

На правах рукописи

Дергоусова Елена Александровна

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ α 1-СУБЪЕДИНИЦЫ Na,K-АТРАЗЫ НА
СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА

03.01.04 Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена на кафедре биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» и в лаборатории конформационной стабильности белков и физических методов анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Лопина Ольга Дмитриевна

Официальные оппоненты: **Медведев Алексей Евгеньевич**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
заведующий лабораторией фармакопротеомики.

Меньшиков Михаил Юрьевич
доктор биологических наук, Федеральное
государственное бюджетное учреждение
Национальный медицинский исследовательский
центр кардиологии Министерства
здравоохранения Российской Федерации, ведущий
научный сотрудник лаборатории ангиогенеза.

Ведущая организация: **Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Российский университет дружбы
народов»**

Защита диссертации состоится « » _____ 2018 года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Na,K-АТРаза (Na,K-зависимая, Mg-активируемая аденозинтрифосфогидролаза, Na-насос) представляет собой трансмембранный гетероолигомерный фермент, осуществляющий перенос ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану против электрохимического градиента. Функциональная единица Na,K-АТРаза состоит из двух полипептидных цепей – каталитической α - и регуляторной β -субъединиц. В некоторых тканях присутствует третья субъединица (γ), относящаяся к семейству белков FXYD и выполняющая регуляторную функцию. Фермент относится к АТРазам Р-типа, и каждая его субъединица представлена несколькими тканеспецифичными изоформами. В процессе каталитического акта происходит циклическая смена различных конформаций Na,K-АТРаза, две из которых, E1 (индуцируемая связыванием ионов Na^+) и E2 (индуцируемая связыванием ионов K^+), являются основными.

В клетках животных Na,K-АТРаза участвует в поддержании потенциала на мембране, отвечает за регуляцию клеточного объёма; обеспечивает сопряжённый с переносом натрия транспорт ряда химических соединений и ионов. Недавно обнаружено, что Na,K-АТРаза, являясь рецептором биологически активных соединений, кардиостероидов, участвует в инициации ряда сигнальных каскадов. При взаимодействии α -субъединицы фермента с кардиотоническим стероидом убаином активность Na,K-АТРаза подавляется, но при этом она получает возможность связываться с белками-партнёрами, что в свою очередь приводит к инициации ряда сигнальных каскадов [Schoner, W., 2002].

Регуляция функции Na,K-АТРаза осуществляется за счёт различных посттрансляционных модификаций, в частности, фосфорилирования. Установлено также, что цистеиновые остатки α -субъединицы Na,K-АТРаза (которых в $\alpha 1$ -изоформе 23, причем 15 из них экспонированы в цитоплазму) могут подвергаться таким модификациям, как окислению до $-\text{SOH}$, $-\text{SO}_2\text{H}$ и $-\text{SO}_3\text{H}$, а также нитрозилированию и глутатионилированию. Глутатионилирование происходит неферментативно за счет образования S-S связи между SH-группой цистеинового остатка белка и трипептидом глутатионом.

Глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин, GSH) является одним из естественных внутриклеточных антиоксидантов. В клетке его концентрация может достигать 10 мМ. При окислении глутатиона между двумя молекулами трипептида образуется S-S связь с формированием гексапептида (окисленного глутатиона, GSSG). В условиях окислительного стресса GSSG способен вступать в реакцию с восстановленными SH-группами молекул белков, глутатионируя их. Это часто

Список сокращений: АТФ – аденозинтрифосфат; ECL – метод визуализации конъюгированных с пероксидазой хрена антител с помощью хемилюминисценции; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; MALDI-TOF MS – матрично-активированная десорбция/ионизация-времяпролётная tandemная масс-спектрометрия; NADPH – никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный; PVDF – поливинилиденфторид; SDS – додецилсульфат натрия; TCEP – трис-2-карбоксиэтилфосфин; БСА – бычий сывороточный альбумин; ДТТ – дитиотреитол; ИКТ – изотермическая калориметрия титрования; β -МЭ – β -меркаптоэтанол; ПААГ – полиакриламидный гель.

приводит к физиологически обратимому ингибированию ферментов (в клетках связанный с SH-группой белка глутатион удаляется при помощи системы сопряженных ферментов – глутаредоксина и глутатионредуктазы). Помимо этого такая модификация защищает SH-группы белка от необратимого окисления.

Установлено, что значительное количество белков в клетке даже при нормальном окислительно-восстановительном потенциале содержат связанный глутатион (так называемое, исходное глутатионилирование), к таким белкам относится и Na,K-АТРаза. Функциональное значение как исходного, так и дополнительного глутатионилирования остатков цистеина α -субъединицы Na,K-АТРаза ещё недостаточно изучено.

Цель работы - выявить влияние исходного и дополнительного глутатионилирования α 1-субъединицы на функции Na,K-АТРаза.

Задачи исследования:

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

Научная новизна. Полученные в ходе исследований результаты расширяют существующие представления о роли глутатионилирования α 1-субъединицы Na,K-АТРаза. Впервые показано, что *in vitro* при использовании сильных химических восстановителей невозможно полностью удалить глутатион, связанный с α 1-субъединицей Na,K-АТРаза, как с нативного, так и денатурированного фермента. Частично деглутатионилированный препарат Na,K-АТРаза в большей степени подвержен трипсинолизу, чем фермент, имеющий исходное глутатионилирование, который выделяется из тканей с нормальным окислительно-восстановительным состоянием. Установлено, что трипсинолиз α 1-субъединицы Na,K-АТРаза, связанной с кардиотоническим стероидом убаином, осуществляется быстрее, чем трипсинолиз фермента в присутствии ионов Na^+ и K^+ . Впервые показана зависимость степени дополнительного глутатионилирования от конформации фермента. Установлено также, что глутатионилирование α 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-АТРаза 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-АТРаза 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, а также эксперименты по связыванию Na,K-АТРазы с убаином и Hsp70 методом изотермической калориметрии титрования (ИКТ). Автором была проведена обработка экспериментальных данных и подготовка 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 желёз 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 Na,K-АТРазы по сравнению с таковым, происходящим с E1- и E2-конформациями.
4. Степень глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы 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: 10th International Congress «Cell Volume Regulation: Novel Therapeutic Targets & Pharmacological Approaches» (Россия, Москва, 2013); 14th 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.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из 131 страницы, содержит 42 рисунка и 3 таблицы. Диссертационная работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы (246 источников) и приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении описана актуальность данной работы, указаны цели и задачи исследования. Глава 1 представляет собой Обзор литературы. В ней рассмотрены

структура и ферментативные свойства Na,K-АТФазы, её взаимодействие с лигандами и белками-партнёрами, способы регуляции её активности, а также эффекты, вызванные связыванием кардиотонических стероидов. Обсуждаются данные о роли глутатиона в клетке в нормальных физиологических условиях и в состоянии окислительного стресса, а также механизмы глутатионилирования белков, в том числе Na,K-АТФазы. В Главе 2 описаны Методы исследования, схемы постановки экспериментов, а также приведён список использованных реактивов. В Главе 3 изложены основные результаты и их обсуждение, в конце работы приведены Выводы, а также список цитируемой литературы и Приложение.

Материалы и методы исследования.

Для получения очищенного препарата Na,K-АТФазы из солевых желёз утки был использован метод выделения, описанный Смитом и соавторами [Hopkins, В.Е., et al., 1976; Smith, T.W., 1988]. Количественное содержание белка в препаратах оценивали методом Лоури и соавторов [Lowry, О.Н., et al., 1951], ферментативную активность измеряли по освобождению неорганического фосфата, концентрацию которого определяли по модифицированному методу Ратбуна и Бетлах [Rathbun, W.B., and Betlach, M.V., 1969]. Белки препарата Na,K-АТФазы разделяли методом одномерного электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ) по методу Леммли [Laemmli, U.K., 1970]. После проведения электрофореза белки окрашивали с использованием Кумасси бриллиантового голубого. Степень глутатионилирования препаратов оценивали после электропереноса белков с геля на PVDF мембрану (иммуноблоттинг) путем окрашивания первичными антителами против α 1-субъединицы Na,K-АТФазы (clone C464.6, фирмы «Millipore») и антителами против связанного с белком глутатиона (mouse anti-glutathione monoclonal antibody, «Millipore»). Другие модификации SH-групп цистеиновых остатков (окисление и нитрозилирование) анализировали, окрашивая мембраны следующими антителами: anti-S-nitroso-Cys (против -SNO) фирмы «Alpha diagnostic international»; anti-cysteine sulfenic acid (против -SOH), «Millipore»; cysteine (sulfonate), pAb (против -SOH+-SO₂H+-SO₃H), «Enzo». Далее мембраны инкубировали во вторичных антителах, конъюгированных с пероксидазой хрена: goat anti-mouse IgG, H+L, «Millipore» и monoclonal anti-rabbit IgG, clone RG-96, «Sigma». Визуализацию проводили методом усиленной хемилюминисценции (ECL). Денситометрические расчёты были сделаны с помощью программы Image Lab™ Software, Version 3.0. Масс-спектрометрические данные анализировали при помощи программ Bruker Daltonics Flex Analysis 2.4 software и Bruker Daltonics BioTools 3.0 software. Ограниченный трипсинолиз Na,K-АТФазы проводили по схеме, описанной в работах Йоргенсена [Jorgensen, P.L., and Collins, J.H., 1986; Jorgensen, P.L., and Andersen, J.P., 1988] и в работах других исследователей [Castro, J., and Farley, R.A., 1979; Winter, C.G., 1978; Mahmmoud, Y.A., 2005]. Результаты ограниченного трипсинолиза анализировали с использованием метода SDS-ПААГ электрофореза. Интенсивность полос фрагментов α -субъединицы Na,K-АТФазы вычисляли относительно фона, принятого за 0%, с помощью программы gelanalyzer2010a по

формуле: $(I_{\text{фрагмента}} - I_{\text{фона}}) / I_{\text{фона}} \times 100\%$. Термодинамические параметры связывания Na,K-АТРазы с белком теплового шока Hsp70 и с убаином измеряли с помощью метода изотермической калориметрии титрования (ИКТ), кривые титрования анализировали с помощью программы MicroCal Origin 7.0.

Все эксперименты были проведены не менее трех раз на нескольких (2-3) препаратах очищенного фермента. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение.

1. Характеристика препарата Na,K-АТРазы из солевых желёз утки.

В качестве источника Na,K-АТРазы были выбраны солевые железы утки, так как в этой ткани содержится только $\alpha 1$ -изоформа фермента. После выдерживания уток на диете с высоким содержанием NaCl происходит усиление экспрессии Na,K-АТРазы. В результате из солевых желёз можно получить очищенный препарат фермента с высокой активностью. $\alpha 1$ -Субъединица Na,K-АТРазы солевых желез утки имеет высокий процент гомологии с $\alpha 1$ -субъединицей из почек млекопитающих и очень близкие кинетические характеристики. Препараты фермента, использованные в нашей работе, обладали активностью около 2000 мкмоль неорганического фосфата (Pi) на мг белка в час, и характеризовались высокой степенью чистоты (рис. 1).

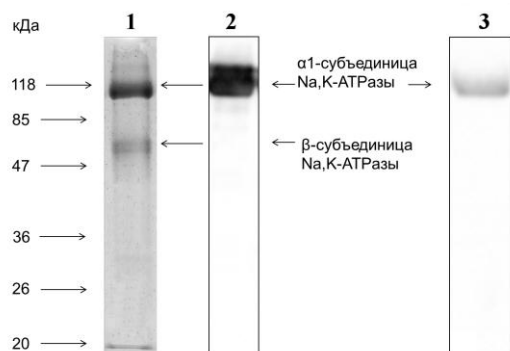


Рис. 1. Характеристика препарата Na,K-АТРазы из солевых желёз утки. 1 – данные SDS-ПААГ электрофореза с окрашиванием белков Кумасси; 2, 3 – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против $\alpha 1$ -субъединицы (2) и связанного глутатиона (3). Визуализация проведена методом ECL.

Путем электропереноса белков препарата Na,K-АТРазы с геля на PVDF мембрану (иммуноблоттинг) с последующим окрашиванием антителами против связанного глутатиона было подтверждено, что $\alpha 1$ -субъединица в полученных препаратах глутатионилирована (рис. 1).

Для изучения функциональной роли глутатионилирования было получено три типа препаратов Na,K-АТРазы: исходно глутатионилированный препарат – фермент, не подвергавшийся обработке ни восстанавливающими агентами, ни глутатионом; дополнительно глутатионилированный препарат, обработанный окисленным глутатионом, и частично деглутатионилированный препарат, обработанный восстанавливающими химическими агентами.

2. Глутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы.

Влияние АТФ на глутатионилирование Na,K-АТРазы и ее активность. При инкубации препарата Na,K-АТРазы с окисленным глутатионом наблюдается

существенное увеличение уровня глутатионилирования ее α -субъединицы. Ранее было обнаружено, что при этом наблюдается снижение активности фермента. Мы установили, что если инкубацию с окисленным глутатионом проводить в присутствии АТР в концентрации от 1 мМ и выше, то активность фермента не снижается, хотя уровень глутатионилирования значительно возрастает (рис. 2). Это свидетельствует в пользу того, что связывание АТР, приводя к конформационным изменениям Na,K-АТРазы [Petrushanko, I.Y., et al., 2014], препятствует глутатионилированию регуляторных остатков цистеина. 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.

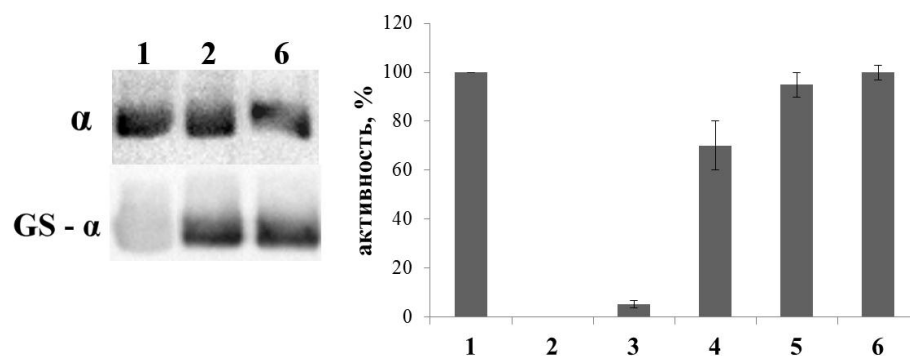


Рис. 2. Глутатионилирование α 1-субъединицы Na,K-АТРазы в присутствии разных концентраций АТР. Слева представлены результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против α 1-субъединицы (α) и антителами против связанного с белком глутатиона (GS- α): контроль (1), инкубация с 1 мМ GSSG (2) и инкубация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

Глутатионилирование α 1-субъединицы Na,K-АТРазы, находящейся в различных конформациях. В ходе каталитического цикла α -субъединица Na,K-АТРазы меняет несколько конформаций, при переходе между которыми в раствор экспонируются разные части молекулы. По этой причине некоторые лиганды, например, ингибитор Na,K-АТРазы убаин, как и белки-партнёры, могут связаться с ферментом только в том случае, когда он находится в определённой конформации. В связи с этим мы исследовали, влияет ли конформация Na,K-АТРазы на глутатионилирование ее α 1-субъединицы.

Для анализа зависимости степени глутатионилирования фермента от его конформации препарат Na,K-АТРазы 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 путем инкубации фермента в буферном растворе, содержащем 3 мМ Pi и 3 мМ MgCl₂. Глутатионилирование Na,K-АТРазы, связанной с убаином, исследовали в конформации E2P с добавлением 0,5 мМ убаина (рис. 3).

Из рис. 3 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 α 1-субъединицы наблюдался в конформации E2P. Это позволяет заключить, что доля экспонированных в раствор цистеиновых остатков α 1-субъединицы в этой конформации минимальна. Связывание убаина не влияет на степень глутатионилирования: в E2P-конформации в присутствии и в отсутствие убаина уровень глутатионилирования практически одинаков и ниже, чем в конформациях E1 и E2.

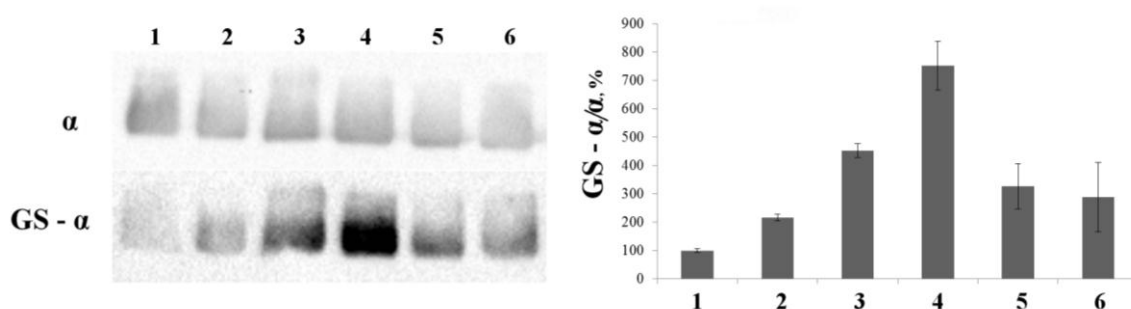


Рис. 3. Глутатионилирование α 1-субъединицы Na,K-АТРазы, находящейся в разных конформациях. Слева – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против α 1-субъединицы (α) и антителами против связанного с белком глутатиона (GS- α). Справа – результаты количественной оценки степени глутатионилирования: отношение интенсивности окрашивания полосы дополнительно глутатионилированной α 1-субъединицы к интенсивности контрольной полосы с нормированием на содержание α 1-субъединицы в полосе (GS- α / α). 1 – контроль (инкубация без GSSG); 2 – 6 – инкубация в присутствии 1 мМ GSSG и: 2 – без добавок; 3 – 150 мМ KCl (E2-конформация); 4 – 150 мМ NaCl (E1-конформация); 5 – 3 мМ Pi и 3 мМ MgCl₂ (E2P-конформация); 6 – 3 мМ Pi, 3 мМ MgCl₂ и 0,5 мМ убаина (конформация E2P-убаин). Представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Таким образом, уровень дополнительного глутатионилирования, наблюдаемого при инкубации фермента с окисленным глутатионом, зависит от его конформации: он является максимальным в E1-конформации, меньшим в E2- и минимальным в E2P-конформации независимо от связывания с этой конформацией убаина. Это хорошо соотносится с тем фактом, что в «открытой» конформации E1 малая и большая цитоплазматические петли α -субъединицы удалены друг от друга, а в «закрытой» конформации E2P они максимально сближены [Shinoda, T., et al., 2009; Petrushanko, I.Y., et al., 2014].

3. Деглутатионилирование α 1-субъединицы Na,K-АТРазы.

Na,K-АТРаза выделяется из различных тканей в состоянии, когда ее α 1-субъединица содержит связанный глутатион. Мы использовали несколько способов удаления глутатиона с Na,K-АТРазы (деглутатионилирования), в

частности, сопряженную ферментативную систему (глутаредоксин/глутатионредуктаза), функционирующую в клетке, и различные химические восстановители.

Деглутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы с использованием ферментативной системы. В клетке деглутатионилирование белков осуществляется при помощи двух сопряженных 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 mM GSH и 0,2 mM NADPH. Результаты представлены на рис. 4.

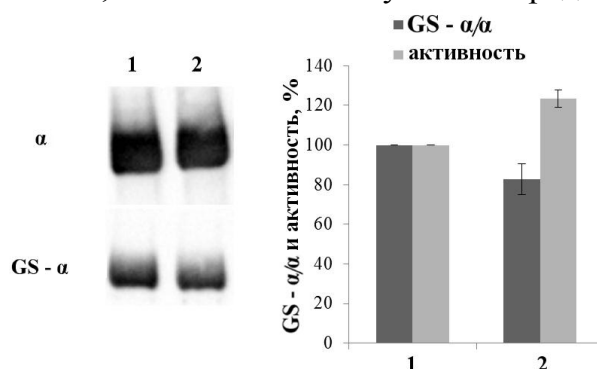


Рис. 4. Деглутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы при помощи ферментативной системы глутаредоксин/глутатионредуктаза. Слева – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против $\alpha 1$ -субъединицы (α) и связанного с белком глутатиона (GS- α). Справа – активность Na,K-АТФазы (серый цвет) в частично деглутатионилированном и контрольном препаратах, а также количественный анализ степени деглутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы (GS- α/α , черный цвет). 1 – контроль; 2 – деглутатионилированный фермент. Представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

При использовании ферментативной системы наблюдалось небольшое снижение степени глутатионилирования (в среднем на 15%), при этом происходило увеличение активности Na,K-АТФазы на 20-30% (с 2000 мкмоль Pi/мг белка в ч до 2500 ± 100 мкмоль Pi/мг белка в ч). Продление времени инкубации Na,K-АТФазы с системой ферментов до 1 ч не привело к увеличению уровня деглутатионилирования фермента. Таким образом, ферментативная система не способна полностью устранить исходное глутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы. Одной из причин может быть то, что часть цистеиновых остатков оказывается стерически недоступной для ферментов. Ранее Митькевичем и соавторами был проведён анализ кристаллических структур Na,K-АТФазы, и было обнаружено, что цистеины цитоплазматических доменов Cys206–244, Cys369–700 и Cys454–458 попарно обращены своими SH-группами в изолированные полости с неразрешённой электронной 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 остатков цистеина имеет исходное глутатионилирование. Этот цистеиновый остаток, подвергающийся глутатионилированию, как правило, имеет положительно заряженное микроокружение, что благоприятно для осуществления данной

модификации [Mitkevich, V.A., et al., 2016]. Второй вероятной причиной невозможности полного удаления глутатиона с $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза с использованием сопряженной ферментативной системы может быть прочность S-S связи фермента с глутатионом, которая также обусловлена микроокружением. В литературе описаны случаи присутствия в белках особо прочных S-S связей, например, Дэвид и соавторы обнаружили в бычьем сывороточном альбумине 4, а в человеческом – 6 S-S связей между двумя остатками цистеинов, которые не восстанавливались даже в присутствии 30 мМ ДТТ (4 ч инкубации) [David, C., et al., 2008].

Деглутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза с использованием химических восстановителей. В этих экспериментах очищенный фермент обрабатывали различными химическими восстановителями, а именно: β -меркаптоэтанолом (β -МЭ); трис(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР), дитиотритреитолом (ДТТ), дитионитом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) и боргидридом натрия (NaBH_4); окислительно-восстановительные потенциалы которых возрастают в ряду: -0,26; -0,29 -0,33; -0,416 и -1,24 В соответственно.

Очищенную Na,K-АТРаза 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.

При инкубации фермента с β -МЭ удалось добиться 20% деглутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы фермента, как и при использовании ферментативной системы. Под действием ДТТ уровень глутатионилирования снизился всего лишь на 5% (данные не представлены). ТСЕР и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ оказали примерно такое же действие, как и β -МЭ: они обеспечили снижение глутатионилирования в среднем на 15% и 17% соответственно (рис. 5). Наиболее эффективно деглутатионилирование осуществлялось в присутствии 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 NaBH_4 не позволяет полностью удалить глутатион с $\alpha 1$ -субъединицы, свидетельствует о том, что либо остатки глутатиона недоступны для восстановителей, либо эти S-S связи являются необычно прочными.

Хотя NaBH_4 способствует большему деглутатионилированию, чем система сопряженных ферментов (40% и 15% соответственно), повышение активности в этих препаратах Na,K-АТРаза примерно одинаково. По-видимому, ферментативная система восстанавливает именно те SH-группы, модификация которых влияет на активность фермента.

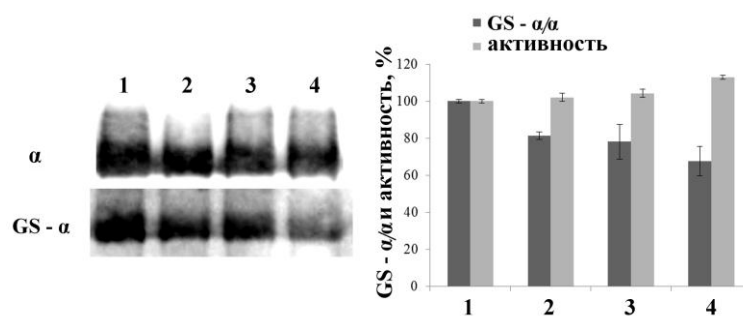


Рис. 5. Деглутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы под действием химических восстановителей: 25 мМ ТСЕР, 10 мМ Na₂S₂O₄ и 3% NaBH₄. Слева – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против $\alpha 1$ -субъединицы (α) и связанного с белком глутатиона (GS- α). Справа – результаты количественной оценки степени деглутатионилирования препаратов и измерения активности Na,K-АТРазы. 1 – контроль; 2 – 25 мМ ТСЕР; 3 – 10 мМ Na₂S₂O₄; 4 – 3% NaBH₄. Представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, полученное в четырёх независимых экспериментах.

Деглутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы под действием химических восстановителей в присутствии денатурирующих агентов. Для того чтобы проверить предположение о недоступности связей цистеиновых остатков $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы с глутатионом для молекул восстановителей, было проведено деглутатионилирование фермента в присутствии денатурирующих агентов – 2% SDS и 6 М мочевины. Эти денатурирующие соединения приводят к разворачиванию полипептидной цепи белка, делая её аминокислотные остатки более доступными для восстанавливающих агентов.

В экспериментах с 10 мМ ДТТ и 30 мМ β -МЭ деглутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы в денатурирующих условиях незначительно отличалось от результатов, полученных в среде без SDS и мочевины (данные не представлены). Результаты экспериментов, проведенных в денатурирующих условиях с более сильными восстановителями, представлены на рисунке 6.

После инкубации Na,K-АТРазы с ТСЕР и Na₂S₂O₄ в денатурирующих условиях степень глутатионилирования снижалась примерно на 30%, в то время как при инкубации с NaBH₄ – 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-АТРазы могут присутствовать особенно прочные S-S связи между цистеиновыми остатками и молекулами глутатиона. Тот факт, что в $\alpha 1$ -субъединице присутствуют -S-SG связи, которые могут быть восстановлены только при денатурации белка (и даже в этом случае не полностью), свидетельствует в пользу того, что глутатионилирование может возникать в процессе синтеза $\alpha 1$ -субъединицы и, по-видимому, может стабилизировать белок. В пользу этого также свидетельствует факт, что, в отличие от регуляторного глутатионилирования, возрастающего при острой гипоксии, исходное глутатионилирование 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 глутатионилирование может стабилизировать структуру белка и препятствовать полной денатурации в присутствии 6 М мочевины и 2 % SDS.

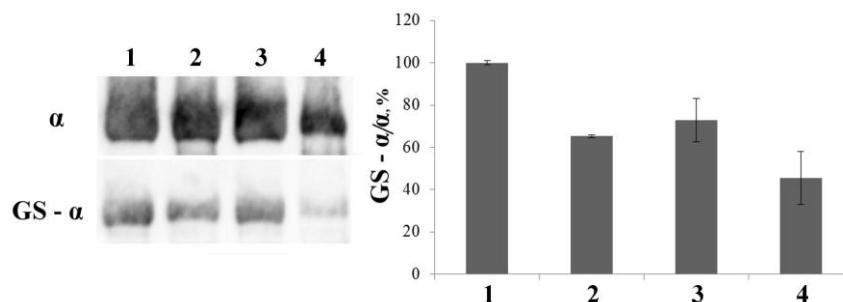


Рис. 6. Деглутатионилирование $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы под действием химических восстановителей в денатурирующих условиях (2% SDS и 6 М мочевины). Слева – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против $\alpha 1$ -субъединицы (α) и связанного с белком глутатиона (GS- α). Справа – результаты количественной оценки степени деглутатионилирования препаратов (GS- α/α). 1 – контроль; 2 – 25 мМ ТСЕР; 3 – 10 мМ Na₂S₂O₄; 4 – 3% NaBH₄. Представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Иные модификации SH-групп $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы и их устранение с использованием химических восстановителей. Известно, что SH-группы Na,K-АТФазы помимо глутатионилирования 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 $\alpha 1$ -субъединицы, была проведена обработка препарата Na,K-АТФазы 25 мМ ТСЕР и 3% NaBH₄ (как самыми эффективными восстановителями) (рис. 7).

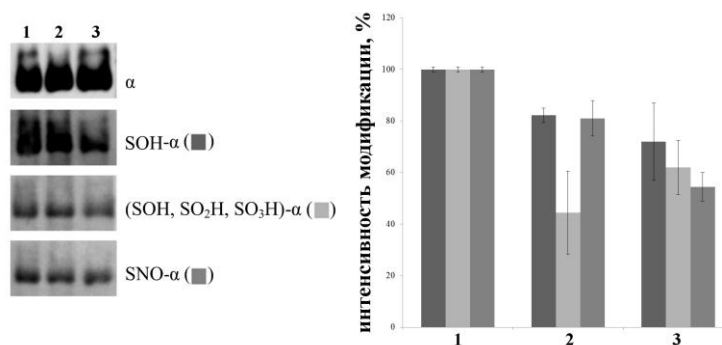


Рис. 7. Восстановление нитрозилированных и окисленных SH-групп $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы под действием химических восстановителей: 25 мМ ТСЕР и 3% NaBH₄. Слева – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против $\alpha 1$ -субъединицы (α), нитрозилированных SH-групп (α -SNO) и общего количества SH-групп, окисленных в разной степени (сумма α -SOH, α -SO₂H, α -SO₃H). Справа – результаты количественной оценки степени восстановления препаратов. 1 – контроль; 2 – 25 мМ ТСЕР; 3 – 3% NaBH₄. Представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Обработка препаратов Na,K-АТФазы TCER и NaBH₄ приводит к устранению нитрозилирования SH-групп α 1-субъединицы на 20% и 45% соответственно; окисления до –SOH групп – на 20-30%, снижая при этом уровень общего окисления цистеиновых остатков (-SOH + -SO₂H + -SO₃H) – на 60% (TCER) и 40% (NaBH₄) соответственно. Последнее свидетельствует о том, что TCER и боргидрид натрия способны восстанавливать сульфгидрильные группы, окисленные в большей степени, чем до –SOH.

Идентификация цистеиновых остатков α 1-субъединицы Na,K-АТФазы, сохраняющихся в модифицированном состоянии после обработки боргидридом натрия в денатурирующих условиях. С использованием метода тандемной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) были установлены остатки цистеина α 1-субъединицы Na,K-АТФазы, которые оставались глутатионилированными, нитрозилированными и окисленными до сульфеновой (-SOH) и сульфиновой (-SO₂H) кислот после обработки 3% NaBH₄ в присутствии 2% SDS и 6 М мочевины (таблица). Работа была проведена совместно с кандидатом химических наук Зиганшиным Р.Х., сотрудником Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Пептиды для масс-спектрометрического анализа были получены путем гидролиза α 1-субъединицы в геле под действием трипсина. По-видимому, участки, по которым осуществлялся протеолиз, несколько различны для контрольного и частично обработанного NaBH₄ 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 α 1-субъединице было обнаружено 8 глутатионилированных остатков цистеина: 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, в глутатионилированном состоянии оставался остаток Cys140, что не наблюдалось в более ранних работах. Было также подтверждено отсутствие глутатиона на остатке Cys423.

После процедуры восстановления в денатурирующих условиях в α 1-субъединице Na,K-АТФазы осталось только 5 глутатионилированных остатков (Cys454, 458, 459, 513, 658). При этом у трех 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%

NaBH₄ в денатурирующих условиях общее количество модифицированных пептидов снизилось примерно в 2 раза (таблица).

Таблица. Сравнение результатов масс-спектрометрического исследования остатков цистеина α 1-субъединицы Na,K-АТФазы в контроле и после обработки фермента 3% NaBH₄ в денатурирующих условиях. В таблице указано количество пептидов с окислительно-восстановительными модификациями (глутатионилирование –SSG; нитрозилирование –SNO; разная степень окисления –SOH и –SO₂H). Покрывание последовательности аминокислот α 1-субъединицы – 69 % для контроля и 69,9 % для препарата, обработанного восстановителем.

Cys №	-SSG		-SNO		-SOH		-SO ₂ H	
	контроль	NaBH ₄	контроль	NaBH ₄	контроль	NaBH ₄	контроль	NaBH ₄
140	1	-	-	1	-	-	-	-
206	1	-	-	-	-	-	-	-
244	-	-	-	-	1	-	1	1
351	2	-	2	1	1	-	3	-
369	-	-	-	-	-	-	-	-
423	-	-	-	-	-	-	-	-
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

Как видно из полученных результатов, SH-группы цистеиновых остатков α 1-субъединицы Na,K-АТФазы могут быть модифицированы различным образом. Максимально и наиболее разнообразно модифицированы Cys454, 458 и 459 – 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 остатки цистеина, находящиеся рядом с активным центром фермента, которые подвергаются также глутатионилированию.

Таким образом, в последовательности аминокислот в α 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, по-видимому, защищающему цистеиновые остатки от необратимого окисления при окислительном стрессе (рис. 8).

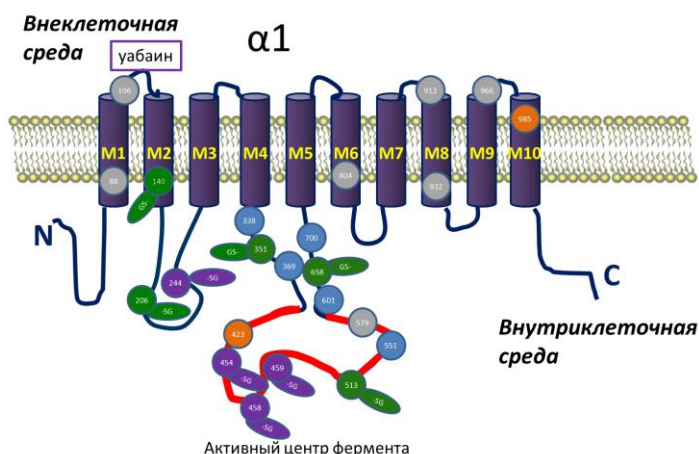


Рис. 8. Глутатионилирование SH-групп остатков цистеинов $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы. Зелёным обозначены исходно глутатионилированные остатки; сиреневым – остатки, глутатионилирование которых регулирует активность фермента (регуляторное глутатионилирование); синим – остатки, глутатионилирование 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).

4. Ограниченный трипсинолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы.

Для установления функции исходного глутатионилирования мы исследовали устойчивость $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы к трипсинолизу. Препарат очищенной Na,K-АТФазы либо дополнительно глутатионилировали, инкубируя его с 1 mM GSSG, либо частично деглутатионилировали путем обработки 3% NaBH₄ в течение 30 мин при 37°C. Трипсинолиз проводили в присутствии 150 mM NaCl (E1-конформация); 150 mM KCl (E2-конформация) или 0,5 mM убаина (конформация E2-убаин). Ранее было показано, что трипсин расщепляет только α -субъединицу Na,K-АТФазы, β -субъединица не подвержена трипсинолизу [Giotta, J.K., 1975].

По данным SDS-ПААГ электрофореза трипсинолиз Na,K-АТФазы в присутствии NaCl и KCl, а также в среде с убаином, сопровождается накоплением полипептидов с молекулярными массами 40, 35,5 и 23 кДа (рис. 9). При инкубации Na,K-АТФазы с трипсином в присутствии NaCl в течение менее чем 60 мин наблюдалось появление неинтенсивной белковой полосы, характерной для белка с молекулярной массой 80 кДа, который по литературным данным является первым продуктом трипсинолиза $\alpha 1$ -субъединицы, находящейся в E1-конформации.

Протеолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в присутствии 150 mM KCl (E2-конформация). Среда, содержащая 150 mM KCl, способствует переходу фермента в E2-конформацию, обладающую большим сродством к ионам K⁺. При трипсинолизе исходно глутатионилированного (контрольного) и частично деглутатионилированного (восстановленного 3% NaBH₄) препаратов Na,K-АТФазы в течение 45, 60 и 90 мин с использованием весового соотношения трипсин:Na,K-

АТРаза 1:10 через 45 мин происходит практически полный протеолиз $\alpha 1$ -субъединицы и начинается накопление продуктов протеолиза (рис. 9).

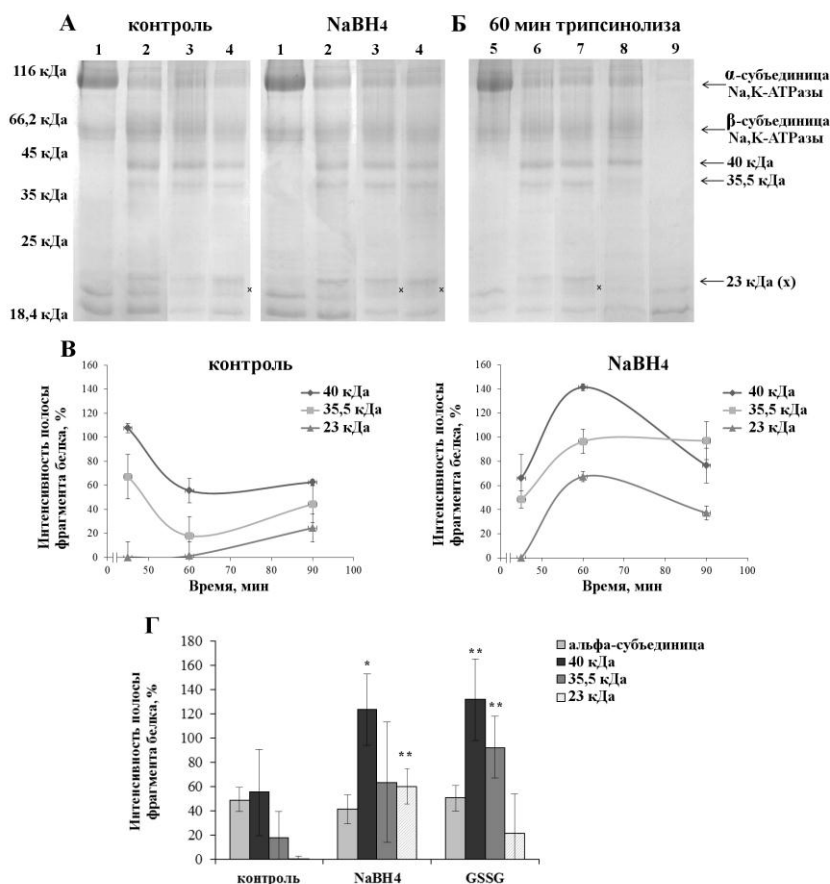


Рис. 9. Трипсинализ $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза в присутствии 150 mM KCl. Результат электрофоретического разделения триптических фрагментов в SDS-ПААГ по Леммли. А – динамика образования протеолитических фрагментов исходно глутатионилированного (контроль) и деглутатионилированного с помощью 3% NaBH₄ препаратов фермента (NaBH₄) в зависимости от времени инкубации с трипсином: 1 – исходный препарат; 2 – 45 мин; 3 – 60 мин; 4 – 90 мин. Б – трипсинализ различных препаратов Na,K-АТРаза в течение 60 мин: 5 – контроль (инкубация в присутствии трипсина и его ингибитора); 6 – исходно глутатионилированный препарат; 7 – препарат, полученный после инкубации с 3% NaBH₄; 8 – препарат, полученный после инкубации с 1 mM GSSG; 9 – автолиз трипсина. В – накопление во времени продуктов трипсинализа $\alpha 1$ -субъединицы исходно глутатионилированной и деглутатионилированной Na,K-АТРаза; Г – результаты трипсинализа деглутатионилированной, исходно глутатионилированной и дополнительно глутатионилированной Na,K-АТРаза в присутствии 150 mM 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.

Наиболее очевидные различия между контрольным и частично деглутатионилированными препаратами наблюдались при трипсинализе в течение 1 ч. В частично 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 трипсинализе 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. 9 Б, Г). Таким образом, в присутствии ионов K^+ (Е2-конформация) и частичное деглутатионилирование, и дополнительное глутатионилирование приводят к возрастанию доступности для трипсина связей, гидролиз которых приводит к образованию фрагмента с молекулярной массой 40 кДа, однако в случае частичного деглутатионилирования, но не дополнительного глутатионилирования, возрастает также доступность связей, ответственных за образование фрагмента с молекулярной массой 23 кДа.

Протеолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы в присутствии 150 мМ NaCl. Среда, содержащая 150 мМ NaCl, обеспечивает переход фермента в Е1-конформацию, имеющую большее сродство к ионам 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]. Установлено, что убыль $\alpha 1$ -субъединицы как в контрольном, так и в глутатионилированном препаратах идёт примерно с одинаковой скоростью. В результате трипсинолиза в присутствии NaCl 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 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 нами в этом случае отличие от контроля – некоторое увеличение количества фрагмента с молекулярной массой 35,5 кДа (рис. 10). Следовательно, частично деглутатионилированный белок в Е1-конформации характеризуется несколько большей чувствительностью к действию трипсина, чем глутатионилированный.

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 Е1- и Е2-конформаций фермента. В литературе описано появление триптических фрагментов, имеющих молекулярные массы около 44, 37 и 23 кДа для фермента в Е1-конформации и 42 и 38 кДа для фермента в Е2-конформации при продолжительной инкубации с трипсином [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 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 М7-М10.

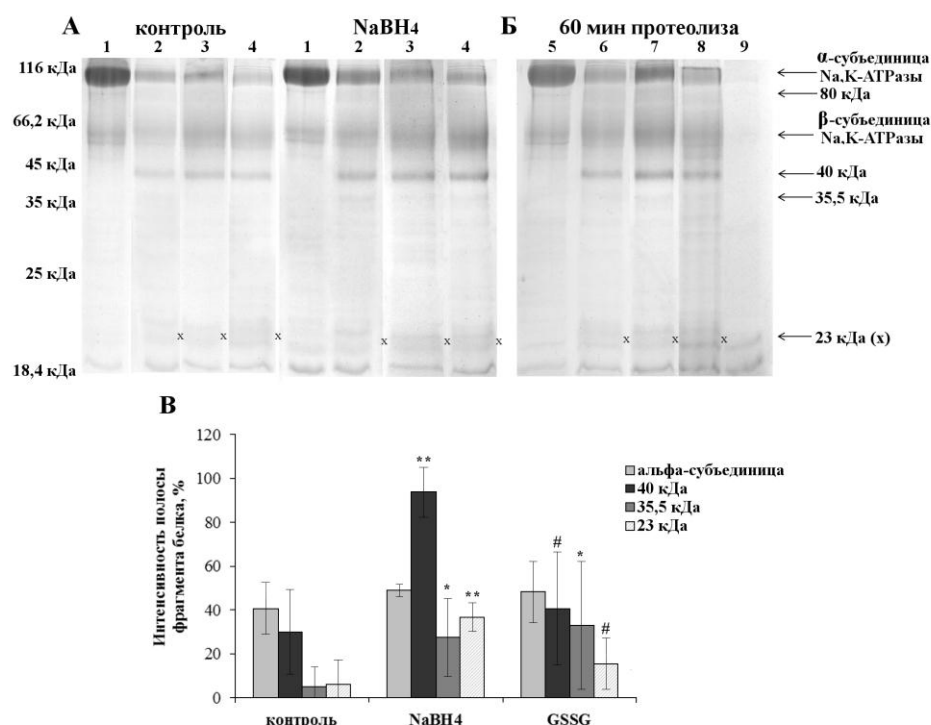


Рис. 10. Трипсинолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза в присутствии 150 мМ NaCl. Результат электрофоретического разделения триптических фрагментов $\alpha 1$ -субъединицы в SDS-ПААГ по Леммли. А – динамика образования протеолитических фрагментов исходно глутатионилированного (контроль) и деглутатионилированного с помощью 3% NaBH₄ препаратов фермента (NaBH₄) 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-АТРаза в течение 60 мин: 5 – контроль; 6 – исходно глутатионилированный препарат; 7 – препарат, полученный после инкубации с 3% NaBH₄; 8 – препарат, полученный после инкубации с 1 мМ GSSG; 9 – автолиз трипсина. В – результаты трипсинолиза деглутатионилированной, исходно глутатионилированной и дополнительно глутатионилированной Na,K-АТРаза в присутствии 150 мМ NaCl в течение 60 минут. Приведены значения интенсивности полосы фрагмента относительно 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 NaBH₄. Представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах.

Протеолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза в присутствии 0,5 мМ убаина. Эксперименты по трипсинолизу фермента в присутствии 0,5 мМ убаина, который необратимо связывается с $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТРаза, переводя фермент в конформацию (Е2-убаин), отличную от Е1- и Е2-конформаций [Klimanova, E.A., et al., 2015] показали, что протеолиз фермента, связанного с кардиотоническим стероидом, идёт быстрее по сравнению с таковым 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 (рис.11А). Добавление 150 мМ холин хлорида для повышения ионной силы несколько замедлило трипсинолиз $\alpha 1$ -субъединицы, но, тем не менее, его скорость оставалась достоверно ниже, чем в присутствии ионов Na⁺ и K⁺.

Результаты экспериментов по трипсинолизу в присутствии убаина не выявили достоверных различий между характером протеолиза исходно глутатионилированного и частично деглутатионилированного препаратов в течение 5 минут. При более длительном трипсинолизе в контрольном препарате триптические фрагменты с молекулярными массами 40 и 35,5 кДа исчезали после 15 мин инкубации, в то время как в деглутатионилированном образце 35,5 кДа белковая полоса не видна уже после 5 мин инкубации, а 40 кДа полоса исчезает после 10 мин инкубации (рис. 11 А).

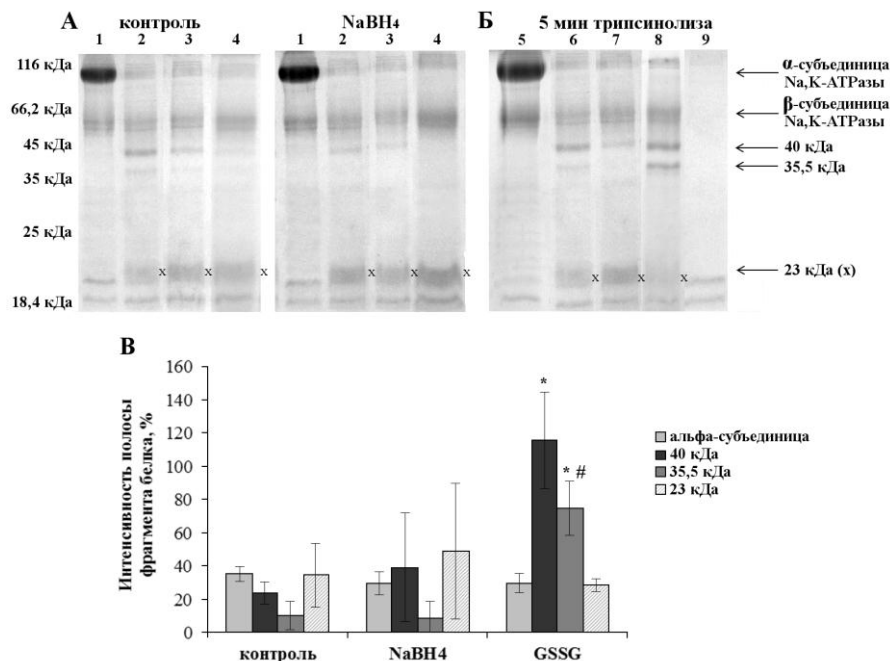


Рис. 11. Трипсинолиз $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в присутствии 0,5 мМ убаина. Результат электрофоретического разделения триптических фрагментов $\alpha 1$ -субъединицы в SDS-ПААГ по Леммли. А – динамика образования протеолитических фрагментов исходно глутатионилированного (контроль) и деглутатионилированного с помощью 3% NaBH₄ препаратов фермента (NaBH₄) 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-АТФазы в течение 5 мин: 5 – контроль; 6 – исходно глутатионилированный препарат; 7 – препарат, полученный после инкубации с 3% NaBH₄; 8 – препарат, полученный после инкубации с 1 мМ GSSG; 9 – автолиз трипсина. В – результат трипсинолиза деглутатионилированной, исходно глутатионилированной и дополнительно глутатионилированной Na,K-АТФазы в присутствии 0,5 мМ убаина в течение 5 минут. Приведены значения интенсивности полосы фрагмента относительно 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, полученных в трёх независимых экспериментах.

При трипсинолизе дополнительно глутатионилированного препарата в течение 5 минут наблюдается существенное увеличение интенсивности фрагментов 40 кДа и 35,5 кДа (рис.11 Б, В). Судя по более позднему накоплению, фрагмент с кажущейся молекулярной массой 23 кДа является одним из конечных продуктов трипсинолиза более высокомолекулярного фрагмента наравне с низкомолекулярными пептидами. Принимая во внимания тот факт, что убывание 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 расщепление до более низкомолекулярных фрагментов (рис. 11).

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, что свидетельствует о снижении протеолитической устойчивости α 1-субъединицы фермента после связывания убаина.

5. Связывание Na,K-АТРазы с лигандами.

Помимо устойчивости Na,K-АТРаза 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.

Связывание Na,K-АТРаза с убаином. Препарат Na,K-АТРаза либо дополнительно глутатионилировали, инкубируя с 1 мМ GSSG, либо частично деглутатионилировали, инкубируя с 25 мМ TCEP. Затем препараты подвергали диализу против буфера, содержащего 3 мМ неорганического фосфата, 3 мМ $MgCl_2$ (перевод фермента в E2P-конформацию) и 0,1 мМ GSSG (дополнительно глутатионилированный препарат), или 5 мМ TCEP (частично деглутатионилированный препарат). Контрольный препарат диализовали против раствора 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%, то препарат, преинкубированный с 1 мМ ДТТ, можно рассматривать как контроль.

В ячейку для образцов, содержащую Na,K-АТРАЗу в концентрации 16 – 17 мкМ, добавляли убаин до тех пор, пока кривая изотермы связывания не выходила на плато. На рисунке 12 приведены типичные ИКТ-кривые для связывания Na,K-АТРаза с лигандом. Анализ кривых титрования проводили в предположении стехиометрии связывания 1:1.

Мы выявили, что как в случае дополнительного глутатионилирования, так и в случае частичного деглутатионилирования фермента параметры, характеризующие его связывание с убаином, достоверно не меняются и не отличаются от параметров, характерных для 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 ($K_a = 2,2 \pm 1,4 \cdot 10^7 M^{-1}$).

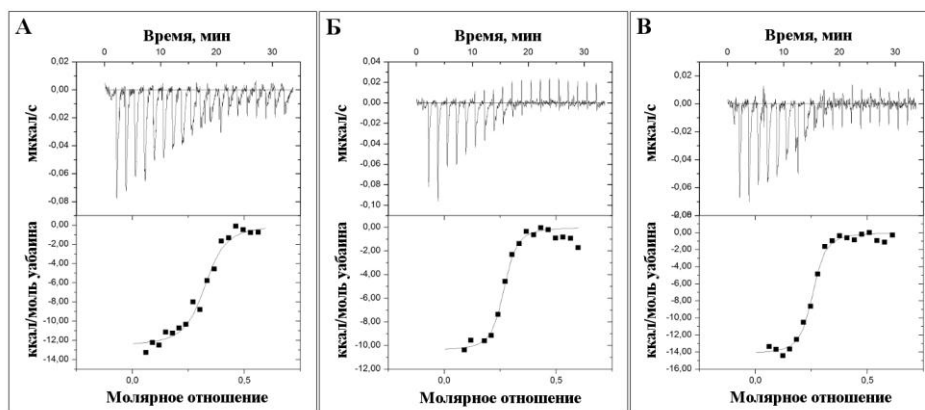


Рис. 12. Анализ взаимодействия Na,K-АТФазы с убаином методом ИКТ. Верхний график – кривая титрования Na,K-АТФазы раствором убаина; нижний график – изотерма связывания фермента и лиганда, полученная путём интеграции экспериментальной ИКТ-кривой. А – контрольный препарат (1 мМ ДТТ); Б – частично деглутатионированный препарат (25 мМ ТСЕР); В – дополнительно глутатионированный препарат (1 мМ GSSG). Эксперименты проводились при 25°C.

Связывание Na,K-АТФазы с Hsp70. Мы исследовали влияние глутатионирования на связывание Na,K-АТФазы с белком Hsp70. Ранее было показано, 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 тем исключением, что диализ проводили в буфере, не содержащем Mg^{2+} и P_i , то есть 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. 13). Анализ кривых титрования проводили в предположении стехиометрии связывания 1:1.

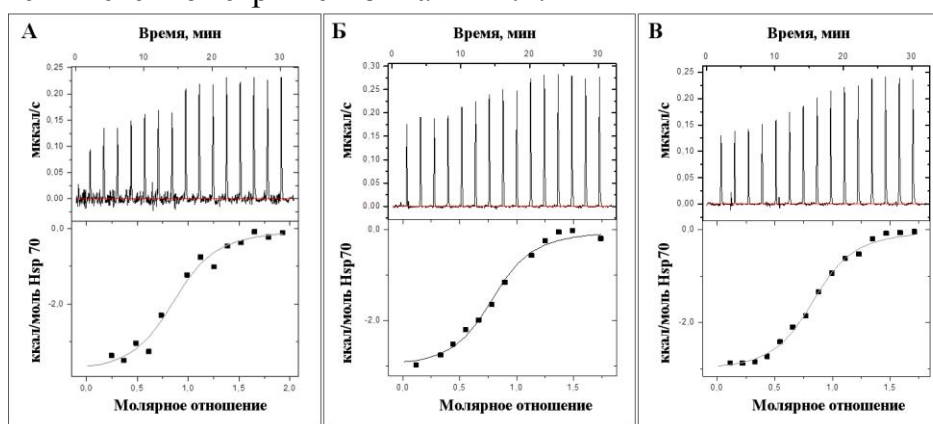


Рис. 13. Анализ взаимодействия Na,K-АТФазы с Hsp70 методом изотермической калориметрии титрования. Верхний график – кривая титрования Na,K-АТФазы раствором Hsp70; нижний график – изотерма связывания фермента и белка-партнёра, полученная путём интеграции экспериментальной ИКТ-кривой. А – контрольный препарат (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. Термодинамические параметры связывания как контрольного, так частично деглутатионилированного и дополнительно глутатионилированных препаратов были близки, достоверных различий обнаружено не было. Для всех трёх типов препаратов Na,K-АТФазы связывание с Hsp70 было энтропийно выгодной реакцией ($\Delta H = -3,1 \pm 0,07$ ккал/моль, $T\Delta S = 5,4$ ккал/моль). Значение константы ассоциации (K_a) составило $1,7 \pm 0,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, а константы диссоциации (K_d) 0,6 мкМ. Полученные данные позволяют предположить, что либо вблизи участка связывания Na,K-АТФазы с Hsp70 нет глутатионируемых остатков цистеина, либо в этом участке изменения в структуре АТФазы при глутатионилировании фермента незначительны и не влияют на взаимодействие двух этих белков.

Заключение

Известно, что многие белки клетки могут модифицироваться по SH-группам цистеиновых остатков полипептидной цепи, формируя S-S связь с глутатионом. Для ряда белков установлено, 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 [Petrushanko, I.Y., et al., 2012]. При окислительном стрессе степень модификации SH-групп $\alpha 1$ -субъединицы может возрастать. Такое дополнительное глутатионилирование нескольких цистеиновых остатков $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы (а именно: Cys244, 454, 458 и 459, находящихся в актуаторном и нуклеотид-связывающем 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., 2012]. Кроме того, степень глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы под действием окисленного глутатиона зависит от её конформации: наиболее доступной для глутатионилирования 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].

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 в пользу того, что система ферментов специфична по

отношению к определённым остаткам цистеинов, модификация которых влияет на активность (Cys244, 454, 456 и/или 458). В то же время химические восстановители такой специфичностью не обладают. Данные о том, что даже сильный восстановитель NaBH_4 не способен восстановить все SH-группы цистеиновых остатков $\alpha 1$ -субъединицы, связанных с глутатионом, свидетельствует либо о стерической недоступности этих остатков для восстановителя, либо о необычной прочности таких S-S связей. Тот факт, что даже в жёстких денатурирующих условиях (6М мочевины 2% SDS) не наблюдается полного деглутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы фермента, свидетельствует в пользу того, что $\alpha 1$ -субъединица Na,K-АТРаза может иметь ряд S-S связей с глутатионом, характеризующихся высокой энергией [David, C., et al., 2008]. Кроме того, это показывает, что исходное глутатионилирование может стабилизировать структуру белка, препятствуя его полной денатурации [Shortle, D., and Ackerman, M.S., 2001]. Помимо глутатионилирования, SH-группы остатков цистеина могут быть нитрозилированы или окислены. При инкубации фермента с 3% NaBH_4 в денатурирующих условиях наблюдается 50% восстановление модифицированных таким образом SH-групп.

На основании этих результатов и данных, полученных методом компьютерного моделирования [Mitkevich, V.A., et al., 2016], можно предположить, что исходное и дополнительное, но не регуляторное, глутатионилирование может выполнять структурные функции, стабилизируя структуру белка. Изучив устойчивость к трипсинолизу фермента, имеющего разную степень глутатионилирования 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 23 кДа. При трипсинолизе в присутствии убаина дополнительное глутатионилирование приводит к увеличению содержания более высокомолекулярных фрагментов по сравнению с нативным и частично деглутатионилированными препаратами, тем самым защищая данные фрагменты от дальнейшего трипсинолиза.

Связывание $\alpha 1$ -субъединицы с убаином переводит фермент в конформацию E2-убаин, менее устойчивую к протеолизу по сравнению с E1- и E2-конформациями. Вероятно в этой конформации участки полипептидной цепи, по которым осуществляется трипсинолиз, максимально экспонированы в раствор. Уменьшение стабильности фермента, связанного с убаином, по сравнению с ферментом в E2-конформации было показано Гириг на Na,K-АТРаза, экспрессированной в ооцитах лягушки [Geering, K., et al., 1996]. Это свойство может быть связано с выполнением Na,K-АТРазой функций сигнального рецептора, так как подобная неустойчивость фермента, связавшегося с убаином, позволяет быстро подвергнуть белок протеолизу после передачи сигнала в клетку. В клетке протеолиз Na,K-АТРаза 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-АТРазы 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-АТРазы на внеклеточной стороне мембраны, то данный результат можно считать ожидаемым. Тот факт, что глутатионилирование не влияет на связывание с Hsp70, может свидетельствовать о том, что либо вблизи участка связывания Na,K-АТРазы 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 $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы, увеличивая её устойчивость к протеолизу. Дополнительное глутатионилирование, с одной стороны, обратимо (в условиях клетки, где есть система сопряженных деглутатионирующих ферментов) ингибирует активность Na,K-АТРазы, а с другой, защищает SH-группы фермента от необратимого окисления.

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-карбоксиэтилфосфина (ТСЕР) и 3% NaBH₄) в денатурирующих условиях (6 М мочевины, 2% додецилсульфат 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-карбоксиэтилфосфином и 3% NaBH₄ наблюдается восстановление нитрозилированных SH-групп $\alpha 1$ -субъединицы на 20% и 45% соответственно, и восстановление окисленных до -SOH, -SO₂H и -SO₃H групп на 60% и 40% соответственно.

- 5) Частичное деглутатионирование α 1-субъединицы Na,K-АТРазы приводит к уменьшению её устойчивости к протеолизу в E1- и E2-конформациях. Характер трипсинолиза дополнительно глутатионированного препарата варьирует в зависимости от конформации белка. Связывание убаина ускоряет трипсинолиз по сравнению с таковым, происходящим с E1- и E2-конформациями.
- 6) Дополнительное глутатионирование и частичное деглутатионирование α 1-субъединицы Na,K-АТРазы не влияет на термодинамические параметры её связывания с убаином и белком теплового шока Hsp70.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

- 1) Мэн С., Петрушанко И.Ю., Климанова Е.А., **Дергоусова Е.А.** и Лопина О.Д. (2014) Глутатионирование α -субъединицы Na,K-АТРазы из сердца крысы под действием окисленного глутатиона приводит к ингибированию активности фермента. *Биохимия*, 79 (2), 209–216.
- 2) Петрушанко И.Ю., Симоненко О.В., Бурнышева К.М., Климанова Е.А., **Дергоусова, Е.А.**, Митькевич В.А., Лопина О.Д. и Макаров А.А. (2015) Способность клеток адаптироваться к условиям низкого содержания кислорода связана с глутатионированием Na,K-АТРазы. *Молекулярная биология*, 49 (1), 175–83.
- 3) **Dergousova, E.A.**, Petrushanko, I.Y., Klimanova, E.A., Mitkevich, V.A., Ziganshin, R.H., Lopina, O.D., and Makarov, A.A. (2017) Effect of reduction of redox modifications of Cys-residues in the Na,K-ATPase α 1-subunit on its activity. *Biomolecules*. 7 (1), E18
- 4) **Дергоусова Е.А.**, Петрушанко И.Ю., Климанова Е.А., Митькевич В.А., Зиганшин Р.Х., Лопина О.Д. и Макаров А.А. (2018) Усиление активности Na,K-АТРазы в результате снятия редокс-модификаций с остатков цистеина α -1 субъединицы: эффект восстанавливающих агентов. *Молекулярная Биология*, 52 (2), 289–93.

Материалы, представленные на научных конференциях:

- 1) Мэн С., Петрушанко И.Ю., Климанова Е.А., **Дергоусова Е.А.** и Лопина О.Д. (2013) Глутатионирование α -субъединицы Na,K-АТРазы из сердца крысы приводит к ингибированию фермента. *Бюллетень сибирской медицины*, том 12, № 4, с. 51.
- 2) Petrushanko, I.Y., Mitkevich, V.A., Burnysheva, K.M., Anashkina, A.A., Klimanova, E.A., Meng, X., **Dergousova, E.A.**, Undrovinas, N.A., Shirinsky, V.P., Ziganshin, R.H., Lopina, O.D., and Makarov, A.A. (2014) Cell resistance to hypoxia/ischemia depends on the S-glutathionylation of catalytic α -subunit of Na,K-ATPase. *14th International Conference "Na,K-ATPase and related transport ATPases: Structure, mechanism, cell biology, health and disease"*, Lunteren, Netherlands, August 30 – September 5, *Book of Abstracts*, с. 133.
- 3) **Дергоусова, Е.А.**, Климанова, Е.А., Петрушанко, И.Ю. и Лопина, О.Д. (2016) Влияние глутатионирования альфа-субъединицы Na,K-АТРазы на её стабильность. *Acta Naturae*, спецвыпуск, том 2, с. 49.