

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Тверской Артём Михайлович

**АНАЛИЗ МЕХАНИЗМА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
КАРДИОТОНИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ**

03.01.04 - Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Орлов Сергей Николаевич

доктор биологических наук, профессор
Лопина Ольга Дмитриевна

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Структура и изоформы Na,K-АТРазы	12
1.1.1. Структурная организация Na,K-АТРазы	12
1.1.2. Изоформы Na,K-АТРазы	16
1.2. Каталитический цикл и конформационные изменения Na,K-АТРазы	18
1.3. Катион-связывающие центры Na,K-АТРазы	20
1.4. Протеолиз α-субъединицы Na,K-АТРазы как метод исследования конформационных состояний фермента.....	23
1.5. Регуляция активности Na,K-АТРазы.....	25
1.6. Na,K-АТРаза как мишень кардиотонических стероидов.....	27
1.6.1. Кардиотонические стероиды.....	27
1.6.2. Na,K-АТРаза как рецептор кардиотонических стероидов	30
1.6.2.1. Связывание убаина в конформации E2	30
1.6.2.2. Связывание убаина в конформации E2-P.....	34
1.6.2.3. Связывание дигоксина в конформации E2-P и буфалина в конформации E2	37
1.6.3. Различие в чувствительности изоформ Na,K-АТРазы к КТС.....	38
1.6.4. Зависимость сродства Na,K-АТРазы к кардиотоническим стероидам от рН и строения КТС	40
1.7. Кардиотонические стероиды как регуляторы клеточной смерти	41
1.8. Кардиотонические стероиды как индукторы Na^+,K^+ - опосредованных и независимых сигнальных каскадов	45
1.8.1. Инотропный эффект.....	46
1.8.2. Внутриклеточная концентрация одновалентных ионов регулирует транскрипцию генов .46	
1.8.3. Внутриклеточная концентрация одновалентных ионов регулирует трансляцию генов.....48	
1.8.4. Влияние КТС на плотные контакты и адгезию клеток.....	48
1.8.5. КТС как триггеры Na^+,K^+ -независимых сигналов	49
1.9. Возможные механизмы цитотоксического действия КТС	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	58
2.1. Материалы	58
2.2. Методы	59
2.2.1. Культуры клеток.....	59

2.2.1.1. Эндотелиальные клетки человека HUVEC.....	59
2.2.1.2. Эндотелиальные клетки крысы RAEC.....	59
2.2.1.3. Гладкомышечные клетки аорты мыши.....	60
2.2.1.4. Трансфекция.....	60
2.2.2. Фазово-контрастная микроскопия.....	60
2.2.3. Измерение внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+	61
2.2.4. Оценка жизнеспособности клеток.....	61
2.2.5. Приготовление образцов для иммуноблоттинга.....	62
2.2.6. Получение фракции микросом из почек свиньи и крысы.....	62
2.2.7. Очистка Na,K-АТФазы.....	64
2.2.8. Измерение концентрации белка методом Бредфорда.....	64
2.2.9. Измерение концентрации белка методом Лоури.....	64
2.2.10. Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг.....	65
2.2.11. Метод усиленной хемилюминисценции (ECL).....	66
2.2.12. Определение активности Na,K-АТФазы по накоплению F_n	66
2.2.13. Определение активности Na,K-АТФазы с использованием системы сопряженных реакций.....	67
2.2.14. Исследование ингибирования Na,K-АТФазы под действием КТС и расчет IC_{50}	68
2.2.15. Изучение обратимости связывания кардиотонических стероидов с Na,K-АТФазой в разных конформациях.....	68
2.2.16. Трипсинолиз Na,K-АТФазы.....	69
2.2.17. Регистрация параметров связывания кардиотонических стероидов методом изотермической калориметрии титрования.....	70
2.2.17.1. Метод изотермической калориметрии титрования.....	70
2.2.17.2. Проведение изотермической калориметрии титрования.....	72
2.2.18. Молекулярное моделирование.....	73
2.2.19. Хромато-масс-спектрометрический анализ.....	74
2.2.20. Статистический анализ.....	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	76
3.1. Действие убаина на ионный баланс и жизнеспособность клеток эндотелия человека и крысы.....	76
3.2. Роль $\alpha 1$-субъединицы Na,K-АТФазы в смерти/выживании клеток.....	79
3.3. Выделение и характеристика препаратов Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы, содержащих $\alpha 1S$- и $\alpha 1R$-изоформу фермента соответственно.....	82

3.4. Ингибирование $\alpha 1S$- и $\alpha 1R$-Na,K-АТРазы убаином, дигоксином и маринобуфагенином	85
3.5. Исследование типа ингибирования $\alpha 1S$- и $\alpha 1R$-Na,K-АТРазы убаином, дигоксином и маринобуфагенином	88
3.5.1. Исследование ингибирования $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы в конформации E2-P	90
3.5.2. Исследование ингибирования $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы в конформации E1	93
3.5.3. Исследование типа ингибирования $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы из почек крысы убаином, дигоксином и маринобуфагенином	96
3.6. Изучение взаимодействия $\alpha 1S$- и $\alpha 1R$-Na,K-АТРазы с КТС методом изотермической калориметрии титрования	97
3.7. Ограниченный трипсинолиз комплексов КТС-Na,K-АТРаза из почек свиньи и крысы	102
3.7.1. Ограниченный трипсинолиз комплексов убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРАЗой из почек свиньи	102
3.7.2. Ограниченный трипсинолиз комплексов убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1R$ -Na,K-АТРАЗой из почек крысы	105
3.8. Моделирование участка связывания с убаином, дигоксином и маринобуфагенином $\alpha 1S$- и $\alpha 1R$-субъединиц Na,K-АТРазы в конформации E2-P	106
3.8.1. Моделирование участка связывания $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы с маринобуфагенином	108
3.8.2. Моделирование участка связывания $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы с убаином, дигоксином и маринобуфагенином	110
3.9. Действие убаина и среды без калия на интермедиаты сигнальных каскадов, опосредованных МАРК в клетках эндотелия человека и крысы	114
3.9.1. Митоген-активируемые протеинкиназы	115
3.9.2. Тирозиновая протеинкиназа c-Src	119
3.9.3. PI3K p85 и Akt протеинкиназы	120
3.9.4. Белки семейства Vcl-2	121
3.9.5. Транскрипционные факторы CREB и NF- κ B	122
3.9.6. Предполагаемая модель	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ	132
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	134
ПРИЛОЖЕНИЕ	153

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

$\alpha 1S$ – альфа один чувствительная к действию кардиотонических стероидов изоформа

$\alpha 1R$ – альфа один резистентная к действию кардиотонических стероидов изоформа

5-ИАФ – 5-иодацетамидфлуоресцеин

$[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация Ca^{2+}

$[K^+]_i$ – внутриклеточная концентрация K^+

$[Na^+]_i$ – внутриклеточная концентрация Na^+

$[Na^+]_i/[K^+]_i$ – внутриклеточное соотношение концентраций Na^+ и K^+

ADP – аденозиндифосфат

Akt - протеинкиназа B

Ala - аланин

AMP – аденозинмонофосфат

Arg – аргинин

Asn – аспарагин

Asp – аспарагиновая кислота (аспартат)

ATF 4 – фактор активации транскрипции 4

ATP – аденозинтрифосфат

C7-MDCK – линия клеток эпителия почек собаки

Caco-2 – эпителиальные клетки почек человека

CHAPS - $C_{32}H_{58}N_2O_7S$

СНО – линия клеток яичников китайских хомячков

Cys - цистеин

DMEM – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла

DTT – дитиотреитол

ECL – метод усиленной хемолюминисценции

eIF2a - фактора инициации 2 у эукариот

EGF(R) – эпидермальный фактор роста

ERK1/2 – протеинкиназы, активируемые внеклеточными сигналами

Gln – глутамин

Glu – глутаминовая кислота (глутамат)

Gly - глицин

GSK – киназа гликогенсинтетазы

His - гистидин

HeLa – линия клеток, полученных из раковой опухоли шейки матки Генриетты Лакс

HUVEC – эндотелиальные клетки из пупочной вены человека

Ile - изолейцин

ITC – изотермическая калориметрия титрования

JNK – стресс-активируемые протеинкиназы

Leu - лейцин

Lys – лизин

M1, M2, ... M10 – трансмембранные домены α -субъединицы Na,K-АТРазы

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа

MAPKAP-2 - активируемая митоген-активируемой протеинкиназой киназа-2

MASMC – гладкомышечные клетки аорты мыши

Met – метионин

MSK-1 - митоген- и стресс-активируемая киназа 1

Na,K-АТРаза - Na^+ , K^+ -активируемая, Mg^{2+} -зависимая аденозинтрифосфогидролаза

NAD^+ – никотинамидадениндинуклеотид окисленный

NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

NF- κ B – ядерный фактор «каппа-би»

РАЕС – эндотелиальные клетки аорты свиньи

Phe - фенилаланин

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PKA – цикло-АМР-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа А)

PKB – протеинкиназа В

PKC – Ca^{2+} диацилглицерол-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа С)

PKG – цикло-GMP-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа G)

PMSF – фенилметансульфонилфторид

Pro - пролин

РАЕС – эндотелиальные клетки из аорты крысы

Raf – семейство серин/треониновых протеинкиназ

Ras – семейство белков, регулирующих процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и морфологии

RASMC – гладкомышечные клетки аорты крысы

Ser – серин

SDS – додецилсульфат натрия

Thr – треонин

Trp - тирптофан

Tyr – тирозин

Val - валин

VSMC – клетки гладкой мускулатуры сосудов крысы

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ГМК – гладкомышечные клетки крысы

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКТ – изотермическая калориметрия титрования

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КТС – кардиотонические стероиды

Ки – кюри

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

РНК – рибонуклеиновая кислота

Трис – трис(гидроксиметил)метиламин

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

ТСБ – трис-солевой буфер

ТСБТ – трис-солевой буфер с твином

ФЕП – фосфоенолпируват

ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат

Ф_н – фосфат неорганический

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФСБТ - фосфатно-солевой буфер с твином

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭФ – электрофорез

ВВЕДЕНИЕ

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, присутствующий в плазматической мембране всех клеток животных и осуществляющий перенос ионов Na^+ и K^+ через мембрану против электрохимического градиента, используя для этого энергию, высвобождающуюся при гидролизе АТФ. В состав Na,K-АТРаза входит как минимум 2 типа субъединиц: каталитическая α - и регуляторная β -субъединица, причем в различных тканях эти субъединицы представлены разными изоформами. Из $\alpha\beta$ -протомеров могут формироваться функциональные олигомеры Na,K-АТРаза ($\alpha\beta$)₂. В некоторых тканях в состав фермента входит небольшая регуляторная γ -субъединица, являющаяся представителем семейства белков FXYD.

Благодаря работе Na,K-АТРаза на плазматической мембране поддерживается потенциал покоя, в возбудимых тканях возможна генерация потенциала действия. Создаваемый за счет работы Na,K-АТРаза 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) или сердечные гликозиды – ряд структурно-родственных соединений, первоначально полученных в очищенном состоянии из листьев наперстянки (*Digitalis purpurea* и *Digitalis lanata*), а также из кожи жаб рода *Bufo*. КТС являются специфическими ингибиторами Na,K-АТРаза, некоторые из них давно используются для лечения сердечной недостаточности.

Наряду с перечисленными выше каноническими функциями Na,K-АТРаза в последнее время появилось большое количество данных, свидетельствующих о том, что при действии КТС в клетках активируются сигнальные каскады с участием протеинкиназ Ras/Raf/MEK/ERK_{1/2} (p44/42 MAPK), p38, JNK и активных форм кислорода, приводящие к активации экспрессии ряда генов. В этой связи исследователи рассматривают Na,K-АТразу как рецептор для КТС, который после их связывания может взаимодействовать с другими белками, ассоциированными с мембраной, и запускать разные сигнальные каскады вне зависимости или совместно с ингибированием ионных потоков и изменением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ внутри клетки.

Существует большое количество данных, показывающих, что сродство к КТС $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТРаза у грызунов в 1000 раз меньше, чем у других млекопитающих. Ранее в нашей лаборатории было показано, что 24 ч инкубация с высокими концентрациями убаина клеток эпителия почек собаки (MDCK), которые экспрессируют чувствительную (sensitive) к действию КТС $\alpha 1$ S-субъединицу Na,K-АТРаза, вызывает их гибель. Однако трансфекция rезистентной к действию КТС $\alpha 1$ R-субъединицы Na,K-АТРаза в эти клетки предотвращала их

смерть. На этих же клетках проводилось сравнение эффектов двух представителей кардиотонических стероидов – убаина и маринобуфагенина на активность Na,K-АТФазы и жизнеспособность. Было показано, что в присутствии 1 мкМ убаина и маринобуфагенина наблюдается одинаковое уменьшение АТФазной активности (~2 раза). Однако несмотря на подобное убаину ингибирование Na,K-АТФазы, маринобуфагенин, в отличие от убаина, вплоть до концентрации более 10 мкМ не вызывал смерть клеток.

Более того, убаин и маринобуфагенин, связываясь в одном и том же центре, вызывают различные конформационные переходы Na,K-АТФазы из солевых желез утки (экспрессирует $\alpha 1S$ -субъединицу), что может вызывать различные физиологические эффекты. По-видимому, Na,K-АТФаза в зависимости от конформации может связываться с разными белками-партнерами, запуская различные сигнальные каскады. При этом механизмы, определяющие различный характер влияния КТС на жизнеспособность клеток, остаются малоизученными.

В настоящей работе мы сопоставили действие убаина и бескалиевой среды – двух альтернативных подходов к подавлению активности Na,K-АТФазы, на жизнеспособность клеток эндотелия человека и крысы, и изучили роль $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ - субъединиц Na,K-АТФазы в этих процессах. Затем мы исследовали взаимодействие $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы с тремя КТС: убаином, дигоксином и маринобуфагенином -, уделяя особое внимание изменению конформационного состояния фермента при связывании этих соединений. В заключении мы исследовали сигнальные механизмы, активирующиеся в этих клетках при действии убаина и бескалиевой среды.

Таким образом, **целью диссертационного исследования** стало изучение механизма действия КТС на жизнеспособность клеток, экспрессирующих $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединицы Na,K-АТФазы.

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-АТФазы.
2. Изучить роль $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединиц Na,K-АТФазы в смерти эндотелиальных клеток человека.
3. Изучить влияние убаина, дигоксина и маринобуфагенина на активность и конформационные переходы $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы 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. Полученные в ходе экспериментальной работы новые результаты расширяют представления о механизме цитотоксического действия кардиотонических стероидов. 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-АТФазы соответственно. Впервые показано, что при действии убаина и среды без калия в HUVEC активируется р38 MAPK, в то время как в RAEC - ERK $\frac{1}{2}$ MAPK. Впервые выявлено, что три кардиотонических стероида – убаин, дигоксин и маринобуфагенин - вызывают различные конформационные переходы в очищенной $\alpha 1S$ -и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты данной работы развивают современные представления о механизме цитотоксического действия кардиотонических стероидов. Выявлена ключевая роль $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в механизме клеточной смерти при действии КТС. Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых подходов в лечении различных болезней, таких как противоопухолевая и антиретровирусная терапия, а также терапия 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-АТФазу, вызывает смерть клеток эндотелия человека, не влияя на жизнеспособность клеток эндотелия крысы. Ингибирование Na,K-АТФазы путём преинкубации фермента в среде без калия не влияет на жизнеспособность клеток как 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-АТФазы.

3. Связывание убаина, дигоксина и маринобуфагенина вызывают различные конформационные переходы в $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединицах Na,K-АТФазы.

4. В клетках эндотелия человека при действии убаина и бескалиевой среды активируется р38 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 результатов была проведена на заседании кафедры биохимии биологического факультета МГУ, а также на следующих научных мероприятиях: «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», 2015; «Ломоносов-2016», 2016; «V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России» 2016; «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» 2019; «VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд Биохимиков России» 2019; Результаты работы обсуждались на семинарах лаборатории физико-химии биологических мембран биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова в 2015-2019 г.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №18-34-00308 и РНФ №16-15-10026. При проведении исследований использовалось оборудование, приобретенное за счет средств Программы развития Московского университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ: 4 статьи в периодических изданиях из перечня рецензируемых научных журналов ВАК, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете, и 6 тезисов в сборниках докладов Всероссийских и Международных научных конференций. 1 статья из перечня рецензируемых научных журналов ВАК, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете, 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 Всероссийских и Международных научных конференциях.

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура и изоформы Na,K-АТРаза

Na,K-АТРаза или Na,K-насос (Na^+, K^+ – активируемая, Mg^{2+} – зависимая аденозинтрифосфат фосфогидролаза (КФ 7.2.2.13)) - интегральный белок плазматической мембраны клеток животных. Na,K-АТРаза переносит три иона Na^+ из клетки и два иона K^+ в клетку против их электрохимического градиента. Для переноса катионов используется энергия, освобождающаяся при гидролизе АТФ до АДФ и неорганического фосфата [1,2].

Фермент необходим для выполнения важных физиологических функций: он обеспечивает поддержание потенциала покоя, участвует в генерации потенциала действия в возбудимых клетках, создаваемый им градиент Na^+ необходим для работы симпортеров и антипортеров, обеспечивающих транспорт ионов и метаболитов. Na,K-АТРаза участвует в регуляции объема клетки, внутриклеточного рН, генерации тепла [3]. Кроме того, в клетках почек Na,K-АТРаза участвует в реабсорбции натрия и воды [4].

Na,K-АТРаза принадлежит к суперсемейству АТРаз Р-типа, обеспечивающих перенос ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , Ag^+ , Fe^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} и Cd^{2+}), а также липидов (липидные флиппазы) через мембрану, используя энергию, образующуюся при гидролизе АТФ до АДФ и неорганического фосфата [5,6]. К ним относятся Са-АТРаза плазматических мембран и эндоплазматического ретикулума, Н,K-АТРаза слизистой оболочки желудка, АТРаза, переносящие тяжелые металлы и другие [6]. В процессе своего каталитического цикла все представители суперсемейства АТРаз Р-типа подвергаются конформационным изменениям [6]. АТРаза Р-типа обнаружены в прокариотических и эукариотических клетках. Na,K-АТРаза обнаружена только у позвоночных [2], ракообразных [7], гидры [8] и плоских червей [9,10].

Na,K-АТРаза является единственным известным рецептором кардиотонических стероидов (КТС), связывание которых с ферментом наряду с ингибированием активности Na,K-АТРаза и изменением внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ приводит к активации ряда внутриклеточных сигнальных каскадов, влияющих на пролиферацию и жизнеспособность клеток [11].

1.1.1. Структурная организация Na,K-АТРаза

Na,K-АТРаза представляет собой олигомер, состоящий, как минимум, из двух типов полипептидных цепей (субъединиц): каталитической α - и регуляторной β -субъединицы [12]. Обе субъединицы сочетаются друг с другом в эквимольных соотношениях. В последнее время

установлено, что в некоторых тканях (например, в почках и сердце) в состав фермента входит также регуляторная γ -субъединица, относящаяся к семейству белков FXYD (Рис. 1). Однако белки семейства FXYD способны взаимодействовать не только с Na,K-АТФазой, но и с другими мембранными белками, например, с Na,Ca-обменником, помимо этого они способны взаимодействовать друг с другом, формируя при этом каналы для катионов с неспецифической проводимостью.

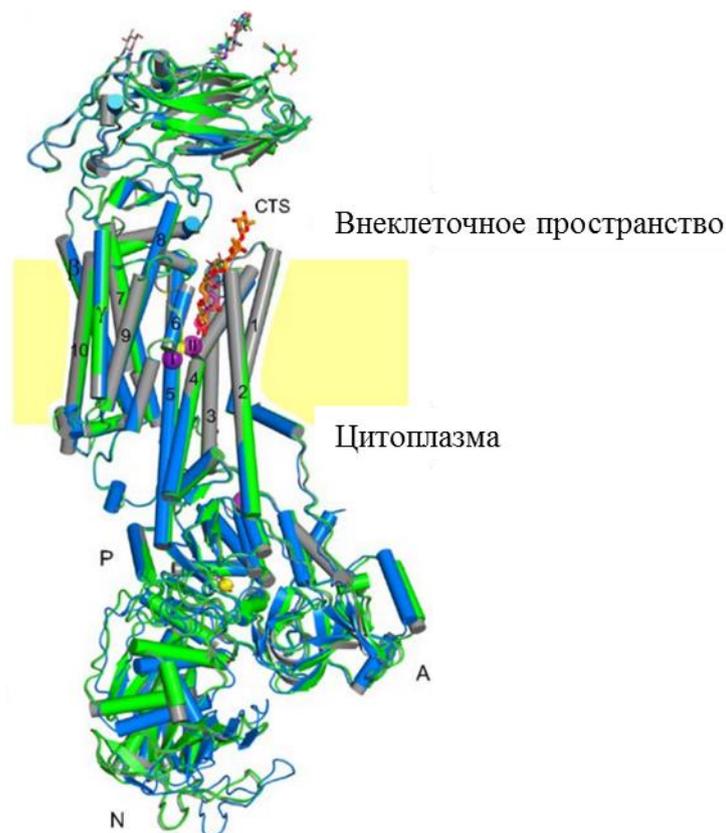


Рис. 1. Структура и расположение Na,K-АТФазы из почек свиньи в составе мембраны. На рисунке представлена модель Na,K-АТФазы ($\alpha\beta\gamma$) в конформации E2-P в комплексе с кардиотоническими стероидами (убаином, дигоксином и буфалином). P – фосфорилируемый домен, N – нуклеотид-связывающий домен, A – актуаторный домен, CTS – кардиотонические стероиды, β – β -субъединица, γ – γ -субъединица. Цифрами 1-10 указаны трансмембранные сегменты (M1-M10) α -субъединицы Na,K-АТФазы [13].

α -Субъединица Na,K-АТФазы с молекулярной массой 100 - 112 кДа [14] состоит из 1002-1039 аминокислотных остатков. В процессе посттрансляционной модификации с N-концевой части могут отщепляться 5 аминокислотных остатков (в $\alpha 1$ и $\alpha 2$ изоформах). Полипептидная цепь α -субъединицы Na,K-АТФазы пересекает мембрану 10 раз, формируя 10 трансмембранных сегментов (M1 - M10), причем N- и C- концевые фрагменты полипептидной цепи располагаются в цитоплазме. Внутриклеточную часть α -субъединицы фермента разделяют на 3 субдомена: N (нуклеотид-связывающий), P (фосфорилируемый) и A (актуаторный). Актуаторный домен включает в себя N-концевой участок и цитоплазматическую петлю между M2 и M3, тогда как

петля между M4 и M5 формирует нуклеотид-связывающий и фосфорилируемый домены, обращенные в цитоплазму (рис.1, 2).

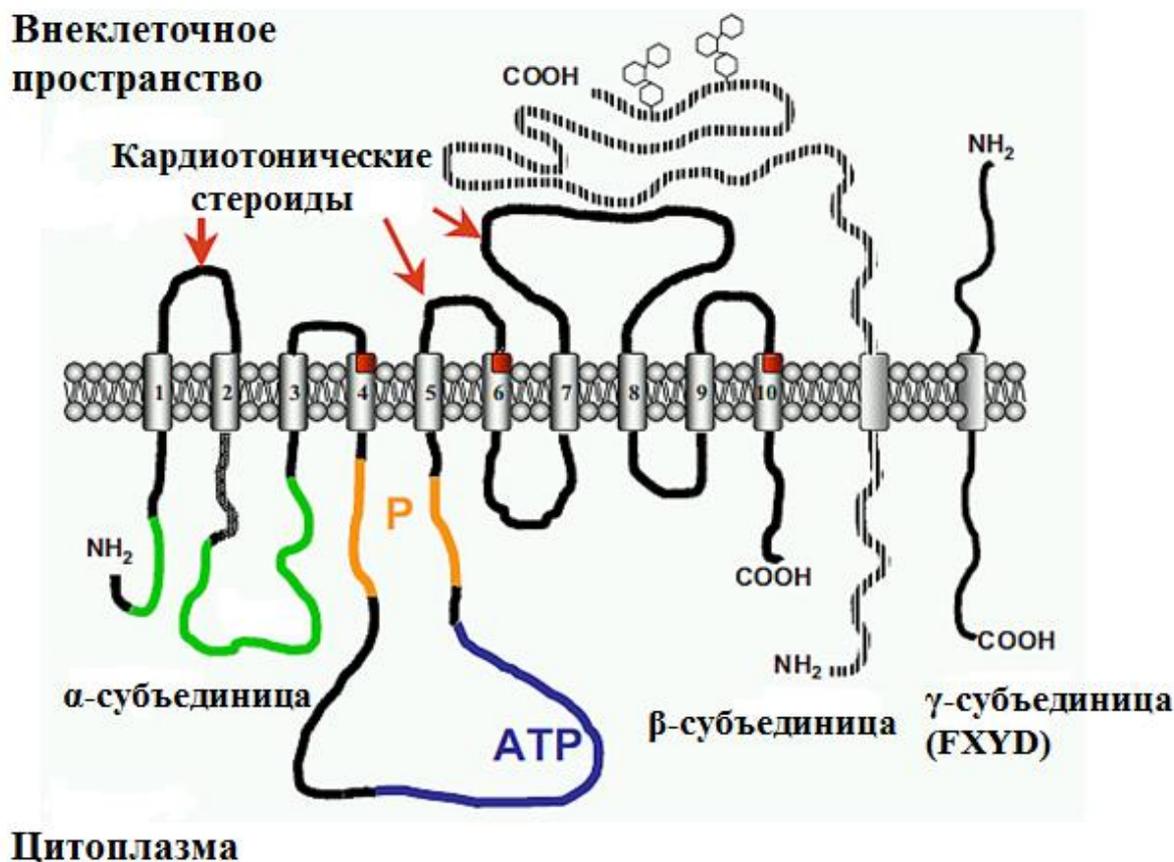


Рис. 2. Схема строения Na,K-АТФазы. Нуклеотид-связывающий домен (синий цвет), фосфорилируемый домен (оранжевый) находятся в цитоплазматической петле между M4 и M5. В N-концевом участке и цитоплазматической петле между M2 и M3 находится актуаторный домен (зеленый). Стрелками показаны участки связывания КТС с внеклеточной стороной α-субъединицы Na,K-АТФазы [15].

В нуклеотид-связывающем домене каталитической субъединицы находится центр связывания АТФ. Он состоит из 8 элементов антипараллельного β-слоя (рис. 3). Фосфорилируемый домен (проксимальная и дистальная часть M4 и M5 соответственно) образован β-слоем из шести параллельных элементов, они формируют 2 складки Россмана, ограниченные по краям одним параллельным и одним антипараллельным β-элементом [5,16] (рис. 3).

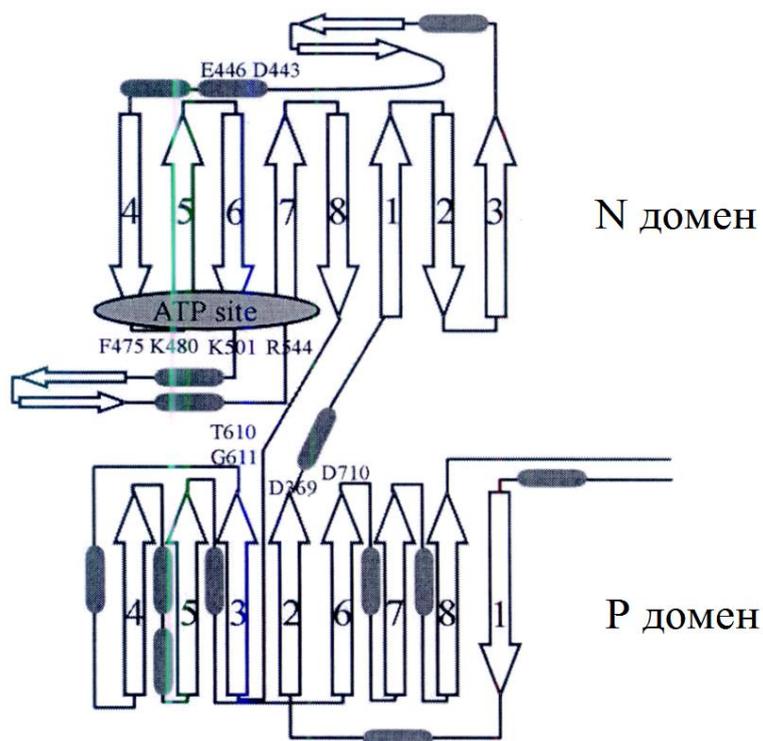


Рис. 3. Структура N- и P-доменов α -субъединицы Na,K-АТРазы [17].

β -Субъединица Na,K-АТРазы - гликопротеид с молекулярной массой белковой части 35 кДа, в результате ее посттрансляционной модификации путем гликозилирования молекулярная масса увеличивается до 40-66 кДа (в зависимости от типа ткани) [18]. β -субъединица не принимает непосредственного участия в катализе, но влияет на сродство α -субъединицы к транспортируемым катионам. В клетках позвоночных она может выступать в роли шаперона, контролирующего правильное сворачивание α -субъединицы и её последующее встраивание в плазматическую мембрану [10]. Если контроль над этими процессами со стороны β -субъединицы устраняется, то фермент после выхода из эндоплазматического ретикулума полностью расщепляется протеазами. β -субъединица имеет один трансмембранный домен. В отличие от α -субъединицы, основная часть β -субъединицы экспонирована во внеклеточное пространство [19]. Её углеводная часть располагается с наружной стороны плазматической мембраны и играет важную роль в формировании межклеточных контактов [20] (рис. 1, 2). Кроме того, β -субъединица Na,K-АТРазы участвует в обеспечении клеточной подвижности, в формировании десмосом и запирающих межклеточных контактов, онкогенной трансформации [21].

В состав β -субъединицы входит около 300 аминокислот, ее N-концевая часть находится в цитозоле, а C-концевая - во внеклеточном пространстве. β -Субъединица взаимодействует внутри мембраны с мембранными сегментами M7 и M10 α -субъединицы, находясь ближе к

фрагменту M7 [22]. В составе β -субъединицы Na,K-АТРаза имеется глициновая «молния» (последовательность аминокислот GxxxGxxxG), которая, по-видимому, необходима для образования $\alpha\beta$ -комплексов. Структура внеклеточного домена β -субъединицы стабилизируется с использованием трех консервативных дисульфидных связей, которые важны для нормального функционирования Na,K-АТРаза [23].

Минимальной функциональной единицей Na,K-АТРаза является комплекс состоящий из α - и β -субъединиц - протомер $\alpha\beta$ [24,25]. Сама β -субъединица не подвергается гидролизу трипсином, более того, образование комплекса из α - и β -субъединиц приводит к увеличению устойчивости α -субъединицы к трипсинолизу (время полужизни одной α -субъединицы – 2 ч, протомера $\alpha\beta$ порядка 20 ч). В отсутствие β -субъединицы каталитическая субъединица не способна изменять конформацию и связывать лиганды [21,26]. Ассоциация этих двух субъединиц происходит в эндоплазматическом ретикулуме [27,28]. Было показано, что Na,K-АТРаза, перемещаясь в мембране путем латеральной диффузии, способна образовывать более сложные комплексы олигомеров: $(\alpha\beta)_2$ и $(\alpha\beta)_4$. Ключевую роль в формировании димеров $(\alpha_2\beta_2)$ принимает цитоплазматическая петля, находящаяся в α -субъединице (между M4 и M5) [25]. Стоит отметить, что димер $(\alpha_2\beta_2)$ полностью выполняет каталитические функции фермента [29]. В настоящий момент роль образования сложных комплексов олигомеров Na,K-АТРаза остается не совсем понятной. Наличие функционально активного протомера $(\alpha\beta)$, а также димера $(\alpha_2\beta_2)$ и тетрамера $(\alpha_4\beta_4)$, по-видимому, необходимо для выполнения определенных функций, таких как, взаимодействие с белками-партнёрами, специфическими ингибиторами или для регуляции активности фермента [30,31].

1.1.2. Изоформы Na,K-АТРаза

Как и многие присутствующие в клетке белки, Na,K-АТРаза представлена несколькими изоформами. У позвоночных обнаружены 4 изоформы α -субъединицы (α_1 , α_2 , α_3 , α_4) и 3 изоформы β -субъединицы (β_1 , β_2 , β_3), кодируемые разными генами.

α_1 -Субъединица, обнаруженная во всех типах тканей, является единственной в целом ряде клеток, включая клетки эпителия почек [32,33]. Изоформа α_2 - преобладает в адипоцитах, астроцитах, нервной ткани, желудочках сердца, скелетных мышцах, легких [34]. α_3 -Субъединица обнаружена в центральной и периферической нервной ткани, скелетных мышцах, кишечнике, эритроцитах [2,15,34]. α_4 -Субъединица фермента выявлена только в семенниках [34,35].

Гомология в первичной последовательности между одной изоформой α -субъединицы у разных видов выше (92% для α_1 и α_2 , α_3 более 96%), чем гомология между разными изоформами одного вида (для α_1 , α_2 и α_3 минимальная гомология 87%, для α_1 и α_4 - 78%) [36]. Структурных

различий между изоформами α -субъединицы Na,K-АТРазы в области трансмембранного домена, а также в участках контакта с β - и γ -субъединицами не обнаружено. Эти элементы высоко консервативны и играют ключевую роль в функционировании фермента. Однако у разных изоформ Na,K-АТРазы существуют структурные различия в организации цитоплазматического домена, благодаря чему, по-видимому, определяется специфичность взаимодействия изоформ с белками-партнерами, участвующими в регуляции функционирования клетки (Рис. 4) [5].

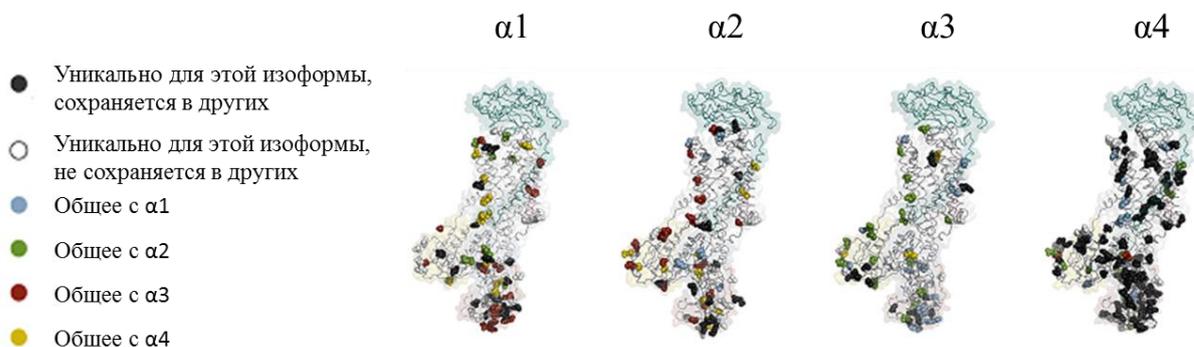


Рис. 4. Модель, представляющая различия в аминокислотных остатках четырех α -изоформ Na,K-АТРазы человека. Различия выделены в виде сфер [34].

Изоформы α -субъединицы различаются по сродству к АТР, ионам активаторам и специфическому ингибитору – убаину, принадлежащему к классу кардиотонических стероидов (КТС) [37]. В клетках грызунов экспрессируется резистентная к КТС $\alpha 1R$ -изоформа ($\alpha 1R$) Na,K-АТРазы, сродство которой к этим ингибиторам снижено в 1000 раз по сравнению с $\alpha 1S$ -чувствительной изоформой Na,K-АТРазы ($\alpha 1S$), обнаруженной в клетках других млекопитающих. Это обусловлено заменой в $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазае двух аминокислотных остатков, расположенных в трансмембранных сегментах M1 и M2: глутамина (M1) и аспарагина (M2) в позициях 111 и 122 на остатки аргинина и аспарагиновой кислоты в $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазае [38]. При этом $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформы Na,K-АТРазы грызунов имеют схожую с другими млекопитающими чувствительность к КТС [39]. Более того, устойчивость к протеолизу может различаться в зависимости от изоформы α -субъединицы. Так $\alpha 3$ -изоформа более устойчива к трипсину, чем $\alpha 2$ [40].

$\beta 1$ -субъединица синтезируется почти во всех тканях. $\beta 2$ -изоформа представлена главным образом в нервной ткани, где она обеспечивает также адгезию клеток, кишечнике, эритроцитах, сердце, печени, предстательной железе и в скелетных мышцах [34,41]. $\beta 3$ -субъединица обнаружена в тканях семенников, предстательной железе, сердце, печени и легких. Гомология в первичной последовательности между одной изоформой β -субъединицы у разных видов высока (около 90%) по сравнению с гомологией между разными изоформами одного вида (39% между $\beta 1$ и $\beta 2$, 36% между $\beta 1$ и $\beta 3$, 47% между $\beta 2$ и $\beta 3$) [34,41,42].

Сродство Na,K-АТФазы к ионам Na^+ и K^+ зависит от того, какая изоформа β -субъединицы входит в состав фермента. Так для Na^+ чувствительность увеличивается в ряду $\alpha 3\beta 1 < \alpha 3\beta 2 = \alpha 1\beta 1 < \alpha 2\beta 1 < \alpha 2\beta 2$ [10].

γ -Субъединица Na,K-АТФазы является представителем семейства FXYD, содержащие в своей аминокислотной последовательности FXYD мотив на N-конце [43]. У млекопитающих найдено 7 белков данного семейства. FXYD-белки пронизывают мембрану 1 раз, причем N-конец находится во внеклеточном пространстве, а C-конец в цитозоле [44,45].

В настоящее время показано ткане-специфичное взаимодействие Na,K-АТФазы с 5 представителями семейства FXYD, влияющее на активность фермента. FXYD 1 или фосфолеман экспрессируется в сердце, скелетных мышцах и нервной ткани [46,47]. В сердце фосфолеман может быть фосфорилирован протеинкиназами А и С по двум остаткам серина [48–50]. Такое фосфорилирование влияет на взаимодействие Na,K-АТФазы с микротрубочками [49], а также увеличивает активность фермента [51]. Na,K-АТФаза в почках ассоциирована с FXYD2 - белком, получивший название γ -субъединицы. Молекулярная масса γ -субъединицы из почек овцы 7,4 кДа, она состоит из 58 аминокислот. γ -Субъединица снижает активность Na,K-АТФазы [52], по-видимому, за счет стабилизации структуры фермента [21].

В собирательных почечных трубках почек экспрессируется белок FXYD4, который в отличие от большинства представителей данного семейства белков, увеличивает чувствительность Na,K-АТФазы к натрию, что приводит к увеличению активности фермента [53]. FXYD6 и FXYD 7 экспрессируются в нервной ткани [54]. Роль FXYD3 и FXYD5 до сих пор непонятна, однако было показано, что их экспрессия увеличивается в раковых клетках [55,56].

1.2. Каталитический цикл и конформационные изменения Na,K-АТФазы

Модель кинетического цикла фермента была предложена в начале 60-х годов 20 века Альберсом и Постом [57] (рис. 5). В этой схеме Na,K-АТФаза претерпевает последовательную смену двух основных конформационных состояний E1 и E2, которые различаются по сродству к переносимым катионам и КТС, а также подвергается фосфорилированию – дефосфорилированию по аминокислотному остатку Asp 369.

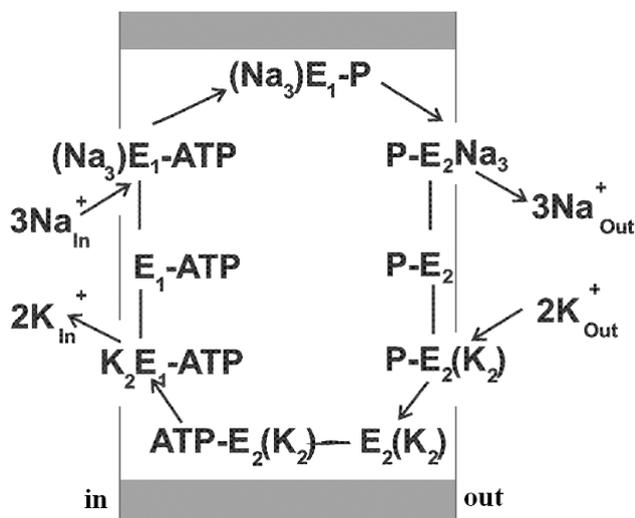


Рис. 5. Каталитический цикл Na,K-АТРаза, модифицированная схема Альберса – Поста [57,58]. E1 и E2 – конформационные состояния Na,K-АТРаза с высоким сродством к Na^+ и K^+ соответственно.

Каталитический цикл начинается со связывания АТФ и ионов Na^+ со стороны цитоплазмы, когда Na,K-АТРаза находится в конформационном состоянии E1, обладающим высоким сродством к этим лигандам. Далее происходит перенос терминального фосфорильного остатка АТФ на остаток аспарагиновой кислоты α -субъединицы Na,K-АТРаза (Asp 369) с образованием ковалентной ацилфосфатной связи. В результате этого происходит формирование фосфоинтермедиата E1-P и высвобождение ADP в цитоплазму. При этом Na,K-АТРаза переходит в новое конформационное состояние, в котором связанные с ним ионы натрия не способны высвободиться ни в цитоплазму, ни во внеклеточное пространство (они окклюдированы в мембране). В этом состоянии происходит связывание ионов Mg^{2+} , инициирующие переход фермента из конформации E1-P в E2-P, что в свою очередь приводит к перемещению ионов Na^+ через мембрану (рис. 6).

В конформационном состоянии E2 сродство к Na^+ уменьшается, и поскольку выход из канала в цитоплазму закрыт, происходит освобождение трех ионов Na^+ во внеклеточное пространство. После чего два внеклеточных иона K^+ связываются с теми же участками α -субъединицы Na,K-АТРаза и окклюдированы ферментом. Связывание K^+ сопровождается гидролизом ацилфосфатной связи, высвобождением в цитоплазму неорганического фосфата и переходом фермента из конформации E2 в E1 (рис. 5, 6) [34]. Стоит отметить, что в ходе каталитического цикла значительные конформационные перестройки происходят в цитоплазматической части фермента.

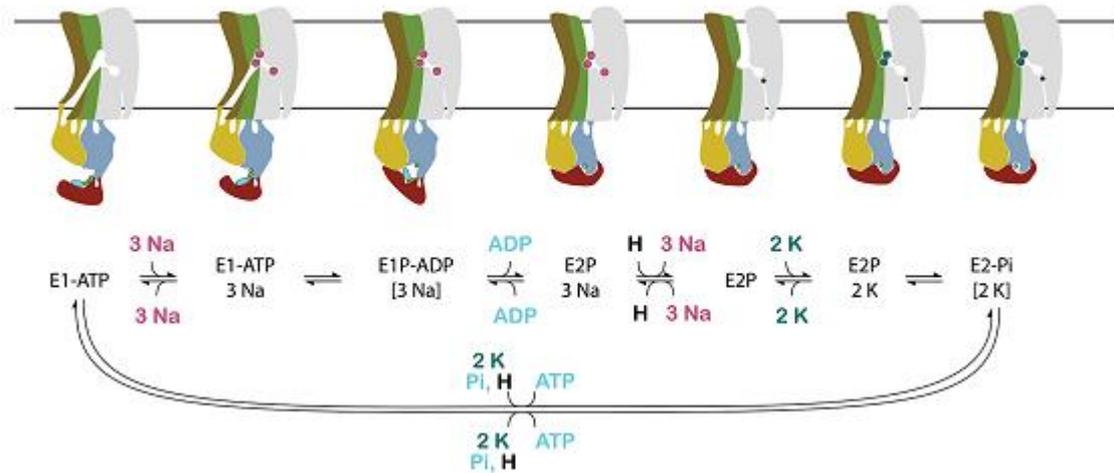


Рис. 6. Схема конформационных изменений Na,K-АТФазы в процессе каталитического цикла [34].

1.3. Катион-связывающие центры Na,K-АТФазы

Как уже отмечалось выше, α -субъединица Na,K-АТФазы содержит участки связывания цитоплазматического Na^+ (высокое сродство в конформации E1) и внеклеточного K^+ (высокое сродство в конформации E2). Путем определения стехиометрии и кинетики связывания было установлено, что фермент кооперативно связывает три иона Na^+ , причем один из центров связывания формируется после взаимодействия со связывающими центрами первых двух ионов [59,60]. Сопоставление трёхмерной структуры фермента в двух этих конформациях позволило получить информацию о структуре центров связывания для катионов (рис. 7). Согласно данным рентгеноструктурного анализа белка в конформации E1 [59], участки связывания Na^+ (I, II и III) располагаются внутри трансмембранной части α -субъединицы (между трансмембранными α -спиралями M4, M5, M6 и M8) на глубине около одной трети от толщины мембраны и ближе к ее цитоплазматической поверхности). В формировании участков связывания натрия основное участие принимают следующие аминокислоты:

- участок I: Ala323, Glu779, Asp804, Asp808, Thr772, Ser775, Asn776;
- участок II: Val322, Ala323, Val325, Glu327, Asp804;
- участок III: Tyr771, Thr772, Thr774, Ser775, Asp808, Gln923, Asp926.

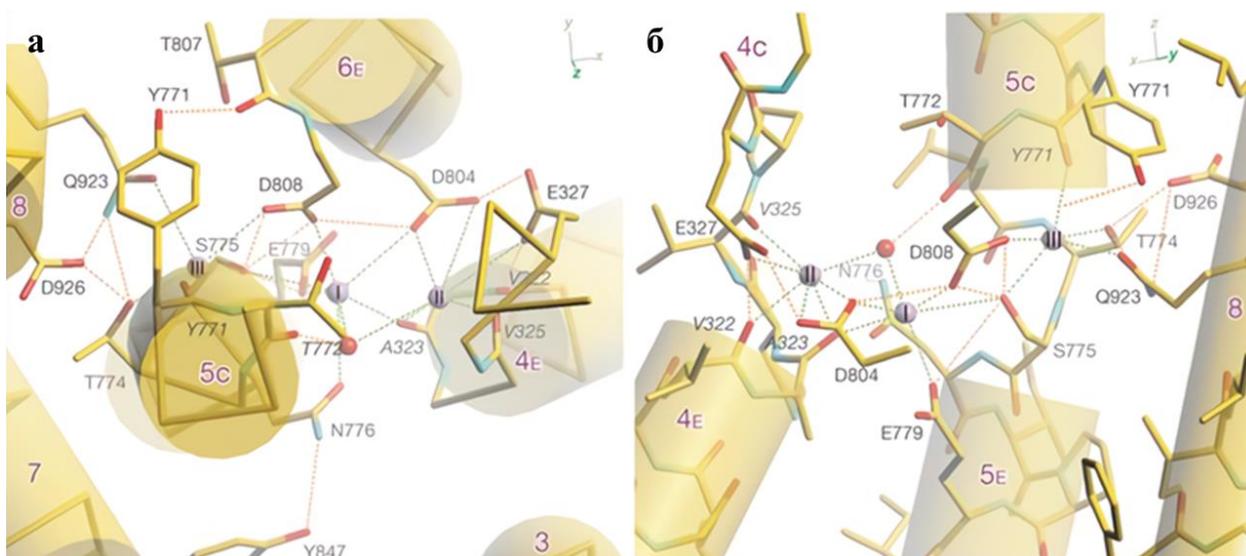


Рис. 7. Атомарная модель Na^+ -связывающих участков Na,K -АТФазы, представленная перпендикулярно поверхности мембраны со стороны цитоплазмы (**а**) и параллельно мембране со стороны М6-спирали (**б**). Обозначения аминокислотных остатков курсивом указывают на то, что карбонил главной цепи способствует координации Na^+ . Зеленые пунктирные линии означают вероятную координацию Na^+ , оранжевые линии – потенциальные водородные связи (при условии, что карбоксильные группы протонированы) [59].

Участок I расположен в том же месте, что и один из участков связывания K^+ , участок II – примерно на 5 Å ближе к цитоплазматической поверхности мембраны. Участки I и II находятся вблизи цитоплазматической части трансмембранной спирали М5 и разделены боковой цепью Ser775. Участок III стерически ограничен (вдоль М5), его полость меньше, чем нужно для связывания иона калия.

Расстояние между участками I и II для Na^+ составляет 3,2-3,6 Å, что меньше, чем расстояние между двумя участками связывания K^+ . Этой длины достаточно для смежного размещения двух ионов натрия (ионный радиус 0,95 Å), но не двух ионов калия (ионный радиус 1,33 Å). Предполагается, что связывание Na^+ специфично, поскольку для этого катиона достаточно полости с радиусом 2,4 Å, а для связывания K^+ необходима полость радиусом 2,8 Å. Именно такого размера полость обнаружена в кристалле Na,K -АТФазы в конформации E2. Участок I наименее стерически ограничен, его полости достаточно для связывания K^+ . Он, по-видимому, является одновременно и K^+ -связывающим центром (боковые цепи Ser775 и дополнительно Asn776 участвуют в координации как иона натрия, так и иона калия). Участки II и III в E1-конформации недостаточно велики для связывания иона калия. Однако при конформационном переходе E1-E2, по-видимому, происходит увеличение полости участка II, и он становится способным связывать K^+ .

Для объяснения ранее обнаруженного последовательного и кооперативного связывания трех ионов натрия предполагают следующий сценарий: в E1-конформации размер полости,

достаточной для входа первого иона натрия (но не калия) из цитоплазмы к участку III, может быть обеспечен только в том случае, если боковая цепь Ser775 изменяет свое положение. Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, можно полагать, что первый ион натрия проходит к участку III и связывается с ним, но в момент его прохода участки I и II не должны быть окончательно сформированы (в противном случае Na^+ свяжется с ними). И только после связывания первого иона натрия с участком III, а второго – с участком II, образуется I участок связывания Na^+ .

Известно, что у другой АТФазы Р-типа, а именно у Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума (SERCA (skeletal-muscle sarcoplasmic-reticulum/endoplasmic-reticulum Са-АТФазе или Са-АТФаза саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума скелетных мышц)), участки связывания катионов формируются почти теми же аминокислотными остатками, что и у Na,K-АТФазы [61]. Важное значение для селективности Na,K-АТФазы в отношении Na^+ играет ориентация цитоплазматической части трансмембранной спирали M5: если спираль M5 выпрямить так же, как в Са-АТФазе, то связывание K^+ в участке III (исходя из данных рентгеноструктурного анализа) становится возможным. Действительно, удаление С-концевых аминокислотных остатков в α -субъединице Na,K-АТФазы, увеличивающих подвижность спирали M5, приводит к уменьшению сродства к Na^+ и к связыванию K^+ в участке III.

Однако Na,K-АТФаза способна связывать K^+ и некоторые другие одновалентные катионы, в то время как SERCA кроме Ca^{2+} связывает только H^+ . Ключевые доводы, сделанные на основе данных рентгеноструктурного анализа Na,K-АТФазы в E2-конформации с разрешением 2,4 Å, можно свести к следующим. *Во-первых*, участки связывания K^+ , в отличие от участков связывания Ca^{2+} в SERCA, расположены на очень небольшом расстоянии друг от друга, хотя ионный радиус K^+ гораздо больше, чем у Ca^{2+} (1,353 и 0,99 Å соответственно) (рис. 8). По-видимому, столь близкое расположение возможно только в случае участков связывания одновалентных катионов и обусловлено тем, что в обоих случаях для координации катионов используются карбонильные атомы кислорода основной цепи аминокислотных остатков. *Во-вторых*, сравнение структур Na,K-АТФазы и SERCA показывает, что у них довольно сильно различается координационная геометрия связанных катионов, что свидетельствует о потенциальном низком сродстве одновалентных катионов к участкам связывания ионов в SERCA. Кроме того, эти участки связывания не очень селективны по отношению к K^+ . Эти данные еще раз подтверждают идею о том, что Na,K-АТФаза – это в первую очередь Na^+ -насос. *В-третьих*, положение и конформация боковых цепей аминокислотных остатков Na,K-АТФазы очень похожи на положения Ca^{2+} -связывающих участков SERCA, за исключением Asn783. Этот аминокислотный остаток Na,K-АТФазы формирует водородную связь с Tyr854 на изогнутой части спирали M7, спираль M5 также частично разворачивается и образует изгиб. Он создается

благодаря наличию Pro785, который имеет решающее значение для создания полости и координации K^+ карбонилем основной цепи Thr799. В SERCA на месте Pro785 находится Gly770, что приводит к меньшей изогнутости спирали M5 и, соответственно, к уменьшению размера полости. В результате амид Asn768 SERCA (аналог Asn783 Na,K-АТФазы) оказывается очень близко к первому участку связывания K^+ и к боковой цепи участка II, что не позволяет ионам K^+ связаться с этими участками SERCA [62]. Все описанное выше показывает, что участки связывания одновалентных катионов формируются хотя и похожими аминокислотными остатками, но они образуются только при формировании третичной структуры белка, и небольшое изменение этой структуры существенно изменяет структуру катион-связывающих центров.

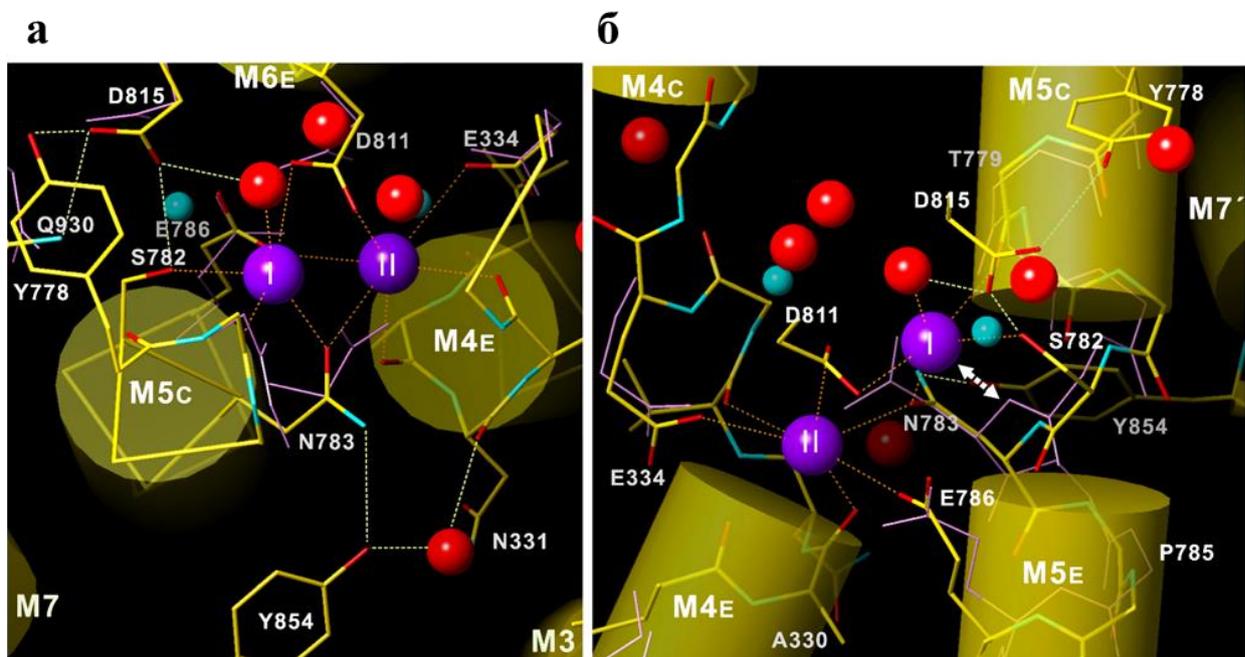


Рис. 8. Атомарная модель K^+ -связывающих участков Na,K-АТФазы, представленная со стороны, перпендикулярной цитоплазме вдоль M5-спирали (а) и параллельно мембране (б). Сплошные фиолетовые линии обозначают боковые и основные цепи Ca^{2+} -координирующих аминокислотных остатков SERCA. Фиолетовые сферы обозначают ионы K^+ , красные – молекулы воды. Голубые сферы показывают положения ионов Ca^{2+} , связанного с SERCA. Двусторонняя стрелка на (б) изображает стерическое столкновение, возникающее между участком связывания K^+ I и амидом Asn768 SERCA, которому соответствует Asn783 Na,K-АТФазы [62].

1.4. Протеолиз α -субъединицы Na,K-АТФазы как метод исследования конформационных состояний фермента

Ограниченный протеолиз – метод, широко используемый для изучения общей структуры белков, а также изменения их конформации. Для этих целей чаще всего используют две протеазы: трипсин и химотрипсин. Протеолиз можно условно разделить на первичный и вторичный. Первичный - это разделение под действием протеаз полной полипептидной цепи белка на

отдельные, обычно крупные фрагменты. Вторичный протеолиз – разделение продуктов первичного протеолиза до более мелких фрагментов. Стоит отметить, что интенсивность протеолиза зависит от соотношения протеазы и исследуемого белка, времени инкубации, температуры, pH и ионной силы среды.

В случае Na,K-АТРазы протеазы трипсин и химотрипсин расщепляют только α -субъединицу фермента, не затрагивая её β -субъединицу [63]. С помощью метода ограниченного протеолиза с использованием трипсина Питером Йоргенсоном (Peter Jørgensen) впервые было показано наличие двух различных конформаций Na,K-АТРазы: E1 и E2 [64,65].

В конформации E1 (в присутствии NaCl) трипсин осуществляет быстрый протеолиз пептидной связи между Lys30 и Glu31 и более медленный между Arg262 и Ile263. В результате накапливаются пептиды с низкой молекулярной массой (~25 кДа) и фрагмент с кажущейся молекулярной массой 77-78 кДа [66–68]. Увеличение времени протеолиза Na,K-АТРазы из почек свиньи и кролика приводит к накоплению продуктов трипсинолиза с молекулярной массой 44 кДа, 37 кДа, 23 кДа и 15 кДа (соотношение трипсин: Na,K-АТРаза = 1:25 или 1:20) [69].

В результате первичного трипсинолиза Na,K-АТРазы из солевых желез утки в конформации E1 (в среде с NaCl) появляется полипептид с молекулярной массой ~80 кДа. При более длительном обработке трипсином образуются фрагменты с молекулярной массой 40 кДа, 35,5 кДа и 23 кДа – продукты вторичного и третичного трипсинолиза (соотношение трипсин:Na,K-АТРаза = 1:10, 5-90 мин, 37°C) [70].

Кроме того, при первичном протеолизе химотрипсином α -субъединицы Na,K-АТРазы из почек свиньи в конформации E1 образуется фрагмент с кажущейся молекулярной массой 83 кДа, а также накапливаются пептиды с низкой молекулярной массой. Такое действие химотрипсина вызывает полную потерю ферментативной активности.

В E2-конформации (в среде с KCl) трипсин быстро гидролизует пептидные связи сначала между Arg438 и Ala439, а затем между Lys30 и Glu31. В результате образуются фрагменты протеолиза с молекулярной массой 58 кДа и 46-48 кДа. При более длительной обработке появляются полипептиды 42 кДа и 38 кДа (соотношение трипсин: Na,K-АТРаза = 1:25) [65,69]. Трипсинолиз Na,K-АТРазы из почек собаки в E2-конформации приводит к появлению полипептидов с молекулярной массой 58 кДа и 41 кДа, причём более длительный трипсинолиз вызывает расщепление фрагмента 41 кДа до фрагмента с молекулярной массой 37 кДа и низкомолекулярных пептидов [68].

Трипсинолиз Na,K-АТРазы из солевых желез утки в E2-конформации вызывает накопление фрагментов с молекулярной массой 40 кДа, 35,5 кДа и 23 кДа (соотношение трипсин:Na,K-АТРаза = 1:10, 5-90 мин, 37°C) [70].

Стоит отметить, что при добавлении АТФ и $MgCl_2$ в среду с $NaCl$ (E1-конформация) происходит накопление продуктов трипсинолиза, специфичных для среды, содержащей KCl . Добавление АТФ в среду с KCl (E2-конформация) вызывает появления протеолических фрагментов, характерных для среды с $NaCl$. Расщепление полипептидной цепи Na,K -АТФазы, лишенной мембраны, под действием трипсина идёт очень быстро и не зависит от присутствия ионов Na^+ и K^+ [65,71]. Стоит отметить, что в E2-конформации наблюдается устойчивость к протеолизу Na,K -АТФазы в сравнении с E1-конформацией [65,72]. Более того, в присутствии убаина – ингибитора Na,K -АТФазы, трипсинолиз $\alpha 1$ -субъединицы происходит намного быстрее [70].

Известно, что трипсин способен связываться с плазматической мембраной. В присутствии ионов Na^+ трипсин ассоциирован с мембраной сильнее, что может влиять на интенсивность трипсинолиза участков полипептидной цепи Na,K -АТФазы, расположенных вблизи плазматической мембраны. Этим свойством трипсина можно объяснить и разную чувствительность к трипсинолизу [73].

Кроме того, при $37^\circ C$ части мембранных доменов белка могут выходить из мембраны. Таким образом могут стать доступными для трипсинолиза новые участки [74].

Таким образом, при изменении конформационного состояния Na,K -АТФазы, которое происходит за счёт связывания с различными лигандами (например, КТС), на поверхности белка экспонируются различные пептидные связи, которые под действием протеаз, в частности, трипсина, могут быть расщеплены этой протеазой. В связи с этим трипсинолиз можно рассматривать как метод, позволяющий изучать различные конформационные состояния фермента.

1.5. Регуляция активности Na,K -АТФазы

В связи с ключевой ролью Na,K -АТФазы в поддержании гомеостаза клетки, регуляция активности этого фермента происходит с использованием множества механизмов, которые запускаются в ответ на изменения в клетке и окружающей ее среде.

Существует два основных механизма, обеспечивающих медленный и быстрый ответ. Медленный механизм влияет на экспрессию генов, кодирующих субъединицы Na,K -АТФазы, на встраивание фермента в плазматическую мембрану, на утилизацию Na,K -АТФазы. Быстрый механизм – это непосредственное воздействие на активность, встроенного в плазматическую мембрану фермента путём изменения соотношения ионов Na^+ и K^+ , доступности АТФ (в нормальных условиях концентрация АТФ сильно не меняется), добавления специфического ингибитора (например, убаина), фосфорилирования Na,K -АТФазы под действием протеинкиназ.

В настоящее время известно, что фосфорилирование α -субъединицы Na,K-АТФазы осуществляют цикло-АМР-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа А, РКА) по остатку Ser943, Ca^{2+} , диацилглицерол-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа С, РКС) по остатку Ser23 и цикло-GMP-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа G, PKG), а также тирозиновые протеинкиназы по остатку Tyr10. Фосфорилирование может как активировать, так и ингибировать фермент в зависимости от типа ткани, изоформы Na,K-АТФазы или изоформы протеинкиназы, а также наличия вспомогательных белков, таких например, как якорный белок А-киназы (АКАР), который необходим для фосфорилирования Ser943 под действием РКА. Так, PKG уменьшает активность $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 3\beta 1$ изоферментов, при этом не влияет на активность $\alpha 2\beta 1$. Фосфорилирование тирозинкиназой α -субъединицы приводит к повышению активности фермента [10,75]. Кроме того, с Na,K-АТФазой взаимодействуют и фосфатазы, причем регуляция активности путем фосфорилирования-дефосфорилирования носит антагонистический характер [76–84].

К медленным механизмам регуляции активности Na,K-АТФазы можно отнести и регуляторное влияние липидов мембраны. Известно, что липидный состав плазматической мембраны изменяется, например, под действием таких факторов, как диета, стресс. Поскольку Na,K-АТФаза – мембранный белок, то липиды, входящие в состав плазматической мембраны также способны влиять на ее активность. Так фосфолипиды, увеличивающие текучесть мембраны, способствуют оптимальной активности Na,K-АТФазы, тогда как свободные жирные кислоты, присутствующие в мембране ингибируют этот фермент [76,85,86].

Важную роль в регуляции Na,K-АТФазы играет взаимодействие с такими компонентами цитоскелета, как спектрин, актин, аддуцин, пасин и анкирин [87–92]. В эпителии почек Na,K-АТФаза связана со спектрином, а через белок анкирин с актиновым цитоскелетом [90,93,94]. Связывание с анкирином вызывает перераспределение Na,K-АТФазы в поляризованных клетках эпителия таким образом, что фермент оказывается в базолатеральной мембране [95]. Мономерный актин, связываясь с α -субъединицей, активирует Na,K-АТФазу. Другой белок цитоскелета - аддуцин при низкой концентрации АТФ (мкМ концентрации) увеличивает сродство Na,K-АТФазы к АТФ, что также приводит к увеличению активности фермента путём ускорения перехода из конформации E2 в конформацию E1 [76,96,97]. В кардиомиоцитах Na,K-АТФаза связывается с фосфолемманом, который взаимодействует с микротрубочками в случае его фосфорилирования РКА [48].

Регуляция активности Na,K-АТФазы в клетке может происходить также при помощи различных гормонов: кортикостероидов, катехоламинов, пептидных гормонов. Гормоны могут действовать как на активность фермента (например, активируя соответствующие протеинкиназы, которые влияют на активность путём фосфорилирования), так и на синтез или

утилизацию (деградацию) Na,K-АТФазы [76]. Так, в почках катехоламины ингибируют активность фермента путем через протеинкиназами С и А. При этом РКА участвует в быстром ответе, а РКС обеспечивает долгосрочную регуляцию [98]. Кроме того, в эпителии почек под действием альдостерона активируется синтез Na,K-АТФазы [99–103].

В настоящее время известен ещё один важный механизм регуляции – глутатионилирование цистеиновых остатков Na,K-АТФазы, которое приводит к уменьшению ферментативной активности. Это позволяет сохранить АТФ в клетке в условиях окислительного стресса. Глутатион один из важнейших компонентов редокс-буфера клетки. Он представляет собой трипептид, состоящий из остатков глутамата, цистеина и глицина (L-γ-глутамил-L-цистеинил-глицин). Концентрация глутатиона в клетках млекопитающих составляет 1-10 мМ. Глутатион может обратимо связываться с молекулой белка с образованием смешанных дисульфидов (P-S-S-G), тем самым регулируя функции этого белка [104].

В настоящее время описано глутатионилирование α-субъединицы [105,106], β1-субъединицы Na,K-АТФазы [107,108] и регуляторного белка фосфолеммана [109,110]. Было показано, что глутатионилирование остатков Cys244, Cys454, Cys458 и Cys459 вызывает полную потерю АТФазной активности [105]. Это происходит поскольку связывание глутатиона с остатками цистеина стерически препятствует связыванию АТФ в активном центре. После устранения окислительного стресса при участии глутатионредуктазы и глутаредоксина глутатион освобождается от этих остатков за счет разрыва S-S-связи между глутатионом и ферментом с использованием ферментативной системы. В результате активность Na,K-АТФазы восстанавливается. Кроме того, существуют данные о том, что восстановленный глутатион защищает клетки от цитотоксического эффекта убаина, в основе которого лежит, предположительно, увеличение фосфорилирования тирозиновых остатков и экспрессии генов Ras [111].

1.6. Na,K-АТФаза как мишень кардиотонических стероидов

1.6.1. Кардиотонические стероиды

Кардиотонические стероиды или сердечные гликозиды – это ряд структурно-родственных соединений, являющихся специфическими ингибиторами Na,K-АТФазы. Использование КТС из экстрактов растений в медицинских целях впервые было зафиксировано более 1500 лет назад. Они использовались как яды, мочегонные и рвотные средства, для абортов и укрепления сосудов [112]. В 1785 году английский врач сэр Уильям Визеринг опубликовал работу о целебном действии экстрактов, полученных из листьев наперстянки (*Digitalis purpurea* и *Digitalis lanata*),

для лечения сердечной недостаточности [113,114]. Впоследствии из этих растений были выделены дигоксин и дигитоксин – первые представители КТС. Позднее из амфибий были получены другие КТС, такие как буфалин и маринобуфагенин [115].

КТС можно разделить на два подсемейства: карденолиды и буфадиенолиды. Для всех КТС основным структурным элементом является циклопентанпергидрофенантроновое ядро (стероидное ядро) с ненасыщенным циклом в 17-м положении: пятичленным (карденолиды) или шестичленным лактоном (буфадиенолиды) (рис. 9).

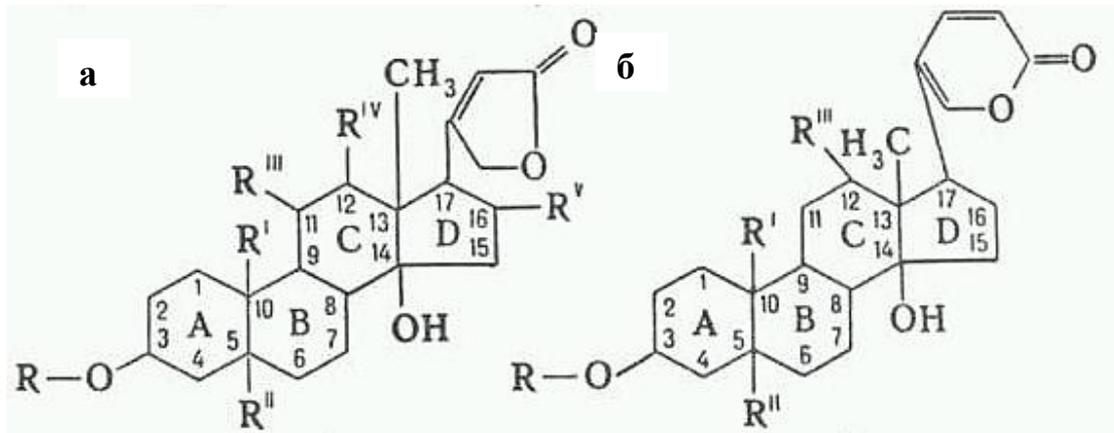


Рис. 9. Структурные формулы кардиотонических стероидов. **а** – карденолиды, **б** – буфадиенолиды.

На рисунке 10 показана структурная формула убаина, дигоксина, дигитоксигенина и строфантидина, которые относятся к подсемейству карденолидов. В третьем положении циклопентанпергидрофенантронового ядра может находиться углеводная цепь, содержащая 1-5 моносахаров. Так, у убаина в третьем положении есть остаток сахара - рамноза, а у дигоксина и дигитоксина – остаток трисахарида. Некоторые карденолиды дегликозилированы, то есть представляют собой агликаны (убагенин, дигоксигенин, дигитоксигенин, строфантин). Убаин является наиболее гидрофильным КТС, а потому широко используется в экспериментах *in vitro*.

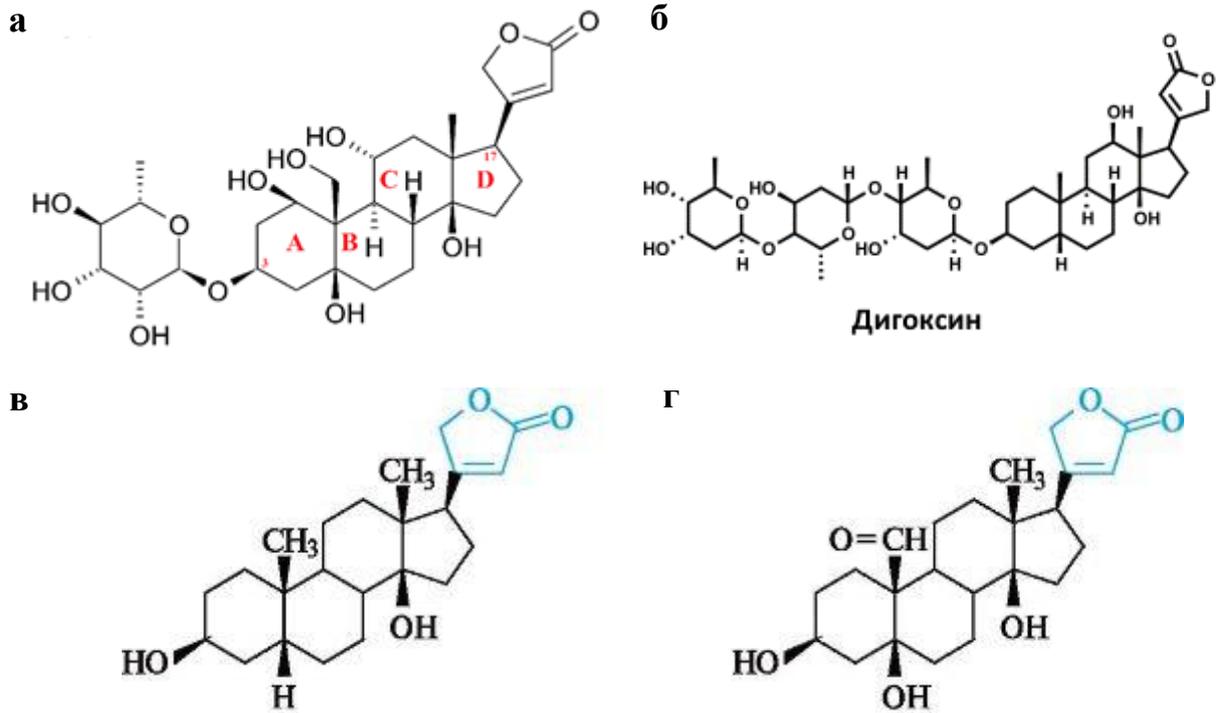


Рис. 10. Структурные формулы карденолидов: а – убаин, б – дигоксин, в - дигитоксигенин, г – строфантин.

К представителям подсемейства буфадиенолидов, выделенных из амфибий, относятся буфалин, Маринобуфагенин, Маринобуфатоксин, телобуфатоксин, цинобуфаталин (рис. 11). В большинстве случаев у буфадиенолидов отсутствует углеводная цепь в третьем положении циклопентанпергидрофенантренового ядра.

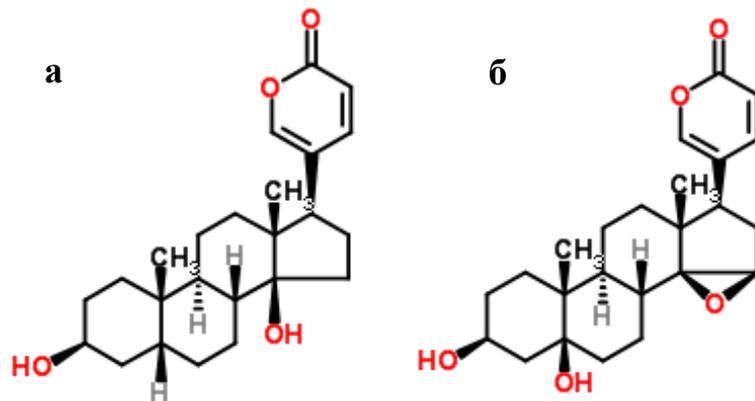


Рис. 11. Структурные формулы буфадиенолидов: а – буфалин, б – Маринобуфагенин.

В последние годы у млекопитающих были обнаружены так называемые эндогенные КТС. Идентифицировано несколько эндогенных кардиотонических стероидов в плазме крови человека: убаин [116–118], буфалин [119], Маринобуфагенин [120,121], Маринобуфатоксин [122], 19-норбуфалин и телоцинобуфагин [123], концентрации которых колеблются от 0,1 до 1

нМ [118–120,124]. В моче человека присутствует дигоксин и маринобуфагенин. Убаин был также обнаружен также в гипоталамусе и надпочечниках [118].

1.6.2. Na,K-АТРаза как рецептор кардиотонических стероидов

Na,K-АТРаза является единственным известным рецептором КТС. В ходе своего каталитического цикла Na,K-АТРаза претерпевает последовательную смену конформационных состояний (рис. 6), которые характеризуются различным сродством к КТС. Наибольшее сродством к убаину обладает фермент в конформации E2-P, который можно получить в присутствии ионов Mg^{2+} и Φ_n за счет обращения последней стадии каталитического цикла ([Mg]-E2-P) [125]. Кроме того, убаин в mM концентрациях (~ 20 mM) может связываться с Na,K-АТРазой в конформации E2, т.е. в состоянии, когда фермент связан с 2 ионами K^+ и Φ_n или стабильным аналогом фосфата MgF_4^{2-} ([K₂]E2-MgF_x). В данном случае стабилизируется окклюзия K^+ [126]. В таком состоянии фермент имеет более низкое сродство к кардиотоническому стероиду.

С помощью метода рентгенструктурного анализа были получены трехмерные структуры Na,K-АТРазы [K₂]E2-MgF_x-убаин [127] и [Mg]-E2-P-убаин, [Mg]-E2-P-дигоксин, [K₂]-E2-P-буфалин [13,125,128].

Участок связывания КТС находится на внеклеточной части α -субъединицы Na,K-АТРазы (рис. 12). Этот участок консервативен у разных организмов. В конформации E2 убаин встраивается между трансмембранными фрагментами M1, M2, M4, M5 и M6, частично разворачивая M4 [127]. Аминокислоты Gln111 (M1) и Asn122 (M2) отвечают за высокое сродство Na,K-АТРазы к убаину у всех млекопитающих, кроме грызунов, где замена на Arg111 и Asp122 уменьшает чувствительность к убаину в 100-1000 раз [129].

1.6.2.1. Связывание убаина в конформации E2

В лаборатории Огава была получена кристаллическая структура Na,K-АТРазы из ректальных желез акулы (разрешение 2,8 Å) в состоянии E2 ([K₂]E2-MgF_x) без убаина и связанной молекулой убаина (характеризуется низким сродством фермента к убаину) (рис. 12).

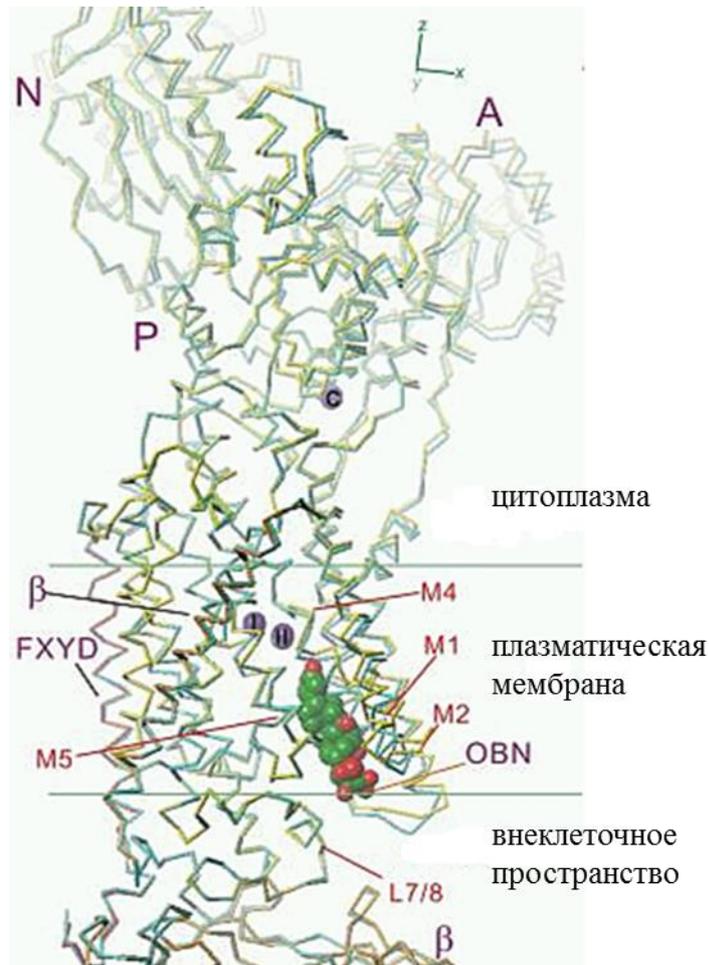


Рис. 12. Кристаллическая структура Na,K-АТФазы, содержащая связанную молекулу убаина. А – актуаторный домен, N – нуклеотидсвязывающий домен, P – фосфорилируемый домен α -субъединицы фермента. β – β -субъединица, FXYD – белок семейства FXYD, OBN – убаин; I, II, c – ионы калия [127].

Установлено, что убаин встраивается внутри α -субъединицы Na,K-АТФазы между трансмембранными фрагментами. Наибольшее изменение происходит в трансмембранном сегменте M4 (в той половине сегмента, которая ближе к внеклеточному пространству (M4E)). M4 отходит от M6, а спирали M1 и M2 перемещаются в свободное место, образованное при изменении положения M4. В результате в α -субъединице Na,K-АТФазы, связанной с убаином, образуется полость большего размера, окруженная M1-M2 и M4-M6 и, открытая с наружной стороны мембраны (рис. 13) [127].

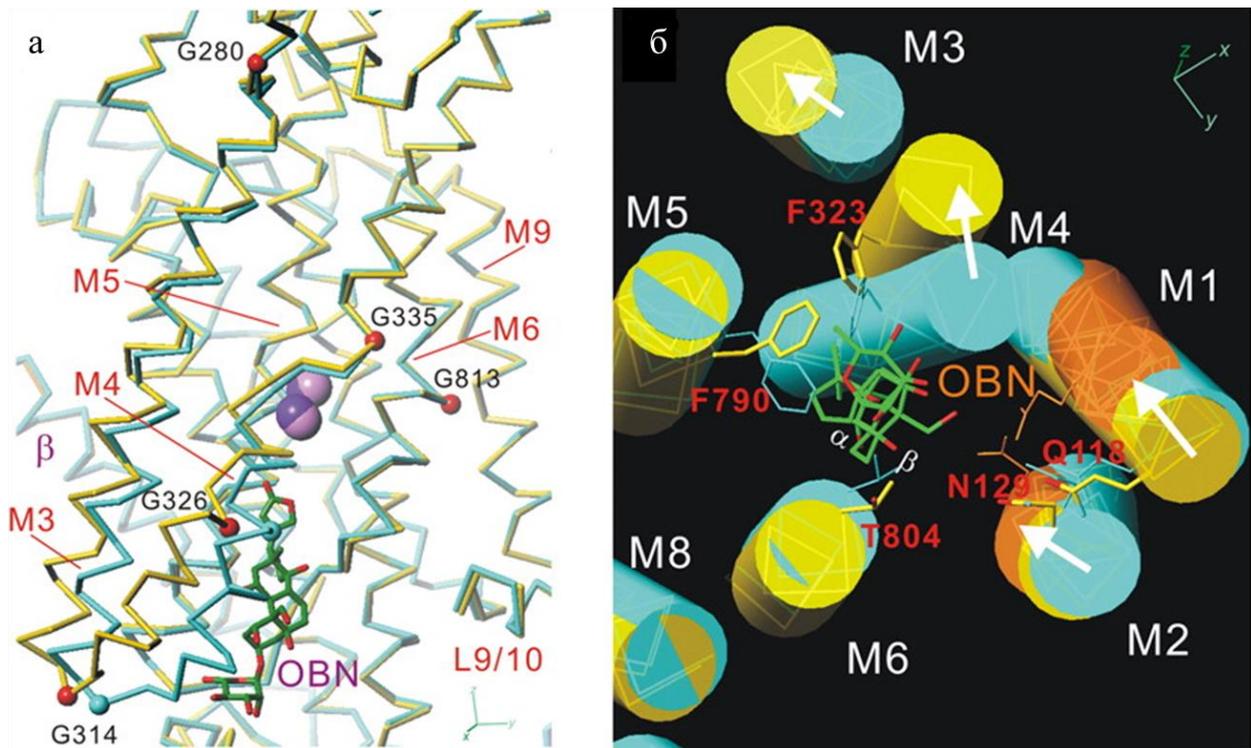


Рис. 13. Атомарная модель изменений структуры трансмембранного участка α -субъединицы Na,K-АТФазы при связывании убаина, представленная параллельно плоскости мембраны (а) и перпендикулярно плоскости мембраны с внеклеточной стороны (б). (а) Сравнение положения трансмембранных цепей Na,K-АТФазы без убаина (сине-зелёный) и при связывании убаина (жёлтый). Трансмембранные сегменты M1 и M2 удалены. Остатки Gly, участвующие в изменении структуры показаны в виде сфер. (б) Сравнение положения трансмембранных спиралей Na,K-АТФазы (в виде цилиндров) без убаина (сине-зелёный), при связывании убаина в конформации $[K_2]E_2-MgF_x$ (жёлтый), при связывании в конформации E2-P (оранжевый). OBN – убаин (зеленый и красный), ионы K^+ (пурпурный). [127].

Связывание убаина с Na,K-АТФазой – многоступенчатый механизм. Три части структуры КТС (лактонное кольцо, циклопентанпергидрофенантроновое (стероидное) ядро и углеводный компонент (см. рис. 9-11)), играют различную роль в процессе связывании с Na,K-АТФазой. В первую очередь с ферментом взаимодействует лактонное кольцо, затем стероидная часть встраивается внутрь фермента, после чего связывание стабилизируется остатком сахара [127,130].

Связываясь, лактонное кольцо отталкивает Gly326, взаимодействуя на близком расстоянии с Val329 и Ala330 в M4. При этом исходные водородные связи карбонила с амидами Val329 и Ala330 разрываются. Вместо них образуются водородные связи с карбонилем, сопряженным с лактонным кольцом. В результате расстояние между Gly326 и Thr804 увеличивается примерно на 5 Å и спираль M4 разворачивается ещё на 1 оборот (между Gly326 и Gly335) (рис. 13а). Карбонил основной цепи Ile327 стабилизируется Asn331 боковой цепи.

Поскольку Val329, который обеспечивает карбонильным кислородом участок II для K^+ [131], смещается, координация K^+ в этом центре частично нарушается. Однако в структуре Na,K-

АТРазы с убаином присутствуют связанные ионы калия, поэтому предполагается, что убаин блокирует его диссоциацию [126,132]. В этом важную роль играет положение карбонильной группы, сопряженной с ненасыщенным лактонным кольцом. Известно, что насыщение лактонного кольца вызывает резкое (примерно на 2 порядка) снижение сродства КТС, обусловленное изменением его ориентации относительно стероидного ядра [133]. Вокруг лактонного кольца существуют сильные Ван-дер-Ваальсовы контакты, поэтому добавление любой боковой цепи к Gly326 приводит к резкому уменьшению аффинности убаина [134]. Без связанных ионов K^+ происходит частичное разворачивание М4, следовательно, размещение лактонного кольца в данном случае упрощается. Это подтверждается тем, что если концентрация убаина меньше концентрации, необходимой для насыщения связывающего центра Na,K-АТРазы, добавление K^+ приводит к диссоциации кардиотонического стероида [135]. Таким образом, стабилизация конформации М4 ионами K^+ частично объясняет низкое сродство убаина в присутствии этого катиона [127].

В случае убаина стероидное ядро прочно удерживается в углублении, образованном М4-М6-цепями за счет остатков Phe323 на М4, Phe790, Phe793 на М5 (рис.13б, 14). Эти аминокислотные остатки образуют поверхность, комплементарную к стероидному ядру, что приводит к *cis*-положению колец АВ и CD в убаине (рис. 9). Без связанного убаина эти 3 остатка Phe и Pe322 на М4, а также Leu800 на М6 образуют гидрофобный кластер [127]. Кроме того, гидроксильная группа в 14 положении стероидного ядра (на стыке между кольцами С и D) образует водородную связь с Thr804 и играет важную роль в связывании убаина [130,136]. Однако гидроксильная группа в положении 11 стероидного ядра не взаимодействует с аминокислотными остатками Na,K-АТРазы, возможно, поэтому дигитоксин (кардиотонический стероид, в котором отсутствует гидроксильная группа в 11 или 12 положении стероидного ядра) имеет более высокое сродство, чем дигоксин (имеет гидроксильную группу в 12 положении) [133].

Остаток рамнозы убаина может образовывать водородные связи с Arg887 в петле между М7 и М8, а также с Glu в М4 (рис. 13, 14), тем самым увеличивая сродство фермента к убаину (примерно в 300 раз) по сравнению с убагенином, в котором отсутствует остаток сахара [133].

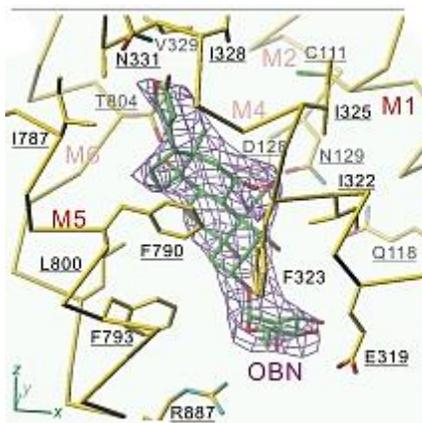


Рис. 14. Атомарная модель взаимодействия α -субъединицы Na,K-АТРазы с убаином. OBN – убаин [127].

1.6.2.2. Связывание убаина в конформации E2-P

Связывание убаина с α -субъединицей Na,K-АТРазы в конформации E2-P (в присутствии ионов Mg^{2+} и Φ_n) приводит к смещению положения спиралей M1-M2 в сторону M3-M10. Кроме того, происходит наклон M4 в латеральном направлении на 15 градусов [125,128]. Эта перестройка приводит к частичному разворачиванию во внеклеточной части спирали M4 (на один виток, в аминокислотных остатках Ile318 – Val325), что приводит к смещению этого сегмента на $\sim 3 \text{ \AA}$ в сторону M3. В результате происходит расширение полости внутри фермента в направлении катионного участка II. Это позволяет убаину встраиваться на $\sim 2 \text{ \AA}$ глубже (рис.15) [125]. Структура Na,K-АТРазы со связанным убаином в конформации E2-P ([Mg]-E2-P-убаин) напоминает структуру Na,K-АТРазы со связанным убаином в конформации E2 ([K₂]E2-MgF_x-убаин). Однако положение убаина в E2-P-конформации смещено в боковом направлении в сторону M1-M2 на 2 \AA в сравнении с E2-конформацией (рис. 15a). Вместе с этим M1-M2 смещаются в сторону кардиотонического стероида [128].

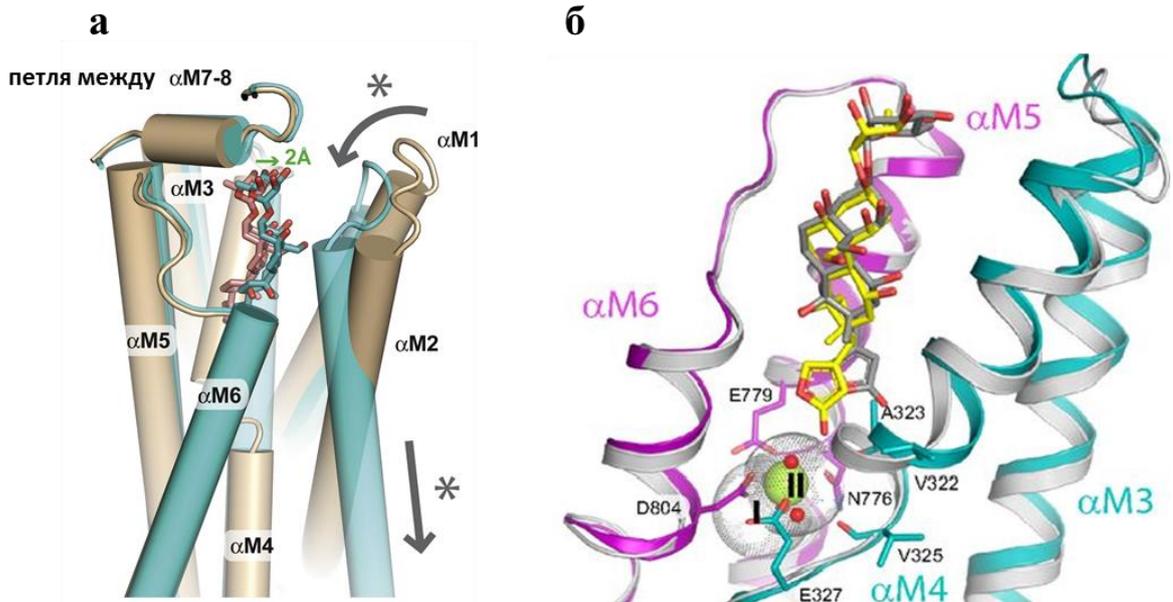


Рис. 15. (а) Сравнение модели убаин-связывающего центра Na,K-АТФазы в конформации [Mg]-E2-P-убаин (бежевый) и [K₂]E2-MgF_x-убаин (сине-зеленый). (б) Сравнение модели структуры комплекса [Mg]-E2-P-убаин (сине-зеленым цветом показано расположение трансмембранных сегментов) и [K₂]E2-MgF_x-убаин (серым цветом показано расположение трансмембранных сегментов). Жёлтым цветом показано положение убаина в комплексе [Mg]-E2-P-убаин, серым цветом - в комплексе [K₂]E2-MgF_x-убаин. Светло-зелёным цветом обозначен Mg²⁺. I и II указаны сайты связывания для ионов K⁺ [128].

Лактонное кольцо убаина лежит на расстоянии в 5 Å от участка связывания II для катионов в гидрофобном участке, который формируют Leu125 (M2), Ala323 (M4) и Ile800 (M6). Полярных взаимодействий между лактонным кольцом и окружающими аминокислотными остатками не обнаружено. Однако распределение заряда, которое связано с релаксацией сильно напряженного пятичленного лактонного кольца, приводит к увеличению частичного отрицательного заряда на карбонильной группе, в отличие от шестичленных лактонов буфадиенолидов (рис. 16) [125]. Таким образом, в гидрофобной среде карбонильная группа может участвовать в электростатических взаимодействиях с ионом Mg²⁺ в участке связывания II, что приводит к увеличению сродства карденолидов к ферменту [125,128].

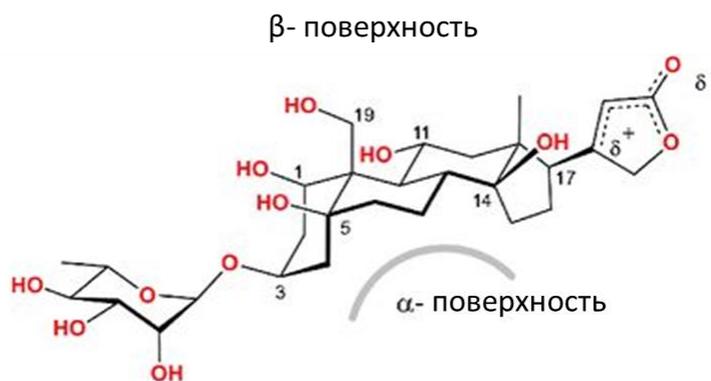


Рис. 16. Структура убаина. Показано перемещение заряда в лактонном кольце, α - и β -поверхности кардиотонического стероида [125].

Циклопентапергидрофенантроновое ядро убаина на α -поверхности прочно связывается с гидрофобными боковыми цепями Pe315, Phe316, Gly319 (расположены в M4), Phe783, Phe786 (расположены в M5), Leu793 (расположен в петле между M5-M6) как и в комплексе $[K_2]E2-MgF_x$ -убаин. β -Поверхность стероидного ядра убаина (в отличие от комплекса $[K_2]E2-MgF_x$ -убаин) взаимодействует с полярными боковыми цепями M1, M2 и M6 (рис. 17). Так, гидроксильная группа в 19 положении в убаине (ОН19 β) образует бифуркационную (многоцентровую) водородную связь с Gln111 (M1) и Asn122 (M2). Далее Gln111 взаимодействует с гидроксильной группой в 1-м положении (ОН1 β) и образует стабилизирующие водородные связи с Asn122. Кроме того, образуются связи между ОН5 β и Glu117 (M2), а также между высоко консервативной гидроксильной группой ОН14 β и Thr797 (M6) – остатком, играющим важную роль в связывании убаина [130,136], который дополнительно стабилизирует Asp121 (M2) [125,128].

Остаток рамнозы в молекуле убаина расположен в широкой полости, подверженной воздействию внеклеточной среды. Эта полость образована полярными остатками Glu116 (петля между M1-M2), Glu312 (M4), Arg880 и Arg884 (петля между M7-M8) [125,128].

Стоит отметить, что аминокислотные остатки, участвующие в формировании центра связывания Mg^{2+} участвуют и в формировании участка связывания II для K^+ в комплексе $[K_2]E2-MgF_x$ [22,137], за исключением Val322, который переместился к участку связывания убаина (рис. 15б). Поскольку радиус ионов Mg^{2+} (0,74 Å) меньше, чем у K^+ (1,33 Å), то в октаэдрической координации магния участвуют только Asn776, Glu779 (M5) и Asp804 (M6). При структурном выравнивании комплексов $[K_2]E2-MgF_x$ и $[Mg]-E2-P$ -убаин (рис. 15б) видно, что тесная ассоциация M4 с Mg^{2+} предоставляет больше пространства для убаина, что позволяет данному кардиотоническому стероиду глубже встраиваться внутри α -субъединицы с внеклеточной стороны. В свою очередь окклюзия калия приводит к тому, что участок Pe318-Val325 перемещается ближе к центру связывания катионов II, закрывая его с внеклеточной стороны и препятствуя плотному связыванию убаина [125].

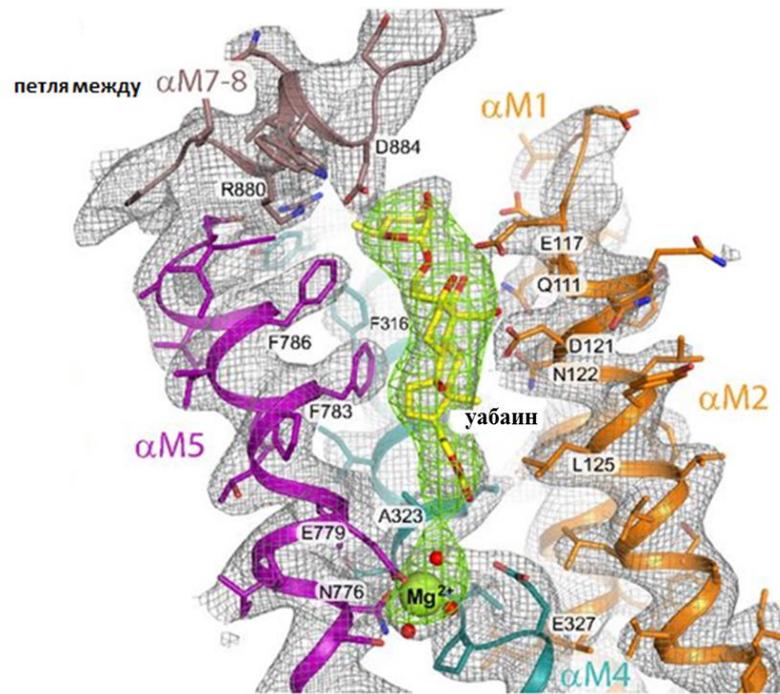


Рис. 17. Карта электронной плотности для центра связывания убаина и катионов. Указаны аминокислотные остатки, участвующие в связывании убаина и Mg^{2+} в α -субъединице Na,K-АТРазы [125].

1.6.2.3. Связывание дигоксина в конформации E2-P и буфалина в конформации E2

Структура центра связывания для дигоксина (рис. 10б) и буфалина (рис. 11а) с α -субъединицей Na,K-АТРазы очень похожа на таковую центра связывания убаина (рис. 18).

1. α -Поверхность стероидного ядра дигоксина и буфалина (она консервативна для всех КТС) взаимодействует с гидрофобными боковыми группами аминокислотных остатков на M4-M6.
2. β -Поверхность стероидного ядра взаимодействует с полярными аминокислотными остатками боковых цепей M1-M2.
3. Лактонное кольцо окружено гидрофобными аминокислотными остатками M4-M6.
4. Остаток сахара у дигоксина находится в широкой гидрофильной полости.

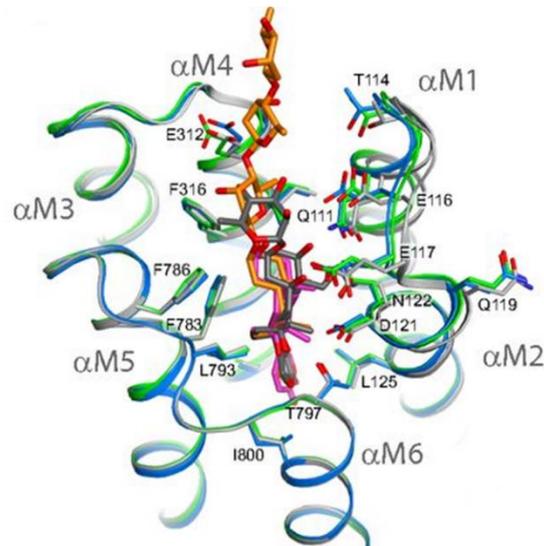


Рис. 18. Сравнение структуры центра связывания убаина (синий), дигоксина (зелёный) и буфалина (серый) в α -субъединице Na,K-АТФазы [13].

Однако дигоксин и буфалин более гидрофобные КТС, нежели убаин. В связывании с Na,K-АТФазой участвуют только две гидроксильных группы: OH14 β и OH3 β (у дигоксина эта группа гликозилирована). OH14 β образует водородную связь с Thr797 (M6), что приводит к стабилизации Asp121 (M2). OH3 β буфалина не участвует в формировании каких-либо связей с α -субъединицей фермента. Дигоксин содержит также OH12 β , которая формирует водородную связь с Asn122 (M2). В отличие от убаина дигоксин и буфалин не образуют водородных связей с Gln111 или Glu117 (петля между M1 и M2). Сахарный остаток в стероидном ядре у дигоксина (в положении 3 β) может связываться с Glu312 (M4) и с Arg880 (петля между M7-M8) [13].

Структурное выравнивание трёх комплексов E2-P-КТС по M7-M10 показывает, что трансмембранные сегменты, образующие центр для связывания КТС, совпадают за исключением положения M1-M2 (рис. 18). В отличие от комплекса E2-P-убаин, в комплексах E2-буфалин и E2-P-дигоксин внеклеточная часть M1-M2 перемещается немного ближе к центру связывания КТС [13]. Таким образом, в зависимости от числа, размера и свойств заместителей в ядре КТС, происходит тонкая регуляция конформационных переходов Na,K-АТФазы, что подтверждается данными по протеолизу этого фермента [68].

1.6.3. Различие в чувствительности изоформ Na,K-АТФазы к КТС

Na,K-АТФаза может быть представлена в разных клетках в виде нескольких изоферментов, которые различаются по сродству к специфическим ингибиторам – кардиотоническим стероидам. Различие в чувствительности к КТС встречается как у разных изоформ фермента, так и у одной изоформы α -субъединицы разных видов животных.

Как было сказано ранее, замена двух аминокислот Gln111 (M1) и Asn122 (M2), отвечающих за высокое сродство Na,K-АТФазы к убаину у всех млекопитающих, кроме грызунов (заменяются на Arg111 и Asp122) уменьшает чувствительность к убаину в 100-1000 раз [129]. При этом чувствительность $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформ в клетках грызунов и других млекопитающих одинаковая [39]. Наибольшим сродством к убаину обладает фермент, содержащий $\alpha 3$ -изоформу. У человека, свиньи, собаки и кролика наименьшим сродством к КТС характеризуется Na,K-АТФаза, содержащая $\alpha 1$ -изоформу [10,138].

Marks и Seeds, обнаружили, что кривая, описывающая зависимость ингибирования убаином Na,K-АТФазы из мозга мышей может быть аппроксимирована двумя гиперболами. Одна из них отражает высокое сродство ($K_i = 10^{-7}$ М) к ингибитору, другая - низкое сродство ($K_i = 10^{-4}$ М) [139]. Изучая кинетические параметры различных комбинаций изоформ Na,K-АТФазы Blanco и Mercer обнаружили различия в их чувствительности к убаину. В таблице 1 приведены полученные данные [10].

Таблица 1. Значение константы ингибирования убаином различных изоформ Na,K-АТФазы [10]

Фермент	K_i (убаин), М
$\alpha 1\beta 1$	$4,3 \pm 1,9 \times 10^{-5}$
$\alpha 2\beta 1$	$1,7 \pm 0,1 \times 10^{-7}$
$\alpha 2\beta 2$	$1,5 \pm 0,2 \times 10^{-7}$
$\alpha 3\beta 1$	$3,1 \pm 0,3 \times 10^{-8}$
$\alpha 3\beta 2$	$4,7 \pm 0,4 \times 10^{-8}$

Наибольшим сродством к убаину обладают $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 3\beta 2$, наименьшая аффинность характерна для формы $\alpha 1\beta 1$. $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 2\beta 2$ занимают промежуточное положение. Такое разнообразие изоферментов Na,K-АТФазы обусловлено, скорее всего, необходимостью отвечать на разные физиологические состояния клетки.

В настоящее время нет данных рентгенструктурного анализа для изоферментов Na,K-АТФазы, содержащих разные изоформы α -субъединицы фермента, поскольку лишь $\alpha 1\beta 1$ -изофермент был получен в чистом виде и закристаллизован. По этой причине мы не имеем в настоящее время данных о структуре КТС-связывающих центров этих изоферментов и об их конформациях, образующихся при связывании различных лигандов.

1.6.4. Зависимость средства Na,K-АТРазы к кардиотоническим стероидам от рН и строения КТС

В исследованиях Yoda и Yoda было показано, что при увеличении рН от 6,5 до 8,0 константы связывания для убаина и дигоксигенина уменьшаются [140].

Позднее Cornelius и соавторы изучили более детально влияние рН на взаимодействие Na,K-АТРазы из ректальных желез акулы ($\alpha 1\beta 1$ -изофермента) с КТС. Среди представителей КТС были следующие:

- карденолиды (пятичленный ненасыщенный лактон) – убаин, дигоксин, дигитоксин, гитоксин, убагенин, дигоксигенин, дигитоксигенин, гитоксигенин;
- буфадиенолид (шестичленный лактон) – буфалин;
- карденолиды, содержащие остаток сахара в 3-м положении стероидного ядра – убаин, дигоксин;
- агликоны – убагенин, дигоксигенин, дигитоксигенин, гитоксигенин, буфалин [141,142].

Значения кажущейся константы ингибирования (K_i) для некоторых КТС представлены в таблице 2.

Таблица 2. Кажущаяся константа ингибирования (K_i) для разных КТС при трёх значениях рН [141,142]

КТС	K_i , мкМ		
	рН 6,5	рН 7,5	рН 8,5
Убагенин	$0,406 \pm 0,077$	$2,28 \pm 0,20$	$32,1 \pm 0,78$
Убаин	$0,086 \pm 0,011$	$0,091 \pm 0,011$	$1,18 \pm 0,27$
Дигоксигенин	$0,136 \pm 0,006$	$0,195 \pm 0,001$	$1,56 \pm 0,034$
Дигоксин	$0,102 \pm 0,008$	$0,131 \pm 0,020$	$1,03 \pm 0,04$
Буфалин	$0,140 \pm 0,017$	$0,134 \pm 0,001$	$0,271 \pm 0,018$

Исходя из полученных данных, авторы сделали вывод, что с увеличением рН ингибирующая активность КТС снижается. При этом данный «рН-эффект» зависит как от:

1. наличия, размера и природы гликозилирования остатка в 3-м положении стероидного ядра;
2. от количества и расположения гидроксильных групп на стероидном ядре.

Действительно, сравнивая ингибирующее действие убаина с убагенином, которые имеют одинаковый пятичленный лактон и стероидную часть, но в случае убагенина отсутствует рамноза. Можно увидеть, что с увеличением рН от 6,5 до 8,5 константа ингибирования увеличивается на порядок. Этот «рН-эффект» обусловлен как отсутствием остатка сахара в

структуре кардиотонического стероида, так и наличием трех гидроксильных групп в 1, 5 и 19 положении на β -поверхности стероидного ядра (ОН1 β , ОН5 β , ОН19 β). При сравнении дигоксина и дигоксигенина (агликон), в которых ОН1 β , ОН5 β и ОН19 β отсутствуют, но есть ОН12 β , рН-эффект выражен значительно меньше. В случае буфалина, в котором присутствует шестичленный лактон и отсутствуют гидроксильные группы на β -поверхности стероидного ядра, рН-эффект также выражен меньше [141,142].

Paula и соавторы сравнивали способность различных кардиотонических стероидов связываться с E2-P-конформацией Na,K-АТФазы из почек овцы (α 1 β 1-изофермент) и изучали их ингибирующие свойства. Они исследовали 37 КТС, различающихся по строению. Было обнаружено, что чем больше углеводных остатков в 3-м положении стероидного ядра, тем выше сродство КТС к ферменту. Тип углеводного остатка тоже имеет значение: рамноза значительно увеличивает сродство гликозида к Na,K-АТФазе. Наличие гидроксильных групп при атомах углерода в 12-м и 16-м положении стероидного ядра уменьшает сродство, а вот замена гидроксильной группы на ацетатную в 16-м положении оказывает противоположный эффект. Кроме того, насыщенность лактонового кольца влияет на увеличение сродства КТС к Na,K-АТФазе. При этом буфадиенолиды (содержащие шестичленный лактон) имеют меньшее сродство к ферменту в сравнении с кардеонелидами. Кроме того, *цис*-изомерия связи между 5-м и 10-м атомами углерода стероидного ядра КТС, по связи, соединяющей стероидные кольца А и В (рис. 9), предпочтительнее для связывания, однако на ингибирующих свойствах эта модификация практически не влияет [133].

Таким образом, в зависимости от рН и наличия в структуре пятичленного или шестичленного лактона, гидроксильных групп и гликозилирования по 3-му положению сродство Na,K-АТФазы к КТС может сильно меняться. Видимо, это необходимо для тонкой регуляции физиологического действия различных представителей сердечных гликозидов.

1.7. Кардиотонические стероиды как регуляторы клеточной смерти

В настоящее время известны две основные морфологически различные формы клеточной смерти: некроз и апоптоз. *Некроз* характеризуется нарушением целостности плазматической мембраны, набуханием клетки, распадом клетки с возникновением очага воспаления. *Апоптоз* – это программируемая клеточная смерть. Этот механизм активируется с целью спасения соседних клеток. В отличие от некроза, апоптоз характеризуется сохранением внутриклеточных структур, конденсацией хроматина, распадом клетки на апоптотические тела, упакованные в плохо проницаемые мембраны, которые затем поглощаются макрофагами. Апоптоз связан с активацией каспазы-3 - фермента класса цистеиновых протеаз, которые расщепляют полипептидные цепи

после остатка аспарагиновой кислоты. Каспаза-3 является маркером апоптоза и играет ключевую роль в расщеплении многих белков клеток [143]. В ряде случаев гибель клеток происходит с характерными признаками как некроза (набухание клеток), так и апоптоза (активация каспазы-3) [144]. Этот тип клеточной смерти был классифицирован, как онкоз. *Онкоз* с греческого переводится как «набухание», и используется для описания программируемой клеточной смерти, имеющей признаки апоптоза, но не сопровождающейся апоптотическим сжатием [145].

Кроме того, в последнее время был описан еще один тип программируемой клеточной смерти, который получил название аутофагия. При аутофагии, в отличие от апоптоза, не происходит активация каспаз. *Аутофагия* – это жёстко регулируемый процесс катаболизма, при котором клетки перерабатывают собственные компоненты. Участок цитоплазмы окружается и отделяется двойной мембраной – аутофагосомой. Аутофагосомы затем соединяются с лизосомами [146].

В большинстве случаев длительная инкубация в присутствии КТС может приводить к массовой гибели клеток (таблица 3). При такой концентрации КТС в клетках почки собаки линии С7- и С11-MDCK [144], клетках аорты свиньи (РАЕС) [147] и эпителиальных клетках кишечника человека (Сасо-2) [148] происходит полное ингибирование Na,K-АТФазы. Однако ряд данных указывает на существование устойчивых к КТС клеток. Так, например, 48 ч инкубация в присутствии убаина, в концентрациях, вызывающих полное ингибирование Na,K-АТФазы и инверсию соотношения внутриклеточных концентраций натрия и калия ($[Na^+]_i/[K^+]_i$), не оказывало влияния на жизнеспособность гладкомышечных клеток (ГМК) крысы [149,150], NIH 3T3 фибробластов мыши [151], клеток линии Jurkat человека [152], и астроцитов крысы [153].

Таблица 3. Действие кардиотонических стероидов на смерть клеток

Тип клеток	Эффект	Используемый тип и концентрация КТС	Время инкубации, ч
Эпителиальные клетки почки собаки линии С7- и С11-MDCK [144]	Онкоз	Убаин (3000 нМ)	24
Клетки аорты свиньи (РАЕС) [147]		Убаин (3000 нМ)	24
Эпителиальные клетки кишечника человека (Сасо-2) [148]		Убаин (3000 нМ)	24
Гладкомышечные клетки предстательной железы человека [154]		Убаин (100 нМ)	20
Клетки HeLa [155]		Убаин (1000 нМ), дигоксин (10000 нМ), буфалин (50 нМ)	24
Клетки аденокарциномы предстательной железы человека [156]	Апоптоз	Убаин, дигоксин (100 нМ)	24
Моноциты человека [157]		Буфалин (100 нМ)	48
Клетки аденокарциномы человека линии H295R [158]	Апоптоз	Убаин (1000 нМ)	72
Клетки аденокарциномы человека линии SW13 [158]	Апоптоз	Убаин (50 нМ)	72
Клетки эритромиелоза человека линии (HEL) [159]	Гибель	Дигитоксин (1 нМ)	48
Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y [160]	Апоптоз	Убаин (1000 нМ)	96
Клетки-нейрональные предшественники NT2 человека [161,162]	Апоптоз	Буфалин (20 нМ)	24
Клетки остеосаркомы костей человека U-2 OS [163]	Апоптоз	Убаин (5 – 60 мкМ)	24 – 48
Клетки НерG2 [155]	Апоптоз	Убаин, дигоксин (1000 нМ), буфалин (10000 нМ)	24
Клетки Raji лимфомы Бёркитта человека [164]	Апоптоз, аутофагия	Убаин (500 нМ)	48

На ГМК крысы было показано, что убаин в концентрации 3 мМ предотвращает развитие апоптоза, вызванного удалением ростовых факторов. Было установлено, что защитный эффект убаина обусловлен увеличением внутриклеточной концентрации ионов Na^+ [149], что приводит к активации генов раннего ответа (c-Fos и c-Jun) и экспрессии антиапоптотических генов (морталин) [150]. Позднее было установлено, что синтез морталина приостанавливает развитие апоптоза путем ингибирования транслокации белка p53 в ядро ГМК [165]. Похожий анти-

апоптатический эффект был показан и на других типах клеток (клетки проксимальных канальцев крысы) [166,167].

Кроме того, на клетках линии C7-MDCK проводилось сравнение эффектов двух кардиотонических стероидов – убаина и маринобуфагенина на активность Na,K-АТФазы и жизнеспособность клеток. Было показано, что в присутствии как 1 мкМ убаина, так и 1 мкМ маринобуфагенина наблюдается 2-4-кратное уменьшение АТФазной активности. Однако несмотря на подобное убаину ингибирование Na,K-АТФазы, маринобуфагенин вплоть до концентрации 10 мкМ не вызывает смерть клеток (рис. 19), [148]. Стоит отметить, что на очищенном препарате Na,K-АТФазы из солевых желез уток (экспрессирует $\alpha 1S$) убаин и маринобуфагенин вызывают различные структурные изменения фермента, что может быть причиной различного действия убаина и маринобуфагенина на клетки [168].

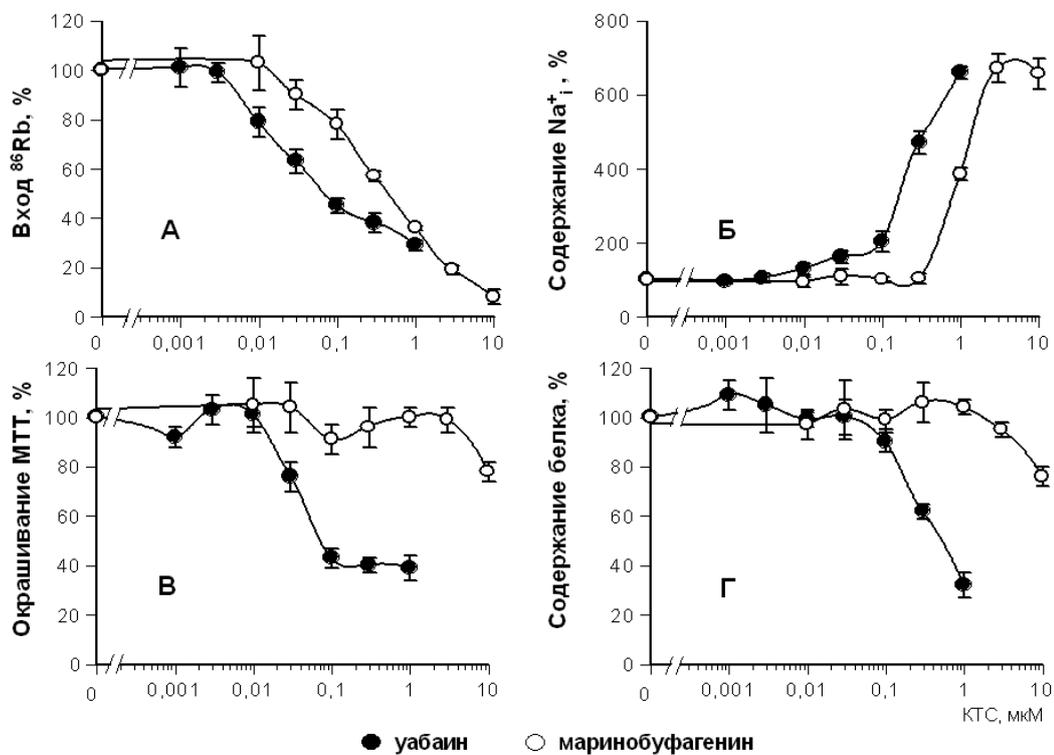


Рис. 19. Концентрационные зависимости эффектов убаина (●) и маринобуфагенина (○) на: **А** – вход в клетки ^{86}Rb ; **Б** - содержание внутриклеточного Na^+ ; **В** - окрашивание клеток МТТ; **Г** - сохранение связи клеток с подложкой [148].

Таким образом, в зависимости от типа клеток КТС способны как индуцировать, так и ингибировать клеточную смерть. Механизм устойчивости клеток грызунов к КТС остается неизученным.

1.8. Кардиотонические стероиды как индукторы Na^+, K^+ - опосредованных и независимых сигнальных каскадов

В таблице 4 перечислены основные функциональные параметры клеток, регулируемые КТС. В большинстве случаев эти эффекты обусловлены ингибированием Na, K -АТФазы, в результате чего изменяются потоки одновалентных ионов и увеличивается соотношение внутриклеточных концентраций Na^+ и K^+ ($[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$). Кроме того, исследователи рассматривают Na, K -АТФазу, как рецептор КТС, который после их связывания может взаимодействовать с другими белками, ассоциированными с мембраной, и запускать сигнальные каскады вне зависимости от ингибирования ионных потоков и увеличения соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [166,169,170]. Следует отметить, что в ряде работ этот вывод не подтверждается корректным измерением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Ниже рассмотрены некоторые примеры такого рода исследований.

Таблица 4. Сигналы, индуцируемые КТС

№ п/п	Сигналы, индуцируемые КТС
<i>Na^+, K^+-зависимые сигналы</i>	
1	регуляция мембранного потенциала клетки [2,3]
2	регуляция объема клеток [171]
3	регуляция концентрации внутриклеточных одновалентных катионов [2]
4	сопряженный транспорт Na^+ и аминокислот, глюкозы, нуклеотидов и некоторых ионов (например, Ca^{2+} , H^+) через плазматическую мембрану [172]
5	регуляция транскрипции генов [173]
6	регуляция трансляции генов [173]
7	инотропный эффект [174,175]
8	влияние на плотные контакты и адгезию клеток [176–180]
<i>Na^+, K^+-независимые сигналы</i>	
1	осцилляции кальция в клетке [181]
2	влияние на плотные контакты и адгезию клеток [182–185]
3	фосфорилирование $\text{ERK}^{1/2}$ (p44/p42) MAPK, фосфорилирование про-апоптотического белка Bad, фосфорилирование противоопухолевого белка p53, высвобождение цитохрома c [160]
<i>Роль соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ не установлена</i>	
1	смерть клеток MDCK [186]
2	активация сигнальных каскадов, включая Ras/Raf/MEK/ERK ^{1/2} (p42/44 MAPK), p38 и JNK ^{1/2} MAPK, фосфорилирование рецепторной тирозиновой Src киназы [11,145,187]
3	высвобождение кальция в клетке [188]
4	увеличение уровня АФК [189]

1.8.1. Инотропный эффект

При изучении регуляции сокращения кардиомиоцитов было показано, что при взаимодействии Na,K-АТРазы с убаином и другими КТС в концентрациях, ингибирующих активность $\alpha 2$ -изоформы, наблюдается положительный инотропный эффект. Этот эффект связан с возрастанием внутриклеточной концентрации натрия, что приводит к активации Na/Ca-обменника и к повышению концентрации Ca^{2+} в клетке, в результате чего происходит увеличение силы и частоты сокращения сердечной мышцы [174]. При удалении ионов Ca^{2+} из среды действие убаина на увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} блокировалось, а увеличение силы и частоты сердечных сокращений не наблюдалось [175].

1.8.2. Внутриклеточная концентрация одновалентных ионов регулирует транскрипцию генов

Наряду с КТС для ингибирования Na,K-АТРазы в конформации E2 достаточно поместить клетки в среду без ионов калия. Однако это вызовет гиперполяризацию мембраны, влияя тем самым на активность многих потенциал-чувствительных мембранных белков [190,191]. Исходя из этого, в нашей лаборатории сравнили действие убаина и бескальевой среды на экспрессию генов в клетках эндотелия человека (HUVEC), клетках гладкой мускулатуры аорты крысы (RASMC) и HeLa [192]. С использованием технологии Affymetrix, было продемонстрировано, что в клетках HeLa, HUVEC и RASMC в ответ на 3-х часовое ингибирование Na,K-АТРазы в присутствии убаина или в бескальевой среде происходит достоверное изменение экспрессии 684, 737 и 1839 транскриптов соответственно (рис. 20). Среди обнаруженных Na_i, K_i -чувствительных генов, 80 транскриптов встречались во всех трех типах клеток [192]. Более половины из этих универсальных Na_i, K_i -чувствительных транскриптов были представлены генами раннего ответа, а также другими генами, вовлеченными в регуляцию транскрипции или трансляции, что в 7 раз превышало их содержание в общем геноме человека [193].

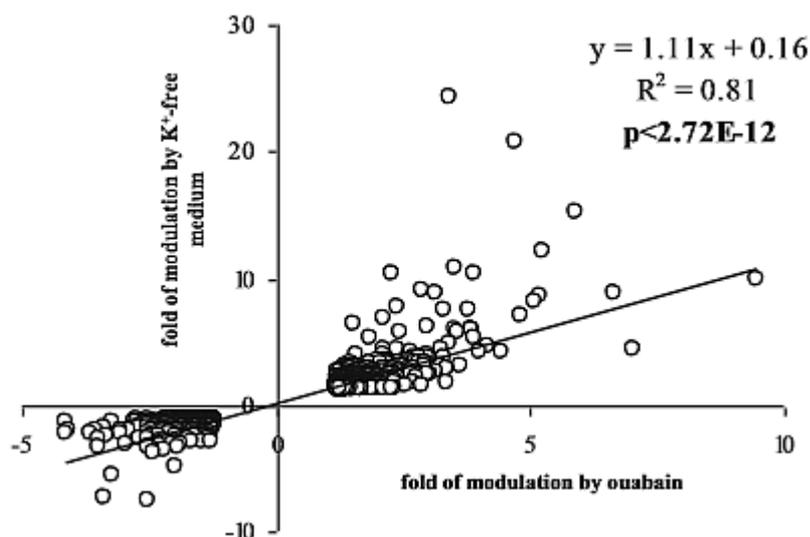


Рис. 20. Анализ корреляции между количеством транскриптов, которые экспрессируются под действием убаина и бескальциевой среды в RASMC. Изменение экспрессии транскриптов более 20% при $p < 0,05$. Экспрессия транскриптов в контрольных клетках приняты за 1,00 [173].

Riganti и его коллеги высказали предположение, что длительная инкубация с КТС может вызывать изменения в экспрессии генов через их взаимодействие с стероидными рецепторами, отличными от α -субъединицы Na,K-АТРазы. Было показано, что 24 ч инкубация клеток Caco-2 с 1 мкМ дигоксина увеличивает содержание транспортера множественной лекарственной устойчивости MDR1, экспрессия которого контролируется стероидным рецептором ксенобиотиков [194]. Smith и его коллеги показали, что 1 мкМ маринобуфагенина резко снижает активность альдостерон-чувствительного рецептора для минералкортикоидов [195]. Fujita-Sato продемонстрировал, что дигоксин подавляет продукцию П-17 за счет его связывания с орфанным ядерным рецептором, связанным с ретиноевой кислотой [196].

Учитывая эти данные в нашей лаборатории сравнили концентрационную зависимость длительного действия убаина и маринобуфагенина на содержание внутриклеточного Na^+ и K^+ и экспрессию генов [197]. Инкубация клеток эндотелия человека HUVEC с 3 нМ убаина или 30 нМ маринобуфагенина в течение 96 ч приводят к увеличению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в 14 и 3 раза, и экспрессии различных 880 и 484 транскриптов соответственно. Обнаружить изменения экспрессии после 96 ч инкубации при добавлении более низких концентраций КТС, не вызывающих изменения соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, не удалось. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что изменения транскриптома HUVEC связано с увеличением $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ [197].

1.8.3. Внутриклеточная концентрация одновалентных ионов регулирует трансляцию генов

На фибробластах человека было показано, что при длительном ингибировании Na,K-АТФазы (с помощью КТС и в бескальциевой среде) уменьшается синтез белков без какого-либо влияния на содержание мРНК, АТФ и транспорт аминокислот [198]. В ретикулоцитах основным белком является глобин (более 90% от общего количества белка). Было установлено, что в этих клетках уменьшение концентрации калия ингибирует процесс элонгации при синтезе глобина без какого-либо воздействия на субъединицы рибосом [199]. Кроме того, в этих экспериментах авторы продемонстрировали, что увеличение внутриклеточной концентрации натрия уменьшает эффективность регуляции калием синтеза белков через подавление взаимодействия калия с гипотетическим сенсором. Альтернативная гипотеза предполагает, что увеличение $[Na^+]_i$ уменьшает транскрипцию факторов элонгации [200–202]. Следует отметить, что эффект уменьшения внутриклеточной концентрации калия на синтез белков тканеспецифичен. Возможно, поэтому в RASMC, которые инкубировали 24 ч с убаином, не обнаружено изменение белкового синтеза, измеренного по включению $[^3H]$ -лейцина [150]. Можно сформулировать 3 гипотезы, объясняющие полученные результаты. (1) В данном типе клеток отсутствуют K^+ -чувствительные элементы регуляции белкового синтеза. (2) K^+ -независимая трансляция может относиться к специальному классу мРНК, содержащих в своем промотере специальный элемент. Так, например, фосфорилирование α -субъединицы фактора инициации 2 у эукариот (eIF2a), снижает трансляцию мРНК, за исключением мРНК, кодирующей фактор активации транскрипции 4 (ATF4) и некоторых других мРНК. (3) Уменьшение синтеза белков замаскировано увеличением их транскрипции. В самом деле, при 10 ч инкубации RASMC с убаином происходит 6-кратное увеличение синтеза РНК, измеренного по включению $[^3H]$ -уридина [150].

Таким образом, трансляция генов является Na^+, K^+ -зависимым сигналом. Для понимания точного механизма действия этих одновалентных катионов требуется дальнейшие исследования.

1.8.4. Влияние КТС на плотные контакты и адгезию клеток

Высокие концентрации убаина блокируют образование плотных контактов в клетках MDCK [176], ГМК аорты крысы [177,178], клетках HeLa [177], а также снижают адгезию клеток COS-7 [179] и клеток пигментного эпителия сетчатки глаза [180]. Стоит отметить, что нарушение плотных контактов и адгезии в клетках, экспрессирующих $\alpha 1R$ - и $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазу наблюдались при концентрации убаина ~1000 и 1 мкМ соответственно (концентрация убаина, необходимая

для ингибирования фермента). Такой же эффект убаина наблюдался в среде без ионов K^+ , что вызывает ингибирование Na,K-АТФазы. В среде без ионов Na^+ описанный эффект убаина прекращался. Таким образом, можно сделать вывод, что поддержание трансмембранного градиента Na^+ и K^+ является обязательным условием для межклеточного взаимодействия и адгезии клеток. При этом относительное влияние увеличения $[Na^+]_i$ и уменьшения $[K^+]_i$ является предметом дальнейшего исследования.

В отличие от результатов исследований, приведенных ранее, Larre и его коллеги показали, что трёхдневная инкубация клеток MDCK с 10-50 нМ убаина не изменяют внутриклеточную концентрацию K^+ , но увеличивают герметичность плотных контактов (измеренную как трансэпителиальный электрический ток) и увеличивают щелевые контакты [182,183]. Предполагает, что в данном случае запускается Na^+,K^+ -независимые сигнальные каскады [184,185]. Этот эффект может быть связан с 2-кратным увеличением фосфорилирования c-Src и ERK $^{1/2}$ MAPK [203].

Таким образом, роль изменения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в регуляции структуры клеточных контактов и адгезии клеток требует дальнейших исследований.

1.8.5. КТС как триггеры Na^+,K^+ -независимых сигналов

При анализе литературы было выявлено более 100 статей, в которых функциональные ответы, запускаемые при действии малых концентраций КТС, связывают с существованием Na^+,K^+ -независимых сигнальных каскадов. Так, например, было установлено, что при добавлении убаина происходит изменение в связывании Src-киназы с α -субъединицей Na,K-АТФазы, в результате которого Src-киназа активирует фосфорилирование рецептора для эпидермального фактора роста по центрам, отличным от центров автофосфорилирования, что в свою очередь приводит к активации сигнального каскада с участием Ras/Raf/MEK/ERK $^{1/2}$, фосфоинозитол-3-киназы (PI3K), протеинкиназы B (или Akt), фосфолипазы C, а также к продукции активных форм кислорода и экспрессии ряда генов, включая гены раннего ответа c-Fos и c-Jun, и транскрипционные факторы AP-1 и NF-kB [204]. Следует, однако, отметить, что только в части из такого рода работ проводилось измерение ионных потоков и внутриклеточной концентрации натрия и калия (таблицы 5 и 6). Кроме того, в большинстве работ измерение этих параметров и КТС-чувствительных сигнальных каскадов проводили при разных временах инкубации. Так, например, несколько групп исследователей показали, что при обработке низкими концентрациями КТС наблюдается 20-50% увеличение пролиферации некоторых типов клеток (таблица 5). В этих работах утверждается, что увеличение пролиферации клеток происходит в отсутствие значительных изменений входа ^{86}Rb или соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$.

Однако, как следует из таблицы 5, эффект убаина на пролиферацию клеток оценивался после многочасовой инкубации, в то время как измерение ионных потоков проводили через 10-60 мин после добавления КТС. В этой связи следует отметить, что ещё в 80-х годах Сигель и Лихман показали, что увеличение времени инкубации с убаином приводит к увеличению кажущегося сродства лимфоцитов человека к КТС, измеренного как по связыванию [^3H]-убаина, так и по ингибированию убаином входа ^{86}Rb (K^+) [205].

Таблица 5. Эффект низких концентраций КТС на пролиферацию клеток

Тип клеток	Используемый тип и концентрация КТС	Степень активации пролиферации, % / время инкубации	Измерение ионных потоков / время инкубации
Клетки гладкой мускулатуры сосудов собаки [206]	Убаин (1 нМ)	25-40 / 1-5 дней	без изменения входа ^{86}Rb в клетку / 10 мин
Клетки гладкой мускулатуры сосудов человека [207]	Убаин (10 нМ), маринобуфагенин (1 нМ)	20-30 / 5 дней	без изменения $[\text{Na}^+]_i$ / 30 мин
Дендриты крысы [208]	Убаин (0,5-1нМ)	50 / 48 ч	без изменения входа ^{86}Rb в клетку / 30 мин
Эндотелиальные клетки пупочной артерии человека [209]	Убаин (10 нМ)	40-50 / 12 ч	без изменения входа ^{86}Rb в клетку / 60 мин
Мышечные клетки предстательной железы [154]	Убаин (0,1 нМ)	30-35 / 4 ч	без изменения $[\text{Na}^+]_i$ / 30 мин
Эпителиальные клетки проксимальных канальцев крысы [210]	Убаин (1 нМ)	25-35 / 24 ч	незначительно уменьшался вход ^{86}Rb в клетку / 30 мин
A7r5 клетки гладкой мускулатуры сосудов крысы [207]	Убаин (1000 нМ), маринобуфагенин (10 нМ)	30-35 / 5 дней	без изменения $[\text{Na}^+]_i$ / 30 мин

Учитывая данные, представленные в таблице 5, в нашей лаборатории было проведено сравнение дозовой и временной зависимости действия убаина на пролиферацию и внутриклеточную концентрацию Na^+ и K^+ в клетках HUVES. Инкубация клеток в течение 48-72 часовая с низкими концентрациями убаина (1 и 3 нМ) активирует пролиферацию клеток на 20-40%. При концентрации убаина 30 нМ и выше клеточная пролиферация снижается [211]. Важно отметить, что длительное воздействие 1 и 3 нМ убаина вызывало увеличение $[\text{K}^+]_i$ и уменьшение $[\text{Na}^+]_i$, что в итоге приводило к снижению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ на 30-50%. Кроме того, низкие концентрации убаина увеличивали скорость притока ^{86}Rb . Это позволило

предположить, что повышение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ вызвано активацией Na,K-АТФазы [211]. Полученные данные согласуются с данными, демонстрирующими активацию Na,K-АТФазы низкими концентрациями КТС. Например, убаин в концентрациях менее 10 нМ увеличивает $[Na^+]_i$ в клетках предсердия морской свинки [212,213], усиливает зависимый от Na,K-АТФазы ионный ток в одиночных миоцитах морской свинки, собаки и сердца человека [214]. На эритроцитах человека было показано увеличение входа ^{86}Rb при добавлении 0,1 нМ убаина [215], в клетках проксимальных канальцев опоссума и почек человека данный эффект наблюдался при концентрации убаина 10 нМ и 10 пМ соответственно [216,217]. На культурах срезов гиппокампа также было продемонстрировано увеличение входа ^{86}Rb при добавлении убаина и других КТС [218].

Как доказательство Na^+,K^+ -независимого механизма приводятся данные о том, что низкие концентрации КТС активируют сигнальные каскады, напрямую не имеющие отношения к функционированию Na,K-насоса (рис. 21, таблица 6). В самом деле, в клетках человеческой нейробластомы после 6-ти часовой инкубации со 100 нМ убаина происходит фосфорилирование ERK $^{1/2}$ (p44/p42) MAPK, фосфорилирование про-апоптотического белка Bad по остатку Ser122, фосфорилирование противоопухолевого белка p53 по остатку Ser 15, высвобождение цитохрома c. В этих же условиях не обнаружено изменения $[Na^+]_i$ и $[K^+]_i$, измеренных с помощью пламенного фотометра [160]. В отличие от цитированной выше работы [160], действие убаина как активатора сигнальных каскадов и ингибитора Na,K-АТФазы проводили при существенно различных временах инкубации (таблица 6). В ряде случаев концентрацию $[Na^+]_i$ измеряли с помощью флуоресцентного зонда BSFI, который имеет низкую селективность по отношению к натрию и калию [175]. Ошибка может увеличиваться из-за отсутствия адекватной калибровки флуоресценции этого зонда. Кроме того, наличие флуоресцентного зонда может приводить к модификации КТС-зависимых сигналов.

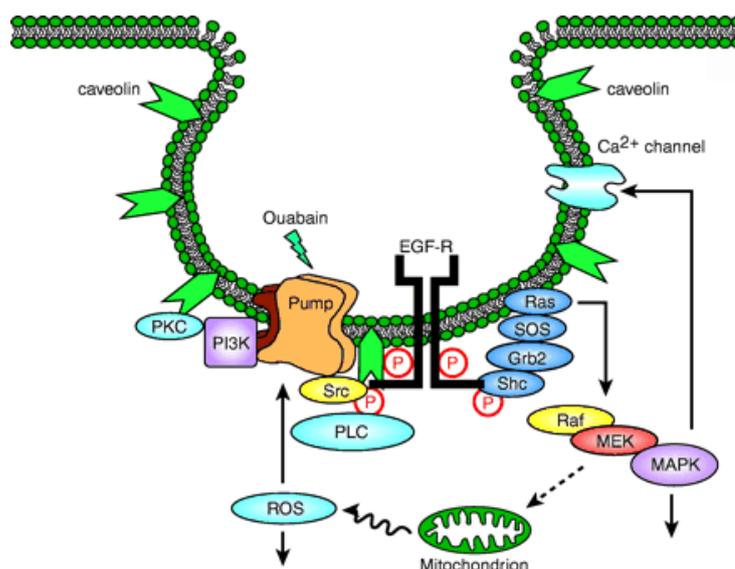


Рис. 21. Схема структурной организации кавеолы и сигнальных путей, вызванных взаимодействием убаина с Na,K-АТФазой. Pump – Na,K-АТФаза; ouabain – убаин; caveolin – кавеолин; PI3K – фосфотидилинозитол-3 киназа; PLC – фосфолипаза С; ROS – активные формы кислорода; EGF-R – рецептор эпидермального фактора роста [204].

Таблица 6. Сигнальные каскады, активируемые низкими концентрациями КТС

Тип клеток	Используемый тип и концентрация КТС	Сигнальные системы клетки / Время инкубации	Измерение ионных потоков / время инкубации
Клетки гладкой мускулатуры сосудов собаки [206]	Убаин (1 нМ)	фосфорилирование ERK ^{1/2} (p44/p42) MAPK / 15 мин, фосфорилирование остатков тирозина, включая EGFR / 15 мин	без изменения входа ⁸⁶ Rb в клетку / 10 мин
Эндотелиальные клетки пупочной артерии человека [209]	Убаин (1 нМ) Убаин (1 нМ)	колебания [Ca ²⁺] _i / 5 мин фосфорилирование ERK ^{1/2} (p44/p42) MAPK / 30 мин	без изменения входа ⁸⁶ Rb в клетку / 60 мин
Мышечные клетки предстательной железы [154]	Убаин (0,1 нМ)	фосфорилирование ERK 2 (p42) MAPK / 4 ч	без изменения [Na ⁺] _i / 30 мин
Эпителиальные клетки проксимальных канальцев крысы [210]	Убаин (1 нМ)	фосфорилирование ERK ^{1/2} (p44/p42) MAPK / 24 ч,	незначительно уменьшался вход ⁸⁶ Rb в клетку / 30 мин,
Кардиомиоциты крысы [175,187–189,219]	Убаин (100 мкМ)	фосфорилирование ERK ^{1/2} (p44/p42) MAPK, активация Src-киназы, активация Ras, возрастание уровня АФК, возрастание [Ca ²⁺] _i / 5-30 мин	без изменения [Na ⁺] _i / 30 мин

В другой серии работ для идентификации Na^+ , K^+ -независимых сигналов сопоставляли действие КТС и бескальевой среды. Так, например, было показано, что как в присутствии убаина, так и в среде без калия происходит активация гена раннего ответа *c-Fos* (рис. 22), что свидетельствует о Na^+ , K^+ -опосредованном механизме регуляции транскрипции [165]. В другой серии работ было показано, что в клетках LLC-PK1 как убаин, так и среда, содержащая в 5 раз меньше $[\text{K}^+]_o$, вызывают фосфорилирование ERK $^{1/2}$ (p44/p42) MAPK, Src-киназы (по тирозину 418). Помимо убаина, BeF и AlF, которые являются аналогом фосфата, и необратимо связываются с Na,K-АТФазой в конформации E2, вызывали фосфорилирование Src-киназы [220], что также свидетельствует о Na^+ , K^+ -опосредованной природе этого сигнального каскада.

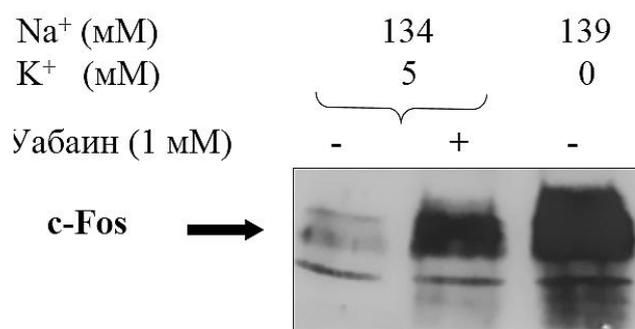


Рис. 22. Влияние 1 мкМ убаина и среды без калия на содержание *c-Fos* в гладкомышечных клетках аорты крысы через 6 ч инкубации. Пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга [165].

В отличие от рассмотренных выше работ, гибель клеток почечного эпителия C7-MDCK наблюдалась при 24-часовом действии 3 мкМ убаина, но не в бескальевой среде (рис. 23, а) [145]. Было также установлено, что в этих клетках при добавлении убаина, но не в среде без калия, происходит фосфорилирование p38 MAPK, ERK2 (p44) MAPK (рис. 23, б). Необходимо отметить, что как и убаин, так и среда без калия вызывали одинаковое увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. В дополнение к этому измерение скорости входа ^{86}Rb в клетку показало, что в бескальевой среде как ингибирование Na,K-АТФазы, так и смерть C7-MDCK клеток наблюдаются при меньших концентрациях убаина. Из этого можно сделать вывод, что смерть клеток происходит как результат взаимодействия убаина с Na,K-АТФазой, а не с другим возможным рецептором КТС. Важно отметить, что гибель клеток происходит только в тот момент, когда КТС вызывает полномасштабное ингибирование фермента. Таким образом, установление относительной роли Na^+ , K^+ -опосредованных и -независимых сигналов в смерти клеток, индуцированной КТС, требует проведения дополнительных экспериментов.

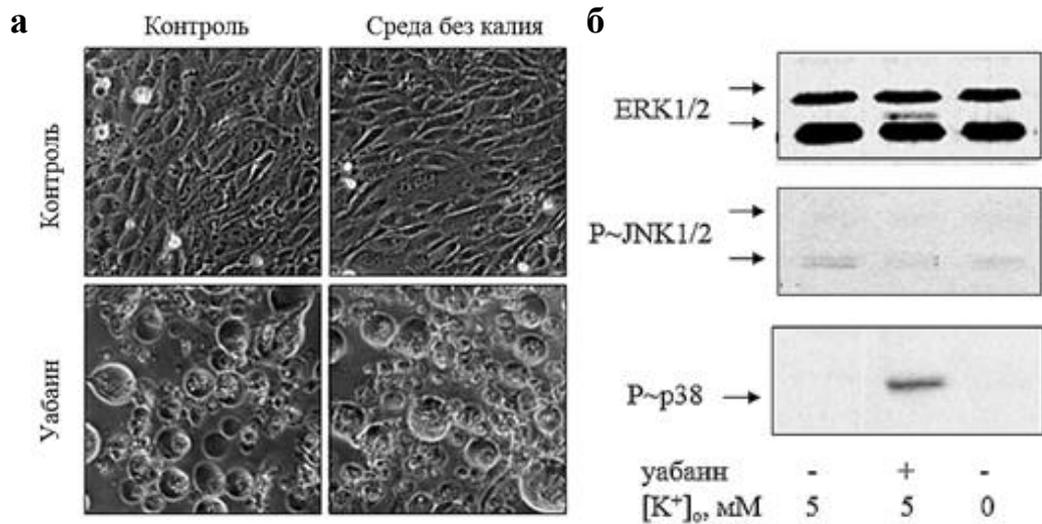


Рис. 23. Эффект убаина и среды без калия на морфологию (**а**) и фосфорилирование MAPK (**б**) клеток C7-MDCK. **а.** Фазово-контрастная микроскопия (увеличение 200 раз) после 24 ч инкубации клеток в контрольной среде и среде без калия ± 3 мкМ убаина. **б.** Влияние 3 мкМ убаина и среды без калия на содержание фосфорилированной формы p38, JNK^{1/2} и ERK^{1/2} (p44/42) MAPK через 6 ч инкубации. Пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга [145].

В клетках проксимальных канальцев почек крысы исследовалась дозовая зависимость действия убаина на ингибирование Na,K-АТФазы и колебания внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) (рис. 24).

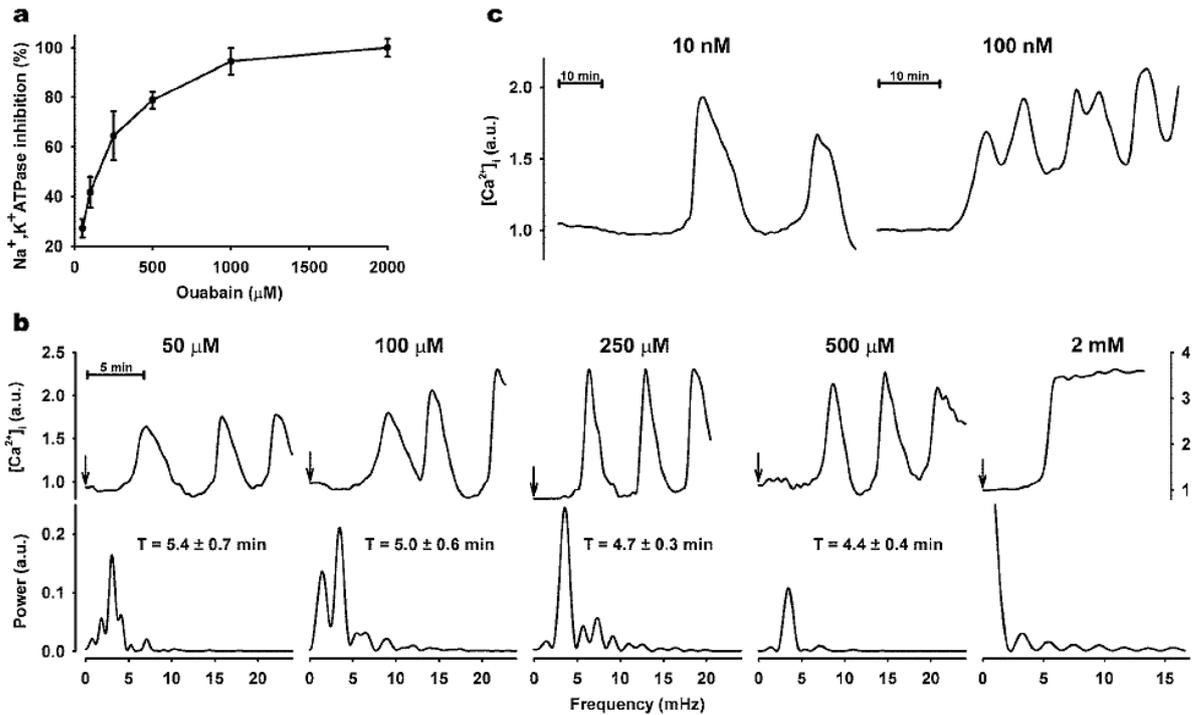


Рис. 24. Эффект убаина на $[Ca^{2+}]_i$ в первичной культуре клеток проксимальных канальцев крысы. **a.** Активность Na,K-АТФазы, измеренная по входу ^{86}Rb в клетку. **b (верхний).** Действие различных концентраций убаина на изменение содержания $[Ca^{2+}]_i$ в одной клетке. В точках, отмеченных стрелками, добавляли убаин в концентрациях 50 мкМ - 2 мМ. Измерение $[Ca^{2+}]_i$ проводили каждые 30 сек. Условные единицы (a.u.) представляют собой отношение значений, соответствующих изменению $[Ca^{2+}]_i$. **(нижний)** Спектральный анализ убаин-индуцированных осцилляций $[Ca^{2+}]_i$. T – периодичность осцилляций $[Ca^{2+}]_i$. **c.** Действие низких концентраций убаина на изменение содержания $[Ca^{2+}]_i$ в одной клетке в течение 3 ч [181].

В этой работе также исследовали действие блокатора калиевых каналов 4-аминопиридина, который вызывает деполяризацию мембран. Это соединение подавляло колебания $[Ca^{2+}]_i$ и вызывало кратковременное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 25). Исследователи считают, что эффект не связан с мембранным потенциалом, который может изменяться из-за изменения натрия и калия. Они продемонстрировали, что в отличие от убаина ингибирование Na,K-АТФазы при уменьшении $[K^+]_o$ от 4 мМ до 0,5 мМ не вызывало колебаний $[Ca^{2+}]_i$. Было также обнаружено, что как убаин, так и среда с низким содержанием калия вызывают примерно одинаковый прирост $[Na^+]_i$, измеренный по флуоресценции красителя SBF1 (рис. 25). Эти результаты авторы данной работы рассматривали как доказательство Na⁺,K⁺-независимого сигнального каскада [181].

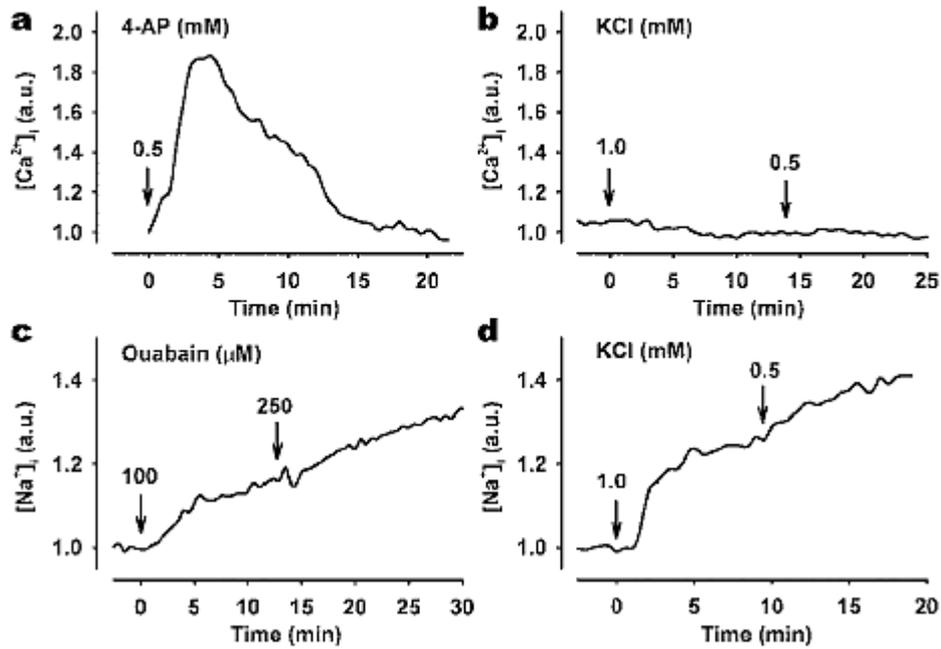


Рис. 25. а. Эффект деполяризации мембраны и низких концентраций калия на убаин-индуцированные изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ при добавлении 5 мМ 4 – аминопиридина (а) или уменьшении внеклеточной концентрации калия (б) с 4 мМ до 1 или 0,5 мМ. Эффект убаина (с) и низких $[K^+]_o$ (д) на изменение $[Na^+]_i$ в одной клетке. Условные единицы (а.у.) представляют собой отношение значений, соответствующих изменению $[Ca^{2+}]_i$ (а, б) и $[Na^+]_i$ (с, д) [181].

1.9. Возможные механизмы цитотоксического действия КТС

Как отмечалось выше, КТС оказывают различное влияние на жизнеспособность клеток грызунов и других млекопитающих, экспрессирующих $\alpha 1R$ - и $\alpha 1S$ -субъединицы Na,K-АТФазы, соответственно. Так, например, убаин вызывает гибель клеток эпителия почечных канальцев собаки, гладкомышечных клеток и астроцитов человека, но не влияет на жизнеспособность астроцитов и клеток гладкой мускулатуры крысы (подробнее см. раздел 1.7). Для объяснения этого явления мы можем сформулировать по крайней мере 3 гипотезы (рис. 26):

1. Цитотоксическое действие КТС обусловлено увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и генерацией Na^+, K^+ -опосредованных сигналов (рис. 26а). Эта гипотеза, тем не менее, противоречит данным, демонстрирующим, что увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в ответ на ингибирование Na,K-АТФазы в среде без калия не влияет на жизнеспособность клеток C7-MDCK (рис. 23а) [145].

2. Цитотоксическое действие КТС не зависит от увеличения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$. Оно вызвано способностью КТС вызывать конформационные переходы $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы, которые запускают различные Na^+, K^+ -независимые сигнальные каскады. Доказательством этой гипотезы может служить тот факт, что клетки C7-MDCK не гибнут при ингибировании Na,K-АТФазы в

бескальевой среде. Следует, однако, отметить, что цитотоксическое действие КТС было обнаружено при действии высоких концентраций убаина, когда происходило полномасштабное ингибирование Na,K-АТФазы и увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ [186].

3. Взаимодействие с КТС приводит к различным конформационным переходам $\alpha 1S$ -и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы. Цитотоксическое действие КТС проявляется как следствие активации сигнальных каскадов, инициируемых конформационными перестройками $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы на фоне изменения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ (рис. 26в). Иными словами, увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является необходимым, но не достаточным условием цитотоксического действия КТС.

Наша работа посвящена проверке этих гипотез.

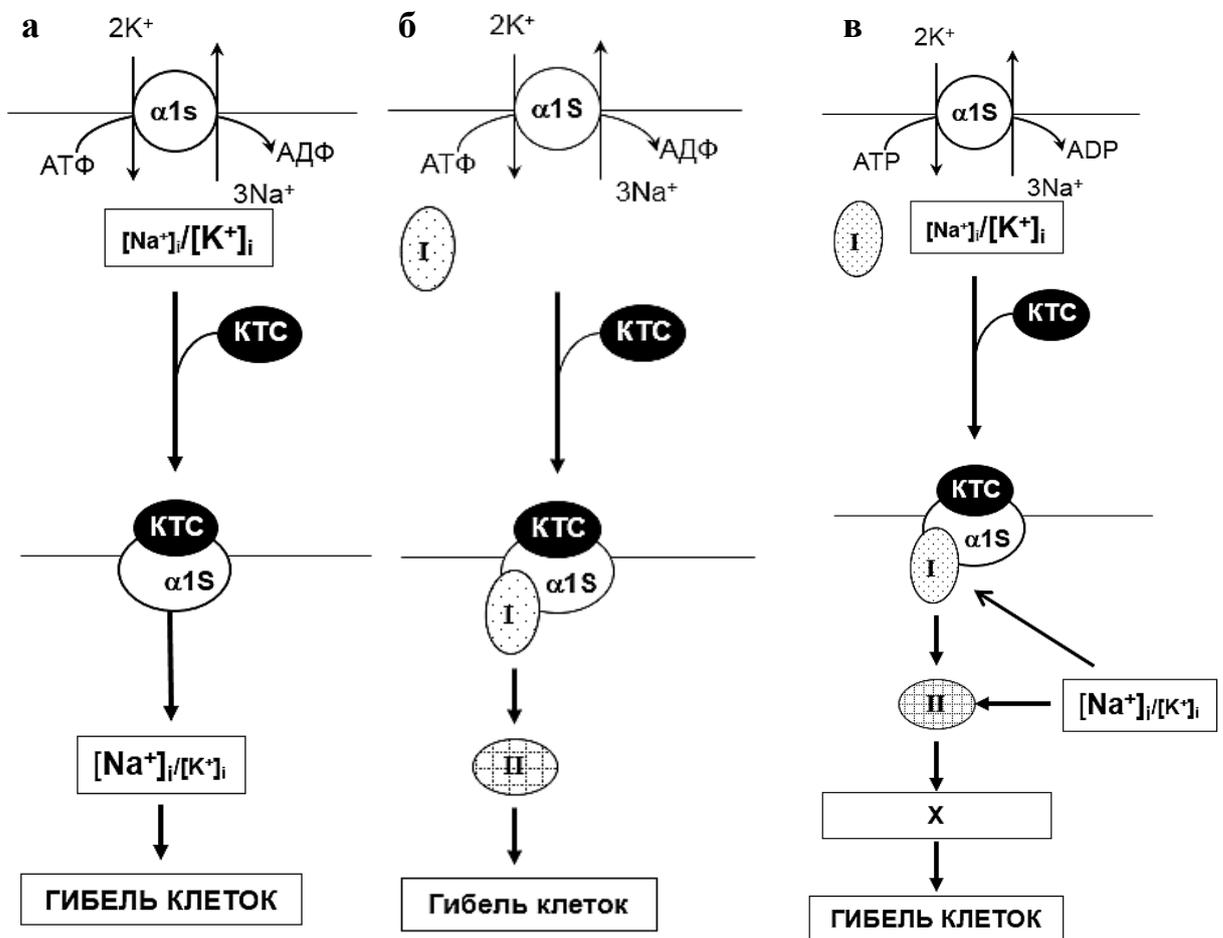


Рис. 26. Возможные механизмы действия КТС на жизнеспособность клеток. **а.** Цитотоксическое действие КТС связано исключительно с увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$. **б.** Цитотоксическое действие КТС не зависит от увеличения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$. **в.** Цитотоксическое действие кардиотонических стероидов на клетки проявляется на фоне изменения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Реактивы, использованные в исследованиях, были куплены у следующих фирм: Россия - «Лабтех»: бромфеноловый синий, этанол, уксусная кислота, NaOH; «Панэко»: трипсин, ингибитор трипсина, фосфатно-солевой буфер, pH 7,4 в таблетках; «Реахим»: HCl, Na₂CO₃, NaHCO₃; «Helicon»: акриламид, глицин, додецилсульфат натрия, диметилсульфоксид, сахароза, Твин-20, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), KCl, KH₂PO₄, NaCl, трис, HEPES, глицерин, тритон X-100, молибдат аммония [(NH₄)₆Mo₇O₂₄], хлорид олова (SnCl₂), фосфорная кислота, формальдегид, дезоксихолат натрия; США – «Ambresco»: бисакриламид, бычий сывороточный альбумин (biotechnology grade); «Acros Organics»: β-меркаптоэтанол; «BIOMOL Research Laboratories»: N-ацетил-DEVD-7-амино-4-метилкумарин, ацетил-DEVD-CHO; «Carmetion»: обезжиренное молоко; «ICN Biomedicals»: метил-[³H]-тимидин; «Cayman Chemical Group»: тиорфан; «Invitrogen»: генетицин (Г418), липофектамин 2000, тризол; «Fermentas»: PageRuler белки-маркеры (SM1811); «Gibco»: DMEM, сыворотка эмбриона теленка, глутамин, пенициллин; «MP-Biomedicals»: Ponceau S; «Lonza»: EBM-2 basal medium (CC-3156), EGM-2 single-quotes kit (CC-4176); «PerkinElmer»: ²²NaCl и ⁸⁶RbCl, Western Lightning Plus-ECL; «Promega»: CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit; «Roche»: лейпептин, апротинин А; «Sigma»: убаин, дигоксин, Кумасси-G250, MgCl₂, NaF, персульфат аммония, PMSF, лейпептин, пепстатин А, коктейль ингибиторов протеаз; «Qiagen»: RNeasy MinElute cleanup kit; Бельгия – «ТСI»: дигоксин; Великобритания – «Abscam»: коктейль ингибиторов протеаз.

Антитела: «Cell Signaling»: против p38 MAPK (#9212), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (#4511), SAPK/JNK (#9252), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (#4668), p44/42 MAPK (ERK1/2) (#4695), phospho-p42/44 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (#4377), к МКК3 (#9238), МКК6 (#9264), МКК4 (#9152), phospho-МКК3 (Ser189)/МКК6 (Ser207) (#9236), phospho-МКК4 (Ser80) (#9155), phospho-CREB (Ser133) (#9198), phospho-nF-kB (p65) (Ser536) (#3031), PI3K (p85) (#4292), phospho (Tyr)-PI3K (p85) (#3821), Akt (#9272), phospho-Akt (Thr308) (#4056), phospho-Akt (Ser473) (#4060), Bcl-xL (#2764), Bcl-w (#2724), Bak (#12105), GAPDH (#2118); «Santa Cruz Biotechnology»: против c-Src (#8056), Bax (#493), Bcl-2 (#7382), phospho-Bcl-2 (Ser87) (#16323), phospho-c-Src (Tyr419) (#101802), антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (#10208), к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (#358943), к иммуноглобулинам козы, конъюгированные с пероксидазой хрена (#L1508); «Millipore»: против α1-субъединицы Na,K-АТФазы (С 464.6).

Маринобуфагенин был любезно предоставлен профессором Багровым А. Я. (Санкт-Петербург).

2.2. Методы

2.2.1. Культуры клеток

2.2.1.1. Эндотелиальные клетки человека HUVEC

Культура клеток HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) – это первичная культура эндотелиальных клеток, выделенных из пупочной вены человека. Клетки культивировали в 6-ти, 24-ти луночных планшетах, а также в матрасах Т-25, помещали в инкубатор, содержащий 5% CO₂ при 37°C и растили в коммерческой среде «EGM-2 BulletKit» (Lonza), содержащей: среду для эндотелиальных клеток (Endothelial basal medium (CC-3156)), гидрокортизон, человеческий рекомбинантный фактор роста фибробластов, человеческий эпидермальный фактор роста, инсулин-подобный фактор роста, человеческий рекомбинантный фактор роста сосудов, аскорбиновую кислоту, гепарин, 2% эмбриональную бычью сыворотку, гентамицин, амфотерицин В. Культуру клеток пересаживали 8 раз (2-10 пассаж). Клетки, достигшие 70-80% конфлюэнтности (состояние, при котором клетки заполняют 70-80% поверхность лунки планшета), использовали в дальнейших экспериментах. За 24 ч до проведения эксперимента снижали концентрацию эмбриональной бычьей сыворотки в среде до 0,2%, чтобы не происходило активного роста клеток, в результате чего они все находились примерно в одной и той же стадии клеточного цикла, что обеспечивало одинаковое действие на них убаина и бескалиевой среды. Поскольку точный состав коммерческой среды неизвестен, то в качестве бескалиевой среды использовали модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), содержащую: 0,2% бычью сыворотку, глутамин (2 мМ), гентамицин (500 мкг/мл), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мг/мл). Убаин добавляли также в DMEM, содержащую: 0,2% бычью сыворотку, глутамин (2 мМ), гентамицин (500 мкг/мл), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мг/мл), 5 мМ KCl.

2.2.1.2. Эндотелиальные клетки крысы RAEC

Культура клеток RAEC (endothelial cells from rat aorta) была любезно предоставлена доктором Торином-Трескейсом (Институт кардиологии университета г. Монреаль, Канада). Культуру клеток выделяли и пересаживали 3-4 раза, как описано ранее [147,153,221]. Клетки культивировали в 6-ти, 24-ти луночных планшетах, помещали в инкубатор, содержащий 5% CO₂

при 37°C и растили в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей: 10% бычью сыворотку, глутамин (2 мМ), гентамицин (500 мкг/мл), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мг/мл). За 24 ч до проведения эксперимента снижали концентрацию эмбриональной бычьей сыворотки в среде до 0,2%, чтобы не происходило активного роста клеток, в результате чего они все находились примерно в одной и той же стадии клеточного цикла.

2.2.1.3. Гладкомышечные клетки аорты мыши

Мыши с убаин-чувствительной $\alpha 1$ -изоформой ($\alpha 1^{S/S}$) были получены путем замены аминокислотных остатков в 111-м и 122-м положении в первой внеклеточной петле α -субъединицы Na,K-АТФазы [222,223]. Они были любезно предоставлены доктором Джоном Лингрелом (Университет г. Цинциннати, США). Гладкомышечные клетки аорты мыши (MASMC) были получены из мышей ($\alpha 1^{S/S}$) и дикого типа ($\alpha 1^{R/R}$) в университете г. Чикаго согласно протоколу, описанному ранее [224].

2.2.1.4. Трансфекция

Плазмиду pRC-CMV, содержащую ген, вызывающий резистентность к неомицину/генетицину (G418) и $\alpha 1R$ -субъединицу Na,K-АТФазы крысы, трансфицировали в HUVES. Клетки растили в чашках Петри диаметром 10 см до достижения ~70% конfluence в среде DMEM без сыворотки 6 ч с 25 мкг плазмиды и 60 мкл липофектамина 2000. Затем промывали средой DMEM и инкубировали 24 ч в среде, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Далее трипсинизировали трансфицированные клетки, пересаживали их на чашки Петри и растили в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,8 мг/мл генетицина (G418) для селекции клеток. После 2 недель селекции, трансфицированные клетки использовали в последующих экспериментах.

2.2.2. Фазово-контрастная микроскопия

Клетки линии HUVES, RAEC рассаживали в 6-ти, 24-ти луночные планшеты и культивировали до достижения 70-80% конfluence. После инкубации клеток в среде, содержащей убаин, или в бескальциевой среде морфологию клеток оценивали с помощью метода фазово-контрастной микроскопии (Nikon «Diaphot») с 100-кратным увеличением без предварительного фиксирования клеток.

2.2.3. Измерение внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+

Клеточное содержание обмениваемых ионов Na^+ и K^+ измеряли по накоплению ^{22}Na и ^{86}Rb , соответственно. Для достижения равновесия, клетки инкубировали 3 часа в 12-ти луночных планшетах в среде DMEM, содержащей 0,5 мкКю/мл $^{86}\text{RbCl}$ или 3 мкКю/мл $^{22}\text{NaCl}$. Затем на 3 ч добавляли убаин. В дальнейшем планшеты переносили на лед, 4 раза промывали 2 мл ледяной среды W, содержащей 100 мМ MgCl_2 и 10 мМ HEPES-Трис буфер (pH 7,4). Среду, которой промывали клетки, удаляли, а клетки лизировали раствором, содержащим 1% SDS, 4 мМ ЭДТА. Радиоактивность инкубационной среды и клеточных лизатов определяли количественно. Внутриклеточное содержание катионов рассчитывали, как отношение $A/a \cdot m$, где A – радиоактивность образца (число распадов в минуту), a – удельная радиоактивность ^{86}Rb (K^+) и ^{22}Na в среде инкубации (число распадов в минуту/нмоль), m – содержание белка в образце (мг) [148].

2.2.4. Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяли по высвобождению лактатдегидрогеназы, активности каспазы-3 и распаду хроматина. *Высвобождение ЛДГ* определяли с помощью калориметрического CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega), используя протокол, предоставленный производителем.

Для измерения активности каспазы-3 клетки растили в 6-ти луночных планшетах, затем переносили на лед и скребком снимали клетки с планшета. Далее центрифугировали 10 мин при $+4^\circ\text{C}$ и 5000 g, а затем промывали 2 раза 3 мл ледяного ФСБ. Осадок смешивали с 150 мкл раствора, содержащего 0,32 М сахарозы, 5 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1% тритон X-100, 2 мМ DTT, 1 мМ PMSF, 10 мкг/мл пепстатин А, 10 мкг/мл апротинин. Затем образцы центрифугировали (14000 g, 10 мин при $+4^\circ\text{C}$) и 100 мкл супернатанта замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Для измерения ферментативной активности 20 мкл образца переносили в 400 мкл буфера, содержащего 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-HCl (pH 7,0), 0,1% CHAPS, 1 мМ DTT, 40 мкМ N-ацетил-DEVD-7-амино-4-метилкумарин с добавлением или без добавления 2 мкМ ингибитора каспазы-3 ацетил-DEVD-CHO. После 2-3 ч инкубации при $+37^\circ\text{C}$, реакцию останавливали добавлением 1 мл 0,5 М г буфера глицин-NaOH (pH 10,0). Образцы разводили водой. Флуоресценцию измеряли с помощью прибора SPEX FluoroMax spectrofluorimeter, длина волны возбуждения ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ нм), длина волны флуоресценции ($\lambda_{\text{em}} = 465$ нм). Флуоресцентный сигнал калибровали, используя 0,01-0,3 мкМ раствор 7-амино-4-

метилкумарина. Активность каспазы-3 определяли, как разность между активностью DEVD в отсутствие и при наличии ацетил-DEVD-CHO [225].

Распад хроматина определяли, как описано ранее [149], с незначительными изменениями, перечисленными ниже. Клетки в 24-ти луночных планшетах инкубировали в среде DMEM, содержащей сыворотку и 0,1 мкКю/мл [³H]-тимидин. После 24 ч инкубации клеток с или без убаина, их дважды промывали 2 мл DMEM и инкубировали 48 ч в DMEM, содержащем сыворотку и 0,1 мкКю/мл [³H]-тимидин. Затем удаляли и центрифугировали среду (900 g, 10 мин). Далее супернатант переносили в жидкостной сцинтилляционный спектрометр (фракция F₁). К осадку и клеткам, оставшимся в планшете, добавляли холодный лизирующий буфер (10 mM ЭДТА, 10 mM трис-HCl, 0,5% тритон X-100, pH 8,0). Далее клеточные лизаты центрифугировали (12000 g, 10 мин), супернатант переносили в камеру для измерения радиоактивности (фракция F₂). Оставшуюся радиоактивность от осадка и планшета удаляли раствором, содержащим 1% SDS, 4 mM ЭДТА (фракция F₃). Относительное содержание внутриклеточных фрагментов хроматина определяли в процентах от общего [³H]-меченного ДНК: $F_2/(F_1+F_2+F_3)^{-1} * 100\%$.

2.2.5. Приготовление образцов для иммуноблоттинга

Культуру клеток HUVEC, RAEC рассаживали в 6-ти луночные планшеты и растили до достижения конfluence. После инкубации с убаином, переносили планшеты на лед, удаляли среду инкубации, клетки дважды промывали холодным раствором ФСБ и добавляли на 10 мин лизирующий буфер (~ 250 мкл) следующего состава: 150 mM NaCl, 1% тритон X-100, 0,1% SDS, 2 mM ЭДТА, 25 mM HEPES (pH 7,5), 10% глицерин, 1 mM NaF, 200 мкМ Na₃VO₄, и ингибиторы протеаз (1 мкг/мл лейпептин, 1 мкг/мл апротинин, 1 мкг/мл пепстатин, 1 mM PMSF). Через 10 мин скребком перемешивали лизаты в лунках и перенесли их в пробирки, после чего центрифугировали при охлаждении 10 мин при 20000 g. Супернатант переносили в чистые пробирки, отбирали небольшую аликвоту каждого образца для измерения концентрации белка по методу Бредфорда, а к остальному объему добавляли 4-х кратный буфер для образцов для ЭФ в ПААГ в присутствии SDS. Полученные образцы хранили при -20°C.

2.2.6. Получение фракции микросом из почек свиньи и крысы

Почки свиньи покупали на скотобойне, сразу после забоя животного, перевозили на льду и хранили при -80°C. Почки крысы были получены из взрослых крыс линии Вистар весом 150 – 250 г. Почки замораживали в жидком азоте, затем хранили при -80°C. За основу для получения

препаратов высокоочищенной Na,K-АТФазы использовали метод Йоргенсона [65]. Все операции по выделению микросом, содержащих Na,K-АТФазу, проводили на льду.

Для получения фракции микросом, содержащих $\alpha 1$ -чувствительную и $\alpha 1$ -резистентную к действию КТС Na,K-АТФазу, почку свиньи и почки крысы соответственно размораживали на льду, разрезали скальпелем в поперечном направлении. Вырезали наружный медулярный слой, отделяя светло-коричневый корковый от светло-красного внутреннего медулярного слоя (рис. 27).

Полученную ткань взвешивали и измельчали ножницами до кашицеобразного состояния, добавляли 10-кратный объем среды для выделения микросом (30 мМ имидазол (pH 7,4), 250 мМ сахараза, 2 мМ ЭДТА, 0,2 мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (2 мМ AEBSF, 10 мкМ пепстатин А, 1 мкМ фосфорамидон, 130 мкМ бестатин, 14 мкМ E-64, 1 мкМ лейпептин, 0,2 мкМ апротинин), 5 мкМ тиорфан, 1 мМ DTT) и гомогенизировали в охлажденном гомогенизаторе Поттера (напряжение 57 В, 15 раз). Гомогенат фильтровали через 3 слоя прокипяченной с 2 мМ ЭДТА марли, смоченной средой для выделения микросом.

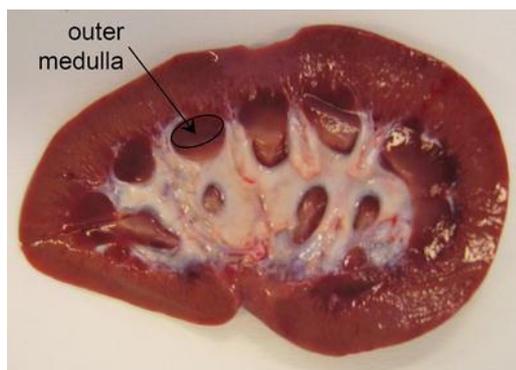


Рис. 27. Продольный разрез почки свиньи [226].

Отфильтрованный гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 6000 g и +4°C (Beckman J2-21, ротор JA-20). Супернатант сливали и хранили при +4°C, а осадок ресуспендировали в 2-кратном объеме среды для выделения и центрифугировали в прежнем режиме. Супернатанты объединяли и центрифугировали в течение 1 ч 5 минут при 45030 g и +4°C (Beckman Avanti J30I, ротор ID 30-50). Осадок ресуспендировали в минимальном объеме среды для выделения микросом, гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера. Полученный препарат микросом разделяли на аликвоты (~0,5 мл) и хранили при -20°C. Концентрацию белка во фракции микросом измеряли с использованием метода Лоури [227], белковый состав полученного препарата анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Леммли [228] и иммуноблоттинга с использованием специфических антител против $\alpha 1$ -субъединицы.

2.2.7. Очистка Na,K-АТРазы

Очистку Na,K-АТРазы проводили из фракции микросом после солюбилизации путем центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (13,5 мл 29,4%, 7 мл 15%, 4,65 мл 10%). Растворы сахарозы готовили на буфере следующего состава: 25 мМ имидазола (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT.

Суспензию микросом разводили в растворе 25 мМ имидазола (рН 7,4), 2 мМ ЭДТА, 3 мМ АТР, 0,2 мМ PMSF, коктейле ингибиторов протеаз (2 мМ AEBSF, 10 мкМ пепстатин А, 1 мкМ фосфорамидон, 130 мкМ бестатин, 14 мкМ E-64, 1 мкМ лейпептин, 0,2 мкМ апротинин), 5 мкМ тиорфана, 1 мМ DTT. Затем по каплям с помощью гамильтоновского шприца при постоянном перемешивании и комнатной температуре солюбилизировали белки, добавляя раствор додецилсульфата натрия (5,4 мг/мл), приготовленный на этом же буфере. Конечная концентрация белка - 1,2 мг/мл, SDS - 0,64 мг/мл. Полученный раствор инкубировали в течение 15 мин при постоянном перемешивании и комнатной температуре. Затем наносили 2,8 мл белкового раствора на ступенчатый градиент сахарозы. Центрифугирование проводили при 137500 g (Beckman Optima L-90K Ultracentrifuge, ротор 70 Ti) в течение 3 ч 50 мин при температуре +4°C. Осадок ресуспендировали в минимальном объеме среды для выделения микросом, гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера, разделяли на аликвоты в пластиковые пробирки и хранили при -80°C.

2.2.8. Измерение концентрации белка методом Бредфорда

Перед проведением электрофореза клеточных лизатов концентрацию белка определяли методом Бредфорда с использованием готового реактива для определения белка фирмы «Bio-Rad». Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре при длине волны 595 нм (Spectrophotometer SmartSpec Plus, Bio-Rad). Для построения калибровочного графика использовали 0,1 мг/мл раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) фирмы «Bio-Rad».

2.2.9. Измерение концентрации белка методом Лоури

Концентрацию белков фракции микросом и очищенной Na,K-АТРазы определяли по методу Лоури [227], используя вместо воды 0,1 % раствор дезоксихолата натрия для солюбилизации мембранных фракций белка. Оптическую плотность исследуемых растворов измеряли при длине волны 750 нм. В качестве стандарта использовали коммерческий раствор БСА с концентрацией 2 мг/мл (Bio-Rad).

2.2.10. Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг

Разделение смеси белков осуществлялся методом, описанном в разделе «Электрофорез в ПААГ» в денатурирующих условиях [228], используя 6% концентрирующий гель, приготовленный на буферном растворе, содержащем 0,5 М трис-НСl, рН 6,8, 0,4% SDS, и 10 - 15% разделяющий гель, приготовленный на буфере, содержащем 1,5 М трис-НСl, рН 8,8, 0,4% SDS. Камеру для ЭФ заполняли буфером следующего состава: 192 мМ глицин, 25 мМ трис-НСl, рН 8,6, 0,1% SDS. Для приготовления гелей использовали раствор 29,2% акриламида и 0,8% N,N-метиленабисакриламида. Образцы для ЭФ готовили на 4-кратном буфере, содержащем 250 мМ трис-НСl, рН 6,8, 8% SDS, 40% сахарозы, 5% β-меркаптоэтанола, 0,05% бромфенолового синего. Перед нанесением в лунки образцы прогревали в течение 5 минут при 95°C (клеточные лизаты), 15 минут при 50°C (микросомы и очищенная Na,K-АТРаза). С целью оценки молекулярной массы белков в отдельную лунку наносили смесь белков маркеров с известной молекулярной массой. Электрофорез проводили в камере Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad), начиная при силе тока 25 мА. После вхождения образцов в разделяющий гель силу тока увеличивали до 50 мА.

Имуноблоттинг проводили после переноса белков, разделенных методом электрофореза в ПААГ, на нитроцеллюлозную мембрану [229]. За 10 мин до окончания электрофореза помещали нитроцеллюлозную мембрану, бумажные фильтры и волокнистые прокладки в буфер для электропереноса (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 20% этанол, рН 8,3). Сразу после проведения электрофореза гель также помещали в этот буфер на 5 мин для отмывки от SDS.

После этого собирали «сэндвич» в кассете в следующем порядке: волокнистый фильтр/губка, три слоя фильтровальной бумаги, гель, нитроцеллюлозная мембрана, три слоя фильтровальной бумаги и опять волокнистый фильтр/губка. Электроперенос проводили в течение 1 ч при силе тока 400 мА и при постоянном перешивании с охлаждением.

Для проверки качества переноса белков на мембрану окрашивали красителем Ponceau S. Краситель обратимо связывается с белками, окрашивая их в красный цвет. Для подготовки мембраны к иммунохимическому окрашиванию её промывали несколько раз в растворе ТСБ (50 мМ Трис, рН 7,4, 150 мМ NaCl) или ФСБ (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KН₂PO₄, рН 7,4). Далее мембрану оставляли на 1 ч при перемешивании в 5% растворе обезжиренного молока, приготовленном на ТСБ, а затем мембрану переносили в раствор ТСБТ (50 мМ Трис, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20) или ФСБТ (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KН₂PO₄, 0,1% Твин-20, рН 7,4), содержащий 5% БСА и первичные антитела (соотношение 1:1000 по объему), и оставляли на 14-17 ч при +4°C и постоянном перемешивании.

Далее мембраны промывали 3 раза по 15 мин в ТСБТ или ФСБТ и после этого инкубировали в отдельной посуде 1 ч в 10 мл раствора ТСБТ или ФСБТ, содержащего 5%

обезжиренное молоко и вторичные антитела в соотношении 1:5000, конъюгированные с пероксидазой из хрена. После этого мембраны отмывали 3 раза по 15 мин в ТСБТ или ФСБТ. Полосы образовавшихся комплексов белков с первичными и вторичными антителами визуализировали, используя метод усиленной хемилюминисценции (ECL).

2.2.11. Метод усиленной хемилюминисценции (ECL)

Для визуализации образовавшихся комплексов белков с первичными и вторичными антителами на нитроцеллюлозной мембране использовали набор реактивов «Western Lightning Plus-ECL» (PerkinElmer) и проявляли мембраны на приборе «Bio-Rad ChemiDoc XRS⁺» (Bio-Rad). Для этого смешивали по 700 мкл реагента А и реагента Б из коммерческого набора, добавляли полученный раствор к нитроцеллюлозной мембране, инкубировали 1 мин. Затем проявляли мембраны и измеряли хемилюминисценцию. Полученные результаты обрабатывали в программе «Image Lab 3.0» (Bio-Rad).

2.2.12. Определение активности Na,K-АТФазы по накоплению Φ_n

Активность Na,K-АТФазы определяли путем измерения концентрации продукта реакции неорганического фосфата (Φ_n), используя метод Ратбуна и Бетлах [230]. В реакционную среду, содержащую 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 30 мМ имидазола (pH 7,4), добавляли 2-5 мкг микросом или 0,5–1,5 мкг очищенной Na,K-АТФазы из почек свиньи или крысы. Реакцию начинали добавлением 3 мМ раствора АТФ. Конечный объем реакционной смеси составлял 500 мкл. Смесь инкубировали 5 мин при 37°C (предварительно было показано, что за это время накопление Φ_n в пробе происходит линейно во времени) на твердотельном термостате «Термит» (ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ).

Реакцию останавливали добавлением 500 мкл 3 М холодного ацетатного буфера (pH 4,3), содержащего 7,4% формальдегида. Для окрашивания добавляли 100 мкл 2% (NH₄)₆Mo₇O₂₄ и 100 мкл свежеприготовленного раствора хлорида олова (15 мг SnCl₂, несколько капель концентрированной уксусной кислоты и 5 мл дистиллированной воды). Инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого измеряли поглощение света раствором при длине волны 660 нм (Spectrophotometer SmartSpec Plus, Bio-Rad).

Для построения калибровочного графика использовали раствор 1 мМ KН₂РO₄. Для расчета активности собственно Na,K-АТФазы во фракции микросом проводили также инкубацию проб с 1 мМ убаина (Na,K-АТФаза из почек свиньи) или 10 мМ убаина (Na,K-АТФаза из почек

крысы). Из значения общей АТРазной активности (в среде без убаина) вычитали активность Mg-АТРазы, измеренную в среде с убаином.

В препаратах микросом для активации «латентной» Na,K-АТРазы (доли фермента, активный центр которого находится внутри везикул) в среду инкубации добавляли детергент дезоксихолат натрия, который увеличивает проницаемость мембран для АТФ и обеспечивает доступ нуклеотида внутрь везикул. В этом случае пробу, содержащую 2,5 мг/мл белка, 0,065% дезоксихолата натрия, 50 мМ имидазол-НСl, 2 мМ ЭДТА, рН 7,0, предварительно инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем определяли активность, как описано выше.

2.2.13. Определение активности Na,K-АТРазы с использованием системы сопряженных реакций

Метод определения активности Na,K-АТРазы в этом случае основан на трёх последовательно протекающих реакциях:



Первая реакция катализируется Na,K-АТРазой или Mg-АТРазой, вторая реакция - пируваткиназой, а третья реакция осуществляется лактатдегидрогеназой. В ходе последней реакции происходит убыль NADH в эквимольном отношении к израсходованному в первой реакции АТФ. Это приводит к уменьшению оптической плотности раствора при длине волны 340 нм.

Измерение активности Na,K-АТРазы проводили с помощью непрерывной фотометрической регистрации при длине волны 340 нм и температуре в кюветном отделении 37°C в среде, содержащей 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ имидазола (рН 7,4), 1 мМ фосфоенолпирувата (ФЕП), 0,2 мМ NADH, 5 ед./мл пируваткиназы, 10 ед./мл лактатдегидрогеназы, 0,125-1,25 мг/мл Na,K-АТРазы. Реакцию начинали добавлением 3 мМ АТФ. Регистрацию изменения оптической плотности проводили на спектрофотометре Ultrospec 2100 Pro (Amersham Biosciences).

Предварительно добавляли различные количества ферментов и убеждались, что активности ферментов сопряженной системы не лимитируют скорость реакции.

Общая формула для расчета активности фермента:

$$A = \frac{60 \times \Delta D_{340}}{E \times C},$$

где A – активность (мкмоль/мг в ч); ΔD_{340} – изменение оптической плотности при 340 нм за 1 мин; C – концентрация белка в пробе (мг/мл); E – коэффициент молярной экстинкции NADH при 340 нм ($6,22 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$).

Для расчета активности собственно Na,K-АТФазы проводили также преинкубацию проб с 1 мМ убаина (Na,K-АТФаза из почек свиньи) или 10 мМ убаина (Na,K-АТФаза из почек крысы). Из значения общей АТФазной активности (в среде без убаина) вычитали активность Mg-АТФазы, измеренной в среде с убаином [231].

2.2.14. Исследование ингибирования Na,K-АТФазы под действием КТС и расчет IC₅₀

Для изучения влияния трёх кардиотонических стероидов (убаина, дигоксина и маринобуфагенина) на активность $\alpha 1$ -чувствительной и $\alpha 1$ -резистентной Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы соответственно в реакционную среду вносили вышеназванные соединения. Диапазон концентраций КТС для $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы составлял от 0,1 мкМ до 20 мкМ, для $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы от 0,01 мМ до 10 мМ (убаин) и от 0,01 мМ до 0,5 мМ (дигоксин, маринобуфагенин). Перед проведением эксперимента преинкубировали фермент с КТС в среде для измерения активности в течение 10 мин при 37°C на твердотельном термостате «Термит» (ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ). Предварительно было показано, что 10 мин преинкубации достаточно для развития максимального ингибирующего действия КТС. Основной раствор дигоксина и маринобуфагенина (10 мМ) был приготовлен с использованием 100% раствора ДМСО. Таким образом, при определении активности максимальная концентрация ДМСО достигала 10%. Поэтому в контрольные пробы мы добавляли такое же количество ДМСО, которое содержалось в добавляемом в пробу КТС. Кроме того, в предварительных экспериментах было показано, что ДМСО не влияет на активность Na,K-АТФазы до концентрации 4%. Эксперименты с убаином, который обладает высокой растворимостью в воде, были проведены как в присутствии ДМСО, так и без него, результаты в этих экспериментах были одинаковы.

Полученные кривые были обчислены с помощью программного пакета Origin 8.1 (OriginLab). Были получены значения IC₅₀ (концентрация ингибитора, при которой происходит полумаксимальное ингибирование активности фермента) и коэффициенты Хилла.

2.2.15. Изучение обратимости связывания кардиотонических стероидов с Na,K-АТФазой в разных конформациях.

Для определения характера ингибирования Na,K-АТФазы кардиотоническими стероидами фермент разводили в буфере, переводящем Na,K-АТФазу в конформацию E1 (10 мМ NaCl, 25 мМ

имидазол (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА) или E2-P (30 мМ имидазол (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ Ф_n/Трис). Далее проводили преинкубацию с КТС. Затем среду преинкубации разводили в 50 раз, добавляя небольшой объем среды, в которой проводилась преинкубация, в среду для измерения активности и определяли активность фермента. Если ингибитор действует обратимо, то его разведение (снижение концентрации ингибитора) в 50 раз будет устранять его ингибирующее действие.

Растворы кардиотонических стероидов готовили с использованием 100% ДМСО с конечной концентрацией убаина 100 мМ, дигоксина и маринобуфагенина - 10 мМ. Фермент из почек свиньи и крысы в конформации E2-P преинкубировали с убаином, дигоксином и маринобуфагенином в течение 10 мин при 37°C, Na,K-АТФазу из почек свиньи и крысы в конформации E1 преинкубировали с убаином, дигоксином и маринобуфагенином при 37°C в течение 30 и 60 мин соответственно. Время преинкубации было подобрано в предварительных экспериментах. Если при увеличении времени преинкубации в 2 раза не происходило изменение активности фермента, то это время считали достаточным.

Контрольную пробу преинкубировали при 37°C в течение того же времени, добавляя ДМСО в концентрации, соответствующей концентрации ДМСО в растворе КТС. Поскольку кардиотонический стероид в среде преинкубации может не связаться или только частично связаться с Na,K-АТФазой, то в контрольную пробу в среду для измерения активности добавляли КТС, в концентрации в 50 раз меньше, чем концентрация этого же КТС в среде преинкубации в экспериментальной пробе.

Определение активности проводили с использованием системы сопряженных ферментов путем непрерывной спектрофотометрической регистрации при длине волны 340 нм, добавляя в среду регистрации пируваткиназу и лактатдегидрогеназу вместе с их субстратами [231].

Полученные кривые были обчислены с помощью программного пакета Origin 8.1 (OriginLab).

2.2.16. Трипсинолиз Na,K-АТФазы

Трипсинолизу подвергали Na,K-АТФазу из почек свиньи и почек крысы, которую предварительно переводили в E1 или E2-P конформацию. Для этого фермент разводили в 20 раз в буфере А (E1-конформация) или буфере Б (E2-P- конформация). Состав буфера А: 10 мМ NaCl, 30 мМ имидазол, 1 мМ ЭДТА (рН 7,4); буфера Б: 30 мМ имидазол, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ Ф_n/трис (рН 7,4). Далее фермент преинкубировали 10 минут при температуре 37°C с 1 мМ убаина, дигоксина или маринобуфагенина и 10 мМ убаина с Na,K-АТФазой из почек крысы. Трипсинолиз проводили в течение 5 или 10 мин при температуре 37°C. Соотношение

трипсин/Na,K-АТРаза (w/w) составляло 1/10. Время и концентрация трипсина были подобраны в предварительных экспериментах. Протеолиз останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов в 2-х кратном избытке по отношению к трипсину (w/w). Затем проводили анализ триптических фрагментов методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Полученные гели сканировали и обрабатывали (денситометрировали фрагменты протеолиза) с помощью программного пакета TotalLab TL120.

2.2.17. Регистрация параметров связывания кардиотонических стероидов методом изотермической калориметрии титрования

Термодинамические параметры связывания убаина, дигоксина и маринобуфагенина с Na,K-АТРазой из почек свиньи и крысы определяли с использованием метода изотермической калориметрии титрования (ИКТ).

2.2.17.1. Метод изотермической калориметрии титрования

В основе метода ИКТ лежит измерение тепла, которое выделяется или поглощается в процессе химической реакции, что позволяет напрямую определять энтальпию (ΔH) и энтропию (ΔS) реакции, константу связывания (K_a), стехиометрию реакции (n). При этом устанавливается полный термодинамический профиль межмолекулярного взаимодействия.

Изотермическую калориметрию титрования проводили, используя прибор MicroCal iTC200 instrument (MicroCal, Northampton, MA), как описано ранее [232]. Данный прибор был приобретен за счет средств Программы развития Московского университета и предназначен для использования сотрудниками МГУ имени М.В. Ломоносова. В приборе предусмотрены две идентичные ячейки, одна из которых содержит воду (буфер) и выступает в качестве контрольной ячейки, а вторая содержит образец (Рис. 28). Термочувствительное устройство определяет разность температур в ячейках во время химической реакции и передает эти данные на электрические нагреватели, которые компенсируют разность, обеспечивая одинаковую температуру в ячейках. В обеих ячейках поддерживается постоянная температура, при которой проводится эксперимент. Раствором лиганда заполняли шприц, установленный в высокоточное устройство ввода. В ячейку с образцом вставляли устройство ввода, которое используется для инъекции лиганда и последующего перемешивания реагентов. Используя данные по тепловым эффектам реакции (при связывании лиганда поглощается или выделяется тепло), строили график, описывающий зависимость теплового эффекта реакции от соотношения концентрации лиганда к концентрации макромолекулы.

Концентрацию титрующего лиганда вычисляли по формуле:

$$C(\text{лиганд}) = k \times n \times V(\text{ячейки}) \times C(\text{белка}) / N \times v,$$

где C – концентрация (лиганда или белка), k – конечное превышение концентрации лиганда над концентрацией белка, n – количество центров связывания, $V(\text{ячейки})$ – объем ячейки, N – количество инъекций, v – объем одной инъекции.

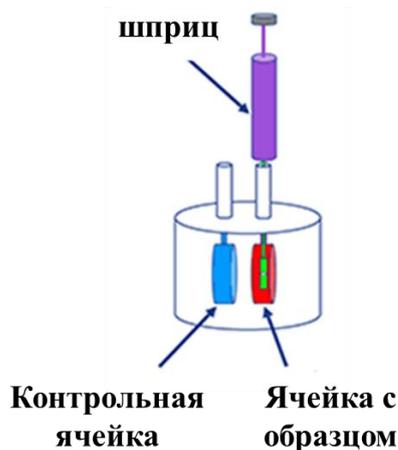


Рис 28. Схема устройства изотермического калориметра MicroCal iTC200 (GE) [233].

Для получения истинного термодинамического профиля в эксперименте необходимо учитывать теплоту разбавления. Для этого мы проводили 3 эксперимента:

1. добавляли лиганд в свободный от белка раствор буфера;
2. добавляли буфер в раствор белка;
3. добавляли буфер в свободный от белка раствор буфера.

$$Q_{\text{эффективная}} = Q_{\text{эксперимент}} - Q_{\text{лиганд,буфер}} - Q_{\text{буфер, макромолекула}} - Q_{\text{буфер, буфер}}$$

Эти 3 величины вычитались из теплоты реакции для получения эффективной энтальпии связывания [233].

В химических реакциях действуют одновременно два противоположных фактора – энтальпийный (ΔH) и энтропийный ($T\Delta S$). Суммарный эффект этих противоположных факторов в процессах, протекающих при постоянном давлении и температуре, определяет изменение энергии Гиббса. Характер изменения энергии Гиббса позволяет судить о принципиальной возможности осуществления процесса. Так как химическая реакция может протекать в случае $\Delta G < 0$, где $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, то в зависимости от изменения данных величин определяют энтальпийный энтропийный вклады в протекание данной реакции [233].

Зная значения величин выделившегося или поглощенного тепла в ходе реакции, можно найти константы связывания и энтальпию реакции, а затем с помощью уравнения Гиббса вычислить изменение свободной энергии ΔG и изменение энтропии реакции ΔS [233,234]:

$\Delta G = -R \times T \times \ln K_a$, где R – газовая постоянная, T – температура в Кельвинах, K_a – константа ассоциации.

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H) / T$$

Оценив изменение термодинамических параметров реакции связывания белка с лигандом, можно определить энергетический источник взаимодействия. Отрицательное изменение энтальпии ($\Delta H < 0$) свидетельствует о большом количестве выгодных водородных связей или Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий между биомолекулой и лигандом. Положительное изменение энтропии ($\Delta S > 0$) позволяет предположить конформационные изменения в одной или обеих молекулах. Относительно небольшие изменения энтропии и энтальпии в сумме могут привести к значительным изменениям в аффинности взаимодействия. Большое положительное значение изменения энтропии свидетельствует о том, что в реакции доминируют перегруппировка молекул растворителя и гидрофобные взаимодействия [234].

2.2.17.2. Проведение изотермической калориметрии титрования

$\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазу из почек свиньи и крысы соответственно переводили в конформацию E2-P или E1. Для этого фермент центрифугировали в течение 1 ч 30 мин при 137500 g (Beckman Optima L-90K Ultracentrifuge, ротор 70 Ti) при температуре +4°C в буфере для E2-P-конформации (10 mM имидазол, 3 mM трис/P_i (pH 7,4), 1 mM ЭДТА, 0,1 mM DTT, 3 mM MgCl₂ - буфер А) или буфере для E1 -конформации (10 mM NaCl, 10 mM имидазол (pH 7,4) 1 mM ЭДТА, 0,1 mM DTT – буфер Б). Осадки ресуспендировали в минимальном объеме буфера А или буфера Б. Определяли концентрацию фермента (методом Лоури) и его активность (с использованием системы сопряженных реакций) [227,231].

Для минимизации теплоты разбавления, лиганд разводили в том же буфере, в котором находился белок. Аликвоты лиганда (2,5 мкл, 25 мкМ – 10 мМ) вносили в калориметрическую ячейку объемом 203 мкл, содержащую 5-20 мкМ Na,K-АТРаза, до получения полной изотермы связывания. В случае добавления дигоксина и маринобуфагенина основной раствор, приготовленный на 100% ДМСО, был разведен соответствующим буфером. Среда, в которую добавляли исследуемый белок, содержала ДМСО в такой же концентрации. Таким образом, при титровании дигоксином и маринобуфагенином концентрация ДМСО не изменялась. Было проведено несколько контрольных экспериментов с титрованием фермента убаином в таких же условиях и установлено, что кривая титрования убаина в присутствии и в отсутствие ДМСО одинакова.

Стоит отметить, что в случае с $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазу из почек крысы мы использовали в качестве лиганда только убаин, поскольку дигоксин и маринобуфагенин содержат высокие

концентрации ДМСО (50 – 100%). Добиться таких же концентраций ДМСО в среде с исследуемым белком невозможно без его денатурации.

Теплоту разбавления, определенную титрованием буферного раствора лигандом, буферного раствора буфером и белкового раствора буфером вычитали из теплоты реакции для получения эффективной теплоты связывания. Результирующие кривые титрования обрабатывали и анализировали с помощью программного пакета MicroCal Origin 7.0. Наилучшим образом они описывались моделью одного типа участков связывания. Таким образом определяли константу связывания (K_a), энтальпию и стехиометрию связывания, а энтропию связывания вычисляли с помощью стандартного термодинамического соотношения $\Delta G = -R \times T \times \ln K_a = \Delta H - T \Delta S$.

2.2.18. Молекулярное моделирование

Молекулярное моделирование проводили совместно с сотрудником Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда Российской академии наук Полуэктовым Ю.М.

Структура Na,K-АТФазы из почек свиньи в состоянии E2-P-уабаин с разрешением 3,404 Å была получена из банка данных Protein Data Bank (rcsb.org), PDB id 4НУТ [125]. Две модели Na,K-АТФазы были сконструированы с помощью программы Moe2014.0901 (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group (CCG)). Первая модель была создана на основе структуры 4НУТ: была проведена замена двух аминокислотных остатков Gln111→Arg111 и Asn122→Asp122 (специфические замены, которые делают Na,K-АТФазу из почек крысы нечувствительной к уабаину), затем были выбраны все атомы на расстоянии 4,5Å вокруг молекулы уабаина, после чего уабаин был удален и отобранные атомы были локально минимизированы в силовом поле MMFF94x. Таким же образом была создана и вторая модель за исключением замены аминокислотных остатков. Она была создана как контрольная для оценки влияния процедуры минимизации на докинг. Структура уабаина была получена из структуры 4НУТ, структура маринобуфагенина была сконструирована с использованием Moe2014.0901. Модели были получены путём локального докинга с использованием Auto Dock Tools. Na,K-АТФаза была определена как рецептор, структуры уабаина, дигоксина и маринобуфагенина – как лиганд. Область докинга была размещена так, чтобы покрывать только внеклеточную часть белка вблизи от участка связывания КТС. Локальный докинг был проведен с использованием AutoDock Vina [235]. Результаты докинга были проанализированы с использованием Auto Dock Tools. Рисунки пространственных структур были сделаны с использованием PyMol 2.1. (Schrödinger, Inc.).

2.2.19. Хромато-масс-спектрометрический анализ

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили с использованием системы состоящей из хроматографа UltiMate™ 3000 RSLCnano System (Thermo Scientific) сопряженного через нано-электроспрейный ионный источник (Thermo Fisher Scientific) с масс-спектрометром Q Exactive HF Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Пептиды разделяли на 25 см колонке Acclaim™ RepMap™ 100 C18 LC Column с размером частиц сорбента 3 мкм и внутренним диаметром 75 мкм. Пептиды для нанесения на предколонку растворяли в буфере А (0.1% FA) и элюировали 120 мин градиентом 4-40% буфера Б (0.1% FA, 80% ацетонитрила) при скорости потока 350 нл/мин. Данные аккумулировали методом DDA (data-dependent analysis) MS/MS сканирования Top15. Целевые значения для MS спектра полного сканирования были 3×10^6 зарядов в диапазоне значений 200-2000 m/z с максимальным временем инъекции 30 мсек и разрешением 60000 при значении m/z 200. Окно изолирования ионов было 1.4 m/z при фиксированной первой массе 100 m/z для MS/MS сканирования. Фрагментацию ионов-прекурсоров осуществляли методом высокоэнергетической диссоциации путем столкновения при нормализованной энергии столкновения 28%. MS/MS сканирование осуществляли с разрешением 15000 при m/z 200 при целевом значении ионов 1×10^5 и максимальном времени инъекции 100 мсек. Для исключения возможности повторного секвенирования идентичных пептидов использовали динамическое исключение идентичных ионов в течение 30 сек. Хромато-масс-спектрометрические исследования были проведены совместно с сотрудником Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук кандидатом химических наук Зиганшином Р.Х.

Анализ качественного состава белков образцов проводили при помощи компьютерной программы PEAKS Studio 8.0 build 20160908 [236]. Первичные структуры пептидов, генерируемые программой PEAKS Studio, анализировали против базы данных белковых последовательностей UNIPROT KB (37425 белков, версия декабрь 2016 г) для вида *Rattus norvegicus*, со следующими настройками: карбамидометилирование Cys – фиксированная модификация; N-концевое ацетилирование белков, окисление Met и дезамидирование Asn/Gln - переменные модификации; специфичность протеазы не указывалась. Допустимый уровень ложноположительных идентификаций (FDR) пептидов был установлен на уровне 0.01 и определялся путем корреляции массива MS/MS-данных с реверсной базой данных белковых последовательностей, которая генерировалась программой PEAKS Studio. Идентификацию пептидов осуществляли при допустимом начальном отклонении массы иона-прекурсора до 10 м.д. и допустимом отклонении массы фрагментов 0.05 Да.

2.2.20. Статистический анализ

Во всех экспериментах рассчитывали среднее значение и среднее квадратичное отклонение или среднюю квадратичную ошибку. Для анализа статистически значимого отличия между выборками использовали t-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ (One Way ANOVA), однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

В предварительных экспериментах мы установили, что 6-ти часовая инкубация с убаином не влияет на жизнеспособность клеток эндотелия человека (HUVEC) и крысы (RAEC), что позволило использовать этот временной интервал для изучения действия этого КТС на внутриклеточное содержание натрия и калия (таблица 7). Инкубация клеток в течение 6-ти ч в среде с 3 мкМ убаина приводит почти к 10-ти кратному увеличению концентрации Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) и снижению концентрации K^+ ($[\text{K}^+]_i$) в клетках эндотелия человека, но не влияет на эти параметры в клетках эндотелия крысы. В RAEC увеличение концентрации убаина до 3000 мкМ приводит к такому же увеличению $[\text{Na}^+]_i$ и уменьшению $[\text{K}^+]_i$, как в HUVEC при добавлении 3 мкМ убаина. Эти результаты согласуются с данными о 1000-кратном снижении сродства убаина к $\alpha 1\text{-Na,K-ATPase}$ у мышей и крыс по сравнению с человеком и многими другими видами млекопитающих [166].

Таблица 7. Эффект убаина на внутриклеточную концентрацию Na^+ и K^+ в эндотелиальных клетках человека и крысы

Тип клеток	Убаин, мкМ	Внутриклеточная концентрация Na^+ (нмоль/мг белка)	Внутриклеточная концентрация K^+ (нмоль/мг белка)
HUVEC	0	114±24	1311±89
	3	978±53*	133±20*
	3000	1016±97*	129±8*
RAEC	0	56±8	722±59
	3	69±12	693±82
	3000	766±54*	86±21*

Клетки инкубировали в среде DMEM с добавлением или без добавления убаина. Показаны среднеарифметические значения и значения стандартной ошибки, полученные в 3-х независимых экспериментах в трехкратной повторности. * - $p < 0,001$ по сравнению с контрольными клетками.

Учитывая, что 3 и 3000 мкМ убаина вызывают примерно одинаковое увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в клетках эндотелия человека и крысы, соответственно, мы сопоставили действие этих концентраций убаина в течение 24 ч инкубации на жизнеспособность этих клеток (таблица 8). Было показано, что 24 ч инкубация в присутствии 3 мкМ убаина приводит к гибели

HUVES, сопровождающейся 6-ти кратным повышением активности каспазы-3 и распадом хроматина (таблица 8). В отличие от клеток человека инкубация RAEC в присутствии 3000 мкМ убаина не приводила к достоверному изменению этих параметров.

Таблица 8. Эффект убаина на активацию каспазы-3 и распад хроматина в клетках эндотелия человека и крысы

Тип клеток	Убаин (мкМ)	Каспаза-3 (нмоль/мг белка/мин)	Распад хроматина, %
HUVES	0	0.56±0.07	3±1
	3	3.12±0.31**	21±4*
RAEC	0	0.33±0.08	3±1
	3000	0.51±0.15	5±2

Клетки инкубировали в среде DMEM с добавлением или без добавления убаина. Показаны среднеарифметические значения и значения стандартной ошибки в 3-х независимых экспериментах в трехкратной повторности. *, ** - $p < 0,01$ и $0,001$ по сравнению с контрольными клетками.

Мы также проанализировали действие убаина и бескальевой среды на эндотелиальные клетки человека и крысы с помощью фазово-контрастной микроскопии. Оказалось, что инкубация с 3000 мкМ убаина и в бескальевой среде в течение 24 ч не влияет на морфологию RAEC (рис. 29б), в то время как инкубация с 3 мкМ убаина вызывает массовое открепление HUVES от подложки и их ошаривание (рис. 29а). В отличие от убаина, ингибирование Na,K-АТРазы в среде без калия в течение 24 ч не влияет на морфологию HUVES (рис. 29а).

Итак, 3 и 3000 мкМ убаина через 6 ч инкубации вызывают примерно одинаковое увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в клетках эндотелия человека и крысы соответственно. Инкубация с этими же концентрациями убаина в течение 24 ч не влияет на жизнеспособность RAEC, но приводит к гибели HUVES, характеризующейся 6-ти кратным увеличением активности каспазы-3 и распадом хроматина. Более того, среда без калия, отсутствие которого приводит к полному ингибированию Na,K-АТРазы (вызывает ~10-кратное увеличение концентрации Na^+ и уменьшение концентрации K^+ ~10 раз), не влияет на жизнеспособность клеток эндотелия человека и крысы.

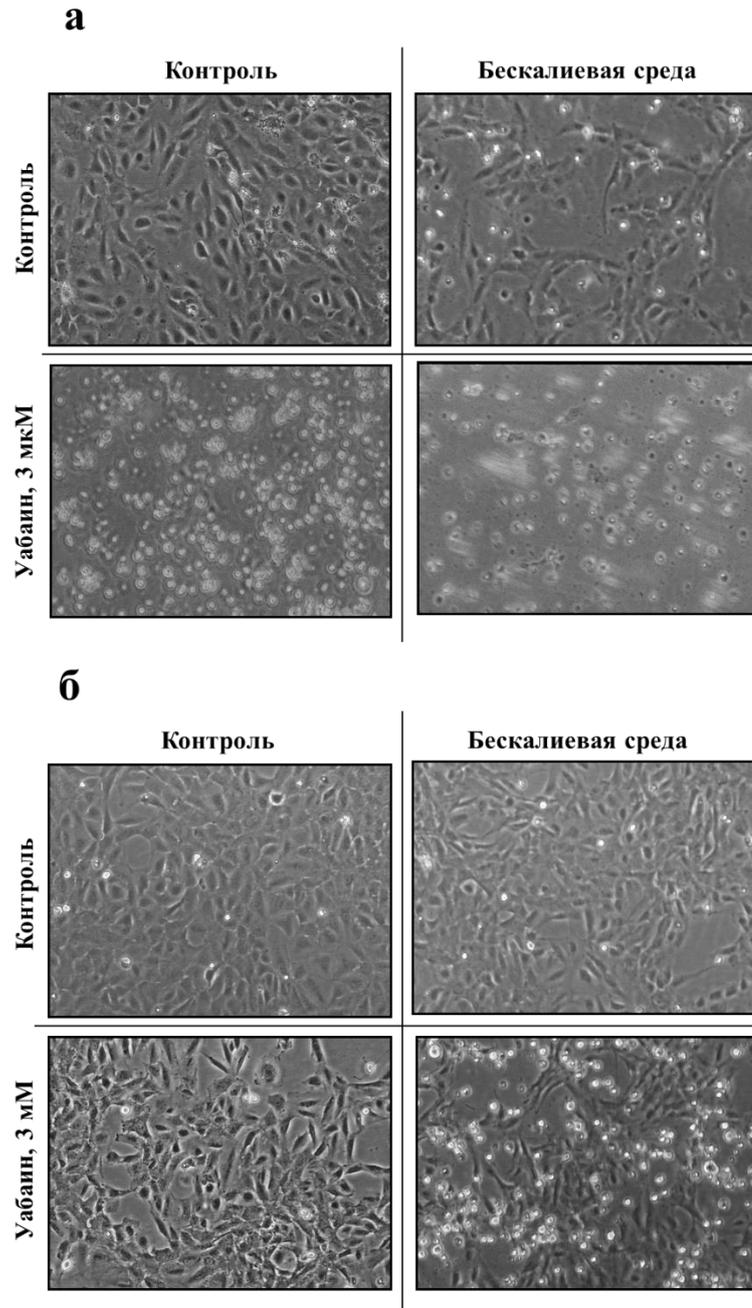


Рис. 29. Фазово-контрастная микроскопия эндотелиальных клеток: **(а)** из пупочной вены человека (HUVEC); **(б)** из аорты крысы (RAEC). Клетки инкубировали 24 ч в контрольной или бескальевой среде DMEM ± 3 мкМ убаина (HUVEC), ± 3 мМ убаина (RAEC).

Полученные в этой части работы данные противоречат гипотезе о том, что цитотоксическое действие КТС обусловлено увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и генерацией исключительно Na^+, K^+ -опосредованных сигналов (рис. 26а). В этой связи, мы можем сформулировать, по крайней мере, 2 альтернативные гипотезы, объясняющие различное влияние убаина на выживание клеток человека и крысы:

1. Гибель клеток эндотелия человека обусловлена сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии убаина с $\alpha 1S$ -, но не с $\alpha 1R$ -субъединицей Na, K -АТФазы, в то

время как выживание клеток эндотелия крысы обусловлено сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии убаина с $\alpha 1R$ -, но не с $\alpha 1S$ - Na, K -АТРазы.

2. Клетки человека и крысы содержат интермедиаты сигнальных каскадов, приводящих к их гибели или выживаемости в присутствии КТС вне зависимости от экспрессии $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединицы Na, K -АТРазы соответственно.

С целью проверки мы сравнили концентрационную зависимость действия убаина на гладкомышечные клетки сосудов мышей дикого типа, экспрессирующих $\alpha 1R$ -субъединицу Na, K -АТРазы и мышей, экспрессирующих убаин-чувствительную изоформу $\alpha 1S$ - Na, K -АТРазы человека. Результаты этих исследований изложены в следующем разделе.

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

Чтобы изучить роль $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ - субъединицы Na, K -АТРазы в гибели клеток человека и крысы при действии убаина, мы сравнили концентрационную зависимость действия этого соединения на гладкомышечные клетки, выделенные из аорты мышей дикого типа ($\alpha 1^{R/R}$), и из полученных генно-инженерным путем $\alpha 1^{S/S}$ мышей, в клетках которых экспрессировалась $\alpha 1S$ -субъединица человека. Эта работа была выполнена совместно с лабораториями университета г. Чикаго (США) и медицинского колледжа г. Олбани (США). На рис. 30 показано, что добавление к гладкомышечным клеткам аорты мыши (MASMC) дикого типа 3000 мкМ убаина не вызывает увеличения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) по сравнению с базовым уровнем. В качестве контроля мы использовали цитотоксическое соединение перекись водорода (H_2O_2), добавление которой в концентрации 1 мМ увеличивало количество освободившегося ЛДГ более чем в 3 раза (с $17,2 \pm 1,9$ до $55,7 \pm 1,3\%$). В отличие от культуры 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 от 3 до 3000 мкМ убаина (рис.30).

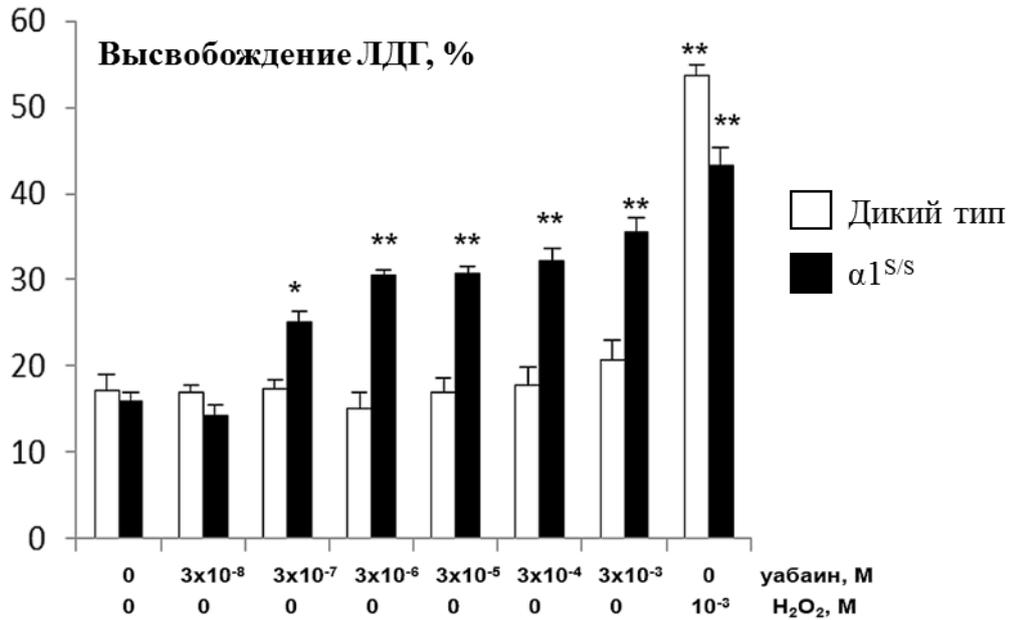


Рис. 30. Эффект убаина и H₂O₂ на высвобождение ЛДГ из гладкомышечных клеток аорты мышей дикого типа и мышей α1^{S/S} с человеческой α1S-субъединицей Na,K-АТФазы. Клетки инкубировали 24 ч в присутствии 0,2% сыворотки, а затем добавляли различные концентрации убаина и H₂O₂. Суммарное содержание ЛДГ было принято за 100%. Показаны среднearифметические значения и значения среднеквадратичной ошибки в 3 независимых экспериментах в трехкратной повторности. *, ** - p<0,005 и 0,001 по сравнению с контрольными клетками.

Для дальнейшего выяснения роли α1S- и α1R-субъединицы Na,K-АТФазы мы изучили концентрационную зависимость действия убаина на внутриклеточную концентрацию натрия и высвобождение ЛДГ в контрольных клетках HUVEC и клетках HUVEC, трансфицированных плазмидой, кодирующей ген α1R-Na,K-АТФазы. Через 6 ч инкубации с 10 мкМ убаина наблюдалось 10-кратное увеличение [Na⁺]_i в контрольных клетках, содержащих α1S. В то же время в клетках с α1R аналогичное увеличение [Na⁺]_i наблюдали при концентрации убаина 3000 мкМ (рис. 31а).

Как видно из рисунка 31б, через 24 ч инкубации контрольных клеток HUVEC с 3 мкМ убаина происходит 6-ти кратное увеличение высвобождения ЛДГ, в то время как в клетках HUVEC с трансфицированной α1R-субъединицей Na,K-АТФазы инкубация с 3000 мкМ убаина не влияет на высвобождение ЛДГ. В качестве контроля мы добавили H₂O₂ к нетрансфицированным и содержащим α1R клеткам. В обоих случаях происходило 7-кратное увеличение высвобождения ЛДГ (рис. 31б). Это наблюдение согласуется с данными, показывающими, что трансфекция MDCK клеток, экспрессирующих α1S-субъединицу Na,K-АТФазы, кДНК, кодирующей резистентную к действию КТС α1R-субъединицу Na,K-АТФазы, предотвращает массовую гибель клеток, вызванную 24-часовой инкубацией в присутствии 1000 мкМ убаина [237].

В отличие от эндотелиальных и гладкомышечных клеток, где преобладает $\alpha 1$ -изоформа [238,239], в нейронах человека и грызунов находится большое количество $\alpha 3$ -, в то время как в астроцитах человека и грызунов много $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТРазы [240,241]. Обе эти изоформы Na,K-АТРазы ($\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -) обладают примерно одинаковым сродством к КТС у грызунов и других млекопитающих [129,166]. Исходя из этих соображений, а также того факта, что астроциты крысы устойчивы к высоким концентрациям убаина [242], можно сделать вывод о том, что КТС-чувствительная $\alpha 2$ -субъединица (и, вероятно, $\alpha 3$ -субъединица) практически не участвует в механизме гибели клеток. В отличие от астроцитов крысы, инкубация нейронов коры головного мозга из 15-17 дневных эмбрионов мышей с 80 мкМ убаина в течение 24 ч вызывает их гибель [243]. Эти данные, рассмотренные в совокупности с нашими результатами, изложенными в этой части работы, свидетельствуют в пользу первой гипотезы (стр. 81): «Гибель клеток эндотелия человека обусловлена сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии убаина с $\alpha 1S$ -, но не с $\alpha 1R$ -субъединицей Na,K-АТРазы, в то время как выживание клеток эндотелия крысы обусловлено сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии убаина с $\alpha 1R$ -, но не с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы». Для выяснения относительной роли $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединицы Na,K-АТРазы необходимо было провести эксперименты с трансфекцией гена, кодирующего $\alpha 1S$ -субъединицу Na,K-АТРазы в клетки, экспрессирующие $\alpha 1R$ -субъединицу Na,K-АТРазы.

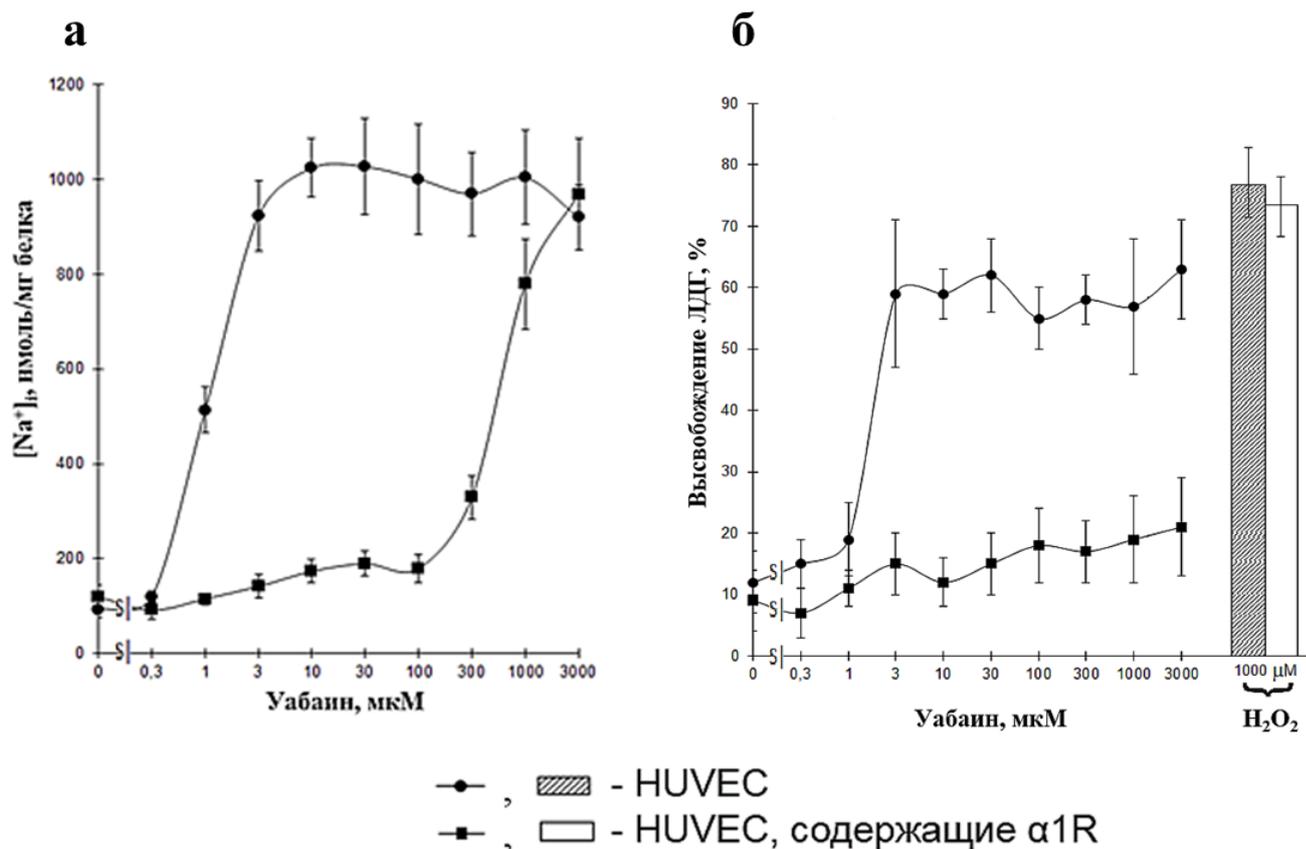


Рис. 31. Концентрационная зависимость действия убаина на внутриклеточную концентрацию натрия (**а**) и высвобождение ЛДГ (**б**) в HUVEC и α1R-трансфицированных HUVEC. Клетки инкубировали 6 (**а**) и 24 (**б**) ч с убаином в концентрациях, показанных на оси X. Общее содержание ЛДГ приняли за 100%. В качестве контроля клеточной смерти использовали 1000 мкМ H₂O₂. Показаны среднеарифметические значения и значения среднеквадратичной ошибки в 3 независимых экспериментах в трехкратной (**а**) и четырехкратной (**б**) повторности.

3.3. Выделение и характеристика препаратов Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы, содержащих α1S- и α1R-изоформу фермента соответственно

В соответствии с предложенной выше гипотезой связывание КТС с убаин-чувствительной (α1S) и убаин-резистентной (α1R) Na,K-АТФазой вызывает различные изменения их конформации и, соответственно, обеспечивает взаимодействие фермента с различными адапторными белками. Для проверки этой гипотезы мы предприняли выделение очищенного убаин-чувствительного (α1S) и убаин-резистентного (α1R) ферментов и регистрацию связывания убаина, дигоксина и маринобуфагенина, а также изменение конформации двух этих изоформ Na,K-АТФазы при связывании КТС. В качестве источника убаин-чувствительной (α1S) и убаин-резистентной (α1R) Na,K-АТФазы были выбраны почки свиньи и крысы, поскольку они содержат только α1S- и α1R-изоформу фермента соответственно. Стоит отметить, что α1S-Na,K-АТФазы из почек свиньи и человека имеют очень близкие кинетические характеристики [244], а гомология их аминокислотной последовательности

составляет 98%. Выделение препаратов очищенного фермента из наружного медулярного слоя почек свиньи и крысы проводили по методике, описанной Йоргенсенем и Акаямой соответственно [65,245] с небольшими изменениями (подробнее в разделе 2.2.6., главы 2. Материалы и методы).

Белковый состав полученных препаратов $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы и $\alpha 1R$ - Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы анализировали с помощью метода одномерного SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [228]. Результаты анализа представлены на рисунке 32.

В препаратах Na,K-АТФазы из почек свиньи (рис. 32а, дорожка 2) главным образом обнаруживается белок с кажущейся молекулярной массой ~100 кДа, который соответствует $\alpha 1$ -изоформе Na,K-АТФазы, что подтверждается данными иммуноблоттинга с использованием антител против $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы (рис. 32а, дорожка 3). Полоса, соответствующая белку с кажущейся молекулярной массой ~55-65 кДа ($\beta 1$ -субъединица), очень сильно «размыта», видимо, вследствие гликозилирования белка. Кроме того, в препарате присутствует некоторое количество других белков, общее содержание которых не превышает 10%. Чистоту препаратов Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы оценивали с помощью программы TotalLab TL120, проводя денситометрический анализ сканов ПААГ после окрашивания белковых полос красителем Кумасси бриллиантовым голубым.

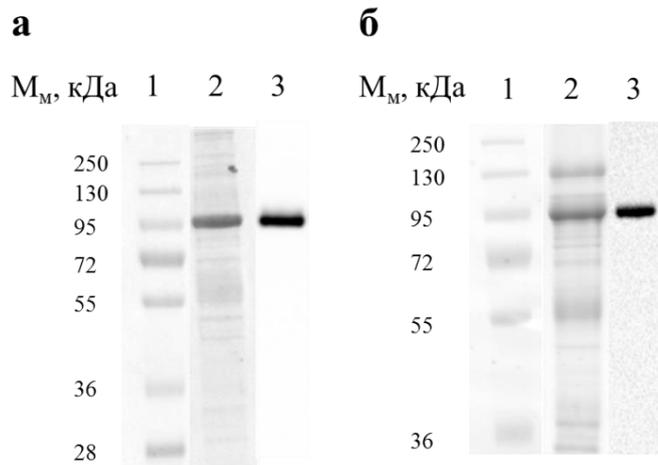


Рис. 32. Анализ белкового состава препаратов Na,K-АТФазы из почек свиньи (**а**) и почек крысы (**б**) и идентификация $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы методом иммуноблоттинга. 1 – маркеры для определения молекулярных масс; 2 – результаты, полученные после проведения SDS-ПААГ электрофореза с окрашиванием белков Кумасси бриллиантовым голубым; 3 – результаты иммуноблоттинга с окрашиванием антителами против $\alpha 1$ -субъединицы.

Препараты Na,K-АТФазы из почек крысы (рис. 32б, дорожка 2) также содержат белки с электрофоретической подвижностью, соответствующей α - и β -субъединицам. Белок с кажущейся молекулярной массой ~100 кДа был идентифицирован как $\alpha 1$ -изоформа с помощью антител

против $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы (рис. 32б, дорожка 3). Однако, помимо α - и β -субъединиц препарат Na,K-АТРазы из почек крысы содержит больше минорных белков (15-25%), чем препарат из почек свиньи. В препарате из почек крыс присутствует довольно большое количество белка с кажущейся молекулярной массой ~ 130 кДа. Попытки удалить этот белок из препарата Na,K-АТРазы путём изменения процедуры солюбилизации (изменение соотношения SDS:белок при солюбилизации, изменение температуры и скорости добавления SDS при солюбилизации) оказались безуспешными. Поэтому мы проанализировали эту полосу с помощью метода хромато-масс-спектрометрического анализа (LS-MS/MS) и обнаружили в этой полосе протеолитические фрагменты следующих белков, представленных в таблице 9.

Мы предполагаем, что эта полоса представляет собой комплекс $\alpha 1$ -субъединицы с протеолитическими фрагментами представленных в таблице 9 белков, либо комплекс протеолитического фрагмента $\alpha 1$ -субъединицы с набором представленных белков. В любом случае препараты Na,K-АТРазы из почек крысы содержат большее количество примесных белков, чем препараты Na,K-АТРазы из почек свиньи.

Таблица 9. Основные протеолитические фрагменты белков, содержащихся в полосе с молекулярной массой ~ 130 кДа, обнаруженного в препарате Na,K-АТРазы из почек крысы после проведения ЭФ в ПААГ

Название белка	Молекулярная масса, кДа
Аланинаминопептидаза	109,5
Аланиламинопептидаза (мембранная)	109,5
$\alpha 1$ -субъединица Na,K-АТРазы	113
Глутамиламинопептидаза	108
Неприлизин	85,8
Кадгерин 16	90

Активность препаратов $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи была равна 700-2200 мкмоль Φ_n /(ч*мг белка), $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы из почек крысы 480-750 мкмоль Φ_n /(ч*мг белка). Полученные данные хорошо согласуются с данными литературы [244–247]. Эти препараты $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы использовали для дальнейших экспериментов по изучению особенностей их взаимодействия с тремя кардиотоническими стероидами – убаином, дигоксином и маринобуфагенином.

Нужно напомнить, что разные представители КТС по-разному действуют на Na,K-АТРАЗУ [142,168], и могут вызывать различные эффекты в клетках. Например, несмотря на примерно одинаковое действие убаина и маринобуфагенина на активность Na,K-АТРазы, убаин в концентрации 1 мкМ вызывал смерть клеток линии C7-MDCK. В отличие от убаина

маринобуфагенин вплоть до концентрации выше 10 мкМ не влиял на жизнеспособность этих клеток [148]. Кроме того, известно, что убаин вызывает изменение кровяного давления, что приводит к артериальной гипертензии у мышей, в то время как дигоксин и дигитоксин не влияют на эти параметры [248,249].

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

Для оценки значений концентрации ингибитора (кардиотонического стероида), при которой происходит полумаксимальное ингибирование фермента (IC_{50} , величина которого во многих публикациях рассматривается как мера сродства ингибитора к Na,K-АТФазе), мы сравнили концентрационную зависимость действия убаина, дигоксина и маринобуфагенина на активность $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы соответственно.

В предыдущих исследованиях ингибирующего действия КТС было отмечено, что для более точного определения кажущейся константы ингибирования необходимо длительное взаимодействие фермента с ингибитором [250–252]. В этой связи мы изучили, как время преинкуции убаина с ферментом влияет на активность Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы (рис. 33).

Было установлено, что через 10 мин преинкубации $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы с убаином в среде определения активности (в отсутствие АТФ) при 37°C, после старта реакции (добавлением АТФ) наблюдается максимальный ингибирующий эффект, который не увеличивается, если время преинкубации продлить до 1 часа. Эти данные согласуются с данными литературы [244]. Аналогичные эксперименты были проведены с дигоксином и маринобуфагенином.

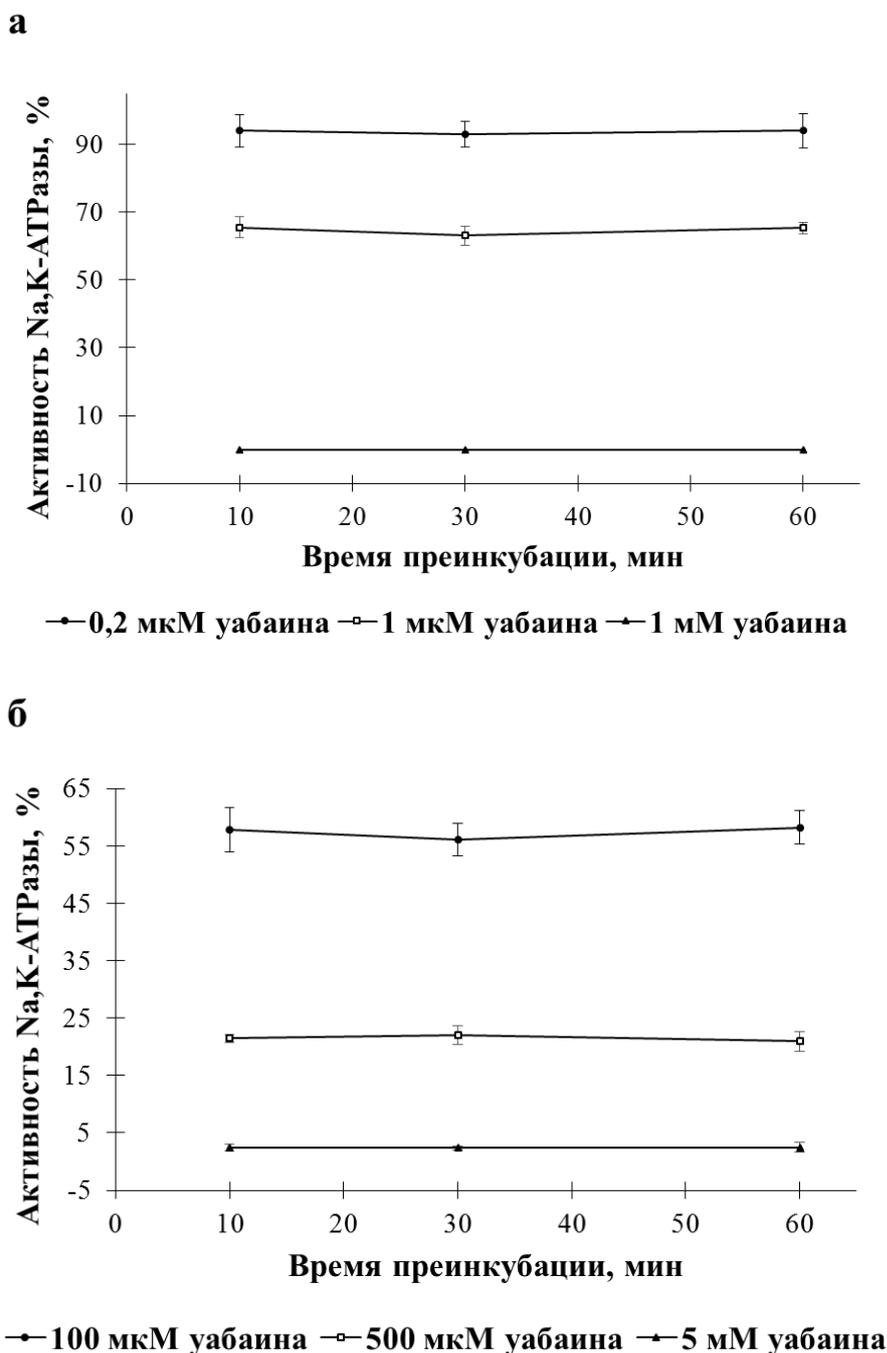


Рис. 33. Зависимость активности **(а)** $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи и **(б)** $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы от времени преинкубации с убаином. Преинкубацию проводили при 37°C в среде без АТФ. Активность определяли после добавления АТФ, измеряя концентрацию Φ_n по методу Ратбуна и Бетлах [230].

На рисунке 34 приведены кривые, описывающие зависимость ингибирования $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи убаином, дигоксином и маринобуфагенином от концентрации этих КТС. Ингибирование активности Na,K-АТФазы из почек свиньи убаином, дигоксином и маринобуфагенином характеризуется схожими значениями IC_{50} (2, 1,2 и 0,8 мкМ соответственно), формы кривых мало различаются между собой. Коэффициент Хилла во всех трех случаях равен 1. Полученные данные согласуются с данными по определенным ранее

значениям IC_{50} для ингибирующего действия этих соединений на Na,K-АТФазу из солевых желез утки [168] и почек человека и свиньи [244].

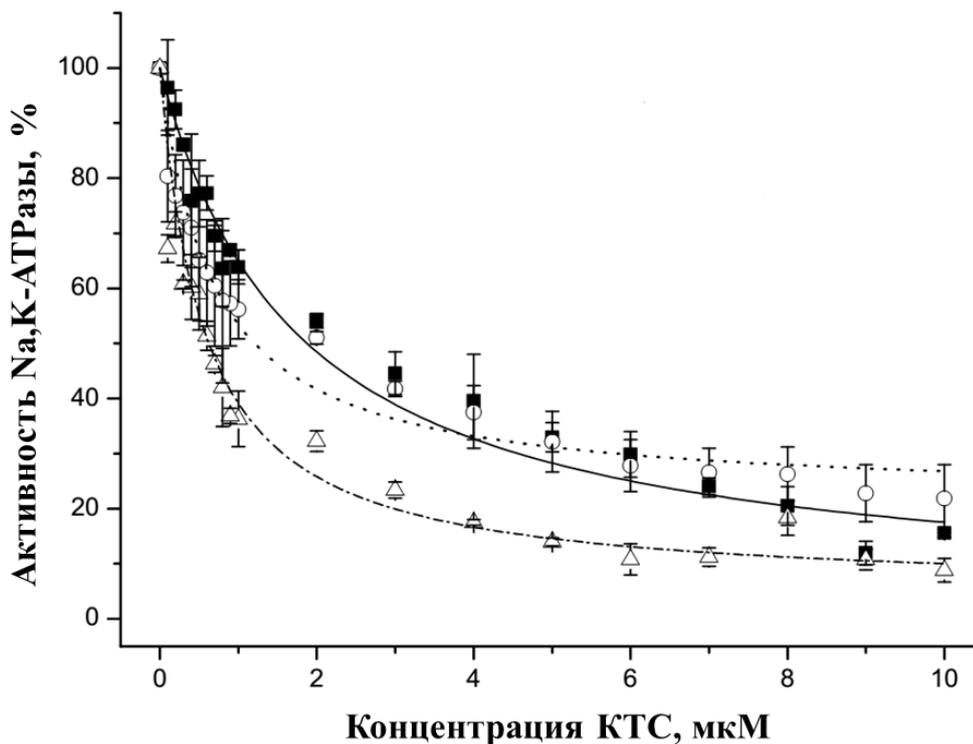


Рис. 34. Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы, полученной из почек свиньи, от концентрации убаина (■), дигоксина (○) и маринобуфагенина (△). За 100% взята активность фермента в отсутствие кардиотонических стероидов. Кривую аппроксимировали кривой Хилла. Представлено среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах в трехкратной повторности.

Зависимость ингибирования $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы от концентрации убаина, дигоксина и маринобуфагенином представлена на рисунке 35. Использование дигоксина и маринобуфагенина в данном эксперименте в концентрациях более 500 мкМ представляется невозможным, поскольку эти соединения начинают выпадать в осадок. Маринобуфагенин в диапазоне концентраций от 5 до 500 мкМ не оказывает ингибирующего воздействия на $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы. Убаин и дигоксин ингибируют фермент, IC_{50} для убаина - 140 мкМ, для дигоксина - 250 мкМ. Формы кривых ингибирования мало различаются между собой; в обоих случаях коэффициент Хилла равен 1.

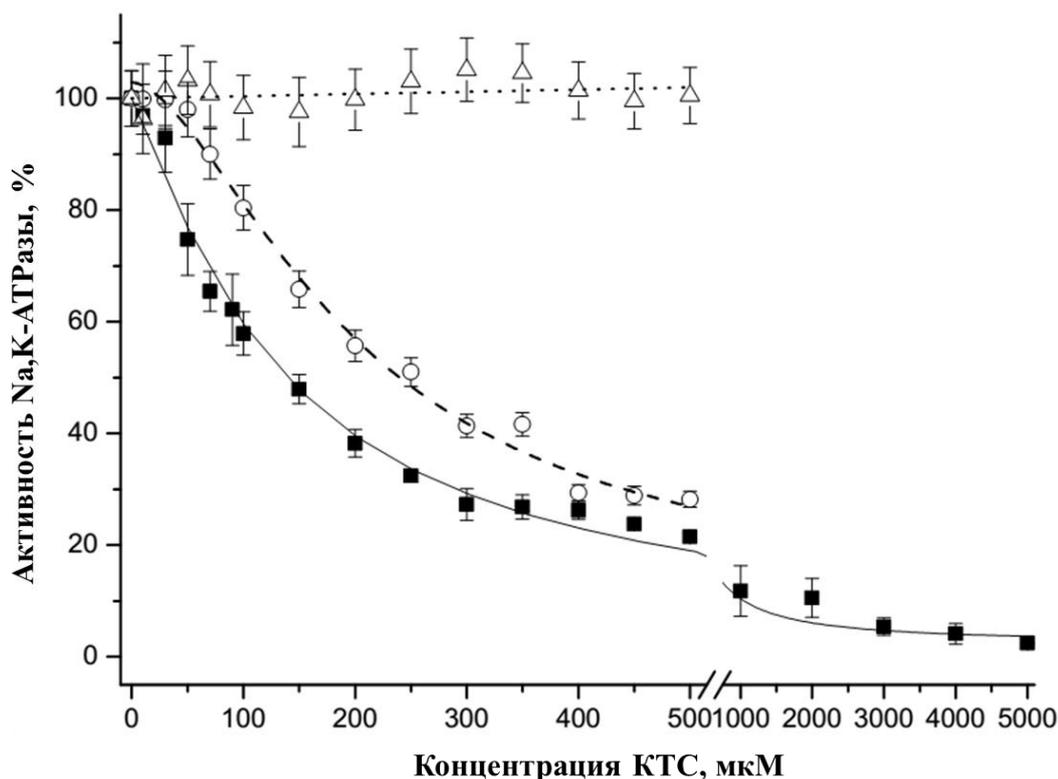


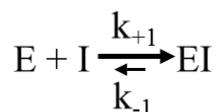
Рис. 35. Зависимость активности $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы, полученной из почек крысы, от концентрации убаина (■), дигоксина (○) и маринобуфагенина (Δ). За 100% взята активность фермента в отсутствие кардиотонических стероидов. Кривую для убаина и дигоксина аппроксимировали кривой Хилла. Представлено среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах в трехкратной повторности.

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

В процессе своего каталитического цикла Na,K-АТФаза претерпевает последовательную смену двух конформационных состояний – E1 и E2, которые характеризуются различным сродством к переносимым катионам и к КТС (рис. 5). В конформации E2-P фермент имеет наиболее высокое сродство к убаину [125]. Ранее с помощью метода изотермической калориметрии титрования было показано, что убаин и маринобуфагенин имеют разное сродство к E1 и E2-P конформациям $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из солевых желез утки: в конформации E2-P значение K_d для убаина было в 17 раз меньше значения K_d для маринобуфагенина [168]. Основываясь на этих данных, мы попытались выяснить характер ингибирования (обратимое или необратимое) Na,K-АТФаз тремя КТС при их взаимодействии с двумя конформациями.

Известно, что убаин относится к ингибиторам Na,K-АТФазы с очень высоким сродством, когда k_{+1} для образования комплекса фермент-ингибитор (EI) очень высока ($10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$), а k_{-1} для диссоциации комплекса EI около 10^{-2} мин^{-1} . Полупериод диссоциации $t_{0,5}$ составляет не

менее 70 мин. Такие значения констант скорости диссоциации фермент-ингибиторного комплекса сближают эти ингибиторы с необратимыми ингибиторами, поэтому их называют псевдообратимыми ингибиторами [253].



Принимая во внимание вышесказанное, мы преинкубировали Na,K-АТФазу из почек свиньи и крысы в конформации E1 и E2-P с тремя различными КТС (уабаином, дигоксином и маринобуфагенином) при разных концентрациях в течение времени, достаточного для достижения устойчивого равновесия для связывания КТС (рис. 36). Переход Na,K-АТФазы в соответствующие конформации (E1 и E2-P) индуцировали, как описано в разделе 2.2.15. Главы 2. Материалы и методы. Na,K-АТФазу из почек свиньи и крысы в конформации E2-P преинкубировали с КТС в течение 10 мин при 37° С, в конформации E1 преинкубировали с КТС при 37° С в течение 30 и 60 мин соответственно. После преинкубации в течение выбранного времени 40 мкл среды преинкубации (содержащей комплекс Na,K-АТФазы-КТС) переносили в кювету объемом 2 мл, содержащую среду для измерения АТФазной активности методом, в котором используется система сопряженных реакций [231]. При этой процедуре происходило разведение комплекса Na,K-АТФазы-КТС в 50 раз.

Как видно из рисунка 36, увеличение времени преинкубации $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы в конформации E2-P с уабаином в концентрации 250 нМ с 10 до 30 мин не вызывало увеличение ингибирующего действия КТС (активность измерена с помощью метода системы сопряженных реакций, подробнее Глава 2. Материалы и методы, раздел 2.2.13.). Таким образом, 10 минут преинкубации достаточно для достижения стационарного состояния. Аналогичные эксперименты были проведены для всех концентраций КТС.

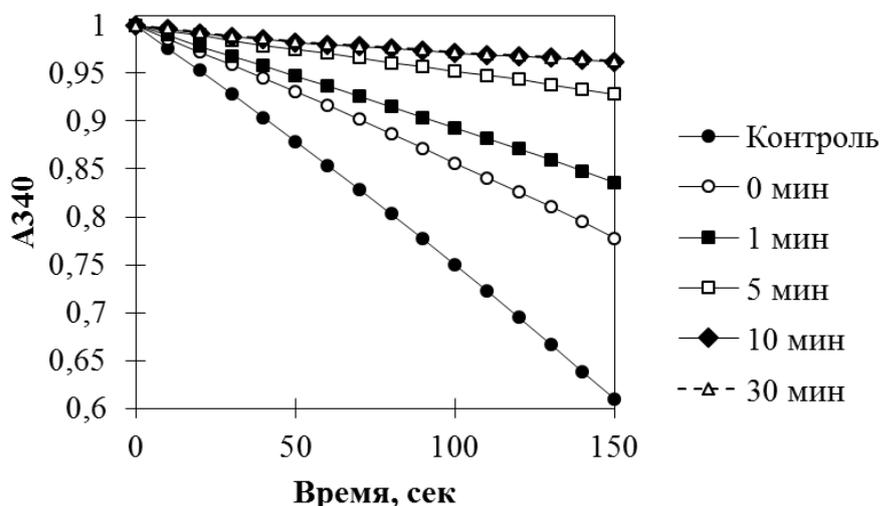


Рис. 36. График, описывающий зависимость изменения оптической плотности среды при длине волны 340 нм (накопление NAD^+ , продукта реакций, сопряженных с Na,K-АТФазой) при температуре 37°C . Пример определения времени преинкубации, необходимого для достижения стационарного состояния. $\alpha 1\text{S-Na,K-АТФазы}$ из почек свиньи в конформации E2-P, концентрация убаина 250 нМ.

3.5.1. Исследование типа ингибирования $\alpha 1\text{S-Na,K-АТФазы}$ при связывании КТС с конформацией E2-P

На рисунке 37 показана зависимость активности $\alpha 1\text{S-Na,K-АТФазы}$ из почек свиньи, преинкубированной с убаином в конформации E2-P, от его концентрации. Мы изучили ингибирующий эффект убаина при разных концентрациях фермента в среде преинкубации, что позволяет определить константу ингибирования для КТС путем построения графика, отражающего зависимость IC_{50} от концентрации белка (см. Приложение). В эксперименте использовали 3 концентрации $\alpha 1\text{S-Na,K-АТФазы}$: 40, 80 и 400 нМ. Мы обнаружили, что кривые, описывающие ингибирование при всех концентрациях белка, 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 может свидетельствовать о наличии двух центров связывания с положительными кооперативными взаимодействиями между ними. Однако тот факт, что ингибирование описывается не гиперболой, а сигмоидой не позволяет определить константу ингибирования в соответствии с уравнением 2, приведенным в Приложении.

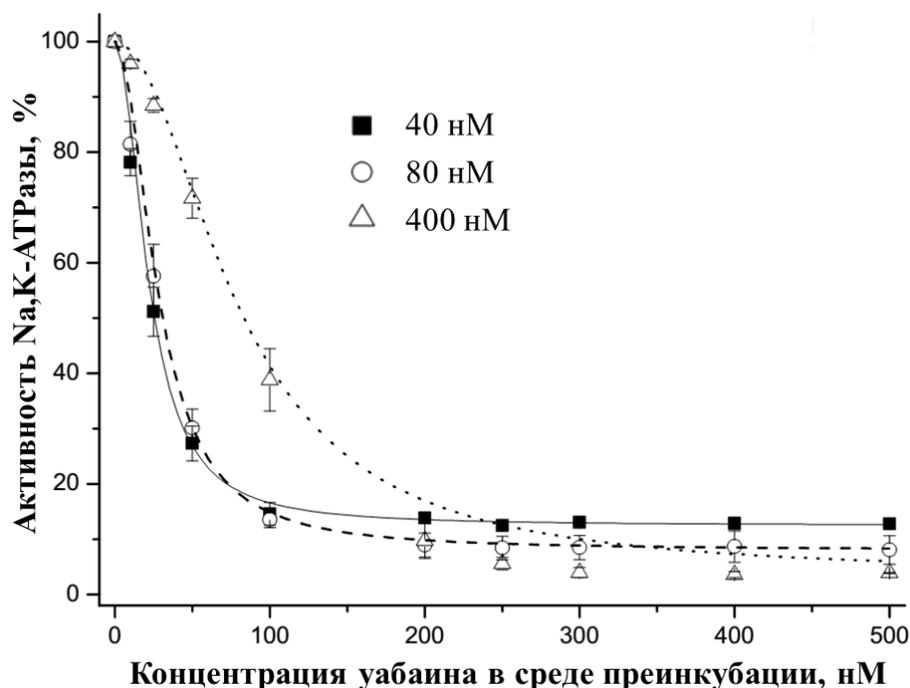


Рис. 37. Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E2-P от концентрации убаина в среде преинкубации. За 100% взята активность фермента в отсутствие убаина. Кривую аппроксимировали кривой Хилла. Коэффициент Хилла $1,89 \pm 0,14$, $1,96 \pm 0,19$, $1,91 \pm 0,09$ для 40, 80 и 400 нМ фермента соответственно. Представлено среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах в трехкратной повторности.

Тот факт, что коэффициент Хилла близок к 2 показывает, что есть два центра связывания убаина с положительными кооперативными взаимодействиями между ними. Эти данные можно объяснить тем, что различным сродством к убаину обладают убаин-связывающие центры двух $\alpha 1$ -субъединиц, объединенных в $\alpha 2\beta 2$ -олигомер, между которыми существует положительная кооперативность. Эксперименты других исследователей по связыванию убаина с Na,K-АТФазой также свидетельствуют о наличии у фермента двух взаимодействующих между собой центров связывания [211,254].

Полученные данные показывают, что убаин является псевдонеобратимым ингибитором $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы, если он связывается с E2-P конформацией фермента. Хотя мы не можем определить константу ингибирования для убаина путем экстраполяции значений IC_{50} к нулевой концентрации белка, можно сделать вывод, что убаин связывается с E2-P конформацией $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи с относительно высоким сродством (при концентрации белка 40 нМ величина IC_{50} для убаина составляла около 40 нМ).

Зависимости активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E2-P от концентрации дигоксина в преинкубационной среде при различной концентрации фермента (40 нМ, 80 нМ и 400 нМ) представлены на рисунке 38. Кривые ингибирования выглядят так же, как

и кривые ингибирования убаином. Кривые были аппроксимированы кривой Хилла, коэффициент Хилла имеет значение близкое к 2: $1,90 \pm 0,21$, $1,70 \pm 0,33$ и $1,99 \pm 0,27$ для концентрации Na,K-АТРазы 40 нМ, 80 нМ и 400 нМ соответственно. Таким образом, на $\alpha 1S$ Na,K-АТРазу есть также два центра связывания дигоксина с положительными кооперативными взаимодействиями между ними. Значение IC_{50} для дигоксина при концентрации Na,K-АТРазы 40 нМ составила около 250 нМ, что ниже, чем для убаина при той же концентрации белка. Это свидетельствует о меньшем сродстве дигоксина к E2-P конформации $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы.

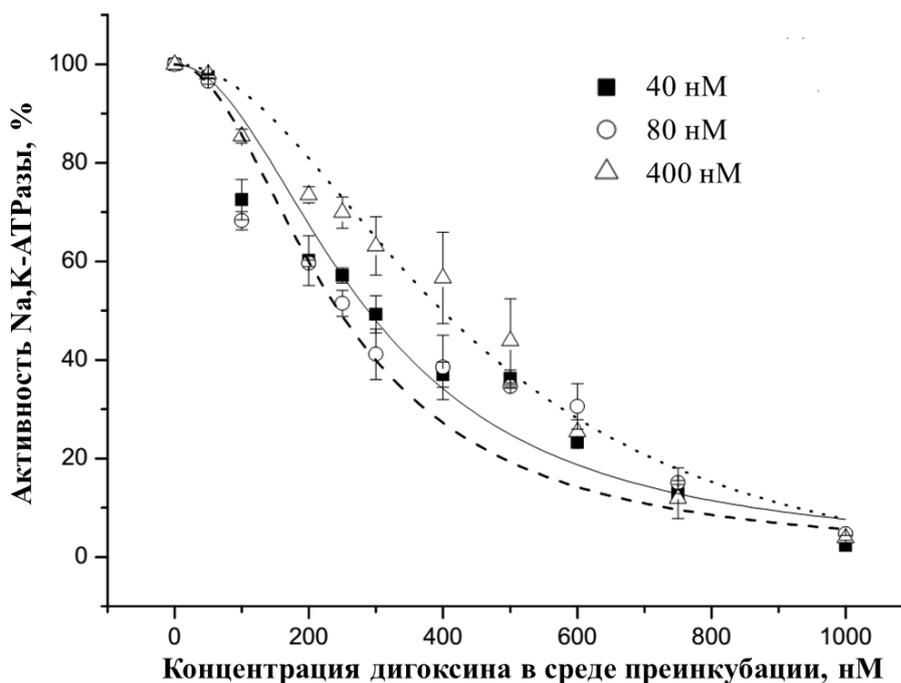


Рис. 38. Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи в конформации E2-P от концентрации дигоксина в среде преинкубации. За 100% взята активность фермента в отсутствие дигоксина. Кривую аппроксимировали кривой Хилла. Коэффициент Хилла $1,90 \pm 0,21$, $1,70 \pm 0,33$ и $1,99 \pm 0,27$ для 40, 80 и 400 нМ фермента соответственно. Представлено среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах в трехкратной повторности.

Результаты свидетельствуют, что убаин и дигоксин, связываясь с E2-P-конформацией $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы, 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-АТРазы ($\alpha\beta$)₂.

Исследуя действие маринобуфагенина на активность Na,K-АТРазы в конформации E2-P, мы обнаружили небольшой ингибирующий эффект. Кроме того, увеличив степень разведения, мы обнаружили уменьшение ингибирования вдвое (данные не представлены). Если маринобуфагенин связывается с Na,K-АТРазой обратимо, то нужно учесть, что при разведении среды преинкубации в среде для измерения АТРазной активности, его концентрация

уменьшается в 50 раз (поскольку разводим преинкубационную среду в 50 раз). Этой концентрации может быть достаточно, чтобы оказывать ингибирующее действие на Na,K-АТФазу в среде для измерения активности (рис. 34). Поэтому, в контрольные пробы мы добавляли в среду для измерения активности маринобуфагенин в концентрации в 50 раз ниже, чем в среде преинкубации (рис. 39). В случае убаина и дигоксина в контрольные пробы мы добавляли более низкие концентрации ингибитора, которые не оказывали действия на активность $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи. Используя такой контроль, мы обнаружили, что в отличие от убаина и дигоксина маринобуфагенин в концентрации 10-150 мкМ не оказывает влияние на активность $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы в конформации E2-P.

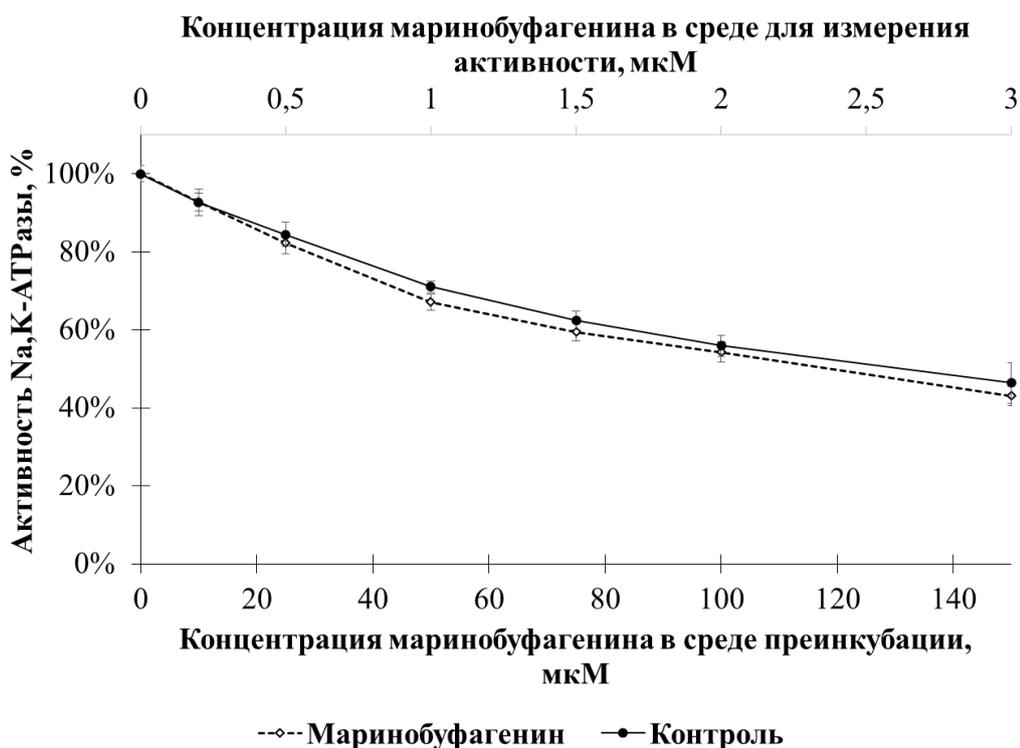


Рис. 39. Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E2-P от концентрации маринобуфагенина в среде преинкубации (нижняя ось абсцисс), от концентрации маринобуфагенина в среде для измерения АТФазной активности (верхняя ось абсцисс). За 100% взята активность фермента в отсутствие маринобуфагенина. Представлено среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах в трехкратной повторности.

3.5.2. Исследование ингибирования $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы в конформации E1

Преинкубация $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в E1-конформации с убаином приводит к необратимому ингибированию фермента с аффинностью, которая намного меньше аффинности в конформации E2-P (рис. 40). I_{50} составляет $20,30 \pm 1,87$ мкМ.

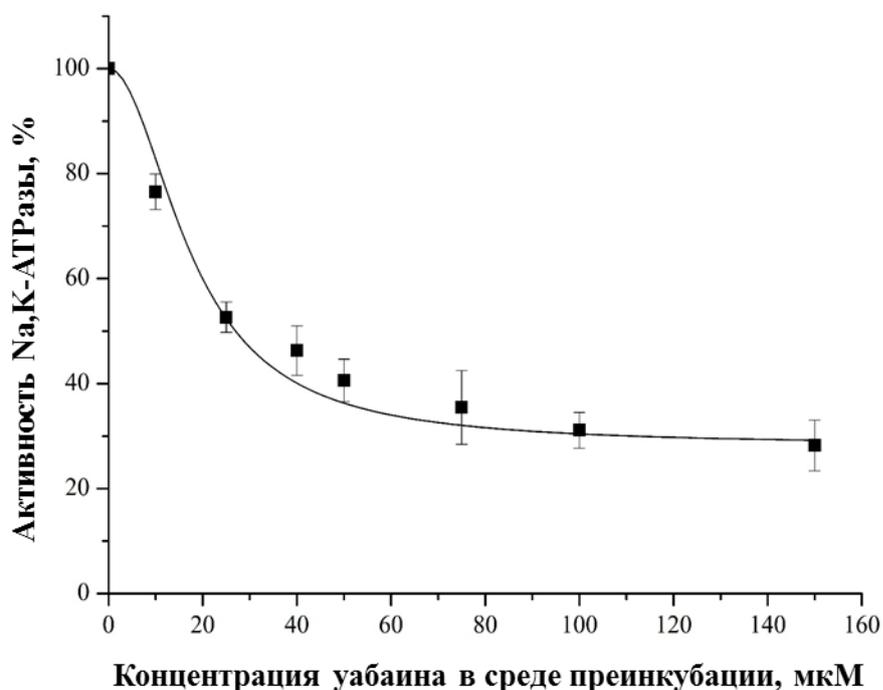


Рис. 40. Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в E1-конформации от концентрации убаина в среде преинкубации. За 100% взята активность фермента в отсутствие кардиотонических стероидов. Указана активность Na,K-АТФазы, нормированная на контроль. В контрольные пробы в среду для измерения АТФазной активности добавляли убаин в концентрации в 50 раз ниже, чем в среде преинкубации. Представлено среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах в трехкратной повторности.

Преинкубация $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в E1-конформации с дигоксином и маринобуфагенином не влияет на её гидролитическую активность (рис. 41). Эти два КТС либо не связываются, либо связываются с конформацией E1 фермента обратимо.

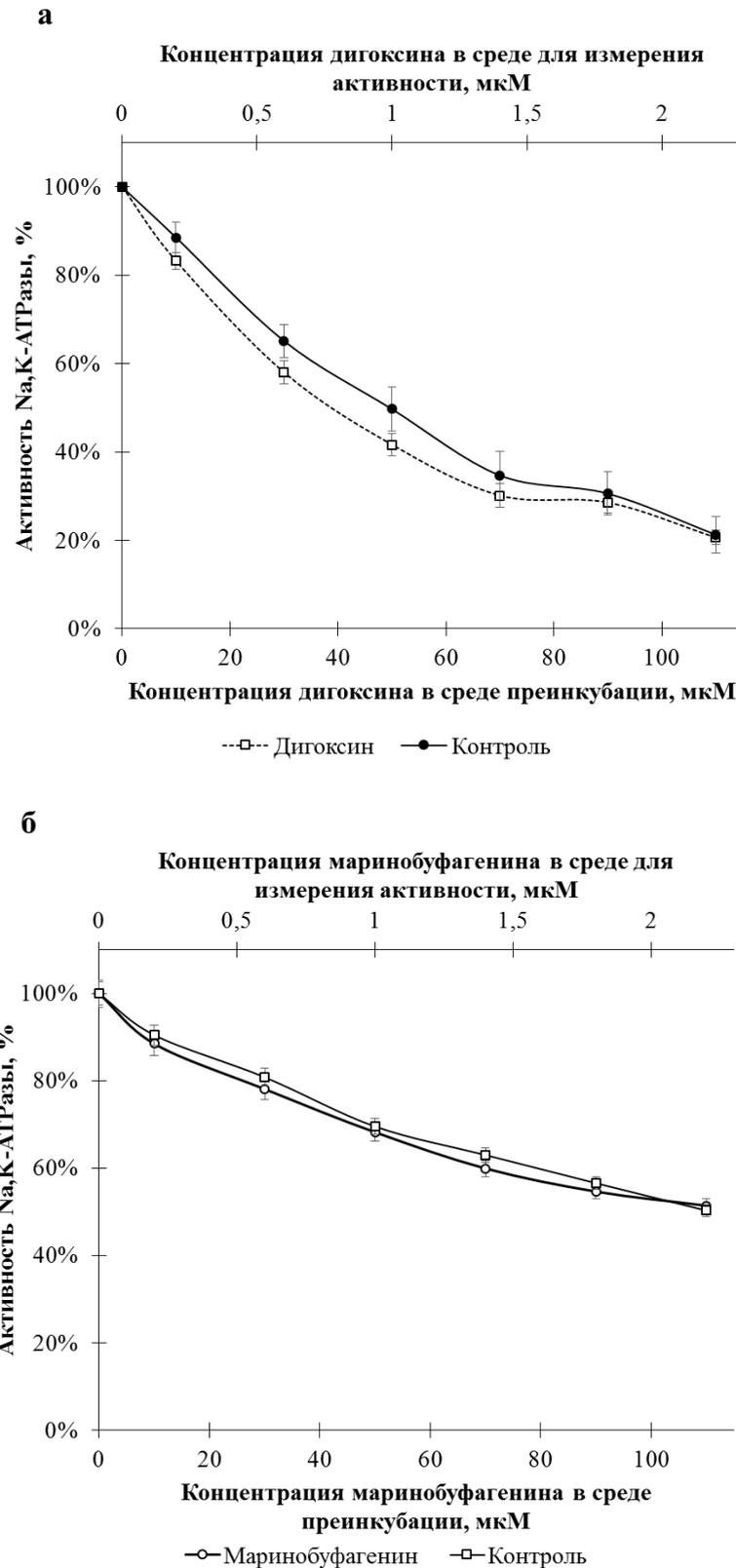


Рис. 41. Зависимость активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E1 от концентрации **(а)** дигоксина и **(б)** маринобуфагенина в среде преинкубации (нижняя ось абсцисс), от концентрации **(а)** дигоксина и **(б)** маринобуфагенина в среде для измерения АТФазной активности (верхняя ось абсцисс). За 100% взята активность фермента в отсутствие маринобуфагенина. Представлено среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах в трехкратной повторности.

3.5.3. Исследование типа ингибирования $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза из почек крысы убаином, дигоксином и маринобуфагенином

При изучении влияния КТС на $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза из почек крысы мы столкнулись с техническими трудностями. Поскольку дигоксин и маринобуфагенин - гидрофобные соединения, которые плохо растворяются в воде, мы готовили 10 мМ растворы этих КТС, используя 100% диметилсульфоксид (ДМСО). Чтобы учесть влияние ДМСО на активность фермента, мы добавляли в контрольную пробу данное соединение в необходимой концентрации (концентрация ДМСО в растворе КТС) в среду преинкубации. 100 мМ раствор убаина готовили, используя ДМСО.

Другая проблема заключается в том, что $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза из почек крысы ингибируется крайне высокими концентрациями КТС [2]. Если КТС не связывается с ферментом, либо связывается обратимо, то в этом случае, при разведении в 50 раз преинкубационной среды с комплексом $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза-КТС в среде для измерения АТРазной активности, концентрация КТС уменьшается в 50 раз – остаточной концентрации КТС может быть достаточно, чтобы ингибировать Na,K-АТРаза в среде для измерения активности. Учитывая данный факт, в контрольную пробу в среду для измерения активности мы добавляли остаточную концентрация КТС.

Мы обнаружили, что преинкубация $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза в конформации E2-P с убаином в концентрации до 10 мМ не вызывает ингибирования АТРазной активности (рис. 42). Мы можем предположить, что убаин либо не взаимодействует с $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазой в конформации E2-P, либо взаимодействует обратимо (ингибирование было устранено после разведения комплекса Na,K-АТРаза-убаин). Аналогичные результаты были получены с дигоксином и маринобуфагенином (данные не показаны).

Преинкубация всех изученных КТС с E1-конформацией $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза из почек крысы также не оказывала влияния на гидролитическую активность фермента (данные не представлены). Связывание убаина, дигоксина и маринобуфагенина с ферментом из почек крысы является обратимым как в конформации E2-P, так и в конформации E1.

Таким образом, убаин и дигоксин являются псевдонеобратимыми ингибиторами (ингибиторами с высоким сродством) $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза из почек свиньи при связывании с конформацией E2-P. Маринобуфагенин является обратимым ингибитором $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза. Все три исследуемые КТС либо не связываются с $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазой из почек крысы (маринобуфагенин) в конформации E1 и E2-P, либо связываются с ними обратимо (убаин и дигоксин).

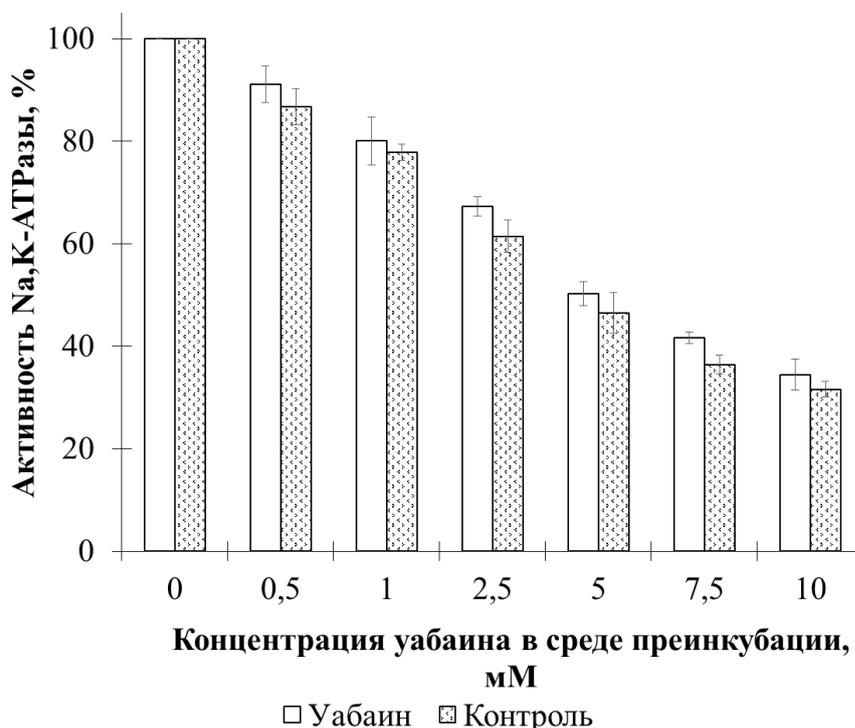


Рис. 42. Зависимость активности $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы в конформации E2-P от концентрации маринобуфагенина в среде преинкубации. За 100% взята активность фермента в отсутствие маринобуфагенина. Представлено среднее значение и стандартное отклонение, полученное в трёх независимых экспериментах в трехкратной повторности.

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

С помощью метода изотермической калориметрии титрования (ИКТ) мы изучали связывание уабаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи, а также связывание уабаина с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы. Данный метод позволяет в одном эксперименте определить без использования меток и модификаций белков такие параметры взаимодействия биологических молекул, как изменения энтальпии и энтропии, а также константу связывания.

Исследовать взаимодействие дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы данным методом оказалось крайне сложно. Мы уже писали, что сродство этого фермента к КТС низкое, поэтому для проведения титрования нужны растворы с высокими концентрациями этих соединений (10 мМ). Из-за их гидрофобности такие растворы приходится готовить с использованием 100% ДМСО. Тепловой эффект разбавления ДМСО значительно превышает тепловой эффект связывания Na,K-АТФазы с кардиотоническим стероидом. Для проведения титрования необходимо, чтобы концентрация ДМСО в экспериментальной ячейке, где содержится фермент, и в шприце (содержит КТС) была одинаковой и составляла 50%-100%

ДМСО. При такой концентрации ДМСО активность Na,K-АТФазы резко уменьшается, по-видимому, из-за его воздействия на конформационное состояние белка. Альтернативный вариант постановки эксперимента заключается в том, чтобы существенно снизить концентрацию КТС (и значит ДМСО) и фермента. Но разрешение прибора не позволяет в этом случае корректно определить параметры связывания, поскольку концентрация Na,K-АТФазы должна быть в диапазоне от 10 до 100 констант диссоциации (K_d) при наличии одного центра связывания КТС. Поскольку убаин более гидрофильное соединение, то он хорошо растворяется в воде, и описанных выше проблем не возникает. По этой причине для $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы мы попытались определить термодинамические параметры связывания только для убаина.

При проведении экспериментов по титрованию аликвоты раствора КТС (2,5 мкл, 25-250 мкМ) вносили с помощью высокоточного устройства ввода в калориметрическую ячейку объемом 203 мкл, содержащую 5-20 мкМ Na,K-АТФазы, до получения полной изотермы связывания. Для получения истинного термодинамического профиля в эксперименте учитывали теплоту разбавления для получения эффективной энтальпии связывания [233].

Используя метод изотермической калориметрии титрования мы оценили константы связывания K_a , а также изменение термодинамических параметров: изменение энтальпии ΔH , изменение энтропии ΔS при связывании убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи, находящейся в двух конформационных состояниях: E2-P и E1.

Изучение связывания КТС с E2-P-конформацией Na,K-АТФазы проводили в среде, содержащей Mg^{2+} и Φ_n . В ячейку для образцов добавляли $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы в E2-P-конформации в концентрации 10-20 мкМ и титровали КТС до тех пор, пока кривая изотермы не выходила на плато. Типичные экспериментальные ИКТ-кривые для связывания убаина, дигоксина и маринобуфагенина представлены на рисунке 43. Кривые связывания фермента с тремя КТС аппроксимировались наилучшим образом с использованием модели одного участка связывания (Рис. 43). В таблице 10 приведены параметры связывания $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы с КТС.

Таблица 10. Термодинамические параметры связывания убаина, дигоксина и маринобуфагенина с E2-P и E1 конформацией $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи при pH 7,4 и температуре 37°C

Конформация Na,K-АТРазы	КТС	K_a, M^{-1}	K_d, nM	$\Delta H,$ ккал/моль	$T\Delta S,$ ккал/моль	$\Delta G,$ ккал/моль
E2-P	убаин	$1,9 \cdot 10^7$	53	-21,6	-1,3	-22,9
E2-P	дигоксин	$4,0 \cdot 10^6$	208	-7,9	-0,3	-8,2
E2-P	МБГ	$4,3 \cdot 10^5$	2320	-5,2	-0,33	-5,53
E1	убаин	НД	-	НД	-	-
E1	дигоксин	НД	-	НД	-	-
E1	МБГ	НД	-	НД	-	-

Показаны среднеарифметические значения, определенные в трех независимых экспериментах в трехкратной повторности.

МБГ – маринобуфагенин;

K_a – константа ассоциации, стандартное отклонение не превышало $\pm 20\%$.

K_d – константа диссоциации: $K_d = 1/K_a$;

ΔH – изменение энтальпии; стандартное отклонение не превышало $\pm 10\%$.

$T\Delta S$ – изменение энтропии; стандартное отклонение не превышало $\pm 10\%$;

ΔG – изменение энергии Гиббса;

НД – не удалось детектировать в условиях эксперимента. $K_d > 10$ мкМ.

Реакция связывания Na,K-АТРазы из почек свиньи в конформации E2-P с убаином при температуре 37°C характеризуется следующими термодинамическими параметрами: изменение энтальпии $\Delta H = -21,63 \pm 0,66$ ккал/моль, изменение энтропии $T\Delta S = -1,3$ ккал/моль, константа диссоциации $K_d = 53 \pm 9$ нМ. Для дигоксина изменение энтальпии ΔH составляет $-7,9 \pm 0,55$ ккал/моль, изменение энтропии $T\Delta S = -0,3$ ккал/моль, константа диссоциации $K_d = 208 \pm 21$ нМ. Измеренная с использованием метода ИКТ стехиометрия связывания убаина (n) с $\alpha 1$ -Na,K-АТразой ($n = 0,65 \pm 0,15$) и с дигоксином ($n = 0,52 \pm 0,12$) меньше единицы, что согласуется с данными литературы [142,246]. Следует отметить, что определенные нами методом ИКТ константы диссоциации комплекса фермент-КТС в конформации E2-P для убаина и дигоксина близки к величинам $K_{0,5}$, определенным нами в экспериментах по выявлению типа ингибирования, которые при самой низкой концентрации белка составили для убаина и дигоксина 40 и 250 нМ соответственно.

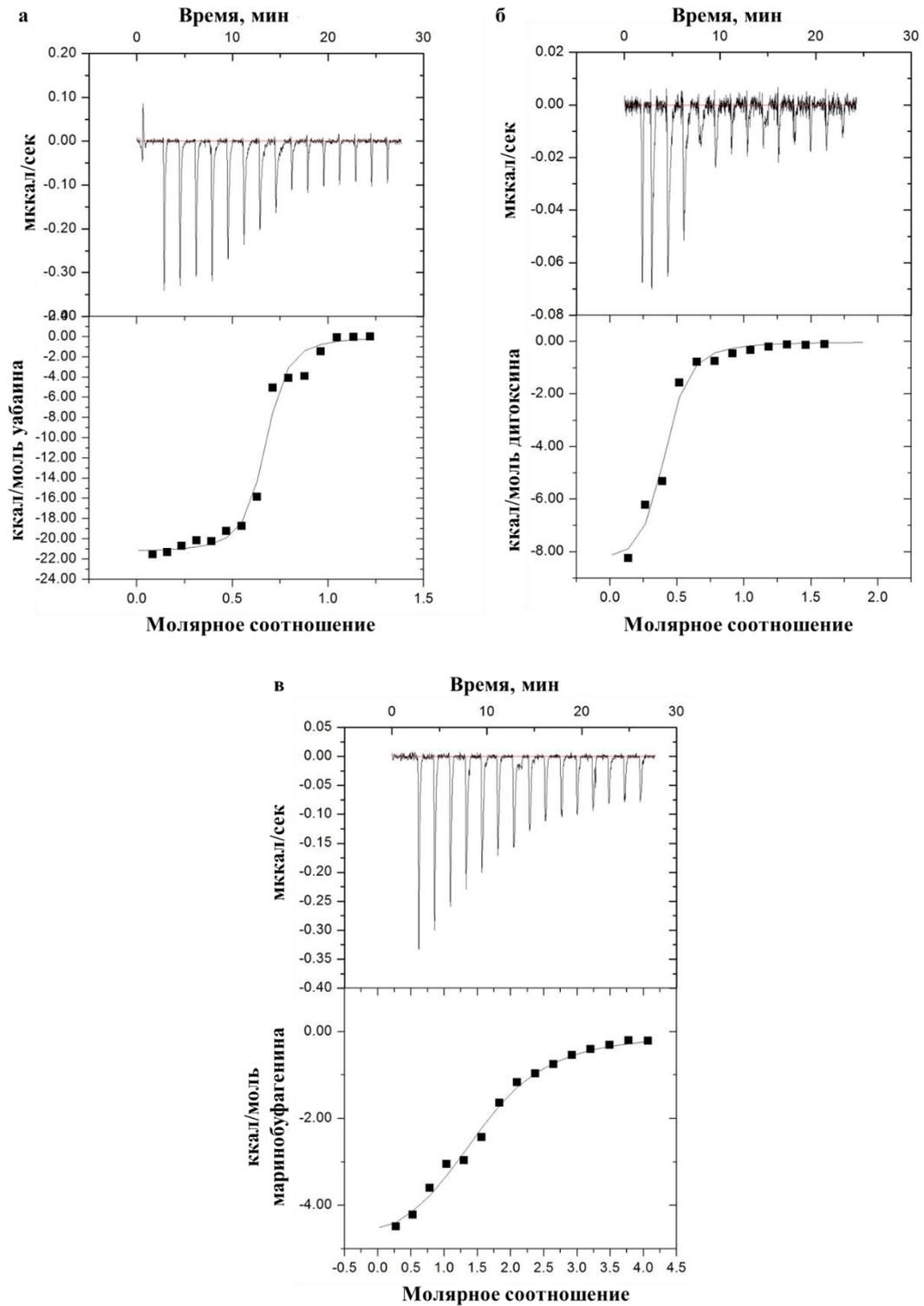


Рис. 43. Анализ взаимодействия $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы (10 мкМ) в E2-P-конформации с (а) убаином, (б) дигоксином и (в) маринобуфагенином методом изотермической калориметрии титрования (ИКТ). Верхняя панель – кривая титрования Na,K-АТРазы из почек свиньи убаином при pH 7,4 и температуре 37°C; нижняя панель – изотерма связывания фермента и лиганда, полученная путем интегрирования кривой титрования, и оптимизированная аппроксимация изотермы связывания с помощью модели одного типа участков связывания (сплошная линия).

Константа диссоциации для маринобуфагенина в 50 раз ниже, чем для убаина ($K_d = 2,3 \pm 0,45$ мкМ), изменение энтальпии $\Delta H = -5,2 \pm 0,25$ ккал/моль, изменение энтропии $T\Delta S = -0,33$ ккал/моль. Стихиометрия связывания для маринобуфагенина составляет $1,7 \pm 0,21$.

При связывании любого из исследуемых КТС (убаина, дигоксина и маринобуфагенина) с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы в конформации E2-P основной вклад в изменение энергии Гиббса (ΔG) вносит энтальпийный фактор. Отрицательная величина изменения энтальпии указывает на образование большого количества водородных связей или Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий между ферментом и КТС. Таким образом, связывание убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи – это энтальпийно выгодный процесс. Наибольшее изменение энтальпии ΔH происходит в случае связывания с Na,K-АТРАЗой убаина, что, скорее всего, объясняется взаимодействием с ферментом ненасыщенного пятичленного лактона и гидроксильных групп на β -поверхности стероидного ядра кардиотонического стероида.

Стоит отметить, что ранее на очищенных препаратах Na,K-АТРазы из солевых желез утки ($\alpha 1S$) проводили сравнение связывания убаина и маринобуфагенина с ферментом. Эти эксперименты проводили при температуре 25°C . Было показано, что убаин и маринобуфагенин связываются с Na,K-АТРАЗой в одном и том же центре связывания (конкурентное ингибирование). Величина K_d для убаина и маринобуфагенина ($0,1$ и $1,7$ мкМ соответственно) имеет схожие значения для фермента из солевых желез утки в конформации E2-P. Более того, убаин связывается с ферментом в конформации E2-P, в то время как маринобуфагенин в конформации E1 и E2-P. Также было установлено, что связывание убаина – энтальпийно выгодный процесс, а связывание маринобуфагенина – энтропийно выгодный процесс [168]. В представленных выше экспериментах мы изучали связывание КТС с Na,K-АТРАЗой из почек свиньи. Этот фермент имеет высокую гомологию ($93,5\%$) с Na,K-АТРАЗой из солевых желез утки, однако не является её полным аналогом. Кроме того, эксперименты мы проводили при 37°C , что также может влиять на связывание КТС с Na,K-АТРАЗой.

Аналогичным образом мы исследовали особенности взаимодействия убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы в конформации E1. Нам не удалось идентифицировать связывание любого из трёх КТС с ферментом в E1-конформации (таблица 10). Это означает, что связывание либо отсутствует, либо константа диссоциации составляет более 10 мкМ.

Далее мы попытались определить параметры связывания убаина с Na,K-АТРазы из почек крысы в конформации E2-P и E1. Нам не удалось идентифицировать взаимодействие $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы с КТС в обеих исследуемых конформациях. Это означает, что связывание либо отсутствует, либо характеризуется константой диссоциации более 10 мкМ.

Стоит отметить, что константы диссоциации $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы в конформации E2-P с убаином и дигоксином, определенные методом ИКТ, соответствуют константам, характерным

для ингибиторов с высоким сродством (псевдонеобратимое ингибирование), а K_d для маринобуфагенина характеризует его как обратимый ингибитор (подробнее в Приложении). Таким образом, результаты, полученные с помощью метода ИКТ подтверждают результаты по определению типа ингибирования Na,K-АТРаза кардиостероидами (подробнее раздел 3.5.1.).

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

Протеолиз является одним из широко используемых методов анализа общей структуры и конформаций белков. В случае Na,K-АТРаза для этих целей часто используют трипсин, поскольку он расщепляет только α -субъединицу фермента, не затрагивая её β -субъединицу [63]. Поэтому после обработки фермента трипсином обнаруживаются только пептидные фрагменты α -субъединицы.

Классическая картина трипсинолиза α -субъединицы была описана Питером Йоргенсенем (Peter Jørgensen) [72]. В конформации E1 трипсин осуществляет быстрый протеолиз пептидной связи перед Lys30 и более медленный - перед Arg262. В результате происходит накопление большого протеолитического фрагмента с молекулярной массой около 77 кДа и минорных фрагментов. При трипсинолизе α -субъединицы Na,K-АТРаза в конформации E2 трипсин обеспечивает накопление полипептидов с молекулярной массой 58 и 41 кДа. При длительном протеолизе (30 - 60 минут) обеих конформаций наблюдается накопление фрагментов с молекулярной массой 44, 37, 23 и 15 кДа [67,70,255]. Описанные эксперименты были проведены на препаратах Na,K-АТРаза из почек кролика, собаки и свиньи при соотношении трипсин/Na,K-АТРаза = 1/25 и 1/20.

В нашей работе были использованы более высокие концентрации трипсина: соотношение трипсин/Na,K-АТРаза (w/w) составляло 1/10, однако время инкубации с трипсином было меньше - 5 минут. Это обусловлено тем, что связывание КТС значительно увеличивает скорость трипсинолиза [70].

3.7.1. Ограниченный трипсинолиз комплексов убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазой из почек свиньи

На рис. 44 представлены данные электрофоретического анализа продуктов трипсинолиза, полученных из $\alpha 1S$ -субъединицы Na,K-АТРаза почек свиньи в конформации E1 (соотношение трипсин/Na,K-АТРаза 1/10, 5 минут при 37°C). Видно, что интенсивность окрашивания $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза (~100 кДа) после протеолиза существенно снижается (см. дорожки 1 и 3). При этом образуется пептидный фрагмент с молекулярной массой около 40 кДа и крайне небольшое

количество пептидного фрагмента с молекулярной массой 35,5 кДа. В небольших количествах появляются еще два пептидных фрагмента с молекулярными массами около 23 и 19 кДа, которые отсутствовали в препарате фермента до протеолиза.

Преинкубация фермента из почек свиньи с убаином и дигоксином в концентрациях, полностью ингибирующих Na,K-АТФазу (1 мМ), приводит к существенному и практически одинаковому снижению количества $\alpha 1S$ -субъединицы Na,K-АТФазы и увеличению количества полипептидного фрагмента с молекулярной массой около 40 кДа. Одновременно в результате преинкубации Na,K-АТФазы с убаином и дигоксином (карденолиды) существенно возрастает количество белка с молекулярной массой 35,5 кДа, этот белок не обнаруживается после преинкубации фермента с маринобуфагенином (буфадиенолид) и последующего трипсинолиза (рис. 44а, дорожка 6). Таким образом, в присутствии карденолидов на поверхности белка экспонируется дополнительный участок расщепления полипептидной цепи трипсином, который недоступен для протеолиза в том случае, если фермент преинкубирован с маринобуфагенином. Это означает, что скорее всего конформация α -субъединицы Na,K-АТФазы после ее связывания с убаином и дигоксином отличается от таковой, индуцированной связыванием маринобуфагенина.

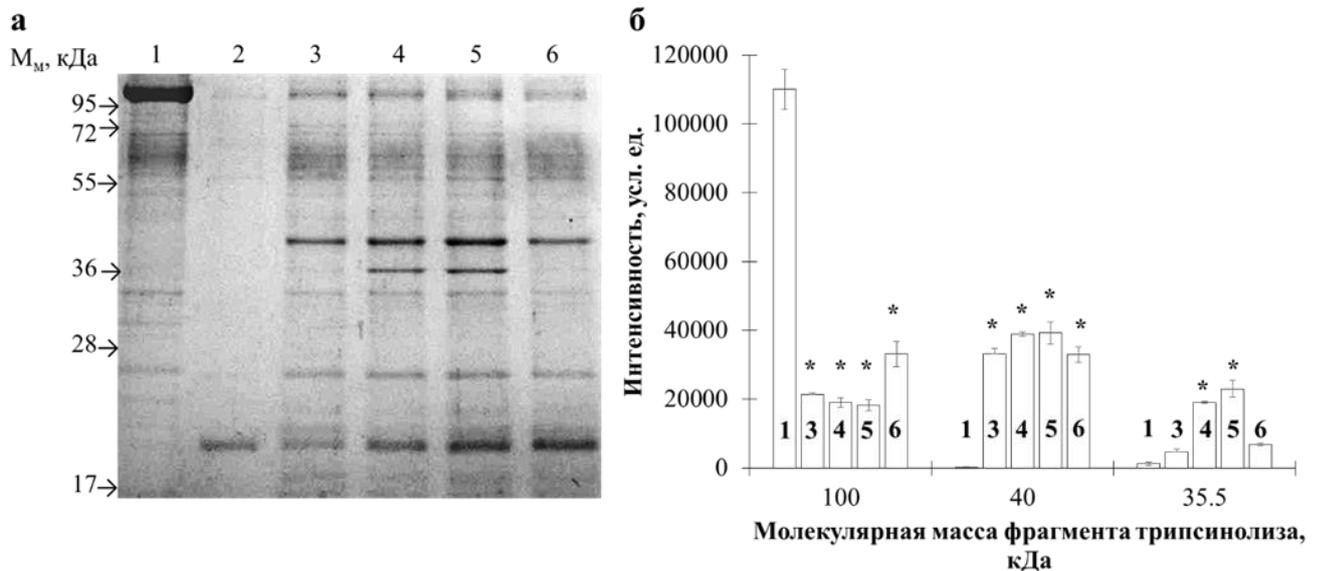


Рис. 44. Результаты трипсинолиза $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E1 в присутствии КТС (1 мМ). Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение Na,K-АТФаза/трипсин 10/1. **(а)** Результаты разделения белков препарата и протеолитических фрагментов $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: 1 - исходный препарат Na,K-АТФазы (7,7 мкг); 2 - трипсин и ингибитор трипсина; 3 - Na,K-АТФаза и трипсин; 4 - комплекс Na,K-АТФаза-убаин и трипсин; 5 - комплекс Na,K-АТФаза-дигоксин и трипсин; 6 - комплекс Na,K-АТФаза-маринобуфагенин и трипсин. **(б)** Интенсивность окрашивания белковых полос, соответствующих $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТФазы и её пептидных фрагментов с молекулярной массой 40 и 35,5 кДа. Представлены результаты трёх экспериментов, показаны стандартные отклонения; * - $p < 0,01$.

Рисунок 45 иллюстрирует результаты, полученные при электрофоретическом разделении продуктов протеолиза $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза из почек свиньи в конформации E2-P (условия трипсинолиза такие же, как на рис. 44). В результате протеолиза в отсутствие КТС наблюдается уменьшение количества $\alpha 1$ -субъединицы, увеличивается количество продуктов протеолиза с молекулярной массой 40 кДа и 35,5 кДа. Но преинкубация с любым из исследуемых кардиотонических стероидов приводит к появлению большого количества дополнительного фрагмента с молекулярной массой 45 кДа. Это показывает, что в конформации E2-P связывание любого из кардиотонических стероидов обеспечивает одинаковое изменение конформации $\alpha 1$ -субъединицы фермента.

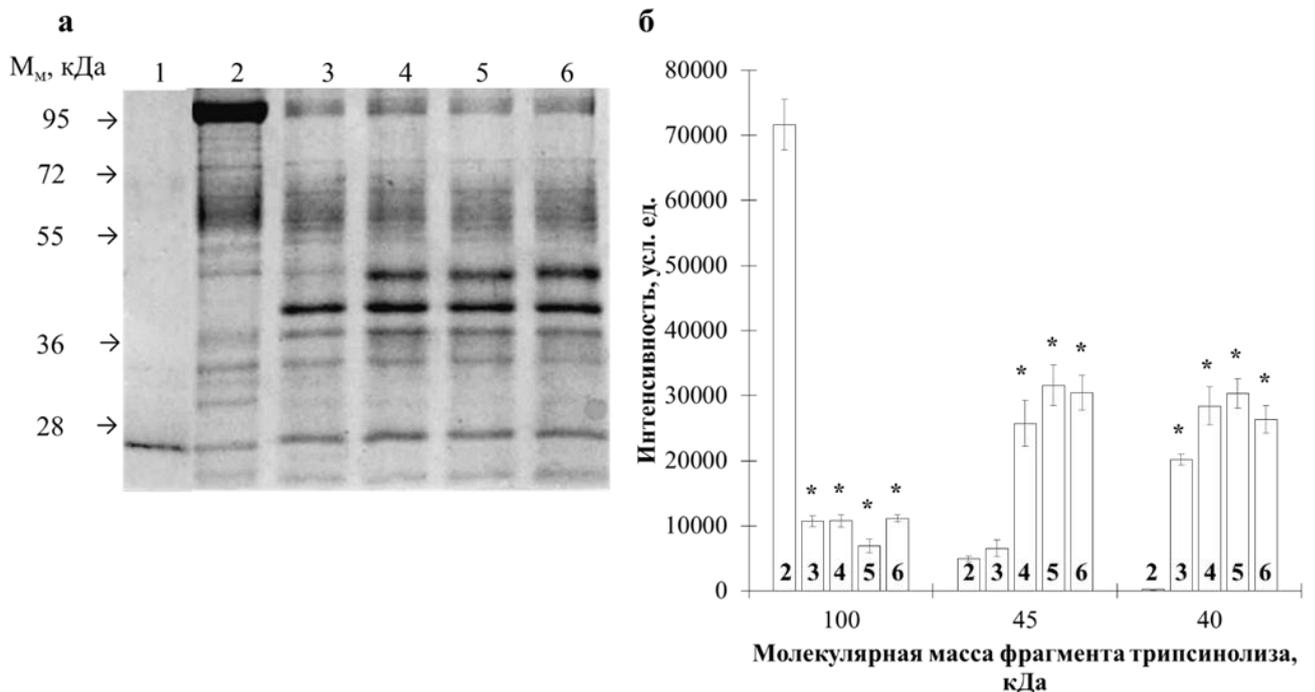


Рис. 45. Результаты трипсинолиза $\alpha 1$ S-Na,K-АТРаза из почек свиньи в конформации E2-P в присутствии КТС (1 мМ). Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение Na,K-АТРаза/трипсин 10/1. **(а)** Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов $\alpha 1$ S-Na,K-АТРаза методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: 1 - трипсин и ингибитор трипсина; 2 – исходный препарат Na,K-АТРаза (7,7 мкг); 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 45 и 40 кДа. Представлены результаты трёх экспериментов, показаны стандартные отклонения; * - $p < 0,01$.

Полученные нами данные по протеолизу $\alpha 1$ S-Na,K-АТРаза из почек свиньи несколько отличаются от данных, полученных ранее другими авторами: мы обнаружили, что под действием трипсина α -субъединица расщепляется с получением в основном фрагмента с молекулярной массой 40 кДа и крайне небольших количеств пептидных фрагментов с молекулярной массой 35,5 кД, 23 и 19 кДа (причем в количественном отношении преобладает фрагмент с молекулярной

массой около 40 кДа), в то время как другие авторы сообщают о получении фрагментов с молекулярными массами 44, 37, 23 и 15 кДа. Однако различия в 3-4 кДа в величине молекулярных масс белков, определенных по их электрофоретической подвижности, находятся в пределах ошибки самого метода, поэтому можно полагать, что получены те же самые полипептиды, о которых сообщали другие авторы. Доказать, что результаты наши результаты не отличаются от результатов предшественников, можно лишь путем определения N-концевой последовательности этих пептидов, однако это не являлась целью нашего исследования. Более того, эти авторы не идентифицировали указанные фрагменты таким способом.

Главное, что установлено в результате нашей работы: при протеолизе Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E1 (но не E2) образуется значительное (статистически значимое) количество пептида с молекулярной массой около 35,5 кДа только в том случае, если с ферментом связаны убаин или дигоксин, которые относятся к группе карденолидов, но не буфадиенолид маринобуфагенин. В присутствии маринобуфагенина этот фрагмент при трипсинолизе вообще не образуется. Это позволяет считать, что маринобуфагенин при связывании с $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы (по крайней мере, в E1-конформации) обеспечивает создание конформации, отличной от таковой, что создается в присутствие убаина и дигоксина.

Анализируя полученные данные, мы можем заключить, что хотя все три исследованных КТС вызывают ингибирование $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы, конформация фермента, индуцируемая связыванием маринобуфагенина, отличается от таковой, полученной при связывании убаина и дигоксина.

3.7.2. Ограниченный трипсинолиз комплексов убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазой из почек крысы

При протеолизе $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы в конформации E1 и E2-P мы наблюдали образование фрагментов с молекулярными массами 40 кДа и не обнаружили появления фрагментов с молекулярной массой 35,5 кДа. Преинкубация фермента с любым кардиотоническим стероидом не изменяла набора продуктов протеолиза и их молекулярной массы в случае пребывания фермента в обеих конформациях (рис. 46).

Таким образом, отсутствуют различия в продуктах протеолиза, полученных после трипсинолиза комплекса Na,K-АТФазы из почек крысы со всеми тремя исследованными КТС, как в конформации E1, так и в конформации E2-P. Эти данные показывают, что две эти $\alpha 1$ -изоформы фермента ($\alpha 1S$ и $\alpha 1R$), различаются не только по их чувствительности к КТС, но и по их способности переходить $\alpha 1R$ -изоформы при связывании КТС в ту конформацию, которая характерна для $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи и, по-видимому, необходима для связывания

нужного белка-партнера. Видимо именно по этой причине две изоформы Na,K-АТРазы ($\alpha 1S$ и $\alpha 1R$) после их связывания с КТС способны инициировать различные сигнальные каскады.

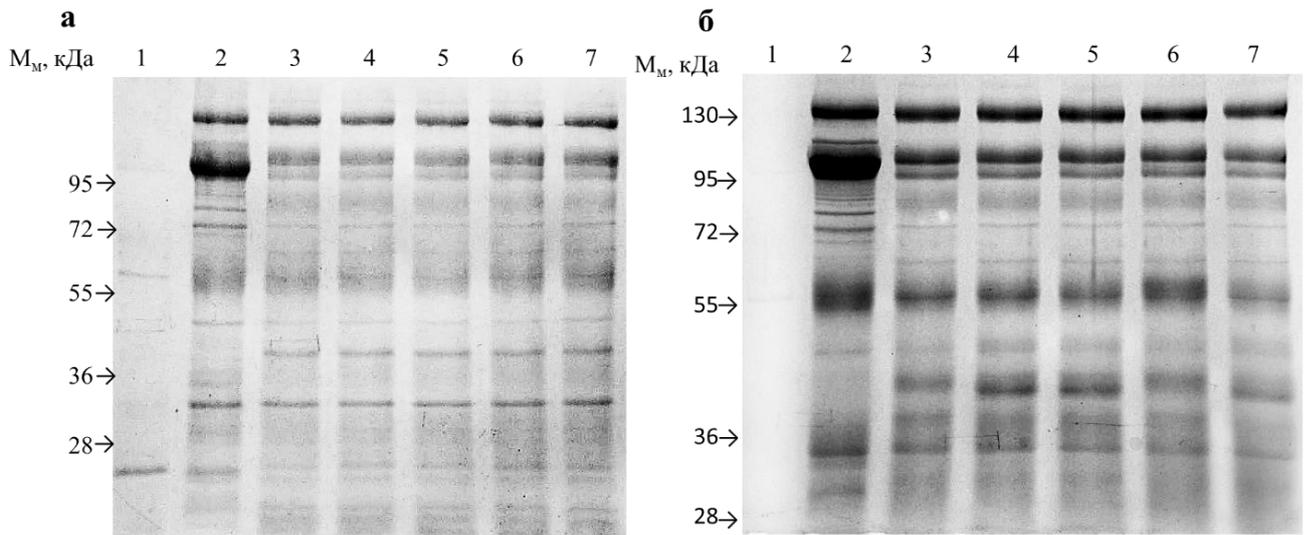


Рис. 46. Результаты трипсинолиза $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы из почек крысы в конформации E1 (**а**) и в конформации E2-P (**б**) в присутствии КТС. Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение Na,K-АТРаза : трипсин 10:1. Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: 1 - исходный препарат Na,K-АТРазы (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; 7 – комплекс Na,K-АТРаза-уабаин и трипсин. Концентрация кардиотонических стероидов при преинкубации $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы с уабаином, дигоксином и маринобуфагенином 4-6 1 мМ, на дорожке 7 10 мМ.

3.8. Моделирование участка связывания с уабаином, дигоксином и маринобуфагенином $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединиц Na,K-АТРазы в конформации E2-P

Структура центра связывания уабаина и дигоксина с $\alpha 1$ -изоформой Na,K-АТРазы из почек свиньи в конформации E2-P была получена с помощью рентгеноструктурного анализа. Для этой конформации характерна наиболее высокая аффинность КТС к ферменту [13,125]. Известно, что с $\alpha 1$ -субъединицей Na,K-АТРазы (PDB код 4НУТ) уабаин образует пять водородных связей с остатками Gln111 (находится в трансмембранном сегменте M1), Glu117, Asn122 (оба аминокислотных остатка расположены в трансмембранном сегменте M2), Glu312 (M4), Thr797 (M6, это связь стабилизируется Asp121, расположенном в M2) и девять гидрофобных контактов с остатками Leu125 (M2), Ala323, Ile315, Phe316, Gly319 (все четыре аминокислотных остатка расположены в M4), Phe783, Phe786 (оба аминокислотных остатка расположены в M5), Leu793 (петля между M5 и M6), Ile800 (M6). Остаток сахара уабаина находится в полости, которая формируется полярными остатками Glu116 (петля между M1 и M2), Glu312 (M4), Arg880 и Arg884 (оба в петле между M7 и M8) (рис. 47) [128].

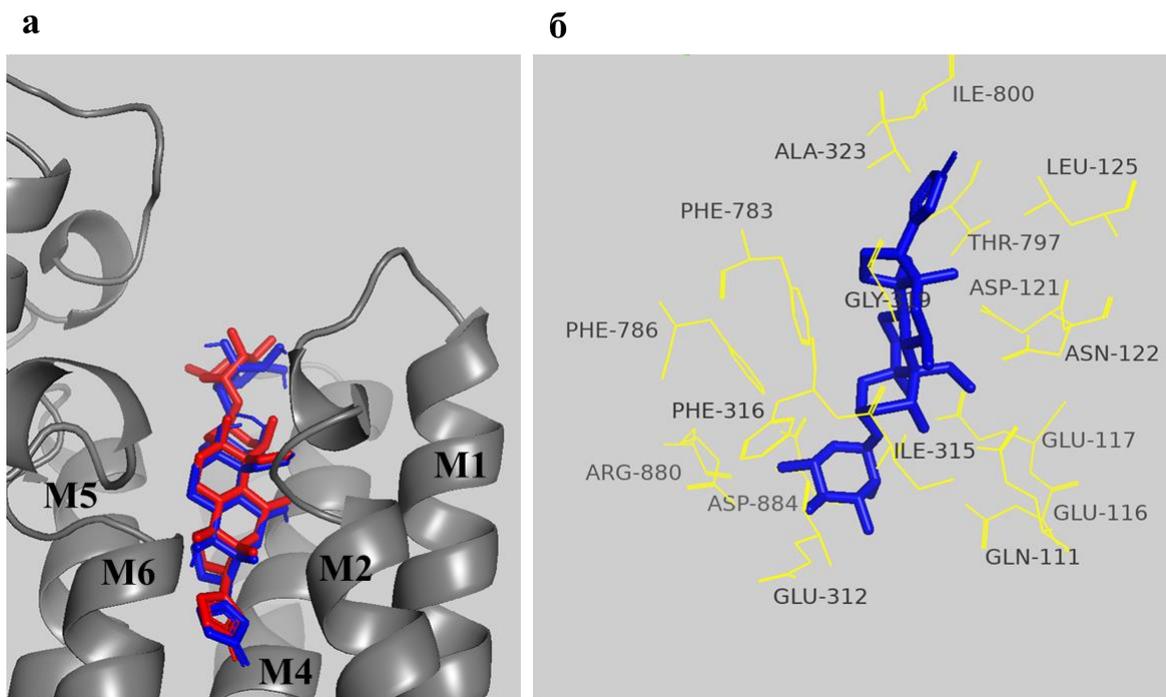


Рис. 47. Моделирование участка $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы, связанного с молекулой убаина. **(а)** Суперпозиция молекулы убаина в связывающем центре $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы. Результат докинга (синий), положение убаина в pdb файле (4HYT) (красный). **(б)** Аминокислотные остатки, участвующие в связывании убаина.

Дигоксин формирует с $\alpha 1$ -изоформой Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E2-P (PDB код 4RET) не пять, а четыре водородные связи с Asn122 (M2), Glu312 (M4), Thr797 (M6), это связь стабилизируется Asp121 (M2), Arg880 (петля между M7 и M8), а также девять гидрофобных контактов с теми же аминокислотными остатками, что и в случае убаина (рис. 48) [13]. С Gln111 водородная связь не образуется.

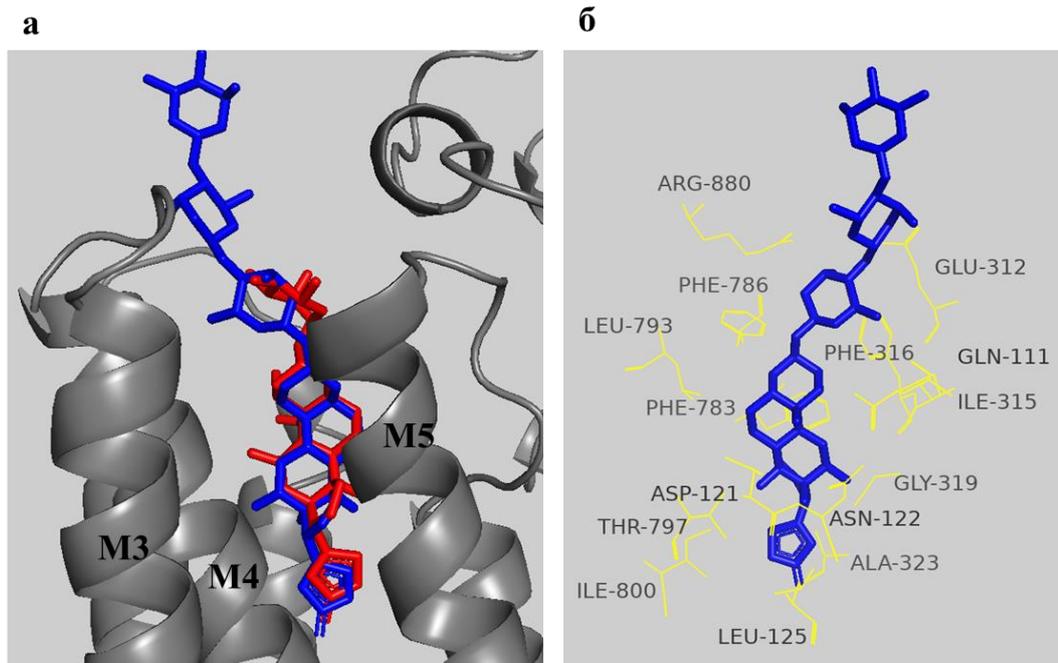


Рис. 48. Моделирование участка $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы, связанного с молекулой дигоксина. **(а)** Суперпозиция молекулы дигоксина (синий) и убаина (красный) в $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы. Показано положение убаина в pdb файле (4НУТ). **(б)** Аминокислотные остатки, участвующие в связывании дигоксина.

3.8.1. Моделирование участка связывания $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы с маринобуфагенином

Структура центра связывания $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы для маринобуфагенина неизвестна, поскольку не проводился рентгеноструктурный анализ комплекса $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы-маринобуфагенин. Однако методом ИКТ установлено, что убаин и маринобуфагенин конкурируют за один участок связывания в Na,K-АТФазе из солевых желез утки [168]. В этой связи, был проведен докинг маринобуфагенина в структуру $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы из почек свиньи в конформации E2-P. В структуре 4НУТ были выбраны все атомы на расстоянии 4,5 Å вокруг молекулы убаина, после чего убаин был удален и отобранные атомы были локально минимизированы в силовом поле MMFF94x. Затем проводили докинг дигоксина и маринобуфагенина в участок связывания КТС. Минимизация энергии комплекса убаин- $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы (4НУТ) не приводила к изменению положения молекулы кардиотонического стероида в центре связывания (рис. 47). Кроме того, положение дигоксина в $\alpha 1S$ не изменялось в сравнении с положением в структуре 4RET. Докинг маринобуфагенина показал, что стероидное ядро данного КТС располагается на ~3,9 Å ближе к внеклеточной части участка связывания по сравнению с убаином и дигоксином, что согласуется с данными моделирования других авторов [168]. 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 (оба аминокислотных остатка расположены M5) (рис. 49).

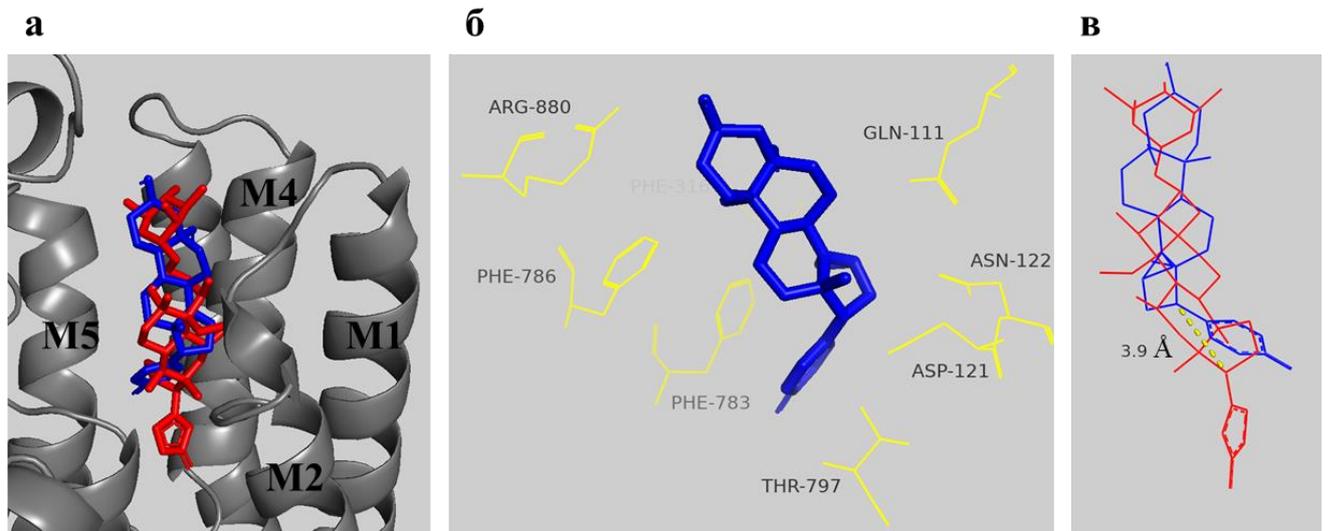


Рис. 49. Моделирование участка $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза, связанного с молекулой маринобуфагенина. **(а)** Суперпозиция молекулы маринобуфагенина (синий) и убаина (красный) в $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза. Показано положение убаина в pdb файле (4НУТ). **(б)** Аминокислотные остатки, участвующие в связывании маринобуфагенина. **(в)** Расстояние между С17-атомами убаина (красный) и маринобуфагенина (синий) составляет 3,9 Å.

При замене убаина на маринобуфагенин наблюдается перераспределение гидрофобных связей и электростатических контактов с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза (таблица 11), что может вызывать изменение положения трансмембранных сегментов, участвующих в образовании центра связывания для КТС. Так, например, М5 взаимодействует с нуклеотид-связывающим доменом. Изменение расположение данного трансмембранного сегмента может передавать сигнал в цитозольную часть Na,K-АТРаза, а именно в область его активного центра.

Конформационные переходы $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза, происходящие при связывании маринобуфагенина отличаются от тех, что вызывает убаин. В результате уменьшается энергия связывания комплекса фермент-КТС (таблица 11). По-видимому, этим и объясняется тот факт, что константа диссоциации для $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза из почек свиньи в конформации E2-P к убаину в 40 раз выше, чем к маринобуфагенину (по данным изотермической калориметрии титрования, подробнее в разделе 3.6.). Кроме того, в отличие от маринобуфагенина убаин является ингибитором с высоким сродством $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза в E2-P-конформации (подробнее в разделе 3.5.1.).

Ранее на Na,K-АТРаза из солевых желез утки (экспрессирует $\alpha 1S$) в конформации E2-P было продемонстрировано, что связывание убаина и маринобуфагенина вызывает различное изменение флуоресценции флуоресцеин-5-изотиоцианата (ФИТЦ) в Na,K-АТРаза, меченой ФИТЦ, и 5-иодацетамидфлуоресцеина в (ИАФ)-меченой Na,K-АТРаза [168]. Стоит отметить, что ФИТЦ связывается с остатком Lys501, который находится рядом с АТФ-связывающим центром, а 5-ИАФ с остатком Cys457, находящемся в нуклеотид-связывающем домене. Разное

изменение флуоресценции при добавлении убаина и маринобуфагенина может быть следствием того, что при их связывании происходят различные структурные изменения в молекуле фермента, что приводит к изменению конформации цитозольной части белка и, как следствие, набора белков, взаимодействующих с Na,K-АТФазой.

3.8.2. Моделирование участка связывания $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы с убаином, дигоксином и маринобуфагенином

В настоящее время нет данных рентгеноструктурного анализа центров связывания $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы для убаина, дигоксина и маринобуфагенина. Поэтому на следующем этапе в структуре 4НУТ аминокислотные остатки Gln111 (M1) и Asn122 (M2) были заменены на Arg111 и Asp122 соответственно. Затем были удалены все атомы на расстоянии 4,5 Å вокруг молекулы убаина, после чего убаин был также удален и отобранные атомы были локально минимизированы в силовом поле MMFF94x. После всех этих процедур мы проводили докинг убаина, дигоксина и маринобуфагенина в созданную структуру $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы.

Как видно из рисунка 50, стероидное ядро убаина встраивается внутри $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы на ~6,9 Å ближе к выходу из полости участка связывания в сравнении с $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы. В связывании принимает участие пять аминокислотных остатков.

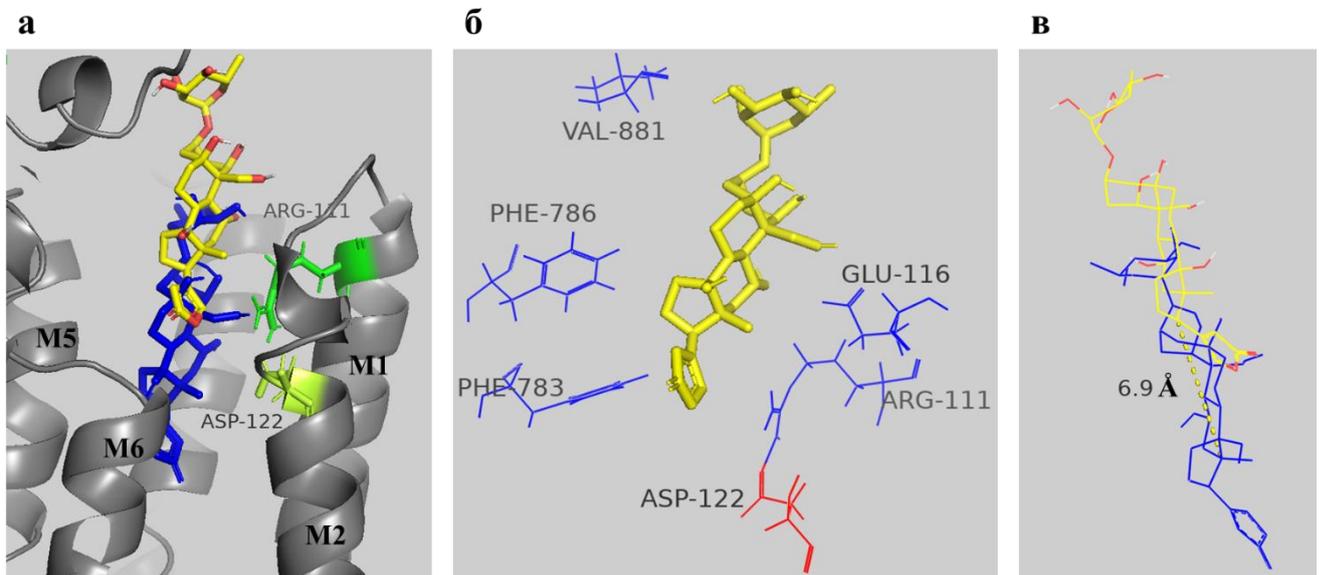


Рис. 50. Моделирование участка $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы, связанного с молекулой убаина. **(а)** Сравнение суперпозиции молекулы убаина в $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы (синий цвет) и в $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы (жёлтый цвет). **(б)** Аминокислотные остатки, участвующие в связывании убаина с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы. 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.

Предсказанная энергия связывания уменьшается с -11,0 ккал/моль до -7,2 ккал/моль (таблица 11). По-видимому, замена Gln и Asn на Arg и Asp соответственно в $\alpha 1R$ -субъединице фермента приводит к образованию солевого мостика между карбоксильной группой радикала аспартата и гуанидиновой группой радикала аргинина. Это приводит к сужению полости для связывания КТС. В результате снижается аффинность фермента к КТС. Так, например, IC_{50} для $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы для убаина составляет 2 мкМ и 140 мкМ соответственно (подробнее в разделе 3.4.). Кроме того, убаин действует на $\alpha 1S$ -Na,K-АТРАЗу в конформации E2-P, как ингибитор с очень высоким сродством (псевдонеобратимое ингибирование), а с $\alpha 1R$ связывается полностью обратимо.

Таблица 11. Аминокислотные остатки $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы, вовлеченные в связывание убаина, дигоксина и маринобуфагенина

КТС Модель	Убаин		Дигоксин		Маринобуфагенин	
	$\alpha 1S$	$\alpha 1R$	$\alpha 1S$	$\alpha 1R$	$\alpha 1S$	$\alpha 1R$
Предсказанная энергия связывания, ккал/моль	-11,0	-7,2	-12,0	-10,3	-9,0	-8,0
Аминокислотные остатки	Gln 111	Arg 111	Asp 121	Arg 111	Gln 111	Arg 111
	Glu 116	Glu 116	Asn 122	Glu 117	Asp 121	Glu 116
	Glu 117	Phe 783	Leu 125	Leu 311	Asn 122	Glu 117
	Asp 121	Phe 786	Glu 312	Ile 315	Phe 316	Glu 312
	Asn 122	Val 881	Ile 315	Phe 783	Phe 783	Ile 315
	Leu 125		Phe 316	Leu 793	Phe 786	Phe 783
	Glu 312		Gly 319	Arg 972	Thr 797	Phe 786
	Ile 315		Ala 323		Arg 880	Leu 793
	Phe 316		Phe 783			Asp 884
	Gly 319		Phe 786			Ile 909
	Ala 323		Leu 793			
	Phe 783		Thr 797			
	Phe 786		Ile 800			
	Leu 793		Arg 880			
	Thr 797					
	Ile 800					
	Arg 880					
Asp 884						

$\alpha 1S$ - $\alpha 1$ -чувствительная к действию КТС изоформа Na,K-АТРазы из почек свиньи;

$\alpha 1R$ - $\alpha 1$ -резистентная к действию КТС изоформа Na,K-АТРазы из почек крысы.

По результатам докинга, как и в случае убаина, центры связывания для дигоксина в $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы различаются (рис. 51). Дигоксин встраивается внутрь $\alpha 1R$ - субъединицы не так глубоко. В связывании участвуют семь аминокислот, причём три аминокислотных остатка Arg111, Glu117 и Arg972 участвуют в связывании дигоксина только с резистентной изоформой

фермента. Предсказанная энергия связывания данного гликозида меньше в случае $\alpha 1R$, чем $\alpha 1S$ (таблица 11). Как было показано ранее, дигоксин действует по-разному на фермент из почек свиньи и крысы: он обратимо ингибирует $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазу и выступает в качестве ингибитора с высоким сродством (псевдонеобратимое ингибирование) для $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы (подробнее в разделе 3.6.).

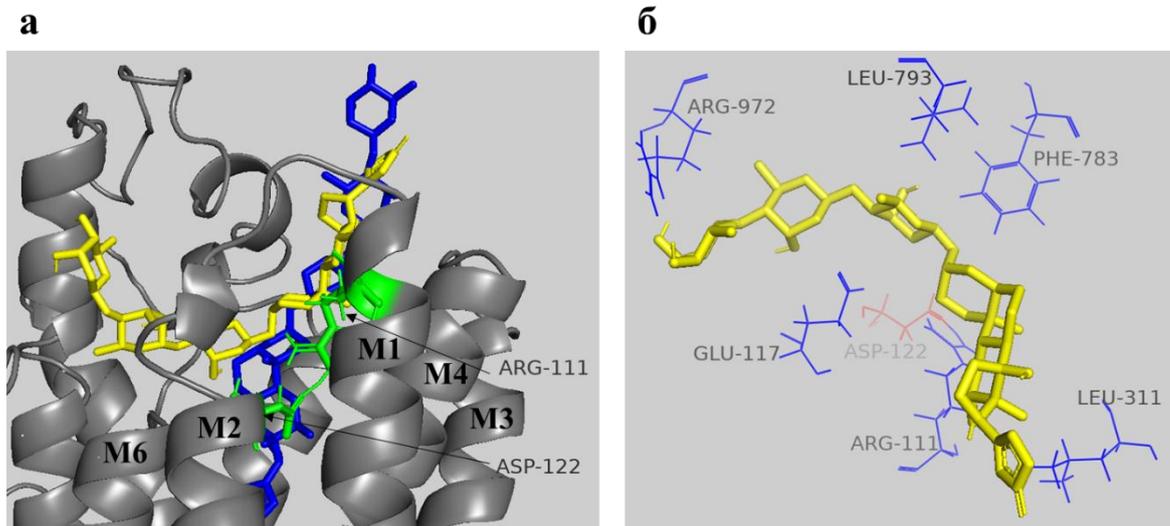


Рис. 51. Моделирование участка $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы, связанного с молекулой дигоксина. **(а)** Сравнение суперпозиции молекулы дигоксина в $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы (синий цвет) и в $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы (жёлтый цвет). **(б)** Аминокислотные остатки, участвующие в связывании дигоксина с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы. Остаток аспарагиновой кислоты 122 не принимает участие в связывании убаина (красный), а является одним из маркеров $\alpha 1R$ -субъединицы.

Энергия связывания для маринобуфагенина характеризуется наименьшими значениями в сравнении с убаином и дигоксином как для чувствительной к действию КТС Na,K-АТФазы, так и резистентной изоформы (таблица 11). Маринобуфагенин по-разному встраивается в $\alpha 1$ -субъединицу фермента (рис. 52), а в связывании принимают участие десять аминокислотных остатков (таблица 11). Видимо, с этим связан тот факт, что это ингибитор обратимо связывается как с $\alpha 1S$ -, так и с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы в конформации E2-P (подробнее в разделе 3.6.). Кроме того, полученные данные подтверждают отсутствие ингибирования маринобуфагенином $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы в концентрации до 500 мкМ.

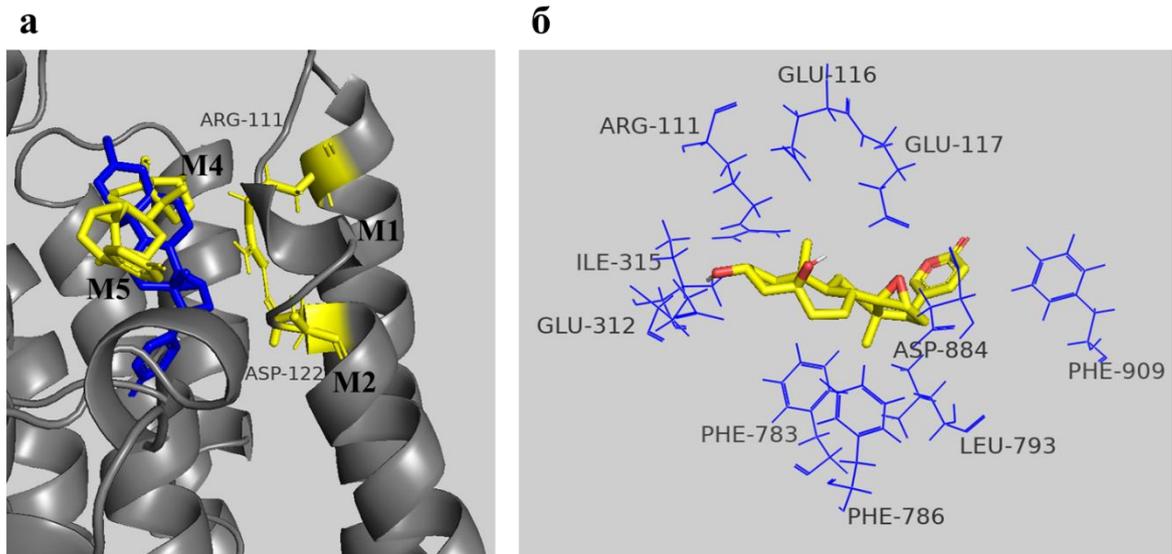


Рис. 52. Моделирование участка $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы, связанного с молекулой маринобуфагенина. **(а)** Сравнение суперпозиции молекулы маринобуфагенина в $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы (синий цвет) и в $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы (жёлтый цвет). **(б)** Аминокислотные остатки, участвующие в связывании маринобуфагенина с $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы.

В настоящее время известно, что с Na,K-АТФазой могут связываться большое количество белков-партнеров. Стоит отметить, что для некоторых из белков связывание может регулироваться убаином [256]. Кроме того, взаимодействие фермента с КТС может вызывать изменение чувствительности Na,K-АТФазы к белкам (например, РКС, ВАХ, Vcl-2), которые влияют на активность фермента и его присутствие в плазматической мембране [257].

Некоторые белки-партнеры (например, P13-киназа, анкирин, кавеолин и Vcl-2) не могут связываться с Na,K-АТФазой одновременно, поскольку имеют перекрывающиеся участки связывания в цитозольной части фермента (рядом с актуаторным доменом) [257–260]. Кроме того, в ходе своего каталитического цикла при изменении конформации фермента актуаторный домен α -субъединицы меняет свое положение в пространстве [17].

Возможно, связывание белков-партнеров с актуаторным доменом происходит только в результате ингибирования ферментативной активности под действием КТС и изменения конформации Na,K-АТФазы, что увеличивает доступ некоторых белков к их сайту связывания, находящемуся на цитозольной части α -субъединицы Na,K-АТФазы.

Связывание убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы стабилизирует различные конформационные состояния фермента. Видимо именно по этой причине с комплексом этих двух изоформ с КТС будут взаимодействовать разные белки-партнеры, что может приводить к инициации различных сигнальных каскадов. Возможно, запуск таких сигнальных каскадов может вызывать различные физиологические ответы в клетке, в том числе влиять на жизнеспособность клеток.

3.9. Действие убаина и среды без калия на интермедиаты сигнальных каскадов, опосредованных MAPK в клетках эндотелия человека и крысы

Итак, приведенные выше результаты показывают, что отсутствие или наличие цитотоксического действия убаина на клетки вызвано особенностями функционирования $\alpha 1R$ - и $\alpha 1S$ -субъединиц Na,K-АТФазы как рецептора КТС. В этой связи в следующей части работы мы сопоставили сигналы, генерируемые $\alpha 1R$ - и $\alpha 1S$ -субъединицами Na,K-АТФазы при взаимодействии с убаином и в бескалиевой среде. В обоих случаях происходит ингибирование Na,K-АТФазы, но в среде без калия нет эффектов, опосредованных изменением конформации этого фермента при связывании убаина и индукцией соответствующих сигнальных каскадов.

У эукариот существует множество сигнальных каскадов, которые позволяют в ответ на внеклеточные воздействия регулировать функции клетки. Информацию о генах, запускающих смерть клеток, были взяты из библиотек KEGG PATHWAY (<http://www.genome.jp>) и <http://www.genecards.org/>. Кроме того, для анализа сигнальных каскадов использовали программу iPawthayGuide (<http://www.advaitabio.com/>).

На основании анализа данных, полученных в этих экспериментах, а также опираясь на данные литературы (подробнее см. ниже), мы разработали модель действия КТС на интермедиаты сигнальных каскадов, влияющих на жизнеспособность клеток (рис. 53).

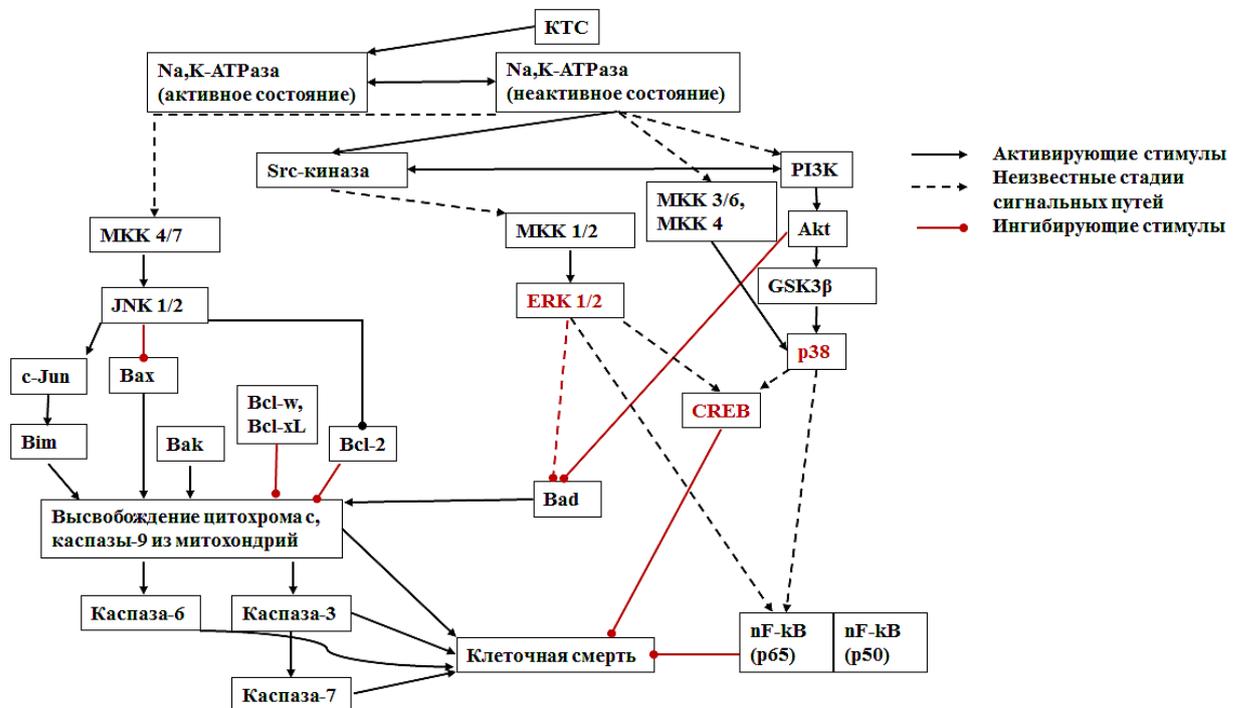


Рис. 53. Модель действия КТС на интермедиаты сигнальных каскадов, влияющих на жизнеспособность разных типов клеток.

Мы предприняли попытку проверить предложенную модель, исследуя изменения содержания некоторых интермедиатов сигнальных каскадов, обусловленные действием убаина и среды без калия.

3.9.1. Митоген-активируемые протеинкиназы

Митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) – белковые Ser/Thr киназы, которые в ответ на внеклеточные стимулы вызывают различные физиологические ответы клетки, такие, например, как: экспрессия генов, начало митоза, рост клеток, их дифференциация, изменение метаболизма, подвижности, жизнеспособности клеток, апоптоз.

Для большинства МАРК сигнальных каскадов характерна следующая схема передачи сигнала, которая состоит из МАРК, киназы МАРК (МАРКК), киназы МАРКК (МАРККК). МАРККК – это Ser/Thr киназа, которая часто активируется путем фосфорилирования или связывания малых ГТФ-связывающих белков (Ras/Rho). Активация МАРККК приводит к фосфорилированию и соответственно активации МАРКК, которая в свою очередь активирует МАРК (рис. 54), фосфорилируя последнюю по остаткам треонина и тирозина в активационной петле, где расположена консервативная последовательность треонин-х-тирозин. Необходимо отметить, что все МАРК фосфорилируют свои субстраты по остаткам серина и треонина, которые находятся после остатка пролина. МАРК могут быть активированы как в цитоплазме, так и в ядре клетки. От этого зависит, какие белки или транскрипционные факторы будут фосфорилированы.

Обычно к митоген-активируемым протеинкиназам относят ERK $\frac{1}{2}$ (extracellular signal-regulated kinases 1/2) или p44/42, JNK $\frac{1}{2}$ (c-Jun amino (N)-terminal kinases $\frac{1}{2}$), 4 изоформы p38 (α , β , γ , δ), ERK 5 (рис. 54). Однако существуют нетипичные МАРК: ERK $\frac{3}{4}$, ERK 7, NLK (Nemo-like kinase). Их функции в настоящее время недостаточно изучены.



Рис. 54. Схема передачи MAPK сигнальных каскадов. Сигнал от рецептора активирует MAPKKK (MAP3K) → MAPKK (MAP2K) → MAPK, что вызывает клеточный ответ [261].

Активация ERK $\frac{1}{2}$ путем фосфорилирования играет огромную роль в развитии смерти или дифференциации клеток. В тоже время фосфорилирование p38 и JNK $\frac{1}{2}$ MAPK вызывает клеточную смерть. Так, ранее было показано, что вызванное воздействием на клетку убаина фосфорилирование p38 MAPK индуцирует смерть клеток линии MDCK. В бескальевой среде, когда ингибируется Na,K-АТРаза, эти клетки эпителия почек собаки не погибают, и при этом не происходит и фосфорилирования этой киназы. Исходя из этого, мы решили изучить эффект 6 ч инкубации клеток в присутствии убаина и в среде без калия на содержание и фосфорилирование MAPK в HUVEC и RAEC, а также на изменение экспрессии генов MAPK. Для учета изменения содержания общего белка в клетках мы контролировали влияние убаина на концентрацию ГАФД (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) (рис. 55).

Исследуя действие убаина и среды без калия (инкубация в течение 6 ч), мы обнаружили, что в клетках эндотелия человека и крысы не происходит значительных изменений в содержании p38 и JNK $\frac{1}{2}$, а также в фосфорилировании JNK $\frac{1}{2}$ MAPK. Однако в RAEC при действии убаина и в среде без калия происходит увеличение количества фосфорилированной формы ERK1 и ERK2 в ~2,5 и ~4 раза соответственно. В то же время в HUVEC наблюдается увеличение в ~2 раза количества фосфорилированной формы p38 MAPK как при действии убаина, так и в среде без калия (рис. 55).

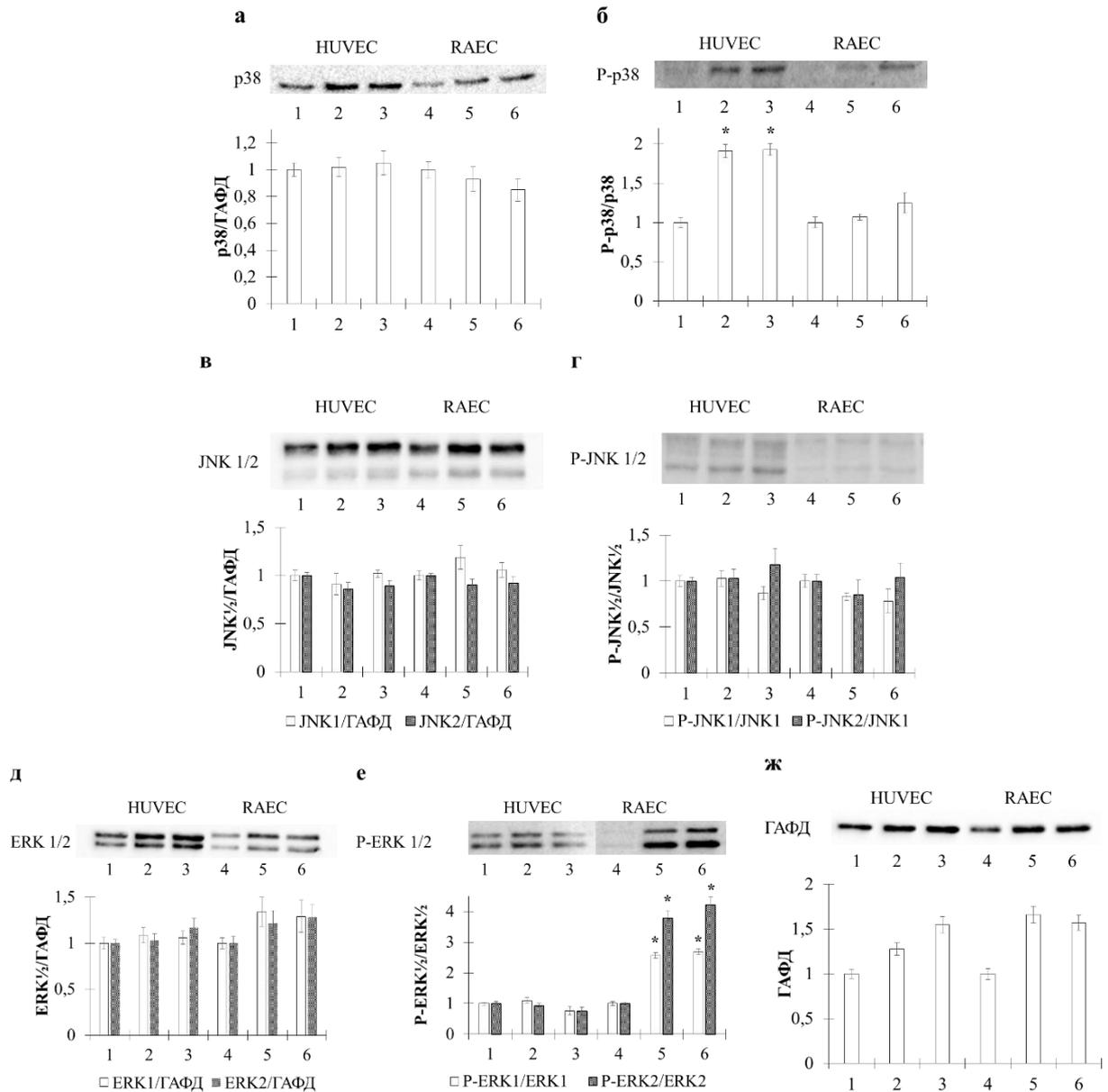


Рис. 55. Влияние убаина и среды без калия (6 ч инкубации) на содержание общей p38 MAPK (**а**) и фосфорилированной p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (**б**), общей JNK ½ MAPK (**в**) и фосфорилированной JNK ½ MAPK (Thr183/Tyr185) (**г**), общей ERK ½ MAPK (**д**) и фосфорилированной ERK ½ MAPK (Thr202/Tyr204) (**е**), ГАФД (**ж**) в клетках HUVEC (1-3) и RAEC (4-6). Анализ проведен с помощью иммуноблоттинга. 1,4 – контроль; 2 – убаин (3 мкМ); 3,6 – среда без калия; 5 – убаин (3 мМ). На гистограммах указано отношение интенсивности окрашивания полос к контрольным пробам (1,4), базовый уровень взят за единицу. Общее содержание MAPK нормировали по отношению к ГАФД. Фосфорилированную форму MAPK нормировали по отношению к общей MAPK. Показаны среднееарифметические значения в 3-х независимых измерениях и стандартные отклонения. * - $p < 0,01$ по сравнению с контрольными пробам.

В последующих экспериментах мы решили выяснить, как КТС и среда без калия влияют на содержание некоторых киназ MAPK (МАРКК), а также на их фосфорилирование. К МАРКК относятся: МКК 1/2, активирующие ERK ½ МАРК, МКК 3/6 и МКК4, активирующие p38

МАРК, МКК4/7, активирующие JNK $\frac{1}{2}$ МАРК. Мы исследовали влияние убаина и среды без калия (6 ч инкубации) на содержание и фосфорилирование МКК3, МКК6 и МКК4. В случае МКК4 после проведения иммуноблоттинга мы не увидели на нитроцеллюлозной мембране полос, соответствующих как общей форме белка, так и ее фосфорилированной по остатку Ser80 формы (данные не представлены). Отрицательные результаты были также получены при исследовании содержания фосфорилированной формы МКК3 (Ser189)/ МКК6 (Ser207) (данные не представлены). Это может быть связано невозможностью детектировать МКК4, фосфорилированную форму МКК4, МКК3/МКК6 в HUVEC и RAEC. Поскольку антитела, использованные в этих экспериментах, позволили изучить дозовую зависимость действия убаина на клетки эндотелия человека (данные готовятся к публикации), можно думать, что если МКК4 в этих клетках присутствует, то в концентрациях, которые не позволяют определить их с использованием этих антител.

МКК3 не детектируется в HUVEC, а в RAEC наблюдается незначительное изменение её количества под действием убаина и среды без калия. В тоже время, МКК6 отсутствует в RAEC, а в HUVEC также происходит небольшое изменение в ее содержании под действием этих же стимулов (рис. 56).

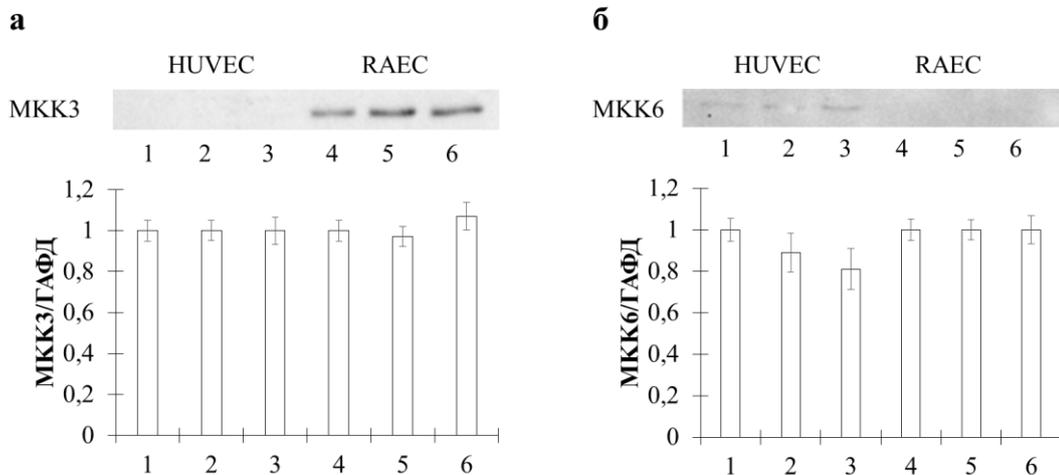


Рис. 56. Влияние убаина и среды без калия (6 ч инкубация) на содержание МКК3 (**а**) и МКК6 (**б**) в клетках HUVEC (1-3) и RAEC (4-6). Анализ проведен с помощью иммуноблоттинга. 1,4 – контроль; 2 – убаин (3 мкМ); 3,6 – среда без калия; 5 – убаин (3 мМ). На гистограммах указано отношение интенсивности окрашивания белковых полос к контрольным пробам (1,4), базовый уровень взят за единицу. Общее содержание МАРКК нормировали по отношению к ГАФД. Показаны среднееарифметические значения в 3-х независимых измерениях и стандартные отклонения.

3.9.2. Тирозиновая протеинкиназа c-Src

Src – нерецепторная тирозиновая протеинкиназа, участвующая в процессах эмбрионального развития и клеточного роста. Семейство Src-киназ представлено 9 представителями: c-Src, c-Tes, Fgr, Yrk, Fyn, Lyn, Hck, Lck и Blk. Активация Src-киназы происходит путем фосфорилирования остатков тирозина в двух центрах. Фосфорилирование Tyr419 в активационной петле киназного домена активирует фермент, фосфорилирование Tyr527 его ингибирует.

Показано, что в кардиомиоцитах и клетках эпителия почек α -субъединица Na,K-АТФазы может взаимодействовать с этой Src-киназой [170,262]. При связывании убаина с Na,K-АТФазой происходит изменение в связывании Src-киназы с α -субъединицей, в результате которого Src-киназа активирует фосфорилирование рецептора эпидермального фактора роста по центрам, отличным от центров аутофосфорилирования, что в свою очередь приводит к активации сигнального каскада с участием MAPK, фосфоинозитол-3-киназы (PI3K), протеинкиназы B, фосфолипазы C, а также к продукции активных форм кислорода и экспрессии ряда генов, включая гены раннего ответа c-Fos и c-Jun, и транскрипционных факторов AP-1 и NF- κ B [204].

Исследуя действие убаина и бескальевой среды, мы показали, что в клетках HUVEC и RAEC не происходит значительных изменений в количестве c-Src (рис. 57). В HUVEC присутствует представитель семейства Src-киназ, отсутствующий в RAEC. При исследовании фосфорилирования c-Src по остатку Tyr419 мы не обнаружили соответствующих полос на нитроцеллюлозной мембране после проведения иммуноблоттинга (данные не представлены). Это может быть связано с малым количеством фосфорилированной формы c-Src в HUVEC и RAEC.

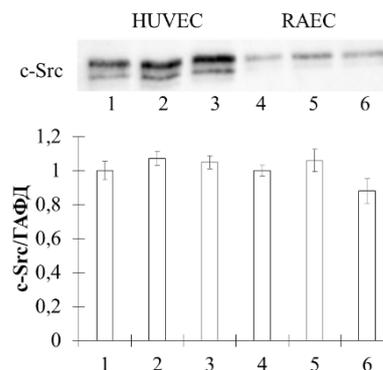


Рис. 57. Влияние убаина и среды без калия (6 ч инкубации) на содержание c-Src в клетках HUVEC (1-3) и RAEC (4-6). Пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга. 1,4 – контроль; 2 – убаин (3 мкМ); 3,6 – среда без калия; 5 – убаин (3 мМ). На гистограмме указано отношение интенсивности окрашивания соответствующих полос к контрольным пробам (1,4), базовый уровень взят за единицу. Общее содержание c-Src нормировали по отношению к ГАФД. Показаны среднееарифметические значения в 3-х независимых измерениях и стандартные отклонения.

3.9.3. PI3K p85 и Akt протеинкиназы

Сигнальные каскады, активируемые фосфоинозитол-3-киназой (PI3K) могут вызывать различные эффекты в клетках: дифференциацию, реорганизацию цитоскелета, везикулярный транспорт, апоптоз. PI3K первого класса представляет собой гетеродимер, состоящий из каталитической (110 кДа) и регуляторной (85 кДа) субъединиц (p85). В настоящее время известно, что p85 может активировать протеинкиназу B (Akt или PKB), фосфорилируя её по остатку Thr308 [263,264]. Кроме того, активация этой протеинкиназы может происходить путем фосфорилирования остатка Ser473. Akt играет ключевую роль в контроле апоптоза [263], поскольку она может инактивировать такие белки, как Bad, каспазу-9, c-Raf [265]. Кроме того, PKB фосфорилирует и тем самым инактивирует киназу-3 α -гликогенсинтетазы (GSK-3 α) по остатку Ser21 или киназу 3 β -гликогенсинтетазы (GSK-3 β) по остатку Ser9. Нефосфорилированный GSK-3 β блокирует димеризацию MEKK4, которая необходима для активации MKK4 и MKK3/6, что приводит к фосфорилированию p38 MAPK [266].

Мы исследовали влияние убаина и среды без калия на содержание PI3K (p85), фосфорилирование PI3K (p85) по остатку тирозина в мотиве Tyr*-X-X-Met, содержание Akt, а также фосфорилирование Akt по остатку Thr308. Значительных изменений в содержании Akt в HUVEC и RAEC, PI3K (p85) в HUVEC мы не обнаружили (рис. 58). Фосфорилированные формы PI3K (p85) и Akt после проведения иммуноблоттинга не были обнаружены (данные не представлены).

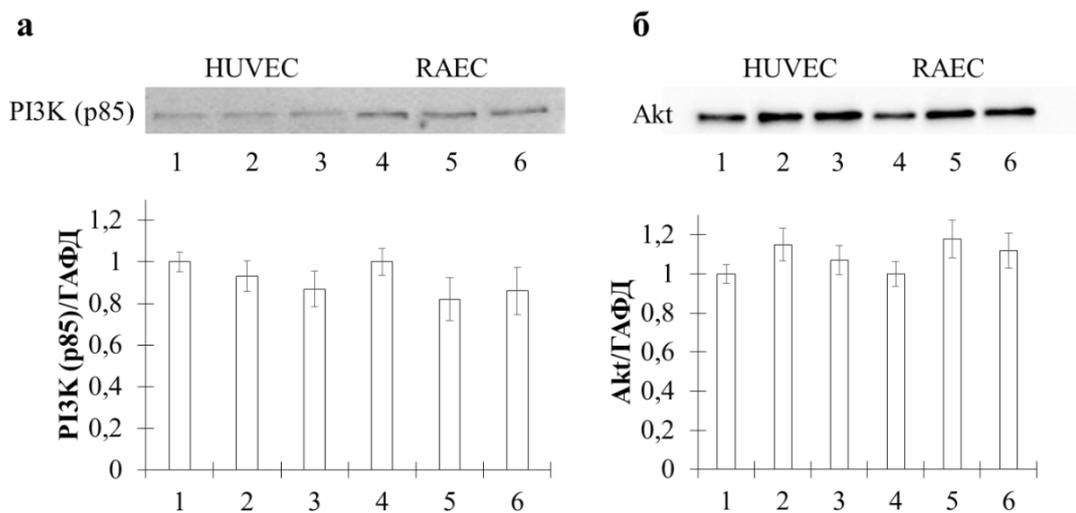


Рис. 58. Влияние с убаина и среды без калия (6 ч инкубации) на содержание PI3K (p85) (**а**) и Akt (**б**) в клетках HUVEC (1-3) и RAEC (4-6). Пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга. 1,4 – контроль; 2 – убаин (3 мкМ); 3,6 – среда без калия; 5 – убаин (3 мМ). На гистограммах указано отношение интенсивности окрашивания соответствующих полос к контрольным пробам (1,4), базовый уровень взят за единицу. Общее содержание PI3K (p85) и Akt нормировали по отношению к ГАФД. Показаны среднееарифметические значения в 3-х независимых измерениях и стандартные отклонения.

3.9.4. Белки семейства Bcl-2

Белки семейства Bcl-2 принимают непосредственное участие в регуляции процесса инициации апоптоза через сигнальные каскады, запускаемые в митохондриях. Они регулируют проницаемость наружной мембраны митохондрий. Все белки этого семейства можно разделить на 2 группы: про- и анти-апоптотические [267]. Соотношение между этими белками регулирует апоптоз.

К про-апоптотическим белкам относятся белки Bax, Bak и Bcl-2. Так, при инициации апоптоза, изменяются конформация и локализация Bax и Bak на внешней мембране митохондрий. Эти белки образуют олигомерные комплексы с другими белками Bax и/или Bak, а также связываются с белками пор наружной мембраны митохондрий, изменяя тем самым проницаемость этой мембраны, что приводит к высвобождению цитохрома c и каспазы-9 [267].

Анти-апоптотические белки включают в себя белки Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL. Белки Bcl-2 и Bcl-xL связываются с Bax и Bad, формируя гетеродимеры. Они могут предотвращать образование олигомеров Bax/Bak и ингибировать формирование пор в мембране митохондрий, что предотвращает изменение проницаемости мембраны. Активность анти-апоптотических белков регулируется в клетке путем их протеолиза. Для Bcl-2 существует другой способ активации – это фосфорилирование по остатку Ser87.

Кроме того, существует группа белков (Bad, Bik, Bid, Puma, Vim, Bmf, Noxa, Hrk), которые при апоптозе могут связываться с про-апоптотическими и анти-апоптотическими белками. Они активируют Bad/Bax и деактивируют Bcl-2, Bcl-xL [267]. В настоящее время известно, что некоторые белки семейства Bcl-2 могут связываться с Na,K-АТФазой [268].

Мы исследовали влияние убаина и бескальевой среды (6 ч инкубации) на содержание Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, а также на фосфорилирование Bcl-2 (рис. 59). В случае Bcl-2 мы не обнаружили соответствующих полос на нитроцеллюлозной мембране после проведения иммуноблоттинга. Это, возможно объясняется либо недостаточной аффинностью, либо плохим качеством антител, поскольку фосфорилированная форма присутствует в HUVEC (рис. 59д). В HUVEC и RAEC не отмечено значительных изменений в содержании всех исследуемых белков семейства Bcl-2. Более того, фосфорилирование Bcl-2 происходит только в клетках эндотелия человека.

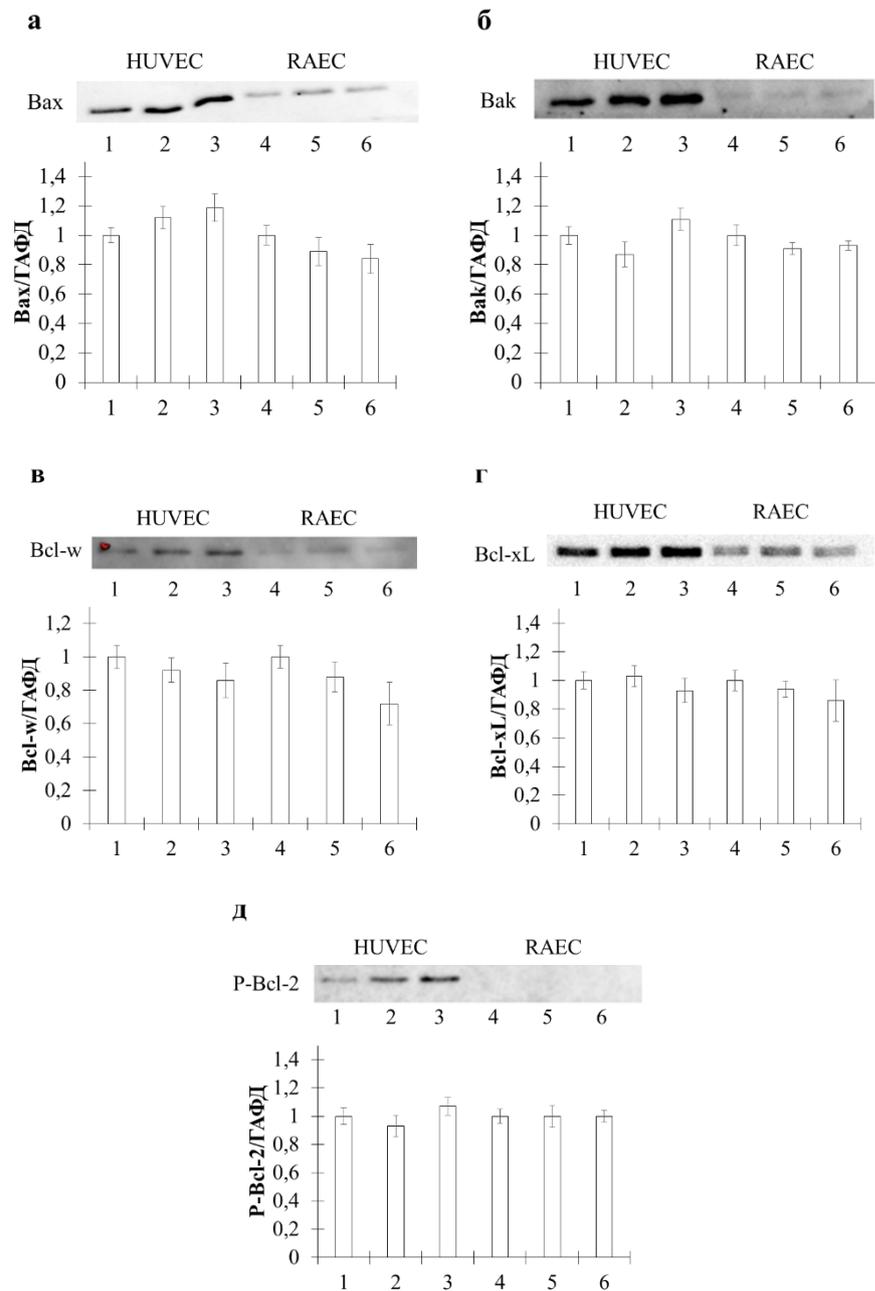


Рис. 59. Влияние убаина и бескальевой среды (6 ч инкубации) на содержание Bax (**а**), Bak (**б**), Bcl-w (**в**), Bcl-xL (**г**) и на фосфорилирование Bcl-2 (Ser87) (**д**) в клетках HUVEC (1-3) и RAEC (4-6). Анализ проведен с помощью иммуноблоттинга. 1,4 – контроль; 2 – убаин (3 мкМ); 3,6 – среда без калия; 5 – убаин (3 мМ). На гистограммах указано отношение интенсивности окрашивания соответствующих полос к контрольным пробам (1,4), базовый уровень взят за единицу. Содержание Bax, Bak, Bcl-w, Bcl-xL и P-Bcl-2 нормировали по отношению к ГАФД. Показаны среднеарифметические значения в 3-х независимых измерениях и стандартные отклонения.

3.9.5. Транскрипционные факторы CREB и NF-κB

CREB (cAMP response element-binding protein) – транскрипционный фактор, который связывается с определенными последовательностями ДНК – CRE (cAMP response element-binding), регулируя транскрипцию разных генов, в том числе генов раннего ответа (в частности,

c-Fos). CREB активируется путем фосфорилирования по остаткам Ser133 протеинкиназой A, протеинкиназой C, кальций-кальмодулинзависимой протеинкиназой (II, IV), митоген- и стресс-активируемой киназой 1 (MSK-1), активируемой митоген-активируемой протеинкиназой киназой-2 (MAPKAP-2). MSK-1 активируется p38 MAPK, а MAPKAP-2 активируются в сигнальном каскаде ERK $\frac{1}{2}$ MAPK.

NF- κ B – фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза, клеточного цикла. Семейство NF- κ B состоит из 5 белков: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB и c-Rel, образующих 15 комбинаций димеров. Фактор NF- κ B проявляет активность только в димерной форме (возможно образование как гетеро-, так и гомодимеров), причём наиболее распространённые формы — димеры субъединиц p50 или p52 с субъединицей p65. Образование такого димера предотвращает клеточную смерть. Активация p65 может запускаться через p38 MAPK и ERK $\frac{1}{2}$ MAPK сигнальные каскады клетки путем фосфорилирования по остатку Ser536 [269].

Мы исследовали влияние убаина и бескальевой среды (6 ч инкубации) на фосфорилирование CREB (по Ser133) и NF- κ B (по Ser36). Обнаружено, что убаин и среда без калия незначительно влияют на количество NF- κ B. Однако в RAEC убаин вызывает увеличение содержания фосфорилированной формы CREB примерно в 6 раз, а среда без калия – примерно в 12 раз. В HUVEC как убаин, так и среда без калия вызывают одинаковое увеличение содержания фосфорилированной формы CREB примерно в 2 раза (рис. 60).

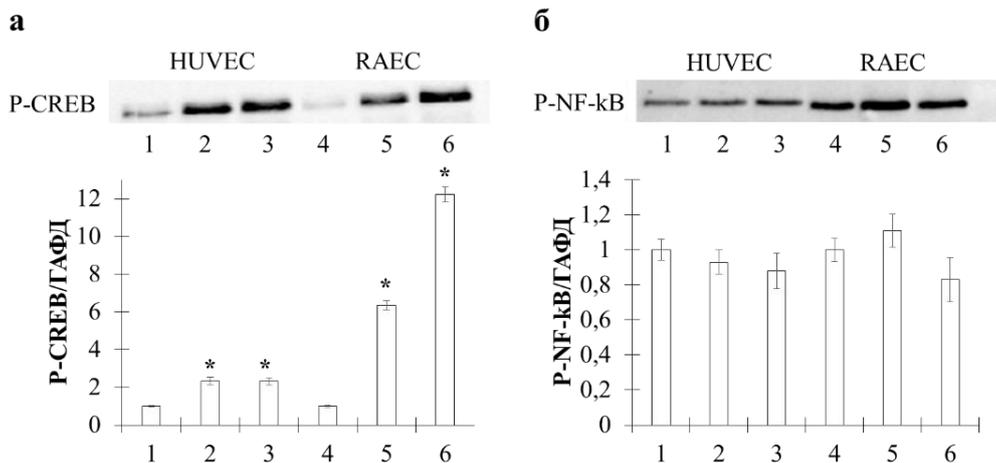


Рис. 60. Влияние убаина и среды без калия на фосфорилирование CREB (Ser133) (**а**) и NF- κ B p65 (Ser536) (**б**) в клетках HUVEC (1-3) и RAEC (4-6). Анализ проведен с помощью иммуноблоттинга. 1,4 – контроль; 2 – убаин (3 мкМ); 3,6 – среда без калия; 5 – убаин (3 мМ). На гистограммах указано отношение интенсивности окрашивания соответствующих полос к контрольным пробам (1,4), базовый уровень взят за единицу. Содержание P-CREB и P-NF- κ B нормировали по отношению к ГАФД. Показаны среднеарифметические значения в 3 независимых измерениях и стандартные отклонения.

3.9.6. Предполагаемая модель

Итак, как в клетках эндотелия человека, так и эндотелия крысы нам не удалось идентифицировать следующие белки: МКК4, фосфо-МКК4 (Ser80), фосфо-МКК3 (Ser189)/-МКК6 (Ser207), фосфо-c-Src (Tyr 419), фосфо-PI3K (p85), фосфо-Akt (Thr308). Кроме того, нам не удалось обнаружить изменений в содержании следующих белков: p38 MAPK, JNK ½ MAPK, фосфо-JNK ½ MAPK, МКК3, МКК6, c-Src, Akt, Bcl-xL, фосфо-nF-kB в HUVEC и RAEC. Фосфорилирование CREB (Ser133) происходило как в HUVEC, так и в RAEC под действием убаина и среды без калия.

Было установлено, что как при действии убаина, так и в бескальевой среде в RAEC активируется ERK½ MAPK сигнальный каскад, что, возможно, связано с выживанием этих клеток. В HUVEC сигнальный каскад p38 MAPK инициируется, по-видимому, как в присутствии убаина, так и в среде без калия и связан, по-видимому, с увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$.

Основываясь на данных, полученных в этой части работы, мы можем сделать вывод о том, что выживание клеток эндотелия крысы в присутствии КТС обусловлено сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии КТС с $\alpha 1R$ -, но не с $\alpha 1S$ -субъединицей Na,K-АТФазы. Гибель клеток, напротив, обусловлена сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии с $\alpha 1S$ -, но не с $\alpha 1R$ -субъединицей Na,K-АТФазы. Механизм вовлечения увеличения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в функционировании этого сигнального каскада остается неизвестным (рис. 61).

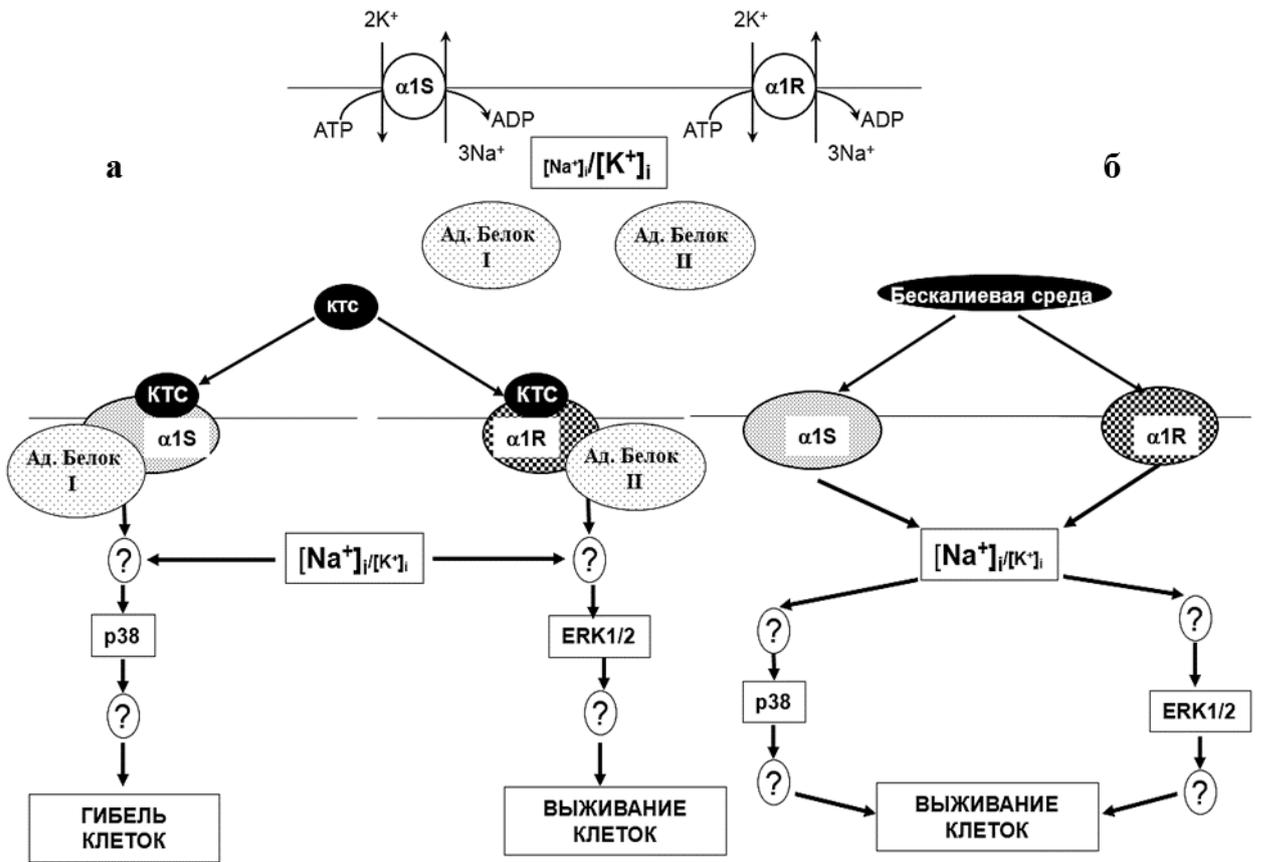


Рис. 61. Гипотетический механизм действия КТС (а) и бескальевой среды (б) на жизнеспособность клеток эндотелия человека и крысы, экспрессирующих $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединицы Na,K-АТФазы. В обоих случаях высокие концентрации КТС и среда без калия увеличивают соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$. Связывание КТС вызывает разные конформационные изменения в $\alpha 1S$ и $\alpha 1R$ субъединицах, в результате чего происходит их взаимодействие с неизвестными адапторными белками I и II. Эти белки инициируют сигнальные каскады, которые, по-видимому, активируют p38 и ERK^{1/2} MAPK и приводят к гибели или выживанию клеток. В бескальевой среде в результате увеличения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ запускаются разные сигнальные каскады, не вызывающие гибели клеток. Ад. белок I и II – неизвестные адапторные белки I и II, ? – неизвестные стадии сигнальных путей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена изучению механизма цитотоксического действия кардиотонических стероидов. Известно, что Na,K-АТРаза выполняет не только функцию насоса, но и при связывании α -субъединицы с КТС в зависимости от типа клеток могут генерироваться различные сигнальные каскады [15,129,204], в том числе влияющие на смерть и пролиферацию клеток [186,211].

В данной работе мы показали, что эндотелиальные клетки из аорты крысы обладают высокой устойчивостью к длительной инкубации с одним из представителей КТС – убаином в концентрации до 3000 мкМ. В тоже время, убаин в концентрации уже 3 мкМ вызывал смерть эндотелиальных клеток из пупочной вены человека. Стоит отметить, что 6-ти часовая инкубация с 3 и 3000 мкМ убаина приводит к примерно одинаковому увеличению соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в HUVEC и RAEC соответственно. Эти данные противоречат гипотезе о том, что цитотоксическое действие КТС обусловлено увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и генерацией исключительно Na^+,K^+ -опосредованных сигналов. В этой связи, было сформулировано 2 альтернативные гипотезы, объясняющие различное влияние убаина на выживание клеток человека и крысы:

1. Гибель клеток эндотелия человека обусловлена сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии убаина с $\alpha 1S$ -, но не с $\alpha 1R$ -субъединицей Na,K-АТРаза, в то время как выживание клеток эндотелия крысы обусловлено сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии убаина с $\alpha 1R$ -, но не с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза.

2. Клетки человека и крысы содержат интермедиаты сигнальных каскадов, приводящих к их гибели или выживаемости в присутствии КТС вне зависимости от экспрессии $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -субъединицы Na,K-АТРаза соответственно.

С целью проверки этих гипотез мы сравнили концентрационную зависимость действия убаина на гладкомышечные клетки сосудов дикого типа мышей, экспрессирующих $\alpha 1R$ -субъединицу Na,K-АТРаза, и генно-модифицированных мышей, экспрессирующих человеческую убаин-чувствительную изоформу $\alpha 1^{S/S}$. В отличие от гладкомышечных клеток дикого типа, где отсутствовало цитотоксическое действие 3000 мкМ убаина, в клетках, выделенных из аорты мышей с $\alpha 1^{S/S}$, выживаемость клеток уменьшалась при тех же концентрациях убаина, при которых происходит смерть клеток человека. Это наблюдение противоречит 2-ой гипотезе.

Мы также показали, что трансфекция $\alpha 1R$ -субъединицы Na,K-АТРаза защищает HUVEC от цитотоксического действия высоких концентраций убаина. Эти данные указывают в пользу

1-ой гипотезы. Однако для ее окончательной проверки необходимо провести эксперименты с трансфекцией $\alpha 1S$ -субъединицы в клетки, экспрессирующие $\alpha 1R$ -субъединицу Na,K-АТФазы.

Основываясь на данных, полученных в этой работе, можно сделать вывод о том, выживание клеток эндотелия крысы в присутствии КТС обусловлено сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии с $\alpha 1R$ -, но не с $\alpha 1S$ -субъединицей Na,K-АТФазы. В то же время смерть клеток обусловлена сигнальным каскадом, который генерируется при взаимодействии с $\alpha 1S$ -, но не с $\alpha 1R$ -субъединицей Na,K-АТФазы. Роль увеличения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ в функционировании этого сигнального каскада остается неизвестной.

В этой связи в следующей части нашей работы мы попробовали установить, одинаково ли действуют КТС на конформационные переходы $\alpha 1S$ - и $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы, которые происходят при их связывании, и исследовать взаимодействие трех КТС (убаина, дигоксина и маринобуфагенина) с ферментом из почек свиньи ($\alpha 1S$ -изоформа) и крысы ($\alpha 1R$ -изоформа) в разных конформациях.

Известно, что $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы свиньи и человека имеют очень близкие кинетические характеристики [244], а гомология аминокислотной последовательности составляет 98%. Мы показали, что убаин, дигоксин и маринобуфагенин характеризуются близкими значениями концентрации, обеспечивающей полумаксимальное ингибирование (IC_{50}) активности $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы (2, 1,2 и 0,8 мкМ соответственно) и имеют схожую кривую ингибирования (коэффициент Хилла = 1), что согласуется с данными литературы [142,168,244]. IC_{50} для ингибирования активности $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазы из почек крысы для убаина и дигоксина равны 140 и 250 мкМ соответственно, кривая зависимость активности фермента от концентрации КТС имеет схожую форму (коэффициент Хилла 1). Удивительно, но маринобуфагенин в концентрации до 500 мкМ не оказывал ингибирующего действия на $\alpha 1R$ -Na,K-АТФазу.

Известно, что в ходе своего каталитического цикла Na,K-АТФаза претерпевает последовательную смену двух основных конформационных состояний (E1 и E2), которые обладают различной чувствительностью к КТС [64,125,142,168,270]. Мы изучили тип ингибирования (обратимый или необратимый ингибитор) Na,K-АТФазы из почек свиньи и крысы при связывании с убаином, дигоксином и маринобуфагенином в конформации E2-P и E1. В конформации E2-P убаин и дигоксин действуют на $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы, как ингибиторы с высоким сродством (псевдонеобратимое ингибирование), причём фермент имеет 2 центра связывания с положительным кооперативным взаимодействием между ними. Можно полагать, что в этом случае происходит взаимодействие между КТС-связывающими центрами двух α -субъединиц фермента, входящих в олигомер ($\alpha\beta$)₂. При этом сродство для убаина выше, чем для дигоксина. Маринобуфагенин связывается с E2-P-конформацией фермента из почек свиньи обратимо. Преинкубация $\alpha 1S$ -Na,K-АТФазы в E1-конформации с убаином также приводит к

необратимому ингибированию фермента с аффинностью, которая намного меньше аффинности в конформации E2-P. Значение I_{50} в этом случае составляет 20 мкМ. Преинкубация Na,K-АТРазы из почек свиньи в конформации E1 с дигоксином и маринобуфагенином не влияет на её гидролитическую активность. Эти два КТС либо не связываются, либо связываются с конформацией E1 фермента обратимо.

Преинкубация всех исследуемых КТС с E2-P и E1-конформацией $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы из почек крысы также не оказывала влияния на активность фермента. Связывание убаина, дигоксина и маринобуфагенина с ферментом из почек крысы либо не происходит, либо является обратимым как в конформации E2-P, так и в конформации E1.

На следующем этапе мы изучали взаимодействие Na,K-АТРазы с КТС с использованием метода изотермической калориметрии титрования. Мы показали, что в E2-P-конформации сродство $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы к убаину в 5 и 40 раз выше, чем сродство к дигоксину и маринобуфагенину соответственно. Связывание убаина, дигоксина и маринобуфагенина с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи – это энтальпийно выгодный процесс. Взаимодействие этих трёх КТС с конформацией E1 фермента из почек свиньи зарегистрировать не удалось. Не удалось также обнаружить связывание $\alpha 1R$ -Na,K-АТРазы из почек крысы с убаином, дигоксином и маринобуфагенином как в конформации E2-P, так и в конформации E1. Это можно объяснить либо отсутствием связывания, либо тем, что связывание характеризуется высокой константой диссоциации (более 10 мкМ).

Для доказательства существования различий в конформации $\alpha 1R$ - и $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы, индуцируемых связыванием трёх КТС: убаина, дигоксина и маринобуфагенина мы проводили анализ продуктов трипсинолиза $\alpha 1$ -субъединицы в E1 и E2-P конформациях фермента. Обработка $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы из почек свиньи трипсином в конформации E1 приводит к появлению фрагментов с молекулярной массой 40, 35, 23 и 19 кДа. В присутствии 1 мМ убаина или дигоксина увеличивается количество фрагмента с молекулярной массой 40 кДа и существенно возрастает количество белка с молекулярной массой 35,5 кДа, который не обнаруживается после связывания с ферментом маринобуфагенина. Это согласуется с другими нашими данными, полученными на клеточной культуре MDCK. Ранее было показано, что маринобуфагенин индуцирует смерть клеток эпителия почек при значительно более низкой концентрации, чем убаин [148]. Возможно, это обусловлено неспособностью маринобуфагенина при связывании с Na,K-АТРАЗой создать конформацию, необходимую для связывания белка-партнера, индуцирующего сигнальный каскад, который обеспечивает смерть клеток.

В конформации E2-P трипсинолиз $\alpha 1S$ -Na,K-АТРазы приводит увеличению количества продуктов протеолиза с молекулярной массой 40 кДа и 35,5 кДа. В этой конформации связывание

фермента с любым из исследуемых КТС вызывает появление дополнительного фрагмента с молекулярной массой 45 кДа. Кроме того, любой из исследованных КТС не изменяет набора и молекулярной массы продуктов протеолиза $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза из почек крысы для конформаций E1 и E2-P.

Наличие различных конформаций рецепторов, создаваемых при связывании определенных лигандов и их агонистов, в настоящее время обсуждается в литературе [271]. Известно, что маринобуфагенин представляет собой, во-первых, агликон (у него отсутствует сахар в 3-м положении стероидного ядра), во-вторых, он является буфадиенолидом, то есть вместо 5-ти членного лактонового кольца в 17-м положении у него находится шестичленное. С какой именно особенностью структуры этого КТС связана его способность создавать отличную от основной конформацию Na,K-АТРаза, будет, по-видимому, предметом дальнейшего нашего исследования.

Мы можем заключить, что в конформации E1 $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза при связывании убаина и дигоксина принимает различные конформации, отличающиеся от конформации при связывании с маринобуфагенином. Кроме того, все три кардиостероида, связываясь с E2-P формой фермента, вызывают одинаковое для всех трех КТС изменение конформации, в отличие от $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза, в которой связывание любого из трех КТС не вызывает видимых изменений конформации.

Полученные методом молекулярного моделирования результаты показывают, что стероидное ядро маринобуфагенина располагается на $\sim 3,9 \text{ \AA}$ ближе к внеклеточной части участка связывания $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза по сравнению с убаином и дигоксином, что согласуется с данными моделирования других авторов [168]. При этом предсказанная энергия связывания уменьшается, что может приводить к менее прочному связыванию комплекса фермент-маринобуфагенин.

Кроме того, с помощью метода молекулярного моделирования мы заменили в структуре $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза (pdb код 4НУТ) Gln111 и Asn122 на Arg111 и Asp122 (экспрессируются в $\alpha 1R$, снижают чувствительность к убаину в 100-1000 раз) соответственно [129]. Данные моделирования свидетельствуют в пользу того, что между карбоксильной группой радикала аспартата и гуанидиновой группой радикала аргинина Arg111 и Asp122 образуется солевой мостик. Это приводит к сужению полости для связывания КТС. В результате убаин встраивается внутрь центра, расположенного на $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза на $\sim 6,9 \text{ \AA}$ ближе к выходу из полости участка связывания в сравнении с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза. В связывании принимает участие лишь пять аминокислотных остатков. Кроме того, дигоксин и маринобуфагенин по-другому связываются с центром связывания КТС $\alpha 1R$ -Na,K-АТРаза, в связывании участвуют иные аминокислотные остатки, а предсказанная энергия связывания в сравнении с $\alpha 1S$ -Na,K-АТРаза уменьшается, что

согласуется с экспериментальными результатами, полученными нами при исследовании связывания КТС и их ингибирующего действия на фермент.

В заключительной части работы мы сопоставили действие убаина и бескалиевой среды, оказывающих одинаковое влияние на соотношение $[Na^+]_i/[K^+]_i$, на активацию сигнальных каскадов в клетках эндотелия человека и крысы. Было показано, что среда без калия не влияет на жизнеспособность HUVEC и RAEC. Стоит отметить, что в клетках эндотелия человека как при действии убаина, так и в бескалиевой среде экспрессия и фосфорилирование исследованных сигнальных белков, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла и смерти клеток, не различается. Хотя мы и обнаружили увеличение количества общей и фосфорилированной формы p38 MAPK в HUVEC, что соответствует полученным ранее данным [145], этот процесс происходит одинаковым образом как в среде без калия, так и в присутствии убаина. Можно сделать вывод, что экспрессия p38 MAPK не является фактором, возникающим за счет изменения конформации Na,K-АТФазы, а есть следствие ее ингибирования. То есть, экспрессия p38 MAPK недостаточное условие для индукции смерти клеток. Таким образом, нам не удалось идентифицировать сигнальный каскад, участвующий только в гибели клеток эндотелия человека.

Изучение механизма цитотоксического действия кардиотонических стероидов - важная и актуальная проблема, поскольку имеет ряд значимых практических перспектив. В самом деле, дигоксин, дигитоксин и некоторые другие КТС широко используются при лечении сердечной недостаточности.

В настоящее время создается и тестируется огромное число новейших препаратов и методик для эффективного лечения различных онкологических заболеваний. Одним из приоритетных направлений является использование кардиотонических стероидов. Так, по данным эпидемиологических наблюдений у пациентов с сердечной недостаточностью, которых лечили, используя КТС, лейкомия, рак молочной железы, простаты и рак легких встречался реже [272–274]. Эти выводы привели к появлению работ по изучению КТС в качестве противораковых препаратов. Так было показано, что использование сердечных гликозидов увеличивает эффективность противоопухолевой терапии [275,276], уменьшает рост некоторых злокачественных образований [277].

На примере экспериментальной модели фиброза легких, вызванного введением в трахею мышей блеомицина (bleomycin-induced fibrosis – BIF), было показано, что КТС вызывают двукратное снижение накопления коллагена [278–280]. Эти данные позволяют предположить, что данные соединения могут быть использованы для лечения идиопатического фиброза легких.

Сравнительно недавно было обнаружено, что дигоксин может подавлять экспрессию и репликацию гена ВИЧ-1, что позволяет рассматривать КТС в качестве потенциальных элементов антиретровирусной терапии [281–285].

Заключая, мы можем сказать, что кроме выяснения фундаментальных механизмов функционирования Na,K-АТФазы и её взаимодействия с КТС, исследование структуры и конформации чувствительных и резистентных изоформ фермента, проведенное в нашей работе, может быть полезным при создании новых лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Убаин в концентрации 3 мкМ приводит к смерти клеток эндотелия человека (HUVEC), 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 HUVEC 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 ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albers R.W. The (Sodium plus Potassium)-Transport ATPase // *The Enzymes of Biological Membranes: Volume 3 Membrane Transport (FIRST EDITION)* / ed. Martonosi A. Boston, MA: Springer US, 1976. P. 283–301.
2. Lingrel J.B. Na, K-ATPase: isoform structure, function, and expression // *J. Bioenerg. Biomembr.* Springer, 1992. Vol. 24, № 3. P. 263–270.
3. Glitsch H.G. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells // *Physiol. Rev. Am Physiological Soc*, 2001. Vol. 81, № 4. P. 1791–1826.
4. Rossier B.C., Geering K., Kraehenbuhl J.P. Regulation of the sodium pump how and why // *Trends Biochem. Sci.* Elsevier, 1987. Vol. 12. P. 483–487.
5. Morth J.P. et al. The structure of the Na⁺, K⁺-ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. The Royal Society*, 2009. Vol. 364, № 1514. P. 217–227.
6. Palmgren M.G., Nissen P. P-Type ATPases // *Annu. Rev. Biophys.* 2011. Vol. 40, № 1. P. 243–266.
7. Baxter-Lowe L.A. et al. Molecular cloning of the Na,K-ATPase α -subunit in developing brine shrimp and sequence comparison with higher organisms // *FEBS Lett.* 1989.
8. Canfield V.A. et al. Molecular cloning and characterization of Na,K-ATPase from *Hydra vulgaris*: implications for enzyme evolution and ouabain sensitivity // *New Biol.* 1992.
9. Pardon R.S., Noël F. Heterogeneity of ouabain binding sites in *Schistosoma mansoni*. First evidence for the presence of two (Na⁺⁺K⁺)-ATPase isoforms in platyhelminths // *Biochem. Pharmacol.* 1994.
10. Blanco G., Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function // *Am. J. Physiol. Physiol. Am Physiological Soc*, 1998. Vol. 275, № 5. P. F633–F650.
11. Xie Z., Askari A. Na/K-ATPase as a signal transducer // *Eur J Biochem.* 2002. Vol. 269, № 10. P. 2434–2439.
12. Forbush III B., Kaplan J.H., Hoffman J.F. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the (sodium-potassium ion)-dependent ATPase // *Biochemistry. ACS Publications*, 1978. Vol. 17, № 17. P. 3667–3676.
13. Laursen M. et al. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺, K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015.
14. Mobasher A. et al. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions // *Bioscience Reports.* 2000. Vol. 20, № 2. P. 51–91.

15. Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O. V. Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets // *Pharmacol. Rev. ASPET*, 2009. Vol. 61, № 1. P. 9–38.
16. Olesen C. et al. Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion // *Science* (80-.). American Association for the Advancement of Science, 2004. Vol. 306, № 5705. P. 2251–2255.
17. Jorgensen P.L., Håkansson K.O., Karlish S.J.D. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions // *Annu. Rev. Physiol. Annual Reviews* 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 2003. Vol. 65, № 1. P. 817–849.
18. Yamaguchi M., Tonomura Y. Simultaneous binding of three Na⁺ and two K⁺ ions to Na⁺, K⁺-dependent ATPase and changes in its affinities for the ions induced by the formation of a phosphorylated intermediate // *J. Biochem. Jpn Biochemical Soc*, 1979. Vol. 86, № 2. P. 509–523.
19. Arystarkhova E., Gibbons D.L., Sweadner K.J. Topology of the Na,K-ATPase: Evidence for externalization of a labile transmembrane structure during heating // *J. Biol. Chem.* 1995.
20. Rajasekaran S.A., Gopal J., Rajasekaran A.K. Expression of Na, K-ATPase β -Subunit in Transformed MDCK Cells Increases the Translation of the Na, K-ATPase α -Subunit // *Ann. N. Y. Acad. Sci. Wiley Online Library*, 2003. Vol. 986, № 1. P. 652–654.
21. Geering K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits // *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2008. Vol. 17, № 5. P. 526–532.
22. Morth J.P. et al. Crystal structure of the sodium--potassium pump // *Nature. Nature Publishing Group*, 2007. Vol. 450, № 7172. P. 1043–1049.
23. Noguchi S., Mutoh Y., Kawamura M. The functional roles of disulfide bonds in the β -subunit of (Na,K)ATPase as studied by site-directed mutagenesis // *FEBS Lett.* 1994.
24. Brotherus J.R., Jacobsen L., Jørgensen P.L. Soluble and enzymatically stable (Na⁺ K⁺)-ATPase from mammalian kidney consisting predominantly of protomer $\alpha\beta$ -units: Preparation, assay and reconstitution of active Na⁺, K⁺ transport // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes. Elsevier*, 1983. Vol. 731, № 2. P. 290–303.
25. Laughery M., Todd M., Kaplan J.H. Oligomerization of the Na,K-ATPase in cell membranes. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 35. P. 36339–36348.
26. Geering K. The functional role of β subunits in oligomeric P-type ATPases // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2001.
27. Geering K. The functional role of the β -subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase // *FEBS Lett.* 1991.
28. Geering K. et al. Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: Functional interaction of the cytoplasmic NH₂ terminus of the β subunit with the α subunit // *J. Cell Biol.* 1996.
29. Vilsen B. et al. Occlusion of ²²Na⁺ and ⁸⁶Rb⁺ in membrane-bound and soluble protomeric alpha

- beta-units of Na,K-ATPase. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262, № 22. P. 10511–10517.
30. Costa C.J., Gatto C., Kaplan J.H. Interactions between Na,K-ATPase α -subunit ATP-binding domains // *J. Biol. Chem.* 2003.
31. Yudowski G.A. et al. Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000.
32. Jørgensen P.L., Pasternak C.A. Structure and molecular mechanisms of the Na, K-pump // *Monovalent Cations Biol. Syst.* 1990. Vol. 1. P. 117–154.
33. Skou J.C., Esmann M. The effects of Na⁺ and K⁺ on the conformational transitions of (Na⁺+K⁺)-ATPase // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* Elsevier, 1983. Vol. 746, № 1. P. 101–113.
34. Clausen M. V., Hilbers F., Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease // *Front. Physiol.* 2017. Vol. 8, № JUN.
35. Shull G.E., Greeb J., Lingrel J.B. Molecular cloning of three distinct forms of the Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit from rat brain. // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25, № 25. P. 8125–8132.
36. Sweadner K.J. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Reviews Biomembr.* Elsevier, 1989. Vol. 988, № 2. P. 185–220.
37. El-Seedi H.R. et al. Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility // *Pharmacological Research.* 2019. Vol. 141. P. 123–175.
38. Lingrel J.B. et al. Cation and Cardiac Glycoside Binding Sites of the Na,K-ATPase // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997. Vol. 834, № 1 Na/K-ATPase a. P. 194–206.
39. Lingrel J.B. et al. Na, K-ATPase and the role of α isoforms in behavior // *J. Bioenerg. Biomembr.* Springer, 2007. Vol. 39, № 5–6. P. 385–389.
40. Urayama O., Sweadner K.J. Ouabain sensitivity of the alpha 3 isozyme of rat Na,K-ATPase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988.
41. Gloor S. et al. The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na, K-ATPase. // *J. Cell Biol. Rockefeller Univ Press,* 1990. Vol. 110, № 1. P. 165–174.
42. Malik N. et al. Identification of the mammalian Na, K-ATPase β 3 subunit // *J. Biol. Chem. ASBMB,* 1996. Vol. 271, № 37. P. 22754–22758.
43. Sweadner K.J., Rael E. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression // *Genomics.* Elsevier, 2000. Vol. 68, № 1. P. 41–56.
44. Arystarkhova E. et al. The gamma subunit modulates Na(+) and K(+) affinity of the renal Na,K-ATPase. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 47. P. 33183–33185.
45. Teriete P. et al. Structure of the Na,K-ATPase regulatory protein FXYD1 in micelles. // *Biochemistry.* 2007. Vol. 46, № 23. P. 6774–6783.

46. Geering K. et al. FXYD Proteins: New Tissue-and Isoform-Specific Regulators of Na, K-ATPase // *Ann. N. Y. Acad. Sci. Wiley Online Library*, 2003. Vol. 986, № 1. P. 388–394.
47. Sweadner K.J. et al. FXYD Proteins as Regulators of the Na, K-ATPase in the Kidney // *Ann. N. Y. Acad. Sci. Wiley Online Library*, 2003. Vol. 986, № 1. P. 382–387.
48. Geering K. et al. FXYD proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na,K-ATPase. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003. Vol. 986. P. 388–394.
49. Bibert S. et al. Phosphorylation of phospholemman (FXYD1) by protein kinases A and C modulates distinct Na,K-ATPase isozymes. // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 1. P. 476–486.
50. Crambert G., Geering K. FXYD proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na,K-ATPase. // *Sci. STKE.* 2003. Vol. 2003, № 166. P. RE1.
51. Mishra N.K. et al. Molecular mechanisms and kinetic effects of FXYD1 and phosphomimetic mutants on purified human Na,K-ATPase // *J. Biol. Chem.* 2015.
52. Arystarkhova E. Beneficial renal and pancreatic phenotypes in a mouse deficient in FXYD2 regulatory subunit of Na,K-ATPase // *Frontiers in Physiology.* 2016.
53. Geering K. Function of FXYD proteins, regulators of Na,K-ATPase // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2005.
54. Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006. Vol. 290, № 2. P. F241-50.
55. Arimochi J., Ohashi-Kobayashi A., Maeda M. Interaction of Mat-8 (FXYD-3) with Na⁺/K⁺-ATPase in Colorectal Cancer Cells // *Biol. Pharm. Bull.* 2007. Vol. 30, № 4. P. 648–654.
56. Nam J.-S., Hirohashi S., Wakefield L.M. Dysadherin: A new player in cancer progression // *Cancer Lett.* 2007. Vol. 255, № 2. P. 161–169.
57. Post R.L., Hegyvary C., Kume S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 1972. Vol. 247, № 20. P. 6530–6540.
58. Kaplan J.H. Biochemistry of na, K-ATPase // *Annu. Rev. Biochem. Annual Reviews* 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 2002. Vol. 71, № 1. P. 511–535.
59. Kanai R. et al. Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1P state // *Nature.* Nature Publishing Group, 2013. Vol. 502, № 7470. P. 201–206.
60. Nyblom M. et al. Crystal structure of Na⁺, K⁺-ATPase in the Na⁺-bound state // *Science (80-)*. 2013.
61. Sweadner K.J. D.C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum // *Biochem. J.* 2001. Vol. 356(Pt 3). P. 685–704.
62. Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: New light on the oldest ion pump // *Structure.* 2011.

63. Giotta G.J. Native (Na⁺ + K⁺) dependent adenosine triphosphatase has two trypsin sensitive sites // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250, № 13. P. 5159–5164.
64. Jorgensen P.L. Transmission of E1-E2 structural changes in response to Na⁺ or K⁺ binding in Na,K-ATPase. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003. Vol. 986. P. 22–30.
65. Jorgensen P.L. Purification and characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. Vol. 401, № 3. P. 399–415.
66. Jørgensen P.L., Collins J.H. Tryptic and chymotryptic cleavage sites in sequence of α -subunit of (Na⁺ + K⁺)-ATPase from outer medulla of mammalian kidney // *BBA - Biomembr.* 1986.
67. Jørgensen P.L., Andersen J.P. Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na, K-pump and Ca-pump proteins // *The Journal of Membrane Biology.* 1988.
68. Castro J., Farley R.A. Proteolytic fragmentation of the catalytic subunit of the sodium and potassium adenosine triphosphatase. Alignment of tryptic and chymotryptic fragments and location of sites labeled with ATP and iodoacetate. // *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 1979. Vol. 254, № 7. P. 2221–2228.
69. Jorgensen P.L. Purification and characterization of (Na⁺ + K⁺)-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. Vol. 466, № 1. P. 97–108.
70. Dergousova E.A. et al. Glutathionylation of Na,K-ATPase Alpha-Subunit Alters Enzyme Conformation and Sensitivity to Trypsinolysis // *Biochem.* 2018. Vol. 83, № 8. P. 969–981.
71. Collins J.H. et al. Tryptic digest of the α subunit of lamb kidney (Na⁺ + K⁺)-ATPase // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1983.
72. Jørgensen P.L., Collins J.H. Tryptic and chymotryptic cleavage sites in sequence of alpha-subunit of (Na⁺ + K⁺)-ATPase from outer medulla of mammalian kidney. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. Vol. 860, № 3. P. 570–576.
73. Mahmmoud Y.A. Stabilization of trypsin by association to plasma membranes: Implications for tryptic cleavage of membrane-bound Na,K-ATPase // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2005.
74. Esmann M., Marsh D. Lipid-protein interactions with the Na,K-ATPase // *Chemistry and Physics of Lipids.* 2006.
75. Лопина О. Взаимодействие каталитической субъединицы Na/K-АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами // *Биохимия.* 2001. Vol. 66, № 10. P. 1389–1400.
76. Therien A.G., Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000. Vol. 279, № 3. P. C541-66.
77. Chibalin A. V et al. Phosphorylation of Na,K-ATPase alpha-subunits in microsomes and in homogenates of *Xenopus* oocytes resulting from the stimulation of protein kinase A and protein kinase

C. // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, № 31. P. 22378–22384.

78. Beguin P. et al. Phosphorylation of the Na,K-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 39. P. 24437–24445.

79. Blanco G., Mercer R.W. Regulation of the alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 isozymes of the Na,K-ATPase by Ca²⁺, PKA, and PKC. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997. Vol. 834. P. 572–575.

80. Cheng X.J. et al. Regulation of rat Na(+)-K(+)-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 273, № 6 Pt 1. P. C1981-6.

81. Blanco G., Sánchez G., Mercer R.W. Differential regulation of Na,K-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. Vol. 359, № 2. P. 139–150.

82. Mahmmoud Y.A., Vorum H., Cornelius F. Identification of a phospholemman-like protein from shark rectal glands. Evidence for indirect regulation of Na,K-ATPase by protein kinase c via a novel member of the FXDY family. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 46. P. 35969–35977.

83. Layne J., Yip S., Crook R.B. Down-regulation of Na-K-Cl cotransport by protein kinase C is mediated by protein phosphatase 1 in pigmented ciliary epithelial cells. // *Exp. Eye Res.* 2001. Vol. 72, № 4. P. 371–379.

84. Gomes P., Soares-da-Silva P. Role of cAMP-PKA-PLC signaling cascade on dopamine-induced PKC-mediated inhibition of renal Na(+)-K(+)-ATPase activity. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2002. Vol. 282, № 6. P. F1084-96.

85. Mahmmoud Y. a, Christensen S.B. Oleic and linoleic acids are active principles in *Nigella sativa* and stabilize an E(2)P conformation of the Na,K-ATPase. Fatty acids differentially regulate cardiac glycoside interaction with the pump. // *Biochim. Biophys. Acta.* Elsevier B.V., 2011. Vol. 1808, № 10. P. 2413–2420.

86. Howie J. et al. Regulation of the cardiac Na(+) pump by palmitoylation of its catalytic and regulatory subunits. // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. Vol. 41, № 1. P. 95–100.

87. Kashgarian M. et al. Na,K-ATPase co-distributes with ankyrin and spectrin in renal tubular epithelial cells. // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1988. Vol. 268B. P. 245–250.

88. Nelson W.J., Hammerton R.W. A membrane-cytoskeletal complex containing Na⁺,K⁺-ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity. // *J. Cell Biol.* 1989. Vol. 108, № 3. P. 893–902.

89. Koob R. et al. Association of kidney and parotid Na⁺, K(+)-ATPase microsomes with actin and analogs of spectrin and ankyrin. // *Eur. J. Cell Biol.* 1990. Vol. 53, № 1. P. 93–100.

90. Nelson W.J., Hammerton R.W., McNeill H. Role of the membrane-cytoskeleton in the spatial organization of the Na,K-ATPase in polarized epithelial cells. // *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 1991. Vol. 46. P. 77–87.

91. Paller M.S. Lateral mobility of Na,K-ATPase and membrane lipids in renal cells. Importance of cytoskeletal integrity. // *J. Membr. Biol.* 1994. Vol. 142, № 1. P. 127–135.
92. Piepenhagen P.A. et al. Differential expression of Na(+)-K(+)-ATPase, ankyrin, fodrin, and E-cadherin along the kidney nephron. // *Am. J. Physiol.* 1995. Vol. 269, № 6 Pt 1. P. C1417-32.
93. Nelson W.J., Veshnock P.J. Ankyrin binding to (Na⁺⁺K⁺)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells // *Nature.* 1987.
94. Morrow J.S. et al. Ankyrin links fodrin to the alpha subunit of Na,K-ATPase in Madin-Darby canine kidney cells and in intact renal tubule cells // *J. Cell Biol.* 1989.
95. Rubtsov A.M., Lopina O.D. Ankyrins // *FEBS Lett.* 2000.
96. Ferrandi M. et al. Evidence for an interaction between adducin and Na(+)-K(+)-ATPase: relation to genetic hypertension. // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 277, № 4 Pt 2. P. H1338-49.
97. Torielli L. et al. alpha-Adducin mutations increase Na/K pump activity in renal cells by affecting constitutive endocytosis: implications for tubular Na reabsorption. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008. Vol. 295, № 2. P. F478-87.
98. Cortes V.F. et al. The γ subunit of Na⁺, K⁺-ATPase: Role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006.
99. Jorgensen P.L. The role of aldosterone in the regulation of (Na + + K +)-ATPase in rat kidney. // *J. Steroid Biochem.* 1972. Vol. 3, № 2. P. 181–191.
100. Verrey F. et al. Regulation by aldosterone of Na⁺,K⁺-ATPase mRNAs, protein synthesis, and sodium transport in cultured kidney cells. // *J. Cell Biol.* 1987. Vol. 104, № 5. P. 1231–1237.
101. Seok J.H. et al. Aldosterone directly induces Na, K-ATPase alpha 1-subunit mRNA in the renal cortex of rat. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999. Vol. 47, № 2. P. 251–254.
102. Musch M.W., Lucioni A., Chang E.B. Aldosterone regulation of intestinal Na absorption involves SGK-mediated changes in NHE3 and Na⁺ pump activity. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008. Vol. 295, № 5. P. G909-19.
103. Salyer S.A. et al. Aldosterone regulates Na(+), K(+) ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1833, № 10. P. 2143–2152.
104. Cai Z., Yan L. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. // *J. Biochem. Pharmacol. Res. Biochem. Pharmacol. Res.* 2013. Vol. 1, № 1. P. 15–26.
105. Petrushanko I.Y. et al. S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic α subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 38. P. 32195–32205.
106. Xianyu M. et al. Glutathionylation of the alpha-subunit of Na,K-ATPase from rat heart by oxidized glutathione inhibits the enzyme. // *Biochem. Biokhimiia.* 2014. Vol. 79, № 2. P. 158–164.
107. Figtree G. a et al. Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na⁺-K⁺ pump

regulation. // *Circ. Res.* 2009. Vol. 105, № 2. P. 185–193.

108. Liu C.-C. et al. Susceptibility of β_1 Na⁺-K⁺ pump subunit to glutathionylation and oxidative inhibition depends on conformational state of pump. // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, № 15. P. 12353–12364.

109. Fuller W. et al. Regulation of the cardiac sodium pump. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2013. Vol. 70, № 8. P. 1357–1380.

110. Dey K. et al. Role of phospholemman and the 70 kDa inhibitor protein in regulating Na⁺/K⁺ ATPase activity in pulmonary artery smooth muscle cells under U46619 stimulation. // *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*, 2013. Vol. 587, № 21. P. 3535–3540.

111. Valente R.C. et al. Mechanisms of ouabain toxicity. // *FASEB J.* 2003. Vol. 17, № 12. P. 1700–1702.

112. Kinne-Saffran E., Kinne R.K.H. Herbal diuretics revisited: From “wise women” to William Withering // *American Journal of Nephrology*. 2002.

113. Kreis W. The Foxgloves (*Digitalis*) Revisited // *Planta Med.* 2017.

114. Agrawal A.A. et al. Toxic cardenolides: Chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions // *New Phytologist*. 2012.

115. Krenn L., Kopp B. Bufadienolides from animal and plant sources // *Phytochemistry*. 1998.

116. Hamlyn J.M. et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991.

117. Kawamura A. et al. On the structure of endogenous ouabain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999.

118. Schneider R. et al. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 2. P. 784–792.

119. Lichtstein D. et al. Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses. // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 216, № 1. P. 261–268.

120. Bagrov A.Y., Fedorova O. V. Effects of two putative endogenous digitalis-like factors, marinobufagenin and ouabain, on the Na⁺, K⁺-pump in human mesenteric arteries // *J. Hypertens. LWW*, 1998. Vol. 16, № 12. P. 1953–1958.

121. Bagrov A.Y. et al. Characterization of a urinary bufodienolide Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction // *Hypertension*. 1998. Vol. 31, № 5. P. 1097–1103.

122. Yoshika M. et al. Novel digitalis-like factor, marinobufotoxin, isolated from cultured Y-1 cells, and its hypertensive effect in rats // *Hypertension*. 2007.

123. Komiyama Y. et al. A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure // *Clin. Biochem.* 2005.

124. Hamlyn J.M., Hamilton B.P., Manunta P. Endogenous ouabain, sodium balance and blood

- pressure: a review and a hypothesis. // *J. Hypertens.* 1996. Vol. 14, № 2. P. 151–167.
125. Laursen M. et al. Crystal structure of the high-affinity Na⁺K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110, № 27. P. 10958–10963.
126. Or E. et al. Solubilization of a complex of tryptic fragments of Na,K-ATPase containing occluded Rb ions and bound ouabain // *Biochemistry.* 1996.
127. Ogawa H. et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺, K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2009. Vol. 106, № 33. P. 13742–13747.
128. Yatime L. et al. Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. // *J. Struct. Biol. Elsevier Inc.*, 2011. Vol. 174, № 2. P. 296–306.
129. Lingrel J.B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na, K-ATPase // *Annu. Rev. Physiol. NIH Public Access*, 2010. Vol. 72. P. 395.
130. Qiu L.Y. et al. Phe783, Thr797, and Asp804 in Transmembrane Hairpin M5-M6 of Na⁺,K⁺-ATPase Play a Key Role in Ouabain Binding // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 47. P. 47240–47244.
131. Shinoda T. et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. // *Nature. Nature Publishing Group*, 2009. Vol. 459, № 7245. P. 446–450.
132. Forbush III B. Cardiotonic steroid binding to Na, K-ATPase // *Current Topics in Membranes and Transport. Elsevier*, 1983. Vol. 19. P. 167–201.
133. Paula S., Tabet M.R., Ball W.J. Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure-activity relationship models for ligand binding to the E2-Pi form of the enzyme versus activity inhibition. // *Biochemistry.* 2005. Vol. 44, № 2. P. 498–510.
134. Qiu L.Y. et al. Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of Na,K-ATPase in gastric H,K-ATPase by substitution of only seven amino acids // *J. Biol. Chem.* 2005.
135. Akera T. et al. Effects of K⁺ on the interaction between cardiac glycosides and Na, K-ATPase // *Eur. J. Pharmacol. Elsevier*, 1985. Vol. 111, № 2. P. 147–157.
136. Feng J., Lingrel J.B. Analysis of Amino Acid Residues in the H5-H6 Transmembrane and Extracellular Domains of Na,K-ATPase α Subunit Identifies Threonine 797 as a Determinant of Ouabain Sensitivity // *Biochemistry.* 1994.
137. Shinoda T. et al. Crystal structure of the sodium--potassium pump at 2.4 {Å} resolution // *Nature. Nature Publishing Group*, 2009. Vol. 459, № 7245. P. 446–450.
138. Munzer J.S. et al. Tissue- and isoform-specific kinetic behavior of the Na,K-ATPase. // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 24. P. 16668–16676.
139. Marks M.J., Seeds N.W. A heterogeneous ouabain-ATPase interaction in mouse brain. // *Life Sci.* 1978. Vol. 23, № 27–28. P. 2735–2744.

140. Yoda A., Yoda S. Influence of pH on the interaction of cardiotonic steroids with sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. // *Mol. Pharmacol.* 1978. Vol. 14, № 4. P. 624–632.
141. Cornelius F., Mahmoud Y. a. Interaction between cardiotonic steroids and Na,K-ATPase. Effects of pH and ouabain-induced changes in enzyme conformation. // *Biochemistry.* 2009. Vol. 48, № 42. P. 10056–10065.
142. Cornelius F., Kanai R., Toyoshima C. A structural view on the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na,K-ATPase // *J. Biol. Chem.* 2013.
143. Porter A.G., Jänicke R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis // *Cell Death and Differentiation.* 1999.
144. Pchejetski D. et al. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio // *Biochem. Biophys. Res. Commun. Elsevier,* 2003. Vol. 301, № 3. P. 735–744.
145. Akimova O.A. et al. Investigation of mechanism of p38 MAPK activation in renal epithelial cell from distal tubules triggered by cardiotonic steroids // *Biochem. Springer,* 2010. Vol. 75, № 8. P. 971–978.
146. Yu L., Chen Y., Tooze S.A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms // *Autophagy.* 2018. Vol. 14, № 2. P. 207–215.
147. Orlov S.N. et al. Na⁺/K⁺ pump and endothelial cell survival: [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of [Na⁺]_i // *Pflügers Arch. Springer,* 2004. Vol. 448, № 3. P. 335–345.
148. Akimova O.A. et al. Cardiotonic steroids differentially affect intracellular Na⁺ and [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent signaling in C7-MDCK cells // *J. Biol. Chem. ASBMB,* 2005. Vol. 280, № 1. P. 832–839.
149. Orlov S.N. et al. Inversion of the intracellular Na⁺/K⁺ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3 // *J. Biol. Chem. ASBMB,* 1999. Vol. 274, № 23. P. 16545–16552.
150. Orlov S.N. et al. Inhibition of Na⁺, K⁺ pump affects nucleic acid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio: possible implication in vascular remodelling // *J. Hypertens. LWW,* 2001. Vol. 19, № 9. P. 1559–1565.
151. Orlov S., Akimova O., Hamet P. Cardiotonic Steroids: Novel Mechanisms of Na⁺_i-Mediated and -Independent Signaling Involved in the Regulation of Gene Expression, Proliferation and Cell Death // *Curr. Hypertens. Rev. Bentham Science Publishers,* 2005. Vol. 1, № 3. P. 243–257.
152. Panayiotidis M.I. et al. Ouabain-induced perturbations in intracellular ionic homeostasis regulate death receptor-mediated apoptosis // *Apoptosis.* 2010. Vol. 15, № 7. P. 834–849.
153. Akimova O.A. et al. The rapid decline of MTT reduction is not a marker of death signaling in ouabain-treated cells // *Cell Mol Biol.* 2006. Vol. 52, № 8. P. 71–77.

154. Chueh S.C. et al. Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells // *J. Urol. Elsevier*, 2001. Vol. 166, № 1. P. 347–353.
155. Özdemir A. et al. Cardiac glycoside-induced cell death and Rho/Rho kinase pathway: Implication of different regulation in cancer cell lines // *Steroids*. 2016. Vol. 109. P. 29–43.
156. McConkey D.J. et al. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells // *Cancer Res. AACR*, 2000. Vol. 60, № 14. P. 3807–3812.
157. Kurosawa M. et al. Distinct PKC isozymes regulate bufalin-induced differentiation and apoptosis in human monocytic cells // *Am. J. Physiol. Physiol. Am Physiological Soc*, 2001. Vol. 280, № 3. P. C459--C464.
158. Pezzani R. et al. The antiproliferative effects of ouabain and everolimus on adrenocortical tumor cells // *Endocr. J.* 2013. Vol. 61, № 1. P. 41–53.
159. Perne A. et al. Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis // *PLoS One. Public Library of Science*, 2009. Vol. 4, № 12. P. e8292.
160. Kulikov A. et al. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes. Elsevier*, 2007. Vol. 1768, № 7. P. 1691–1702.
161. Hennion J.P. et al. Evaluation of neuroprotection by lithium and valproic acid against ouabain-induced cell damage // *Bipolar Disord. Wiley Online Library*, 2002. Vol. 4, № 3. P. 201–206.
162. Rosen H. et al. Cardiac steroids induce changes in recycling of the plasma membrane in human NT2 cells // *Mol. Biol. Cell. Am Soc Cell Biol*, 2004. Vol. 15, № 3. P. 1044–1054.
163. Ouabain Induces Apoptotic Cell Death Through Caspase- and Mitochondria-dependent Pathways in Human Osteosarcoma U-2 OS Cells // *Anticancer Res.* 2018. Vol. 38, № 1.
164. Meng L. et al. Ouabain induces apoptosis and autophagy in Burkitt's lymphoma Raji cells // *Biomed. Pharmacother.* 2016.
165. Taurin S. et al. Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio in cultured vascular smooth muscle cells // *Circ. Res. Am Heart Assoc*, 2002. Vol. 91, № 10. P. 915–922.
166. Schoner W., Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth // *Am. J. Physiol. Physiol. Am Physiological Soc*, 2007. Vol. 293, № 2. P. C509–C536.
167. Zhang S. et al. Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 31. P. 21954–21962.
168. Klimanova E.A. et al. Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na,K-ATPase and depends on the enzyme conformation // *FEBS Lett.* 2015. Vol. 589, № 19.

P. 2668–2674.

169. Aperia A. New roles for an old enzyme: Na, K-ATPase emerges as an interesting drug target // *J. Intern. Med.* Wiley Online Library, 2007. Vol. 261, № 1. P. 44–52.
170. Liu J., Xie Z. The sodium pump and cardiotonic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.* Elsevier, 2010. Vol. 1802, № 12. P. 1237–1245.
171. Cooke K.R. Ouabain and regulation of cellular volume in freshly prepared slices of rabbit renal cortex. // *J. Physiol.* 1978.
172. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness // *Am. J. Physiol. Physiol.* Am Physiological Soc, 1993. Vol. 264, № 6. P. C1367–C1387.
173. Orlov S.N., Hamet P. Salt and gene expression: evidence for [Na⁺]_i/[K⁺]_i-mediated signaling pathways // *Pflügers Arch. J. Physiol.* Springer, 2014. P. 1–10.
174. Newman D.B. et al. Hypertrophic cardiomyopathy. // *J. Miss. State Med. Assoc.* 2008. Vol. 49, № 11. P. 330–334.
175. Liu J. et al. Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 2000. Vol. 275, № 36. P. 27838–27844.
176. Rajasekaran S.A. et al. Na,K-ATPase Activity Is Required for Formation of Tight Junctions, Desmosomes, and Induction of Polarity in Epithelial Cells // *Mol. Biol. Cell.* 2001. Vol. 12, № 12. P. 3717–3732.
177. Martin P.E.M. et al. Ouabain exerts biphasic effects on connexin functionality and expression in vascular smooth muscle cells // *Br. J. Pharmacol.* 2003. Vol. 140, № 7. P. 1261–1271.
178. Matchkov V. V. et al. Interaction between Na⁺/K⁺-pump and Na⁺/Ca²⁺-exchanger modulates intercellular communication // *Circ. Res.* 2007. Vol. 100, № 7. P. 1026–1035.
179. Belusa R. et al. Changes in Na⁺-K⁺-ATPase activity influence cell attachment to fibronectin // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2002. Vol. 282, № 2. P. C302–C309.
180. Rajasekaran S.A. et al. Na,K-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2003. Vol. 284, № 6. P. C1497–C1507.
181. Aizman O. et al. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2001. Vol. 98, № 23. P. 13420–13424.
182. Larre I. et al. Contacts and cooperation between cells depend on the hormone ouabain // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. Vol. 103, № 29. P. 10911–10916.
183. Larre I. et al. Ouabain modulates epithelial cell tight junction // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol.

107, № 25. P. 11387–11392.

184. Cerejido M. et al. The Na⁺-K⁺-ATPase as self-adhesion molecule and hormone receptor // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2012. Vol. 302, № 3. P. C473–C481.

185. Ponce A. et al. Ouabain increases gap junctional communication in epithelial cells // *Cell. Physiol. Biochem.* 2014. Vol. 34, № 6. P. 2081–2090.

186. Akimova O.A. et al. Death of ouabain-treated renal epithelial cells: evidence for p38 MAPK-mediated Na⁺/K⁺-independent signaling // *Apoptosis*. Springer, 2009. Vol. 14, № 11. P. 1266–1273.

187. Haas M. et al. Src-mediated interreceptor cross-talk between the Na/K-ATPase and the EGF receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 18694–18702.

188. Peng M. et al. Partial inhibition of Na/K-ATPase by ouabain induces the Ca-dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 1996. Vol. 271, № 17. P. 10372–10378.

189. Xie Z. et al. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 1999. Vol. 274, № 27. P. 19323–19328.

190. Okamura Y., Dixon J.E. Voltage-sensing phosphatase: its molecular relationship with PTEN // *Physiology*. Am Physiological Soc, 2011. Vol. 26, № 1. P. 6–13.

191. Bezanilla F. How membrane proteins sense voltage // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2008. Vol. 9, № 4. P. 323–332.

192. Koltsova S. V et al. Ubiquitous [Na⁺]ⁱ/[K⁺]ⁱ-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca²⁺ⁱ-independent excitation-transcription coupling // *PLoS One*. Public Library of Science, 2012. Vol. 7, № 5. P. e38032.

193. Tupler R., Perini G., Green M.R. Expressing the human genome // *Nature*. Nature Publishing Group, 2001. Vol. 409, № 6822. P. 832–833.

194. Takara K. et al. Digoxin up-regulates multidrug resistance transporter (MDR1) mRNA and simultaneously down-regulates steroid xenobiotic receptor mRNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 306, № 1. P. 116–120.

195. Smith C.L. et al. Marinobufagenin interferes with the function of the mineralocorticoid receptor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 356, № 4. P. 930–934.

196. Fujita-Sato S. et al. Structural basis of digoxin that antagonizes ROR γ t receptor activity and suppresses Th17 cell differentiation and interleukin (IL)-17 production // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 36. P. 31409–31417.

197. Klimanova E.A. et al. Time- and dose dependent actions of cardiotonic steroids on transcriptome and intracellular content of Na(+) and K(+): a comparative analysis. // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 45403.

198. Ledbetter M.L.S., Lubin M. Control of protein synthesis in human fibroblasts by intracellular potassium // *Exp. Cell Res. Elsevier*, 1977. Vol. 105, № 2. P. 223–236.
199. Cahn F., Lubin M. Inhibition of elongation steps of protein synthesis at reduced potassium concentrations in reticulocytes and reticulocyte lysate. // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 1978. Vol. 253, № 21. P. 7798–7803.
200. Cao J. et al. Cap-dependent translation initiation factor, eIF4E, is the target for Ouabain-mediated inhibition of HIF-1 α // *Biochem. Pharmacol. Elsevier*, 2014. Vol. 89, № 1. P. 20–30.
201. Jennings M.D., Pavitt G.D. eIF5. Taylor & Francis, 2010.
202. Klann E., Dever T.E. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity // *Nat. Rev. Neurosci. Nature Publishing Group*, 2004. Vol. 5, № 12. P. 931–942.
203. Larre I. et al. The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2014. Vol. 36. P. 149–156.
204. Xie Z., Cai T. Na⁺-K⁺--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function // *Mol. Interv. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003. Vol. 3, № 3. P. 157.
205. Segel G.B., Lichtman M.A. The apparent discrepancy of ouabain inhibition of cation transport and of lymphocyte proliferation is explained by time-dependency of ouabain binding // *J. Cell. Physiol. Wiley Online Library*, 1980. Vol. 104, № 1. P. 21–26.
206. Aydemir-Koksoy A., Abramowitz J., Allen J.C. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 2001. Vol. 276, № 49. P. 46605–46611.
207. Abramowitz J. et al. Ouabain-and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5 // *Circulation. Am Heart Assoc*, 2003. Vol. 108, № 24. P. 3048–3053.
208. Desfrere L. et al. Na, K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2009. Vol. 106, № 7. P. 2212–2217.
209. Saunders R., Scheiner-Bobis G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump // *Eur. J. Biochem. Wiley Online Library*, 2004. Vol. 271, № 5. P. 1054–1062.
210. Dmitrieva R.I., Doris P.A. Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 2003. Vol. 278, № 30. P. 28160–28166.
211. Tverskoi A.M. et al. Effects of ouabain on proliferation of human endothelial cells correlate with Na⁺,K⁺-ATPase activity and intracellular ratio of Na⁺ and K⁺ // *Biochem*. 2016. Vol. 81, № 8. P. 876–883.
212. Li J. Low Doses of Ouabain Protect from Serum Deprivation-Triggered Apoptosis and Stimulate

Kidney Cell Proliferation via Activation of NF- κ B // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006. Vol. 17, № 7. P. 1848–1857.

213. Ghysel-Burton, JOSIANE, Godfraind T. Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardioactive steroids in relation to their binding sites and their inotropic effect on guinea-pig isolated atria // *Br. J. Pharmacol.* 1979. Vol. 66, № 2. P. 175–184.

214. Gao J. et al. Isoform-specific Stimulation of Cardiac Na/K Pumps by Nanomolar Concentrations of Glycosides // *J. Gen. Physiol.* 2002. Vol. 119, № 4. P. 297–312.

215. Balzan S. et al. Erythrocyte sodium pump stimulation by ouabain and an endogenous ouabain-like factor // *Cell Biochem. Funct.* 2007. Vol. 25, № 3. P. 297–303.

216. Khundmiri S.J. et al. Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2006. Vol. 291, № 6. P. C1247–C1257.

217. Khundmiri S.J. et al. Structural determinants for the ouabain-stimulated increase in Na-K ATPase activity // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2014. Vol. 1843, № 6. P. 1089–1102.

218. Oselkin M., Tian D., Bergold P.J. Low-dose cardiotonic steroids increase sodium-potassium ATPase activity that protects hippocampal slice cultures from experimental ischemia // *Neurosci. Lett.* 2010. Vol. 473, № 2. P. 67–71.

219. Kometiani P. et al. Multiple Signal Transduction Pathways Link Na⁺/K⁺-ATPase to Growth-related Genes in Cardiac Myocytes the roles of ras and mitogen-activated protein kinases // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 1998. Vol. 273, № 24. P. 15249–15256.

220. Ye Q. et al. Identification of a potential receptor that couples ion transport to protein kinase activity // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 2011. Vol. 286, № 8. P. 6225–6232.

221. Voghel G. et al. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors // *Mech. Ageing Dev. Elsevier*, 2007. Vol. 128, № 11. P. 662–671.

222. Dostanic I. et al. The α 1 isoform of Na, K-ATPase regulates cardiac contractility and functionally interacts and co-localizes with the Na/Ca exchanger in heart // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 2004. Vol. 279, № 52. P. 54053–54061.

223. Wansapura A.N. et al. Mice expressing ouabain-sensitive α 1-Na, K-ATPase have increased susceptibility to pressure overload-induced cardiac hypertrophy // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol. Am Physiological Soc*, 2011. Vol. 300, № 1. P. H347--H355.

224. Ray J.L. et al. Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta. // *Methods Cell Sci.* 2001. Vol. 23, № 4. P. 185–188.

225. Orlov S.N. et al. Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase-3. *Nature Publishing Group*, 1999.

226. Fedosova N.U. Purification of Na,K-ATPase from pig kidney // *Methods in Molecular Biology*. 2016. Vol. 1377. P. 5–10.
227. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. 265–275.
228. Laemmli U.K., others. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. London, 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
229. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 1979. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.
230. Rathbun W.B., Betlach M.V.V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate // *Anal. Biochem.* 1969. Vol. 28, № 1. P. 436–446.
231. Nørby J.G. [11] Coupled assay of Na⁺,K⁺-ATPase activity // *Biomembranes Part P: ATP-Driven Pumps and Related Transport: The Na,K-Pump*. Academic Press, 1988. Vol. 156. P. 116–119.
232. Mitkevich V.A. et al. Termination of translation in eukaryotes is mediated by the quaternary eRF1*eRF3*GTP*Mg²⁺ complex. The biological roles of eRF3 and prokaryotic RF3 are profoundly distinct. // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, № 14. P. 3947–3954.
233. Freyer M.W., Lewis E.A. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions // *Methods Cell Biol.* Elsevier, 2008. Vol. 84. P. 79–113.
234. Ladbury J.E., Doyle M.L. *Biocalorimetry 2: applications of calorimetry in the biological sciences*. John Wiley & Sons, 2004.
235. Trott O., Olson A.J. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // *J. Comput. Chem.* 2010.
236. Ma B. et al. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 17, № 20. P. 2337–2342.
237. Akimova O.A. et al. Cardiotoxic steroid-resistant α 1-Na⁺, K⁺-ATPase rescues renal epithelial cells from the cytotoxic action of ouabain: evidence for a Na⁺, K⁺-independent mechanism // *Apoptosis*. Springer, 2010. Vol. 15, № 1. P. 55–62.
238. Pierre S. et al. RT-PCR detection of Na, K-ATPase subunit isoforms in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC): evidence for the presence of alpha1 and beta3. // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2001. Vol. 47, № 2. P. 319–324.
239. Hansen O. Quantification of α -subunit isoforms of Na, K-ATPase in rat resistance vessels // *Acta Physiol. Scand.* Wiley Online Library, 2004. Vol. 180, № 1. P. 49–56.
240. Golovina V.A. et al. Na⁺ pump alpha 2-subunit expression modulates Ca²⁺ signaling. // *Am. J.*

- Physiol. Cell Physiol. 2003. Vol. 284, № 2. P. C475–C486.
241. Song H., Thompson S.M., Blaustein M.P. Nanomolar ouabain augments Ca^{2+} signalling in rat hippocampal neurones and glia. // *J. Physiol.* 2013. Vol. 591, № Pt 7. P. 1671–1689.
242. Akimova O.A. et al. Critical role of the $\alpha 1\text{-Na}^+$, $\text{K}^+\text{-ATPase}$ subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain // *Apoptosis.* 2015. Vol. 20, № 9. P. 1200–1210.
243. Xiao A.Y. et al. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22, № 4. P. 1350–1362.
244. Gable M.E. et al. Comparison of Digitalis Sensitivities of $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPases}$ from Human and Pig Kidneys // *ACS Omega.* 2017. Vol. 2, № 7. P. 3610–3615.
245. Akayama M. et al. The $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ of rat kidney: purification, biosynthesis, and processing. // *Cell Struct. Funct.* 1986. Vol. 11, № 3. P. 259–271.
246. Grell E., Schick E., Lewitzki E. Membrane receptor calorimetry: Cardiac glycoside interaction with Na,K-ATPase // *Thermochim. Acta.* 2001. Vol. 380, № 2. P. 245–254.
247. Gable M.E. et al. Digitalis-induced cell signaling by the sodium pump: on the relation of Src to $\text{Na}^+(\text{+})\text{/K}^+(\text{+})\text{-ATPase}$. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier Inc., 2014. Vol. 446, № 4. P. 1151–1154.
248. Liu M., Ren Y., Guo C. Effect of ouabain on the pathogenesis of hypertension in rats. // *Chin. Med. J. (Engl).* 2013. Vol. 127, № 10. P. 1931–1934.
249. Song H. et al. Ouabain-digoxin antagonism in rat arteries and neurones. // *J. Physiol.* 2014. Vol. 592, № Pt 5. P. 941–969.
250. Katz A. et al. Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 25. P. 19582–19592.
251. Touza N.A. et al. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotonic steroids on $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ activity in human kidney membrane preparation // *Life Sci.* 2011. Vol. 88, № 1–2. P. 39–42.
252. Wallick E.T., Schwartz A. Interaction of Cardiac Glycosides with $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ // *Methods Enzymol.* 1988. Vol. 156, № C. P. 201–213.
253. Гривенникова В.Г. Ингибиторы с высоким средством. Москва.
254. Askari A. $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$: On the number of the ATP sites of the functional unit // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1987. Vol. 19, № 4. P. 359–374.
255. Jorgensen P.L. Purification and characterization of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. Vol. 466, № 1. P. 97–108.
256. Reinhard L. et al. $\text{Na}^+(\text{+}),\text{K}^+(\text{+})\text{-ATPase}$ as a docking station: protein-protein complexes of the $\text{Na}^+(\text{+}),\text{K}^+(\text{+})\text{-ATPase}$. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2013. Vol. 70, № 2. P. 205–222.

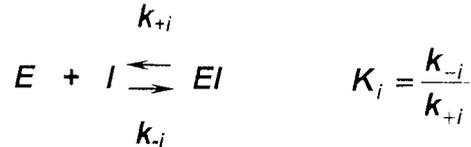
257. Lauf P.K. et al. Interaction between Na/K ATPase and Bcl-2 Proteins BclXL and BAK. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015. Vol. 1, № 31. P. ajpcell.00287.2014.
258. Lauf P.K. et al. Canonical Bcl-2 motifs of the Na⁺/K⁺ pump revealed by the BH3 mimetic chelerythrine: Early signal transducers of apoptosis? // *Cell. Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 31, № 2–3. P. 257–276.
259. Morrill G.A., Kostellow A.B., Askari A. Caveolin-Na/K-ATPase interactions: Role of transmembrane topology in non-genomic steroid signal transduction // *Steroids.* 2012. Vol. 77, № 11. P. 1160–1168.
260. Li Z., Xie Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotoxic steroid-activated protein kinase cascades // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* 2009. Vol. 457, № 3. P. 635–644.
261. Zhang W., Liu H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. // *Cell Res.* 2002. Vol. 12, № 1. P. 9–18.
262. Haas M., Askari A., Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 36. P. 27832–27837.
263. Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis // *Cell.* Elsevier, 1997. Vol. 88, № 4. P. 435–437.
264. Boudewijn M.T., Coffey P.J., others. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. Nature Publishing Group, 1995.
265. Cardone M.H. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation // *Science* (80-). American Association for the Advancement of Science, 1998. Vol. 282, № 5392. P. 1318–1321.
266. Pearson G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1 // *Endocr. Rev. Endocrine Society*, 2001. Vol. 22, № 2. P. 153–183.
267. Laulier C., Lopez B.S. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. // *Mutat. Res.* 2012. Vol. 751, № 2. P. 247–257.
268. Lauf P.K. et al. Interaction between Na-K-ATPase and Bcl-2 proteins BclXL and Bak // *Am. J. Physiol. Physiol. Am Physiological Soc*, 2015. Vol. 308, № 1. P. C51--C60.
269. Chung M.H. et al. Genistein inhibits phorbol ester-induced NF-κB transcriptional activity and COX-2 expression by blocking the phosphorylation of p65/RelA in human mammary epithelial cells // *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2014.
270. Orlov S.N. et al. Na⁺ i, K⁺ i-Dependent and-Independent Signaling Triggered by Cardiotoxic Steroids: Facts and Artifacts // *Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2017. Vol. 22, № 4. P. 635.
271. Kenakin T. Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol. 336, № 2. P. 296–302.

272. Goldin A., Safa A. Digitalis and cancer // *The Lancet*. 1984.
273. Haux J. et al. Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies // *BMC Cancer*. 2001.
274. Platz E.A. et al. A novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment // *Cancer Discov*. 2011.
275. Verheye-Dua F.A., Böhm L. Influence of apoptosis on the enhancement of radiotoxicity by ouabain. // *Strahlenther. Onkol*. 2000. Vol. 176, № 4. P. 186–191.
276. Iizuka N. et al. Downregulation of intracellular nm23-H1 prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells: possible association with Na(+), K(+)-ATPase. // *Br. J. Cancer*. 2000. Vol. 83, № 9. P. 1209–1215.
277. Yeh J.Y. et al. Inhibitory effects of digitalis on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. // *J. Urol*. 2001. Vol. 166, № 5. P. 1937–1942.
278. Dulin N.O., Smolyaninova L. V., Orlov S.N. Control of lung myofibroblast transformation by monovalent ion transporters // *Current Topics in Membranes*. 2019.
279. La J. et al. Regulation of myofibroblast differentiation by cardiac glycosides // *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol. Am Physiological Soc*, 2016. Vol. 310, № 9. P. ajplung--00322.
280. Ard S. et al. Sustained Smad2 phosphorylation is required for myofibroblast transformation in response to TGF- β // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2019.
281. Prinsloo G. et al. A cardiac glucoside with in vitro anti-HIV activity isolated from *Elaeodendron croceum* // *Nat. Prod. Res*. 2010. Vol. 24, № 18. P. 1743–1746.
282. Wong R.W. et al. Digoxin Suppresses HIV-1 Replication by Altering Viral RNA Processing // *PLoS Pathog*. 2013. Vol. 9, № 3.
283. Laird G.M. et al. A novel cell-based high-throughput screen for inhibitors of HIV-1 gene expression and budding identifies the cardiac glycosides // *J. Antimicrob. Chemother*. 2014. Vol. 69, № 4. P. 988–994.
284. Zhyvoloup A. et al. Digoxin reveals a functional connection between HIV-1 integration preference and T-cell activation // *PLoS Pathog*. 2017.
285. Wong R.W. et al. Cardiac glycoside/aglycones inhibit HIV-1 gene expression by a mechanism requiring MEK1/2-ERK1/2 signaling // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2018. Vol. 8, № 1. P. 850.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Ингибиторы с высоким сродством (псевдонеобратимые ингибиторы)

Если к ферменту добавлять ингибитор, взаимодействующий с высоким сродством, то реакция будет сильно смещена вправо, это делает невозможным изучение связывания таких ингибиторов в условиях, которые используют для обратимых ингибиторов с более высокими значениями K_i ($I \gg E$), поэтому систему



рассматривают в условиях, когда концентрации фермента и ингибитора сравнимы по величине между собой и с величиной константы ингибирования ($\sim 10^{-9}$ М, K_i для обратимых ингибиторов составляет порядка 10^{-5} - 10^{-2} М) и уравнение решают в общем виде:

$$K_i = \frac{[E]_{\text{св}} \times [I]_{\text{св}}}{[EI]} = \frac{([E]_0 - [EI]) \times ([I]_0 - [EI])}{[EI]}$$

Это система со взаимным истощением: связывание фермента и ингибитора приводит к уменьшению концентрации и свободного фермента, и свободного ингибитора. Решив это квадратное уравнение относительно EI можно записать ответ:

$$[EI] = \frac{([E]_0 + [I]_0 + K_i) - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_i)^2 - 4[E]_0 \times [I]_0}}{2}$$

Концентрация комплекса фермента с ингибитором будет определяться по формуле, в которой присутствуют концентрации фермента и ингибитора, а также константа ингибирования. Концентрация свободного фермента будет равна:

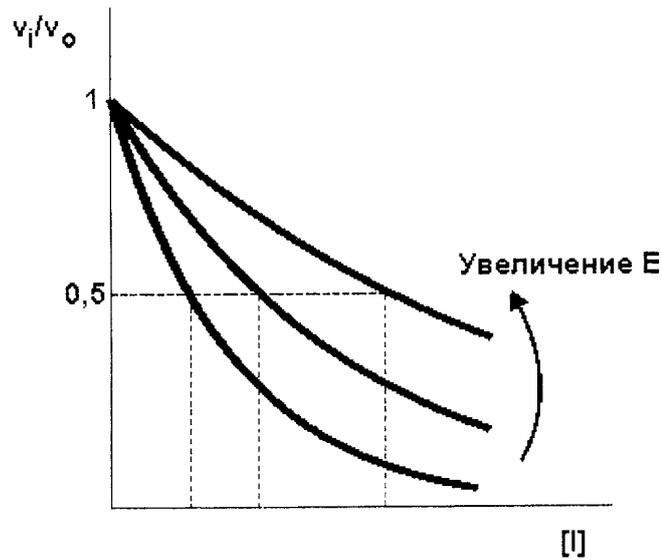
$$[E]_{\text{св}} = [E]_0 - \frac{([E]_0 + [I]_0 + K_i) - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_i)^2 - 4[E]_0 \times [I]_0}}{2}$$

$$\frac{[E]_{\text{св}}}{[E]_0} = 1 - \frac{([E]_0 + [I]_0 + K_i) - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_i)^2 - 4[E]_0 \times [I]_0}}{2[E]_0}$$

Так как скорость ферментативной реакции линейно зависит от концентрации фермента, то можно это выражение переписать. Остаточная активность фермента V_i/V_0 при концентрации ингибитора $[I]_0$ будет равна:

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E]_0 + [I]_0 + K_i) - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_i)^2 - 4[E]_0 \times [I]_0}}{2[E]_0} \quad , \text{уравнение (1)}$$

Графически зависимость остаточной активности (это корень квадратного уравнения) от концентрации ингибитора выглядит так:



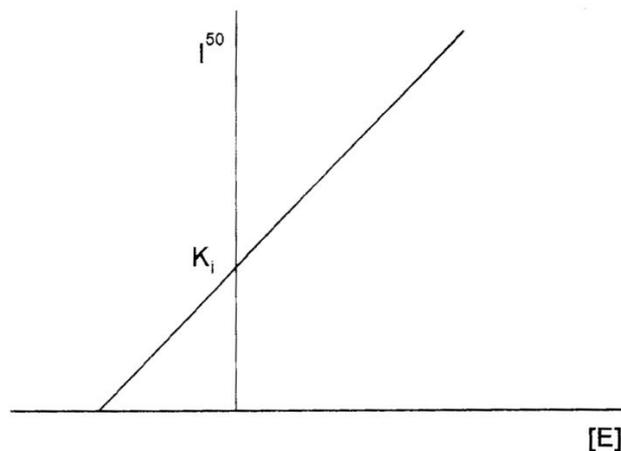
Из формулы видно, что результат зависит от того, при какой концентрации фермента проводили эксперимент: чем выше концентрация, тем правее на графике смещается кривая. Чтобы найти концентрацию ингибитора $[I]^{50}$, при которой происходит уменьшение активности фермента в 2 раза (останется половина свободного фермента), воспользуемся формулой, определяющей константу ингибирования:

$$K_i = \frac{[E]_{св} \times [I]_{св}}{[EI]} = \frac{0,5[E]_0 \times ([I]^{50} - 0,5[E]_0)}{0,5[E]_0} = [I]^{50} - 0,5[E]_0$$

$$[I]^{50} = K_i + 0,5[E]_0$$

, уравнение (2)

Таким образом, для ингибиторов с высоким сродством величина $[I]^{50}$ зависит от концентрации фермента и представляет собой сумму K_i и половины концентрации белка. Если при нескольких концентрациях фермента найти зависимость остаточной активности от концентрации ингибитора и величину $[I]^{50}$, а затем построить вторичный график $[I]^{50}$ от $[E]_0$, то получится прямая линия, пересекающая ось ординат в точке, численно равной K_i .

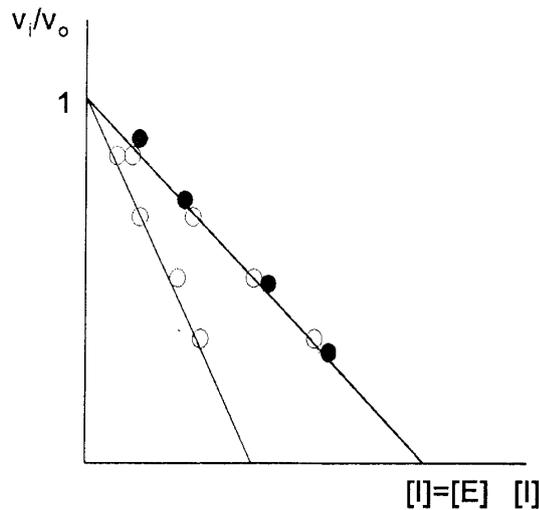


В таких опытах есть трудность, связанная с тем, что в области низких концентраций фермента и ингибитора их взаимодействие происходит крайне медленно. При разведении системы, в которой реагенты вступают в реакцию второго порядка скорость взаимодействия падает как квадрат фактора разведения. Поэтому ждать надо долго и убедиться в том, что система фермент-ингибитор пришла в равновесие.

Ингибиторами с высоким сродством (псевдонеобратимыми ингибиторами) можно титровать фермент, как и в случае необратимых модификаторов. Для этого нужно изменить условия инкубации и взять концентрации ингибитора и фермента, которые на несколько порядков превосходят величину K_i . Тогда величиной K_i в уравнении (1) можно пренебречь и уравнение примет вид:

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{[I]_0}{[E]_0}$$

Таким образом, остаточная активность будет линейно зависеть от концентрации ингибитора и пересечет ось абсцисс в точке, численно равной концентрации фермента. Графически это будет выглядеть как титрование фермента:



Результаты титрования зависят от концентрации белка. Если взять фермента в 2 раза больше, то понадобится в 2 раза больше ингибитора, чтобы полностью связать фермент. Константу ингибирования в такой постановке определить нельзя [253].

Выражаю особую благодарность моему научному руководителю профессору Орлову Сергею Николаевичу за внимание, поддержку и помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Отдельную благодарность и искреннюю признательность выражаю своему научному руководителю профессору Лопиной Ольге Дмитриевне за неоценимую помощь в выполнении и написании диссертационной работы.

Благодарю Биневского Петра Витальевича, Климанову Елизавету Андреевну и Полуэктова Юрия Михайловича за помощь в освоении новых методов, проведении экспериментов и обсуждении полученных результатов.

Благодарю Сидоренко Светлану Вадимовну, которая помогала при выполнении экспериментов.

Огромное спасибо за замечания к работе хочу выразить кандидату физико-математических наук Петрушанко Ирине Юрьевне.

За приобретение навыков работы в лаборатории, внимание и поддержку я хочу поблагодарить всех сотрудников кафедры биохимии и лаборатории физико-химии биологических мембран биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова.