

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Тверской Артём Михайлович

**АНАЛИЗ МЕХАНИЗМА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
КАРДИОТОНИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ**

03.01.04 - Биохимия

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители

Орлов Сергей Николаевич
доктор биологических наук, профессор

Лопина Ольга Дмитриевна
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты

Меньшиков Михаил Юрьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации»;

Архипенко Юрий Владимирович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатория адаптационной медицины ФГБОУ высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет фундаментальной медицины;

Зинченко Валерий Петрович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения ФГБУ науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»;

Защита диссертации состоится «25» ноября 2019 г. в 17 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 12, МГУ, биологический факультет, ауд. БА.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/239203123/>.

Автореферат разослан «__» октября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень её разработанности. Na,K-АТРаза или Na,K-насос (Na^+ , K^+ -активируемая, Mg^{2+} -зависимая аденозинтрифосфогидролаза, КФ 7.2.2.13) – фермент плазматической мембраны клеток животных, осуществляющий перенос ионов Na^+ и K^+ через мембрану против электрохимического градиента, используя энергию, высвобождающуюся при гидролизе АТФ. В состав Na,K-АТРаза входит как минимум 2 типа субъединиц: каталитическая α - и регуляторная β -субъединица, в различных тканях эти субъединицы представлены разными изоформами. Из $\alpha\beta$ -протомеров могут формироваться функциональные олигомеры Na,K-АТРаза ($\alpha\beta$)₂.

Благодаря работе Na,K-АТРаза на мембране поддерживается потенциал покоя, в возбудимых тканях возможна генерация потенциала действия. Создаваемый Na,K-АТРазой градиент ионов Na^+ и K^+ необходим для работы систем вторично-активного транспорта некоторых ионов (например, Ca^{2+} и H^+), метаболитов (аминокислот, нуклеотидов), а также используется для регуляции клеточного объема.

Кардиотонические стероиды (КТС) – структурно-родственные соединения, первоначально полученные в очищенном состоянии из листьев наперстянки, а также из кожи жабы рода *Bufo*. КТС являются специфическими ингибиторами Na,K-АТРаза, некоторые из них давно используются для лечения сердечной недостаточности.

В последнее время появилось много работ, свидетельствующих, что КТС активируют в клетках сигнальные каскады с участием протеинкиназ Ras/Raf/MEK/ERK_{1/2} (p44/42), p38, JNK и активных форм кислорода, приводящие к увеличению экспрессии ряда генов. В этой связи исследователи рассматривают Na,K-АТразу как рецептор для КТС, который после их связывания взаимодействует с белками, ассоциированными с мембраной, запуская разные сигнальные каскады вне зависимости или совместно с ингибированием ионных потоков Na^+ и K^+ .

Сродство к КТС $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза у грызунов в ~1000 раз меньше, чем у других млекопитающих. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что 24 ч инкубация с высокими концентрациями убаина клеток эпителия почек собаки (MDCK), экспрессирующих чувствительную (sensitive) к действию КТС $\alpha 1$ S-субъединицу Na,K-АТРаза, вызывает их гибель. Но трансфекция rезистентной к действию КТС $\alpha 1$ R-субъединицы Na,K-АТРаза в эти клетки предотвращала их смерть. На этих же клетках проведено сравнение эффектов двух представителей КТС – убаина и маринобуфагенина

на активность Na,K-АТРазы и жизнеспособность клеток. Установлено, что 1 мкМ убаина и маринобуфагина в одинаковой степени снижают АТРАЗную активность фермента, однако маринобуфагин, в отличие от убаина, вплоть до концентрации более 10 мкМ не вызывал смерть клеток.

Более того, связываясь в одном центре, убаин и маринобуфагин вызывают различные конформационные переходы Na,K-АТРазы из солевых желез утки, где экспрессируется $\alpha 1S$. По-видимому, в зависимости от конформации Na,K-АТРаза может связываться с разными белками-партнерами, запуская различные сигнальные каскады. Механизмы, определяющие различный характер влияния КТС на жизнеспособность клеток, остаются малоизученными.

В настоящей работе сопоставлено действие убаина и бескалиевой среды (альтернативные подходы к подавлению активности Na,K-АТРазы) на жизнеспособность клеток эндотелия человека и крысы, и исследована роль $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединиц Na,K-АТРазы в этих процессах. Мы изучили взаимодействие $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы с тремя КТС: убаином, дигоксином и маринобуфагином -, уделяя особое внимание изменению конформационного состояния фермента при связывании этих КТС. В заключении мы исследовали сигнальные механизмы, активирующиеся в клетках эндотелия человека и крысы при действии убаина и бескалиевой среды.

Целью диссертационного исследования стало изучение механизма действия КТС на жизнеспособность клеток, экспрессирующих $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединицы Na,K-АТРазы.

Задачи исследования:

1. Сопоставить действие убаина и среды без калия на соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и жизнеспособность эндотелиальных клеток человека и крысы, содержащих $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы.
2. Изучить роль $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединиц Na,K-АТРазы в смерти эндотелиальных клеток человека.
3. Изучить влияние убаина, дигоксина и маринобуфагина на активность и конформационные переходы $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи и крысы соответственно.
4. Сопоставить влияние убаина и среды без калия на фосфорилирование митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и другие сигнальные каскады, вовлеченные в регуляцию жизнеспособности клеток.

Научная новизна. В работе получены новые результаты, расширяющие представления о механизме цитотоксического действия КТС. Впервые установлено, что в выживании клеток эндотелия крысы (RAEC) и смерти клеток эндотелия человека (HUVEC) ключевую роль играет наличие $\alpha 1R$ - или $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы соответственно. Впервые показано, что при действии убаина и среды без калия в HUVEC активируется p38 MAPK, в то время как в RAEC - ERK $\frac{1}{2}$ MAPK. Впервые выявлено, что три КТС – убаин, дигоксин и маринобуфагенин - вызывают различные конформационные переходы в очищенной $\alpha 1S$ -и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы развивают современные представления о механизме цитотоксического действия КТС. Выявлена ключевая роль $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы в механизме клеточной смерти при действии КТС. Полученные результаты можно использовать для разработки некоторых видов терапии, в частности, противоопухолевой, антиретровирусной и лечения идиопатического фиброза лёгких.

Методология и методы исследования. Работа проведена с использованием современных биохимических, молекулярно-биологических, биофизических и биоинформационных методов.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Убаин в концентрациях, полностью ингибирующих Na,K-АТРазу, вызывает смерть клеток эндотелия человека, не влияя на жизнеспособность клеток эндотелия крысы. Ингибирование Na,K-АТРазы путём инкубации клеток в среде без калия не влияет на жизнеспособность как клеток эндотелия человека, так и эндотелия крысы.
2. Цитотоксическое действие убаина на клетки эндотелия человека устраняется в присутствии $\alpha 1$ -резистентной к действию КТС субъединицы Na,K-АТРазы.
3. Связывание убаина, дигоксина и маринобуфагенина вызывают различные конформационные переходы в $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединиц Na,K-АТРазы.
4. В клетках эндотелия человека при действии убаина и бескалиевой среды активируется p38 MAPK, а в клетках эндотелия крысы ERK $\frac{1}{2}$ MAPK.

Степень достоверности результатов исследований. Задачи работы сформулированы, исходя из тщательного и критического анализа работ российских и зарубежных авторов по теме диссертационного исследования. Набор используемых методов является оптимальным для решения поставленных задач. Выводы

диссертационной работы обоснованы, вытекают из полученных результатов, подтверждённых использованием современных общепринятых экспериментальных методов, достаточным объёмом экспериментальных данных и актуальными методами статистического анализа, а также содержат решения поставленных задач.

Апробация работы была проведена на заседании кафедры биохимии биологического факультета МГУ, а также на следующих научных мероприятиях: «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» в 2015 и 2019 году; «Ломоносов-2016», 2016 г.; «V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России», 2016 г.; «VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд Биохимиков России», 2019 г. Результаты работы были представлены на семинарах лаборатории физико-химии биологических мембран биологического факультета МГУ в 2015-2019 г.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №18-34-00308 и РНФ №16-15-10026.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ: 4 статьи и 6 тезисов сообщений на конференциях. 1 статья принята в печать.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов; анализе, статистической обработке и обобщении результатов; подготовке статей и тезисов, предоставлении результатов работы на научных конференциях.

Структура и объём диссертации. Диссертация написана по стандартному плану и включает в себя введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключения, выводы, списка литературы. Материал изложен на 156 страницах, включает 11 таблиц, 61 рисунок и приложение. Список литературы содержит 285 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы посвящен описанию структуры и функций Na,K-АТФазы, в нем проведен анализ данных литературы по связыванию с ферментом его специфических ингибиторов – КТС. Особое внимание уделяется рецепторным свойствам Na,K-АТФазы, в том числе активации сигнальных каскадов в клетках, приводящих к различным

физиологическим эффектам, а также роли соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в запуске внутриклеточных сигналов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры клеток. В работе использовали клетки эндотелия человека из пупочной вены (HUVES) и клетки эндотелия из аорты крысы (RAEC), гладкомышечные клетки аорты мышей дикого типа и генно-модифицированных мышей, экспрессирующих $\alpha 1$ -изоформу Na,K-АТФазы человека.

Жизнеспособность клеток определяли по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ), активности каспазы-3 и распаду хроматина. Для визуальной оценки использовали фазово-контрастную микроскопию.

Внутриклеточную концентрацию Na^+ и K^+ измеряли по накоплению ^{22}Na и ^{86}Rb , соответственно.

Трансфекцию плазмиды с $\alpha 1R$ -субъединицей в HUVES проводили с использованием липофектамина 2000.

Очищенные препараты Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы ($\alpha 1S$ и $\alpha 1R$ соответственно) получали в соответствии с методом Йоргенсена.

Концентрацию белка в очищенных препаратах Na,K-АТФазы определяли по методу Лоури, в клеточных лизатах - по методу Бредфорда.

Определение активности Na,K-АТФазы проводили: 1) измеряя концентрацию продукта реакции неорганического фосфата по методу Ратбуна и Бетлах, 2) используя систему сопряженных ферментов (пируваткиназа-лактатдегидрогеназа), обеспечивающих окисление NADH до NAD^+ в количестве, эквимолярном продукту реакции ADP.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Леммли применяли для анализа белкового состава фракций, используя 6% концентрирующий и 10% разделяющий гели. Белковые полосы после проведения электрофореза окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым.

Иммуноблоттинг. Белки разделяли методом электрофореза в ПААГ, проводили их электроперенос на нитроцеллюлозную мембрану, которую далее инкубировали в 5% растворе обезжиренного молока с последующей обработкой первичными, а затем вторичными антителами. Визуализацию комплексов антиген-антитело проводили методом усиленной хемилюминисценции (ECL).

Параметры связывания КТС определяли методом изотермической калориметрии титрования (ИКТ) с использованием прибора MicroCal VP-ITC (США) при температуре 37°C в растворах: 1) 10 мМ имидазол-НСl (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА, 3 мМ Ф_н/Трис, 3 мМ MgCl₂ и 2) 10 мМ NaCl, 10 мМ имидазол-НСl, 1 мМ ЭДТА (рН 7,5). Определяли константу связывания (K_a), изменение энтальпии (ΔH) и стехиометрию связывания, а энтропию связывания вычисляли с помощью соотношения: $\Delta G = -R \times T \times \ln K_a = \Delta H - T \Delta S$.

Ограниченный трипсинолиз Na,K-АТРаза из почек свиньи и крысы проводили, инкубируя фермент с КТС, а затем добавляли трипсин (соотношение трипсин/Na,K-АТРаза = 1/10) и инкубировали 5-10 минут при 37°C. Изменение набора продуктов протеолиза определяли с помощью электрофореза в ПААГ.

Молекулярное моделирование проводили совместно с Полуэктовым Ю.М., сотрудником Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН.

Трёхмерная структура α1S-Na,K-АТРаза в комплексе с маринобуфагенином была создана на основе данных рентгеноструктурного анализа комплекса α-субъединицы фермента из почек свиньи с убаином (PDB код 4НУТ, разрешение 3,404 Å). Были отобраны атомы белка, находящиеся на расстоянии 4,5 Å вокруг молекулы убаина, после чего КТС удаляли из структуры, а отобранные атомы локально минимизировали в силовом поле MMFF94x.

Для моделирования структуры α1R-Na,K-АТРаза проводили замену аминокислотных остатков Gln111→Arg111 и Asn122→Asp122 в структуре комплексов α-субъединица-убаин, затем повторяли процедуры, описанные выше. Все модели были получены путём локального докинга с использованием Auto Dock Tools.

Компьютерный и статистический анализ данных проводили с помощью программного пакета Origin 8.1 (OriginLab). Во всех экспериментах рассчитывали среднее значение и среднее квадратичное отклонение в 3-х независимых экспериментах в 3-кратной повторности. Для анализа статистически значимого отличия между выборками использовали t-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ, однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Действие убаина на ионный баланс и жизнеспособность клеток эндотелия человека и крысы

Инкубация клеток эндотелия человека в течение 6 ч в среде с 3 мкМ убаина приводит почти к 10-ти кратному увеличению внутриклеточной концентрации Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) и к ~10-кратному снижению внутриклеточной концентрации K^+ ($[\text{K}^+]_i$), не влияя на эти параметры в клетках эндотелия крысы. Увеличение концентрации убаина до 3000 мкМ приводит к такому же изменению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в RAEC, как в HUVEC при добавлении 3 мкМ убаина.

Сопоставление действия 3 и 3000 мкМ убаина в течение 24 ч на жизнеспособность двух типов клеток показало, что инкубация с 3 мкМ убаина приводит к смерти HUVEC, сопровождающейся 6-ти кратным повышением активности каспазы-3 и распадом хроматина. Инкубация RAEC в присутствии 3 мМ убаина не вызывает их смерти.

Действие 3 мМ убаина и бескальевой среды в течение 24 ч не влияет на морфологию RAEC (рис. 1б); инкубация с 3 мкМ убаина вызывает массовое открепление HUVEC от подложки и изменение их формы (рис. 1а). Ингибирование $\text{Na}_2\text{K-ATP}$ азы в среде без калия в течение 24 ч не меняет морфологию HUVEC (рис. 1а).

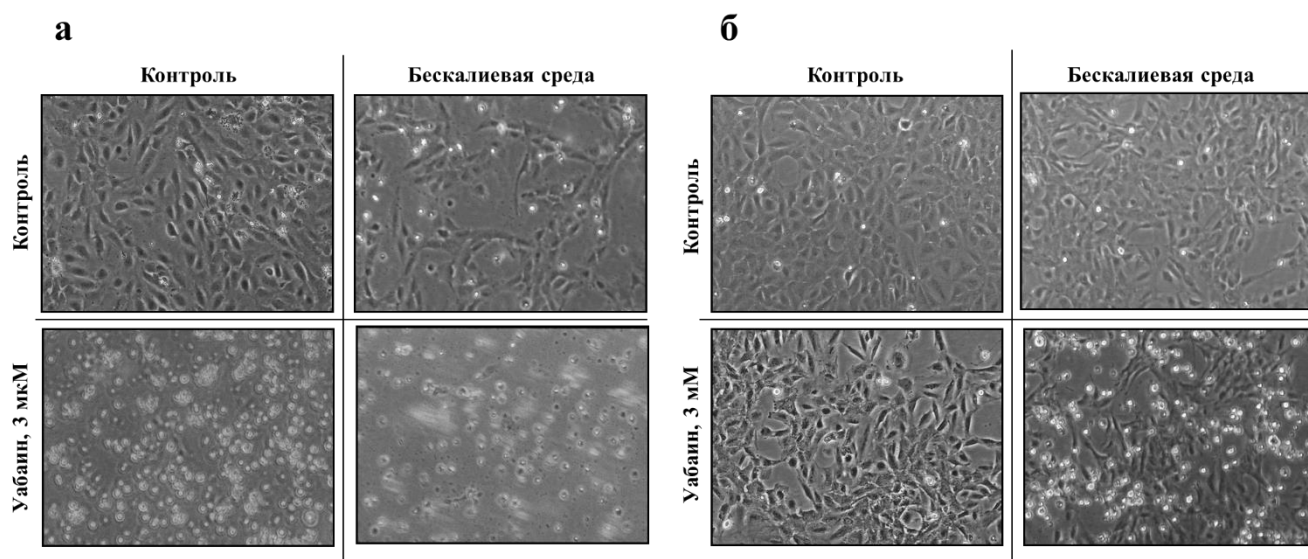


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия эндотелиальных клеток: **(а)** пупочной вены человека (HUVEC), **(б)** аорты крысы (RAEC). Клетки инкубировали 24 ч в контрольной или бескальевой среде DMEM ± 3 мкМ убаина (HUVEC), ± 3 мМ убаина (RAEC).

2. Роль $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в смерти/выживании клеток

Для выяснения роли $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединиц Na,K-АТФазы в смерти клеток человека и крысы при добавлении убаина, мы сравнили концентрационную зависимость его действия на гладкомышечные клетки аорты мышей дикого типа ($\alpha 1^{R/R}$) и мышей, полученных генно-инженерным путем ($\alpha 1^{S/S}$), в которых экспрессируется $\alpha 1S$ -субъединица человека. Работа выполнена совместно с сотрудниками университета г. Чикаго (США) и медицинского колледжа г. Олбани (США). Добавление 3000 мкМ убаина к гладкомышечным клеткам аорты мыши (MASMC) дикого типа (рис. 2) не вызывает увеличения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Добавление к клеткам цитотоксического соединения перекись водорода (1 мМ), увеличивало количество ЛДГ в растворе более чем в 3 раза (с $17,2 \pm 1,9$ до $55,7 \pm 1,3\%$). В отличие от клеток с $\alpha 1^{R/R}$, добавление 3 мкМ убаина к MASMC с $\alpha 1^{S/S}$ увеличило освобождение ЛДГ с $15,9 \pm 1,2$ до $30,4 \pm 0,7\%$ ($p < 0,001$) с незначительным повышением внеклеточного содержания ЛДГ в диапазоне концентраций убаина 3 - 3000 мкМ (рис.2).

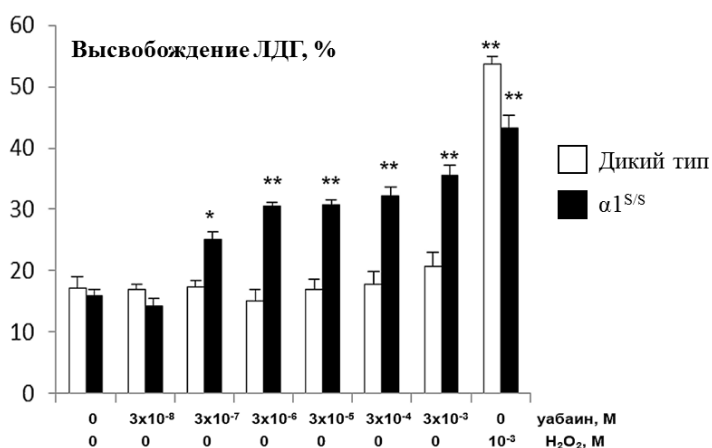


Рис. 2. Эффект убаина и H₂O₂ на высвобождение ЛДГ из гладкомышечных клеток аорты мышей дикого типа и мышей $\alpha 1^{S/S}$ с человеческой $\alpha 1S$ -субъединицей Na,K-АТФазы. Клетки инкубировали 24 ч в присутствии 0,2% сыворотки, а затем добавляли различные концентрации убаина и H₂O₂. Суммарное содержание ЛДГ в клетках принято за 100%. *, ** - $p < 0,005$ и $0,001$ по сравнению с контрольными клетками.

Для идентификации роли $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединиц Na,K-АТФазы исследовали концентрационную зависимость действия убаина на внутриклеточную концентрацию натрия и высвобождение ЛДГ в контрольных и трансфицированных плазмидой с геном $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы HUVES. Через 6 ч инкубации с 10 мкМ убаина наблюдалось 10-кратное увеличение $[Na^+]_i$ в контрольных клетках с $\alpha 1S$. В клетках с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазой аналогичное увеличение $[Na^+]_i$ наблюдали при концентрации убаина 3000 мкМ (рис. 3а).

Инкубация (24 ч) контрольных клеток с 3 мкМ убаина приводит к 6-кратному увеличению высвобождения ЛДГ (рис. 3б), инкубация HUVES с трансфицированной $\alpha 1R$ -субъединицей Na,K-АТФазы в среде с 3000 мкМ убаина не влияет на

высвобождение ЛДГ. Добавление H_2O_2 к обоим типам клеток приводит к 7-кратному увеличению высвобождения ЛДГ (рис. 3б).

Данные свидетельствуют в пользу гипотезы, согласно которой выживание клеток эндотелия обусловлено сигналом, который генерируется при взаимодействии убаина с $\alpha 1R$ -, но не с $\alpha 1S$ - Na, K -АТФазой.

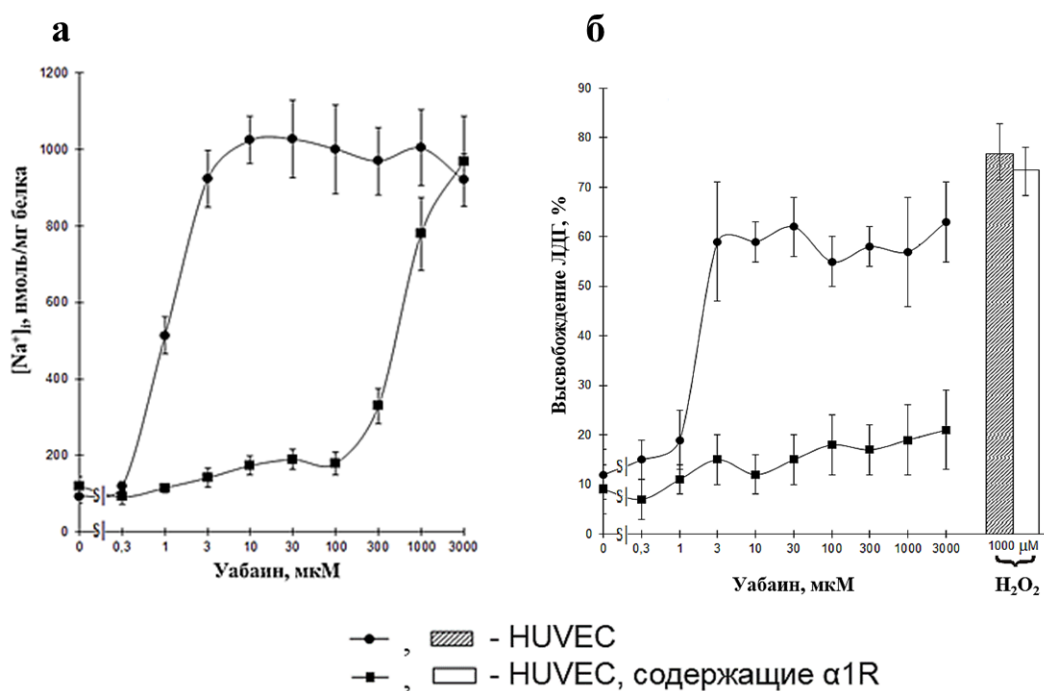


Рис. 3. Концентрационная зависимость действия убаина на внутриклеточную концентрацию натрия (**а**) и высвобождение ЛДГ (**б**) в HUVEC и $\alpha 1R$ -трансфицированных HUVEC. Клетки инкубировали 6 (**а**) и 24 (**б**) ч с убаином в концентрациях, указанных на оси X. Суммарное содержание ЛДГ в клетках было принято за 100%. В качестве контроля клеточной смерти использовали 1мМ H_2O_2 .

3. Выделение и характеристика препаратов Na, K -АТФазы из почек свиньи и крысы, содержащих $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -изоформу соответственно

Предполагается, что связывание КТС с $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединицами Na, K -АТФазы вызывает различные изменения их конформации, обеспечивая взаимодействие фермента с разными адапторными белками и запуская разные сигнальные каскады. Для проверки этого мы получили очищенный убаин-чувствительный ($\alpha 1S$) и убаин-резистентный ($\alpha 1R$) фермент и исследовали связывание трех КТС с этими формами Na, K -АТФазы. В качестве источника ферментов были выбраны почки свиньи и крысы, поскольку они содержат только $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -изоформу фермента соответственно. Кроме того, $\alpha 1S$ - Na, K -АТФазы свиньи и человека имеют близкие кинетические характеристики и высокую гомологию аминокислотной последовательности (98%).

Белковый состав препаратов $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазаы и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазаы из почек свиньи и крысы представлен на рисунке 4. В препаратах из почек свиньи (рис. 4а, дорожка 2) обнаруживается в основном белок с молекулярной массой ~ 100 кДа, соответствующий $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТРазаы, что подтверждается данными иммуноблоттинга с антителами против $\alpha 1$ -субъединицы (рис. 4а, дорожка 3). Полоса, соответствующая белку с молекулярной массой $\sim 55-65$ кДа ($\beta 1$ -субъединица), сильно «размыта», видимо, вследствие гликозилирования белка. В препарате присутствует некоторое количество других белков, общее содержание которых не превышает 10% (оценивали с помощью программы TotalLab TL120, проводя денситометрический анализ гелей).

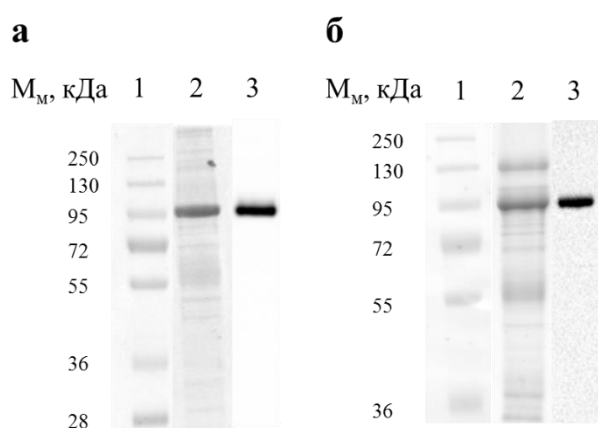


Рис. 4. Анализ белкового состава препаратов Na,K-АТРазаы из почек свиньи (**а**) и крысы (**б**) и идентификация $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазаы методом иммуноблоттинга. 1 – маркеры для определения молекулярных масс; 2 – результаты, полученные после проведения SDS-ПААГ; 3 – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против $\alpha 1$ -субъединицы.

Препараты Na,K-АТРазаы из почек крысы (рис. 4б, дорожка 2) также содержат белки с электрофоретической подвижностью, соответствующей α - и β -субъединицам. Белок с молекулярной массой ~ 100 кДа идентифицирован как $\alpha 1$ -изоформа с помощью антител (рис. 4б, дорожка 3). Помимо α - и β -субъединиц в этом препарате содержится больше минорных белков (15-25%), чем в препарате из почек свиньи.

Активность препаратов $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазаы из почек свиньи составляла 700-2200 мкмоль Φ_n /(ч*мг белка), $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазаы из почек крысы 480-750 мкмоль Φ_n /(ч*мг белка), что хорошо согласуются с данными литературы.

4. Ингибирование $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазаы убаином, дигоксином и маринобуфагенином

Для оценки значений концентрации КТС, обеспечивающих полумаксимальное ингибирование фермента (IC_{50}), сравнили концентрационную зависимость действия убаина, дигоксина и маринобуфагенина на активность $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазаы из почек свиньи и крысы. $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазау преинкубировали с этими КТС при $37^\circ C$ в

среде, содержащей все компоненты реакции (кроме АТР), до установления равновесия, затем инициировали реакцию добавлением АТР. На рисунке 5 приведены кривые, описывающие концентрационную зависимость ингибирования $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи (рис. 5а) и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы из почек крысы (рис. 5б) убаином, дигоксином и маринобуфагенином.

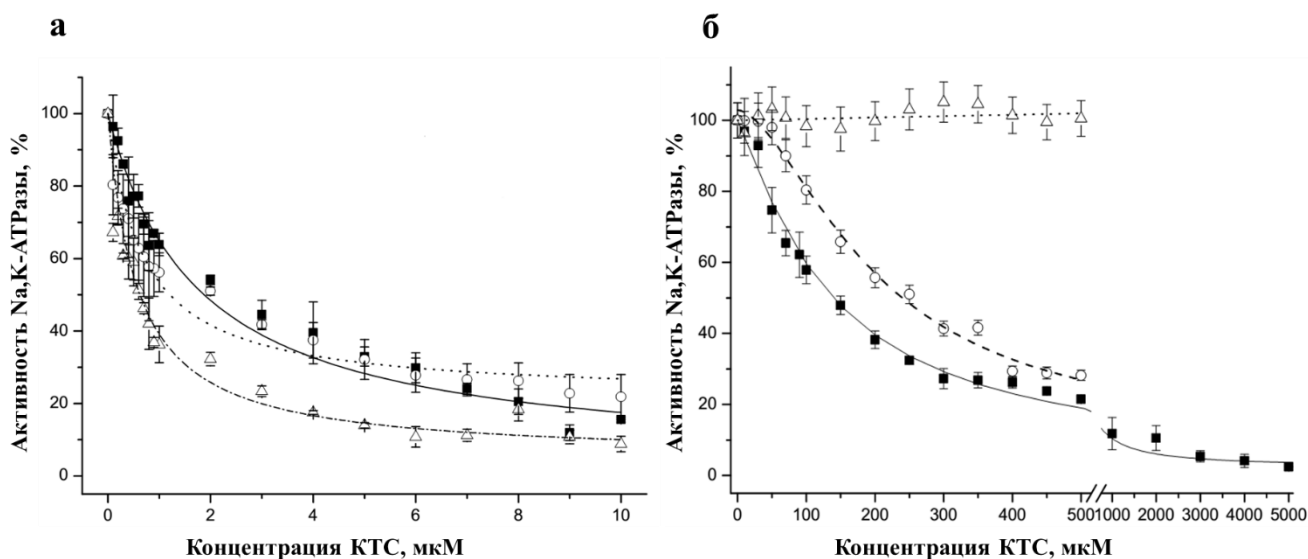


Рис. 5. (а) Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи от концентрации убаина (■), дигоксина (○) и маринобуфагенина (Δ) в среде инкубации. (б) Зависимость активности $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы из почек крысы от концентрации убаина (■), дигоксина (○) и маринобуфагенина (Δ) в среде инкубации (Δ). За 100% взята активность фермента в отсутствие КТС. Кривая была аппроксимирована уравнением Хилла.

Ингибирование Na,K-АТРазы из почек свиньи убаином, дигоксином и маринобуфагенином характеризуется близкими значениями IC_{50} (2, 1,2 и 0,8 мкМ соответственно). Коэффициент Хилла во всех трех случаях равен 1. Маринобуфагенин в диапазоне концентраций от 5 до 500 мкМ не оказывает ингибирующего воздействия на $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазу. Убаин и дигоксин ингибируют этот фермент со значениями IC_{50} 140 мкМ и 250 мкМ соответственно, в обоих случаях коэффициент Хилла равен 1.

5. Исследование типа ингибирования $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы убаином, дигоксином и маринобуфагенином

В процессе каталитического цикла Na,K-АТРаза претерпевает последовательную смену двух конформационных состояний – E1 и E2, характеризующихся различным сродством к переносимым катионам и к КТС. В конформации E2-P фермент имеет наиболее высокое сродство к убаину.

Убаин относится к ингибиторам $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы с очень высоким сродством. Для исследования типа ингибирования фермента КТС мы преинкубировали его с кардиостероидами в конформации E1 и E2-P до установления равновесия, а затем переносили небольшой объем этого раствора в среду для измерения активности, обеспечивая 50-кратное комплекса фермент-КТС.

На рисунке 6 показана зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи от концентрации убаина и дигоксина после преинкубации ее с этими КТС в конформации E2-P (рис. 6) при разных концентрациях фермента в среде преинкубации. В случае, если эта зависимость описывается гиперболой, можно определить константу ингибирования для КТС из графика, отражающего зависимость IC_{50} от концентрации белка. Мы обнаружили, что кривые, описывающие ингибирование убаином имеют вид сигмоиды с коэффициентом Хилла около 2 ($1,89 \pm 0,14$; $1,96 \pm 0,19$ и $1,91 \pm 0,09$ для 40, 80 и 400 нМ фермента соответственно), что не позволяет определить IC_{50} . Однако данные о том, что коэффициент Хилла близок к 2, могут свидетельствовать о наличии у фермента в конформации E2-P двух центров связывания убаина с положительными кооперативными взаимодействиями между ними.

Аналогичные результаты были получены при исследовании типа ингибирования $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы дигоксином: кривая, описывающая ингибирование в зависимости от концентрации КТС сигмоидальна, коэффициенты Хилла для трех концентраций фермента близки к 2 ($1,9 \pm 0,21$, $1,7 \pm 0,33$ и $1,99 \pm 0,27$). В отличие от убаина и дигоксина, маринобуфагенин в концентрации 10-150 мкМ не оказывал влияния на активность $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы после преинкубации в конформации E2-P.

Результаты свидетельствуют, что убаин и дигоксин, связываясь с E2-P-конформацией $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы, являются ее псевдонеобратимыми ингибиторами. Поскольку коэффициент Хилла близок к 2, а в α -субъединице есть только один центр связывания КТС, можно предположить, что в E2-P конформации происходит взаимодействие между двумя связывающими центрами в димере Na,K-АТФазы ($\alpha\beta$)₂.

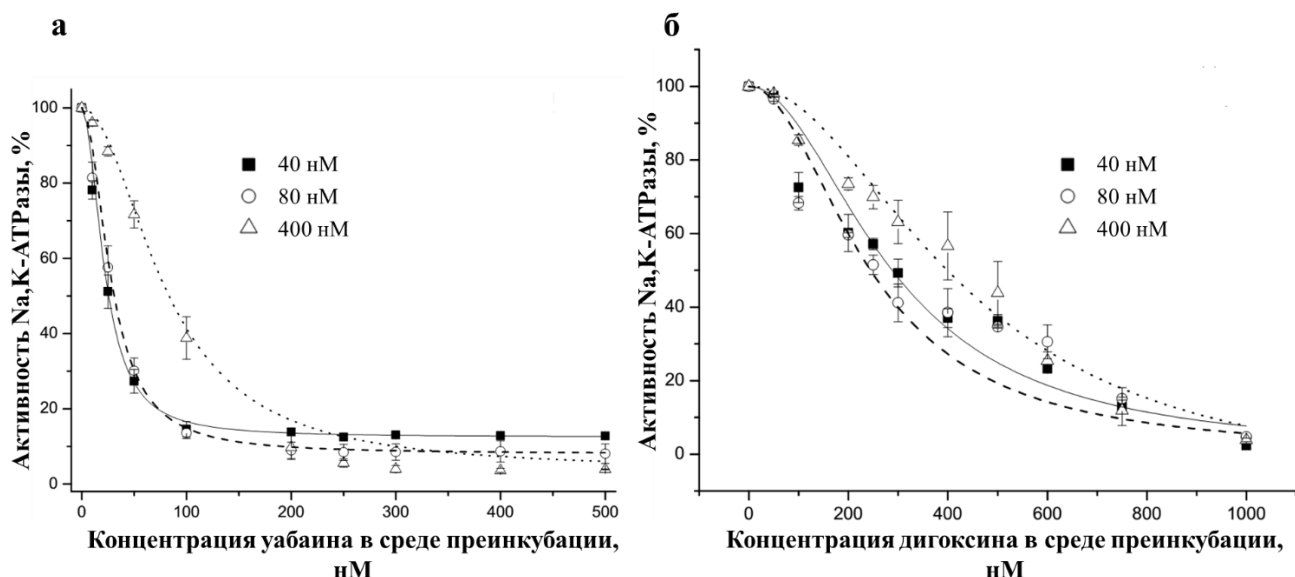


Рис. 6. (а) Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E2-P от концентрации убаина в среде преинкубации. (б) Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E2-P от концентрации дигоксина в среде преинкубации. Кривые аппроксимировали кривой Хилла. За 100% взята активность фермента в отсутствие убаина (а) и дигоксина (б).

Убаин необратимо связывается с E1-конформацией $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы ($I_{50} = 20$ мкМ). Преинкубация этого фермента в E1-конформации с дигоксином и маринобуфагенином не влияет на его активность. Эти КТС либо не связываются, либо связываются с E1-конформацией обратимо.

Преинкубация всех трех КТС с E2-P и E1-конформациями $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы также не влияла на активность фермента. Таким образом, все три КТС либо не связываются (маринобуфагенин) с этими конформациями $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы, либо связываются с ними обратимо.

6. Изучение взаимодействия $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы с КТС методом изотермической калориметрии титрования

Используя метод изотермической калориметрии титрования (ИКТ) мы определили стехиометрию связывания КТС с $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазой: для убаина и дигоксина она составляет $0,65 \pm 0,15$ и $0,52 \pm 0,12$ соответственно, для маринобуфагенина – $1,7 \pm 0,21$.

Мы попытались определить константы связывания (K_a), изменения энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) при связывании убаина, дигоксина и маринобуфагенина с Na,K-АТФазой из двух различных источников в конформационных состояниях E2-P и E1 при температуре 37°C . Полученные данные для $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы в конформации E2-P приведены в таблице 1.

Таблица 1. Термодинамические параметры связывания убаина, дигоксина и маринобуфагенина с E2-P конформацией $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза из почек свиньи при pH 7,4 и температуре 37°C

| КТС | K_a, M^{-1} | K_d, nM | $\Delta H,$ ккал/моль | $T\Delta S,$ ккал/моль | $\Delta G,$ ккал/моль |
|----------|------------------|----------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Убаин | $1,9 \cdot 10^7$ | 53 ± 9 | $-21,6 \pm 0,7$ | -1,3 | -20,3 |
| Дигоксин | $4,0 \cdot 10^6$ | 208 ± 21 | $-7,9 \pm 0,6$ | -0,3 | -7,6 |
| МБГ | $4,3 \cdot 10^5$ | 2320 ± 450 | $-5,2 \pm 0,3$ | -0,3 | -4,9 |

МБГ – маринобуфагенин; K_a – константа ассоциации; K_d – константа диссоциации: $K_d = 1 / K_a$; ΔH – изменение энтальпии; $T\Delta S$ – изменение энтропии; ΔG – изменение энергии Гиббса.

Связывание $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза в конформации E2-P с КТС в ряду убаин, дигоксин и маринобуфагенин характеризуется увеличением константы диссоциации комплекса фермент-КТС с 53 до 2320 нМ, снижением величины энтальпии (ΔH) от -21,6 до -5,2 ккал/моль, а энтропии ($T\Delta S$) – от -1,3 до -0,3 ккал/моль. При связывании любого из КТС с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазой в конформации E2-P основной вклад в изменение энергии Гиббса (ΔG) вносит энтальпийный фактор: связывание КТС является энтальпийно выгодным процессом. Отрицательная величина изменения энтальпии связывания указывает на образование большого количества водородных связей или Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий между ферментом и КТС.

Нам не удалось обнаружить связывание любого из КТС с $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза в E1-конформации и с ферментом из почек крысы как в конформации E2-P, так и в конформации E1. Учитывая особенности метода можно заключить, что константа диссоциации комплекса КТС-фермент в этих случаях может составлять более 10 мкМ.

Стоит отметить, что константы диссоциации связывания убаина и дигоксина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза в конформации E2-P, определенные методом ИКТ, соответствуют константам, характерным для ингибиторов с высоким сродством (псевдонеобратимое ингибирование), а K_d для маринобуфагенина характеризует его как обратимый ингибитор. Таким образом, результаты, полученные с помощью метода ИКТ согласуются с результатами по определению типа ингибирования Na,K-АТРаза кардиостероидами.

7. Ограниченный трипсинолиз комплексов КТС-Na,K-АТРаза из почек свиньи и крысы

Протеолиз широко используется для анализа конформации белков. В случае Na,K-АТРаза в качестве протеазы используют трипсин, поскольку он не затрагивает β -

субъединицу, расщепляя только α -субъединицу фермента: после трипсинолиза обнаруживаются только пептидные фрагменты α -субъединицы.

На рис. 7 представлены данные электрофоретического анализа продуктов трипсинолиза, полученных из $\alpha 1S$ -субъединицы Na,K-АТРаза почек свиньи в конформации E1. Интенсивность окрашивания $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза (~100 кДа) после протеолиза снижается (см. дорожки 1 и 3). При этом образуется пептидный фрагмент с молекулярной массой около 40 кДа и небольшое количество пептидного фрагмента с молекулярной массой 35,5 кДа. В небольших количествах появляются пептидные фрагменты с молекулярными массами около 23 и 19 кДа.

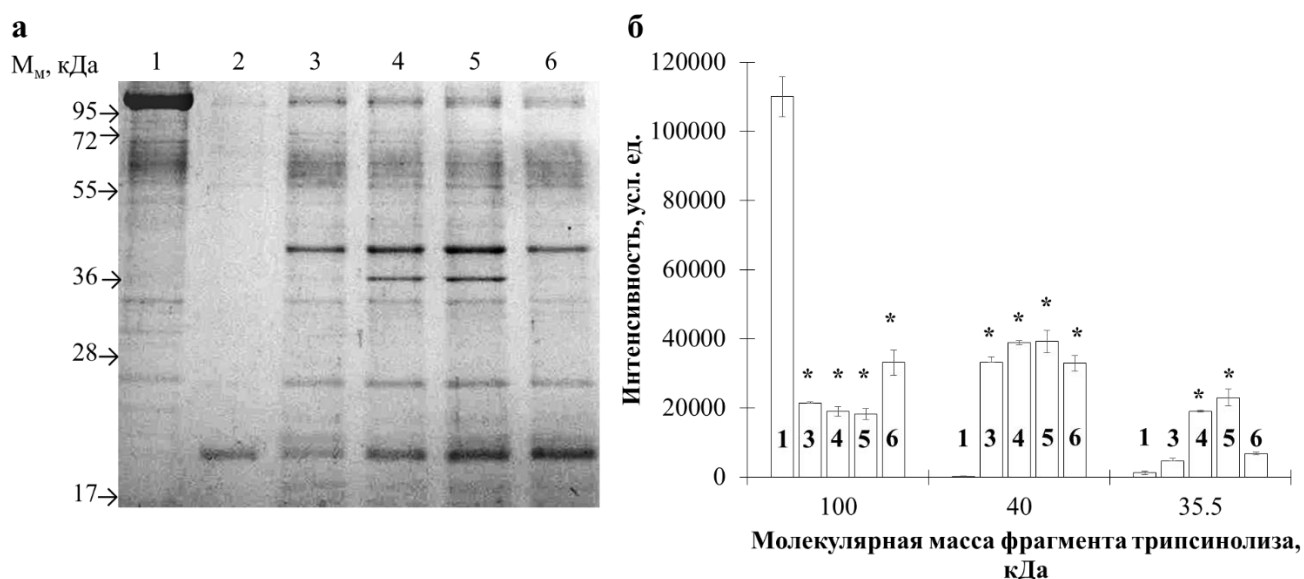


Рис. 7. Результаты трипсинолиза $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза из почек свиньи в конформации E1 в присутствии КТС (1 мМ). Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение Na,K-АТРаза/трипсин 10/1. **(а)** Результаты разделения белков препарата и протеолитических фрагментов $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: 1 - Na,K-АТРаза (7,7 мкг); 2 – трипсин и ингибитор трипсина; 3 - Na,K-АТРаза и трипсин; 4 – комплекс Na,K-АТРаза-уабаин и трипсин; 5 – комплекс Na,K-АТРаза-дигоксин и трипсин; 6 - комплекс Na,K-АТРаза-маринобуфагенин и трипсин. **(б)** Интенсивность окрашивания белковых полос, соответствующих $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТРаза и её пептидных фрагментов с молекулярной массой 40 и 35,5 кДа. * - $p < 0,01$.

Преинкубация фермента из почек свиньи с уабаином и дигоксином в концентрациях, полностью ингибирующих Na,K-АТРаза (1 мМ), приводит к снижению количества $\alpha 1S$ -субъединицы Na,K-АТРаза и увеличению количества фрагмента с молекулярной массой около 40 кДа. Одновременно возрастает количество фрагмента с молекулярной массой 35,5 кДа, этот пептид не обнаруживается после обработки фермента маринобуфагенином (рис. 7а, дорожка 6). Таким образом, связывание уабаина

и дигоксина делает доступным для трипсина дополнительный участок трипсинолиза $\alpha 1S$ -субъединицы, который недоступен для протеазы в том случае, если фермент связан с маринобуфагенином. Это означает, что конформация α -субъединицы Na,K-АТРаза после ее взаимодействия с убаином и дигоксином отличается от таковой, индуцированной связыванием маринобуфагенина.

Рисунок 8 иллюстрирует результаты электрофоретического разделения продуктов протеолиза $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза из почек свиньи в конформации E2-P. После протеолиза в отсутствие КТС наблюдается уменьшение количества $\alpha 1$ -субъединицы, увеличивается количество продуктов протеолиза с молекулярной массой 40 кДа и 35,5 кДа. Но связывание фермента с любым из КТС приводит к появлению дополнительного фрагмента с молекулярной массой 45 кДа. Это показывает, что в конформации E2-P связывание любого из КТС делает доступным для трипсина один и тот же дополнительный участок трипсинолиза.

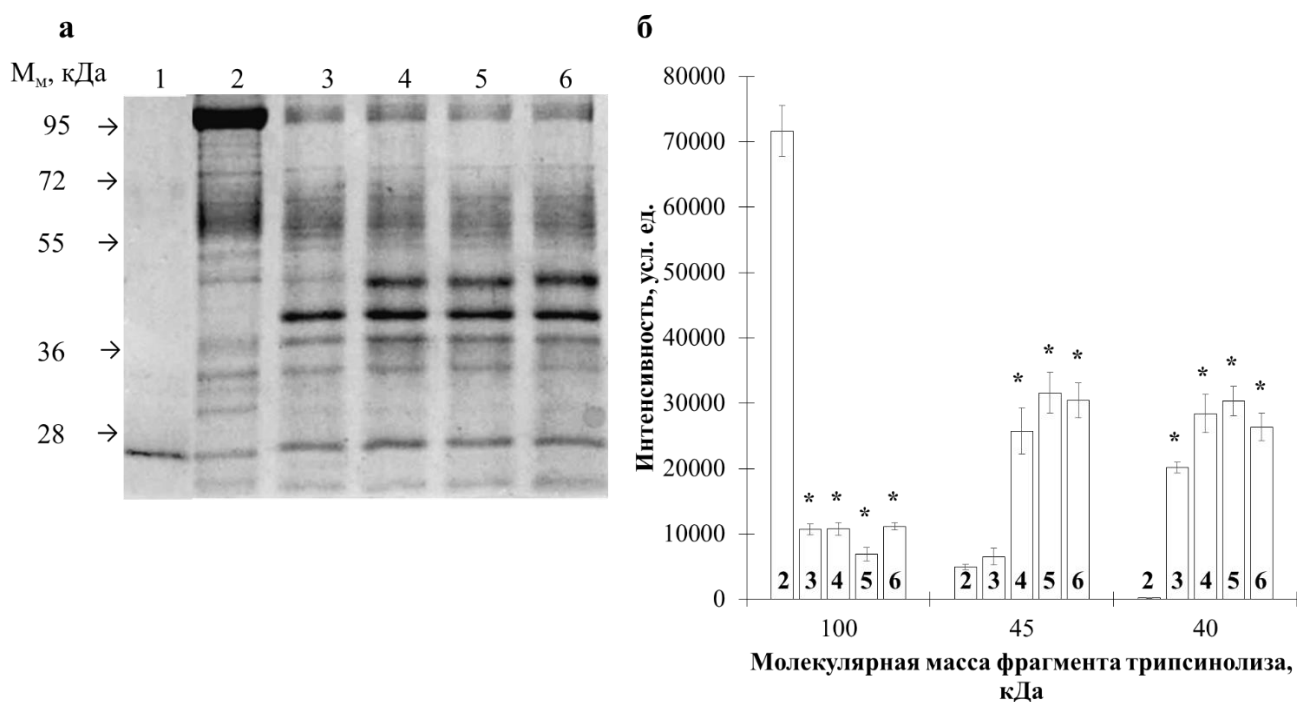


Рис. 8. Результаты трипсинолиза $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза из почек свиньи в конформации E2-P в присутствии КТС (1 мМ). Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение Na,K-АТРаза/трипсин 10/1. **(а)** Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: 1 - трипсин и ингибитор трипсина; 2 - Na,K-АТРаза (7,7 мкг); 3 - Na,K-АТРаза и трипсин; 4 - комплекс Na,K-АТРаза-убаин и трипсин; 5 - комплекс Na,K-АТРаза-дигоксин и трипсин; 6 - комплекс Na,K-АТРаза-маринобуфагенин и трипсин. **(б)** Интенсивность окрашивания белковых полос, соответствующих $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТРаза и её пептидных фрагментов с молекулярной массой 45 и 40 кДа. * - $p < 0,01$.

Связывание Na,K-АТРаза из почек крысы ($\alpha 1R$) с любым КТС не изменяло набора продуктов протеолиза в случае пребывания фермента в обеих конформациях (E1 и E2-P).

8. Моделирование участка связывания с убаином, дигоксином и маринобуфагенином $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединиц Na,K-АТРаза в конформации E2-P

Структура центра связывания убаина (PDB код 4HYT) и дигоксина (PDB код 4RET) с $\alpha 1$ -изоформой Na,K-АТРаза из почек свиньи ($\alpha 1S$) в конформации E2-P была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа. Для этой конформации характерно наиболее высокое сродство КТС к ферменту.

Структура центра связывания для маринобуфагенина неизвестна, поскольку не проводился рентгеноструктурный анализ комплекса $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза-маринобуфагенин. Ранее было установлено, что маринобуфагенин связывается в том же центре $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза из солевых желез утки, что и убаин. Мы провели докинг маринобуфагенина в структуру $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза из почек свиньи в конформации E2-P. Результаты показали, что стероидное ядро маринобуфагенина располагается на $\sim 3,9$ Å ближе к внеклеточной части участка связывания по сравнению с убаином и дигоксином (рис. 9). Маринобуфагенин формирует водородные связи с Gln111 (M1), Asp121, Asn122 (оба на M2), Thr797 (M6) и Arg880 (петля между M7 и M8) и образует гидрофобные связи с Phe316 (M4), Phe783, Phe786 (расположены в M5).

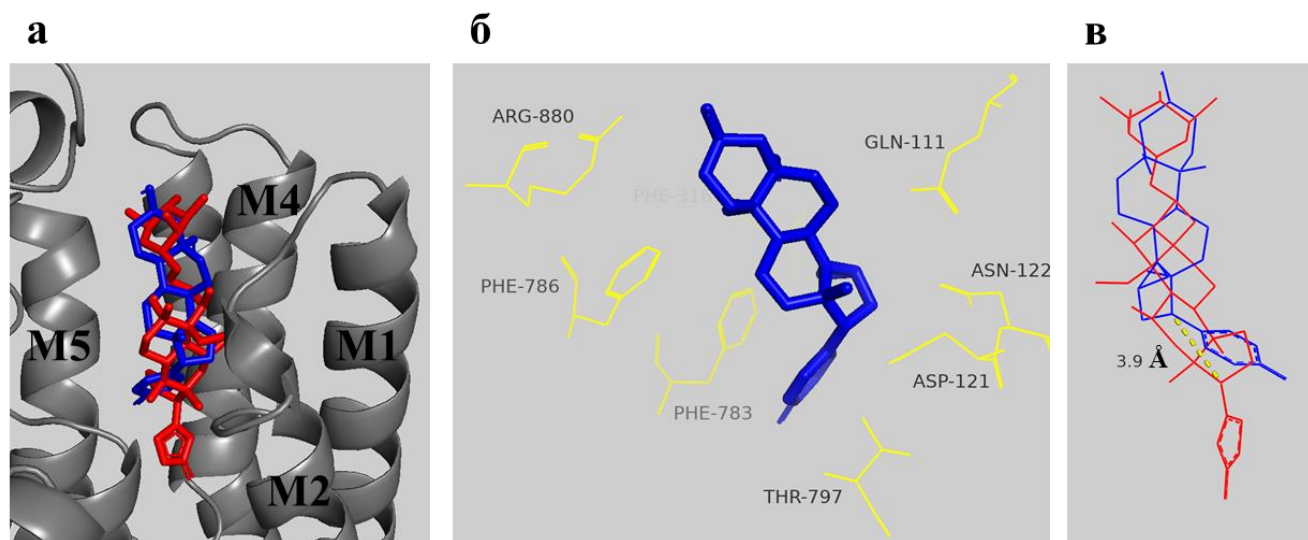


Рис. 9. Моделирование участка $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза, связанного с маринобуфагенином. **(а)** Суперпозиция молекулы маринобуфагенина (синий) и убаина (красный) в $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза. Показано положение убаина в pdb файле (4HYT). **(б)** Аминокислотные остатки, участвующие в связывании маринобуфагенина. **(в)** Расстояние между C17-атомами убаина (красный) и маринобуфагенина (синий) составляет 3,9 Å.

В настоящее время нет данных рентгеноструктурного анализа для центров связывания $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы с КТС. Поэтому мы заменили в структуре 4НУТ $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы аминокислотные остатки Gln111 (M1) и Asn122 (M2) на Arg111 и Asp122 (аминокислотные остатки, характерные для $\alpha 1R$). Из рисунка 10 видно, что стероидное ядро убаина входит внутрь центра связывания в $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазе на $\sim 6,9$ Å ближе к выходу из полости в сравнении с $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазой, а в связывании принимает участие пять аминокислотных остатков. Предсказанная энергия связывания уменьшается с $-11,0$ ккал/моль ($\alpha 1S$) до $-7,2$ ккал/моль ($\alpha 1R$).

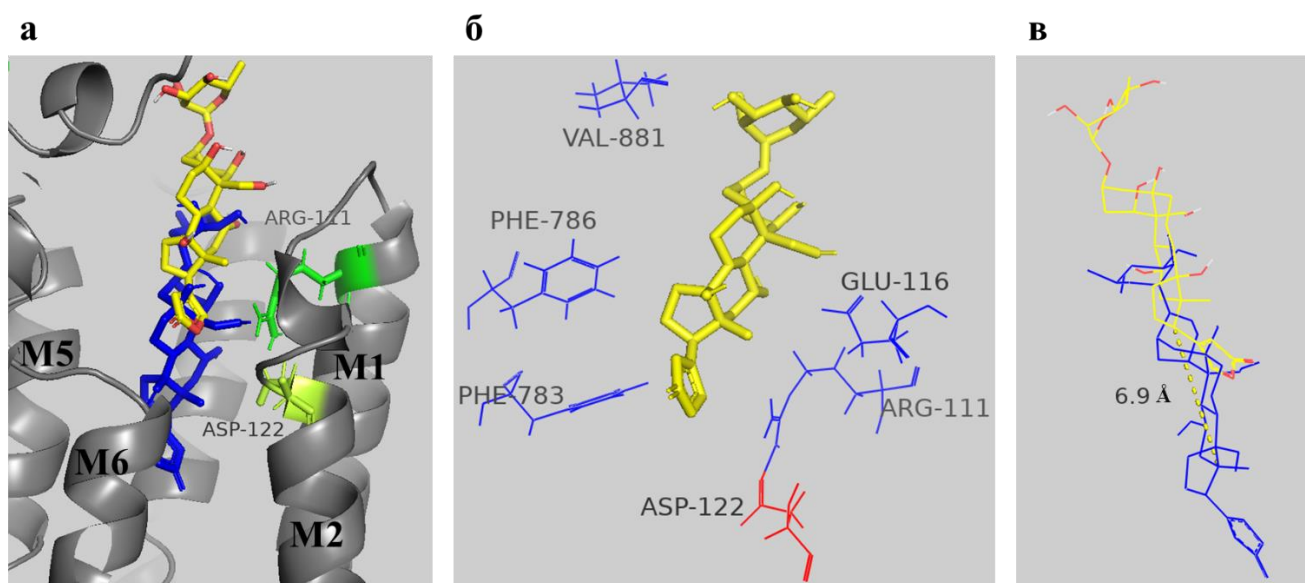


Рис. 10. Моделирование участка $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы, связанного с молекулой убаина. **(а)** Сравнение суперпозиции молекулы убаина в $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы (синий) и в $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы (жёлтый). **(б)** Аминокислотные остатки, участвующие в связывании убаина с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы. Остаток аспарагиновой кислоты 122 не принимает участие в связывании убаина (красный), а является одним из маркеров $\alpha 1R$ -субъединицы. **(в)** Расстояние между C17-атомами в комплексе $\alpha 1S$ -убаин (красный) и $\alpha 1R$ -убаин (жёлтый) составляет $6,9$ Å.

По-видимому, замена Gln111 и Asn122 на Arg111 и Asp122 в $\alpha 1R$ -субъединице фермента приводит к образованию солевого мостика между карбоксильной группой аспартата и гуанидиновой группой аргинина. Это сужает полость связывания КТС, в результате чего снижается сродство фермента к КТС.

По результатам докинга, как в случае убаина, центры связывания для дигоксина и маринобуфагенина в $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы различаются. Эти КТС встраиваются внутри связывающего центра $\alpha 1R$ -фермента иначе, а в связывании участвует иной набор аминокислот. Предсказанная энергия связывания снижается как для дигоксина ($-12,0$

ккал/моль в $\alpha 1S$, -10,3 ккал/моль в $\alpha 1R$), так и маринобуфагенина (-9 ккал/моль в $\alpha 1S$, -8 ккал/моль в $\alpha 1R$).

9. Действие убаина и среды без калия на интермедиаты сигнальных каскадов в клетках эндотелия человека и крысы

У эукариот существует множество сигнальных каскадов, которые позволяют в ответ на внеклеточные воздействия регулировать функции клетки. Мы исследовали изменения содержания общей и фосфорилированной форм некоторых интермедиатов сигнальных каскадов, обусловленных действием убаина или средой без калия в клетках, содержащих $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ - Na, K -АТФазы. В бескалиевой среде Na, K -АТФазы не работает, что позволяет оценить, вызван ли сигнальный каскад изменением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в клетке или эффектом убаина на конформацию фермента.

В клетках эндотелия человека и крысы нам не удалось идентифицировать следующие белки сигнальных каскадов: МКК4, фосфо-МКК4 (Ser80), фосфо-МКК3 (Ser189)/-МКК6 (Ser207), фосфо-c-Src (Tyr 419), фосфо-PI3K (p85), фосфо-Akt (Thr308). Кроме того, не обнаружено изменений в содержании следующих белков: p38 MAPK, JNK $\frac{1}{2}$ MAPK, фосфо-JNK $\frac{1}{2}$ MAPK, МКК3, МКК6, c-Src, Akt, Bcl-xL, фосфо-NF-kB в HUVEC и RAEC. Фосфорилирование белка CREB (Ser133) происходило в HUVEC и в RAEC под действием убаина и среды без калия.

Установлено, что при действии убаина и в бескалиевой среде в RAEC активируется ERK $\frac{1}{2}$, что, возможно, связано с выживанием этих клеток. В HUVEC сигнальный каскад с участием p38 инициируется и в присутствии убаина, и в среде без калия, т.е. он связан, по-видимому, с увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$. Отметим, что в среде без калия HUVEC выживают, а в среде с убаином, который, как и бескалиевая среда, полностью подавляет активность Na, K -АТФазы – умирают. Значит увеличение внутриклеточного соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является необходимым условием для активации p38 MAPK, но недостаточным для индукции смерти HUVEC.

Основываясь на этом, мы можем сделать вывод, что выживание RAEC в присутствии КТС обусловлено сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии КТС с $\alpha 1R$ -, но не с $\alpha 1S$ -субъединицей Na, K -АТФазы. Смерть клеток, напротив, обусловлена сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии с $\alpha 1S$ -, но не с $\alpha 1R$ -субъединицей Na, K -АТФазы. Для выживания клеток наличие $\alpha 1R$ -, но не $\alpha 1S$ - Na, K -АТФазы, является определяющим фактором. Роль увеличения

внутриклеточного соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в функционировании этих сигнальных каскадов остается пока недостаточно изученным.

ВЫВОДЫ

1. Убаин в концентрации 3 мкМ приводит к смерти клеток эндотелия человека (HUVES), содержащих КТС-чувствительную ($\alpha 1S$) изоформу Na,K-АТФазы. Эта смерть характеризуется 6-кратным увеличением активности каспазы-3 и распадом хроматина. В концентрациях до 3000 мкМ убаин не влияет на жизнеспособность клеток эндотелия крысы (RAEC), содержащих резистентную ($\alpha 1R$) изоформу Na,K-АТФазы. При этом 3 и 3000 мкМ убаина вызывают одинаковое увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в HUVES и RAEC соответственно. Подавление активности Na,K-АТФазы в среде без калия не влияет на жизнеспособность обоих типов клеток.
2. Отсутствие цитотоксического действия убаина на клетки грызунов вызвано наличием в них $\alpha 1R$ -субъединицы Na,K-АТФазы.
3. Зависимость ингибирования $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи от концентрации убаина, дигоксина и маринобуфагенина при добавлении его в среду инкубации описывается гиперболической кривой с близкими значениями IC_{50} . При ингибировании $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы в этих же условиях значение IC_{50} примерно в ~100 раз выше для убаина и дигоксина в сравнении с $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы. Маринобуфагенин не оказывает ингибирующего действия на $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы в концентрации до 500 мкМ.
4. Убаин и дигоксин являются псевдонеобратимыми ингибиторами $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы при связывании с конформацией E2-P, ингибиторы взаимодействуют с двумя центрами связывания с положительными кооперативными взаимодействиями между ними. Маринобуфагенин является обратимым ингибитором $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы. Убаин, дигоксин и маринобуфагенин связываются с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазой в конформации E1 и E2-P обратимо или не связываются вообще (маринобуфагенин).
5. Методом изотермической калориметрии титрования показано, что константа диссоциации для комплекса $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы в конформации E2-P при 37°C увеличивается в ряду убаин, дигоксин, маринобуфагенин; основной вклад в энергию связывания вносит энтальпийный фактор.
6. В результате связывания всех трех КТС на поверхности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы в конформации E2-P экспонируется дополнительный участок расщепления полипептидной

цепи трипсином. Методом ограниченного трипсинолиза не обнаружено видимых изменений конформации $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы при связывании КТС.

7. Путем молекулярного моделирования создана модель структуры центра связывания КТС с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазой, согласующаяся с полученными данными, характеризующими связывание и механизм ингибирования фермента КТС.

8. В RAEC при действии убаина и в среде без калия происходит увеличение количества фосфорилированной формы ERK1 и ERK2 в $\sim 2,5$ и ~ 4 раза соответственно. В HUVES при действии убаина и в бескальевой среде происходит увеличение ~ 2 раза содержания фосфорилированной p38 MAPK.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science (WoS), Scopus, RSCI:

1. Akimova O.A., **Tverskoi A.M.**, Smolyaninova L.V., Mongin A.A., Lopina O.D., La J, Dulin N.O., Orlov S.N. Critical role of the $\alpha 1$ -Na⁺,K⁺-ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain // Apoptosis, 2015; 20(9):1200-1210. **Impact Factor (IF) 4.021 (WoS).**
2. Orlov S.N., Klimanova E.A., **Tverskoi A.M.**, Vladychenskaya E.A., Smolyaninova L.V., Lopina O.D. Na⁺_i, K⁺_i-Dependent and-Independent Signaling Triggered by Cardiotonic Steroids: Facts and Artifacts // Molecules, 2017; 22(4):635. **IF 3.380 (WoS).**
3. **Тверской А.М.**, Сидоренко С.В., Климанова Е.А., Акимова О.А., Смольянинова Л.В., Лопина О.Д. и Орлов С.Н. Влияние убаина на пролиферацию эндотелиальных клеток человека коррелирует с изменением активности Na⁺,K⁺-АТФазы и соотношением внутриклеточных концентраций Na⁺ и K⁺ // Биохимия (Москва), 2016, том 81, выпуск 8, с. 1112-1121. **IF 2.178 (RSCI).**
4. Klimanova E.A., **Tverskoi A.M.**, Koltsova S.V., **Sidorenko S.V.**, **Lopina O.D.**, Tremblay J., Hamet P., Kapilevich L.V., **Orlov S.N.** Time- and dose dependent actions of cardiotonic steroids on transcriptome and intracellular content of Na⁽⁺⁾ and K⁽⁺⁾: a comparative analysis. Sci Rep., 2017;7:45403. doi:10.1038/srep45403. **IF 4.525 (WoS).**
5. **Тверской А.М.**, Локтева В.А., Орлов С.Н., Лопина О.Д. Изменение конформации резистентной и чувствительной к кардиотоническим стероидам $\alpha 1$ -Na,K-АТФазы из почек при связывании убаина, дигоксина и маринобуфагенина // Биологические мембраны (принята к публикации). **IF 0.598 (RSCI).**

Тезисы докладов:

1. **Тверской А.М.**, Климанова Е.А., Орлов С.Н., Лопина О.Д. Действие карденолидов и буфадиенолидов на резистентную и чувствительную к кардиотоническим стероидам $\alpha 1$ - Na,K-АТФазу из почек: сравнительный анализ // Научные труды II объединенного научного форума: VI Съезда физиологов СНГ, VI Съезда биохимиков России и IX Российского симпозиума «Белки и пептиды». СПЕЦВЫПУСК. – Т. 2. – Сочи, 2019. – С. 88-89.
2. **Тверской А.М.**, Локтева В.А., Орлов С.Н., Лопина О.Д. Изменение конформации резистентной и чувствительной к кардиотоническим стероидам $\alpha 1$ -Na,K-АТФазы при связывании убаина, дигоксина и маринобуфагенина // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. – Т.1 – Пущино, 2019. – С. 181-185.
3. Лопина О.Д., Климанова Е.А., **Тверской А.М.** Na,K-АТФазы как рецептор кардиотонических стероидов: эффекты, зависимые и независимые от транспорта Na^+ // Научные труды II объединенного научного форума: VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». СПЕЦВЫПУСК. – Т. 1. – Сочи, 2019. – С. 108-108.
4. Акимова О.А., **Тверской А.М.**, Смольянинова Л.В., Монгин А.А., Лопина О.Д., Ла Дж, Дулин Н.О., Орлов С.Н. Отсутствие цитотоксического действия кардиотонических стероидов в клетках грызунов: роль $\alpha 1$ субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы // XXIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов». Секция "Биология". – Т. 1 – Москва, 2016. - С. 90-90.
5. **Тверской А.М.**, Акимова О.А., Смольянинова Л.В., Монгин А.А., Лопина О.Д., Ла Дж, Дулин Н.О., Орлов С.Н. Отсутствие цитотоксического действия кардиотонических стероидов в клетках грызунов: роль $\alpha 1$ субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. – Т. 2. – Пущино, 2015. – С. 683-688.
6. **Тверской А.М.**, Сидоренко С.В., Климанова Е.А., Акимова О.А., Смольянинова Л.В., Лопина О.Д., Орлов С.Н. Влияние убаина на пролиферацию эндотелиальных клеток человека коррелирует с изменением активности Na^+, K^+ -АТФазы и соотношением внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. ACTA NATURAE. СПЕЦВЫПУСК. – Т. 2. – Сочи, 2016. – С. 76-77.