинкиназами: PKG снижает активность  $\alpha 1\beta 1$  и  $\alpha 3\beta 1$  изоферментов, не влияя при этом на активность  $\alpha 2\beta 1$ , а фосфорилирование тирозинкиназой по Tyr10  $\alpha$ -субъединицы приводит к повышению активности фермента. [Blanco, G., and Mercer, R.W., 1998; Лопина О.Д., 2001].

Таким образом, одним из механизмов регуляции работы Na,K-АТФазы является её фосфорилирование протеинкиназами по остаткам серина. Благодаря наличию в клетках различных изоформ Na,K-АТФазы и протеинкиназ, оказался возможным тонкий, видо- и ткане- специфичный контроль функционирования фермента.

### 1.2.2. Окислительный стресс

Как упоминалось выше, сигнальные каскады могут запускаться при изменении редокс-статуса клетки. В нормальных физиологических условиях клетки млекопитающих функционируют в восстановленном состоянии, но при этом они постоянно производят реакционноспособные формы кислорода (ROS) и азота (RNS) в низких концентрациях. Эти соединения участвуют в сигнальных каскадах клетки в качестве вторичных переносчиков сигнала [Moran, L.K., et al., 2001].

Источниками активных форм кислорода, в первую очередь, являются митохондрии. Генерация ROS в основном происходит через комплексы 1 и 3 дыхательной цепи. Помимо митохондрий, они могут синтезироваться рядом ферментов, в частности, NADPH оксидазой, ксантинооксидазой,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназным комплексом, оксидазами D-аминокислот и дигидролипоамиддегидрогеназой. Синтез оксида азота происходит в основном с участием NO-синтаз. Однако при определённых условиях в процесс синтеза оксида азота могут быть вовлечены ксантинооксидаза или цитохром с оксидаза [Turrens, J.F., 2003; Bogdanova, A., et al., 2016].

Противовесом ROS и RNS являются антиоксидантные системы клетки, в частности, «ловушки радикалов» – витамины А ( $\beta$ -каротин), С (аскорбиновая кислота) и Е ( $\alpha$ -токоферол), восстановленный глутатион и другие, а также ферменты (каталаза, супероксиддисмутаза) и системы ферментов (тиоредоксиновая система и глутатионовая система) [Turrens, J.F., 2003]. В случаях чрезмерной продукции ROS и RNS и/или снижения эффективности антиоксидантной системы клетки может развиться состояние окислительного стресса. В «Энциклопедии стресса, 2-е издание, 2007 год» было дано следующее определение этого патологического состояния: «окислительный стресс – это дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, приводящий к нарушению редокс-сигнализации и контроля над разрушением молекул» [Sies, H., and Jones, D., 2007]. Кроме того, к накоплению ROS/RNS может привести и гипоксия. Несмотря на то, что при гипоксии содержание активных форм кислорода и азота должно снижаться, что подтверждается рядом исследований [Hagen, T., et al., 2003; Chua, Y.L., et al., 2010], в некоторых случаях наблюдается обратный процесс [Chandel, N.S., et al., 1998; Guzy, R.D., and Schumacker, P.T., 2006]. Это явление было названо парадоксальным накоплением активных форм кислорода в условиях гипоксии [Turrens, J.F., 2003; Guzy, R.D., and Schumacker, P.T., 2006; Bogdanova, A., et al., 2016].

В свою очередь, накопление ROS и RNS может вызвать повреждение макромолекул клетки (липидов, белков, нуклеиновых кислот), что может привести к последующей смерти клетки путем некроза или апоптоза. Длительный окислительный

стресс может стать причиной и/или последствием ряда заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, астма, сахарный диабет, ишемия-реперфузия, и другие. Повреждение всех основных классов макромолекул в клетке в условиях окислительного стресса наблюдается в процессе физиологического старения и при прохождении ряда дегенеративных процессов, сопутствующих возрастным заболеваниям [Barnham, K.J., et al., 2004; Jones, D.P., 2006].

В условиях окислительного стресса наблюдается появление ряда обратимых и/или необратимых модификаций некоторых аминокислотных остатков белков, часто цистеинов и метионинов, что может повлиять на работу фермента. Обратимые модификации зачастую участвуют в регуляции работы фермента или передаче сигнала. Необратимые модификации, такие как сшивание белков, в большинстве случаев приводят к необратимой потере активности и денатурации белков. Такие белки подвергаются деградации через систему протеасом или накапливаются в цитоплазматических тельцах включения [Dalle-Donne, I., et al., 2008].

### **1.2.3. Глутатион**

Глутатион является одним из важнейших компонентов редокс-буфера клетки. Он представляет собой водорастворимый трипептид, состоящий из остатков глицина, цистеина и глутамата (L-γ-глутамил-L-цистеинил-глицин, GSH) (рис. 12). В клетках его концентрация достигает 1-10 мМ. При потере электронов остатками цистеина двух молекул глутатиона с последующим формированием дисульфидной связи может происходить образование глутатион-дисульфида (GSSG). В клетке может происходить и обратный процесс – восстановление GSSG под действием системы ферментов, состоящей из глутаредоксина, глутатионредуктазы, и NADPH [Dalle-Donne, I., et al., 2008; Калинина Е.В. и соавт., 2008].

В клетках млекопитающих более 98% глутатиона присутствует в восстановленной форме (GSH) и менее 1% в окисленной (GSSG). Около 90% всего глутатиона клетки содержится в цитозоле (1-10 мМ), примерно 10% в митохондриях (5-10 мМ) и следовые количества в эндоплазматическом ретикулуме [Lu, S.C., 2000].

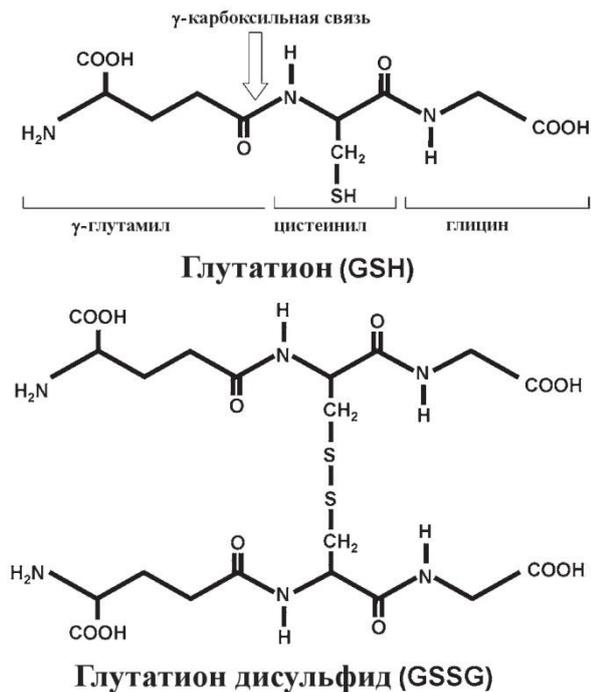


Рис. 12. Структуры восстановленного и окисленного глутатиона [Dalle-Donne, I., et al., 2008].

Окисленный и восстановленный глутатион составляют редокс-пару GSH/GSSG, которая, вместе с парами  $\text{NADPH/NADP}^+$ ,  $\text{Trx}(\text{SH})_2/\text{TrxSS}$  (восстановленный тиоредоксин/окисленный тиоредоксин) и цистеин/цистин, составляет внутриклеточный редокс-буфер [Jones, D.P., et al., 2004; Maher, P., 2006]. Эти соотношения регулируются такими ферментами, как тиоредоксинредуктаза и глутатионредуктаза [Калинина Е.В. и соавт., 2008]. Окислительно-восстановительный статус клетки играет ключевую роль в регуляции её жизни. В частности, в условиях более восстановленной среды запускается процесс пролиферации, а небольшой сдвиг в сторону окисленной среды – дифференциацию. При сильном сдвиге в сторону окисленных состояний индуцируется смерть клеток по механизму апоптоза или некроза [Schafer, F.Q., and Buettner, G.R., 2001; Moriarty-Craige, S.E., and Jones, D.P., 2004].

Из всех перечисленных редокс-соотношений пара GSH/GSSG играет наиболее значимую роль в поддержании и регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клетки, а также в антиоксидантной защите (рис. 13). Последняя заключается в том, что восстановленный глутатион (GSH) берёт на себя роль «ловушки радикалов», субстрата для глутатион пероксидаз (GPxs), восстанавливающих перекисные соединения, в частности, перекисные липиды, и модифицирует (S-глутатионирует) цистеиновые группы белков, подвергнутые обратимому окислению.

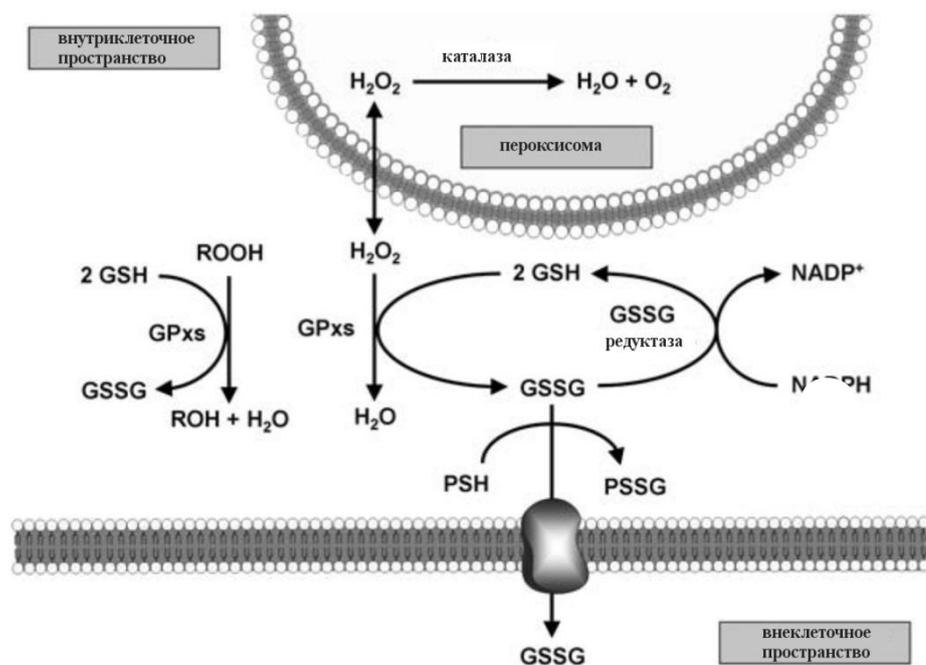


Рис 13. Антиоксидантная функция GSH [Dalle-Donne et al., 2008].

Таким образом, нарушение баланса GSH/GSSG в клетке может привести к патологическим процессам, в частности, вызвать окисление мембранных липидов и ряда белков-мишеней, приводящее к нарушению их функций, а также разрушение ДНК под действием радикалов, что в итоге может привести к гибели клетки. Соотношение GSH/GSSG может меняться как за счёт уменьшения уровня GSH, так и за счёт увеличения GSSG. В патологических условиях оно может быть изменено до очень низких или очень высоких значений. В то же время в клетках существует ряд защитных механизмов, направленных на сохранение данного баланса, например, члены семейства белков с множественной лекарственной устойчивостью (ABC-транспортёры, пермеазы) способны экспортировать окисленный глутатион и глутатион-S-конъюгаты из клетки [Homolya, L., et al., 2003]. GSH синтезируется в клетке *de novo* из свободных аминокислот с помощью  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионсинтетазы. В условиях окислительного стресса происходит повышение экспрессии первого фермента, что также является компенсаторным механизмом [Griffith, O.W., 1999].

#### 1.2.4. Механизмы глутатионирования белков

При взаимодействии белка, содержащего цистеиновые остатки, с глутатионом происходит S-глутатионирование остатков цистеина, которое в некоторых случаях может привести к ингибированию его активности. Впервые эффект ингибирования

ферментативной активности под действием окисленного глутатиона был обнаружен в 1930-х Гопкинсом и Морганом при работе с сукцинатдегидрогеназой [Торчинский Ю.М., 1977].

Сначала процесс S-глутатионилирования рассматривали только как явление, происходящее в условиях окислительного стресса. В этом случае модифицирование SH-групп белков глутатионом приводит к их защите от необратимого окисления, с одной стороны, и, в некоторых случаях, к временной инактивации ферментов, с другой стороны [Klatt, P., and Lamas, S., 2000]. Но позднее выяснилось, что S-глутатионилирование происходит и в обычных физиологических условиях как посттрансляционная модификация. Оно было обнаружено в гемоглобине эритроцитов [Giustarini, D., et al., 2003],  $\gamma$ -кристаллине из хрусталика глаз человека [Craghill, J., et al., 2004], актине из клеток эпидермиса человека A431 [Wang, J., et al., 2001], Ca-АТФазе саркоплазматического ретикулула, ингибиторной каппа киназе бета (IKK $\beta$ ) и редуктазе альдолазы [Mieyal, J.J., et al., 2008]. В связи с этими наблюдениями было выдвинуто предположение, что такое глутатионилирование играет важную роль в регуляции и передаче сигналов [Ghezzi, P., et al., 2005]. В дополнение к возможной регуляторной роли глутатионилирование белков служит способом запасания глутатиона.

Процесс S-глутатионилирования белков может осуществляться несколькими путями (рис. 14).

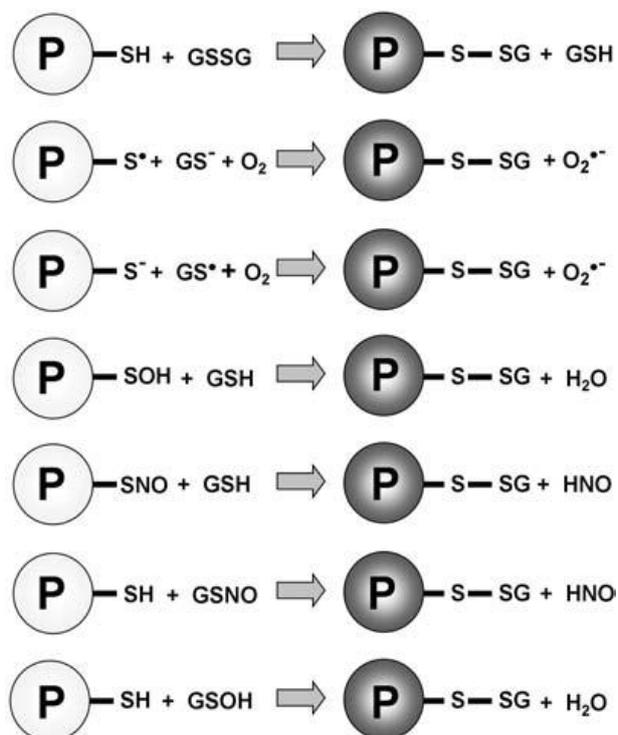


Рис 14. Механизмы S-глутатионилирования сульфгидрильных групп белков [Dalle-Donne et al., 2008].

Инициатором начала S-глутатионилирования белков клетки может послужить изменение соотношения GSH/GSSG. При накоплении GSSG может реагировать с восстановленными SH-группами по механизму тиол-дисульфидного обмена (рис.13). Эта реакция состоит из двух стадий нуклеофильного замещения с образованием на промежуточном этапе смешанного дисульфида. Она протекает с заметной скоростью при физиологических значениях pH и температуры; при понижении pH скорость реакции заметно уменьшается [Торчинский Ю.М., 1977; Dalle-Donne, I., et al., 2008].

Кроме того, реакции тиол-дисульфидного обмена могут проходить между восстановленными тиоловыми и глутатионилированными группами белков, а также по частично окисленным или нитрозилированным сульфгидрильным группам белка или цистеинильной части восстановленного глутатиона и по радикальному механизму (рис. 13). Реакции глутатионилирования могут проходить как спонтанно, так и с помощью глутаредоксина, фермента, который также задействован и в обратной реакции – деглутатионилировании сульфогрупп белков [Dalle-Donne, I., et al., 2008].

В реакции деглутатионилирования принимает участие система глутатионредуктаза/глутаредоксин/NADPH [Калинина Е.В. и соавт., 2008; Figtree, G.A., et al. 2009]. Глутаредоксины (Grx, КФ 1.20.4.1) представляют собой GSH-зависимые оксидоредуктазы с молекулярной массой в 9-14 кДа, принадлежащие к суперсемейству тиоредоксинов. Эти белки были обнаружены как в эукариотах, так и в прокариотических организмах, все они имеют высокую степень гомологии. Существуют несколько изоформ глутаредоксинов, которые располагаются в разных частях клетки, в частности, глутаредоксин 1 преобладает в цитозоле и межмембранном пространстве, в то время как глутаредоксин 2 специфичен для матрикса митохондрий [Калинина Е.В. и соавт., 2008]. Глутатионредуктаза (КФ 1.8.1.7) относится к семейству флавин-содержащих оксидоредуктаз. Она, как и глутаредоксин, является широко распространённым и высоко гомологичным ферментом. Активной единицей глутатионредуктазы является гомодимер из двух мономеров с молекулярной массой около 50 – 56 кДа. В структуре фермента присутствуют две Россмановские складки, одна из которых участвует в связывании FAD и NADPH, а вторая находится в димеризационном домене фермента [Yu, J., and Zhou, C.Z., 2007; Couto, N., et al., 2016].

В системе глутаредоксин/глутатионредуктаза сначала происходит восстановление S-S связей белков-субстратов глутаредоксином, при этом происходит окисление SH-групп активного центра фермента, которые затем восстанавливаются за счёт GSH. Последний, в свою очередь, образуется при восстановлении GSSG глутатионредуктазой с использованием NADPH. В зависимости от того, один или два сульфгидрильных остатка

активного центра глутаредоксина участвуют в восстановлении дисульфидов, выделяют монотиольный и дитиольный механизмы реакции (рис. 15).

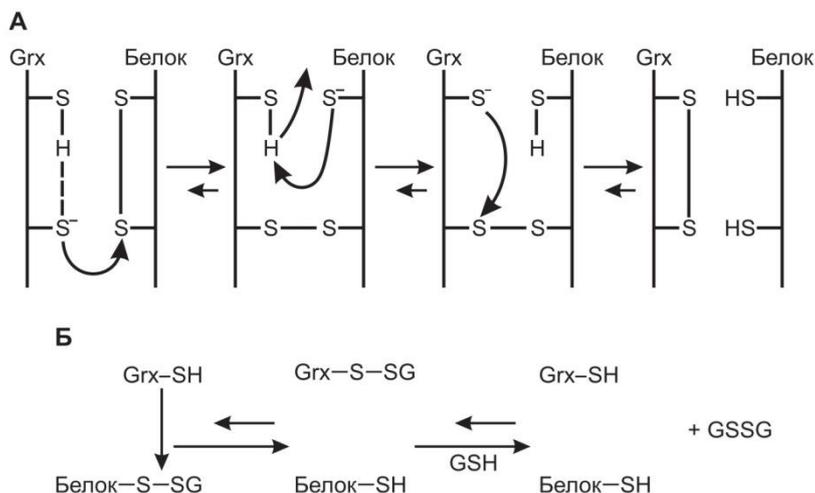


Рис. 15. Дитиольный (А) и монотиольный (Б) механизмы восстановления дисульфидов [Калинина Е.В. и соавт., 2008].

У дитиольных глутаредоксинов имеется участок аминокислотной цепи с последовательностью С-Х-Х-С (чаще Cys-Pro-Tyr-Cys), участок связывания восстановленного глутатиона и гидрофобная область, расположенная на поверхности фермента. При дитиольном механизме сначала происходит взаимодействие между одним из цистеинов указанной последовательности (обычно N-концевым) с субстратом с образованием смешанного дисульфида, а потом второй цистеин активного центра взаимодействует с первым, образуя S-S связь и освобождая восстановленный субстрат. По дисульфидному механизму могут быть восстановлены S-S связи дисульфидов белков и низкомолекулярных соединений.

По монотиольному механизму идёт восстановление смешанных дисульфидов белков (в том числе глутатионилированных SH-групп). При этом в реакцию вступает только один остаток цистеина активного центра. Благодаря высокому сродству к -SSG глутаредоксин специфически взаимодействует с остатком глутатиона смешанного дисульфида с образованием интермедиата Grx-S-SG, который восстанавливается за счёт окисления GSH до GSSG, который, в свою очередь, восстанавливается далее до GSH глутатионредуктазой с переносом электрона с NADPH, и цикл может повториться [Калинина Е.В. и соавт., 2008].

### 1.2.5. Цистеиновые остатки Na,K-АТРазы и других белков

Сульфгидрильные группы клеточных белков достаточно реакционноспособны и могут находиться в нескольких состояниях. Они могут сохраняться в восстановленном

виде (SH-форма), могут быть окислены до сульфеновой, сульфиновой или сульфоновой кислоты (соответственно -SOH, -SO<sub>2</sub>H и -SO<sub>3</sub>H). Кроме того, они могут образовывать внутримолекулярные или межмолекулярные дисульфиды с низкомолекулярными тиолами, такими как гомоцистеин, цистеинилглицин, цистеин и глутатион (рис.16). Эти модификации могут иметь как регуляторное или защитное, так и структурное значение, в зависимости от их расположения в четвертичной структуре белка.

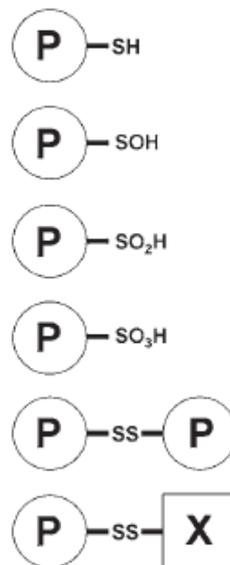


Рис. 16. Модификация тиоловых групп белка [Dalle-Donne, I., et al.2008].

Было показано, что процесс тионирования может происходить при физиологических условиях во время дыхательного взрыва в макрофагах мышей [Rokutan, K., et al., 1991], а также в нейтрофилах человека [Chai, Y.C., et al., 1994]. Кроме того, тионирование-детиионирование белка является динамическим процессом, который происходит в физиологических условиях во время генерации дыхательного взрыва в моноцитах человека. С SH-группами белков могут связываться  $\gamma$ -глутамилцистеин, цистеин и глутатион, причём последний является основным низкомолекулярным тиолом, участвующим в реакциях тионирования (в данном случае, глутатионирования) [Seres, T., et al., 1996].

Чувствительность остатков цистеина к редокс-модификациям определяется, во-первых, их физической доступностью для модифицирующих агентов в пределах трехмерной структуры белка, а во-вторых, их реакционной способностью, обусловленной их микроокружением и общим окислительно-восстановительным статусом среды. В физиологических условиях в клетке поддерживается восстановленная среда, это приводит к тому, что основная масса остатков цистеинов белков имеет значения рК более 8,0 и поэтому является устойчивой к окислению. Но существует ряд белков, обладающих

чувствительностью к окислительным модификациям. Их цистеиновые остатки располагаются в основном микроокружении, что снижает значения их рК и способствует переходу в тиолатную форму уже при нейтральных значениях pH. Такие цистеины были обнаружены у транскрипционного фактора c-Jun, [Klatt, P., et al., 1999], у тирозинфосфатаз [Stone, R.L., and Dixon, J.E., 1994], альбумина и ряда других белков.

Окисление сульфгидрильных групп под действием ROS начинается с образования сульфеновой кислоты (-SOH). Эта модификация может выполнять регуляторные функции и участвовать в передаче сигнала. Она может быть обращена, как при помощи ферментативных систем, так и неферментативным путём. Во многих случаях окисленная сульфеновая группа является реакционноспособной и часто нестабильной, что может приводить к спонтанным реакциям с соседними тиолами с формированием S-S связей. [Dalle-Donne, I., et al., 2008].

В условиях жёсткого окислительного стресса наблюдается дальнейшее окисление SOH-групп до -SO<sub>2</sub>H и -SO<sub>3</sub>H (сульфиновой и сульфоновой кислот), модификаций, являющихся необратимыми в физиологических условиях, хотя было установлено, что в некоторых частных случаях окисленная -SO<sub>2</sub>H всё-таки может быть восстановлена до -SH с помощью ферментативной системы. Таким образом, белки с сульфгидрильными группами, окисленными до сульфиновой (в большинстве случаев) и сульфоновой (во всех случаях) кислот уже не могут быть восстановлены и подлежат деградации.

Окисление сульфгидрильных групп остатков цистеинов может идти до S-S связи (то есть, с образованием дисульфидов белка). Этот процесс может проходить между двумя белками (межмолекулярная связь) или внутри белка (внутримолекулярная связь), что, в свою очередь, может способствовать денатурации и агрегации белков. Внутримолекулярные дисульфиды образуются в цитоплазме клетки как при физиологических условиях для выполнения регуляторной функции, так и при окислительном стрессе [Brennan, J.P., et al., 2004].

Под действием оксида азота, нитрозильного радикала и пероксинитрита может происходить процесс нитрозилирования белков. Выделяют реакции S-нитрозилирования (модификация SH-группы цистеина до -SNO) и нитрозилирования тирозина (образование нитротирозина, обычно 3-нитро-тирозина, Tyr-NO<sub>2</sub>). Эти модификации влияют на структуру фермента, его работу, взаимодействие с другими ферментами, и появляются вследствие повышенной продукции NO ферментами NO-синтазами, что может наблюдаться при воспалительных процессах и/или интоксикации. Примечательно, что сам по себе оксид азота не реагирует с восстановленными сульфгидрильными группами белка, но было описано несколько реакций нитрозилирования, которые не требуют участия

ферментов: окись азота может напрямую взаимодействовать с тиорадикалом (тиильным радикалом), окисляться до  $N_2O_3$  с последующей реакцией с SH-группами белков.

Нитрозилирование может происходить под действием нитрозоглутатиона. В условиях гипоксии степень S-нитрозилирования белков меняется в зависимости от типа тканей. Это связано, в том числе, и с присутствием различных изоформ NO-синтазы (NOS). Например, в клетках эндотелия в большом количестве присутствует изоформа NOSIII, имеющая высокое сродство к  $O_2$ , что позволяет ей работать при низком содержании кислорода [Dweik, R.A., 2005]. В сердце преобладают изоформы NOSI и NOSII, имеющие низкое сродство к  $O_2$ , что приводит к уменьшению выработки NO в условиях гипоксии и, соответственно, к снижению уровня нитрозилирования цистеиновых остатков белков, в частности Na,K-АТФазы [Yakushev, S.S., et al., 2012]. Было показано, что S-нитрозилирование препятствует как необратимому окислению тиолов, так и их глутатионилированию, что позволяет ферменту оставаться активным и в условиях гипоксии [Petrushanko, I.Y., et al., 2007; Yakushev, S.S., et al., 2012; Bogdanova, A., et al., 2016].

S-нитрозилирование, в отличие от нитрозилирования тирозина, можно обратить с помощью редуктаз, в частности, тиоредоксинов или S-нитрозоглутатионредуктаз. По имеющимся данным, S-нитрозилирование возрастает в гидрофобном окружении. Для белков, встроенных в мембрану или находящихся внутри мембраны, была показано увеличение уровня S-нитрозилирования.

Значительное количество белков подвержено S-глутатионилированию, при этом разные SH-группы обладают разной чувствительностью к глутатиону. Любопытно, что эта чувствительность может не коррелировать ни со степенью экспонирования остатка на поверхности третичной структуры, ни с чувствительностью к другим модификациям. Например, малый GTP-связывающий белок Ras имеет 4 остатка цистеина, которые могут быть и окислены, и нитрозилированы, при этом только два из них могут быть глутатионилированы. У циклофелина А есть 4 остатка цистеина: Cys52, Cys62, Cys115 и Cys161. Из них мишенями для глутатионилирования являются Cys52 и Cys62. При этом с использованием метода симуляции молекулярной динамики было установлено, что Cys52 и Cys161 в большей степени экспонированы в раствор, чем Cys62 и Cys115. Вместе с тем нуклеофильная реакционная способность остатков цистеина увеличивается в ряду: Cys52 > Cys62 > Cys115 > Cys161. Это значит, что первые два цистеина легче образуют тиолат-анион. Но у некоторых белков решающим может оказаться стерический фактор. К ним, например, относится актин. Он содержит 5 свободных SH-групп, из которых Cys 274,

второй с С-конца и находящийся в растворе, является быстро реагирующей группой, несмотря на то, что его рК составляет 8,5.

### SH-группы Na,K-АТРазы

Известно, что в  $\alpha$ 1-субъединице Na,K-АТРазы имеется 23, а в  $\beta$ 1-субъединице – 7 остатков цистеина. Шесть из семи цистеиновых остатков  $\beta$ 1-субъединицы находятся во внеклеточной части белка и формируют дисульфидные связи (рис. 17). По данным, полученным методом точечного мутагенеза, замена Cys44 в  $\beta$ 1-субъединице калифорнийского электрического ската (*Torpedo californica*) на серин не влияет ни на взаимодействие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, ни на активность Na,K-АТРазы в целом. В то же время, замены цистеиновых остатков, образующих дисульфидные мостики Cys158 – Cys174 и Cys212 – Cys275, приводят к тому, что  $\beta$ -субъединица перестаёт связываться с  $\alpha$ -субъединицей. При замене цистеинов, участвующих в формировании связи Cys125 – Cys148, происходит более прочное связывание с  $\alpha$ -субъединицей, но при этом фермент теряет активность. Таким образом, две из трёх S-S связей  $\beta$ -субъединицы необходимы для сборки гетероолигомера фермента, а третий нужен для того, чтобы фермент был активен. Следует заметить, что последовательности, содержащие эти S-S связи, являются высоко консервативными для калифорнийского ската, человека, овцы, собаки, свиньи, крысы, цыплёнка и лягушки, что подтверждает их функциональную необходимость для работы фермента [Noguchi, S., et al., 1994]. В то же время, функции цистеинов  $\alpha$ -субъединицы, ещё не до конца изучены [Shi, H.G., et al., 2000].

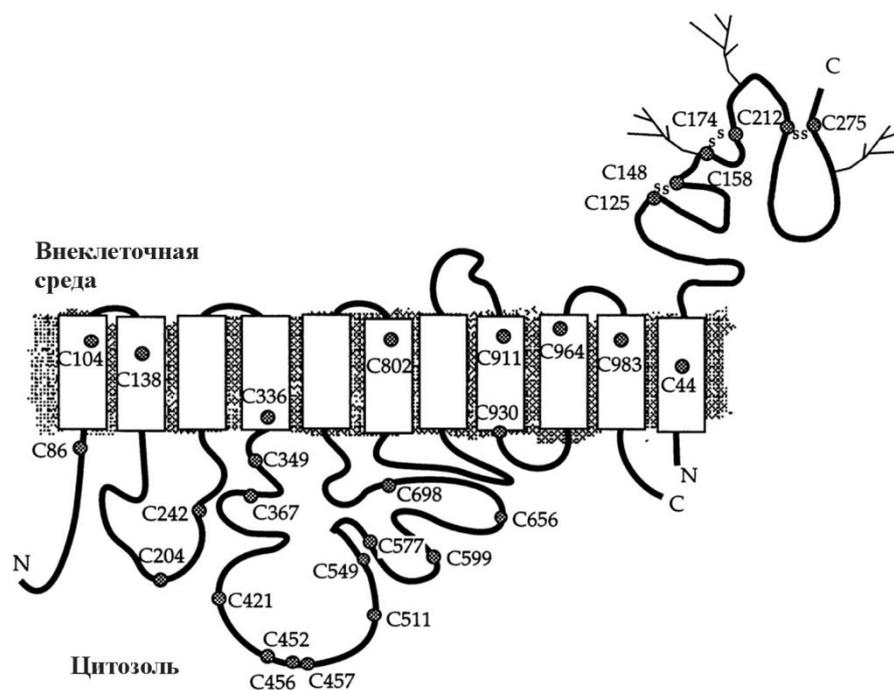


Рис. 17. Схема расположения цистеиновых остатков  $\alpha$ 1 и  $\beta$ 1- субъединиц овцы. На схеме показано расположение S-S связей на  $\beta$ 1-субъединице [Shi, H.G., et al., 2000].

Ши (Shi) с соавторами систематически заменяли по одному каждый остаток цистеина в  $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТФазы овцы на аланин или серин. Мутантный фермент экспрессировали в клетках линии HeLa на убаин-селективной среде. В итоге было обнаружено, что только клетки, трансфицированные кДНК Na,K-АТФазы с заменой Cys242, не выживают в присутствии 1 мкМ убаина вне зависимости от того, заменен цистеин на серин или аланин. Клетки, трансфицированные кДНК с другими заменами, экспрессируют активный фермент. Но при некоторых заменах число оборотов Na,K-АТФазы было ниже, чем у фермента дикого типа. Снижение числа оборотов фермента на 50% и более наблюдалось при следующих заменах: Cys204 на Ser, Cys336 на Ala, Cys367, 349, 421, 452, 456, 457, 511, 577, 599, 656 на Ser, Cys698, 930 на Ala, Cys964 на Ser. Следует отметить, что большинство из этих остатков экспонировано в цитоплазму, из них лишь Cys336, 930 и 964 находятся в трансмембранных фрагментах.

Не было обнаружено значительного влияния замен остатков цистеина на аланин или серин на связывание ферментом  $\text{Na}^+$ , в то время как некоторые замены привели к повышению его сродства к ионам  $\text{K}^+$ : Cys86Ala, Cys204Ser, Cys421Ser, Cys549Ser, Cys577Ser, Cys599Ala, Cys656Ser, Cys698Ala и Cys964Ser [Shi, H.G., et al., 2000].

Помимо одиночных замен Ши с соавторами сконструировали  $\alpha$ -субъединицу, в которой сразу несколько остатков цистеина из цитозольных областей были заменены на аланин или серин: Cys104Ser, Cys138Ser, Cys336Ala, Cys802Ala, Cys911Ala, Cys930Ala, Cys964Ser и Cys983Ala. Этот мутантный фермент имел существенно более низкое число оборотов по сравнению с диким типом (52%). Вместе с тем существенных изменений в  $K_{0,5}$  для ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  не наблюдалось, хотя  $K_m$  для АТФ у мутантного фермента была ниже [Shi, H.G., et al., 2000].

Ху (Hu) с коллегами удалось сконструировать мутантную Na,K-АТФазу на базе  $\alpha 1$  изоформы из почек овцы, у которой были заменены сразу все остатки цистеинов. Работа была проведена в бакуловирусной системе на клетках насекомых «High Five». Согласно полученным в работе данным мутантный фермент имел более высокое кажущееся сродство к ионам  $\text{Na}^+$  и менее высокое кажущееся сродство к ионам  $\text{K}^+$  по сравнению с ферментом дикого типа, вместе с тем  $K_m$  для АТФ у обоих ферментов оказалась сравнимой. Активность АТФазы, лишённой остатков цистеина, была почти в 4 раза ниже, чем у фермента дикого типа. Мутантный белок был активен – это свидетельствует о том, что SH-группы не являются необходимыми для функционирования фермента, они, очевидно, выполняют иную роль. В этой работе было показано, что мутантный белок хуже встраивается в плазматическую мембрану (большая часть вновь экспрессированного мутанта оставалась в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи) и быстрее

деградирует. Это позволяет предположить, что остатки цистеинов участвуют в свёртывании (фолдинге) белка или во встраивании его в плазматическую мембрану [Hu, Y.K., et al., 2000].

Было показано, что SH-группы Na,K-АТФазы отвечают за чувствительность фермента к ROS. Ингибирование Na,K-АТФазы приводит к пропорциональному уменьшению количества свободных SH-групп фермента. При этом ингибирование является тканеспецифичным. Na,K-АТФаза мозга более чувствительна к ROS, чем АТФаза почек, что можно объяснить присутствием в тканях разных изоформ фермента. Было показано, что из 23 остатков цистеина  $\alpha 1$ -субъединицы 13 находятся в цитоплазматических доменах,  $\alpha 2$ - имеет один дополнительный цистеин (происходит замена Ala243Cys в Na,K-АТФазе крысы), а  $\alpha 3$  – четыре дополнительных SH-группы (замены His52Cys, Leu59Cys, Phe321Cys и Trh573Cys) в цитозольных доменах белка [Vasilets, L.A., and Schwarz, W., 1993]. Зависимость ингибирования активности фермента от изоформы  $\alpha$ -субъединицы была подтверждена в экспериментах в бакуловирусной системе в клетках насекомых, экспрессирующих  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -изоформы по отдельности. После 10 мин инкубации с 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активность фермента, содержащего  $\alpha 1$ -изоформу, не менялась, в то время как фермента, содержащего  $\alpha 2$ -изоформу, ингибировалась на 50% [Xie, Z., et al., 1995; Kurella, E.G., et al., 1999].

### **1.2.6. S-глутатионилирование Na,K-АТФазы**

Ранее было установлено, что происходит глутатионилирование SH-групп и  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц Na,K-АТФазы. Глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы фермента возможно по единственному восстановленному остатку цистеина – Cys46, что приводит к снижению гидролитической активности фермента примерно на 20% [Petrushanko, I.Y., et al., 2012]. Этот остаток цистеина, расположенный в трансмембранном домене, подвергается глутатионилированию лишь тогда, когда фермент находится в E1 конформации [Liu, C.C., et al., 2012], либо при диссоциации  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединиц [García, A., et al., 2015]. Более того, глутатионилирование этого остатка цистеина происходит преимущественно в присутствии пероксинитрита или под воздействием O<sub>2</sub><sup>\*-</sup>, производимого NADPH оксидазами [Liu, C.C., et al., 2013; Bogdanova, A., et al., 2016]. Было обнаружено, что при инкубации  $\alpha 1\beta 1$ -изофермента Na,K-АТФазы с ONOO<sup>-</sup> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> глутатионилирование  $\beta 1$ -субъединицы коррелирует со снижением активности фермента. При этом также наблюдается снижение взаимодействия  $\alpha 1$ - и  $\beta 1$ -субъединиц, что может служить одним из механизмов, регулирующих активность фермента. Для субъединиц  $\beta 2$ - и  $\beta 3$ - подобной

модификации в условиях окислительного стресса не было обнаружено [Figtree, G.A., et al., 2009].

Глутатионилирование, не влияющее на активность и возникающее в клетке в нормальных физиологических условиях, было обнаружено у  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТРазы, выделенной из солевых желез утки и почек кролика ( $\alpha 1$ -изоформа), а также у фермента из гомогената сердечной мышцы ( $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  изоформы). Эта модификация может быть частично устранена при выделении фермента в среде с восстановителями (ДТТ, ТСЕР). Методом масс-спектрометрии было установлено, что такому, «исходному», глутатионилированию подвергаются остатки Cys206, 454, 458, 459, 601 и 700 [Petrushanko, I.Y., et al., 2012].

Возникает закономерный вопрос о том, какую роль играет исходное глутатионилирование фермента. Были проведены работы по анализу расположения глутатионилированных цистеинов в структуре Na,K-АТРазы по аналогии с исследованием, проведённым для митохондриального АВС транспортёра Atm1. При сравнении кристаллических структур глутатионилированного и неглутатионилированного транспортёра было обнаружено, что в структуре глутатионилированного фермента есть неразрешённые электронные плотности. Причём расчёты показали, что в эти области можно встроить молекулу глутатиона [Srinivasan, V., et al., 2014]. В структуре  $\alpha 1$ -субъединицы свиньи были обнаружены аналогичные полости с неразрешёнными электронными плотностями, которые расположены вблизи цистеиновых остатков (Cys204, Cys242, Cys336, Cys349, Cys367, Cys421, Cys452, Cys456, Cys457, Cys511, Cys549, Cys577, Cys656, Cys599 и Cys698). Более того, было обнаружено, что SH-группы цистеинов обращены в полости парами (Cys204, Cys242; Cys367, Cys698; Cys452, Cys456 (457); Cys511, Cys549), но при этом они не образуют S-S связей. В эти полости, так же как и в модели транспортёра, может быть встроена молекула глутатиона, но только одна молекула на полость, то есть, одна на два остатка цистеина. Вместе с тем рядом с Cys421 не было вывлено подобных полостей, а по данным масс-спектрометрического анализа этот остаток цистеина не был обнаружен в глутатионилированном состоянии [Petrushanko, I.Y., et al., 2012; Mitkevich, V.A., et al., 2016]. Если предположения об остатках глутатионов, находящихся внутри полостей белка в полостях верны, то исходное глутатионилирование должно происходить в процессе трансляции и сворачивания белка, только тогда глутатион может оказаться внутри полостей в третичной структуре белка. Возможно, исходное глутатионилирование необходимо для правильного сворачивания  $\alpha$ -субъединицы фермента.

Любопытно, что при наличии исходного глутатионилирования Na,K-АТРаза не ингибируется окисленным глутатионом, хотя общий уровень глутатионилирования повышается. Но если препарат предварительно частично деглутатионилирован, то инкубация с окисленным глутатионом может привести к ингибированию его активности. Это глутатионилирование было названо регуляторным. Происходящее *in vitro* дополнительное глутатионилирование направлено на цистеиновые остатки большой и малой цитозольных петель  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза [Petrushanko, I.Y., et al., 2012].

Из аминокислотных остатков, подвергающихся дополнительному глутатионилированию, особого внимания заслуживают Cys244, 454, 458 и 459. Эти цистеины расположены в актуаторном (Cys244) и нуклеотид-связывающем домене в области связывания АТФ (Cys454, 458 и 459). По данным, полученным методом точечного мутагенеза, было установлено, что глутатионилирование именно этих цистеиновых остатков приводит к ингибированию активности фермента. При этом активность мутантов, лишённых Cys454, 458 и 459 ингибировалась GSSG лишь частично, а мутанты, лишённые Cys244 оказались полностью нечувствительными к действию окисленного глутатиона [Petrushanko, I.Y., et al., 2016]. Таким образом, глутатионилирование этих цистеиновых остатков можно отнести к регуляторной модификации.

Разные изоформы  $\alpha$ -субъединицы имеют разную чувствительность к глутатионилированию:  $\alpha 2$ -изоформа более чувствительна, чем  $\alpha 1$ - [Petrushanko, I.Y., et al., 2012; Мэн С. и соавт., 2014]. Так как два цистеиновых остатка цитозольных доменов  $\alpha 2$ -изоформы (206 и 579) имеют положительно заряженные аминокислоты в ближайшем окружении, в отличие от  $\alpha 1$ -, где преобладают нейтральные аминокислотные остатки, они могут легче терять протон и, соответственно, подвергаться модификациям.  $\alpha 2$ -Субъединица имеет дополнительный остаток цистеина в актуаторном домене (Cys236), но у нее нет Cys458 в нуклеотид-связывающем домене, что также может влиять на общую чувствительность Na,K-АТРаза к модификациям [Bogdanova, A., et al., 2016].

В модели *in situ* при перфузии изолированного сердца кровью с низким содержанием кислорода наблюдается увеличение уровня глутатионилирования  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -изоформ, коррелирующее со снижением активности Na,K-АТРаза, что может служить подтверждением гипотезы о защитной функции данной модификации [Petrushanko, I.Y., et al., 2012].

Возникает вопрос, по какому из механизмов происходит регуляторное глутатионилирование Na,K-АТРаза. Предположительно, оно является следствием взаимодействия SH-групп с окисленным глутатионом, концентрация которого в условиях окислительного стресса резко возрастает. Концентрации восстановленного глутатиона в

клетке велика и в норме, но, судя по всему, в обычных условиях GSH на состояние SH-групп Na,K-АТФазы не влияет. Более того, *in vitro* было показано, что восстановленный глутатион способен предотвращать ингибирование Na,K-АТФазы, вызываемое пролином (моделирование гиперпролинемии II типа), при этом не понижая её активности [Franzon, R., et al., 2003]. Добавление GSH также приводит к восстановлению активности Na,K-АТФазы, снизившейся после инкубации с галактозой (моделирование галактоземии) [Tsakiris, S., et al., 2004]. Так как в обоих случаях ингибирование АТФазной активности происходило за счет окислительного стресса, индуцируемого избытком пролина и галактозы соответственно, эти эксперименты демонстрируют антиоксидантные свойства восстановленного глутатиона. Следовательно, более вероятно, что модификации, при которых наблюдается потеря активности фермента, могут быть вызваны именно окисленным глутатионом.

Таким образом, были сформулированы следующие цели и задачи исследования:

**Цель работы** - выявить влияние исходного и дополнительного глутатионирования  $\alpha 1$ -субъединицы на функции Na,K-АТФазы.

**Задачи исследования:**

1. Получить максимально глутатионированный и деглутатионированный препараты Na,K-АТФазы из солевых желёз утки и определить влияние глутатионирования на активность фермента.
2. Исследовать влияние глутатионирования на устойчивость  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы к действию трипсина.
3. Исследовать влияние глутатионирования на связывание Na,K-АТФазы с кардиотоническим стероидом убаином и белком-партнёром Hsp70.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Получение очищенного препарата Na,K-АТРазы

Фракцию микросом из солевых желёз уток, а затем и очищенный препарат Na,K-АТРазы получали с использованием метода, предложенного Питером Йоргенсенем [Jorgensen, P.L., 1988] в модификации Смита и соавторов [Hopkins, B.E., et al., 1976; Smith, T.W., 1988]. Все операции проводили при 0 – +4°C. В работе использовали замороженные солевые железы уток, хранившиеся при -70°C.

Солевые железы (5-7 г) уток, предварительно выдержанных на диете с высоким содержанием NaCl, очищали от соединительной ткани, измельчали ножницами, а затем растирали в жидком азоте. Потом измельчённую ткань переносили в гомогенизатор Поттера (стекло-тефлон) и добавляли 10-ти кратный объём 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), содержащий 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 0,2 мМ PMSF, 5 мкМ тиорфан и коктейль ингибиторов протеаз (SigmaFAST protease inhibitor cocktail tablet, EDTA free, конечные концентрации ингибиторов: 2 мМ AEBSF, 1 мкМ фосфорамидон, 130 мкМ бестатин, 14 мкМ E-64, 1 мкМ лейпептин, 0,2 мкМ апротинин, 10 мкМ пепстатин). Все растворы для выделения микросом и очистки препарата Na,K-АТРазы деоксигенировали в течение 10 мин аргоном. Ткань гомогенизировали, а гомогенат фильтровали через три слоя предварительно прокипячённой марли, смоченной в среде выделения. Затем гомогенат центрифугировали при 5 000 g в течение 15 мин на центрифуге Beckman J2-21 Centrifuge. Супернатант собирали, а осадок разводили 2-х кратным объёмом среды выделения и вновь центрифугировали в тех же условиях. Оба супернатанта объединяли и центрифугировали при 45 000 g в течение 1 ч на центрифуге Beckman Coulter Avanti J-301. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в минимальном объёме среды выделения и хранили при -70°C.

При очистке фермента суспензию микросом разводили 25 мМ раствором имидазола (pH 7,5), содержащим 2 мМ ЭДТА, 3 мМ АТР, 0,2 мМ PMSF, 5 мкМ тиорфан и коктейль ингибиторов протеаз, а затем по каплям добавляли раствор SDS-Na, приготовленный на этом же буфере. Конечная концентрация белка составила 1,2 мг/мл, конечная концентрация SDS-Na – 0,54 мг/мл. Затем белковый раствор (2,8 мл) наносили на ступенчатый градиент сахарозы (13,5 мл 29,4%; 7 мл 15%; 4,65 мл 10%), приготовленной на 25 мМ имидазольном буфере (pH 7,5), содержащем 1 мМ ЭДТА, 5 мкМ тиорфан и 0,2 мМ PMSF. Центрифугировали в течение 3 ч 35 мин при 100 000 g на центрифуге Beckman Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 25 мМ имидазоле, 1 мМ ЭДТА, 0,25 М сахарозе (pH 7,5) и хранили при -70°C.

Кроме препаратов из солевых желёз уток в некоторых экспериментах использовали препараты Na,K-АТФазы из почек кролика. Выделение проводили из ткани наружной медуллы почки по аналогичному протоколу, за исключением стадии измельчения ткани в жидком азоте. Так как медуллярный слой почек в отличие от солевых желёз утки является мягкой тканью, легко измельчаемой в гомогенизаторе Поттера, в этой стадии не было необходимости.

## **2.2. Определение концентрации белка**

Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Лоури и соавторов [Lowry, O.H., et al., 1951]. Для солюбилизации мембранных белков препараты вместо воды разводили 1% раствором дезоксихолатом натрия. В качестве стандарта использовали коммерческий раствор БСА с концентрацией 2 мг/мл. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 750 нм на спектрофотометре СФ-104.

## **2.3. Определение активности Na,K-АТФазы**

Активность Na,K-АТФазы определяли путём измерения концентрации продукта реакции  $P_i$  по модифицированному методу Ратбуна и Бетлах [Rathbun, W.B., and Betlach, M.V., 1969]. В реакционную среду, содержащую 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мМ АТФ и 30 мМ имидазола (рН 7,5), вносили 0,5 мкг очищенного препарата Na,K-АТФазы из солевых желёз утки. Конечный объём реакционной пробы составлял 0,5 мл. Составляли две серии проб. Во второй серии кроме всех перечисленных компонентов в пробы добавляли убаин (конечная концентрация 1 мМ). Это позволяло оценить вклад Mg-АТФазы в общую АТФазную активность. Кроме того, в качестве контроля использовали пробы, которые содержали все компоненты среды инкубации кроме фермента. Смесь инкубировали при 37°С (термостат биокон ТЕРМО 24-15) в течение 5 мин (предварительно было показано, что накопление  $P_i$  в данный промежуток времени происходит линейно). Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл охлаждённого 3 М ацетатного буфера (рН 4,3), содержащего 3,7% формальдегида. Для получения окраски добавляли 0,1 мл 2% (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> и 0,1 мл свежеприготовленного раствора 0,3% SnCl<sub>2</sub> (для растворения соли добавляли несколько капель концентрированной уксусной кислоты). Инкубировали пробы 15 мин при комнатной температуре и фотометрировали при 660 нм на спектрофотометре СФ-104.

Расчёт общей АТРазной активности и активности Mg-АТРазы проводили по следующим формулам:

$$\frac{D_{660}}{k} = \text{нмоль (Pi)};$$

$$\frac{\text{нмоль (Pi)}}{t \text{ инкуб, мин} \cdot \text{кол-во белка в пробе, мг}} = \frac{\text{нмоль}}{\text{мин} \cdot \text{мг белка}};$$

где k – коэффициент наклона прямой линии на калибровочном графике.

Активность Na,K-АТРазы рассчитывали как разность между общей АТРазной активностью и активностью Mg-АТРазы, которую мы определяли в тех же условиях, но в среде с убаином (1 мМ).

Для построения калибровочного графика использовали 0,2 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

#### 2.4. Электрофорез в полиакриламидном геле

Белковый состав и чистоту препаратов Na,K-АТРазы, а также степень протеолиза  $\alpha 1$ -субъединицы определяли с использованием электрофореза в полиакриламидном геле по методу Леммли [Laemmli, U.K., 1970]. Для разделения белков препаратов микросом и очищенной Na,K-АТРазы использовали 6% концентрирующий и 10% разделяющий гель. Образцы для электрофореза готовили с использованием 4-х кратного буфера, содержащем 250 мМ трис-HCl (pH 6,8), 8% SDS-Na, 40% сахарозу, бромфеноловый синий и 2%  $\beta$ -меркаптоэтанол (в тех случаях, когда после проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и анализировали их степень глутатионилирования,  $\beta$ -меркаптоэтанол не добавляли). Образцы прогревали в течение 10 мин при 50°C и наносили на гель по 3-5 мкг белка в лунку. Электрофорез проводили в камере Mini-Protean III Bio-Rad при силе тока 25 мА на стекло при прохождении белками разделяющего и 50 мА на стекло концентрирующего геля до выхода лидирующей полосы красителя в анодный буфер. Для анализа результатов трипсинолиза использовали 6% концентрирующий и 15% разделяющий гели, образцы наносили по 10 мкг белка в лунку. Электрофорез заканчивали через 15 мин после выхода лидирующего красителя из геля.

По окончании электрофореза гели, которые не планировали использовать для электропереноса, отмывали от SDS-Na и фиксировали в течение 30 мин в растворе 10% уксусной кислоты и 25% изопропанола. Затем полосы белков на геле окрашивали раствором Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,5% Coomassie Brilliant Blue G-250, 10% уксусная кислота, 25% изопропанол) в течение 1 ч. Интенсивность полос фрагментов  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТРазы вычислялась относительно фона, принятого за 0%, с помощью программы gelanalyzer2010a по формуле:  $(I_{\text{фрагмента}} - I_{\text{фона}}) / I_{\text{фона}} \times 100\%$ .

## 2.5. Иммуноблоттинг

Гель после электрофореза отмывали от SDS в течение 15 мин в буфере для электропереноса следующего состава: 25 мМ трис-HCl, 192 мМ глицин, 20% этанол. Электроперенос белков на PVDF мембрану проводили в течение 1 ч 15 мин при силе тока 250 мА (на одну мембрану) и при постоянном перемешивании с охлаждением в камере Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell. Затем мембрану блокировали в течение 1 ч в 5% растворе казеина или БСА, приготовленного на буфере PBST (10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20). После блокировки мембрану отмывали 4 раза по 10 мин в растворе PBST. Далее мембрану переносили в раствор первичных антител, специфичных к  $\alpha 1$ -субъединице (разведение 1:10000, «Millipore», clone C464.6) или в раствор первичных антител против SH-групп белков, несущих различные модификации, а именно: глутатионилирование (1:3000, «Millipore», mouse anti-glutathione monoclonal antibody), нитрозилирование (1:2000, «Alpha diagnostic international», anti-S-nitroso-Cys), окисление до сульфеновой кислоты (1:10000, «Millipore», anti-cysteine sulfenic acid) и суммарное окисление до сульфеновой, сульфиновой и сульфоновой кислот (1:1000, «Enzo», cysteine (sulfonate), pAb). Мембраны инкубировали в растворах первичных антител в течение 15 – 17 ч при +4°C и постоянном покачивании. Затем мембраны отмывали 4 раза по 10 мин в растворе PBST и инкубировали в течение 1,5-2 ч в растворе вторичных антител, специфичных к иммуноглобулинам IgG мышей (1:100000, «Sigma», anti-mouse IgG-peroxidase) или кроликов (1:3000, «Sigma», monoclonal anti-rabbit IgG peroxidase conjugate clone RG-96), конъюгированных с пероксидазой хрена. Далее мембраны отмывали 6 раз по 10 мин в растворе PBST. Полосы комплексов белков с первичными и вторичными антителами визуализировали методом ECL (enhanced chemiluminescence) на приборе Molecular Imager Gel Doc XR+ System, BioRad с использованием наборов для ECL с чувствительностью пико и фемпто («Perkin Elmer», Western Lightning Plus-ECL enhanced chemiluminescence substrate; «Thermo Scientific», super signal western femto maximum sensitivity substrate). Для оценки степени глутатионилирования (а также нитрозилирования и окисления)  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы вычисляли интенсивность полос на мембранах, окрашенных антителами против соответствующих модификаций, относительно контрольного образца и нормировали на содержание  $\alpha 1$ -субъединицы в полосе (окрашивание антителами против  $\alpha 1$ -субъединицы). Денситометрическую оценку проводили с помощью программы Image Lab™ Software, Version 3.0.

## **2.6. Глутатионилирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы**

Глутатионилированный препарат Na,K-АТФазы получали, инкубируя фермент с 1мМ окисленным глутатионом в разных растворах при комнатной температуре в течение 1 ч. Для того, чтобы установить, влияют ли конформации фермента на глутатионилирование его SH-групп, препарат инкубировали с GSSG в 25 мМ имидазольном буфере с 1 мМ ЭДТА (pH 7,5), содержащем 150 мМ NaCl (E1), либо 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl и 3 мМ АТФ (E1-АТФ), либо 150 мМ K<sup>+</sup> (E2), либо 0,5 мМ убаина (E2-убаин). Кроме того, инкубацию проводили в буфере состава: 10 мМ имидазол, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ Pi, 3 мМ MgCl<sub>2</sub> (pH 7,5) с и без добавления 0,5 мМ убаина. В такой среде фермент переходит в конформации E2P и E2P-убаин. При приготовлении глутатионилированного фермента для последующего трипсинолиза, его инкубировали с 1мМ GSSG при 37°С в течение 30 мин.

## **2.7. Деглутатионилирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы**

Деглутатионилирование проводили несколькими способами: деглутатионилирование в процессе выделения, деглутатионилирование в ферментативной системе, в неферментативной системе и в неферментативной системе в присутствии денатурирующих агентов.

### **2.7.1. Получение препарата очищенной Na,K-АТФазы в присутствии восстановителей**

Для деглутатионилирования фермента в процессе выделения во все растворы (среда выделения, буфер для солиubilизации, буфер для приготовления градиента сахарозы) добавляли либо 1 мМ ДТТ, либо 5 мМ ТСЕР.

### **2.7.2. Деглутатионилирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием ферментативной системы**

Деглутатионилирование в ферментативной системе проводили в присутствии глутаредоксина и глутатионредуктазы [Durratla, V., et al., 2012]. Препарат Na,K-АТФазы разводили средой следующего состава: 25 мМ MOPS/имидазол, 2 мМ ЭДТА, pH 7,0 до конечной концентрации 0,25 мг/мл. Опытные пробы также содержали 0,5 мМ GSH, 6 мкг/мл глутатионредуктазы, 20,6 мкг/мл глутаредоксина, 200 мкМ NADPH. В контроле отсутствовали ферменты и восстановленный глутатион. Все пробы инкубировали 30 мин при 37°С.

Затем определяли активность Na,K-АТФазы по модифицированному методу Ратбуна и Бетлах и анализировали степень глутатионилирования фермента методом иммуноблоттинга.

### **2.7.3. Деглутатионилирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием химических восстановителей**

Деглутатионилирование препарата Na,K-АТФазы неферментативным путём проводили при помощи химических восстановителей, концентрации которых были предварительно подобраны для достижения максимального удаления глутатиона с  $\alpha$ 1-субъединицы фермента. Они составляли 10 мМ ДТТ, 30 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола, 25 мМ ТСЕР-НСl, 10 мМ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> и 3% NaBH<sub>4</sub>. Инкубацию проводили в присутствии и в отсутствие 2% SDS-Na и 6 М мочевины. Препарат Na,K-АТФазы разводили буфером следующего состава: 0,25 М сахароза, 1 мМ ЭДТА, 25 мМ трис-НСl (рН 7,5) до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Добавляли восстановители до указанных концентраций и, в ряде экспериментов, денатурирующие агенты. Пробы инкубировали с восстановителями в течение 30 мин при 37°C (в случае с ТСЕР ещё и при 70°C), а затем измеряли активность по модифицированному методу Ратбуна и Бетлах (в серии экспериментов без денатурирующих агентов), после чего ставили на диализ против 25 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА (рН 7,5) на 4 ч с четырьмя сменами буфера при +4°C. После диализа измеряли концентрацию белка и анализировали степень глутатионилирования Na,K-АТФазы методом иммуноблоттинга.

Кроме того, проводили эксперименты по деглутатионилированию Na,K-АТФазы с помощью 25 мМ ТСЕР и 3% NaBH<sub>4</sub> на PVDF мембране. Использовали очищенные препараты Na,K-АТФазы из солевых желёз утки и из почек кролика и препараты микросом из солевых желёз утки и почек кролика. Сначала проводили SDS-электрофорез в ПААГ и электроперенос белков на мембрану. Затем эти мембраны инкубировали в 3% NaBH<sub>4</sub>, 25 мМ ТСЕР, приготовленных на 25 мМ имидазоле (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА, или в том же буфере без восстановителей (контрольная проба) в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее мембраны отмывали, окрашивали антителами на  $\alpha$ 1-субъединицу и глутатион, связанный с белком, и визуализировали методом ECL.

### **2.8. Трипсинолиз Na,K-АТФазы**

Очищенные препараты Na,K-АТФазы, выделенные без восстановителей, инкубировали с 3% NaBH<sub>4</sub> или 1 мМ GSSG при 37°C в течение 30 мин. Затем проводили трипсинолиз в среде, содержащей 150 мМ KCl, 150 мМ NaCl или 0,5 мМ убаин, в

течение 5-90 мин при весовом соотношении трипсин : белок = 1:10 и при температуре 37°C. Трипсинолиз останавливали добавлением 2-кратного весового избытка ингибитора трипсина из сои. Затем проводили анализ триптических фрагментов методом SDS-ПААГ электрофореза по Леммли с последующим окрашиванием гелей красителем Coomassie R-250.

## **2.9. Масс-спектрометрический анализ**

Для определения того, какие остатки подвергаются деглутатионированию, был проведён масс-спектрометрический анализ по методу MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry).

Образцы деглутатионированной Na,K-АТРазы подготавливали, инкубируя препарат с 3% NaBH<sub>4</sub> в присутствии 2% SDS и 6М мочевины в течение 30 мин при 37°C. Далее проводили SDS-ПААГ электрофорез по методу Леммли при +4°C, затем окрашивали гели Кумасси R-250 и вырезали полосу, соответствующую α1-субъединице Na,K-АТРазы. Далее белок подвергали трипсинолизу. Полученные триптические фрагменты анализировали на масс-спектрометре Ultraflex II TOF/TOF. Масс-спектрометрические данные были проанализированы с помощью программы Bruker Daltonics Flex Analysis 2.4. Сопоставление данных MS с последовательностью белка проводили с использованием программного обеспечения Bruker Daltonics BioTools 3.0. Масс-спектрометрические исследования были проведены сотрудником лаборатории института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова кандидатом химических наук Зиганшином Рустамом Хусмановичем.

## **2.10. Изотермическая калориметрия титрования (ИКТ)**

Оценку связывания Na,K-АТРазы с убаином и Hsp70 проводили методом изотермической калориметрии титрования. В основе принципа ИКТ лежит измерение тепла, выделяющегося или поглощающегося во время реакции, что позволяет рассчитать термодинамические параметры связывания лигандов: константу связывания, ΔG, ΔH и ΔS реакции.

Изучали связывание препаратов исходно глутатионированной, дополнительно глутатионированной и частично деглутатионированной Na,K-АТРазы с убаином и Hsp70. Для получения глутатионированного фермента препарат Na,K-АТРазы инкубировали с 1 мМ GSSG в течение 30 мин при комнатной температуре (препараты очищенной Na,K-АТРазы размораживали и добавляли стоковый раствор GSSG в среде аргона для того, чтобы избежать окисления SH-групп белка кислородом воздуха). Для

получения частично деглутатионированного препарата фермент инкубировали с 25 мМ ТСЕР (так как  $\text{NaBH}_4$  даёт обильное газоотделение, то его нельзя использовать в качестве восстановителя при работе с данным методом, поэтому мы выбрали наиболее сильный восстановитель из оставшихся реагентов). Контрольный препарат также выдерживали 30 мин при комнатной температуре, но без добавления глутатиона или ТСЕР. Затем препараты ставили на диализ на 5 ч при  $+4^\circ\text{C}$  с тремя сменами буфера. В случае, когда в дальнейшем исследовали связывание  $\text{Na,K-ATPазы}$  с убаином, использовали буфер следующего состава: 10 мМ имидазол, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ  $\text{Pi}$ , 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,5. В этих условиях фермент находится в E2P конформации. В серии экспериментов, когда исследовали связывание фермента с Hsp70, использовали другой буфер: 50 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4. При диализе дополнительно глутатионированного препарата в диализный буфер добавляли GSSG до конечной концентрации 100 мкМ, в диализный буфер для частично деглутатионированного препарата добавляли ТСЕР до конечной концентрации 5 мМ, а в диализный буфер для контрольного препарата – 1 мМ ДТТ для предотвращения окисления  $\text{Na,K-ATPазы}$ .

По окончании диализа препараты разводили диализным буфером до конечного объёма 270 мкл. При этом конечная концентрация  $\text{Na,K-ATPазы}$  в пробах для измерения связывания убаина составляла примерно 16-17 мкМ, а в пробах для измерения связывания Hsp70 – 10-11 мкМ. Далее препарат фермента помещали в камеру прибора и титровали аликвотами лиганда. Полученные кривые титрования анализировали с помощью программы MicroCal Origin 7.0.

### **2.11. Глутатионирование в клеточной культуре и иммунопреципитация**

Для проведения этих экспериментов использовали культуру эмбриональных клеток мыши SC1. Клетки растили при  $37^\circ\text{C}$  в среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 5%  $\text{CO}_2$ .

Клетки обрабатывали в течение 1 ч окисленным глутатионом (1 мМ GSSG) или этилглутатионом (5 мМ etGSH) – аналогом восстановленного глутатиона, способным проникать сквозь клеточную мембрану. Затем клетки лизировали в RIPA-буфере в течение 30 мин при  $+4^\circ\text{C}$  и центрифугировали 1 мин при 16000 g. Супернатант собирали и определяли концентрацию белка методом Лоури и соавт. В качестве материала для иммунопреципитации использовали лизаты клеток. К клеточным лизатам добавляли по 15 мкг антител к  $\alpha 1$ -субъединице  $\text{Na,K-ATPазы}$  и инкубировали при  $+4^\circ\text{C}$  в течение ночи при постоянном покачивании. Далее полученный раствор переносили в пробирку,

содержащую протеин-А агарозу, и инкубировали в течение 2 ч при +4°C и постоянном перемешивании. Далее пробы центрифугировали в течение 1 мин при 5000 g и отбрасывали супернатант. Преципитат трижды промывали фосфатно-солевым буфером Дульбекко, затем к иммунным комплексам добавляли 0,1 М глицин-HCl (pH 2,8), осторожно перемешивали и переносили в нейтрализующий буфер (1 М трис-HCl, pH 9,5). Пробы перемешивали и центрифугировали в течение 1 мин при 5000 g. Супернатант собирали и операцию повторяли ещё 2 раза. Степень глутатионилирования  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы, полученной путем иммунопреципитации, анализировали методом иммуноблоттинга.

### **2.12. Статистические методы обработки результатов**

В работе представлены средние значения по результатам минимум трёх независимых экспериментов на 2-3 препаратах очищенного фермента  $\pm$  стандартное отклонение, вычисленное с использованием формул программы Excel, пакет Microsoft Office 2010.

### **2.13. Использованные реактивы**

В работе использовали следующие реактивы: сахароза, трис, NaCl, KCl,  $KH_2PO_4$ , глицин, TEMED, TWEEN-20,  $\beta$ -меркаптоэтанол, персульфат натрия фирмы «Helicon»; коктейль ингибиторов протеаз, реактив Фолина-Чиокальтеу,  $MgCl_2$ ,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ ,  $SnCl_2$ , фосфорная кислота, формальдегид, Coomassie R-250 ТСЕР, глутаредоксин-1, глутатионредуктаза, убаин, etGSH, протеин А агароза фирмы «Sigma»; ЭДТА – кислота, изопропанол фирмы «Panreac»; имидазол фирмы «Acros organic»; HCl фирмы «Сигма Тек»; SDS-Na фирмы «MP Biomedicals»; АТР, динатриевая соль, NADPH, дезоксихолат натрия, глутатион окисленный и восстановленный фирмы «AppliChem»; акриламид, метиленбисакриламид фирмы «Serva»; БСА, стандартный раствор с концентрацией 2 мг/мл, фирмы «Bio-Rad»;  $CuSO_4$  фирмы «Лабтех»;  $Na_2CO_3$ , цитрат натрия, ацетат натрия, ледяная уксусная кислота, мочевины, фирмы «Реахим»; БСА фирмы «AMRESCO»; трипсин, ингибитор трипсина и глутамин фирмы «ПанЭко»; DMEM, фетальная телячья сыворотка, пенициллин и стрептомицин фирмы «Invitrogen», ECLkit с чувствительностью пико фирмы «Perkin Elmer» и с чувствительностью фемто фирмы «Thermo Scientific», RIPA buffer и DPBS (Dulbecco`s buffer) фирмы «Thermo Fisher Scientific».

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Характеристика препарата Na,K-АТФазы из солевых желёз утки

Солевые железы утки были выбраны в качестве источника Na,K-АТФазы, так как они содержат только  $\alpha 1$ -изоформу Na,K-АТФазы. Кроме того, после выдерживания уток на диете с высоким содержанием NaCl происходит усиление экспрессии фермента, что позволяет получить высокоочищенный препарат Na,K-АТФазы с высокой активностью [Hopkins, В.Е., et al., 1976; Smith, Т.В., 1988]. Вместе с тем  $\alpha 1$ -субъединица Na,K-АТФазы солевых желез утки имеет высокий процент гомологии с  $\alpha 1$ -субъединицей млекопитающих и очень близкие кинетические характеристики.

Получение препаратов микросом и очищенного фермента проводили по классическому методу Йоргенсена, описанному для почек млекопитающих [Jorgensen, P.L., 1988]. Единственной модификацией стал этап измельчения ткани в жидком азоте. Так как, в отличие от почек, солевые железы представляют собой жёсткую ткань, измельчить их только с помощью ножниц и гомогенизатора Поттера сложно – остаются крупные куски ткани, что делает экстракцию неэффективной. Гомогенизатор Политрон (использовалась модель ИЭ1202А), как и гомогенизатор Уорринга (модель 31ВL92 7011) справляются с задачей лучше, но, тем не менее, ткань измельчается не полностью. Дробление желёз в жидком азоте позволяет добиться наиболее эффективного измельчения препарата и высокого выхода фермента (до 1 мг белка/г ткани).

На рисунке 18 представлен результат электрофоретического разделения одного из препаратов, выделенных из солевых желёз утки, а также иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы и проявлением методом ЕСL. Полученные препараты обладают высокой активностью – около 2000 мкмоль неорганического фосфата (Pi) на мг белка в час, и высокой степенью чистоты (рис. 18).

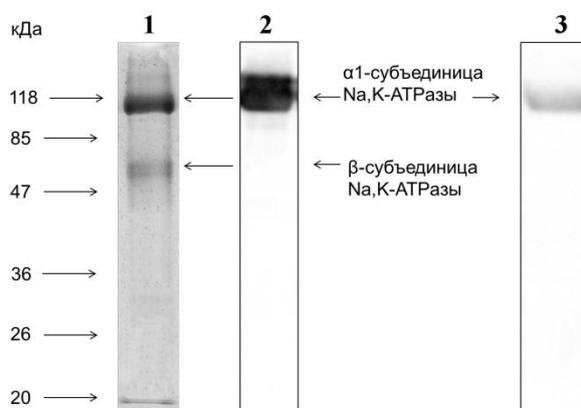


Рис. 18. Характеристика препарата Na,K-АТФазы из солевых желёз утки. 1 – данные SDS-ПААГ электрофореза с окрашиванием белков Кумасси; 2,3 – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha 1$ -субъединицы (2) и связанного с белком глутатиона (3). Визуализация проведена методом ЕСL.

Ранее было обнаружено, что  $\alpha 1$ -субъединица Na,K-АТФазы глутатионилирована по некоторым SH-группам цистеиновых остатков: от 9 до 12 из 15 экспонированных в цитозоль остатков цистеина содержат связанный глутатион [Petrushanko, I.Y., et al., 2012]. Мы проанализировали полученные нами препараты фермента методом иммуноблоттинга (Western blot) с окрашиванием антителами против связанного глутатиона и подтвердили, что  $\alpha 1$ -субъединица действительно выделяется в глутатионилированном виде (рис. 18).

Согласно литературным данным, глутатионилирование белков может происходить как под действием окислительного стресса при помощи восстановленного глутатиона клетки, так в нормальных физиологических условиях. Чтобы исключить вероятность того, что мы наблюдаем не «исходную» модификацию, возникающую внутри клетки в физиологических условиях, а артефакт, появляющийся на первых этапах выделения за счёт окисления фермента кислородом воздуха с последующим глутатионилированием GSH, содержащимся в клетках, мы деаэрировали среду выделения аргоном.

Функции исходного глутатионилирования ещё не до конца ясны, но, судя по ряду данных, эта модификация может появляться уже на стадии трансляции белка [Mitkevich, V.A., et al., 2016]. Примечательно то, что исходное глутатионилирование не влияет на активность фермента. Более того, в некоторых условиях оно предотвращает ингибирование активности при инкубации фермента с окисленным глутатионом [Petrushanko, I.Y., et al., 2012; Мэн С. и соавт., 2014]. В лабораториях Джека Каплана (Jack Kaplan) и Жозе Аргуэлло (Jose Arguello) были получены мутантные  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы из почек овцы, в которых часть или все цистеиновые остатки были заменены на аланин или серин. Мутантные ферменты обладали активностью, хотя некоторые их кинетические характеристики изменялись. Например, полностью лишённая цистеинов  $\alpha 1$ -субъединицы имела активность и значение  $K_m$  для АТФ сходные с ферментом дикого типа, но значение  $K_m$  для активации ионами  $Na^+$  была на 50% меньше, а величина  $K_m$  для ионов  $K^+$  в 2 раза выше, чем у белка дикого типа. Вместе с тем было обнаружено, что такой фермент хуже ассоциируется с  $\beta$ -субъединицей, хуже встраивается в мембрану, накапливаясь в ЭПР и аппарате Гольджи, и быстрее деградирует [Hu, Y.K., et al., 2000; Shi, H.G., et al., 2000]. Эти данные позволяют предположить, что исходное глутатионилирование может способствовать правильному формированию третичной структуры белка и поддержанию его стабильности.

### 3.2. Глутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы

#### 3.2.1. Глутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы *in vitro*

При инкубации препарата Na,K-АТФазы с окисленным глутатионом наблюдается существенное увеличение уровня глутатионилирования фермента (рис. 19).

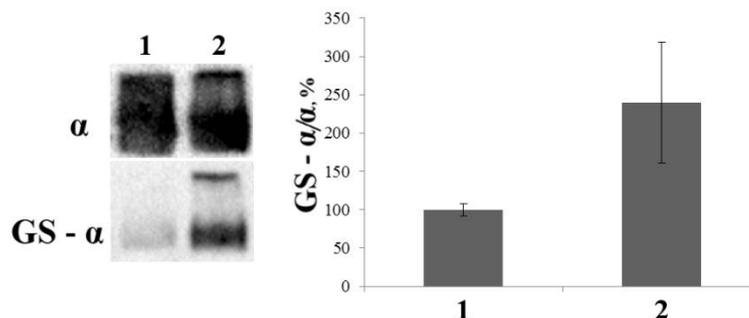


Рис. 19. Повышение уровня глутатионилирования  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы после инкубации фермента с 1 mM GSSG в течение 30 мин при 37°C. Слева – результаты иммуноблоттинга с окраской антителами против  $\alpha 1$ -субъединицы ( $\alpha$ ) и против связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа – результаты количественной оценки степени глутатионилирования препаратов: отношение интенсивности полосы дополнительно глутатионилированного препарата к контролю с нормировкой на содержание  $\alpha 1$ -субъединицы в полосе (GS- $\alpha/\alpha$ ). 1 – контроль (инкубация без окисленного глутатиона); 2 – инкубация в присутствии 1 mM GSSG. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Эти данные показывают, что *in vitro* окисленный глутатион активно взаимодействует с SH-группами белка, приводя к их модификации. Ранее было установлено, что глутатионилированию могут подвергаться до 12 SH-групп цистеиновых остатков  $\alpha 1$ -субъединицы из 15, экспонированных в цитозоль. Методами масс-спектрометрии, компьютерного моделирования и точечного мутагенеза было показано, что глутатионилирование четырёх SH-групп (Cys244, 454, 458 и 459), располагающихся в актуаторном и нуклеотид-связывающем доменах фермента, может приводить к ингибированию его активности [Petrushanko, I.Y., et al., 2012; 2017]. Это глутатионилирование было названо «регуляторным». Ранее на препарате Na,K-АТФазы, выделенном из почек кролика, было показано, что инкубация фермента с окисленным глутатионом в присутствии АТФ не приводит к ингибированию АТФазной активности [Petrushanko, I.Y., et al., 2012]. Мы повторили данный эксперимент на ферменте, выделенном из солевых желёз утки, и показали, что, как и в случае с препаратом из почечной ткани, Na,K-АТФаза из солевых желёз полностью сохраняет свою активность в присутствии в среде инкубации АТФ в концентрациях выше 1 mM. Однако при этом общий уровень глутатионилирования  $\alpha 1$ -субъединицы в данных препаратах значительно возрастает, как и в препаратах, проинкубированных с GSSG в отсутствие АТФ (рис. 20).

Это наблюдение свидетельствует в пользу предположения о том, что для выполнения регуляторной функции достаточно, по-видимому, глутатионилирования только одной из выше обозначенных четырёх SH-групп, глутатионилирование других сульфгидрильных групп на активность фермента не влияет. Более того, с помощью мутагенеза было подтверждено, что регуляторному глутатионилированию подвергаются остатки цистеина Cys244, 454, 456 и 458, при этом ключевую роль в ингибировании активности Na,K-АТРазы играет глутатионилирование Cys244 [Petrushanko, I.Y., et al., 2017]. Таким образом, достаточно предотвратить глутатионилирование только одного из 15, экспонированных в цитозоль остатков цистеина, чтобы сохранить АТРазную активность фермента.

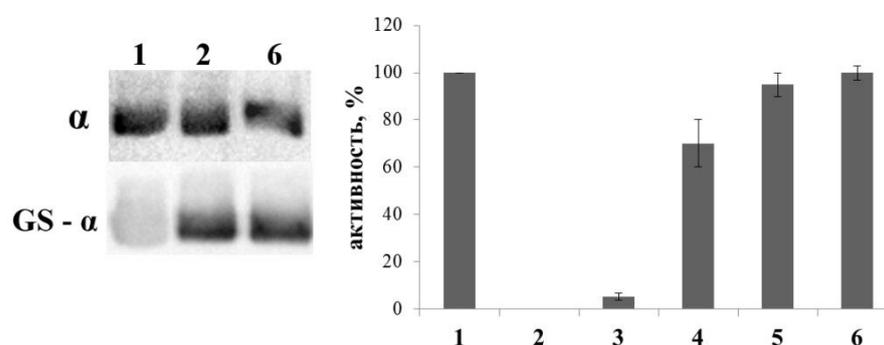


Рис. 20. Глутатионилирование  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы в присутствии различных концентраций АТРа. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha 1$ -субъединицы ( $\alpha$ ) и антителами против связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ): контроль (1), инкубация с 1 мМ GSSG (2) и инкубация с 3 мМ АТРа и 1 мМ GSSG (6). Справа – данные по защите ферментативной активности. 1 – контроль (инкубация без окисленного глутатиона); 2 – 6 – инкубация в присутствии 1 мМ GSSG и: 2 – без АТРа; 3 – 0,3 мМ АТРа; 4 – 0,5 мМ АТРа; 5 – 1 мМ АТРа; 6 – 3 мМ АТРа. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Таким образом, глутатионилирование следующих остатков цистеина: Cys244, 454, 458 и 459, участвует в регуляции ферментативной активности, однако значение глутатионилирования остальных цистеиновых остатков пока не выяснено.

### 3.2.2. Глутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы, находящейся в различных конформациях

В ходе каталитического цикла  $\alpha$ -субъединица Na,K-АТРазы проходит несколько конформаций, при переходе между которыми в раствор экспонируются разные части молекулы. Это приводит к тому, что некоторые лиганды, например, ингибитор Na,K-АТРазы убаин, как и некоторые белки-партнёры, могут связаться с ферментом только в том случае, когда он находится в E2- или E2P-конформациях. В связи с этим мы

исследовали, влияет ли конформация Na,K-АТФазы на глутатионилирование её  $\alpha$ -субъединицы.

Для анализа зависимости степени глутатионилирования фермента от его конформации препарат Na,K-АТФазы инкубировали в присутствии 1 мМ GSSG в течение 1 ч при 37°C в различных условиях. Для перевода фермента в E1-конформацию в среду инкубации добавляли 150 мМ NaCl, E2-конформацию создавали добавлением 150 мМ KCl. Конформация E2P была получена путём инкубации фермента в буферном растворе, содержащем 3 мМ Pi и 3 мМ MgCl<sub>2</sub>. Глутатионилирование Na,K-АТФазы, связанной с убаином, исследовали в конформации E2P с добавлением 0,5 мМ убаина (рис. 21).

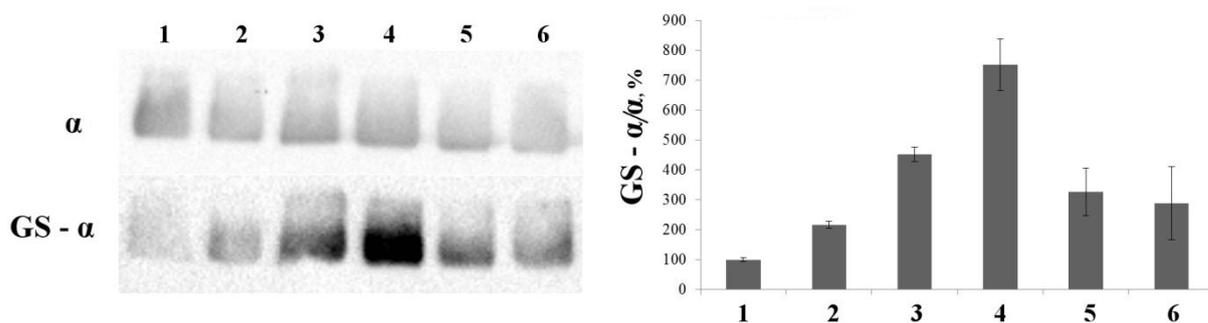


Рис. 21. Глутатионилирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы, находящейся в разных конформациях, под действием окисленного глутатиона. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и антителами против связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа представлены результаты количественной оценки степени глутатионилирования: отношение интенсивности окрашивания полосы дополнительно глутатионилированной  $\alpha$ -субъединицы к интенсивности контрольной полосы с нормировкой на содержание  $\alpha$ 1-субъединицы в полосе (GS- $\alpha/\alpha$ ). 1 – контроль (инкубация без окисленного глутатиона); 2 – 6 – инкубация в присутствии 1 мМ GSSG и: 2 – без добавлений; 3 – 150 мМ KCl (E2-конформация); 4 – 150 мМ NaCl (E1-конформация); 5 – 3 мМ Pi и 3 мМ MgCl<sub>2</sub> (E2P-конформация); 6 – 3 мМ Pi, 3 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,5 мМ убаина (конформация E2P-убаин). Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Из рис. 21 видно, что глутатионилирование в присутствии NaCl достигает максимальных значений по сравнению с глутатионилированием в других условиях. Уровень модификации достаточно выражен также в среде, содержащей KCl. Минимальный уровень глутатионилирования наблюдался для конформации E2P (рис.21). Это позволяет предполагать, что доля экспонированных в раствор цистеиновых остатков  $\alpha$ 1-субъединицы в этой конформации минимальна. Связывание убаина не влияет на степень глутатионилирования: в E2P-конформации в присутствии и отсутствие убаина уровень глутатионилирования практически одинаков и ниже, чем в конформациях E1 и E2.

Таким образом, степень дополнительного глутатионилирования, обеспечиваемого инкубацией фермента с окисленным глутатионом, зависит от его конформации, являясь

максимальной в E1-конформации, меньшей в E2- и минимальной – в E2P-конформации независимо от связывания с этой конформацией убаина.

### 3.2.3. Глутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы *in situ*

Для того чтобы убедиться, что глутатионирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы действительно является физиологическим процессом и может происходить не только *in vitro*, но и в клетках (*in situ*), были проведены эксперименты на клеточных культурах. Эмбриональные стволовые клетки мышей SC1 инкубировали в течение 1 ч либо с окисленным глутатионом (1 мМ GSSG), либо с этилглутатионом (5 мМ etGSH), который является аналогом восстановленного глутатиона, способным проникать через клеточную мембрану. Затем клетки лизировали, иммунопреципитировали Na,K-АТФазу из лизата и анализировали степень глутатионирования её  $\alpha$ 1-субъединицы с помощью иммуноблоттинга с последующей окраской антителами против связанного глутатиона (рис. 22).

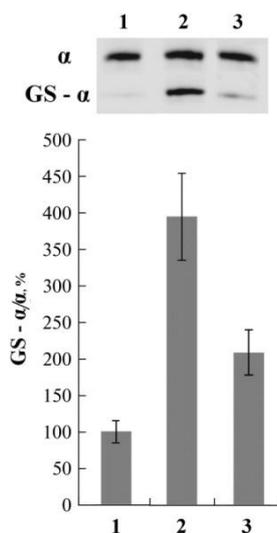


Рис. 22. Глутатионирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы *in situ* под действием 5 мМ etGSH и 1 мМ GSSG. Сверху представлен результат иммуноблоттинга: окрашивание антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ) с визуализацией методом ECL. Снизу – результаты количественной оценки степени глутатионирования препаратов (GS- $\alpha$ / $\alpha$ ). 1 – контрольная проба; 2 – после обработки клеток 5 мМ et-GSH; 3 – 1 мМ GSSG. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

По-видимому, добавление этилглутатиона или окисленного глутатиона меняет соотношение GSH/GSSG в клетке, приводя к дополнительному глутатионированию  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы. Тот факт, что при инкубации с GSSG уровень модификации ниже, может быть следствием того, что окисленный глутатион не может напрямую, как et-GSH, проходить клеточную мембрану – он расщепляется до отдельных аминокислот,

которые переносятся специфическими переносчиками в клетку, где из них синтезируется восстановленный глутатион. Тем не менее, наблюдаемый нами эффект подтверждает, что дополнительное (возможно, регуляторное) глутатионирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы может происходить не только *in vitro*, но и *in situ*, и оно коррелирует с соотношением GSH/GSSG клетки.

### 3.3. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы

Ранее мы уже сообщали о том, что Na,K-АТФаза выделяется из различных тканей в состоянии, когда ее  $\alpha$ 1-субъединица содержит связанный глутатион. Мы использовали несколько способов удаления связанного глутатиона с цистеиновых остатков фермента (деглутатионирования), в частности, сопряженную ферментативную систему (глутаредоксин/глутатионредуктаза) и различные химические восстановители.

#### 3.3.1. Получение препарата очищенной Na,K-АТФазы в присутствии восстановителей

Исходное глутатионирование пробовали устранить или уменьшить, выделяя препарат Na,K-АТФазы с восстановителями: 1 мМ ДТТ и 5 мМ ТСЕР. Ранее было показано, что 100 мкМ ДТТ снижает исходное глутатионирование при выделении фермента из почек кролика [Petrushanko, I.Y., et al., 2012]. Но в случае препарата из солевых желёз утки подобного эффекта достичь не удалось. Даже 1 мМ ДТТ достоверно не снижал уровень исходного глутатионирования фермента. Тогда мы использовали более сильный восстановитель – 5 мМ ТСЕР. Однако достоверного деглутатионирования  $\alpha$ -субъединицы и в этом случае не наблюдалось (рис. 23).

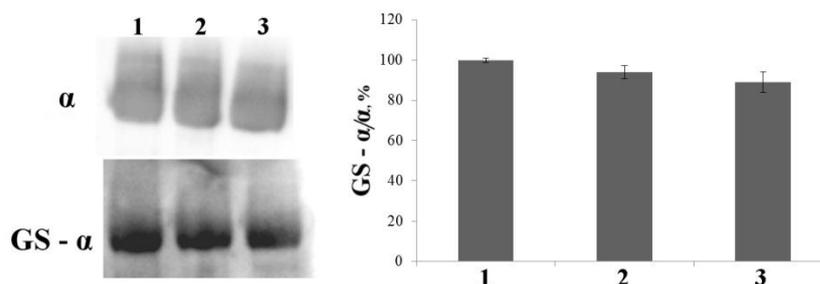


Рис. 23. Выделение препарата из солевых желёз утки с восстановителями – 1 мМ ДТТ и 5 мМ ТСЕР. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окраской антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа представлены результаты количественной оценки степени глутатионирования препаратов (GS- $\alpha/\alpha$ ). 1 – препарат, выделенный без восстановителей; 2 – препарат, выделенный с 1 мМ ДТТ; 3 – препарат, выделенный с 5 мМ ТСЕР. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное при выделении трёх или четырёх препаратов фермента.

Нужно подчеркнуть, что вероятность дополнительного глутатионилирования Na,K-АТФазы в процессе выделения фермента невелик. Во-первых, после декапитации уток железы извлеклись из них в течение менее 1 мин и тут же замораживались в жидком азоте. Во-вторых, все растворы, использованные для выделения, предварительно насыщали аргоном в течение 6-10 мин, что снижает уровень растворенного кислорода. Препараты Na,K-АТФазы также замораживали и размораживали под аргоном. Можно предположить, что эффективность деглутатионилирования зависит от типа ткани, из которой выделяется фермент, в частности, от микроокружения, которое способно повлиять на реакционную способность SH-групп или от способа выделения (медулярный слой почек кроликов препарируется в течение довольно длительного времени, не менее 10 минут).

### 3.3.2. Деглутатионилирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием ферментативной системы

В клетке деглутатионилирование белков осуществляется при помощи двух сопряжённых ферментов – глутаредоксина и глутатионредуктазы. Мы использовали эту систему *in vitro*. Очищенный препарат Na,K-АТФазы инкубировали в течение 30 мин при 37°C в присутствии этих ферментов, 0,5 мМ GSH и 0,2 мМ NADPH (рис. 24).

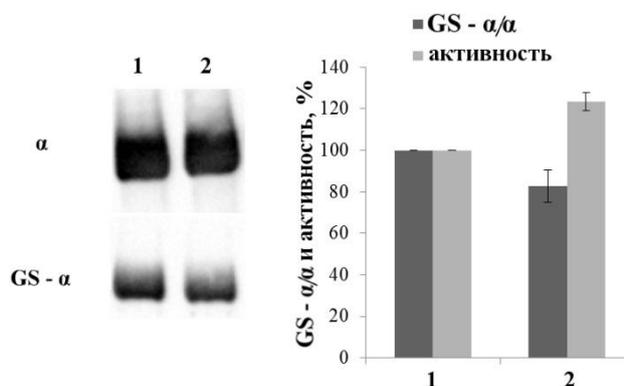


Рис. 24. Деглутатионилирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы при помощи ферментативной системы глутаредоксин/глутатионредуктаза. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа – результаты измерения активности Na,K-АТФазы (серый цвет) в частично деглутатионилированном и контрольном препаратах, а также количественный анализ степени деглутатионилирования образцов (GS- $\alpha/\alpha$ , черный цвет)). 1 – контроль; 2 – деглутатионилированный фермент. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

При использовании ферментативной системы наблюдалось небольшое, но достоверное снижение степени глутатионилирования (в среднем на 15%), при этом

происходило увеличение активности фермента на 20-30% (с 2000 мкмоль Pi/мг белка в ч до  $2500 \pm 100$  мкмоль Pi/мг белка в ч). Увеличение времени инкубации препарата Na,K-АТФазы с системой ферментов до 1 ч не привело к увеличению степени деглутатионирования  $\alpha$ -субъединицы (рис. 25).

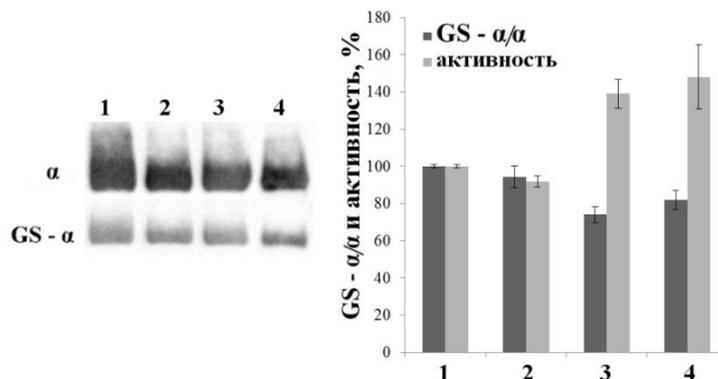


Рис. 25. Деглутатионирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы в ферментативной системе. Инкубация в течение 15, 30 и 60 мин. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа – результаты измерения активности Na,K-АТФазы (серый цвет) в частично деглутатионированном и контрольном препаратах, а также количественный анализ степени деглутатионирования образцов (GS- $\alpha/\alpha$ , черный цвет). 1 – контроль (инкубация без ферментативной системы); 2, 3, 4 – после инкубации препарата Na,K-АТФазы с системой ферментов в течение 15, 30 и 60 мин соответственно. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Таким образом, ферментативная система не способна полностью устранить исходное глутатионирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы. Одной из причин может быть то, что часть цистеиновых остатков оказывается стерически недоступной для ферментов. Ранее Митькевич и соавторы провели анализ кристаллических структур Na,K-АТФазы и обнаружили, что пары цистеиновых остатков цитоплазматических доменов Cys206–244, Cys369–700 и Cys454–458 обращены своими SH-группами в изолированные полости с неразрешённой плотностью. Методом компьютерного моделирования было показано, что в каждую из таких полостей может быть встроена молекула глутатиона, а методом масс-спектрометрии – что, по крайней мере, один из каждой пары этих остатков цистеина глутатионирован [Mitkevich, V.A., et al., 2016]. Второй вероятной причиной невозможности полного удаления глутатиона с  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием сопряжённой ферментативной системы может быть прочность S-S связи фермента с глутатионом, которая может быть обусловлена ее микроокружением. В литературе описаны случаи присутствия в белках особо прочных S-S связей, например, Дэвид (David) и соавторы обнаружили в бычьем сывороточном альбумине 4, а в

человеческом – 6 S-S связей между двумя остатками цистеинов, которые не восстанавливались даже под действием 30 мМ ДТТ (4 ч инкубации) [David, C., et al., 2008].

### 3.3.3. Деглутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы с использованием химических восстановителей

В этих экспериментах очищенный фермент обрабатывали различными химическими восстановителями, а именно: дитиотритреитолом (ДТТ, окислительно-восстановительный потенциал -0,33 В),  $\beta$ -меркаптоэтанолом ( $\beta$ -МЭ, -0,26 В); трис(2-карбоксиитил)фосфином (ТСЕР, -0,29 В); дитионитом натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , -0,416 В) и боргидридом натрия ( $\text{NaBH}_4$ , -1,24 В). Эти соединения имеют большой восстановительный потенциал и часто используются в экспериментах для восстановления S-S связей в белках.

Очищенную Na,K-АТФазу инкубировали с различными концентрациями восстановителей при 37°C в течение 30 мин, а затем проводили диализ. В этих экспериментах были подобраны концентрации реагентов, обеспечивающие максимальное деглутатионилирование. Степень деглутатионилирования  $\alpha 1$ -субъединицы после инкубации Na,K-АТФазы с максимальными действующими концентрациями ДТТ и  $\beta$ -МЭ представлена на рисунке 26.

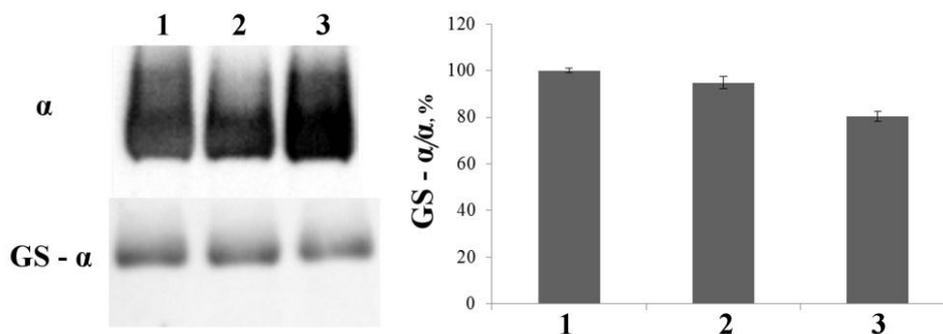


Рис. 26. Деглутатионилирование  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы под действием химических восстановителей: 10 мМ ДТТ и 30 мМ  $\beta$ -МЭ. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha 1$ -субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа – результаты количественной оценки степени деглутатионилирования препаратов (GS- $\alpha$ / $\alpha$ ). 1 – контроль; 2 – 10 мМ ДТТ; 3 – 30 мМ  $\beta$ -МЭ. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

$\beta$ -МЭ является более сильным восстановителем, чем ДТТ, но, тем не менее, при инкубации фермента с этим соединением удалось добиться только 20% деглутатионилирования  $\alpha 1$ -субъединицы фермента, как и при использовании

ферментативной системы (рис. 24). Под действием ДТТ уровень глутатионилирования снизился всего лишь на 5%.

Более сильные восстановители – ТСЕР и  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  оказали примерно такое же действие, как и  $\beta$ -МЭ – они обеспечили снижение глутатионилирования в среднем на 15% и 17%, соответственно (рис. 27). Наиболее эффективно деглутатионилирование осуществлялось в присутствии  $\text{NaBH}_4$  – этот восстановитель снижал уровень связанного с  $\alpha$ 1-субъединицей глутатиона примерно на 40%. При этом наблюдалось повышение активности фермента в среднем на 13%. Инкубация с другими восстановителями не приводила к достоверному увеличению активности фермента.

Тот факт, что такой сильный восстановитель как  $\text{NaBH}_4$  не позволяет полностью удалить глутатион с остатков цистеина  $\alpha$ 1-субъединицы, свидетельствует о том, что либо остатки глутатиона недоступны для восстановителей, либо эти S-S связи являются необычно прочными.

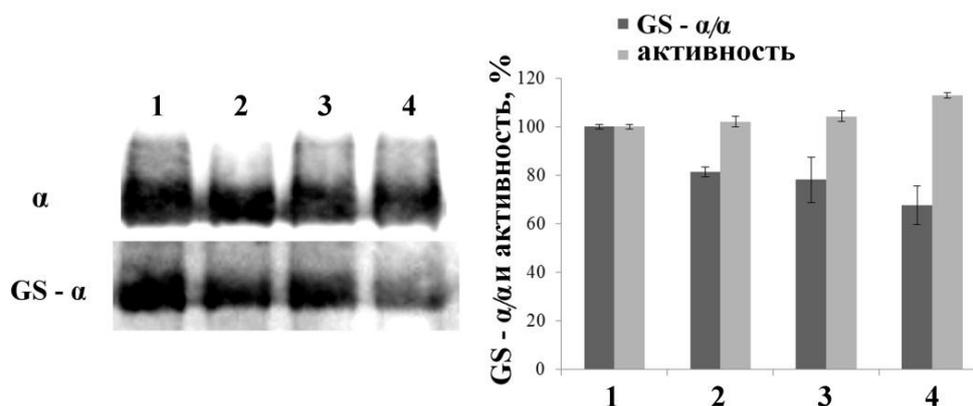


Рис. 27. Деглутатионилирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы под действием химических восстановителей: 25 мМ ТСЕР, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  и 3%  $\text{NaBH}_4$ . Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа – результаты количественной оценки степени деглутатионилирования препаратов (GS- $\alpha/\alpha$ , чёрный цвет) и измерения активности Na,K-АТФазы (серый цвет). 1 – контроль; 2 – 25 мМ ТСЕР; 3 – 10 мМ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ; 4 – 3%  $\text{NaBH}_4$ . Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в четырёх независимых экспериментах.

Хотя  $\text{NaBH}_4$  способствует большему деглутатионилированию, чем система сопряжённых ферментов (40% и 15%, соответственно), повышение активности в деглутатионилированных таким образом препаратах Na,K-АТФазы примерно одинаково. По-видимому, ферментативная система восстанавливает именно те SH-группы, модификация которых влияет на активность фермента, модификация же других цистеиновых остатков на активность Na,K-АТФазы воздействия не оказывает.

### 3.3.4. Деглутатионилирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием химических восстановителей в присутствии денатурирующих агентов

Для того чтобы проверить предположение о стерической недоступности S-S связей цистеиновых остатков  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы для молекул восстановителей, было проведено деглутатионилирование фермента в присутствии денатурирующих агентов – 2% SDS и 6M мочевины (SDS использовали для солубилизации липидов мембраны). В этих условиях происходит разворачивание полипептидной цепи белка, что делает её аминокислотные остатки более доступными для восстанавливающих агентов.

В экспериментах с 10 мМ ДТТ и 30 мМ  $\beta$ -МЭ деглутатионилирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы в денатурирующих условиях мало отличалось от результатов, полученных в среде без SDS и мочевины (рис. 28).

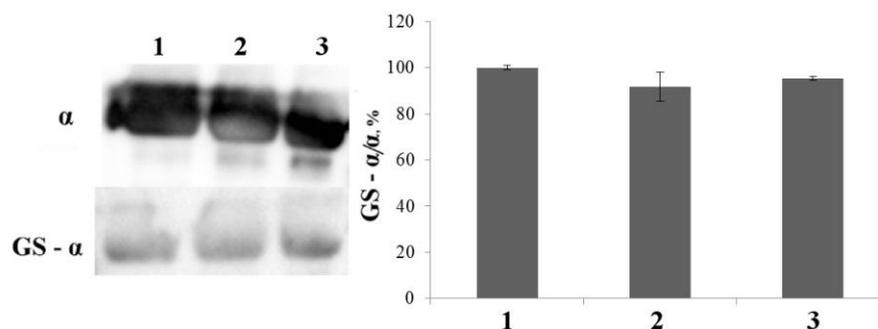


Рис. 28. Деглутатионилирование под действием химических восстановителей: 10 мМ ДТТ и 30 мМ  $\beta$ -МЭ в присутствии 2% SDS и 6M мочевины. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа представлены результаты количественной оценки степени деглутатионилирования препаратов (GS- $\alpha$ / $\alpha$ ). 1 – контроль; 2 – 10 мМ ДТТ; 3 – 30 мМ  $\beta$ -МЭ. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Инкубация препаратов Na,K-АТФазы с более сильными восстановителями (ТСЕР,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  и  $\text{NaBH}_4$ ) привела к большему снижению уровня глутатионилирования в присутствии денатурирующих агентов (рис. 29).

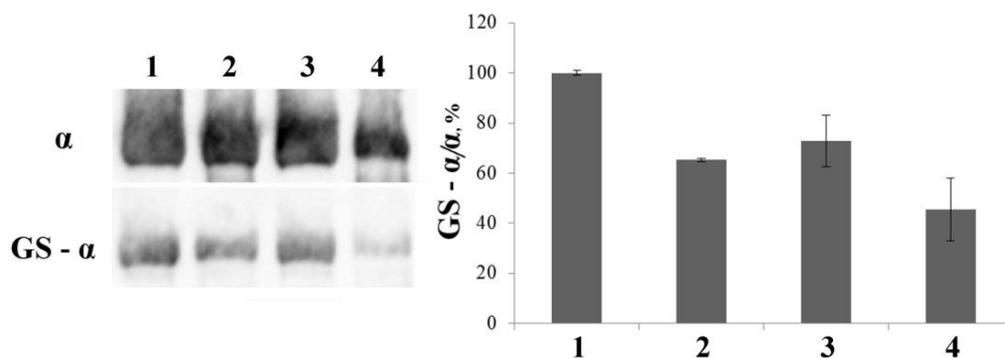


Рис. 29. Деглутатионирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы под действием химических восстановителей: 25 мМ ТСЕР, 10 мМ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> и 3% NaBH<sub>4</sub> в присутствии 2% SDS и 6М мочевины. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа – результаты количественной оценки степени деглутатионирования препаратов (GS- $\alpha$ / $\alpha$ ). 1 – контроль; 2 – 25 мМ ТСЕР; 3 – 10 мМ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; 4 – 3% NaBH<sub>4</sub>. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

После инкубации в денатурирующих условиях препаратов Na,K-АТФазы с ТСЕР и Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> степень глутатионирования снижалась примерно на 30%, в то время как при инкубации с NaBH<sub>4</sub> – на 55% по сравнению с препаратами, которые инкубировали с восстановителями без денатурирующих агентов. Несмотря на достаточно жёсткие условия, полного удаления глутатиона с  $\alpha$ 1-субъединицы не наблюдалось. Это позволяет предположить, что в молекуле  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы могут присутствовать особенно прочные S-S связи между цистеиновыми остатками и молекулами глутатиона. Тот факт, что в  $\alpha$ 1-субъединице есть S-SG связи, которые могут быть восстановлены только при денатурации белка (и даже в этом случае не полностью), свидетельствует в пользу того, что глутатионирование может возникать в процессе синтеза  $\alpha$ 1-субъединицы и, по-видимому, может стабилизировать белок. В пользу этого свидетельствует и данные о том, что в отличие от регуляторного глутатионирования, возрастающего при острой гипоксии, исходное глутатионирование увеличивается лишь при длительной гипоксии [Mitkevich, V.A., et al., 2016]. Кроме того, в литературе описаны белки, которые имеют в своей структуре стабильные участки, не подверженные полному денатурированию даже в присутствии 8 М мочевины [Shortle, D., and Ackerman, M.S., 2001]. Нельзя отрицать гипотезу о том, что глутатионирование может стабилизировать структуру белка и препятствовать полной денатурации в присутствии 6 М мочевины и 2 % SDS.

### 3.3.5. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы в составе микросом с использованием химических восстановителей в присутствии денатурирующих агентов

Помимо восстановления очищенного препарата Na,K-АТФазы мы исследовали деглутатионирование препаратов микросом, полученных из солевых желёз утки. Микросомы инкубировали с 3% NaBH<sub>4</sub>, восстановителем, приводящим к максимальному деглутатионированию препарата очищенного фермента в денатурирующих условиях (2% SDS, 6 М мочевины) (рис. 30).

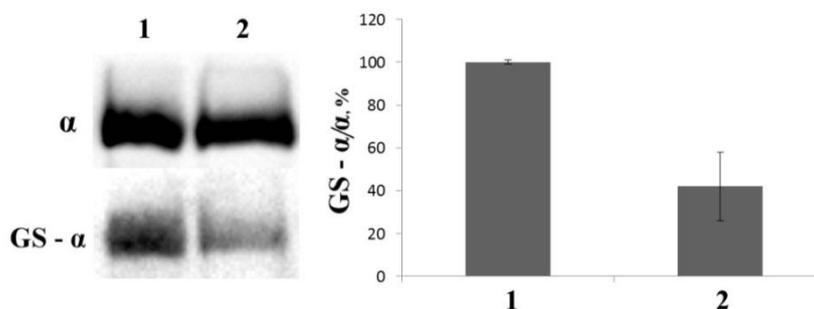


Рис. 30. Деглутатионирование препарата микросом из солевых желёз утки с использованием 3% NaBH<sub>4</sub> в присутствии денатурирующих агентов 2% SDS и 6 М мочевины. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа – результаты количественной оценки степени деглутатионирования препаратов (GS- $\alpha/\alpha$ ). 1 – контроль; 2 – 3% NaBH<sub>4</sub>. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

При восстановлении препаратов микросом, так же как и при восстановлении очищенного фермента, уровень глутатионирования снижается в среднем на 55-60%. Таким образом, деглутатионирование Na,K-АТФазы, как в препарате микросом, так и в препарате очищенного фермента идёт сходным образом.

### 3.3.6. Деглутатионирование $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы на PVDF мембране с использованием химических восстановителей

Помимо восстановления фермента в присутствии денатурирующих агентов, мы проводили деглутатионирование Na,K-АТФазы, перенесённой на PVDF-мембрану. SDS-ПААГ электрофорез по Леммли с последующим электропереносом белков на мембрану должен был привести к максимальной денатурации белка, при этом молекулы фермента не имеют возможности агрегировать друг с другом. Мы предположили, что в таких условиях модифицированные SH-группы  $\alpha$ 1-субъединицы станут максимально доступными для восстановителя. Помимо очищенного фермента, эксперимент проводили на микросомах из солевых желёз утки, а также на очищенном препарате фермента и

микросомах из почек кролика. Препараты Na,K-АТФазы инкубировали с NaBH<sub>4</sub> и ТСЕР – восстановителями, которые оказались наиболее эффективными при деглутатионировании в денатурирующих условиях (рис. 31).

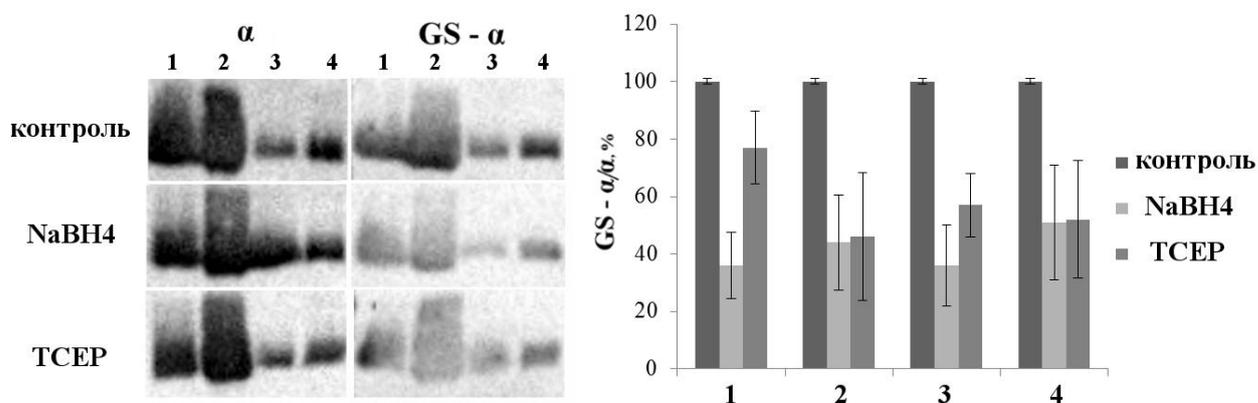


Рис. 31. Деглутатионирование микросом (1 – из солевых желёз утки, 3 – из почек кролика) и очищенных препаратов (2 – из солевых желёз утки, 4 – из почек кролика) на PVDF-мембране с использованием 3% NaBH<sub>4</sub> и 25 мМ ТСЕР. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против α1-субъединицы (α) и связанного с белком глутатиона (GS-α). Справа представлены результаты количественной оценки степени деглутатионирования препаратов (GS-α/α). Представлено среднее значение ± стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Достоверной разницы между степенью деглутатионирования препаратов из солевых желёз утки и почек кролика мы не наблюдали. Вместе с тем, в случае препаратов микросом наиболее сильное восстановление наблюдается после обработки NaBH<sub>4</sub>, в то время как для очищенного фермента, как из почек кролика, так и из солевых желёз утки, достоверного различия между деглутатионированием с использованием NaBH<sub>4</sub> или ТСЕР не наблюдалось. Примечательно то, что при инкубации с NaBH<sub>4</sub> были получены результаты, сходные с результатами экспериментов по деглутатионированию в присутствии денатурирующих агентов. Вместе с этим деглутатионирование с использованием ТСЕР на мембране оказалось эффективнее, чем в присутствии денатурирующих агентов – 50% и 30%, соответственно. Таким образом, можно предположить, что доступность SH-групп нативного фермента для ТСЕР ниже, чем для NaBH<sub>4</sub>.

### 3.3.7. Деглутатионирование α1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием химических восстановителей в присутствии денатурирующих агентов при высоких температурах

Кроме экспериментов по восстановлению S-S связей в присутствии денатурирующих агентов и на PVDF-мембране, мы провели деглутатионирование SH-

групп фермента в присутствии денатурирующих агентов при высоких температурах. Препарат Na,K-АТФазы из солевых желёз уток инкубировали при 70°C с 25 мМ ТСЕР в присутствии 2% SDS и 6 М мочевины. Мы выбрали именно этот восстановитель, так как по итогам экспериментов он является одним из самых сильных, но при его использовании не происходит газообразования, как в случае использования NaBH<sub>4</sub>. В ходе этих экспериментов наблюдали снижение глутатионилирования фермента более чем на 60%, но, тем не менее, оно так и не было полным. Более того, наблюдался сильный гидролиз самой  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы (рис. 32).

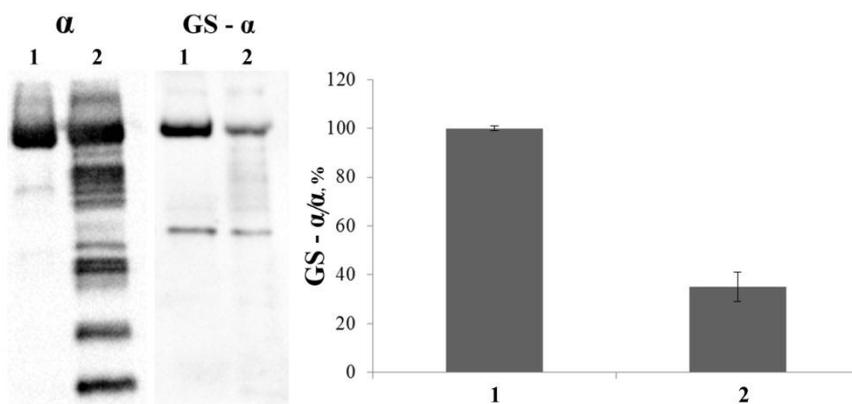


Рис. 32. Деглутатионилирование Na,K-АТФазы под действием 25 мМ ТСЕР в присутствии 2% SDS и 6 М мочевины при 70°C. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против  $\alpha$ 1-субъединицы ( $\alpha$ ) и связанного с белком глутатиона (GS- $\alpha$ ). Справа – результаты количественной оценки степени деглутатионилирования препаратов (GS- $\alpha$ / $\alpha$ ). 1 – контроль (инкубация без восстановителя); 2 – 25 мМ ТСЕР. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в двух независимых экспериментах.

Таким образом, нам не удалось получить препарат Na,K-АТФазы с полностью деглутатионилированной  $\alpha$ 1-субъединицей. Тот факт, что даже при восстановлении фермента в присутствии денатурирующих агентов в жёстких условиях полностью удалить глутатион с  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы невозможно, может свидетельствовать либо в пользу гипотезы о наличии S-S связей с высокой энергией между остатками цистеинов и молекулами глутатиона, либо в пользу гипотезы о наличии в структуре белка стабильных участков, не поддающихся денатурации в данных условиях.

В итоге наибольшего снижения уровня глутатионилирования удалось достичь при инкубации препарата Na,K-АТФазы с NaBH<sub>4</sub> в присутствии денатурирующих агентов и при инкубации с ТСЕР на PVDF-мембране или в присутствии денатурирующих агентов при высокой температуре. Но, в последнем случае наблюдался протеолиз самой  $\alpha$ 1-субъединицы. Кроме того, для изучения влияния глутатионилирования на свойства фермента не подходит денатурированный белок. Поэтому в дальнейших экспериментах

использовали частично деглутатионированный препарат, полученный при инкубации Na,K-АТФазы с 3% NaBH<sub>4</sub> в течение 30 мин при 37°C без денатурирующих агентов. При таких условиях препарат деглутатионирован примерно на 40%.

### 3.3.8. Иные модификации SH-групп α1-субъединицы Na,K-АТФазы и их восстановление химическими восстановителями

Известно, что SH-группы Na,K-АТФазы помимо глутатионирования могут подвергаться и другим окислительным модификациям – нитрозилированию и окислению. Чтобы установить, влияет ли инкубация с химическими восстановителями на окисленные и нитрозилированные сульфгидрильные группы цистеиновых остатков α1-субъединицы, была проведена обработка препарата Na,K-АТФазы 25 мМ ТСЕР и 3% NaBH<sub>4</sub> (как самыми эффективными восстановителями) (рис. 33).

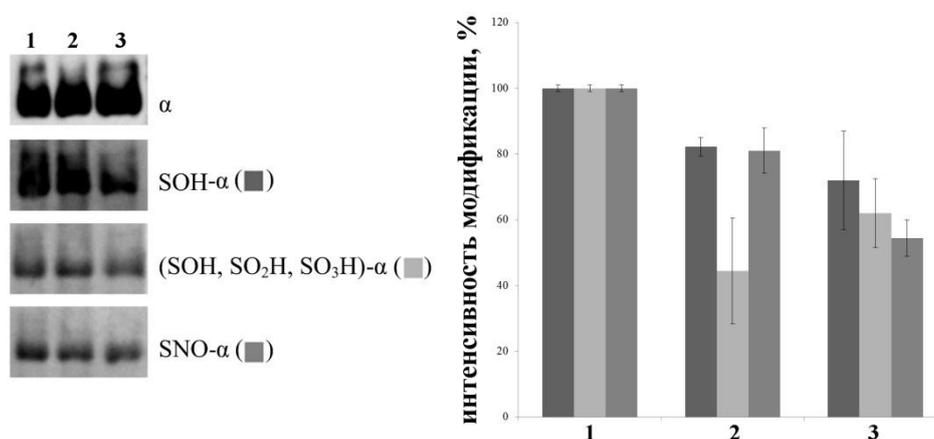


Рис. 33. Восстановление нитрозилированных и окисленных SH-групп α1-субъединицы Na,K-АТФазы под действием химических восстановителей: 25 мМ ТСЕР и 3% NaBH<sub>4</sub>. Слева – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против α1-субъединицы (α), нитрозилированных SH-групп (α-SNO) и общего количества SH-групп, окисленных в разной степени (сумма α-SOH, α-SO<sub>2</sub>H, α-SO<sub>3</sub>H). Справа – результаты количественной оценки степени восстановления препаратов. 1 – контроль; 2 – 25 мМ ТСЕР; 3 – 3% NaBH<sub>4</sub>. Представлено среднее значение ± стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Обработка препаратов Na,K-АТФазы ТСЕР и NaBH<sub>4</sub> приводит к восстановлению нитрозилированных SH-групп α1-субъединицы на 20% и 45% соответственно; окисленных до –SOH групп – на 20-30%, снижая при этом уровень общего окисления цистеиновых остатков (-SOH + -SO<sub>2</sub>H + -SO<sub>3</sub>H) на 60% и 40% соответственно. Последнее свидетельствует о том, что ТСЕР и NaBH<sub>4</sub> способны восстанавливать сульфгидрильные группы, окисленные в большей степени, чем до -SOH.

### 3.3.9. Идентификация цистеиновых остатков $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы, поддающихся и не поддающихся деглутатионированию

С использованием метода масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) были установлены остатки цистеина  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы, которые оставались глутатионированными после обработки 3% NaBH<sub>4</sub> в присутствии 2% SDS и 6 М мочевины (таблица 1). Кроме того, было исследовано наличие цистеиновых остатков, в которых SH-группы были нитрозилированы и окислены до сульфеновой (-SOH) и сульффиновой (-SO<sub>2</sub>H) кислот в тех же условиях. Работа была проведена совместно с кандидатом химических наук Зиганшиным Р.Х., сотрудником Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Полные таблицы с указанием триптических пептидов и их модификаций (таблицы 3 и 4), а также пример полученных спектров (рис. 42) представлены в приложении.

Таблица 1. Сравнение результатов масс-спектрометрического исследования остатков цистеина  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы в контроле и после обработки фермента 3% NaBH<sub>4</sub> в денатурирующих условиях. В таблице указано количество пептидов с окислительно-восстановительными модификациями (глутатионированием –SSG; нитрозилированием –SNO; разными степенями окисления –SOH и –SO<sub>2</sub>H). Покрывание последовательности аминокислот  $\alpha$ 1-субъединицы – 69 % для контроля и 69,9 % для препарата, обработанного восстановителем.

Cys №	-SSG		-SNO		-SOH		-SO <sub>2</sub> H	
	контроль	NaBH <sub>4</sub>	контроль	NaBH <sub>4</sub>	контроль	NaBH <sub>4</sub>	контроль	NaBH <sub>4</sub>
140	1	-	-	1	-	-	-	-
206	1	-	-	-	-	-	-	-
244	-	-	-	-	1	-	1	1
351	2	-	2	1	1	-	3	-
454, 458, 459	5	2	8	3	6	2	12	6
513	1	2	-	-	-	-	-	-
601	-	-	-	-	2	2	2	2
658	1	1	-	-	-	-	1	1
700	-	-	-	1	1	2	2	1
Всего:	11	5	10	6	11	6	21	11

Пептиды для масс-спектрометрического анализа были получены путём гидролиза  $\alpha$ -субъединицы под действием трипсина в геле. По-видимому, участки, по которым осуществлялся протеолиз, были несколько различны для контрольного и частично деглутатионированного препаратов фермента: в контроле было выявлено 28 фрагментов, содержащих 13 цистеиновых остатков, после процедуры восстановления

CysS-SG связей в том же препарате было выявлено 26 триптических фрагментов с 13 цистеиновыми остатками.

В контрольном препарате Na,K-АТФазы в  $\alpha 1$ -субъединицы было обнаружено 8 глутатионилированных цистеиновых остатков: Cys140, 206, 351, 454, 458, 459, 513 и 658. Мы не нашли в этом препарате пептидов с глутатионилированными остатками Cys244 и 700, которые были обнаружены в более ранних исследованиях [Petrushanko, I.Y., et al., 2012]. Эти остатки были окислены, что, по-видимому, могло препятствовать их глутатионилированию. Кроме того, было выявлено глутатионилирование остатка Cys140, которое не наблюдалось в более ранних работах, а также подтверждено отсутствие глутатиона на остатке Cys423.

После процедуры восстановления в денатурирующих условиях в  $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТФазы осталось только 5 глутатионилированных остатков (Cys454, 458, 459, 513, 658). При этом у трёх остатков цистеина (Cys140, 206 и 351) SH-группы были полностью восстановлены, кроме того наблюдалось уменьшение количества пептидов, содержащих глутатион в остатках Cys454, 458 и 459.

Четыре остатка (Cys351, 454, 458 и 459) были обнаружены в нитрозилированной форме. Практически все выявленные в исследованных препаратах остатки цистеина (кроме Cys140, 206 и 513) были представлены в состоянии разной степени окисления. После восстановления с использованием 3% NaBH<sub>4</sub> в денатурирующих условиях общее количество модифицированных пептидов снизилось примерно в 2 раза (таблица 1).

Как видно из полученных результатов, SH-группы цистеиновых остатков  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы могут быть модифицированы различным образом. Максимально и наиболее разнообразно модифицированы Cys454, 458 и 459 – цистеиновые остатки, расположенные вблизи активного центра фермента. Ранее было высказано предположение, что нитрозилирование, как и глутатионилирование, является одним из механизмов защиты SH-групп ферментов от необратимого окисления [Yakushev, S.S. et al., 2012]. Полученные данные подтверждают это предположение: нитрозилированию подвергаются в большей степени Cys454, 458 и 459, то есть цистеиновые остатки, находящиеся рядом с активным центром фермента, которые также подвергаются глутатионилированию.

Таким образом, в последовательности аминокислот в  $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТФазы можно условно выделить три типа остатков цистеина: 1 тип – цистеины с исходно глутатионилированными SH-группами, модификация которых, по-видимому, происходит во время синтеза белка (такое глутатионилирование можно условно разделить на две группы – устраняемое в неденатурирующих условиях и не устраняемое, так называемое

«базальное», глутатионилирование); 2 тип – остатки цистеинов, SH-группы которых подвергаются регуляторному глутатионилированию, влияющему на активность фермента (по-видимому, только в условиях окислительного стресса); 3 – остатки цистеинов, SH-группы которых подвергаются дополнительному глутатионилированию, не влияющему на активность фермента, но защищающему цистеиновые остатки от необратимого окисления при окислительно-восстановительном дисбалансе в клетке (рис. 34).

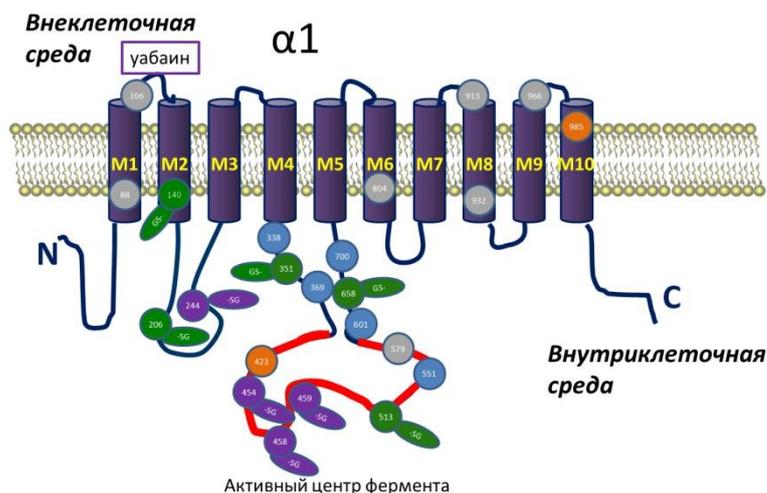


Рис. 34. Глутатионилирование SH-групп остатков цистеинов  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы. Зелёным цветом обозначены исходно глутатионилированные остатки; сиреневым – остатки, глутатионилирование которых регулирует активность фермента (регуляторное глутатионилирование); синим – остатки, глутатионилирование которых выполняет защитную функцию; оранжевым – остатки, для которых глутатионилирование не было обнаружено; серым – остатки, не попавшие под покрытие масс-спектрометрического анализа. (Данная схема была сделана на основе соответствующего рисунка в публикации: Bogdanova, A., et al., 2016).

### 3.4. Ограниченный трипсинолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы

Для установления функции исходного глутатионилирования мы исследовали устойчивость  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы к трипсинолизу. Препарат очищенной Na,K-АТРазы либо дополнительно глутатионилировали, инкубируя его с 1 мМ GSSG, либо частично деглутатионилировали путём обработки 3% NaBH<sub>4</sub> в течение 30 мин при 37°C. Трипсинолиз проводили в присутствии 150 мМ NaCl (E1-конформация); 150 мМ KCl (E2-конформация) или 0,5 мМ уабаина (конформация E2-уабаин). Ранее было показано, что трипсин расщепляет только  $\alpha$ -субъединицу Na,K-АТРазы,  $\beta$ -субъединица не подвержена трипсинолизу [Giotta, G.J., 1975].

По данным SDS-ПААГ электрофореза трипсинолиз Na,K-АТРазы в присутствии NaCl и KCl, а также в среде с уабаином, сопровождается накоплением полипептидов с кажущимися молекулярными массами 40, 35,5 и 23 кДа (рис. 35). При инкубации Na,K-АТРазы с трипсином в присутствии NaCl в течение менее чем 60 мин наблюдалось

появление неинтенсивной белковой полосы, характерной для белка с кажущейся молекулярной массой 80 кДа, который по литературным данным является первым продуктом трипсинолиза  $\alpha 1$ -субъединицы, находящейся в E1-конформации.

#### **3.4.1. Трипсинолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в присутствии 150 мМ КСl**

Среда, содержащая 150 мМ КСl, способствует переходу фермента в E2-конформацию, обладающую большим сродством к ионам  $K^+$ . При трипсинолизе исходно глутатионилированного (контрольного) и частично деглутатионилированного (восстановленного 3%  $NaBH_4$ ) препаратов Na,K-АТФазы в течение 45, 60 и 90 мин с использованием весового соотношения трипсин:Na,K-АТФаза 1:10 через 45 мин происходит практически полный протеолиз  $\alpha 1$ -субъединицы и начинается накопление продуктов протеолиза (рис. 35).

Наиболее очевидные различия между контрольным и частично деглутатионилированными препаратами наблюдались при трипсинолизе в течение 1 ч. В деглутатионилированном препарате было отмечено увеличение количества фрагмента с молекулярной массой 40 кДа, а также появление фрагмента с молекулярной массой 23 кДа, который отсутствует в контроле. При трипсинолизе дополнительно глутатионилированного препарата фермента, проведённом в течение того же времени, наблюдали более интенсивное накопление фрагментов с молекулярными массами 35,5 и 40 кДа, вместе с тем накопление фрагмента с кажущейся молекулярной массой 23 кДа достоверно не отличалось от контроля (рис. 35 Б, Г). Таким образом, в присутствии ионов  $K^+$  (E2-конформация) и частичное деглутатионилирование, и дополнительное глутатионилирование  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы приводит к возрастанию доступности для трипсина связей, гидролиз которых приводит к образованию фрагмента с молекулярной массой 40 кДа. Однако в случае деглутатионилирования, но не дополнительного глутатионилирования, возрастает также доступность связей, ответственных за образование фрагмента с молекулярной массой 23 кДа.

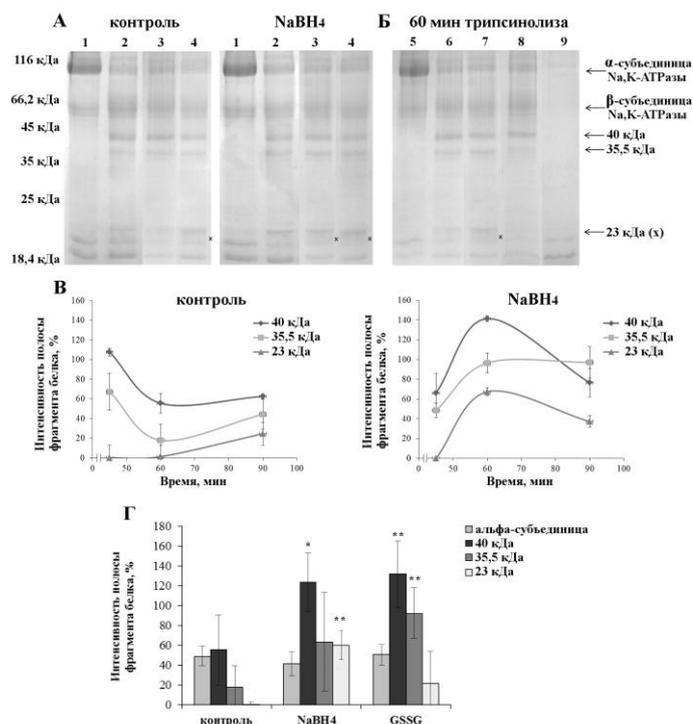


Рис. 35. Трипсинолиз  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в присутствии 150 мМ KCl. Результат электрофоретического разделения в ПААГ методом электрофореза по Леммли протеолитических фрагментов  $\alpha$ -субъединицы. А – динамика образования протеолитических фрагментов исходно глутатионилированного (контроль) и частично деглутатионилированного с помощью 3%  $\text{NaBH}_4$  препаратов фермента ( $\text{NaBH}_4$ ) в зависимости от времени инкубации с трипсином: 1 – исходный препарат; 2 – 45 мин; 3 – 60 мин; 4, – 90 мин. Б – трипсинолиз различных препаратов Na,K-АТФазы в течение 60 мин: 5 – контроль (инкубация с трипсином и его ингибитором); 6 – исходно глутатионилированный препарат; 7 – препарат, полученный после инкубации с 3%  $\text{NaBH}_4$ ; 8 – препарат, полученный после инкубации с 1 мМ GSSG; 9 – автолиз трипсина. В – накопление во времени продуктов трипсинолиза  $\alpha 1$ -субъединицы исходно глутатионилированного и частично деглутатионилированного препаратов Na,K-АТФазы. Г – результаты трипсинолиза деглутатионилированной, исходно глутатионилированной и дополнительно глутатионилированной Na,K-АТФазы в присутствии 150 мМ KCl в течение 60 минут. Приведены значения интенсивности полосы фрагмента относительно интенсивности фона:  $(I_{\text{фрагмента}} - I_{\text{фона}}) / I_{\text{фона}} \times 100\%$ . Символом \* отмечены значения, отличающиеся от контроля с  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ . Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

### 3.4.2. Трипсинолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в присутствии 150 мМ NaCl

Среда, содержащая 150 мМ NaCl, обеспечивает переход фермента в E1-конформацию, имеющую большее сродство к ионам  $\text{Na}^+$ . В присутствии NaCl  $\alpha 1$ -субъединица оказалась более устойчива к протеолизу, чем в среде с KCl, что соответствует литературным данным [Jorgensen, P.L., 1975]. Вместе с тем убыль  $\alpha 1$ -

субъединицы как в контрольном, так и в дополнительно глутатионилированном препаратах идёт примерно с одинаковой скоростью. В результате трипсинолиза в присутствии NaCl среди полученных протеолитических фрагментов наблюдалось преобладание фрагмента с молекулярной массой 40 кДа и незначительное накопление фрагментов с молекулярными массами 35,5 и 23 кДа. Как и в среде с KCl, в частично деглутатионилированном препарате накопление фрагментов с кажущимися молекулярными массами 40 и 23 кДа идёт интенсивнее, чем в контрольном. Трипсинолиз дополнительно глутатионилированного препарата Na,K-АТРазы сходен с трипсинолизом контрольного препарата, единственное наблюдаемое в этом случае отличие от контроля – некоторое возрастание количества фрагмента с молекулярной массой 35,5 кДа (рис. 36). Следовательно, деглутатионилированный белок в E1-конформации характеризуется большей чувствительностью к действию трипсина, чем глутатионилированный.

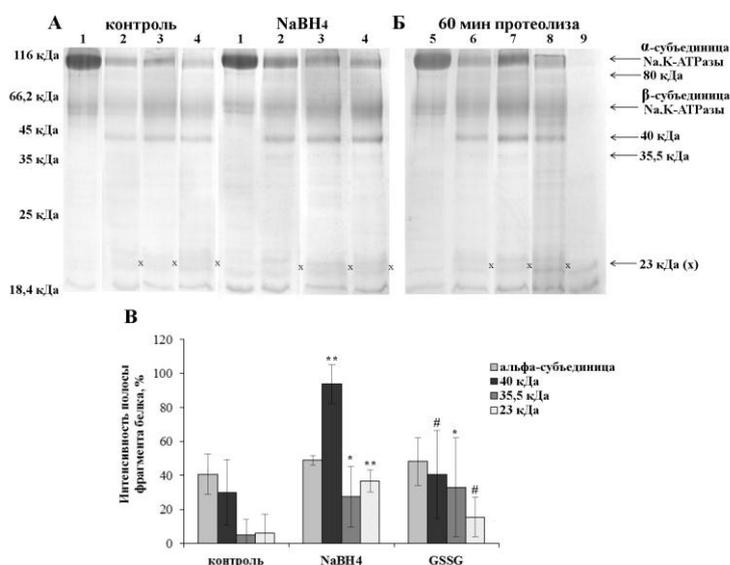


Рис. 36. Трипсинолиз  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы в присутствии 150 мМ NaCl. Результат электрофоретического разделения в ПААГ по Леммли полученных протеолитических фрагментов фермента. А – динамика образования протеолитических фрагментов исходно глутатионилированного (контроль) и деглутатионилированного с помощью 3% NaBH<sub>4</sub> препаратов фермента (NaBH<sub>4</sub>) в зависимости от времени инкубации с трипсином: 1 – исходный препарат; 2 – 30 мин; 3 – 60 мин; 4 – 90 мин. Б – трипсинолиз различных препаратов Na,K-АТРазы в течение 60 мин: 5 – контроль; 6 – исходно глутатионилированный препарат; 7 – препарат, полученный после инкубации с 3% NaBH<sub>4</sub>; 8 – препарат, полученный после инкубации с 1 мМ GSSG; 9 – автолиз трипсина. В – результаты трипсинолиза деглутатионилированной, исходно глутатионилированной и дополнительно глутатионилированной Na,K-АТРазы в присутствии 150 мМ NaCl в течение 60 минут. Приведены значения интенсивности полосы фрагмента относительно интенсивности фона:  $(I_{\text{фрагмента}} - I_{\text{фона}}) / I_{\text{фона}} \times 100\%$ . Символом \* отмечены значения, отличающиеся от контроля с  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ . Символом # отмечены значения, которые достоверно ( $p < 0,05$ ) отличаются для препарата обработанного GSSG и NaBH<sub>4</sub>. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Несмотря на то, что полученные нами при интенсивном трипсинолизе в разных условиях полипептиды имеют сходные молекулярные массы, мы не можем утверждать, что трипсинолиз идёт одинаково для E1- и E2-конформаций фермента. В литературе описано появление триптических фрагментов, имеющих молекулярные массы около 44, 37 и 23 кДа для фермента в E1-конформации и 42 и 38 кДа для фермента в E2-конформации [Jorgensen, P.L., 1977]. Кроме того, при длительном протеолизе обеих конформаций фермента было обнаружено накопление триптического фрагмента с кажущейся молекулярной массой 19-20 кДа [Mahmmoud, Y.A., 2005]. Так как SDS-ПААГ электрофорез по методу Леммли позволяет лишь приблизительно оценить молекулярную массу триптических фрагментов, то обнаруженный нами полипептид с кажущейся молекулярной массой 23 кДа может соответствовать описанному в литературе протеолитическому фрагменту  $\alpha$ 1-субъединицы с молекулярной массой 19-20 кДа, представляющему собой домен ионной окклюзии, включающий трансмембранные фрагменты M7-M10.

### **3.4.3. Трипсинолиз $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы в присутствии 0,5 мМ уабаина**

Эксперименты по трипсинолизу фермента в присутствии 0,5 мМ уабаина, который необратимо связывается с  $\alpha$ 1-субъединицей Na,K-АТРазы, переводя фермент в конформацию (E2-уабаин), отличную от E2-конформации [Klimanova, E.A., et al., 2015] показали, что связывание кардиотонического стероида ускоряет трипсинолиз по сравнению с таковым, идущим в присутствии NaCl и KCl. Через 5 мин инкубации фермента с трипсином наблюдалось накопление фрагмента с кажущейся молекулярной массой 23 кДа, а после 15 мин высокомолекулярные продукты протеолиза почти полностью исчезали. Результаты этих экспериментов не выявили достоверных различий между характером трипсинолиза исходно глутатионилированного и частично деглутатионилированного препарата в течение 5 минут. Но при более длительном трипсинолизе в контрольном препарате триптические фрагменты с кажущимися молекулярными массами 40 и 35,5 кДа исчезали после 15 мин инкубации. В частично деглутатионилированном образце белок с молекулярной массой 35,5 кДа не виден уже после 5 мин инкубации, а полоса, соответствующая белку с молекулярной массой 40 кДа исчезает после 10 мин инкубации (рис. 37 А). При трипсинолизе дополнительно глутатионилированного препарата в течение 5 минут наблюдается существенное увеличение интенсивности фрагментов 40 кДа и 35,5 кДа (рис. 37 Б, В). Судя по результатам более длительного протеолиза, фрагмент с кажущейся молекулярной массой

23 кДа (наравне с низкомолекулярными пептидами) является одним из конечных продуктов трипсинолиза более высокомолекулярного фрагмента. Принимая во внимания тот факт, что убыль фрагментов с молекулярными массами 40 кДа и 35,5 кДа наблюдается параллельно с накоплением фрагмента с молекулярной массой 23 кДа, можно предположить, что дополнительное глутатионилирование способно защищать фрагменты с молекулярными массами 40 и 35,5 кДа, замедляя их протеолиз с получением более мелких фрагментов (рис. 37).

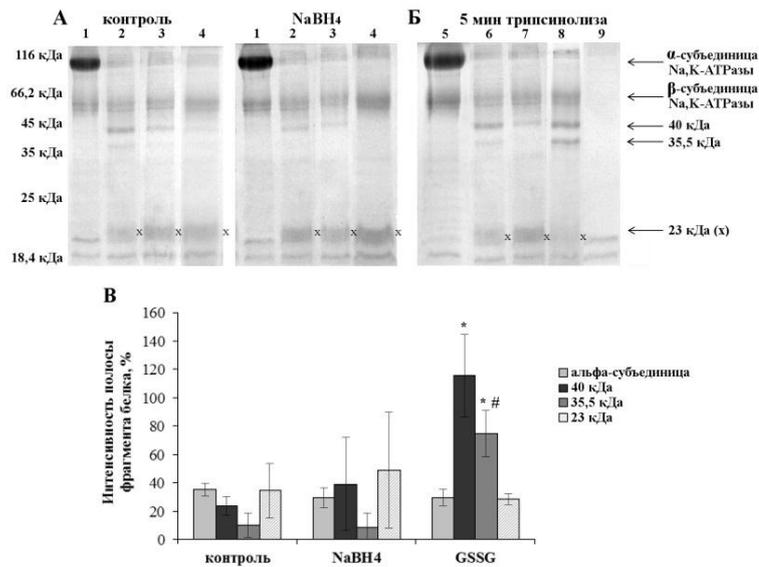


Рис. 37. Трипсинолиз  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза в присутствии 0,5 мМ убаина. Результат электрофоретического разделения в ПААГ по Леммли полученных протеолитических фрагментов фермента. А – динамика образования протеолитических фрагментов исходно глутатионилированного (контроль) и деглутатионилированного с помощью 3% NaBH<sub>4</sub> препаратов фермента (NaBH<sub>4</sub>) в зависимости от времени инкубации с трипсином: 1 – исходный препарат; 2 – 5 мин; 3 – 10 мин; 4 – 15 мин. Б – трипсинолиз различных препаратов Na,K-АТРаза в течение 5 мин: 5 – контроль; 6 – исходно глутатионилированный препарат; 7 – препарат, полученный после инкубации с 3% NaBH<sub>4</sub>; 8 – препарат, полученный после инкубации с 1 мМ GSSG; 9 – автолиз трипсина. В – результат трипсинолиза деглутатионилированной, исходно глутатионилированной и дополнительно глутатионилированной Na,K-АТРаза в присутствии 0,5 мМ убаина в течение 5 минут. Приведены значения интенсивности полосы фрагмента относительно интенсивности фона:  $(I_{\text{фрагмента}} - I_{\text{фона}}) / I_{\text{фона}} \times 100\%$ . Символом \* отмечены значения, отличающиеся от контроля с  $p < 0,05$ . Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Помимо этого были проведены контрольные эксперименты для установления влияния ионной силы на характер протеолиза. Добавление 150 мМ холинхлорида для повышения ионной силы замедлило трипсинолиз  $\alpha 1$ -субъединицы, но, тем не менее, его скорость оставалась достоверно ниже, чем в присутствии ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> (рис. 38). Результаты трипсинолиза  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза в присутствии 0,5 мМ убаина с добавлением и без добавления холинхлорида качественно не различались.

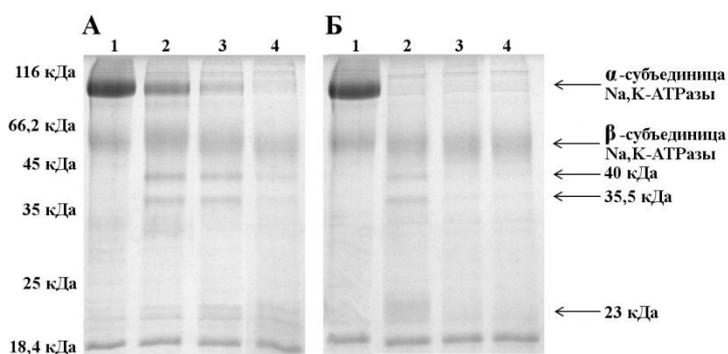


Рис. 38. Трипсинолиз  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы в присутствии 0,5 мМ убаина. Результат электрофоретического разделения в ПААГ по Леммли полученных протеолитических фрагментов фермента. А – в присутствии 150 мМ холинхлорида; Б – без добавления холинхлорида. 1 – исходный препарат; 2 – 4 инкубация с трипсином: 2 – 10 мин; 3 – 30 мин; 4 – 60 мин.

Сравнение результатов экспериментов по трипсинолизу в присутствии 150 мМ KCl и в среде с убаином подтверждает, что конформации E2, индуцированная связыванием  $K^+$ , и E2-убаин значительно различаются. Судя по тому, что в последнем случае протеолиз идёт быстрее, можно предположить, что переход фермента в конформацию E2-убаин приводит к существенному повышению доступности участков полипептидной цепи, по которым происходит триптическое расщепление белка, по сравнению с E1- и E2-конформациями, тем самым снижая его протеолитическую устойчивость.

### 3.5. Влияние степени глутатионилирования Na,K-АТРазы на её связывание с лигандами

Помимо устойчивости Na,K-АТРазы к протеолизу мы исследовали влияние глутатионилирования на связывание фермента с одним из его ингибиторов – убаином и с одним из белков-партнёров – шапероном Hsp70 с использованием метода изотермической калориметрии титрования.

#### 3.5.1. Связывание Na,K-АТРазы с убаином

Как было показано в предыдущих разделах диссертации, при связывании с убаином  $\alpha 1$ -субъединица Na,K-АТРазы переходит в конформацию E2-убаин (в присутствии ионов  $P_i$  – E2P), которая, с одной стороны, является более чувствительной к трипсинолизу, а с другой, менее подверженной глутатионилированию. Исходя из этих данных, мы провели эксперименты, целью которых было выяснить, влияет ли глутатионилирование на связывание  $\alpha 1$ -субъединицы с этим кардиотоническим стероидом.

Препарат Na,K-АТФазы либо дополнительно глутатионилировали, инкубируя с 1мМ GSSG, либо частично деглутатионилировали, инкубируя с 25 мМ ТСЕР. Затем их подвергали диализу против буфера, содержащего 3 мМ неорганического фосфата, 3 мМ MgCl<sub>2</sub> (перевод фермента в E2P конформацию) и 0,1 мМ GSSG (дополнительно глутатионилированный препарат), или 5 мМ ТСЕР (частично деглутатионилированный препарат). Контрольный препарат диализовали против буфера, содержащего 1 мМ ДТТ, чтобы избежать окисления SH-групп кислородом воздуха. Так как при инкубации фермента с 10 мМ ДТТ уровень глутатионилирования снижается не более чем на 5% (рис. 26), то препарат, преинкубированный с 1 мМ ДТТ можно рассматривать как контрольный.

В ячейку для образцов, содержащую Na,K-АТФазу в концентрации 16 – 17 мкМ, добавляли убаин до тех пор, пока кривая изотермы связывания не выходила на плато. Ниже приведены типичные ИКТ-кривые для связывания Na,K-АТФазы с лигандом (рис. 39). Анализ кривых титрования проводили в предположении стехиометрии связывания 1:1.

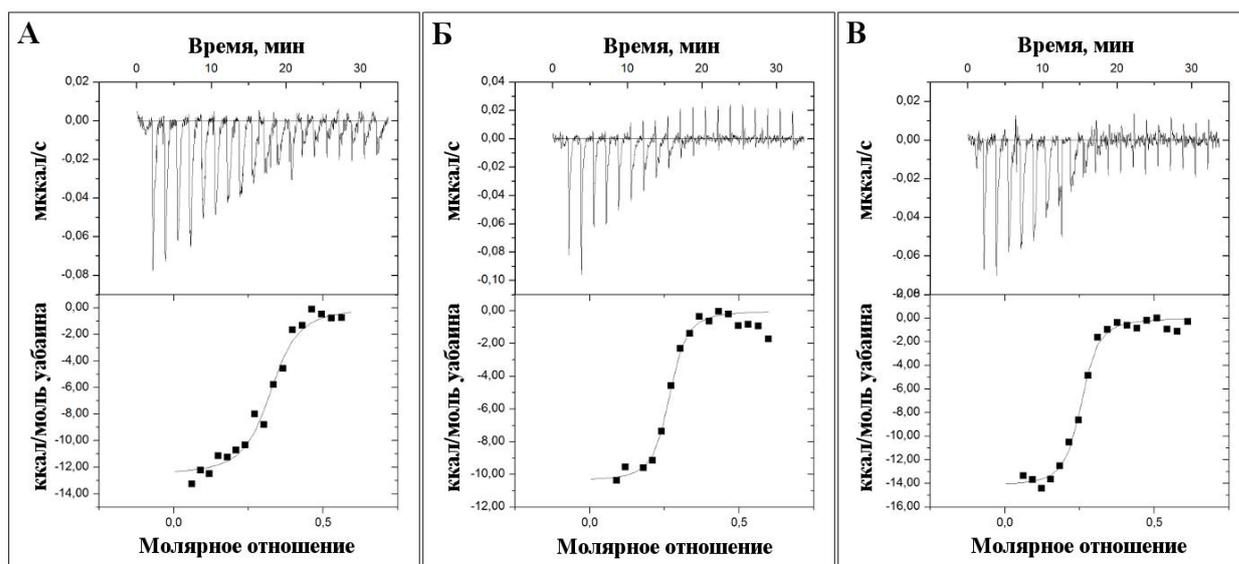


Рис. 39. Анализ взаимодействия Na,K-АТФазы с убаином методом изотермической калориметрии титрования. Верхний график – кривая титрования Na,K-АТФазы раствором убаина; нижний график – изотерма связывания фермента и лиганда, полученная путём интеграции экспериментальной ИКТ-кривой. А – контрольный препарат (1 мМ ДТТ); Б – деглутатионилированный препарат (25 мМ ТСЕР); В – дополнительно глутатионилированный препарат (1 мМ GSSG). Эксперименты проводились при 25°С.

Мы выявили, что как в случае дополнительного глутатионилирования, так и в случае частичного деглутатионилирования препаратов фермента параметры, характеризующие его связывание с лигандом, достоверно не меняются и не отличаются от параметров исходно глутатионилированного (контрольного) препарата. Реакция является

энтальпийно выгодной ( $\Delta H = -13 \pm 1,4$  ккал/моль;  $T\Delta S = -3,2$  ккал/моль), а константа диссоциации для убаина ( $K_d$ ) составляет  $0,06$  мкМ ( $K_a = 2,2 \pm 1,4 \times 10^7 M^{-1}$ ).

### 3.5.2. Связывание Na,K-АТФазы с Hsp70

Ранее методом перекрестной иммунопреципитации было установлено, что Hsp70 соосаждается вместе с Na,K-АТФазой (личное сообщение Каманиной Ю.В.). В связи с этим мы исследовали влияние глутатионилирования на связывание Na,K-АТФазы с Hsp70. Из литературных данных известно, что этот белок с шаперонной активностью взаимодействует с Na,K-АТФазой в стрессовых условиях, стабилизируя её и предотвращая диссоциацию от цитоскелета [Riordan, M., et al., 2005; Ruete, M.C., et al., 2008].

Эксперименты проводили так же, как и эксперименты по связыванию с убаином, за исключением того, что диализ проводили в буфере, не содержащем ионов  $Mg^{2+}$  и  $P_i$ . Таким образом, фермент находился преимущественно в E1-конформации. К препарату Na,K-АТФазы последовательно добавляли Hsp70 до выхода изотермы связывания на плато. Ниже приведены типичные ИКТ-кривые для связывания Na,K-АТФазы с Hsp70 (рис. 40). Анализ кривых титрования проводили в предположении стехиометрии связывания 1:1.

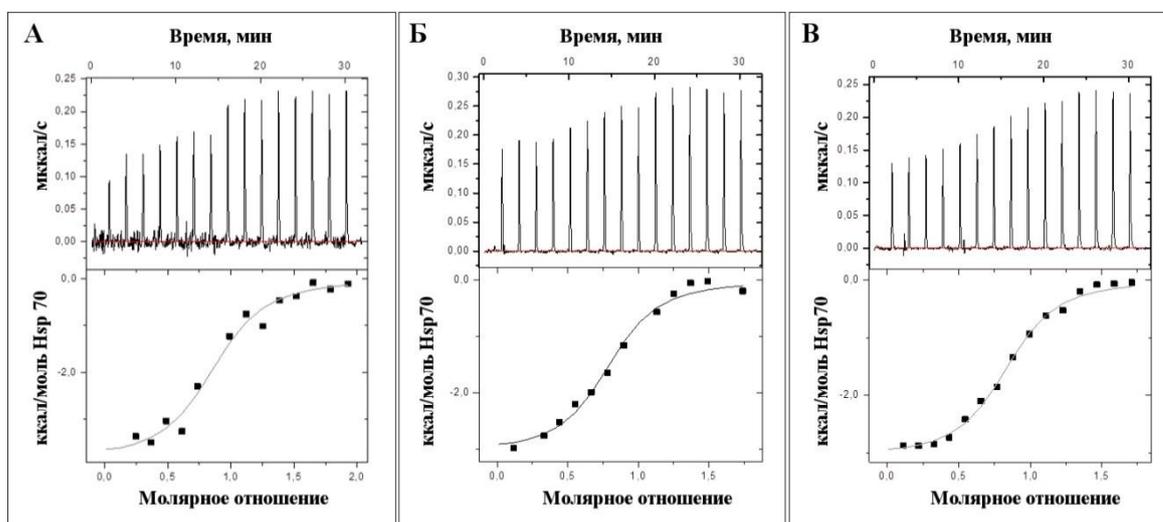


Рис. 40. Анализ взаимодействия Na,K-АТФазы с Hsp70 методом изотермической калориметрии титрования. Верхний график – кривая титрования Na,K-АТФазы раствором Hsp70; нижний график – изотерма связывания фермента и белка-партнёра, полученная путём интеграции экспериментальной ИКТ-кривой. А – контрольный препарат (1 мМ ДТТ); Б – деглутатионированный препарат (25 мМ ТСЕР); В – дополнительно глутатионированный препарат (1 мМ GSSG). Эксперименты проводились при 25°C.

Было установлено, что связывание Na,K-АТФазы с Hsp70, как и с убаином, не зависит от степени глутатионилирования препарата. Значения термодинамических параметров, характеризующих связывание Hsp70 как с контрольным, так с частично

деглутатионилированным и дополнительно глутатионилированным препаратом Na,K-АТРазы, были близки, достоверных различий обнаружено не было. Для всех трёх типов препаратов Na,K-АТРазы связывание с Hsp70 было энтальпийно выгодной реакцией ( $\Delta H = -3,1 \pm 0,07$  ккал/моль;  $T\Delta S = 5,4$  ккал/моль). Значение константы диссоциации ( $K_d$ ) составило 0,6 мкМ ( $K_a = 1,7 \pm 0,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ).

Термодинамические параметры связывания убаина и Hsp70 приведены на рисунке 41 и в таблице 2.

Таблица 2. Термодинамические параметры связывания убаина и Hsp70 с  $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТРазы, полученные методом изотермической калориметрии титрования. Указаны средние значения, полученные минимум в 3-х экспериментах,  $\pm$  стандартное отклонение.

Лиганд	$K_a, \text{ M}^{-1}$	$K_d, \text{ мкМ}$	$\Delta H, \text{ ккал/моль}$	$T\Delta S, \text{ ккал/моль}$	$\Delta G, \text{ ккал/моль}$
Убаин	$2,2 \pm 1,4 \times 10^7$	0,06	$-13 \pm 1,4$	-3,2	-9,8
Hsp70	$1,7 \pm 0,3 \times 10^6$	0,6	$-3,1 \pm 0,07$	5,4	-8,5

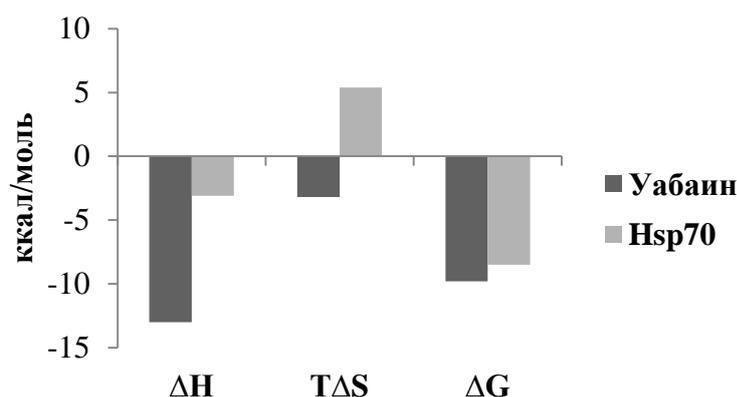


Рис. 41. Термодинамические параметры связывания убаина и Hsp70 с  $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТРазы, полученные методом изотермической калориметрии титрования.

Так как молекула убаина связывается с  $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТРазы на внеклеточной стороне мембраны, то эффект глутатионилирования мог передаваться только через влияние на конформацию фермента. Согласно полученным нами результатам мы можем сделать вывод, что эти изменения не повлияли на связывание с данным кардиотоническим стероидом.

Кроме того, исходя из данных наблюдений, мы можем предположить, что либо вблизи участка связывания Na,K-АТРазы с Hsp70 нет глутатионилируемых остатков цистеина, либо в этом участке изменения в структуре АТРазы при глутатионилировании фермента незначительны и не влияют на взаимодействие этих двух белков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что многие белки клетки могут модифицироваться по SH-группам цистеиновых остатков полипептидной цепи, формируя S-S связь с трипептидом глутатионом. Еще в прошлом веке для ряда белков клетки было показано, что они содержат ковалентно связанный глутатион (находятся в глутатионилированном состоянии) в нормальных физиологических условиях [Торчинский Ю.М., 1977]. Для  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы, содержащей 23 остатка цистеина, обнаружена модификация 12 из 15 остатков, экспонированных в цитозоль. При окислительном стрессе степень модификации SH-групп  $\alpha$ 1-субъединицы может возрасть. Такое дополнительное глутатионилирование нескольких цистеиновых остатков  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы (а именно: Cys244, 454, 458 и 459, находящихся в актуаторном и нуклеотид-связывающим доменах фермента) приводит к падению её активности, по-видимому, за счет снижения доступа АТФ в активный центр фермента [Petrushanko, I.Y., et al., 2012; Мэн С. и соавт., 2014].

В настоящей работе мы выяснили, что инкубация фермента, выделенного из солевых желёз утки, с АТФ предотвращает ингибирование его активности окисленным глутатионом, что подтверждает полученные ранее данные [Petrushanko, I.Y., et al., 2012]. Кроме того, степень глутатионилирования  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы под действием окисленного глутатиона зависит от её конформации: наиболее доступной оказалась E1-конформация фермента, в то время как E2P-конформация наименее благоприятна для модификации. Это хорошо согласуется с тем, что E1-конформация отличается наибольшим экспонированием доменов фермента в цитозоль [Shinoda, T., et al., 2009; Petrushanko, I.Y., et al., 2014]. Неожиданным оказался тот факт, что при инкубации фермента с 1 мМ GSSG в присутствии 3 мМ АТФ общий уровень глутатионилирования возрастает почти в той же мере, что и при инкубации фермента без АТФ. Эти данные позволяют предположить, что для защиты активности фермента от ингибирования достаточно предотвратить глутатионилирование SH-группы лишь одного остатка цистеина из 15. Это хорошо коррелирует с результатами работы, в которой методом точечного мутагенеза было показано, что регуляторную функцию выполняют 4 цистеина цитоплазматических доменов фермента (Cys244, 454, 458 и 459), при этом именно глутатионилирование Cys244 имеет критическое значение для ингибирования активности фермента [Petrushanko, I.Y., et al., 2017].

Деглутатионилирование  $\alpha$ 1-субъединицы очищенной Na,K-АТФазы *in vitro* с использованием системы ферментов осуществляется только на 15% от исходного. При деглутатионилировании с использованием химических восстановителей это значение

достигает 40%. При этом в первом случае наблюдается увеличение активности фермента на 20-30%, а во втором только на 13%. Эти факты могут свидетельствовать о том, что система ферментов специфична по отношению к определённым, регуляторным, цистеинам (Cys244, 454, 456 и/или 458). В то же время химические восстановители подобной специфичностью не обладают.

Данные о том, что даже сильный восстановитель  $\text{NaBH}_4$  не способен разрушить все S-S связи между цистеиновыми остатками  $\alpha 1$ -субъединицы и глутатионом, свидетельствует либо о стерической недоступности этих остатков для восстановителя, либо о необычайной прочности таких S-S связей. Тот факт, что даже в жёстких денатурирующих условиях (6 М мочевины, 2% SDS, а также при восстановлении на PVDF-мембране) не наблюдается полного деглутатионирования  $\alpha 1$ -субъединицы фермента, свидетельствует в пользу того, что  $\alpha 1$ -субъединица Na,K-АТФазы может иметь ряд S-S связей с глутатионом, характеризующихся высокой энергией. Наличие в белковых молекулах особо прочных S-S связей уже было показано на человеческом и бычьем сывороточных альбуминах, имеющих внутримолекулярные S-S мостики между остатками цистеинов, которые не поддавались восстановлению при длительной инкубации (4 часа) с 30 мМ ДТТ [David, C., et al., 2008]. Кроме того, были описаны белки, имеющие в своей структуре стабильные участки, не подвергающиеся денатурации даже в присутствии 8 М мочевины [Shortle, D., and Ackerman, M.S., 2001]. Нельзя отрицать предположение, что глутатионирование некоторых остатков цистеина  $\alpha 1$ -субъединицы, происходящее котрансляционно, как это предположили Миткевич и соавторы [Mitkevich, V.A., et al., 2016], может стабилизировать структуру белка и препятствовать полной денатурации в присутствии 6 М мочевины и 2 % SDS.

Помимо глутатионирования, SH-группы остатков цистеина могут быть нитрозилированы или окислены. При инкубации фермента с 3%  $\text{NaBH}_4$  в денатурирующих условиях наблюдается 50% восстановление модифицированных таким образом SH-групп.

Таким образом, можно условно выделить три типа глутатионирования цистеиновых остатков  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы. Первый тип – исходное глутатионирование, которому подвергаются SH-группы  $\alpha 1$ -субъединицы в нормальных физиологических условиях. При этом можно выделить устранимое в неденатурирующих условиях и не устранимое, так называемое «базальное», глутатионирование (которому, судя по данным, полученным методом масс-спектрометрии, подвергаются как минимум два остатка – Cys513 и 658). Помимо этого, методом компьютерного моделирования были получены данные, свидетельствующие о том, что в полости с неразрешённой плотностью,

находящиеся в структуре  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы, полученной методом рентгеноструктурного анализа, может быть встроено по одной молекуле глутатиона [Mitkevich, V.A., et al., 2016]. Это свидетельствует в пользу того, что такое глутатионилирование идёт котрансляционно и, как мы предполагаем, оно может стабилизировать структуру белка. Второй тип – регуляторное глутатионилирование, влияющее на активность Na,K-АТФазы, которому подвергаются Cys244, 454, 458 и 459 [Petrushanko, I.Y., et al., 2017]. И, наконец, третий тип – дополнительное глутатионилирование, происходящее под воздействием окисленного глутатиона, но не влияющее на активность фермента.

Мы предположили, что глутатионилирование первого и третьего типов может выполнять структурные функции, стабилизируя молекулу белка. Изучив устойчивость к трипсинолизу фермента, имеющего разную степень глутатионилирования (исходно глутатионилированный, частично деглутатионилированный и дополнительно глутатионилированный) и находящегося в различных конформациях, мы выяснили, что частичное деглутатионилирование приводит к ускорению трипсинолиза в случае E1- и E2-конформаций белка. Протеолиз дополнительно глутатионилированного фермента в E1-конформации сходен с протеолизом контрольного препарата. В E2-конформации дополнительное глутатионилирование приводит к усилению накопления триптических фрагментов с молекулярными массами 40 и 35,5 кДа, но не триптических фрагментов с молекулярной массой 23 кДа. При трипсинолизе в присутствии убаина дополнительное глутатионилирование приводит к увеличению содержания более высокомолекулярных фрагментов по сравнению с нативным и частично деглутатионилированным препаратами, тем самым защищая данные фрагменты от дальнейшего трипсинолиза.

Связывание  $\alpha 1$ -субъединицы с убаином переводит фермент в E2-убаиновую конформацию, менее устойчивую к протеолизу по сравнению с E1- и E2- конформациями. Вероятно, в данной конформации участки полипептидной цепи, по которым идёт триптическое расщепление, максимально экспонированы в раствор. Уменьшение стабильности фермента, связанного с убаином, по сравнению с ферментом в E2-конформации было показано Гириг на Na,K-АТФазе, экспрессированной в ооцитах лягушки [Geering, K., et al., 1996]. Это свойство может быть связано с выполнением Na,K-АТФазой функций сигнального рецептора, так как подобная неустойчивость фермента, связавшегося с кардиотоническим стероидом, позволяет быстро подвергнуть белок протеолизу после передачи сигнала в клетку. В клетке протеолиз Na,K-АТФазы может проходить под действием сериновых протеаз, имеющих такую же специфичность, как и трипсин, например, катепсина В [Mort, J.S., and Buttle, D.J., 1997].

Исследование влияния глутатионилирования  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы на термодинамические параметры её связывания с убаином и с белком-шапероном Hsp70 показали, что эта модификация не влияет на связывание фермента ни с убаином, ни с Hsp70. Так как молекула убаина связывается с  $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТФазы на внеклеточной стороне мембраны, то данный результат можно считать вполне ожидаемым. Тот факт, что глутатионилирование не влияет на связывание с Hsp70, может свидетельствовать о том, что либо вблизи участка связывания Na,K-АТФазы с Hsp70 нет глутатионируемых остатков цистеина, либо при глутатионилировании изменения в структуре фермента в этом участке незначительны и не влияют на взаимодействие двух этих белков.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно заключить, что исходное глутатионилирование может стабилизировать структуру  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы, в то время как структурная роль дополнительного глутатионилирования ещё требует более глубокого изучения.

## ВЫВОДЫ

- 1)  $\alpha$ 1-Субъединица Na,K-АТРазы, выделенной из солевых желёз утки, содержит связанный глутатион (исходное глутатионилирование). Инкубация фермента с окисленным глутатионом (1 мМ) приводит к увеличению степени глутатионилирования  $\alpha$ 1-субъединицы, при этом доступность конформаций к глутатионилированию снижается в ряду: E1, E2, E2P. Связывание убаина с конформацией E2P не влияет на уровень глутатионилирования.
- 2) Глутатионилирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы с помощью окисленного глутатиона ингибирует активность фермента. Преинкубация препарата с АТР защищает фермент от ингибирования концентрационно-зависимым способом с максимальным эффектом при концентрации АТР выше 1 мМ.
- 3) Полного восстановления S-S связей между глутатионом и остатками цистеина  $\alpha$ 1-субъединицы фермента (деглутатионилирования) не удается достичь даже под действием сильных восстанавливающих агентов (25 мМ трис-2-карбоксиитилфосфина (ТСЕР) и 3% NaBH<sub>4</sub>) в денатурирующих условиях (6 М мочевины, 2% додецилсульфата натрия (SDS)). По данным масс-спектрометрического анализа глутатион не удаляется с остатков Cys513 и 658 и лишь частично удаляется с остатков Cys454, 458 и 459.
- 4) После инкубации препарата Na,K-АТРазы с 25 мМ трис-2-карбоксиитилфосфином и 3% NaBH<sub>4</sub> наблюдается восстановление нитрозированных SH-групп  $\alpha$ 1-субъединицы на 20% и 45% соответственно, и восстановление окисленных до -SOH, -SO<sub>2</sub>H и -SO<sub>3</sub>H групп на 60% и 40% соответственно.
- 5) Частичное деглутатионилирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы приводит к уменьшению её устойчивости к протеолизу в E1- и E2-конформациях. Характер трипсинолиза дополнительно глутатионилированного препарата варьирует в

зависимости от конформации белка. Связывание убаина существенно ускоряет трипсинолиз по сравнению с таковым, происходящим с E1- и E2-конформациями.

- б) Дополнительное глутатионирование и частичное деглутатионирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы не влияет на термодинамические параметры её связывания с лигандом убаином и белком теплового шока Hsp70.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Болдырев А.А. (1998) Na/K-АТФаза – свойства и биологическая роль. *Соросовский образовательный журнал*, 4, 2–9.
- 2) Болдырев А.А. (2008) Роль Na/K-насоса в возбудимых тканях. *Журнал Сибирского федерального университета*, серия: биология, 1 (3), 206–25.
- 3) Долгова Н.В., Каманина Ю.В., Акимова О.А., Орлов С.Н., Рубцов А.М. и Лопина О.Д. (2007) Белок, связывание которого с Na,K-АТФазой регулируется убаином. *Биохимия*, 72 (8), 1061–71.
- 4) Калинина Е.В., Чернов Н.Н. и Сапин А.Н. (2008) Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах. *Успехи биологической химии*, 48, 319–58.
- 5) Каманина Ю.В., Климанова Е.А., Дергоусова Е.А., Петрушанко И.Ю. и Лопина О.Д. (2016) Идентификация участка полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы, взаимодействующего с мелиттинподобным белком с молекулярной массой 67 кДа. *Биохимия*, 81 (3), 369–75.
- 6) Лопина О.Д. (2001) Взаимодействие каталитической субъединицы Na,K-АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами. *Биохимия*, 66 (10), 1389–400.
- 7) Муртазина Д.А., Петухов С.П., Рубцов А.М., Стори К.Б. и Лопина О.Д. (2001) Фосфорилирование  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы из солевых желёз уток под действием сАМР-зависимой протеинкиназы ингибирует активность фермента. *Биохимия*, 66 (8), 1066–77.
- 8) Мэн С., Петрушанко И.Ю., Климанова Е.А., Дергоусова Е.А. и Лопина О.Д. (2014) Глутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы из сердца крысы под действием окисленного глутатиона приводит к ингибированию активности фермента. *Биохимия*, 79 (2), 209–16.
- 9) Тверской А.М., Сидоренко С.В., Климанова Е.А., Акимова О.А., Смольянинова Л.В., Лопина О.Д. и Орлов С.Н. (2016) Влияние убаина на пролиферацию эндотелиальных клеток человека коррелирует с изменением активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и соотношением внутриклеточных концентраций  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . *Биохимия*, 81 (8), 1112–21.
- 10) Торчинский Ю.М. (1977) Сера в белках. Издательство Наука, Москва.

- 11) Якушев С.С., Кумскова Е.М., Рубцов А.М. и Лопина О.Д. (2008) Влияние колхицина на чувствительность Na,K-АТФазы из солевых желёз утки к Na<sup>+</sup>. *Биохимия*, 73 (9), 1230–35.
- 12) Akimova, O.A., Bagrov, A.Y., Lopina, O.D., Kamernitsky, A.V., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S.N. (2005) Cardiotoxic steroids differentially affect intracellular Na<sup>+</sup> and [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> – independent signaling in C7-MDCK cells. *J. Biol. Chem.*, 280 (1), 832–9.
- 13) Ark, M., Ozdemir, R., and Polat, B. (2010) Ouabain-induced apoptosis and Rho kinase: a novel caspase-2 cleavage site and fragment of Rock-2. *Apoptosis*, 15 (12), 1494–506.
- 14) Arystarkhova, E., and Sweadner, K.J. (1997) Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase β3 subunit. The presence of β3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J. Biol. Chem.*, 272 (36), 22405–8.
- 15) Arystarkhova, E., Gibbons, D.L., and Sweadner, K.J. (1995) Topology of the Na,K-ATPase. Evidence for externalization of a labile transmembrane structure during heating. *J. Biol. Chem.*, 270 (15), 8785–96.
- 16) Arystarkhova, E., Wetzel, R.K., Asinowski, N.K., and Sweadner, K.J. (1999) The γ subunit modulates Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> affinity of the renal Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 274 (47), 33183–5.
- 17) Attali, B., Latter, H., Rachamim, N., and Garty, H. (1995) A corticosteroid-induced gene expressing an “IsK-like” K<sup>+</sup> channel activity in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6092–6.
- 18) Bagrov, A.Y., and Fedorova, O.V. (1998) Effects of two putative endogenous digitalis-like factors, marinobufagenin and ouabain, on the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump in human mesenteric arteries. *J. Hypertens.*, 16 (12 Pt 2), 1953–8.
- 19) Bagrov, A.Y., Fedorova, O.V., Dmitrieva, R.I., Howald, W.N., Hunter, A.P., Kuznetsova, E.A., and Shpen V.M. (1998) Characterization of a urinary bufodienolide Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. *Hypertension*, 31 (5), 1097–103.
- 20) Bagrov, A.Y., Shapiro, J.I., and Fedorova, O.V. (2009a) Endogenous cardiotoxic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.*, 61 (1), 9–38.
- 21) Barcroft L.C., Moseley, A.E., Lingrel, J.B., and Watson, A.J. (2004) Deletion of the Na/K-ATPase α1-subunit gene (*Atp1a1*) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo. *Mech. Dev.*, 121 (5), 417–26.
- 22) Barnham, K.J., Masters, C.L., and Bush, A.I. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3 (3), 205–14.

- 23) Baxter-Lowe, L.A., Guo, J.Z., Bergstrom, E.E., and Hokin, L.E. (1989) Molecular cloning of the Na,K-ATPase alpha-subunit in developing brine shrimp and sequence comparison with higher organisms. *FEBS Lett.*, 257 (1), 181–7.
- 24) Beguin, P., Crambert, G., Guennoun, S., Garty, H., Horisberger, J.-D., and Geering, K. (2001) CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the  $\gamma$ -subunit. *The EMBO Journal*, 20 (15), 3993–4002.
- 25) Beguin, P., Crambert, G., Monnet-Tschudi, F., Uldry, M., Horisberger, J.-D., Garty, H., and Geering, K. (2002) FXYD7 is a brain – specific regulator of Na,K-ATPase  $\alpha$ 1- $\beta$  isozymes. *The EMBO Journal*, 21 (13), 3264–3273.
- 26) Beguin, P., Wang, X., Firsov, D., Puoti, A., Claeys, D., Horisberger, J.-D., and Geering, K. (1997) The  $\gamma$  subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *The EMBO Journal*, 16 (14), 4250–4260.
- 27) Berrebi-Bertrand, I., Maixent, J.M., Christe, G., and Lelievre, L.G. (1990) Two active Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases of high affinity for ouabain in adult rat brain membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1021 (2), 148–56.
- 28) Bertorello, A.M., and Katz, A.L. (1993) Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 265 (6 Pt 2), F743–55.
- 29) Bibert, S., Liu, C.C., Figtree, G.A., Garcia, A., Hamilton, E.J., Marassi, F.M., Sweadner, K.J., Cornelius, F., Geering, K., and Rasmussen, H.H. (2011) FXYD proteins reverse inhibition of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump mediated by glutathionylation of its  $\beta$ 1 subunit. *J. Biol. Chem.*, 286 (21), 18562–72.
- 30) Blanco, G., and Mercer, R.W. (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 275, 633–50.
- 31) Bogdanova, A., Petrushanko I.Y., Hernansanz-Agustin, P., and Martinez-Ruiz, A. (2016) “Oxygen sensing” by Na,K-ATPase: these miraculous thiols. *Front. Physiol.*, 7:314, article 314.
- 32) Brennan, J.P., Wait, R., Begum, S., Bell, J.R., Dunn, M.J., and Eaton, P. (2004) Detection and mapping of widespread intermolecular protein disulfide formation during cardiac oxidative stress using proteomics with diagonal electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 279 (40), 41352–60.
- 33) Brocchieri, L., Conway de Macario, E., and Macario, A.J. (2008) Hsp70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol. Biol.*, 8, 19.

- 34) Brown, M.T., and Cooper, J.A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta*, 1287 (2-3), 121–49.
- 35) Burgener-Kairuz, P., Horisberger, J.D., Geering, K., and Rossier, B.C. (1991) Functional expression of N-terminal truncated  $\alpha$ -subunits of Na,K-ATPase in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.*, 290 (1-2), 83–6.
- 36) Canfield, V.A., Xu, K.Y., D'Aquila, T., Shvian, A.W., and Levenson, R. (1992) Molecular cloning and characterization of Na,K-ATPase from *Hydra vulgaris*: implications for enzyme evolution and ouabain sensitivity. *New Biol.*, 4 (4), 339–48.
- 37) Cantiello, H.F. (1995) Actin filaments stimulate the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . *Am. J. Physiol.*, 269 (5 Pt 2), F637–43.
- 38) Castro, J., and Farley, R.A. (1979) Proteolytic fragmentation of the catalytic subunit of the sodium and potassium adenosine triphosphatase. Alignment of tryptic and chymotryptic fragments and location of sites labeled with ATP and iodoacetate. *J. Biol. Chem.*, 254 (7), 2221–8.
- 39) Chai, Y.C., Ashraf, S.S., Rokutan, K., Johnston, R.B. Jr., and Thomas, J.A. (1994) S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 310 (1), 273–61.
- 40) Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., and Schumacker, P.T. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (20), 11715–20.
- 41) Chen, D., Song, M., Mohamad, O., and Yu, S.P. (2014) Inhibition of  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$  induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells. *BMC Cancer*, 14, article 716.
- 42) Chibalin, A.V., Ogimoto, G., Pedemonte, C.H., Pressley, T.A., Katz, A.I., Feraille, E., Berggren, P.O., and Bertorello, A.M. (1999) Dopamine-induced endocytosis of  $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$  is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 274 (4), 1920–7.
- 43) Choi, H., Tostes, R.C., and Webb, R.C. (2011) S-nitrosylation inhibits protein kinase C-mediated contraction in mouse aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 57 (1), 65–71.
- 44) Chu, F., Ward, N.E., and O'Brian, C.A. (2001) Potent inactivation of representative members of each PKC isozyme subfamily and PKD via S-thiolation by the tumor-promotion/progression antagonist glutathione but not by its precursor cysteine. *Carcinogenesis*, 22 (8), 1221–9.

- 45) Chua, Y.L., Dufour, E., Dassa, E.P., Rustin, P., Jacobs, H.T., Taylor, C.T., and Hagen, T. (2010) Stabilization of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.*, 285 (41), 31277–84.
- 46) Collins, J.H., Zot, A.S., Ball, W.J. Jr., Lane, L.K., and Schwartz, A. (1983) Tryptic digest of the  $\alpha$  subunit of lamb kidney (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 742 (2), 358–65.
- 47) Cornelius, F., and Logvinenko, N. (1996) Functional regulation of reconstituted Na,K-ATPase by protein kinase A phosphorylation. *FEBS Lett.*, 380 (3), 277–80.
- 48) Cortes, V.F., Veiga-Lopes, F.E., Barrabin, H., Alves-Ferreira, M., and Fontes, C.F. (2006) The  $\gamma$ -subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38 (11), 1901–13.
- 49) Costa, C.J., Gatto, C., and Kaplan, J.H. (2003) Interaction between Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit ATP-binding domains. *J. Biol. Chem.*, 278 (11), 9176–84.
- 50) Couto, N., Wood, J., and Barber, J. (2016) The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.*, 95, 27–42.
- 51) Craghill, J., Cronshaw, A.D., and Harding, J.J. (2004) The identification of a reaction site of glutathione mixed-disulfide formation on gamma-S-crystallin in human lens. *Biochem. J.*, 379 (Pt 3), 595–600.
- 52) Cuppoletti, J., and Abbott, A.J. (1990) Interaction of melittin with the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase: evidence for a melittin-induced conformational change. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283 (2), 249–57.
- 53) Dada, L.A., Chandel, N.S., Ridge, K.M., Pedemonte, C., Bertorello, A.M., and Sznajder, J.I. (2003) Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC- $\zeta$ . *J. Clin. Invest.*, 11 (7), 1057–64.
- 54) Dalle-Donne, I., Milzani, A., Gagliano, N., Colombo, R., Giustarini, D., and Rossi, R. (2008) Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.*, 10 (3), 445–73.
- 55) Daugaard M., Rohde, M., and Jaattela, M. (2007) The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.*, 581 (19), 3702–10.
- 56) David, C., Foley, S., Mavon, C., and Enescu, M. (2008) Reductive unfolding of serum albumins uncovered by Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 89 (7), 623–34.

- 57) de Carvalho Aguiar, P., Sweadner, K.J., Penniston, J.T., Zaremba, J., Liu, L., Caton, M., Linzasoro, G., Borg, M., Tijssen, M.A., Bressman, S.B., Dobyns, W.B., Brashear, A., and Ozelius L.J. (2004) Mutations in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron*, 43 (2), 169–75.
- 58) De Fusco, M., Marconi, R., Silvestri, L., Atorino, L., Rampoldi, L., Morgante, L., Ballabio, A., Aridon, P., and Casari, G. (2003) Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump  $\alpha$ 2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat. Genet.*, 33 (2), 192–6.
- 59) Dempsey, C.E. (1990) The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1031 (2), 143–61.
- 60) Domenicotti, C., Paola, D., Vitali, A., Nitti, M., d'Abramo, C., Cottalasso, D., Maloberti, G., Biasi, F., Poli, G., Chiarpotto, E., Marinari, U.M., and Pronzato, M.A. (2000) Glutathione depletion induces apoptosis of rat hepatocytes through activation of protein kinase C novel isoforms and dependent increase in AP-1 nuclear binding. *Free Radic. Biol. Med.*, 29 (12), 1280–90.
- 61) Duppatla, V., Gjorgjevikj, M., Schmitz, W., Kottmair, M., Mueller, T.D., and Sebald, W. (2012) Enzymatic deglutathionylation to generate interleukin-4 cysteine mutants with free thiol. *Bioconjug. Chem.*, 23 (7), 1396–405.
- 62) Dweik, R.A. (2005) Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax*, 60 (4), 265–7.
- 63) Efendiev, R., Bertorello, A.M., Pressley, T.A., Rousselot, M., Feraille, E., and Pedemonte, C.H. (2000) Simultaneous phosphorylation of Ser11 and Ser18 in the  $\alpha$  subunit promotes the recruitment of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase molecules to the plasma membrane. *Biochemistry*, 39 (32), 9884–92.
- 64) Einholm, A.P., Nielsen, H.N., Holm, R., Toustrup-Jensen, M.S., and Vilsen, B. (2016) Importance of a potential protein kinase A phosphorylation site of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and its interaction network for Na<sup>+</sup> binding. *J. Biol. Chem.*, 291 (20), 10934–47.
- 65) Esmann, M., Arora, A., Maunsbach, A.B., and Marsh, D. (2006) Structural characterization of Na,K-ATPase from shark rectal glands by extensive trypsinization. *Biochemistry*, 45 (3), 954–63.
- 66) Ewart, H.S., and Klip, A. (1995) Hormonal regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.*, 269 (2 Pt 1) C295–311.
- 67) Fagan, M.J., and Saier, M.H., Jr (1994) P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J.Mol.Evol.*, 38 (1), 57–99.

- 68) Fambrough, D.M. (1988) The sodium pump becomes a family. *Trends Neurosci.*, 11 (7), 325–8.
- 69) Farley, R.A., Heart, E., Kabalin, M., Putnam, D., Wang, K., Kasho, V.N., and Faller, L.D. (1997) Site-directed mutagenesis of the sodium pump: analysis of mutations to amino acids in the proposed nucleotide binding site by stable oxygen isotope exchange. *Biochemistry*. 36 (4), 941–51.
- 70) Fedorova, O.V., Doris, P.A., and Bagrov, A.Y. (1998) Endogenous marinobufagenin-like factor in acute plasma volume expansion. *Clin. Exp. Hypertens.*, 20 (5-6), 581–91.
- 71) Ferrandi, M., Salardi, S., Tripodi, G., Barassi, P., Rivera, R., Manunta, P., Goldshleger, R., Ferrari, P., Bianchi, G., and Karlish, S.J. (1999) Evidence for an interaction between adducin and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase: relation to genetic hypertension. *Am. J. Physiol.*, 277 (4 Pt 2), H1338–49.
- 72) Feschenko, M.S., and Sweadner, K.J. (1994) Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 269 (48), 30436–44.
- 73) Feschenko, M.S., and Sweadner, K.J. (1995) Structural basis for species-specific differences in the phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 270 (23), 14072–7.
- 74) Figtree, G.A., Liu, C.C., Bibert, S., Hamilton, E.J., Garcia, A., White, C.N., Chia, K.K., Cornelius, F., Geering, K., and Rasmussen, H.H. (2009) Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump regulation. *Circ. Res.*, 105 (2), 185–93.
- 75) Finka, A., Sharma, S.K., and Goloubinoff, P. (2015) Multi-layered molecular mechanisms of polypeptide holding, unfolding and disaggregation by HSP70/HSP110 chaperones. *Front. Mol. Biosci.*, 2, article 29.
- 76) Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D.B. (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346 (6285), 623–8.
- 77) Franzon, R., Lamers, M.L., Stefanello, F.M., Wannmacher, C.M., Wajner, M., and Wyse, A.T. (2003) Evidence that oxidative stress is involved in the inhibitory effect of proline on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic plasma membrane of rat hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 21 (6), 303–7.
- 78) Fuzesi, M., Gottschalk, K.-E., Lindzen, M., Shainskaya, A., Kuster, B., Garty, H., and Karlish, S.J. (2005) Covalent cross-linking between the  $\gamma$  subunit (FXVD2) and  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of Na,K-ATPase: modeling the  $\alpha$ - $\gamma$  interaction. *J Biol. Chem.*, 280 (18), 18291–301.

- 79) Gable, M.E., Abdallah, S.L., Najjar, S.M., Liu, L., and Askari, A. (2014) Digitalis-induced cell signaling by the sodium pump: on the relation of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 446 (4), 1151–4.
- 80) Ganjeizadeh, M., Zolotarjova, W.-H., and Askari, A. (1994) Interaction of phosphorylation and dimerizing domains of the  $\alpha$ -subunits of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Biol. Chem.*, 270 (26), 15707–10.
- 81) Garcia, A., Eljack, N.D., Sani, M.A., Separovic, F., Rasmussen, H.H., Kopec, W., Khandelia, H., Cornelius, F., and Clarke, R.G. (2015) Membrane accessibility of glutathione. *Biochim. Biophys. Acta*, 1848 (10 Pt A), 2430–6.
- 82) Geering, K. (1991) The functional role of the beta-subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase. *FEBS Lett.*, 285 (2), 189–93.
- 83) Geering, K., Beggah, A., Good, P., Girardet, S., Roy, S., Schaer, D., and Jaunin, P. (1996) Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus of the  $\beta$  subunit with  $\alpha$  subunit. *J. Cell Biol.*, 133 (6), 1193–204.
- 84) Geering, K., Beggah, A., Good, P., Girardet, S., Roy, S., Schaer, D., and Jaunin, P. (1996) Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus of the  $\beta$  subunit with the  $\alpha$  subunit. *J. Cell Biol.*, 133 (6), 1193–204.
- 85) Geering, K., Beguin, P., Garty, H., Karlisch, S., Fuzesi, M., Horisberger, J.-D., and Crambert, G. (2003) FXYD proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 986, 388–94.
- 86) Gehrman, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jaattela, M., Zilch, T., and Multhoff, G. (2005) Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ.*, 12 (1), 38–51.
- 87) Ghezzi, P., et al., (2005) Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.*, 7 (7-8), 964–72.
- 88) Giotta, G.J. (1975) Native (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-dependent adenosine triphosphatase has two trypsin-sensitive sites. *J. Biol. Chem.* 250 (13), 5159–64.
- 89) Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Colombo, R., Petralia, S., Giampaolletti, S., Milzani, A., and Rossi, R. (2003) Protein glutathionylation in erythrocytes. *Clin. Chem.*, 49 (2), 327–30.

- 90) Gopalakrishna, R., and Anderson, W.B. (1989)  $\text{Ca}^{2+}$ - and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (17), 6758–62.
- 91) Griffith, O.W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 27 (9-10), 922–35.
- 92) Guo, F., Sigua, C., Bali, P., George, P., Fiskus, W., Scuto, A., Annavarapu, S., Mouttaki, A., Sondarva, G., Wei, S., Wu, J., Djeu, J., and Bhalla, K (2005) Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*, 105 (3), 1246–55.
- 93) Guzy, R.D., and Schumacker, P.T. (2006) Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.*, 91 (5), 807–19.
- 94) Haas, M., Wang, H., Tian, J., and Xie, Z. (2002) Src-mediated inter-receptor cross-talk between the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and the epidermal growth factor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 277 (21), 18694–702.
- 95) Hagen, T., Taylor, C.T., Lam, F., and Moncada, S. (2003) Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 $\alpha$ . *Science*, 302 (5652), 1975–8.
- 96) Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381 (6583), 571–9.
- 97) He, S., Shelly, D.A., Moseley, A.E., James, P.F., James, J.H., Paul, R.J., and Lingrel, J.B. (2001) The  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-isoforms of Na,K-ATPase play different roles in skeletal muscle contractility. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281 (3), R917–25.
- 98) Homolya, L., Varadi, A., and Sarkadi, B. (2003) Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*, 17 (1-4), 103–14.
- 99) Hopkins, B.E., Wagner, H. Jr., and Smith, T.W. (1976) Sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase of the nasal salt gland of the duck (*Anas platyrhynchos*). Purification, characterization, and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of the phosphorylating polypeptide. *J. Biol. Chem.*, 251 (14), 4365–71.
- 100) Hu, Y.K., Eisses, J.F., and Kaplan, J.H. (2000) Expression of an active Na,K-ATPase with an  $\alpha$ -subunit lacking all twenty-three native cysteine residues. *J. Biol. Chem.*, 275 (39), 30734–9.
- 101) James, P.F., Grupp, I.L., Grupp, G., Woo, A.L., Askew, G.R., Croyle, M.L., Walsh, R.A., and Lingrel, J.B. (1999) Identification of a specific role for the Na,K-ATPase  $\alpha$ 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol. Cell*, 3 (5), 555–63.

- 102) Jewell, E.A., and Lingrel, J.B. (1991) Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  isoforms expressed in HeLa cells.
- 103) Jones, D.H., Davies, T.C., and Kidder, G.M. (1997) Embryonic expression of the putative  $\gamma$  subunit of the sodium pump is required for acquisition of fluid transport capacity during mouse blastocyst development. *J. Cell Biol.*, 139 (6), 1545–52.
- 104) Jones, D.P. (2006) Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Res.*, 9 (2), 169–81.
- 105) Jones, D.P., Go, Y.M., Anderson, C.L., Ziegler, T.R., Kinkade, J.M. Jr., Kirilin, W.G. (2004) Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control.
- 106) Jorgensen, P.L. (1975) Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool. *Biochim. Biophys. Acta*, 401 (3), 399–415.
- 107) Jorgensen, P.L. (1977) Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. *Biochim. Biophys. Acta*, 466 (1), 97–108.
- 108) Jorgensen, P.L. (1988) Purification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: enzyme sources, preparative problems, and preparation from mammalian kidney. *Methods Enzymol.*, 156, 29–43.
- 109) Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., (1988) Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. *J. Membrane Biol.*, 103, 95-120.
- 110) Jorgensen, P.L., and Collins, J.H. (1986) Tryptic and chymotryptic cleavage sites in sequence of  $\alpha$ -subunit of (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase from outer medulla of mammalian kidney. *Biochim. Biophys. Acta*, 860 (3), 570–6.
- 111) Karlsh, S.J., Goldshleger, R., and Stein, W.D. (1990) A 19-kDa C-terminal tryptic fragment of the  $\alpha$  chain of Na/K-ATPase is essential for occlusion and transport of cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87 (12), 4566–70.
- 112) Kelly, C.E., Ram, M.L., Francis, S.A., Houle, T.D., and Cala, S.E. (2004) Identification of a cytoskeleton-bound form of phospholemman with unique C-terminal immunoreactivity. *J. Membr. Biol.*, 202 (3), 127–35.
- 113) Klatt, P., and Lamas, S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.*, 267 (16), 4928–44.
- 114) Klatt, P., Molina, E.P., De Lacoba, M.G., Padilla, C.A., Martinez-Galesteo, E., Barcena, J.A., and Lamas, S. (1999) Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J.*, 13 (12), 1481–90.

- 115) Klimanova, E.A., Petrushanko, I.Y., Mitkevich, V.A., Anashkina, A.A., Orlov, S.N., Makarov, A.A., and Lopina, O.D. (2015) Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na,K-ATPase and depends on the enzyme conformation. *FEBS Lett.*, 589 (19 Pt B), 2668–74.
- 116) Koster, J.C., Blanco, G., and Mercer, R.W. (1995) A cytoplasmic region of the Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit is necessary for specific  $\alpha/\alpha$  association. *J. Biol. Chem.*, 270 (24), 14332–9.
- 117) Kowdley, G.C., Ackerman, S.J., Chen, Z., Szabo, G., Jones, L.R., and Moorman, J.R. (1997) Anion, cation, and zwitterion selectivity of phospholemman channel molecules. *Biophys. J.*, 72 (1), 141–5.
- 118) Kulikov, A., Eva, A., Kirch, U., Boldyrev, A., and Scheiner-Bobis, G. (2007) Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1768 (7), 1691–702.
- 119) Kuntzweiler, T.A., Wallick, E.T., Johnson, C.L., and Lingrel, J.B. (1995) Amino acid replacement of Asp369 in the sheep  $\alpha 1$  isoform eliminates ATP and phosphate stimulation of [ $^3\text{H}$ ] ouabain binding to the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase without altering the cation binding properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 270 (27), 16206–12.
- 120) Kurella, E.G., Tyulina, O.V., and Boldyrev, A.A. (1999) Oxidative resistance of Na/K-ATPase. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 19 (1), 133–40.
- 121) Kuster, B., Shainskaya, A., Pu, H.X., Goldshleger, R., Blostein, R., Mann, M., and Karlsh, S.J. (2000) A new variant of the  $\gamma$  subunit of renal Na,K-ATPase. Identification by mass spectrometry, antibody binding, and expression in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 275 (24), 18441–6.
- 122) Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–5.
- 123) Lavoie, L., Levenson, R., Martin-Vasallo, P., and Klip, A. (1997) The molar ratios of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase differ in distinct subcellular membranes from rat skeletal muscle. *Biochemistry*, 36 (25), 7726–32.
- 124) Levenson, R. (1994) Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 123, 1–45.
- 125) Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22, 631–77.
- 126) Lingrel, J.B. (1992) Na, K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 24 (3), 263–270.

- 127) Lingrel, J.B., and Kuntzweiler, T. (1994) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 269 (31), 19659–62.
- 128) Lingrel, J.B., Williams, M.T., Vorhees, C.V., and Moseley, A.E. (2007) Na,K-ATPase and the role of  $\alpha$ -isoforms in behavior. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 39 (5-6), 385–9.
- 129) Liu, C.C., Garcia, A., Mahmmoud, Y.A., Hamilton, E.J., Galougahi, K.K., Fry, N.A., Figtree, G.A., Cornelius, F., Clarke, R.J., and Rasmussen, H.H. (2012) Susceptibility of  $\beta$ 1 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump subunit to glutathionylation and oxidative inhibition depends on conformation state of pump. *J. Biol. Chem.*, 287 (15), 12353–64.
- 130) Liu, C.C., Karimi Galougahi, K., Weisbrod, R.M., Hansen, T., Ravaie, R., Nunez, A., Liu, Y.B., Fry, N., Garcia, A., Hamilton, E.J., Sweadner, K.J., Cohen, R.A., and Figtree, G.A. (2013) Oxidative inhibition of the vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump via NADPH oxidase-dependent  $\beta$ 1-subunit glutathionylation: implications for angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.*, 65, 563–72.
- 131) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1), 265–75.
- 132) Lu, S.C. (2000) regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 36, 95–116.
- 133) Mahmmoud, Y.A. (2005) Stabilization of trypsin by association to plasma membranes: implications for tryptic cleavage of membrane-bound Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1720 (1-2), 110–6.
- 134) Mahmmoud, Y.A., Vorum, H., and Cornelius, F. (2000) Identification of a phospholemman-like protein from shark rectal glands. Evidence for indirect regulation of Na,K-ATPase by protein kinase c via a novel member of the FXVD family. *J. Biol. Chem.*, 275 (46), 35969–77.
- 135) Malik, N., Canfield, V.A., Beckers, M.C., Gros, P., and Levenson, R. (1996) Identification of the mammalian Na,K-ATPase  $\beta$ 3 subunit. *J. Biol. Chem.*, 271 (37), 22754–8.
- 136) Mattoo, R.U., and Goloubinoff, P. (2014) Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71 (17), 3311–25.
- 137) McDonough, A.A., and Farley, R.A. (1993) Regulation of Na,K-ATPase activity. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2(5), 725–34.
- 138) Medford, R.M., Hyman, R., Ahmad, M., Allen, J.C., Pressley, T.A., Allen, P.D., and Nadal-Ginard, B. (1991) Vascular smooth muscle expresses a truncated Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1-subunit isoform. *J. Biol. Chem.*, 266 (27), 18308–12.
- 139) Mercer, R.W. (1993) Structure of the Na,K-ATPase. *Int. Rev. Cytol.*, 137C, 139–68.

- 140) Mercer, R.W., Biemesderfer, D., Bliss, D.P. Jr., Collins, J.H., and Forbush, B. 3<sup>rd</sup>. (1993) Molecular cloning and immunological characterization of the  $\gamma$  polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.*, 121 (3), 579–86.
- 141) Mieyal, J.J., Gallogly, M.M., Qanungo, S., Sabens, E.A., and Shelton, M.D. (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.*, 10 (11), 1941–88.
- 142) Minor, N.T., Sha, Q., Nichols, C.G., and Mercer, R.W. (1998) The gamma subunit of the Na,K-ATPase induces cation channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6521–5.
- 143) Mitkevich, V.A., Petrushanko, I.Y., Poluektov, Y.M., Burnysheva, K.M., Lakunina, V.A., Anashkina, A.A., and Makarov, A.A. (2016) Basal glutathionylation of Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit depends on redox status of cells during the enzyme biosynthesis. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, published online, ID 9092328.
- 144) Mobasher, A., Avila, J., Cozar-Castellano, I., Brownleader, M.D., Trevan, M., Francis, M.J.O., Lamb, J.F., and Martin-Vasallo, P. (2000) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Bioscience Reports*, 20 (2), 51–91.
- 145) Moorman, J.R., Ackerman, S.J., Kowdley, G.C., Griffin, M.P., Mounsey, J.P., Chen, Z., Cala, S.E., O'Brian, J.J., Szabo, G., and Jones, L.R. (1995) Unitary anion currents through phospholemman channel molecules. *Nature*, 377 (6551), 737–40.
- 146) Moorman, J.R., Palmer, C.J., John, J.E. 3<sup>rd</sup>., Durieux, M.E., and Jones, L.R. (1992) Phospholemman expression induces a hyperpolarization-activated chloride current in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 267 (21), 14551–4.
- 147) Moran, L.K., Gutteridge, J.M., and Quinlan, G.J. (2001) Thiols in cellular redox signaling and control. *Curr. Med. Chem.*, 8 (7), 763–72.
- 148) Moriarty-Craige, S.E., and Jones, D.P. (2004) Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 481–509.
- 149) Morrill, G.A., Erlichman, J., Gutierrez-Juarez, R., and Kostellow, A.B. (2005) The steroid-binding subunit of the Na/K-ATPase as a progesterone receptor on the amphibian oocyte plasma membrane. *Steroids*, 70 (14), 933–45.
- 150) Morrill, G.A., Kostellow, A.B., and Askari, A. (2012) Caveolin-Na/K-ATPase interactions: role of transmembrane topology in non-genomic steroid signal transduction. *Steroids*, 77 (11), 1160–8.
- 151) Morrow, J.S., Cianci, C.D., Ardito, T., Mann, A.S., and Kashgarian, M. (1989) Ankyrin links fodrin to the alpha subunit of Na,K-ATPase in Madin-Darby canine kidney cells and in intact renal tubule cells. *J. Cell Biol.*, 108 (2), 455–65.

- 152) Mort, J.S., and Buttle, D.J. (1997) Cathepsin B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (5), 715–20.
- 153) Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sorensen, T.L., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B., and Nissen, P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*, 450 (7172), 1043–9.
- 154) Moseley, A.E., Lieske, S.P., Wetzell, R.K., James, P.F., He, S., Shelly, D.A., Paul, R.J., Boivin, G.P., Witte, D.P., Ramirez, J.M., Sweadner, K.J., and Lingrel, J.B. (2003) The Na,K-ATPase  $\alpha 2$  isoform is expressed in neurons, and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice. *J. Biol. Chem.*, 278 (7), 5317–24.
- 155) Moseley, A.E., Williams, M.T., Schaefer, T.L., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., Behbehani, M.M., Vorhees, C.V., and Lingrel, J.B. (2007) Deficiency in Na,K-ATPase  $\alpha$  isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J. Neurosci.*, 27 (3), 616–26.
- 156) Multhoff, G., and Hightower, L.E. (1996) Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones*, 1 (3), 167–76.
- 157) Nelson, W.J., and Veshnock, P.J. (1987) Ankyrin binds to  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$  and implications for the organization of membrane domains in polarized cells. *Nature*, 328 (6130), 533–6.
- 158) Nelson, W.J., Hammerton, R.W., and McNeill, H. (1991) Role of the membrane-cytoskeleton in the spatial organization of the Na,K-ATPase in polarized epithelial cells. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 46, 77–87.
- 159) Newton, A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.*, 270 (48), 28495–8.
- 160) Nishigaki, I., Chen, F.T., and Hokin, L.E. (1974) Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. XV. Direct chemical characterization of the acyl phosphate in the enzyme as an aspartyl beta-phosphate residue. *J. Biol. Chem.*, 249 (15), 4911–6.
- 161) Noguchi, S., Mutoh, Y., and Kawamura, M. (1994) The functional roles of disulfide bonds in the  $\beta$ -subunit of  $(\text{Na},\text{K})\text{ATPase}$  as studied by site-directed mutagenesis. *EBS Lett.*, 341 (2-3), 233–8.
- 162) Ogawa, H., and Toyoshima, C. (2002) Homology modeling of the cation binding sites of  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99 (25), 15977–82.
- 163) Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump ( $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ ) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106 (33), 13742–7.

- 164) Orłowski, J., and Lingrel, J.B. (1988) Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic  $\alpha$  isoform and  $\beta$  subunit mRNAs. *J. Biol. Chem.*, 263 (21), 10436–42.
- 165) Pardon, R.S., and Noel, F. (1994) Heterogeneity of ouabain binding sites in *Schistosoma mansoni*. First evidence for the presence of two (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase isoforms in platyhelminths. *Biochem.Pharmacol.*, 47 (2), 331–6.
- 166) Pedemonte, C.H., and Kaplan, J.H. (1990) Chemical modification as an approach to elucidation of sodium pump structure-function relations. *Am. J. Physiol.* 258 (1), 1–23.
- 167) Peng, L., Martin-Vasallo, P., and Sweadner, K.J. (1997) Isoforms of Na,K-ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J. Neurosci.*, 17 (10), 3488–502.
- 168) Periyasamy, S.M., Huang, W.-H., and Askari, A. (1983a) Subunit association of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) – dependent adenosine triphosphatase. Chemical cross-linking studies. *J. Biol. Chem.*, 258 (16), 9878–85.
- 169) Periyasamy, S.M., Huang, W.-H., and Askari, A. (1983b) Origins of the different sensitivities of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-dependent adenosinetriphosphatase preparations to ouabain. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 76 (3), 449–54.
- 170) Petrushanko, I.Y., Bogdanov, N.B., Lapina, N., Boldyrev, A.A., Gassmann, M., and Bogdanova, A.Y. (2007) Oxygen-induced regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells. *J. Gen. Physiol.*, 130 (4), 389–98.
- 171) Petrushanko, I.Y., Mitkevich, V.A., Anashkina, A.A., Klimanova, E.A., Dergousova, E.A., Lopina, O.D., and Makarov, A.A. (2014) Critical role of  $\gamma$ -phosphate in structural transition of Na,K-ATPase upon ATP binding. *Sci. Rep.*, 4, article 5165.
- 172) Petrushanko, I.Y., Yakushev, S., Mitkevich, V.A., Kamanina, Y.V., Ziganshin, R.H., Meng, X., Anashkina, A.A., Makhro, A., Lopina, O.D., Gassmann, M., Makarov, A.A., and Bogdanova, A. (2012) S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic  $\alpha$  subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. *J. Biol. Chem.*, 287 (38), 32195–205.
- 173) Petrushanko, I.Yu., Mitkevich, V.A., Lakunina, V.A., Anashkina, A.A., Spirin, P.V., Rubtsov, P.M., Prassolov, V.S., Bogdanov, N.B., Hänggi, P., Fuller, W., Makarov, A.A., and Bogdanova, A. (2017) Cysteine residues 244 and 458–459 within the catalytic subunit of Na,K-ATPase control the enzyme's hydrolytic and signaling function under hypoxic conditions. *Redox Biology*.13, 310–319.
- 174) Pierelli, F., Grieco, G.S., Pauri, F., Pirro, C., Fiermonte, G., Ambrosini, A., Costa, A., Buzzi, M.G., Valoppi, M., Caltagirone, C., Nappi, G., and Santorelli, F.M. (2006) A novel ATP1A2 mutation in a family with FHM type II. *Cephalalgia*, 26 (3), 324–8.

- 175) Pierre, S.V., and Xie, Z. (2006) The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. *Cell Biochem. Biophys.*, 46 (3), 303–16.
- 176) Pirkkala, L, Nykanen, P., and Sistonen, L. (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.*, 15 (7), 1118–31.
- 177) Pockley, A.G., Henderson, B., and Multhoff, G. (2014) Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease. *Biochem. Soc. Trans.*, 42 (6), 1744–51.
- 178) Post, R.L., and Kume, S. (1973) Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 248 (20), 6993–7000.
- 179) Prassas, I., and Diamandis, E.P. (2008) Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7 (11), 926–35.
- 180) Pressley, T.A. (1996) Structure and function of Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner Electrolyte Metab.*, 22 (5-6), 264–71.
- 181) Pu, H.X., Cluzeaud, F., Goldshleger, R., Karlsh, S.J., Farman, N., and Blostein, R. (2001) Functional role and immunocytochemical localization of the  $\gamma\alpha$  and  $\gamma\beta$  forms of the Na,K-ATPase  $\gamma$  subunit. *J. Biol. Chem.*, 276 (23), 20370–8.
- 182) Radons, J. (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones*, 21 (3), 379–404.
- 183) Rathbun, W.B., and Betlach, M.V. (1969) Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.*, 28 (1), 436–45.
- 184) Repke, K.R., and Schon, R. (1992) Role of protein conformation changes and transphosphorylations in the function of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -transporting adenosine triphosphatase: an attempt at an integration into the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump mechanism. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 67 (1), 31–78.
- 185) Riordan, M., Sreedharan, R., Wang, S., Thulin, G., Mann, A., Stankewich, M., Van Why, S., Kashgarian, M., and Siegel, N.J. (2005) HSP70 binding modulates detachment of Na-K-ATPase following energy deprivation in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 288 (6), F1236–42.
- 186) Rokutan, K., Thomas, J.A., and Johnston, R.B. Jr. (1991) Phagocytosis and stimulation of the respiratory burst by phorbol diester initiate S-thiolation of specific proteins in macrophages. *J. Immunol.*, 147 (1), 260–4.
- 187) Rossier, B.C., Geering, K., and Kraehenbuhl, J.P. (1987) Regulation of the sodium pump: how and why? *TIBS*, 12, 483–487.
- 188) Rubtsov, A.M., and Lopina, O.D. (2000) Ankyrins. *FEBS Lett.*, 482 (1-2), 1–5.

- 189) Ruete, M.C., Carrizo, L.C., and Valles, P.G. (2008) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase stabilization by Hsp70 in the outer stripe of the outer medulla in rats during recovery from a low-protein diet. *Cell Stress Chaperones*. 13 (2), 157–67.
- 190) Ruiz, A., Bhat, S.P., and Bok, D. (1995) Characterization and quantification of full-length and truncated Na,K-ATPase  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 1 RNA transcripts expressed in human retinal pigment epithelium. *Gene*, 155 (2), 179–84.
- 191) Russo, J.J., and Sweadner, K.J. (1993) Na(+)-K(+)-ATPase subunit isoform pattern modification by mitogenic insulin concentration in 3T3-L1 preadipocytes. *Am. J. Physiol.*, 264 (2 Pt 1), C311–6.
- 192) Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (11), 1191–212.
- 193) Scheiner-Bobis, G. (2002) The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.*, 269(10), 2424–33.
- 194) Scheiner-Bobis, G., and Farley, R.A. (1994) Subunit requirements for expression of functional sodium pumps in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1193 (2), 226–34.
- 195) Schneider, B.G., and Kraig, E. (1990) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase of the photoreceptor: selective expression of  $\alpha$ 3 and  $\beta$ 2 isoforms. *Exp. Eye. Res.*, 51 (5), 553–64.
- 196) Schneider, B.G., Shyjan, A.W., and Levenson, R. (1991) Co-localization and polarized distribution of Na,K-ATPase  $\alpha$ 3 and  $\beta$ 2 subunits in photoreceptor cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 39 (4), 507–17.
- 197) Schoner, W. (2002) Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur. J. Biochem.*, 269, 2440–48
- 198) Seres, T., Ravichandran, V., Moriguchi, T., Rokutan, K., Thomas, J.A., and Johnston, R.B. Jr. (1996) Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress. *J. Immunol.* 156 (5), 1973–80.
- 199) Shamraj, O.I., and Lingrel, J.B. (1994) A putative fourth Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91 (26), 12952–6.
- 200) Sharma, S.K., De los Rios, P., Christen, P., Lustig, A., Goloubinoff, P. (2010) The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. *Nat. Chem. Biol.*, 6 (12), 914–20.
- 201) Shi, H.G., Mikhaylova, L., Zchittella, A.E., and Arguello, J.M. (2000) Functional role of cysteine residues in the Na,K-ATPase  $\alpha$  subunit. *Biochim. Biophys. Acta*, 1464 (2), 177-187.

- 202) Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4Å resolution. *Nature*, 459 (7245), 446–50.
- 203) Shorina, E.A., Dolgova, N.V., Rubtsov, A.M., Storey, K.B., and Lopina, O.D. (2004) Melittin induces both time-dependent aggregation and inhibition of Na,K-ATPase from duck salt glands however these two processes appear to occur independently. *Biochim. Biophys. Acta*, 1661 (2), 188–95.
- 204) Shortle, D., and Ackerman, M.S. (2001) Persistence of native-like topology in denaturated protein in 8 M urea. *Science*, 293 (5529), 487–9.
- 205) Shyjan, A.W., Gottardi, C., and Levenson, R., (1990) The Na,K-ATPase  $\beta$  subunit is expressed in rat brain and copurifies with Na,K-ATPase activity. *J. Biol. Chem.*, 265 (9), 5166–9.
- 206) Sies, H., and Jones, D. (2007) Oxidative stress. In: *Encyclopedia of stress*, 2<sup>nd</sup> edition, edited by Fink G. Elsevier, Academic. Press, 3, 45–48.
- 207) Skou, J.C. (1962) Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na ions and K ions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 58, 314–25.
- 208) Skou, J.C., and Esmann, M. (1992) The Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 24 (3), 249–61.
- 209) Smith, T.W. (1988) Purification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from the supraorbital salt gland of the duck. *Methods Enzymol.*, 156, 46–8.
- 210) Srinivasan, V., Pierik, A.J., and Lill, R. (2014) Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science*, 343 (6175), 1137–40.
- 211) Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., Radicioni, S.M., and Mosser, D.D. (2005) Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.*, 280 (46), 38729–39.
- 212) Stephanou, A., and Latchman, D.S. (2005) Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors*, 23 (3), 177–82.
- 213) Stone, R.L., and Dixon, J.E. (1994) Protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 269 (50), 31323–6.
- 214) Sweadner, K.J. (1979) Two molecular forms of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J. Biol. Chem.*, 254 (13), 6060–7.
- 215) Sweadner, K.J. (1985) Enzymatic properties of separated isozymes of the Na,K-ATPase. Substrate affinities, kinetic cooperativity, and ion transport stoichiometry. *J. Biol. Chem.*, 260 (21), 11508–13.

- 216) Sweadner, K.J. (1989) Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 988 (2), 185–220.
- 217) Sweadner, K.J. (1991) Overview: subunit diversity in the Na,K-ATPase. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 46, 63–76.
- 218) Sweadner, K.J., and Rael, E. (2000) The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics*, 68, 41–56.
- 219) Sweadner, K.J., Herrera, V.L., Amato, S., Moellmann, A., Gibbons, D.K., and Repke, K.R. (1994) Immunologic identification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isoforms in myocardium. Isoform change in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Circ. Res.*, 74 (4), 669–78.
- 220) Therien, A.G., Goldshleger, R., Karlsh, S.J., and Blostein, R. (1997) Tissue-specific distribution and modulatory role of the  $\gamma$  subunit of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 272 (51), 32628–34.
- 221) Therien, A.G., Karlsh, S.J., and Blostein, R. (1999) Expression and functional role of the  $\gamma$  subunit of the Na,K-ATPase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 274 (18), 12252–6.
- 222) Tian, J., Cai, T., Yuan, Z., Wang, H., Liu, L., Haas, M., Maksimova, E., Huang, X.-Y., and Xie, Z.-J. (2006) Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol. Biol. Cell*, 17 (1), 317–26.
- 223) Torielli, L., Tivodar, S., Montella, R.C., Iacone, R., Padoani, G., Tarsini, P., Russo, O., Sarnataro, D., Strazzullo, P., Ferrari, P., Bianchi, G., and Zurzolo, C. (2008)  $\alpha$ -Adducin mutations increase Na/K pump activity in renal cells by affecting constitutive endocytosis: implications for tubular Na reabsorption. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 295 (2), F478–87.
- 224) Toyoshima, C., Kanai, R., and Cornelius, F. (2011) First crystal structures of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Structure*, 19 (12), 1732–8.
- 225) Tsakiris, S., Schulpis, K.H., Marinou, K., and Behrakis, P. (2004) Protective effect of L-cysteine and glutathione on the modulated suckling rat brain Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities induced by the in vitro galactosaemia. *Pharmacol. Res.*, 49 (5), 475–9.
- 226) Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 552 (Pt 2), 335–44.
- 227) Urayama, O., and Sweadner, K.J. (1988) Ouabain sensitivity of the  $\alpha$ 3 isozyme of rat Na,K-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156 (2), 796–800.
- 228) Vasilets, L.A., and Schwarz, W. (1993) Structure-function relationships of cation binding in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1154 (2), 201–22.

- 229) Venugopal, J., and Blanco, G. (2016) Ouabain enhances ADPKD cell apoptosis via the intrinsic pathway. *Front., Physiol.*, 7, article 107.
- 230) Wang, H., Haas, M., Liang, M., Cai, T., Tian, J., Li, S., and Xie, Z. (2004) Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 279 (17), 17250–9.
- 231) Wang, J., Boja, E.S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H.M., English, S., Mieyal, J.J., and Chock, P.B. (2001) Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.*, 276 (51), 47763–6.
- 232) Ward, N.E., Pierce, D.S., Chung, S.E., Gravitt, K.R., and O`Brian, C.A. (1998) Irreversible inactivation of protein kinase C by glutathione. *J. Biol. Chem.*, 273 (20), 12558–66.
- 233) Ward, N.E., Stewart, J.R., Ioannides, C.G., and O`Brian, C.A. (2000) Oxidant-induced S-glutathiolation inactivates protein kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ): a potential mechanism of PKC isozyme regulation. *Biochemistry*, 39 (33), 10319–29.
- 234) Weigand, K.M., Swarts, H.G., Fedosova, N.U., Russel, F.G., and Koenderink, J.B. (2012) Na,K-ATPase activity modulates Src activation: a role for ATP/ADP ratio. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818 (5), 1269–73.
- 235) Winter, C.G. (1978) Tryptic inactivation of the ouabain binding site of canine kidney Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and its effect on catalytic function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2), 474–81.
- 236) Xie, Z., and Askari, A. (2002) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.*, 269 (10), 2434–9.
- 237) Xie, Z., Jack-Hays, M., Wang, Y., Periyasamy, S.M., Blanco, G., Huang, W.H., and Askari, A. (1995) Different oxidant sensitivities of the  $\alpha 1$  and  $\alpha$  isoforms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expressed in baculovirus-infected insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207 (1), 155–9.
- 238) Yakushev, S., Band, M., Tissot van Patot, M.C., Gassmann, M., Aviv, A., and Bogdanova, A. (2012) Cross talk between S-nitrosylation and S-glutathionylation in control of the Na,K-ATPase regulation in hypoxic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 303 (11), H1332–43.
- 239) Yang, S., Zhang, X.M., and Jiang, M.H. (2001) Inhibitory effect of melittin on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from guinea pig myocardial mitochondria. *Acta Pharmacol. Sin.*, 22 (3), 279–82.
- 240) Yang, X., Wang, J., Zhou, Y., Wang, Y., Wang, S., and Zhang, W. (2012) Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.*, 321 (2), 137–43.

- 241) Yosef, E., Katz, A., Peleg, Y., Mehlman, T., and Karlish, S.J. (2016) Do Src kinase and caveolin interact directly with Na,K-ATPase? *J. Biol. Chem.*, 291 (22), 11736–50.
- 242) Yu, J., and Zhou, C.Z. (2007) Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins*, 68 (4), 972–9.
- 243) Yudowski, G.A., Efendiev, R., Pedemonte, C.H., Katz, A.I., Berggren, P.O., and Bertorello, A.M. (2000) Phosphoinositide-2-kinase binds to a proline-rich motif in the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit and regulates its trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97 (12), 6556–61.
- 244) Zhang, J., Lee, M.Y., Cavalli, M., Chen, L., Berra-Romani, R., Balke, C.W., Bianchi, G., Ferrari, P., Hamlyn, J.M., Iwamoto, T., Lingrel, J.B., Matteson, D.R., Wier, W.G., and Blaustein, M.P. (2005) Sodium pump  $\alpha$ 2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. *J. Physiol.*, 569 (Pt 1), 243–56.
- 245) Zhang, L., Zhang, Z., Guo, H., and Wang, Y. (2008) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase regulation. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 22 (6), 615–21.
- 246) Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., and Hendrickson, W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272 (5268), 1606–14.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 3. Пептиды, содержащие остатки цистеина, детектированные методом тандемной масс-спектрометрии MALDI-TOF MS в контрольном (исходно глутатионилированном) образце Na,K-АТФазы из солевых желёз утки.

Сус №	Триптический фрагмент	Последовательность фрагмента	Экспериментальное значение m/z	Расчитанное значение m/z	Модификация цистеина
140	123-148	DNLYLGIVLAAVVIITGCFSYYQEAK	3168,742	3168,563	SG
206	200-207	IISAHGCK	1133,508	1133,384	SG
	200-207	IISAHGCK	828,44	828,349	SH
	200-222	IISAHGCKVDNSSLTGESEPTQR	2429,173	2428,803	SH
244	223-250	SPDFSNENPLETRNIAFFSTNCVEGTAR	3132,433	3131,83	SOH
	223-250	SPDFSNENPLETRNIAFFSTNCVEGTAR	3116,438	3115,842	SH
	236-250	NIAFFSTNCVEGTAR	1661,759	1661,531	SO <sub>2</sub> H
	236-250	NIAFFSTNCVEGTAR	1629,769	1629,557	SH
351	346-354	MARKNCLVK	1091,581	1091,431	SNO
	346-354	MARKNCLVK	1062,591	1062,407	SH
	349-372	KNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDK	2874,353	2874,865	SOH, SG
	349-372	KNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDK	2890,348	2889,819	SG, SO <sub>2</sub> H
	349-354	KNCLVK	736,402	736,271	SO <sub>2</sub> H
	350-372	NCLVKNLEAVETLGSTSTICSDK	2486,175	2485,812	SO <sub>2</sub> H, SNO
369	355-372	NLEAVETLGSTSTICSDK	1867,895	1867,631	SH
	360-385	NLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNR	2739,347	2738,916	SH
423	419-425	VAGLCNR	732,382	732,304	SH
454, 458, 459	440-463	RAVAGDASESALLKCIELCCGSVK	2455,199	2454,809	SO <sub>2</sub> H
	441-463	AVAGDASESALLKCIELCCGSVK	2331,088	2330,795	SO <sub>2</sub> H, SO <sub>2</sub> H
	454-466	CIELCCGSVKEMR	1388,531	1388,496	SG, SNO
	454-466	CIELCCGSVKEMR	1820,71	1820,604	SG, SNO, SOH
	454-468	CIELCCGSVKEMRER	1851,77	1851,66	SO <sub>2</sub> H, SO <sub>2</sub> H, SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1388,531	1388,496	SG, SNO
	459-471	CIELCCGSVKEMR	1836,705	1836,759	SO <sub>2</sub> H, SNO, SG
	459-473	CIELCCGSVKEMRER	1829,776	1829,687	SNO, SOH, SNO
	459-471	CIELCCGSVKEMR	1820,71	1820,604	SG, SOH, SNO
	459-468	CIELCCGSVK	1118,453	1118,422	SO <sub>2</sub> H, SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1086,463	1086,444	SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1102,458	1102,469	SOH, SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1086,463	1086,444	SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1102,458	1102,469	SO <sub>2</sub> H, SOH

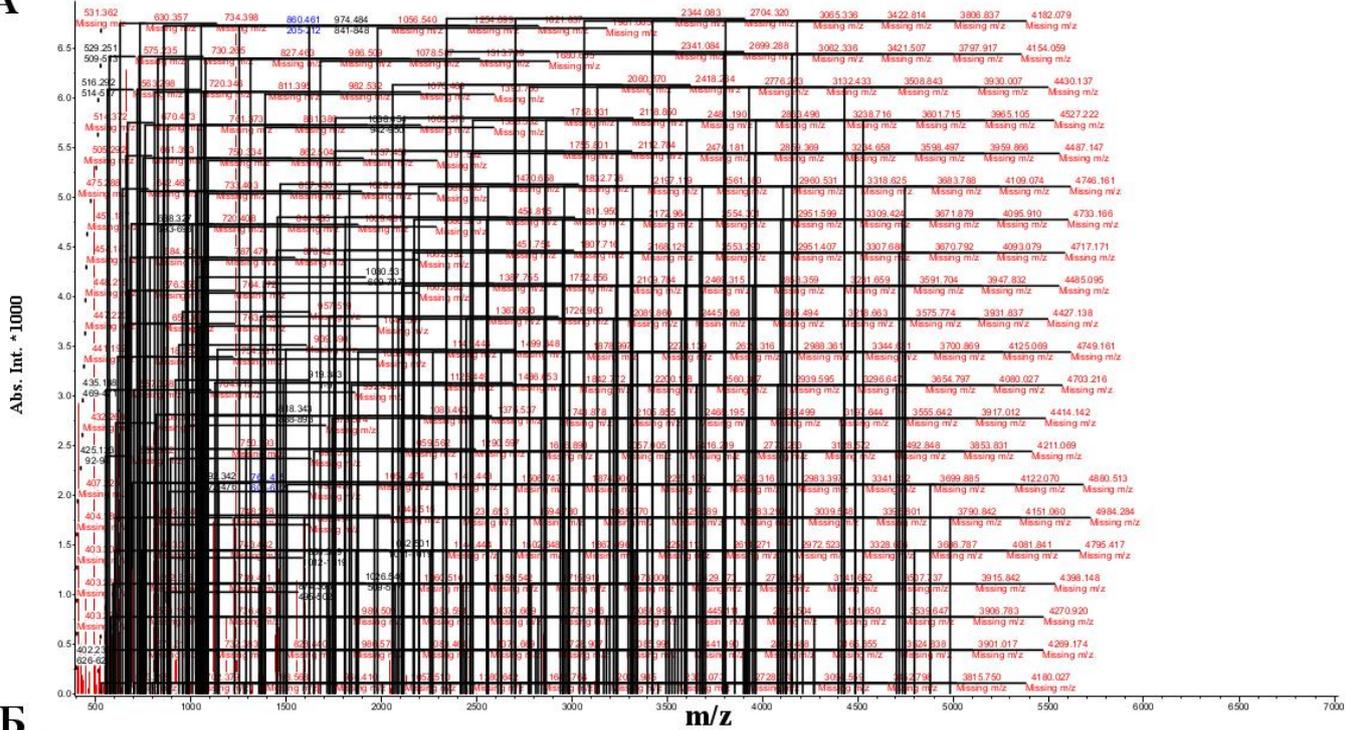
Сус №	Триптический фрагмент	Последовательность фрагмента	Экспериментальное значение m/z	Рассчитанное значение m/z	Модификация цистеина
454, 458, 459	459-468	CIELCCGSVK	1118,453	1118,422	SO <sub>2</sub> H, SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1054,473	1054,38	SH, SH, SH
	459-468	CIELCCGSVK	1086,463	1086,444	SO <sub>2</sub> H, SH, SH
	459-468	CIELCCGSVK	1131,448	1131,376	SOH, SO <sub>2</sub> H, SNO
	459-468	CIELCCGSVK	1141,443	1141,359	SNO, SNO, SNO
513	509-521	ILDRCSSILLHGK	1454,815	1454,622	SH
	513-521	CSSILLHGK	1262,587	1262,492	SG
	513-521	CSSILLHGK	957,519	957,403	SH
601	594-602	AAVPDAVGKCR	1102,567	1102,469	SOH
	594-612	AAVPDAVGKCRSAGIK	1558,837	1558,98	SOH
	592-602	AAVPDAVGKCR	1086,444	1086,572	SH
	592-602	AAVPDAVGKCR	1118,422	1118,562	SO <sub>2</sub> H
	601-607	CRSAGIK	766,388	766,362	SO <sub>2</sub> H
658	657-687	ACVVHGSCLKDMTSEQLDDILMHHTEI VFAR	3510,681	3510,026	SH
	657-687	ACVVHGSCLKDMTSEQLDDILMHHTEI VFAR	3542,671	3542,008	SO <sub>2</sub> H
700	688-701	TSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGV NDSPALK	3524,838	3525,008	SO <sub>2</sub> H
	694-702	LIIVEGCQR	1062,561	1062,407	SO <sub>2</sub> H
	694-702	LIIVEGCQR	1030,447	1030,571	SH
	694-702	LIIVEGCQR	1046,566	1046,377	SOH

Таблица 4. Пептиды, содержащие остатки цистеина, детектированные методом тандемной масс-спектрометрии MALDI-TOF MS в частично деглутатионированном образце Na,K-АТФазы из солевых желёз утки.

Сус №	Триптический фрагмент	Последовательность фрагмента	Экспериментальное значение m/z	Рассчитанное значение m/z	Модификация цистеина
140	123-151	DNLYLGIVLAAVVITGCFSYQEAQSS K	3194,644	3194,998	SNO
206	194-207	IPADLRISAHGCK	1493,826	1493,614	SH
	200-222	IISAHGCKVDNSSLTGESEPTQR	2429,173	2428,99	SH
244	223-250	SPDFSNENPLETRNIAFFSTNCVEGTAR	3116,023	3116,438	SH
	236-250	NIAFFSNVCVEGTAR	1661,759	1661,628	SO <sub>2</sub> H
	236-250	NIAFFSTNCVEGTAR	1629,648	1629,769	SH
351	346-354	MARNCLVK	1091,581	1091,475	SNO
	346-354	MARNCLVK	1062,591	1062,497	SH
369	355-372	NLEAVETLGSTSTICSDK	1867,895	1867,719	SH
	360-385	NLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNR	2739,347	2739,05	SH

Сус №	Триптический фрагмент	Последовательность фрагмента	Экспериментальное значение m/z	Рассчитанное значение m/z	Модификация цистеина
423	419-425	VAGLCNR	732,382	732,343	SH
454, 458, 459	440-463	RAVAGDASESALLKCIELCCGSVK	2486,996	2487,189	SO <sub>2</sub> H, SO <sub>2</sub> H
	440-463	RAVAGDASESALLKCIELCCGSVK	2455,199	2454,963	SO <sub>2</sub> H
	441-463	AVAGDASESALLKCIELCCGSVK	2877,244	2877,008	SG, SG
	441-463	AVAGDASESALLKCIELCCGSVK	2331,088	2330,923	SO <sub>2</sub> H, SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1388,531	1388,615	SG, SNO
	459-473	CIELCCGSVKEMRER	1829,776	1829,786	SNO, SOH, SNO
	459-468	CIELCCGSVK	1118,453	1118,474	SO <sub>2</sub> H, SO <sup>2</sup> H
	459-468	CIELCCGSVK	1086,463	1086,501	SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1102,458	1102,533	SOH, SO <sub>2</sub> H
	459-468	CIELCCGSVK	1054,473	1054,443	SH, SH, SH
	454-466	CIELCCGSVKEMR	1557,628	1557,607	SNO, SNO, SNO
513	509-530	ILDRCSSILLHGKEQPLDEEMK	2859,369	2859,069	SG
	509-521	ILDRCSSILLHGK	1454,815	1454,69	SH
	513-521	CSSILLHGK	1262,587	1262,55	SG
	513-521	CSSILLHGK	957,519	957,467	SH
601	594-602	AAVPDAVGKCR	1102,567	1102,533	SOH
	592-607	AAVPDAVGKCRSAGIK	1558,837	1559,116	SOH
	592-602	AAVPDAVGKCR	1086,572	1086,501	SH
	592-602	AAVPDAVGKCR	1118,474	1118,562	SO <sub>2</sub> H
	601-607	CRSAGIK	766,388	766,406	SO <sub>2</sub> H
658	654-606	DAKACVVHGSDLK	1647,747	1647,648	SG
	657-687	ACVVHGSDLKDMTSEQLDDILMHHTEIFAR	3510,681	3510,235	SH
700	688-702	TSPQQKLIIVEGCQR	1715,911	1715,665	SOH
	694-702	LIIVEGCQR	1062,561	1062,497	SO <sub>2</sub> H
700	694-702	LIIVEGCQR	1030,571	1030,499	SH
700	694-702	LIIVEGCQR	1046,566	1046,456	SOH
700	694-721	LIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALK	2852,493	2852,038	SNO

**А**



**Б**

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGKGAGRDKY	EPTATSEHGA	KKKKGAKVER	DMDELKKEVS	MDDHKLSDLDE	LHRKYGTDLs	RGLTTARAAE	ILARDGPNTL	TPPPTPEWV	KFCRQLFGGF
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
LLLLWIGAIL	CFLAYGIQSV	MEEEPKNDNL	YLGIVLAAVV	IITGCFsYyQ	EAKSSKIMES	FKNMVPPQAL	VVRNGEKMSI	NAEGVVVVDL	VEVKGGRDIP
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ADLRiISAHG	CKVDNSLTG	ESEFQTRSPD	FSNENPLETR	NIAFFSTNCV	EGTARGIVIR	TGDRVTVMGRI	ASLASGLEGG	KTPiAMEIEH	FIHLITGVAV
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
FLGVSFFILs	LILEYTWLEA	VIFLIGIIVA	NVPEGLLATV	TVCLTLTAKR	MARKNCLVKN	LEAVETLGS	STICSDKTGT	LTQNRMTVAH	MWFDNIHEA
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
DTEENOSGAS	FDKSSATWTA	LSRVAGLCNR	AVFQANQENV	PILKRAVGD	ASESALLKCI	ELCCGSVKEM	RERYPKVVEI	PFNSTNKYQL	SIHKNAIPSE
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
SRYLVMKGA	PERILDRCSS	ILLHGKEQPL	DEEMKDAFQN	AYLELGLLGE	RVLGFCHEAL	PDDQFPEGFQ	FDTEVFNFPV	DKLCFVGLMS	MIDPPRAAVP
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
DAVGKCRSAG	IKVIMVTGDH	PITAKAIAGK	VGIISEGNET	VEDIAARLNI	PVSQVNPBDA	KACVVHGSDDL	KDMTSEQLDD	ILMHHTEIFV	ARTSPQOKLI
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
IVEGQQRQGA	IVAVTGDGVN	DSPALKKADI	GVAMGISGSD	VSKQAADMIL	LDDNFASIVT	GVEEGRLLFD	NLKKSIAYTL	TSNIPEITPF	LIFIVANIPL
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
PLGTVTILCI	DLGTDMPVAI	SLAYEQAESD	IMKRQPRNPK	TDKLVNERLI	SMAYGQIGMI	QALGGFFTYF	VIMAENGFWP	SGLLGIKRVQW	DDRINDVED
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
SYGQQWYEQ	RKIVEFTCHT	AFFVSIIVVQ	WADLIICKTR	RNSVFQQGMK	NKILIFGLFE	ETALAAFLSY	CPGMQVALRM	YPLKPTWWFC	AFPYSLLIFL
1010	1020	1030							
YDEIRKLIIR	RNPGGWVEKE	TYV							

Рис. 42. Пример данных, полученных при анализе модификаций  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы методом тандемной масс-спектрометрии MALDI-TOF MS (получение пептидов методом трипсинолиза в геле). А – спектр триптических фрагментов  $\alpha$ 1-субъединицы; Б – наложение полученных пептидов на последовательность  $\alpha$ 1-субъединицы (покрытие 38,1 %).

## Благодарности

Выражаю особую благодарность моему научному руководителю, доктору биологических наук, профессору Лопиной Ольге Дмитриевне за внимание, поддержку и неоценимую помощь в выполнении данной работы.

Благодарю кандидата физико-математических наук Петрушанко Ирину Юрьевну за помощь в постановке экспериментов, обсуждении и анализе полученных результатов.

Благодарю кандидатов химических наук Зиганшина Рустама Хусмановича и Митькевича Владимира Александровича за сотрудничество и помощь при выполнении работы.

Благодарю заведующего кафедрой, доктора биологических наук, член-корр. РАН, профессора Гусева Николая Борисовича за отзывчивость и помощь в моей работе, а также всех коллег и сотрудников кафедры биохимии за внимание и поддержку. И хочу выразить отдельную благодарность преподавателям МГУ за те знания и навыки, которые я получила за время обучения.