

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ Na,K-АТФазы

© 2020 г. И.Ю. Петрушанко, В.А. Митькевич, А.А. Макаров

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: irina-pva@mail.ru

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

После доработки 17.06.2020 г.

Принята к публикации 19.06.2020 г.

Обзор посвящен молекулярным механизмам редокс-регуляции Na,K-АТФазы. Na,K-АТФаза создает трансмембранный градиент ионов натрия и калия, необходимый для жизнедеятельности всех клеток животных, а также является рецептором для кардиотонических стероидов, регулирующих пролиферацию и апоптоз клеток. Функционирование Na,K-АТФазы зависит от окислительно-восстановительного (редокс) статуса клеток. Изначально было показано, что фермент ингибируется при окислительном стрессе, однако теперь ясно, что редокс-регуляция Na,K-АТФазы является сложным процессом и не объясняется одним лишь окислительным повреждением белка. Активность фермента максимальна при физиологической концентрации кислорода, снижаясь как при гипоксии, так и при гипероксии, а также при падении или возрастании внутриклеточного глутатиона. Таким образом, активность Na,K-АТФазы максимальна в определенном диапазоне редокс-условий. В настоящее время стало очевидным, что нарушение активности Na,K-АТФазы при ряде патологий, таких как гипоксия, ишемия, диабет, болезнь Альцгеймера, связано именно с изменением редокс-статуса клеток. Рецепторная функция Na,K-АТФазы также зависит от редокс-статуса клеток, что необходимо учитывать при рассмотрении действия кардиотонических стероидов на клетки и ткани. В обзоре особое внимание уделено редокс-модификациям тиоловых групп различных субъединиц Na,K-АТФазы и рассмотрению процессов регуляции, в которые они вовлечены в норме и патологии. Понимание молекулярных механизмов редокс-регуляции поможет предотвратить нарушение функционирования Na,K-АТФазы при патологических условиях и снизить повреждение клеток.

*Ключевые слова:* Na,K-АТФаза, редокс-регуляция, глутатионилирование, нитрозилирование, окисление, остатки цистеина, кардиотонические стероиды.

DOI: 10.31857/S0006302920050014

Na,K-АТФаза – трансмембранный белок, который за счет энергии гидролиза АТФ создает трансмембранный градиент  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Данный градиент используется для транспорта других ионов, аминокислот и глюкозы, поддержания внутриклеточного pH и уровня  $\text{Ca}^{2+}$  [1–3]. Транспортная и гидролитическая активности Na,K-АТФазы чувствительны к редокс-статусу клеток [4–8]. Они максимальны при физиологической концентрации кислорода, снижаясь как при гипоксии, так и гипероксии, а также при падении или возрастании внутриклеточного глутатиона [5, 6]. Соотношение восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона определяет тиоловый редокс-статус клетки и изменяется при гипоксии, окислительном стрессе и многих патологиях [9, 10]. Нарушение функционирования

Na,K-АТФазы при ряде патологий связано именно с изменением редокс-статуса клеток [7, 8].

Ранее неоднократно отмечалось, что активность Na,K-АТФазы снижается при недостатке кислорода, и это происходит гораздо раньше, чем истощение клеток по АТФ, которое может привести к ингибированию фермента [11–13]. Снижение активности наблюдалось и при окислительном стрессе [4, 14, 15]. В дальнейшем было показано, что снижение активности Na,K-АТФазы происходит не только при гипоксии, но и при гипероксии [6], а избыток глутатиона, как и его недостаток, может также привести к снижению активности фермента [5]. Таким образом, активность Na,K-АТФазы имеет максимум в определенном диапазоне редокс-условий. Вопрос о механизмах ее редокс-регуляции является крайне актуальным, потому что нарушение работы этого фермента критично для жизнеспособности клеток. В электровозбудимых тканях функционирование Na,K-АТФазы необходимо еще и для

*Сокращения:* GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, КТС – кардиотонические стероиды, АФК – активные формы кислорода.

нормального формирования потенциала действия. Именно нарушение функционирования Na,K-АТФазы в ткани мозга и сердца при ишемии и гипоксии является одним из самых ранних и критичных событий, приводящих к нарушению работы ткани и последующей гибели клеток [7, 8]. При этом вопрос о редокс-регуляции Na,K-АТФазы не ограничивается только регуляцией активности фермента. В последнее время появляются все больше работ, свидетельствующих об огромном значении Na,K-АТФазы как рецептора к кардиотоническим стероидам (КТС) [16–20]. Эти вещества, которые ранее рассматривались как экзогенные ядовитые соединения, специфически ингибирующие Na,K-АТФазу, затем были найдены в организме животных и человека, и в настоящее время рассматриваются как важные гормоноподобные регуляторы. Na,K-АТФаза является единственным известным рецептором КТС. Связывание их с Na,K-АТФазой приводит к активации целого ряда сигнальных каскадов, опосредующих пролиферацию и апоптоз клеток. КТС активно использовались человечеством на протяжении сотен лет для лечения сердечной недостаточности. Однако они очень токсичны и вызывают ряд серьезных побочных эффектов. В настоящее время благодаря исследованиям рецепторной функции Na,K-АТФазы причины многих из этих эффектов стали ясны. Тем не менее такие исследования еще только начинаются, и в этом направлении больше вопросов, чем ответов. Понимание того, как изменяется рецепторная функция Na,K-АТФазы при окислительном стрессе, гипоксии или иных изменениях редокс-статуса очень важно для выявления особенностей регуляции рецепторной функции фермента, а также для правильного использования КТС в терапевтических целях.

Влияние редокс-статуса на функционирование белка возможно как вследствие непосредственной модификации его остатков, так и опосредованно, например, через редокс-чувствительные киназы. В данном обзоре фокус смещен на аспект редокс-регуляции Na,K-АТФазы путем непосредственной модификации остатков цистеина субъединиц Na,K-АТФазы.

### СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ Na,K-АТФазы

Функциональный мономер Na,K-АТФазы состоит из каталитической  $\alpha$ -субъединицы и регуляторной  $\beta$ -субъединицы [1].  $\alpha$ -Субъединица (100–113 кДа) имеет десять трансмембранных доменов, содержит участки связывания АТФ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и осуществляет гидролиз АТФ, а также транспорт ионов. Кроме того, на  $\alpha$ -субъединице локализован участок связывания КТС. Как С-, так и N-конец  $\alpha$ -субъединицы находятся в цитозоле.  $\alpha$ -Субъединица содержит малую и большую ци-

тозольную петли, которые формируют три основных цитозольных домена: N-конец белка и малая цитозольная петля формируют актуаторный домен (А), большая петля формирует нуклеотид-связывающий домен (N) и фосфорилируемый домен (Р).  $\beta$ -Субъединица (55 кДа – гликозилированная часть, 36–38 кДа – белковая часть) содержит один трансмембранный домен. Большая часть  $\beta$ -субъединицы формирует внеклеточный домен. Она необходима для транспорта вновь синтезированной Na,K-АТФазы в мембрану, а также для правильной ориентации  $\alpha$ -субъединицы в цитоплазматической мембране и для окклюзии  $\text{K}^+$  [21]. В течение каталитического цикла Na,K-АТФаза проходит две основные конформации: E1 и E2 [1, 7, 22]. Согласно циклу Альберса–Поста [1, 7, 22], цитозольный  $\text{Na}^+$  связывается с ферментом в E1-конформации, обладающей высоким сродством к АТФ. Это приводит к гидролизу АТФ, фосфорилированию фермента (E1P) и окклюзии трех ионов  $\text{Na}^+$ . Конформационный переход E1P–E2P приводит к снижению сродства к  $\text{Na}^+$  и возрастанию сродства к  $\text{K}^+$ . Происходит высвобождение  $\text{Na}^+$  во внеклеточную среду и связывание двух ионов  $\text{K}^+$ . Это приводит к дефосфорилированию фермента и окклюзии ионов калия (E2(2 $\text{K}^+$ )). В этой конформации фермент связывает АТФ с низким сродством, что способствует переходу E2–E1 и высвобождению  $\text{K}^+$  в цитозоль. Это приводит к возрастанию сродства к АТФ. Таким образом, при низких концентрациях АТФ, еще достаточных для фосфорилирования, фермент будет ингибироваться, поскольку станет невозможным связывание АТФ в сайте с низким сродством и уход  $\text{K}^+$  [1].

Данные по ограниченному трипсинолизу Na,K-АТФазы [23, 24], Fe-катализируемому окислительному расщеплению [25], флуоресценции фермента [26], а также тепловой денатурации [27, 28] в конформациях E1 и E2 указывают на различное относительное расположение доменов Na,K-АТФазы в этих состояниях. С появлением пространственной структуры Na,K-АТФазы в E1P- [29] и E2P-конформациях [30] многие данные о доменной организации фермента были подтверждены, однако, к сожалению, структуры фермента в E1-конформации до сих пор нет. Согласно нынешним представлениям, E1-конформация является более открытой в цитозоль, чем E2- и E2P-конформации [23–30].

В настоящее время известны четыре изоформы  $\alpha$ -субъединицы и три изоформы  $\beta$ -субъединицы. В отличие от повсеместно распространенной  $\alpha 1$ -изоформы распределение других изоформ  $\alpha$ -субъединицы тканеспецифично.  $\alpha 2$ -Изоформа играет важную роль в регуляции сократимости клеток и распространена в скелетных мышцах и сердце [31–34], а также в глиальных клетках [35].

$\alpha 3$ -Изоформа распространена в нейронах, сетчатке глаза и встречается также в сердце [34–36]. Созревание нейронной сети сопровождается увеличением уровня экспрессии  $\alpha 3$ -субъединицы [37], в то время как  $\alpha 2$ -субъединица важна для модуляции нейрональной активности в неонатальный период, но во взрослом мозге встречается только в астроцитах [33].  $\alpha 4$  встречается только в тестикулах [32, 38].  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -изоформы в различных пропорциях встречаются в разных тканях, тогда как  $\beta 3$ -изоформа экспрессируется только в некоторых тканях, например в сетчатке [36]. Изозимы фермента, содержащие одинаковые изоформы  $\beta$ -субъединицы, но разные изоформы  $\alpha$ -субъединицы, отличаются по чувствительности к КТС, причем показано, что важную роль в данной селективности играет остаток сахара КТС, агликоны не обладают селективностью в отношении изоформ  $\alpha$ -субъединицы [39]. Изозимы, состоящие из разных  $\alpha$ - и  $\beta$ -изоформ, имеют различную чувствительность к субстратам, сердечным гликозидам и окислительному стрессу [7, 39].

### ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС КЛЕТКИ

Окислительно-восстановительный (редокс) статус клетки определяется соотношением восстановленных и окисленных форм молекул. В клетках животных много редокс-пар молекул, которые вовлечены в поддержание внутриклеточного редокс-статуса, но самой распространенной является пара 2GSH/GSSG [9, 10]. Глутатион ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин) — основной низкомолекулярный тиол клеток животных. Он не только определяет окислительно-восстановительный статус клетки, поддерживает SH-группы белков в восстановленном состоянии, защищает клетку от активных форм кислорода (АФК), но и участвует в выводе ксенобиотиков. Окисленная форма глутатиона представляет собой гексапептид, две молекулы глутатиона, соединенные SS-мостиком. В норме содержание в клетке: GSH — 1–10 мМ, GSSG — 50–500 мкМ [10]. Следовательно, в покоящихся клетках  $[GSH]/[GSSG] > 100$ . Но в состоянии окислительного стресса это соотношение может существенно снизиться:  $1 < [GSH]/[GSSG] < 10$  [10]. GSH синтезируется в цитозоле в ходе двух ферментативных АТФ-зависимых реакций, катализируемых глутамин-цистеин-лигазой и глутатион-синтетазой, и затем транспортируется в различные компартменты клетки [40]. Восстановление GSSG до GSH катализируется глутатион-редуктазой, которая в качестве субстрата использует НАДФ-Н.

Редокс-потенциал, определяемый парой GSSG/GSH [10], при 25°C и pH 7.0, составляет

$$E_{hc} = -240 - \frac{59.55}{2} \log \frac{[GSH]^2}{[GSSG]}$$

Соотношение  $[GSH]/[GSSG]$  является основным индикатором редокс-статуса клетки. Величина редокс-потенциала этой пары коррелирует с биологическим статусом клетки, составляя при пролиферации около –240 мВ, при дифференцировке –200 мВ и при апоптозе –170 мВ [10]. Как следует из приведенного выше выражения, редокс-потенциал пары 2GSH/GSSG зависит не только от соотношения окисленной и восстановленной формы, но и от концентрации GSH. Это обусловлено тем, что из двух молекул GSH образуется одна молекула GSSG. В то же время для пар НАД-Н/НАД<sup>+</sup> и НАДФ-Н/НАДФ<sup>+</sup> редокс-потенциал зависит только от соотношения окисленной и восстановленной форм. В клетках и тканях соотношение НАДФ-Н/НАДФ<sup>+</sup> около 100/1, тогда как НАД-Н/НАД<sup>+</sup> — от 1/10 до 1/1000 [41]. В то время как НАДФ-Н является основным источником электронов для биосинтеза и участвует в реакции восстановления глутатиона, НАД<sup>+</sup> участвует в процессах катаболизма и служит стоком электронов [10].

Изначально понятие редокс-статуса использовалось для описания соотношения восстановленной и окисленной пар молекул. Однако уже много лет его используют в более широком смысле для того, чтобы описать окислительно-восстановительную среду клетки. Зачастую это понятие не очень хорошо определено. В одной из ключевых работ по этой тематике [10] было высказано предложение характеризовать редокс-статус среды как сумму редокс-потенциалов всех пар, каждый из которых умножен на концентрацию восстановленного компонента пары. Хотя редокс-потенциал пары НАДФ-Н/НАДФ<sup>+</sup> ниже, чем редокс-потенциал пары 2GSH/GSSG, количество восстановленного НАДФ-Н (0.1 мМ) [42] существенно ниже, чем GSH (5–10 мМ). Поэтому общий окислительно-восстановительный статус клетки зависит в основном от пары 2GSH/GSSG, которую также называют главным редокс-буфером клетки [10].

При изменении редокс-статуса клетки ряд белков изменяет свое функционирование [9]. В большинстве случаев окислительные модификации тиолов (SH) остатков цистеина обеспечивают редокс-зависимую регуляцию активности белков. Данные модификации можно разделить на обратимые: сульфенирование (S–OH); глутатионилирование (S–SG) — присоединение глутатиона к тиоловой группе белка с образованием дисульфидного мостика; нитрозилирование (S–NO) — присоединение NO и необратимые: сульфенирование (S–O<sub>2</sub>H) и сульфонирование (S–O<sub>3</sub>H). В то время как обратимые модифика-

ции вовлечены в сигнальные функции и редокс-регуляцию функции белка, необратимые модификации приводят к потере контроля над регуляцией функции белка и его последующей деградации.

## РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

### Na, K-АТФазы

Функционирование Na, K-АТФазы зависит от окислительно-восстановительного статуса клеток. В первую очередь было обнаружено ингибирование активности Na, K-АТФазы при развитии окислительного стресса, которое сопровождается снижением количества восстановленных SH-групп  $\alpha$ -субъединицы [4, 14, 20]. Затем было установлено, что тканеспецифичные изоформы  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  более чувствительны к окислению, чем конститутивная  $\alpha 1$ -изоформа [4, 20, 43–45]. При этом присутствие миллимолярных концентраций АТФ защищало фермент от окисления гидроксильными радикалами [46], а также от ингибирования цистеин-модифицирующим реагентом [47]. Проведенное сравнение последовательностей изоформ показало, что  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -изоформы имеют равное число остатков цистеина, а изоформа  $\alpha 3$  имеет один дополнительный цистеин, таким образом, более высокая чувствительность к окислению изоформ  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  по сравнению с изоформой  $\alpha 1$  не связана с большим количеством тиоловых групп в тканеспецифичных изоформах [7].

Необратимое окисление тиоловых групп делает невозможным их дальнейшие редокс-зависимые модификации, вследствие чего белок становится нечувствительным к изменению редокс-статуса клетки [48]. Na, K-АТФаза с необратимо окисленными тиоловыми группами подвергается деградации [49]. Активность Na, K-АТФазы максимальна в определенном диапазоне внутриклеточных редокс-условий. Как истощение нейрональных клеток по глутатиону, так и их загрузка глутатионом приводит к ингибированию транспортной активности Na, K-АТФазы [5].

Одним из первых свидетельств о редокс-чувствительности Na, K-АТФазы является ее ингибирование при снижении уровня кислорода. Способность Na, K-АТФазы отвечать на снижение уровня кислорода была показана на различных типах клеток, включая нейроны, кардиомиоциты, эритроциты, гепатоциты, гладкомышечные клетки, эпителиальные клетки легкого и т.д. [11–13, 50–53]. Однако позже было установлено, что не только гипоксия, но и гипероксия может снижать активность фермента. Так, на гранулярных клетках мозжечка крыс было показано, что активность Na, K-АТФазы имеет максимум при физиологическом парциальном давлении кислорода  $pO_2$  (3–5 кПа) и снижается, как в условиях

гипоксии, так и в условиях гипероксии [6]. Таким образом, было установлено, что активность Na, K-АТФазы чувствительна к изменению редокс-статуса клеток, реализующегося в случае окислительного стресса, изменения уровня внутриклеточных тиолов и уровня оксигенации.

## МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ Na, K-АТФазы

Основные механизмы редокс-чувствительности Na, K-АТФазы можно разделить на две группы – прямая модификация тиоловых групп остатков цистеина субъединиц белка и редокс-зависимое фосфорилирование фермента [7, 8].

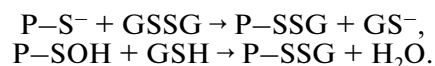
Наибольшее количество остатков цистеина содержит каталитическая  $\alpha$ -субъединица. В зависимости от изоформы их количество составляет 23 или 24 остатка, 15 из которых расположены в цитозоле и доступны для модификаций. Работы по точечному мутагенезу остатков цистеина с заменой их на аланин или серин, а также полная замена всех остатков цистеина не позволили выявить ни одного остатка цистеина, критичного для функционирования Na, K-АТФазы [54]. Мутант  $\alpha 1$ -субъединицы Na, K-АТФазы овцы с полной заменой остатков цистеина демонстрирует снижение  $K_{0.5}$  для  $Na^+$ , двукратное возрастание  $K_{0.5}$  для  $K^+$  и не влияет на  $K_m$  для АТФ. Хотя замены незначительно влияют на активность, стабильность функционального мономера  $\alpha$ - $\beta$  снижается. При этом замена Cys242 у овцы (соответствующего Cys244 у крысы) на аланин делает клетки очень чувствительными к кардиотоническому стероиду убаину [54]. Замены цитозольных остатков цистеина могут приводить к ингибированию активности Na, K-АТФазы максимум в два раза, при этом  $K_{0.5}$  для  $Na^+$  не меняется, а сродство к  $K^+$  и АТФ изменяется. Большинство остатков цистеина, замена которых влияет на активность фермента, локализовано в большой цитозольной петле M4-M5. Поскольку замены не вызывают существенного изменения активности [54], а модификация остатков цистеина может существенно менять функционирование фермента [8, 48], можно заключить, что цистеины важны не непосредственно для активности Na, K-АТФазы, а для редокс-чувствительной регуляции ее активности. Тиоловые группы остатков цистеина  $\alpha$ -субъединицы Na, K-АТФазы не образуют SS-мостиков [55]. Данные по мутагенезу также свидетельствуют о том, что SS-мостики  $\alpha$ -субъединицы не нужны для фолдинга и активности белка. Тиоловые группы  $\alpha$ -субъединицы находятся в восстановленном состоянии или могут быть модифицированы: окислены, нитрозилированы или глутатионилированы [8, 48, 55].

$\beta$ -Субъединица имеет семь остатков цистеина. Из них шесть находятся на внеклеточной части белка и образуют три SS-мостика, а один (Cys46) является восстановленным и локализован вблизи трансмембранной части белка, погружаясь и выходя из мембраны в ходе каталитического цикла, вследствие чего он может подвергаться модификациям, в частности глутатионилрованию [56, 57].

Третья субъединица (FXD), являющаяся тканеспецифичной, содержит в зависимости от изоформы один или два остатка цистеина, один из которых может подвергаться глутатионилрованию [57].

#### РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЕМ СУБЪЕДИНИЦ Na,K-АТФазы

Полученные данные демонстрировали, что окисление тиоловых групп Na,K-АТФазы не может объяснить наблюдаемое значительное ингибирование фермента при гипоксии, поскольку даже полностью окисленный белок вследствие инкубации с высокими концентрациями перекиси водорода обладает активностью [4, 14, 15]. Тот факт, что индуцированное изменение уровня GSH в клетке существенно изменяет активность фермента [5], а при гипоксии редокс-статус клеток и соотношение GSH/GSSG меняется [6], позволил предположить, что глутатион может напрямую модифицировать Na,K-АТФазу. Субъединицы Na,K-АТФазы содержат тиоловые группы, а это значит, что при изменении редокс-статуса, в частности при окислительном стрессе, возможно S-глутатионилрование — образование смешанных дисульфидов между цистеинами белка и глутатионом. Возможные пути глутатионилрования белков подробно описаны в работах [9, 58]. В частности, глутатионилрование возможно при взаимодействии тиоловой группы белка с GSSG или при взаимодействии частично окисленной тиоловой группы с GSH [58]:



Соответственно, развитие окислительного стресса, сопровождающееся ростом GSSG и окислением белков, будет приводить к индукции глутатионилрования [9, 58]. Эта модификация защищает тиоловые группы белков от необратимого окисления, а в некоторых случаях приводит к изменению функционирования белка. При нормализации редокс-условий в клетке равновесие смещается в сторону реакции деглутатионилрования, протекающей с участием специальных ферментов, таких как глутаредоксин [58]. Необходимо отметить, что глутаредоксин спосо-

бен катализировать как реакцию глутатионилрования, так и деглутатионилрования в зависимости от уровня внутриклеточного НАДФ-Н.

**Глутатионилрование  $\alpha$ -субъединицы и его влияние на активность Na,K-АТФазы.**  $\alpha$ -Субъединица Na,K-АТФазы имеет около 23 остатков цистеина (23 в изоформах  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  и 24 — в  $\alpha 3$ -изоформе) [7]. Около 15 цистеинов локализованы в цитозоле и, таким образом, могут подвергаться редокс-зависимым модификациям. Было обнаружено, что  $\alpha$ -субъединица Na,K-АТФазы подвергается глутатионилрованию [48, 59]. На очищенном белке из солевых желез утки и почек кролика было показано, что инкубация Na,K-АТФазы с GSSG индуцирует увеличение глутатионилрования  $\alpha 1$ -субъединицы и приводит к ингибированию фермента вплоть до полной его инактивации [48]. Уровень глутатионилрования  $\beta$ -субъединицы при этом не меняется. Инкубация с GSSG приводит к дозозависимому снижению активности фермента, развивающемуся во времени. Ингибирующее действие GSSG является бифазным: быстрое взаимодействие фермента с GSSG приводит к снижению активности на 80%, затем медленное взаимодействие приводит к полной инактивации белка. Для очищенного фермента из солевых желез утки и кролика величина  $IC_{50}$  составляет около 60 мкМ [48]. Обработка сарколеммальной фракции гомогената сердца крысы GSSG также приводила к росту глутатионилрования  $\alpha$ -субъединицы и ингибированию Na,K-АТФазы на 80% [48, 59]. При этом преинкубация сарколеммальной фракции со 100%-м кислородом в течение 30 мин или преинкубация очищенного белка в течение нескольких часов с 20% кислорода приводила к исчезновению чувствительности Na,K-АТФазы к действию GSSG, не влияя существенным образом на активность фермента [48]. Вероятно, это связано с окислением тиоловых групп белка и утрате их способности взаимодействовать с GSSG. Важно отметить, что ингибиторный эффект GSSG на сарколеммальную фракцию сердца значительно снижался при активации NO-синтаз [59]. Это может быть связано со снижением глутатионилрования тиоловых групп вследствие нитрозилирования. Инкубация очищенного фермента с восстановителем, например, дитиотреитолом снижает глутатионилрование  $\alpha$ -субъединицы и восстанавливает активность фермента. Также деглутатионилрование и восстановление активности фермента достигается при инкубации с глутаредоксином и НАДФ-Н [48]. Индукция глутатионилрования  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы была продемонстрирована не только на очищенном белке из почек и солевых желез, но и на ряде клеточных линий, ткани сердца, мышечной ткани в разных видах животных: утке, кролике, свинье, мыши, крысе, слепыше и человеке [48, 55, 59–67]. Это свидетельствует

о том, что механизм глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы является общим для различных органов и тканей в различных организмах.

В мышечных тканях кроме  $\alpha 1$ -субъединицы экспрессируется  $\alpha 2$ -субъединица, которая, будучи солокализована с Na/Ca-обменником, играет важную роль в регуляции мышечного сокращения [32, 68]. На ткани сердца и скелетных мышцах было показано, что глутатионилированию подвергается как  $\alpha 1$ -, так и  $\alpha 2$ -изоформа Na,K-АТФазы [48, 62–65]. При этом чувствительность  $\alpha 2$ -изоформы к глутатионилированию выше, чем чувствительность  $\alpha 1$ -изоформы [48]. На препарате из сердца крысы было показано, что концентрация GSSG, ингибирующая  $\alpha 2\beta$ -изофермент на 50%, в шесть раз ниже, чем концентрация, ингибирующая  $\alpha 1\beta$ -изофермент ( $IC_{50}$  составляет около 44 и 265 мкМ соответственно) [48]. Это хорошо коррелирует с большей чувствительностью  $\alpha 2$ -изоформы к окислению [69]. Хотя число остатков цистеина в этих изоформах одинаково,  $\alpha 2$ -изоформа отличается от  $\alpha 1$  дополнительным цистеином в актуаторном домене (Cys 236) и отсутствием цистеина в нуклеотидсвязывающем домене (Cys 458). Ранее было высказано предположение [7], что большая чувствительность к окислению фермента с  $\alpha 2$ -изоформой по сравнению с  $\alpha 1$ -изоформой может быть следствием сдвига равновесия E2–E1 в сторону более открытой в цитозоль конформации E1 [23]. Еще одной возможной причиной является разное окружение остатков цистеина в этих изоформах. Анализ двух ближайших аминокислот вблизи остатков цистеина в последовательности  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -изоформ показал, что для остатков Cys 206 и 579 в  $\alpha 2$ -изоформе по сравнению с  $\alpha 1$ -изоформой происходит замена незаряженных аминокислот на положительно заряженные, что может приводить к сдвигу рК тиоловых групп цистеинов и, следовательно, к их большей доступности для редокс-модификаций [8].

Возрастание уровня глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы приводит к значительному снижению активности фермента, вплоть до его полного ингибирования [48]. Такое значительное изменение активности белков при глутатионилировании может наблюдаться в случае, если глутатионирующий остаток цистеина находится вблизи активного центра, как в случае с альдозоредуктазой [9, 70]. Было установлено, что причиной ингибирования Na,K-АТФазы является нарушение связывания адениновых нуклеотидов [48]. Вследствие этого преинкубация Na,K-АТФазы с GSSG нарушает дозозависимую активацию фермента АТФ. С другой стороны, преинкубация Na,K-АТФазы с возрастающими концентрациями АТФ приводит к дозозависимому снижению ингибирующего действия GSSG [48]. В присутствии высоких концентраций аденино-

вых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) ингибирование Na,K-АТФазы GSSG нарушается [48, 64]. Наиболее эффективным защитным действием обладал АТФ, поскольку меньшие его концентрации требовались для нивелирования эффекта ингибирования GSSG [64]. Это может объясняться тем, что связывание АТФ приводит к изменению конформации белка, в частности, к сближению фосфорилируемого и нуклеотидсвязывающего доменов, переводя фермент в E1-закрытое состояние, что делает регуляторные цистеины недоступными для взаимодействия с GSSG [71].

Было высказано предположение, что основным регуляторным остатком является Cys452, находящийся вблизи участка связывания АТФ [48]. Согласно данным молекулярного моделирования, внесение отрицательного заряда вследствие глутатионилирования может нарушать связывание АТФ. Это также соответствовало данным масс-спектрометрии, согласно которым при инкубации с GSSG увеличивается уровень глутатионилирования остатков Cys454, 456, 459, локализованных в нуклеотидсвязывающем домене вблизи сайта связывания АТФ и Cys244, локализованного в малой цитозольной петле, формирующей актуаторный домен [48]. Однако эксперименты по точечному мутагенезу показали, что наиболее критичным для ингибирования активности при глутатионилировании являются вовсе не Cys454, 456, 459, а остаток Cys244 [60]. При замене этого остатка на аланин Na,K-АТФаза теряет способность ингибироваться при инкубации с GSSG. В настоящее время причина снижения активности при глутатионилировании Cys244 не совсем ясна. Остаток Cys244 может приближаться к АТФ-связывающему сайту, когда Na,K-АТФаза находится в E2-конформации. В конформации E2 АТФ связывается с белком с низким сродством и способствует уходу  $K^+$  [7]. Вероятно, глутатионилирование Cys244 нарушает данный процесс.

Эффективность глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы зависит от конформации фермента, что связано с изменением доступности остатков цистеина [72]. Максимальное увеличение уровня глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы при инкубации с GSSG наблюдается в случае, когда фермент находится в E1-конформации. В E2-конформации эффективность глутатионилирования снижается. Самая низкая эффективность глутатионилирования наблюдается в E2P- и E2P-убабин-конформациях. Как было сказано выше, при изменении конформации меняется взаимное расположение цитозольных доменов. Так, согласно данным ограниченного трипсинолиза, в E1 конформации большая и малая цитозольные петли находятся отдельно друг от друга, в то время как в E2-конформации они приближены друг к другу [23]. Таким образом, можно было предпо-

ложить, что в E1-конформации большая часть остатков цистеина доступна для модификации. Проведенный анализ существующих структур Na,K-АТФазы показал, что действительно в E1P-конформации количество доступных растворителю остатков цистеина максимально, в то время как в E2P- и E2P-уабаин-конформациях оно существенно ниже [72]. Таким образом, эффективность глутатионилирования коррелирует с количеством остатков цистеина, доступных растворителю [72]. Обнаруженная зависимость эффективности глутатионилирования от конформации фермента может пролить свет на роль лигандов и белков-партнеров во влиянии на редокс-модификацию тиоловых групп Na,K-АТФазы и регуляцию его активности. В частности, связывание уабаина будет снижать эффективность глутатионилирования фермента. Кроме того, смещение равновесия E2-E1 может быть причиной большей чувствительности к глутатионилированию тканеспецифичной  $\alpha 2$ -изоформы по сравнению с  $\alpha 1$ -изоформой.

Для того чтобы установить, как влияет глутатионилирование на конформацию фермента, был проведен анализ трипсинолиза  $\alpha$ -субъединицы для ряда конформаций Na,K-АТФазы, глутатионилированной в различной степени [74]. Деглутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы приводит к увеличению скорости трипсинолиза для фермента в E1- и E2-конформациях. Дополнительное увеличение уровня глутатионилирования фермента в конформации E2P приводит к увеличению содержания более высокомолекулярных фрагментов по сравнению с нативным и деглутатионилированным препаратами. Другими словами, глутатионилирование уменьшает количество доступных сайтов для протеолиза по сравнению с неглутатионилированным белком. Это свидетельствует о том, что глутатионилирование влияет на конформацию фермента и его чувствительность к трипсинолизу [74]. Таким образом, можно предполагать, что глутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы вследствие влияния на конформацию Na,K-АТФазы может изменять ее взаимодействие с белками-партнерами.

Поскольку Na,K-АТФаза является редокс-чувствительным ферментом, при исследовании ее свойств важно представлять, в каком состоянии находятся тиоловые группы белка. В одной из работ были охарактеризованы модификации остатков цистеина  $\alpha 1$ -субъединицы очищенного препарата Na,K-АТФазы из солевых желез утки [67]. Было установлено, что  $\alpha 1$ -субъединица Na,K-АТФазы содержит глутатионилированные, нитрозилированные и окисленные до SOH и SO<sub>2</sub>H остатки цистеина. Данные модификации были зарегистрированы как с помощью Вестерн-блоттинга, так и с помощью масс-спектрометрии. Инкубация с химическими восстановителями ча-

стично устраняла эти модификации, что приводило к незначительному увеличению активности фермента. В работе были использованы три химических восстановителя с различными стандартными редокс-потенциалами: трис(2-карбоксиил)фосфин, дитионит натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) и боргидрид натрия (NaBH<sub>4</sub>), которые имеют окислительно-восстановительные потенциалы -290 мВ, -416 мВ и -1024 мВ соответственно. Максимальную эффективность в снятии глутатионилирования, нитрозилирования и снижении уровня окисления продемонстрировал самый сильный восстановитель - боргидрид натрия. Только под действием этого восстановителя наблюдалось достоверное возрастание активности белка, однако оно составляло менее 20%. В то же время ферментативная система глутаредоксин/глутатионредуктаза деглутатионилировала нативную Na,K-АТФазу в меньшей степени, чем химические восстановители (на 20%), но, в отличие от них, приводила к значительному увеличению активности фермента (до 30%). Таким образом, ферментативная восстановительная система специфически влияет на глутатионилирование регуляторных остатков цистеина  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы. На белке из почек кролика, обработанном восстановителями дитиотретитолом, меркаптоэтанолом и трис(2-карбоксиил)фосфином, также было отмечено снижение исходного глутатионилирования белка и некоторое повышение активности [66]. Во всех случаях полное снятие глутатионилирования с нативного белка оказалось невозможным [66, 67].

Кроме регуляторного глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы, которое влияет на активность фермента и может быть снято восстановителями, было обнаружено также базальное глутатионилирование. Это глутатионилирование не может быть удалено при обработке нативного белка восстановителями. Однако обработка восстановителями денатурированного белка приводит к деглутатионилированию [55]. Было высказано предположение, что связывание глутатиона с рядом остатков цистеина происходит в процессе синтеза белка, и в нативном белке данные остатки цистеина уже недоступны для модификации. Действительно, на клетках фибробластов мыши линии SC1 было показано, что длительная гипоксия в течение нескольких суток (72 ч) приводит к возрастанию уровня базального глутатионилирования Na,K-АТФазы, в то время как при острой гипоксии происходит увеличение только регуляторного глутатионилирования [55]. Тщательный анализ структур Na,K-АТФазы (PBD коды: 3B8E, 3KDP, 3WGU, 3WGV, 4HYNT) показал, что вблизи некоторых остатков цистеина (Cys206-Cys244; Cys454-Cys458-Cys459; Cys700-Cys369; Cys601) имеются полости с неразрешенной электронной плотностью [55]. Они не могут быть объяснены

присутствием воды и по размеру соответствуют молекуле глутатиона. Глутатионилированные остатки белков часто регистрируют с помощью масс-спектроскопии, однако детекция глутатионилированных белков в кристаллических структурах очень редка. Впервые подход по обнаружению глутатионилированных остатков цистеина с помощью анализа неразрешенной электронной плотности вблизи остатков цистеина в структуре белка (митохондриального АВС транспортера) был описан в работе [74]. Анализ структур  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы показал, что в полости с неразрешенной плотностью направлены тиоловые группы двух остатков цистеинов, при этом глутатион может быть связан только с одним из них [55]. Дисульфидные связи в  $\alpha$ -субъединице не обнаружены [55]. Анализ первичной последовательности вблизи цистеиновых групп белков показал, что, действительно, только в ближайшей окрестности одного из цистеинов имеются положительно заряженные аминокислотные остатки, смещающие рК тиоловой группы, что увеличивает способность данного цистеина глутатионилироваться. В паре Cys204—Cys242 это Cys204, в паре Cys367—Cys698 — Cys698; в паре Cys452—Cys456 — Cys456. Было высказано предположение, что базальное глутатионилирование, происходящее в момент синтеза белка, может лежать в основе так называемой редокс-памяти, обуславливая изменение свойств белка, синтезированного в измененных редокс-условиях. Вероятно, базальное глутатионилирование Na,K-АТФазы является котрансляционной модификацией, изменяющей свойства белка для адаптации к длительному изменению редокс-условий [55]. Данный аспект редокс-регуляции белков еще предстоит изучить.

**Глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы и его влияние на активность Na,K-АТФазы.** У  $\beta$ -субъединицы есть только один восстановленный остаток цистеина, который может подвергаться редокс-модификациям, в частности, глутатионилированию — Cys46. В отличие от  $\alpha$ -субъединицы инкубация фермента с GSSG не приводит к изменению уровня глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы, что было показано на очищенных препаратах белка из солевых желез утки [48]. Впервые глутатионилирование  $\beta$ 1-субъединицы было обнаружено в ткани сердца кролика [56]. Увеличение уровня глутатионилирования  $\beta$ 1-субъединицы наблюдалось под действием пероксинитрита (ONOO—), перекиси водорода, параквата и активации НАДФ-Н-оксидазы ангиотензином II [56]. Преинкубация с супероксиддисмутазой приводила к снижению глутатионилирования индуцированного паракватом или активацией НАДФ-Н-оксидазы. Таким образом, образование супероксид-анион-радикала вовлечено в индукцию глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы. Увеличение

глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы под действием ONOO— наблюдалось также на очищенном белке из почек свиньи [56]. Инкубация с диэтиотреитолом приводила к существенному снижению уровня глутатионилирования. Интересно отметить, что в присутствии ингибитора NO-синтазы (L-NAME) общий уровень глутатионилирования был ниже и не возрастал под действием ангиотензина [56]. Позже глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы было показано не только для сердечной мышцы, но и для скелетных мышц и гладкой мускулатуры [62, 63, 75]. В отличие от глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы, индукция глутатионилирования Cys46 приводит лишь к частичному ингибированию фермента, его активность снижается на 20% [56].

Предполагают, что эффект ингибирования Na,K-АТФазы связан с нарушением взаимодействия между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами [56], поскольку в результате глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы снижается коиммунопреципитация этих субъединиц. К сожалению, в ряде случаев регистрация глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы не сопровождалась оценкой глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы, поэтому вычленивать вклад глутатионилирования каждой из субъединиц сложно [75]. Глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы замедляет скорость перехода E1—E2P и скорость перехода E2—E1—E2P [56].

Необходимо отметить, что Cys46 находится вблизи мембраны и заглублен в нее в случае 2K<sup>+</sup>-E2P-конформации [76]. На очищенном белке из почек свиньи было показано, что данный остаток доступен для глутатионилирования в E1ATP- и E1Na(3)-конформации [77]. Так, для фермента в E1ATP-конформации уровень глутатионилированной  $\beta$ -субъединицы почти в десять раз выше, чем в E2-конформации, а для E1Na(3)-конформации в два с половиной раза выше, чем в E2-конформации. При этом различия между глутатионилированием в E2- и E2K-конформациях не наблюдалось. Кроме того, инкубация белка с ONOO— приводила к существенному возрастанию глутатионилирования в E1-конформации (более чем в два раза), но не меняла глутатионилирования белка, находящегося в E2-конформации [77]. Наблюдаемые эффекты связаны с тем, что Cys46 в E2-конформации практически недоступен. При этом ингибирование активности при инкубации белка с ONOO— и GSH также наблюдалось гораздо более существенное, если белок находился в E1Na(3)-, а не в E2-конформации. Данный эффект наблюдался как на очищенном белке из почек свиньи, так и на кардиомиоцитах свиньи, однако характер ингибирования различался вследствие того, что в кардиомиоцитах кроме  $\beta$ 1-субъединицы присутствует нечувствительная к глутатионилированию  $\beta$ 2-субъединица [77]. Преинкубация кар-



диомиоцитов с убаином, который фиксирует фермент в E2P-конформации, предотвращает глутатионирование индуцированное ONOO<sup>-</sup> [77]. Таким образом, присутствие убаина снижает уровень глутатионирования  $\beta$ -субъединицы при окислительном стрессе. В то время как глутатионирование  $\beta$ 1-субъединицы в конформации E2 минимально, коиммунопреципитация  $\beta$ 1- и  $\alpha$ -субъединицы, напротив, выше в E2-конформации. Глутаредоксин, снижая глутатионирование  $\beta$ -субъединицы, повышает коиммунопреципитацию  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Полученные данные свидетельствуют о том, что глутатионирование  $\beta$ -субъединицы нарушает ее взаимодействие с  $\alpha$ -субъединицей [77]. С другой стороны, доступность Cys46 может возрастать при нарушении взаимодействия между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами [78].

Трансмембранные домены изоформ  $\beta$ -субъединицы  $\beta$ 2 и  $\beta$ 3 имеют не очень высокую гомологию с  $\beta$ 1 (от 57 до 61%) [79] и, вероятно, вследствие этого изоформы  $\beta$ 2 и  $\beta$ 3 не способны глутатионироваться. Предполагают, что Cys46 в данных изоформах недоступен для модификаций [56].

**Глутатионирование FXYD-субъединицы и его влияние на активность Na,K-АТФазы.** Хотя функциональный мономер Na,K-АТФазы состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, третья субъединица из семейства FXYD-белков может связываться с ферментом и влиять на его активность. Семейство FXYD содержит около семи небольших трансмембранных белков, которые могут модулировать активность Na,K-АТФазы. Эти белки в зависимости от изоформы содержат от одного до двух цистеинов, которые могут быть доступны для глутатионирования. Впервые глутатионирование было показано для субъединицы FXYD1, экспрессирующейся в сердце и известной как фосфолепман [57]. Глутатионирование FXYD1 облегчает де-глутатионирование  $\beta$ 1-субъединицы и таким образом обращает окислительное ингибирование Na,K-АТФазы. Субъединица FXYD содержит два остатка цистеина (Cys40 и Cys42 у FXYD1 человека). С помощью точечного мутагенеза было показано, что FXYD1 подвергается глутатионированию по остатку Cys42 [57]. Подверженность данного остатка глутатионированию обусловлена тем, что остаток Cys42, в отличие от Cys40, имеет в своем окружении положительно заряженные аминокислоты [57]. Cys42 в FXYD1 и FXYD7 фланкирован остатками аргинина и лизина. Изоформа FXYD2, в которой Cys42 фланкирован не двумя, а одной положительно заряженной аминокислотой, обладает меньшей способностью глутатионироваться и вследствие этого не способна снижать глутатионирование  $\beta$ 1-субъединицы. Введение второго положительно заряженного остатка рядом с цистеином восста-

навливает реакционную способность данного остатка цистеина. И, наоборот, замена положительно заряженного остатка на глицин в FXYD1 лишает его описанной функции. Эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что положительно заряженные аминокислотные остатки в ближайшем окружении остатка цистеина, сдвигая рK тиоловой группы, повышают эффективность глутатионирования [80]. Уровень глутатионирования FXYD возрастает при инкубации с ONOO<sup>-</sup>. Инкубация с дитиотреиолом снимает глутатионирование. Активатор аденилатциклазы форсколин, индуцирующий увеличение глутатионирования  $\beta$ 1-субъединицы [81], приводит также к возрастанию глутатионирования FXYD1 [57]. Супероксиддисмутаза предотвращает индукцию глутатионирования, вызванную форсколином, что еще раз подтверждает важность супероксид-анион-радикала в процессе индукции глутатионирования.

Инкубация кардиомиоцитов с ангиотензином II приводит к возрастанию уровня глутатионирования FXYD1. Также увеличение глутатионирования было обнаружено в зоне инфаркта. Было установлено, что глутатионирование и ингибирование  $\beta$ 1 может быть обращено добавлением FXYD3. Однако мутантная безцистеиновая форма FXYD не оказывает подобного действия. В сердцах FXYD-/-мышцы уровень глутатионирования  $\beta$ -субъединицы был повышен. Таким образом, предполагают, что FXYD играет важную роль в де-глутатионировании  $\beta$ 1-субъединицы, восстанавливая ее активность, и, следовательно, вовлечена в динамическую регуляцию активности Na,K-АТФазы.

Установлено, что глутатионирование субъединицы FXYD влияет на ее взаимодействие с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами, которое было оценено с помощью коиммунопреципитации. Возрастание уровня глутатионирования FXYD вследствие инкубации с ангиотензином или в зоне инфаркта приводит к снижению взаимодействия FXYD с  $\alpha$ -субъединицей, тогда как взаимодействие FXYD с  $\beta$ -субъединицей возрастает [75]. До настоящего времени не ясен механизм де-глутатионирования  $\beta$ -субъединицы в присутствии FXYD. Это может происходить как вследствие реакции тиол-дисульфидного обмена между этими субъединицами, так и вследствие того, что глутатионированная FXYD-субъединица, которая сильнее взаимодействует с  $\beta$ -субъединицей, предотвращает ее глутатионирование. Анализ структур показывает, что способные глутатионироваться остатки цистеина  $\beta$ -субъединицы и FXYD расположены далеко, что делает невозможным прямой тиол-дисульфидный обмен [75]. Необходимо отметить, что в отношении фосфолепмана (FXYD1), присоединение которого регулирует активность Na,K-АТФазы в сердце, су-

шествуют противоречивые данные о роли влияния его модификаций, фосфорилирования, пальмитоилирования (присоединение пальмитиновой кислоты) и глутатионилирования в условиях окислительного стресса на активность Na,K-АТФазы [82], которые в настоящее время пока не решены.

Итак, все три изоформы Na,K-АТФазы могут подвергаться глутатионилированию. При этом максимальное изменение активности, вплоть до полного ингибирования, наблюдается в случае  $\alpha$ -субъединицы за счет нарушения связывания АТФ. Глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы приводит к ингибированию фермента на 20% вследствие нарушения взаимодействия  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Как для  $\alpha$ -, так и для  $\beta$ -субъединицы максимальная эффективность глутатионилирования наблюдается для белка в E1-конформации, снижаясь в E2- и E2P-конформациях. Связывание убаина с ферментом, фиксирующее Na,K-АТФазу в E2P-конформации, приводит к резкому снижению способности к глутатионилированию  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Необходимо отметить, что в случае  $\alpha$ -субъединицы глутатионилированию подвержены не только повсеместно распространенная  $\alpha 1$ -, но и тканеспецифичная  $\alpha 2$ -изоформа, тогда как в случае только одна из трех изоформ —  $\beta 1$ , а в случае с FX $\gamma$ D только некоторые из изоформ, в частности FX $\gamma$ D1 и FX $\gamma$ D7.

#### РОЛЬ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ И НИТРОЗИЛИРОВАНИЯ СУБЪЕДИНИЦ Na,K-АТФазы В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

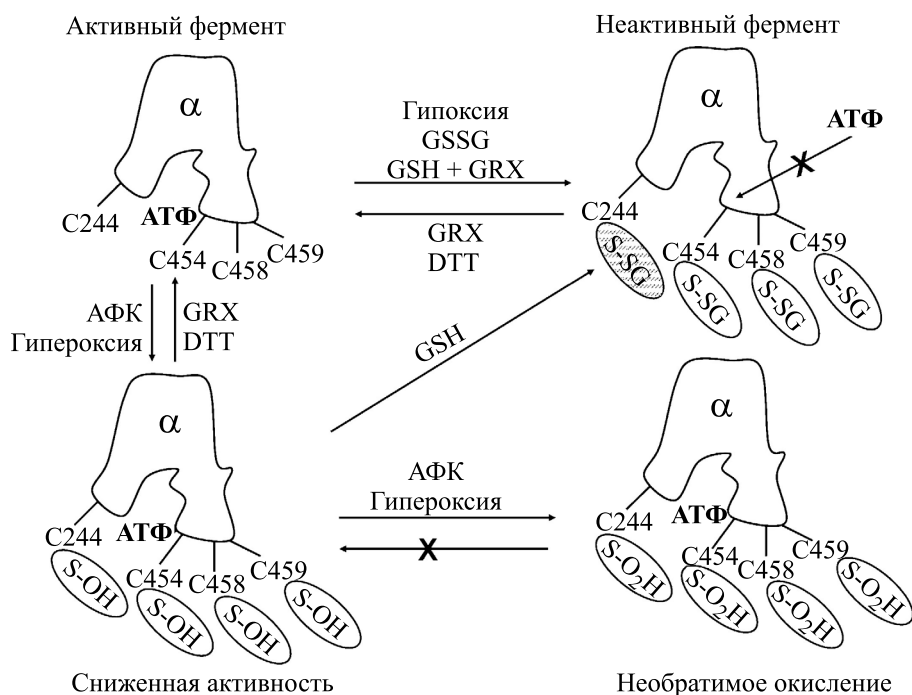
Изменение уровня глутатионилирования Na,K-АТФазы может являться причиной изменения активности фермента при патологиях, сопровождающихся нарушением редокс-статуса.

**Роль глутатионилирования и нитрозилирования  $\alpha$ -субъединицы в регуляции активности Na,K-АТФазы при гипоксии и ишемии.** Ингибирование Na,K-АТФазы является одним из самых ранних и критических ответов клеток на гипоксию [6, 8, 48, 59, 83]. Как было описано ранее, оно наблюдается в самых разных тканях. Ингибирование Na,K-АТФазы приводит к быстрой диссипации градиента Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> и гибели клетки. Однако, с другой стороны, ингибирование Na,K-АТФазы начинается существенно раньше, чем развивается значительный окислительный стресс, и не может быть объяснено просто необратимым окислением остатков цистеина фермента [8]. Обнаружено, что ключевым фактором, приводящим к ингибированию фермента при гипоксии, является глутатионилирование каталитической  $\alpha$ -субъединицы фермента [48]. Этот эффект был обнаружен в гомогенате сердца крысы [48, 59] и затем показан в

культуре клеток фибробластов мышцы линии SC1 [61]. При гипоксии происходит снижение продукции NO, развитие окислительного стресса и рост GSSG [48, 59]. Так, было показано, что в ткани сердца при гипоксии происходит смещение баланса GSH/GSSG в сторону GSSG [48], и редокс-потенциал пары GSH/GSSG сдвигается в более окисленную область [59]. Это приводит к снижению нитрозилирования и росту глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы [48, 59]. Возрастание уровня глутатионилирования и ингибирование фермента наблюдаются как при гипоксии на изолированном сердце [48, 59], так и при инкубации животного в гипоксической камере [59]. Также S-глутатионилирование  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы наблюдалось в клетках фибробластов мышцы линии SC1 при их инкубации в течение трех с половиной часов в условиях гипоксии (0.2% pO<sub>2</sub> и 0.05% pO<sub>2</sub>) [55, 61].

Поскольку снижение уровня АТФ увеличивает эффективность глутатионилирования [64], то в этом случае процесс глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы должен протекать существенно быстрее. Было высказано предположение, что глутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы, приводящее к ее ингибированию, является одним из этапов адаптации, позволяющим предотвратить истощение клеток по АТФ [8, 48] в первые минуты гипоксии. Доля АТФ, которая расходуется на поддержание работы Na,K-АТФазы, довольно существенна — от 20% внутриклеточных запасов в мышечной ткани до 80% в головном мозге [84]. Действительно, замена в  $\alpha$ -субъединице регуляторных остатков цистеина на аланин предотвращает ингибирование фермента окисленным глутатионом и приводит к снижению жизнеспособности клеток НЕК293, экспрессирующих данный белок, в условиях гипоксии (1% O<sub>2</sub>, 24 ч) [60]. Как было сказано выше, наиболее критичным остатком, глутатионилирование которого приводит к существенному снижению активности, является Cys244 [60]. Кроме того, было установлено, что инкубация клеток SC1 с веществами, индуцирующими глутатионилирование Na,K-АТФазы, приводит к лучшей выживаемости клеток в условиях гипоксии и препятствует существенному снижению АТФ [61].

Схема редокс-регуляции активности Na,K-АТФазы вследствие модификации регуляторных остатков цистеина  $\alpha$ -субъединицы приведена на рис. 1. Фермент находится в динамическом равновесии между различными состояниями. Его максимальная активность наблюдается в определенных редокс-условиях. В полностью активном ферменте регуляторные остатки цистеина не модифицированы. Окислительный стресс, в том числе вызванный гипоксией, приводит к окислению SH-групп регуляторных цистеинов до SOH и последующему глутатионилированию вследствие



**Рис. 1.** Редокс-регуляция активности Na,K-АТФазы вследствие модификации остатков цистеина  $\alpha$ -субъединицы. На схеме отмечены регуляторные остатки цистеина  $\alpha$ -субъединицы. В полностью активном ферменте они не модифицированы. Окислительный стресс, в том числе вызванный гипоксией, приводит к окислению SH-групп регуляторных остатков цистеина до SOH и последующему глутатионированию вследствие их взаимодействия с GSH или к глутатионированию SH-групп вследствие реакции тиол-дисульфидного обмена с GSSG, уровень которого возрастает. Истощение по АТФ усиливает эффективность глутатионирования. Главную роль в ингибировании фермента играет глутатионирование остатка Cys244 (выделено штриховкой). В результате нарушается связывание АТФ. Ингибирование вследствие глутатионирования регуляторных цистеинов обратимо при восстановлении нормальных редокс-условий, реакция деглутатионирования может катализироваться, в частности, глутаредоксином (GRX). В случае сильного окислительного стресса тиоловые группы не успевают глутатионироваться и возможно их необратимое окисление до  $SO_2H$  и  $SO_3H$ . Фермент с необратимо окисленными группами подвергается деградации.

их взаимодействия с GSH или к глутатионированию SH-групп вследствие реакции тиол-дисульфидного обмена с GSSG, уровень которого возрастает. Истощение по АТФ усиливает эффективность глутатионирования. Глутатионирование защищает тиоловые группы белка от необратимого окисления. При этом глутатионирование регуляторного остатка Cys244 приводит к нарушению связывания АТФ и инактивации фермента. Однако эта инактивация обратима при восстановлении нормальных редокс-условий. В частности, реакция деглутатионирования может катализироваться глутаредоксином. В том случае, если окислительный стресс сильный и тиоловые группы не успевают глутатионироваться, возможно их необратимое окисление до  $SO_2H$  и  $SO_3H$ . Фермент с необратимо окисленными группами подвергается деградации (рис. 1).

Было обнаружено, что инкубация клеток с веществами, индуцирующими глутатионирование  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы, — проникающим аналогом глутатиона этилглутатионом, нитрозоглутатионом, N-ацетилцистеином приводят

к снижению повреждения фибробластов мышечной линии SC1 при гипоксии [61]. На кардиомиоцитах из сердца крысы было показано, что данные вещества, в особенности этилглутатион и нитрозоглутатион, способны снижать повреждающее действие гипоксии и существенно увеличивать время нормальной сократимости клеток [65]. Наибольшим защитным эффектом обладал нитрозоглутатион, который не только увеличивал время сократимости клеток, сохраняя форму  $Ca^{2+}$ -пика близкой к нормальной, но и более чем на треть ускорял восстановление нормальной сократительной функции сердца [65]. Тканеспецифичная  $\alpha 2$ -субъединица более важна для регуляции уровня кальция и сократимости кардиомиоцитов, чем конститутивная  $\alpha 1$ -субъединица, которая осуществляет контроль транспорта  $Na^+$  и  $K^+$  [68, 85, 86]. Оказалось, что инкубация кардиомиоцитов с нитрозоглутатионом приводит к увеличению уровня глутатионирования  $\alpha 2$ -субъединицы, не изменяя глутатионирование  $\alpha 1$  [65]. Это соответствует полученным ранее данным о том, что  $\alpha 2$ -изоформа сердца крысы более

чувствительна к глутатионилированию, чем  $\alpha 1$  [48]. Предполагают, что специфические ингибиторы  $\alpha 2$  способны индуцировать положительный ионотропный эффект, не вызывая перегрузку кардиомиоцитов по  $\text{Ca}^{2+}$  и аритмию [85]. По-видимому, в определенных концентрациях нитрозоглутатион может работать как селективный ингибитор  $\alpha 2$  в кардиомиоцитах [65]. Однако пока непонятно, опосредовано ли защитное действие нитрозоглутатиона при гипоксии только глутатионилированием  $\alpha 2$ -субъединицы или в это вовлечены и другие механизмы.

Регуляция активности Na,K-АТФазы при гипоксии тесно связана с изменением редокс-статуса, а также уровнем глутатионилирования и нитрозилирования белка. Важно отметить, что гипоксия изолированного сердца крысы приводит не только к повышению уровня глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы [48, 59], но и снижению уровня ее нитрозилирования [59]. Подробно это было исследовано на модели изолированного сердца крысы. При гипоксии редокс-потенциал, обусловленный парой GSH/GSSG, сдвигается в более окисленную область. Так, в гомогенате сердца крысы он изменяется от  $-266$  мВ (при 20%  $\text{pO}_2$ ) до  $-256$  мВ (при 5%  $\text{pO}_2$ ). При этом производство NO в условиях гипоксии снижается [59]. Это связано с тем, что NO-синтазы обладают низким сродством к кислороду [7]. В результате уровень нитрозилирования  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы снижается, а уровень глутатионилирования возрастает. В присутствии ингибитора NO-синтаз (L-NAME) уровень NO снижается, и сдвиг редокс-потенциала в окисленную область происходит даже в условиях нормоксии. Уровень NO в нормоксии и гипоксии в присутствии этого ингибитора не отличается [59]. В результате в присутствии ингибитора NO-синтаз уровень нитрозилирования  $\alpha$ -субъединицы снижается в условиях нормоксии и в условиях гипоксии уже не меняется, при этом уровень глутатионилирования в нормоксии возрастает, а в гипоксии нет [59]. На гранулярных клетках мозжечка крыс было показано, что активность Na,K-АТФазы максимальна при физиологическом содержании кислорода (3–5%  $\text{pO}_2$ ), снижаясь при гипоксии и гипероксии. При этом L-NAME приводит к исчезновению максимума активности Na,K-АТФазы при физиологических концентрациях кислорода [6], а активация NO-синтаз существенно снижает ингибирование, индуцируемое GSSG [59]. Очевидно, кислород-индуцированная регуляция Na,K-АТФазы опосредована переключением между глутатионилированием и нитрозилированием регуляторных тиоловых групп, локализованных на каталитической  $\alpha$ -субъединице фермента [59]. Таким образом, нитрозилирование и глутатионилирование — две конкурирующие редокс-модификации  $\alpha$ -субъединицы, и изменение их уровня опреде-

ляет активность Na,K-АТФазы. Регуляторное глутатионилирование — механизм адаптации клеток к окислительному стрессу и гипоксии.

У ряда животных, способных переживать гипоксию, процесс диссипации градиента  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  сильно замедлен за счет того, что при ингибировании Na,K-АТФазы реализуется закрытие ионных каналов, так называемый «канальный арест» [87]. При этом деятельность животного прекращается [88–91]. Отмечалось, что способность к выживанию в условиях гипоксии сохраняется даже в срезах ткани мозга гибернирующих животных, а убаин ее повышает [92]. Кроме того, есть устойчивые к гипоксии виды, такие как черепаха, а также ведущие подземный образ жизни животные: голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) и слепыш (*Spalax mole rate*), которые способны быть активными при гипоксии. В условиях пониженного кислорода у этих животных, в отличие от крыс, не наблюдается ингибирования Na,K-АТФазы. Было показано, что при критичном  $\text{pO}_2$  слепыши (*Spalax judaei* и *Spalax galili*) по крайней мере в течение 20 мин способны поддерживать редокс-статус клеток достаточно восстановленным для того, чтобы Na,K-АТФаза не ингибировалась [59]. Интересно отметить, что у слепышей локализация остатков цистеина такая же, как и у крысы, и они тоже способны подвергаться глутатионилированию. Так, при инкубации с GSSG гомогената сердечной ткани слепышей происходит индукция глутатионилирования Na,K-АТФазы и ингибирование фермента [59]. Таким образом, у этого вида гипоксийно устойчивых животных присутствуют регуляторные остатки цистеина, которые, по-видимому, достаточно консервативны.

**Роль глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы в регуляции активности Na,K-АТФазы при болезни Альцгеймера.** К изменению уровня глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы могут приводить патологии, сопровождающиеся изменением редокс-статуса. Так, например, на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера происходит нарушение редокс-статуса нейрональных клеток, в частности, снижение содержания GSH [93–95]. При этом активность Na,K-АТФазы в этих клетках снижается [96–99]. Восстановление уровня глутатиона даже рассматривают в качестве возможной стратегии терапии при болезни Альцгеймера [95]. Было установлено, что патогенный пептид бета-амилоид (A $\beta$ ) способен непосредственно взаимодействовать с Na,K-АТФазой и ингибировать ее активность в течение 30–60 мин инкубации [99, 100]. Это быстрое ингибирование не связано с его проникновением в клетку [100]. Однако при более длительных временах инкубации необходимо также учитывать возможное ингибирование Na,K-АТФазы в результате измене-

ния редокс-статуса клеток под действием Аβ-пептида. Было показано, что инкубация клеток нейроblastомы человека SH-SY-5Y в течение 24 ч с Аβ-пептидом приводит к существенному снижению уровня восстановленного глутатиона, изменению соотношения GSH/GSSG и индукции глутатионилирования α-субъединицы Na,K-АТФазы [101]. Таким образом, увеличение уровня глутатионилирования Na,K-АТФазы является одной из причин снижения активности фермента, наблюдаемого на ранних этапах развития болезни Альцгеймера [101]. В связи с этим становится ясна причина неудачной попытки восстановить активность Na,K-АТФазы в клетках мозга, подверженных действию Аβ-пептида, глутатионом и его синтетическими аналогами [98], наоборот, под действием этих веществ активность Na,K-АТФазы еще более снижалась. По-видимому, это связано с тем, что происходило еще большее увеличение глутатионилирования Na,K-АТФазы. В пользу этого свидетельствует тот факт, что проникающий аналог глутатиона (этилглутатион) приводит к ингибированию Na,K-АТФазы в нейрональных клетках [5], и при инкубации клеток с этилглутатионом и нитрозоглутатионом глутатионилирование α-субъединицы Na,K-АТФазы возрастает [61]. Таким образом, необходимо тщательно подбирать соединения и их рабочий диапазон концентраций для восстановления нормального редокс-статуса клеток при болезни Альцгеймера. Просто загрузка клеток глутатионом в условиях окислительного стресса может лишь увеличить уровень глутатионилирования белков. Можно предложить использовать для восстановления редокс-статуса клеток более сильные восстановители, такие как НАДФ-Н [101]. В последнее время появляется все больше свидетельств того, что изменение уровня нитрозилирования и глутатионилирования белков является важным аспектом патогенеза болезни Альцгеймера [102]. Можно надеяться, что вскоре появятся способы для нормализации редокс-статуса клеток и восстановления нормального функционирования белков при патологии.

**Роль глутатионилирования Na,K-АТФазы в разных типах мышц.** Глутатионилирование α-субъединицы Na,K-АТФазы наблюдается не только в сердечной мышце, но и в других типах мышц. В окислительных мышечных волокнах скелетных мышц уровень глутатионилированной α-субъединицы почти в два раза выше, чем в гликолитических мышечных волокнах [62]. При этом отмечено, что базальный уровень глутатионилирования β1-субъединицы в обоих типах мышц выше, чем α-субъединицы. Дитиотреитол снижает глутатионилирование и приводит к возрастанию активности фермента. Инкубация с GSSG приводит к возрастанию глутатионилирования α-субъединицы как в окислительных, так и в гликолитических

типах волокон, при этом для β1-субъединицы в окислительных волокнах достоверного возрастания не наблюдается, но оно наблюдается для β2-субъединицы в гликолитических волокнах [62]. Необходимо отметить, что ранее считалось, что β2-субъединица глутатионилироваться неспособна [77]. Хотя и в окислительных, и в гликолитических волокнах GSSG вследствие глутатионилирования Na,K-АТФазы приводит к ингибированию фермента, наибольшее ингибирование наблюдается в окислительных волокнах. Таким образом, предполагают, что глутатионилирование играет роль в регуляции работы Na,K-АТФазы в скелетных мышцах. В частности, глутатионилирование, индуцированное окислительным стрессом, особенно важно при длительной нагрузке. Было показано, что при физической нагрузке и β2-адренергической стимуляции в мышцах человека возрастает уровень глутатионилирования β1-субъединицы, тогда как уровень глутатионилирования α-субъединицы практически не меняется [63]. Таким образом, глутатионилирование способствует комплексной регуляции Na,K-АТФазной функции в скелетных мышцах человека. В частности, глутатионилирование Na,K-АТФазы может объяснить снижение максимальной активности Na,K-АТФазы после физической нагрузки, которое может быть вовлечено в развитие мышечной усталости [63].

**Роль глутатионилирования β-субъединицы в регуляции активности Na,K-АТФазы в норме и патологии.** В настоящее время описано несколько физиологических факторов, приводящих к изменению глутатионилирования β-субъединицы. Как было сказано выше, увеличение глутатионилирования β-субъединицы приводит к снижению активности Na,K-АТФазы, которое, однако, менее выражено, чем при глутатионилировании α-субъединицы и составляет около 20% [56]. Условия, в которых наблюдают возрастание глутатионилирования α- и β-субъединиц, различаются [48, 56, 59, 63]. Увеличение уровня глутатионилирования β-субъединицы наблюдали при стимуляции НАДФ-Н-оксидазы, которая может быть вызвана фосфорилированием субъединицы НАДФ-Н-оксидазы протеинкиназой С вследствие активации β1/β2-адренорецепторов или обработки миокарда ангиотензином II. Более того, увеличение глутатионилирования β-субъединицы наблюдалось в зоне инфаркта сердца овцы [56]. Похожий эффект достигается экспонированием кардиомиоцитов с активатором аденилатциклазы форсколином и последующей активацией протеинкиназой С [81] или прямой обработкой кардиомиоцитов пероксинитритом (ONOO<sup>-</sup>) [56]. Обработка гладкомышечных клеток сосудов нитрозоглутатионом также приводит к возрастанию глутатионилирования. Снижение уровня супероксид-анион-радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) с помощью супероксиддисмутазы предотвращает

глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы. Также предотвратить глутатионилирование позволяет стимуляция гуанилатциклазы, поскольку это мешает фосфорилированию и активации НАДФ-Н-оксидазы [103]. Механизм индукции глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы при обработке клеток ангиотензином был изучен достаточно подробно. Ангиотензин II активирует адренорецептор, что приводит к активации протеинкиназы С и фосфорилированию  $p47^{\text{phox}}$ -субъединицы НАДФ-Н-оксидазы. В результате происходит транслокация  $p47^{\text{phox}}$ , приводящая к активации НАДФ-Н-оксидазы и образованию  $O_2^{\cdot-}$ . Взаимодействие  $O_2^{\cdot-}$  с NO приводит к образованию пероксинитрита и индуцирует глутатионилирование [81]. Стимуляция гуанилатциклазы индуцирует осуществляемое фосфатазой PP2A-зависимое дефосфорилирование  $p47^{\text{phox}}$ , препятствует активации НАДФ-Н-оксидазы и нарушает глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы [103]. Этот сдвиг в сторону деглутатионилирования может приводить к активации Na,K-АТФазы. Также было показано, что ангиотензин ингибирует Na,K-АТФазу в гладкомышечных клетках легочной артерии путем индукции глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы [104].

В отличие от активации  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-адренорецепторов активация  $\beta$ 3-адренорецептора, напротив, снижает S-глутатионилирование  $\beta$ 1-субъединицы [104] и приводит к активации Na,K-АТФазы [105]. В мышцах с делецией  $\beta$ 3-адренорецептора отмечается повышенный уровень окислительного стресса и возрастание глутатионилирования  $\beta$ 1-субъединицы. Ингибирование NO-синтазы снимает этот эффект [105]. Необходимо отметить, что сверхэкспрессия  $\beta$ 3-адренорецептора наблюдается при нарушении функции миокарда [106]. Можно предполагать, что она является компенсаторным механизмом. Об этом же свидетельствуют данные, полученные при гипергликемии.

Гипергликемия, индуцированная в организме кролика блокадой инсулинового рецептора, приводит к активации НАДФ-Н-оксидазы [107]. При активации НАДФ-Н-оксидазы происходит глутатионилирование эндотелиальных NO-синтаз, в результате чего в большей степени генерируется  $O_2^{\cdot-}$ , чем NO [107]. Возрастание  $O_2^{\cdot-}$  приводит к увеличению уровня глутатионилирования  $\beta$ 1-субъединицы и ингибированию Na,K-АТФазы в кардиомиоцитах [107]. При этом активация  $\beta$ 3-адренорецептора с помощью обработки агонистом снижает уровень окислительного стресса, вызванного гипергликемией. Это происходит в результате восстановления работы эндотелиальных NO-синтаз, возможно, за счет его связывания с белком теплового шока Hsp90, и синтезируемый NO снижает активацию НАДФ-Н-оксидазы через канонический гуанилатциклазный путь, приводящий к

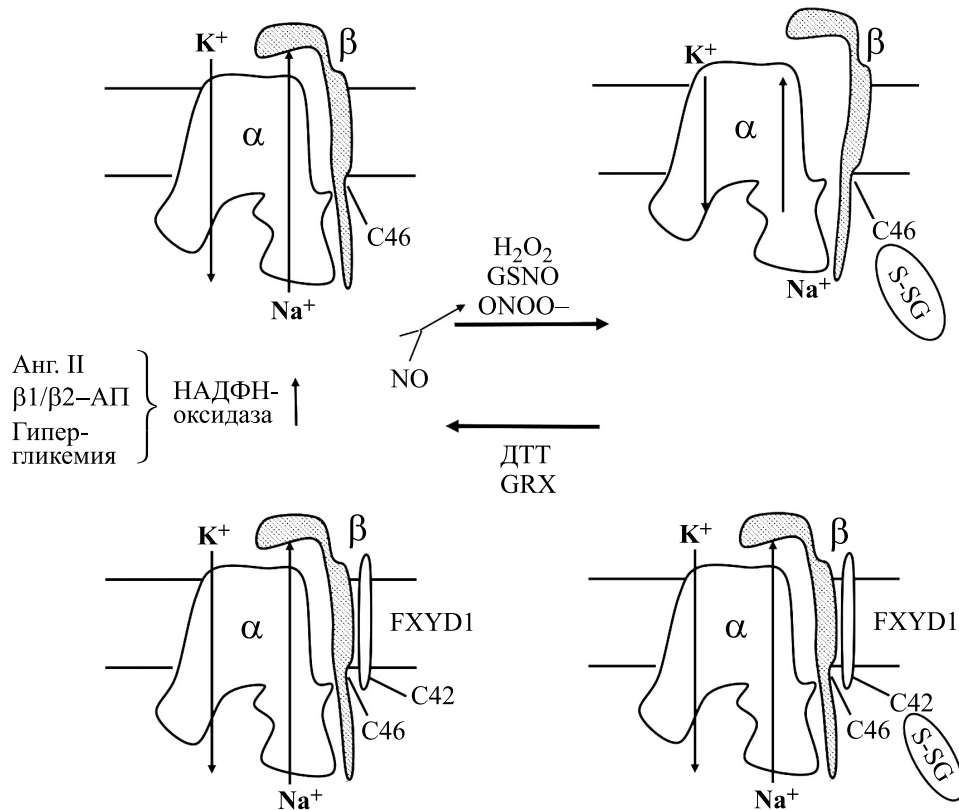
дефосфорилированию  $p47^{\text{phox}}$  и ее диссоциации от мембранных субъединиц. В результате предотвращается глутатионилирование  $\beta$ 1-субъединицы и вызванное этим ингибирование Na,K-АТФазы [107]. Таким образом, сверхэкспрессия  $\beta$ 3-адренорецептора, наблюдаемая в сердце крыс с диабетом [108], возможно, играет важную компенсаторную роль и позволяет снизить уровень окислительного стресса и вызванное этим ингибирование Na,K-АТФазы.

Подводя итог вышесказанному, можно предложить следующую схему регуляции глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы и субъединицы семейства FX $\gamma$ D (рис. 2). Физиологические стимулы, приводящие к активации НАДФ-Н-оксидазы (ангелотинезин II, активация  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-адренорецепторов, гипергликемия), приводят к росту супероксид-анион-радикала, образованию пероксинитрита и индукции глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы. В результате нарушается взаимодействие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц и снижается транспортная активность фермента. Повидимому, образование ONOO $^-$  важно для глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы, поскольку в присутствии супероксиддисмутазы или ингибитора NO-синтазы, а также ловушки ONOO $^-$  глутатионилирование снижается. Глутатионилирование возрастает также при непосредственной обработке клеток ONOO $^-$ , H $_2$ O $_2$  или нитрозоглутатионом. В присутствии FX $\gamma$ D1 под действием вышеописанных стимулов происходит индукция ее глутатионилирования, что затрудняет глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы и предотвращает ингибирование фермента. Обработка восстановителями или восстановление нормальных редокс-условий приводят к деглутатионилированию данных субъединиц. Эта реакция катализируется глутаредоксином (рис. 2).

Таким образом, глутатионилирование всех трех субъединиц вовлечено в редокс-регуляцию активности Na,K-АТФазы. В зависимости от условий и физиологических стимулов каждое из них играет свою роль, что обеспечивает регуляцию активности Na,K-АТФазы и адаптационный ответ клеток.

#### РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРНОЙ ФУНКЦИИ Na,K-АТФазы

Na,K-АТФаза является единственным известным рецептором к эндогенным КТС [16–20], которые были впервые выделены из растений более 200 лет назад и издавна применялись для лечения хронической сердечной недостаточности. Несмотря на достаточно низкий терапевтический индекс вследствие близости терапевтических и токсичных доз, некоторые КТС, например дигоксин, до сих пор активно используются в терапии



**Рис. 2.** Редокс-регуляция активности Na,K-АТФазы вследствие модификации остатков цистеина  $\beta$ -субъединицы и FXDY1. Физиологические стимулы, приводящие к активации НАДФ-Н-оксидазы (ангiotинезин II (Анг. II), активация  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-адренорецепторов ( $\beta$ 1/ $\beta$ 2-АР), гипергликемия) приводят к росту супероксид-анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), образованию пероксинитрита ( $ONOO^-$ ) и индукции глутатионилирования  $\beta$ -субъединицы. В результате нарушается взаимодействие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц и снижается транспортная активность фермента. Обработка клеток  $ONOO^-$ ,  $H_2O_2$  или нитрозоглутатионом (GSNO) также приводит к индукции глутатионилирования. В присутствии третьей субъединицы FXDY1 под действием данных стимулов в первую очередь происходит индукция ее глутатионилирования, что затрудняет глутатионилирование  $\beta$ -субъединицы и предотвращает ингибирование фермента. Обработка восстановителями, такими как дитиотреитол (ДТТ), или восстановление нормальных редокс-условий при катализе глутаредоксином (GRX), приводят к деглутатионилированию данных субъединиц.

[109]. Связывание КТС с внеклеточной частью  $\alpha$ -субъединицы приводит к фиксации фермента в Е2Р-конформации и останавливает его каталитический цикл. Лечебное действие КТС основано на том, что ингибирование Na,K-АТФазы сердца приводит к возрастанию уровня натрия, что вызывает активацию  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника, возрастанию уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и в конечном итоге к увеличению силы сердечных сокращений [109]. В настоящее время понятно, что КТС не только ингибируют Na,K-АТФазу, но и вызывают активацию целого ряда сигнальных каскадов [17, 110].

Изначально КТС были найдены в растениях и на коже некоторых видов жаб, а затем обнаружены в крови позвоночных [111–115]. Все КТС содержат в своем составе стероидное (циклопентанпергидрофенантроновое) ядро. КТС делятся на два класса – карденолиды и буфадиенолиды. У карденолидов в семнадцатом положении стеро-

идного ядра находится пятичленное лактоновое кольцо, а у буфадиенолидов – шестичленное лактоновое кольцо. Ряд КТС содержит остатки сахара. Карденолиды впервые были выделены из растений, а буфадиенолиды – из амфибий. В организме человека обнаружены представители обоих классов. Первым в плазме крови человека был обнаружен карденолид, эндогенный убаин [116], а затем в плазме и моче был выявлен буфадиенолид, маринобуфагенин [115, 117, 118]. КТС обнаруживаются в крови в наномолярных и субнаномолярных концентрациях. Оба эндогенных КТС являются вазоконстрикторами [119]. Увеличение уровня маринобуфагенина наблюдается при ишемии миокарда [115] и почечной ишемии [120]. КТС вовлечены в развитие некоторых заболеваний, в том числе гипертонии [121]. Присутствие различных КТС в организме предполагает, что их действие на рецепторную функцию Na,K-АТФазы отличается. Действительно, различные КТС мо-

гут обуславливать разные биологические ответы [122]. Так, несмотря на то, что маринобуфагенин и убаин практически одинаково ингибируют Na,K-АТФазу почечных эпителиальных клеток, концентрации этих ингибиторов, приводящие к гибели 50% клеток, отличаются на два порядка [123]. Эксперименты с очищенным препаратом Na,K-АТФазы показали, что связывание убаина и маринобуфагенина индуцирует разные конформационные изменения в молекуле белка, что может быть причиной связывания различных белков партнеров и активации разных сигнальных каскадов [124].

КТС выполняют роль гормонов и продуцируются средним мозгом и надпочечниками при гипоксии и в ответ на определенные стимулы, такие как ангиотензин II, ацетилхолин, вазопрессин, катехоламины [125]. КТС играют важную роль в патофизиологии эссенциальной гипертензии, преэклампсии, конечной стадии почечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности и сахарного диабета [126]. Функция эндогенных КТС до конца не установлена, однако очевидно, что их действие опосредовано связыванием с Na,K-АТФазой, которое приводит к активации сигнальных каскадов, регулирующих гибель и пролиферацию клеток [20, 127]. Одним из основных и наиболее исследованных компонентов этих каскадов является Src-киназа. Это тирозинкиназа, участвующая в регуляции целого ряда клеточных процессов, в том числе роста, выживаемости и дифференцировки клеток [128, 129]. Активность Src-киназы может регулироваться активирующим и ингибирующим фосфорилированием по остаткам Tyr416 и Tyr527 соответственно. Фосфорилирование по остатку Tyr527 приводит к инактивации киназы, в то время как при дефосфорилировании Tyr527 она становится активной, а фосфорилирование по Tyr416 приводит к еще большему возрастанию ее активности [130–132]. Часть молекул Na,K-АТФазы образует комплекс с Src-киназой. Связывание с Na,K-АТФазой убаина приводит к высвобождению киназного домена Src-киназы из комплекса, что приводит к активации Src-киназы [133] и возрастанию уровня ее активирующего фосфорилирования [128]. Действие убаина на фосфорилирование Src-киназы не зависит от концентраций внутриклеточных ионов, поэтому предполагают, что ингибирование убаином Na,K-АТФазы, наблюдающееся при высоких концентрациях убаина, и активация Src-зависимого сигналинга реализуются по двум независимым регулируемым механизмам [134, 135–137].

На изолированных кардиомиоцитах крысы было показано, что активация сигнальных каскадов через Na,K-АТФазу убаином приводит к увеличению генерации АФК [138–141]. Также убаин стимулирует Na,K-АТФазный сигналинг и

генерацию АФК и в других типах клеток: нейрональных [142], раковых [143], поджелудочной железы [144], почек [145, 146]. В присутствии антиоксиданта N-ацетилцистеина, снижающего уровень АФК, сигналинг нарушается [145]. В то же время устойчивое увеличение АФК в клетках миокарда на уровне, сопоставимом с убаином, также способно активировать каскады, вовлеченные в сигналинг Na,K-АТФазы, в частности, приводит к росту  $Ca^{2+}$ , активации Erk1/2 и гипертрофических маркерных генов [147]. Так, добавление к культуре кардиомиоцитов глюкозооксидазы, приводящее к возрастанию уровня  $H_2O_2$ , активирует сигнальные каскады через Na,K-АТФазу [138].

Как Src-киназа, так и кавеолин (структурный белок кавеол), вовлеченные в рецепторную функцию Na,K-АТФазы, являются редокс-чувствительными и необходимы для формирования редокс-чувствительной сигнальной платформы [148–154]. Ряд данных свидетельствует о том, что базальный уровень АФК необходим для стимуляции каскадов, опосредованных связыванием убаина с Na,K-АТФазой и активации Src-киназы [145, 146]. Показано, что в Src-киназе есть редокс-чувствительные остатки цистеина, окисление которых до SOH приводит к ее активации при возрастании АФК, например, при НАДФ-Н-опосредованном сигналинге [153]. Таким образом, применение антиоксидантов требует тщательного рассмотрения с учетом того, что поддержание редокс-статуса в физиологическом диапазоне важно для эффективного АФК-сигналинга [155].

Поскольку убаин индуцирует рост АФК, возникает вопрос, не может ли сам по себе рост АФК приводить к индукции сигнального каскада, индуцированного Na,K-АТФазой. Добавление перекиси водорода или глюкозооксидазы стимулирует Na,K-АТФазный сигналинг в клетках почек [145–147] и кардиомиоцитах [138, 145, 147]. Обработка антиоксидантами (N-ацетилцистеином или витамином E) нарушает индукцию Na,K-АТФазы/Src-сигналинга убаином и глюкозооксидазой [145, 146]. При этом ингибирование c-Src и Erk1/2 отменяет эффекты АФК-индуцированного синтеза белка, на который не влияет хелатирование внутриклеточного  $Ca^{2+}$  [138]. Необходимо отметить, что ингибирование c-Src-киназы антиоксидантами может блокировать убаин-стимулированную генерацию АФК, но не влияет на индуцированное убаином увеличение  $Ca^{2+}$  [156]. Таким образом, можно сделать вывод, что возрастание  $Ca^{2+}$ , вызванное убаином, не является необходимым для роста АФК [157].

Необходимо отметить, что низкие концентрации убаина приводят к клатрин-зависимому эндоцитозу Na,K-АТФазы, ассоциированной с Src-



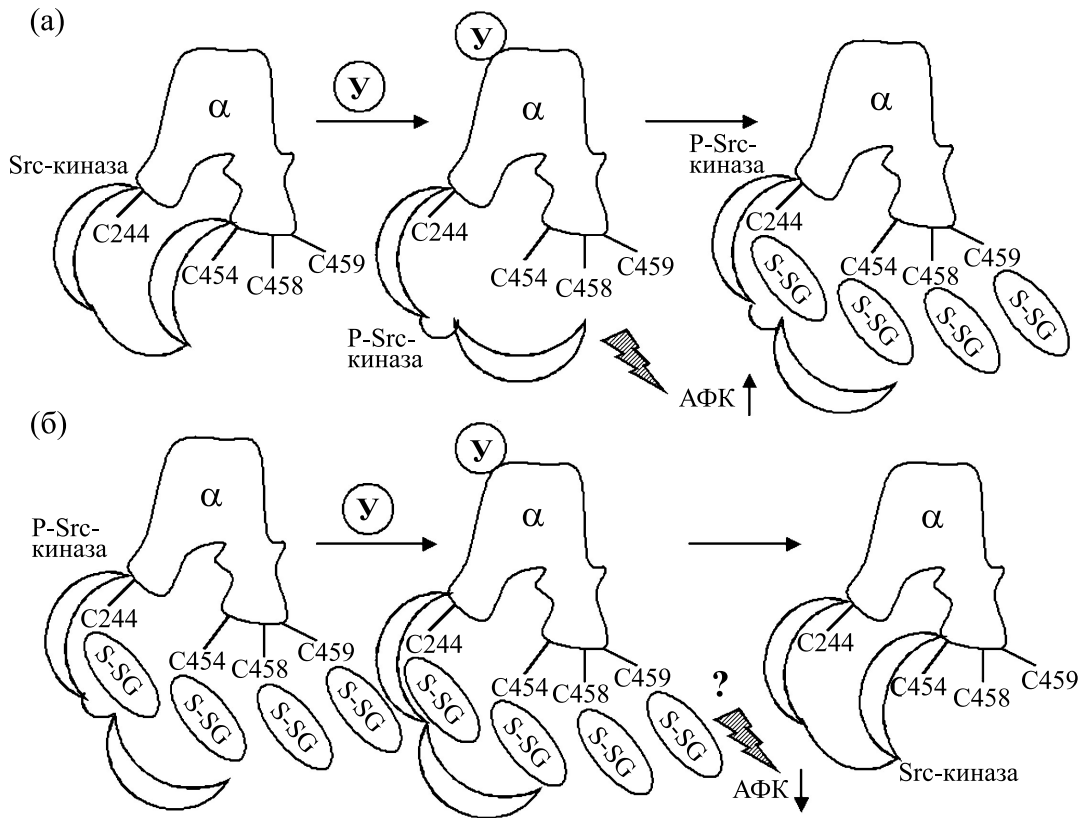
киназой, что может приводить к снижению сигнальной функции и активности Na,K-АТФазы со временем [158]. Есть основания предполагать, что изменение уровня Na,K-АТФазы может зависеть от изоформного состава фермента. Так, убаин приводил к увеличению мРНК  $\alpha 1$ - и  $\beta 1$ -изоформ и снижал при этом уровень мРНК  $\alpha 2$ - и  $\beta 2$ -изоформ [159]. Длительное повышение уровня КТС приводит к развитию гипертрофии и фиброза в тканях сердца и почек [160, 161].

В настоящее время существует следующая модель связывания Na,K-АТФазы с Src-киназой: SH2-домен Src-киназы связан с актуаторным доменом Na,K-АТФазы, а ее киназный домен — с нуклеотидсвязывающим доменом Na,K-АТФазы [162–164]. Взаимодействие Src-киназы с актуаторным доменом более сильное и сохраняется все время, а вот взаимодействие с нуклеотидсвязывающим доменом нарушается при связывании убаина, что приводит к высвобождению киназного домена и активации киназы. КТС-индуцированная активация Src-киназы в дальнейшем может приводить к активации митоген-активируемых киназ, индуцировать каскад через фосфолипазу C или влиять на сигнальный путь, опосредованный PI3-киназой [165]. Для реализации рецепторной функции через связывание с Src-киназой важно, чтобы в составе Na,K-АТФазы была  $\alpha 1$ -изоформа [164, 166], поскольку именно у этой изоформы есть участок взаимодействия с Src [167]. Однако интересно отметить, что фермент, имеющий в составе тканеспецифичную  $\alpha 3$ -изоформу каталитической субъединицы, реагирует на стимуляцию низкими дозами убаина с активацией Erk1/2-киназы, но не Src-киназы [166, 168]. Таким образом, возможен клеточный сигналинг, независимый от активации Src-киназы.

Необходимо отметить также, что кроме модели прямого взаимодействия Src-киназы с Na,K-АТФазой существуют и другие, менее исследованные модели, например модель, объясняющая активацию Src-киназы под действием убаина ее временным взаимодействием с комплексом  $\alpha 1$ -Na,K-АТФаза-кавеолин-1 [169], или модель, в которой активация с-Src-киназы регулируется изменением соотношения АТФ/АДФ и низкими концентрациями  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  (обе эти модели были протестированы лишь в бесклеточной системе) [170, 171]. Было высказано предположение, что поскольку все модели объединяет то, что в результате стабилизируется E2P-конформация белка, а переход E2P–E1P замедляется (в присутствии КТС и/или из-за энергетического статуса клетки), то именно это замедление регулирует сигнальную функцию Na,K-АТФазы [157]. Ведущая роль изменения конформации Na,K-АТФазы в реализации сигналинга представляется наиболее вероятной. В пользу этого свидетельствует тот факт, что связывание маринобуфагенина и уба-

ина, которые вызывают различные биологические ответы, приводит к разным изменениям конформации фермента [172]. В настоящее время все большее развитие получает представление о Na,K-АТФазе как о «стыковочной станции» для различных белков. Известны более десяти белков, которые могут связываться с ней и взаимодействовать с некоторыми из них регулируется КТС [165]. Очевидно, что изменение конформации Na,K-АТФазы играет в регуляции связывания белков-партнеров важную роль. Так, например, некоторые белки (PI3-киназа, кавеолин, анкирин, проапоптотический белок Bcl-2) имеют перекрывающиеся сайты связывания в актуаторном домене Na,K-АТФазы и, следовательно, не могут связываться одновременно [164, 173–175]. Можно предположить, что КТС, стабилизирующие Na,K-АТФазу в разных конформациях, создают преимущества для связывания с ней разных белков-партнеров.

Несмотря на широкое применение экзогенных КТС и активное исследование роли эндогенных КТС, долгое время оставалось неясным, как гипоксия и иные изменения редокс-статуса клетки влияют на рецепторную функцию Na,K-АТФазы. Как уже было отмечено выше, некоторые виды млекопитающих отвечают на гипоксию увеличением уровня КТС в крови. Высказывались предположения, что убаин может защищать сердце от ишемии-реперфузии за счет активации Src-киназы [176]. На клетках фибробластов мышцы линии SC1 [177] и на клетках эмбриональной почки человека [60] было обнаружено, что в условиях гипоксии действие убаина на клетки изменяется. В условиях острой гипоксии инкубация клеток с убаином не приводит к активации Src-киназы, которое наблюдается в клетках, находящихся при 20% кислорода [177]. Напротив, ее активирующее фосфорилирование снижается по сравнению с необработанными убаином клетками, находящимися в гипоксии [60, 177]. При этом в условиях острой гипоксии уровень активирующего фосфорилирования Src-киназы повышен по сравнению с контролем [60, 177]. Вероятно, это связано с активацией Src-киназы под действием повышенного уровня АФК вследствие модификации остатков цистеина [153], поскольку, как уже говорилось выше, уровень АФК в условиях гипоксии возрастает [8, 177]. Добавление убаина, которое в обычных условиях вызывает рост АФК, в условиях гипоксии приводит к снижению индуцированного гипоксией роста АФК [177]. Возможно, именно вследствие этого при добавлении убаина активация Src-киназы снижается [60]. Важно отметить, что высокие дозы убаина, которые при 20%  $\text{pO}_2$  через 24 ч инкубации приводят к снижению жизнеспособности клеток, в условиях гипоксии (0.05%  $\text{pO}_2$ ) не оказывают цитотоксического действия или даже повышают жизнеспособность клеток [177]. Таким



**Рис. 3.** Схематическое представление механизма редокс-регуляции рецепторной функции Na,K-АТФазы вследствие модификации остатков цистеина  $\alpha$ -субъединицы. (а) – В условиях нормоксии Src-киназа связана с актуаторным и нуклеотидсвязывающим доменом Na,K-АТФазы. Связывание убаина (Y) приводит к диссоциации киназного домена Src-киназы от нуклеотидсвязывающего домена Na,K-АТФазы и активации Src-киназы. Вследствие этого начинается рост АФК, что приводит к глутатионилированию регуляторных остатков цистеина Na,K-АТФазы в нуклеотидсвязывающем домене и присоединение к нему киназного домена Src-киназы становится невозможным. (б) – Гипоксия и последующий рост АФК приводят к глутатионилированию регуляторных остатков цистеина и диссоциации Src-киназы от нуклеотидсвязывающего домена даже в отсутствие убаина, что приводит к ее активации. Связывание убаина с Na,K-АТФазой в условиях гипоксии приводит к снижению АФК, что индуцирует деглутатионилирование Na,K-АТФазы и ингибирование Src-киназы вследствие восстановления связывания ее киназного домена с нуклеотидсвязывающим доменом Na,K-АТФазы.

образом, в условиях гипоксии рецепторная функция Na,K-АТФазы существенно меняется, что необходимо учитывать при терапевтическом использовании КТС. С другой стороны, в присутствии убаина клетки становятся менее чувствительны к гипоксии. Следовательно, одной из физиологических функций КТС действительно может быть их протекторное действие при ишемии и гипоксии. Вопрос о механизме изменения рецепторной функции при гипоксии пока остается открытым.

Эксперименты по точечному мутагенезу показали, что замена остатка Cys244 на аланин, которая приводит к утрате регуляторного цистеина и предотвращает ингибирование фермента GSSG, не влияет на рецепторную функцию Na,K-АТФазы. Однако замена трех остатков цистеина Cys454-458-459 на аланин нарушает активацию Src-киназы в ответ на убаин или гипоксию, делая ее нечувствительной к данным стимулам [60]. Была

создана трехмерная модель комплекса «Na,K-АТФаза:Src-киназа» на основе  $\alpha\beta 1$ -изозима Na,K-АТФазы из почек свиньи (PDB 3wgu) и человеческой Src-киназы (PDB 2src). Докинг Src-киназы и нуклеотидсвязывающего домена Na,K-АТФазы показал, что остатки цистеина Cys454-458-459 находятся вблизи интерфейса взаимодействия этих белков. Более того, по данным моделирования S-глутатионилирование остатков Cys58 и Cys59 нарушает связывание Src-киназы с нуклеотидсвязывающим доменом Na,K-АТФазы [60]. Таким образом, одной из причин изменения рецепторной функции Na,K-АТФазы при гипоксии является нарушение взаимодействия глутатионилированной Na,K-АТФазы с Src-киназой.

Можно предположить следующий механизм редокс-чувствительности рецепторной функции Na,K-АТФазы (рис. 3). В условиях нормоксии связывание убаина приводит к диссоциации ки-

назного домена Src-киназы от нуклеотидсвязывающего домена Na,K-АТФазы и активации Src-киназы [162–164]. Вследствие этого начинается рост АФК [157, 177], что приводит к глутатионилированию регуляторных остатков цистеина Na,K-АТФазы в нуклеотидсвязывающем домене, и присоединение к нему киназного домена Src-киназы становится невозможным [60]. Гипоксия и последующий рост АФК приводят к глутатионилированию регуляторных остатков цистеина и вызывают диссоциацию Src-киназы от нуклеотидсвязывающего домена даже в отсутствие убаина, что приводит к ее активации [60, 177]. Связывание убаина с Na,K-АТФазой в условиях гипоксии приводит к снижению АФК [177], что, по-видимому, индуцирует деглутатионилирование Na,K-АТФазы и последующее ингибирование Src-киназы [60, 177] вследствие восстановления связывания ее киназного домена с нуклеотидсвязывающим доменом Na,K-АТФазы (рис. 3).

Таким образом, есть несколько причин редокс-чувствительности рецепторной функции Na,K-АТФазы: во-первых, это редокс-зависимые модификации остатков цистеина самой Na,K-АТФазы, которые могут влиять на связывание с Src-киназой и взаимодействие с КТС; во-вторых, изменение активности Src-киназы и иных участников сигнального каскада и, в-третьих, петля обратной связи, заключающаяся в том, что связывание КТС с Na,K-АТФазой само влияет на редокс-статус клеток [60, 157].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно заключить, что редокс-зависимые модификации тиоловых групп Na,K-АТФазы – глутатионилирование и нитрозилирование – играют важную роль в регуляции транспортной и рецепторной функции фермента в норме и патологии. В зависимости от условий и физиологических стимулов определяющим для регуляции активности Na,K-АТФазы и адаптационного ответа клеток может являться изменение уровня глутатионилирования/нитрозилирования каталитической ( $\alpha$ ) или регуляторных субъединиц фермента ( $\beta$ , FXYD). Однако пока нет полного понимания согласованной редокс-регуляции всех трех субъединиц Na,K-АТФазы. Необходимо создание единой картины регуляции различных субъединиц фермента при изменении редокс-условий, обеспечивающей изменение его функционирования как целого. Только в этом случае будет возможно предотвращать и корректировать редокс-зависимые нарушения функционирования фермента, жизненно необходимого для каждой клетки нашего организма. Мы надеемся, что дальнейшие исследования редокс-регу-

ляции транспортной и рецепторной функции Na,K-АТФазы дадут ответы на вопросы, поставленные в данном обзоре.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00374).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. H. Kaplan, *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 511 (2002).
2. S. N. Orlov, A. A. Platonova, P. Hamet, and R. Grygorczyk, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **305** (4), C361 (2013).
3. M. J. Shattock, M. Ottolia, D. M. Bers, et al., *J. Physiol. (Lond.)* **593**, 1361 (2015).
4. D. Dobrota, M. Matejovicova, E.G. Kurella, and A. A. Boldyrev, *Cell. Mol. Neurobiol.* **19** (1), 141 (1999).
5. I. Petrushanko, N. Bogdanov, E. Bulygina, et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R916 (2006).
6. I. Y. Petrushanko, N. B. Bogdanov, N. Lapina, et al., *J. Gen. Physiol.* **130**, 389 (2007).
7. A. Bogdanova, I. Petrushanko, A. Boldyrev, and M. Gassmann, *Curr. Enzyme Inhibit.* **2**, 37 (2006).
8. A. Bogdanova, I. Y. Petrushanko, P. Hernansanz-Agustin, and A. Martínez-Ruiz, *Front. Physiol.* **7**, 314 (2016).
9. J. J. Mieyal, M. M. Gallogly, S. Qanungo, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1941 (2008).
10. F. Q. Schafer and G. R. Buettner, *Free Radic. Biol. Med.* **30** (11), 1191 (2001).
11. S. Suzuki, M. Noda, M. Sugita, et al., *J. Appl. Physiol.* **87** (3), 962 (1999).
12. R. Carini, M. G. De Cesaris, R. Splendore, et al., *Hepatology* **31** (1), 166 (2000).
13. A. Y. Bogdanova, O. O. Ogunshola, C. Bauer, and M. J. Gassmann, *Membr. Biol.* **195** (1), 33 (2003).
14. A. Boldyrev and E. Kurella, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222** (2), 483 (1996).
15. E. G. Kurella, O. V. Tyulina, and A. A. Boldyrev, *Cell. Mol. Neurobiol.* **19** (1), 133 (1999).
16. A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro, and O. V. Fedorova, *Pharmacol. Rev.* **61**, 9 (2009).

17. A. O. Del Toro, L. Jimenez, L. Hinojosa, et al., *Cardiol. Res. Pract.* **2019**, 8646787 (2019).
18. M. Haas, H. Wang, J. Tian, and Z. Xie, *J. Biol. Chem.* **277**, 18694 (2002).
19. M. Simonini, P. Casanova, L. Citterio, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **19** (7), 1948 (2018).
20. J. X. Xie, X. Li, and Z. Xie. *IUBMB Life* **65** (12), 991 (2013).
21. D. C. Chow and J. G. Forte, *J. Exp. Biol.* **198**, 1 (1995).
22. G. Scheiner-Bobis, *Eur. J. Biochem.* **269**, 2424 (2002).
23. L. Segall, Z. Z. Javaid, S. L. Carl, et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 9027 (2003).
24. P. L. Jorgensen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 22 (2003).
25. C. Lupfert, E. Grell, V. Pintschovius, et al., *Biophys. J.* **81**, 2069 (2001).
26. S. J. Karlsh, *J. Bioenerg. Biomembr.* **12**, 111 (1980).
27. И. Ю. Петрушанко, В. А. Митькевич, В. А. Борзова и др., *Биофизика* **54** (6), 1019 (2009).
28. A. V. Grinberg, N. M. Gevondyan, N. V. Grinberg, and V. Y. Grinberg, *Eur. J. Biochem.* **268** (19), 5027 (2001).
29. R. Kanai, H. Ogawa, B. Vilsen, et al., *Nature* **502**, 201 (2013).
30. J. P. Morth, B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, et al., *Nature* **450**, 1043 (2007).
31. T. Clausen, *Physiol. Rev.* **83**, 1269 (2003).
32. J. Lingrel, A. Moseley, I. Dostanic, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **986**, 354 (2003).
33. A. E. Moseley, S. P. Lieske, R. K. Wetzel, et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 5317 (2003).
34. P. Ostadal, A. B. Elmoselhi, I. Zdobnicka, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 457 (2003).
35. L. Peng, P. Martin-Vasallo, and K. J. Sweadner, *J. Neurosci.* **17**, 3488 (1997).
36. R. K. Wetzel, E. Arystarkhova, and K. J. Sweadner, *J. Neurosci.* **19**, 9878 (1999).
37. Sundaram S.M., D. Safina, A. Ehrkamp, et al., *Neurochem. Int.* **128**, 163 (2019).
38. G. Blanco, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 536 (2003).
39. A. Katz, Y. Lifshitz, E. Bab-Dinitz, et al., *J. Biol. Chem.* **285** (25), 19582 (2010).
40. A. Scirè, L. Cianfruglia, C. Minnelli, et al., *Biofactors* **45** (2), 152 (2019).
41. J. G. Reich and E. E. Sel'kov, *Energy metabolism of the cell: a theoretical treatise* (Acad. Press, N. Y., 1981).
42. H. Sies, In *Metabolic Compartmentation* (Acad. Press, Lond., 1982), p. 205.
43. А. Болдырев, Е. Булыгина, О. Герасимова и др., *Биохимия* **69** (4), 530 (2004).
44. A. A. Boldyrev, In: *Molecular and Therapeutical Aspects of RedOx Biochemistry*, Ed. by T. Bahorun and A. Gurib-Fakim (OICA, 2003), p. 59.
45. Z. Xie, M. Jack-Hays, Y. Wang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 155 (1995).
46. K. Y. Xu, J. L. Zweier, and L.C. Becker, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **834**, 680 (1997).
47. C. Gatto, S. J. Thornewell, J. P. Holden, and J. H. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **274** (35), 24995 (1999).
48. I. Yu. Petrushanko, S. Yakushev, V. A. Mitkevich, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 32195 (2012).
49. F. Thevenod and J. M. Friedmann, *FASEB J.* **13**, 1751 (1999).
50. A. Ziegelhoffer, K. Kjeldsen, H. Bundgaard, et al., *Gen. Physiol. Biophys.* **19** (1), 9 (2000).
51. M. Erecinska and I. A. Silver, *Prog. Neurobiol.* **43**(1), 37 (1994).
52. M. Inoue, N. Fujishiro, and I. Imanaga *J. Physiol.* **519**, 385 (1999).
53. T. Clausen, *Physiol. Rev.* **83** (4), 1269 (2003).
54. H. G. Shi, L. Mikhaylova, A. E. Zichittella, and J. M. Arguello, *Biochim. Biophys. Acta* **1464**, 177 (2000).
55. V. A. Mitkevich, I. Y. Petrushanko, Y. M. Poluektov, et al., *Oxid. Med. Cell Longev.* 9092328 (2016).
56. G. A. Figtree, C. C. Liu, S. Bibert, et al., *Circ. Res.* **105** (2), 185 (2009).
57. S. Bibert, C. C. Liu, G. A. Figtree, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 18562 (2011).
58. J. J. Mieyal, M. M. Gallogly, S. Qanungo, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **10** (11), 1941 (2008).
59. S. Yakushev, M. Band, M. C. Tissot VanPatot, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **303**, H1332 (2012).
60. I.Y. Petrushanko, V. A. Mitkevich, V. A. Lakunina, et al., *Redox Biol.* **13**, 310 (2017).
61. И. Ю. Петрушанко, О. В. Симоненко, К. М. Бурнышева и др., *Молекуляр. биология* **49**, 175 (2015).
62. C. Juel, *PLoS One* **9** (10), e110514 (2014).
63. C. Juel, M. Hostrup, and J. Bangsbo, *Physiol. Rep.* **3** (8), e12515 (2015).
64. С. Мэн, И. Ю. Петрушанко, Е. А. Климанова и др., *Биохимия* **79** (2), 209 (2014).
65. Y. M. Poluektov, I. Y. Petrushanko, N. A. Undrovinas, et al., *Sci. Rep.* **9** (1), 4872 (2019).
66. Е. А. Дергусова, И. Ю. Петрушанко, Е. А. Климанова и др., *Молекуляр. биология* **52** (2), 289 (2018).
67. Е. А. Дergousova, I. Y. Petrushanko, Е. А. Klimanova, et al., *Biomolecules* **7** (1), 18 (2017).
68. S. Despa, J. B. Lingrel, and D. M. Bers, *Cardiovasc. Res.* **95**, 480 (2012).
69. Z. Xie, M. Jack-Hays, Y. Wang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 155 (1995).
70. A. Chandra, S. Srivastava, J. M. Petrash, et al., *Biochemistry* **36** (50), 15801 (1997).
71. I. Y. Petrushanko, V. A. Mitkevich, A. A. Anashkina, et al., *Sci. Rep.* **4**, 5165 (2014).

72. Y. M. Poluektov, E. A. Dergousova, O. D. Lopina, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **510** (1), 86 (2019).
73. Е. А. Дегоусова, Ю. М. Полуэктов, Е. А. Климанова и др., *Биохимия* **83** (8), 1220 (2018).
74. V. Srinivasan, A. J. Pierik, and R. Lill, *Science* **343** (6175), 1137 (2014).
75. C. C. Liu, K. Galougahi, R. M. Weisbrod, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 563 (2013).
76. H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius, and C. Toyoshima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13742 (2009).
77. C. C. Liu, A. Garcia, Y. A. Mahmmoud, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 12353 (2012).
78. A. Garcia, N. D. Eljack, M. A. Sani, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 2430 (2015).
79. S. P. Barwe, S. Kim, S. A. Rajasekaran, et al., *J. Mol. Biol.* **365**, 706 (2007).
80. I. Dalle-Donne, R. Rossi, G. Colombo, et al., *Trends Biochem. Sci.* **34**, 85 (2009).
81. C. N. White, C. C. Liu, A. Garcia, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 13712 (2010).
82. D. Pavlovic, W. Fuller, and M. J. Shattock, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **61**, 83 (2013).
83. W. Fuller, V. Parmar, P. Eaton, et al., *Cardiovasc. Res.* **57**, 1044 (2003).
84. R. G. Boutilier, *J. Exp. Biol.* **204** (18), 3171 (2001).
85. M. Habeck, et al., *J. Biol. Chem.* **291**, 23159 (2016).
86. H.-J. Apell, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **150**, 1 (2003).
87. L. T. Buck and M. E. Pamerter, *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* **224**, 61 (2018).
88. L. T. Buck and P. W. Hochachka, *Am. J. Physiol.* **265**, R1020 (1993).
89. P. W. Hochachka, L. T. Buck, C. J. Doll, and S. C. Land, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9493 (1996).
90. P. Hylland, S. Milton, M. Pek, et al., *Neurosci. Lett.* **235**, 89 (1997).
91. M. P. Wilkie, M. E. Pamerter, S. Alkabile, et al., *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **148**, 355 (2008).
92. A. P. Ross, S. L. Christian, H. W. Zhao, and K. L. Drew, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 1148 (2006).
93. W. M. Johnson, A. L. Wilson-Delfosse, and J. J. Mieyal, *Nutrients* **4**, 1399 (2012).
94. S. Akterin, R. F. Cowburn, A. Miranda-Vizuete, et al., *Cell Death and Differentiation* **13**, 1454 (2006).
95. C. B. Pocerich and D. A. Butterfield, *Biochim. Biophys. Acta.* **1822** (5), 625 (2012).
96. L. N. Zhang, Y. J. Sun, S. Pan, et al., *Fundam. Clin. Pharmacol.* **27**, 96 (2013).
97. V. M. Vitvitsky, S. K. Garg, R. F. Keep, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 1671 (2012).
98. C. Kairane, R. Mahlapuu, K. Ehrlich, et al., *Curr. Alzheimer Res.* **11**, 79 (2014).
99. C. A. Dickey, M. N. Gordon, D. M. Wilcock, et al., *BMC Neurosci.* **2**, 1 (2005).
100. I. Y. Petrushanko, V. A. Mitkevich, A. A. Anashkina, et al., *Sci. Rep.* **6**, 27738 (2016).
101. В. А. Лакунина, И. Ю. Петрушанко, К. М. Бурнышева и др., *Докл. РАН* **473** (3), 374 (2017).
102. R. R. Dyer, K. I. Ford, and R. A. S. Robinson, *Methods Enzymol.* **626**, 499 (2019).
103. K. Chia, C. C. Liu, E. J. Hamilton, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **309**, 239 (2015).
104. S. M. Rahaman, K. Dey, T. Chakraborti, and S. Chakraborti, *Ind. J. Biochem. Biophys.* **52** (2), 119 (2015).
105. H. Bundgaard, C. C. Liu, A. Garcia, et al., *Circulation.* **122**, 2699 (2010).
106. S. Moniotte, L. Kobzik, O. Feron, et al., *Circulation* **103**, 1649 (2001).
107. K. Galougahi, C. C. Liu, A. Garci, et al., *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **309** (5), 286 (2015).
108. V. M. Altan, E. Arioglu, S. Guner, and A. T. Ozcelikay, *Heart Fail. Rev.* **12**, 58 (2007).
109. F. M. Botelho, F. Pierezan, B. Soto-Blanco, and M. M. Melo, *Toxicon.* **158**, 63 (2019).
110. A. A. Shiyani, L. V. Kapilevich, A. V. Lopachev, et al., *PLoS One* **14** (9), e0222767 (2019).
111. J. M. Hamlyn, M. P. Blaustein, S. Bova, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6259–6263 (1991).
112. R. S. Kieval, V. P. J. Butler, F. Derguini, et al., *Am. Coll. Cardiol.* **11**, 637 (1988).
113. D. Lichtstein, I. Gati, and H. J. Ovadia, *Cardiovasc. Pharmacol.* **22**, S102 (1993).
114. A. Hollman, *Br. Heart J.* **54** (3), 258 (1985).
115. A. Y. Bagrov, O. V. Fedorova, R. I. Dmitrieva, et al., *Hypertension* **31**, 1097 (1998).
116. J. H. Ludens, M. A. Clark, D. W. Du Charme, et al., *Hypertension* **17**, 923 (1991).
117. O. V. Fedorova, P. A. Doris, and A. Y. Bagrov, *Clin. Exp. Hypertens.* **20**, 581–591 (1998).
118. H. C. Gonick, Y. Ding, N. D. Vaziri, et al., *Clin. Exp. Hypertens.* **20**, 617 (1998).
119. A. Y. Bagrov and O. V. Fedorova, *J. Hypertens.* **16**, 1953 (1998).
120. J. Tian, S. Haller, S. Periyasamy, et al., *Hypertension* **56**, 914 (2010).
121. W. Schoner and G. Scheiner-Bobis, *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **7**, 173 (2007).
122. M. Dvela, H. Rosen, T. Feldmann, et al., *Pathophysiology* **14**, 159 (2007).
123. O. A. Akimova, A. Y. Bagrov, O. D. Lopina, et al., *J. Biol. Chem.* **280**, 832 (2005).

124. E. A. Klimanova, I. Y. Petrushanko, V. A. Mitkevich, et al., *FEBS Lett.* **589**, 2668 (2015).
125. C. De Angelis and G. T. Hauptert, *Am. J. Physiol.* **274**, F182 (1998).
126. A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro, and O. V. Fedorova, *Pharmacol. Rev.* **61**, 9 (2009).
127. R. S. El-Mallakh, K. S. Brar, and R. R. Yeruva, *Insects* **10** (4), 102 (2019).
128. M. Haas, H. Wang, J. Tian, and Z. Xie, *J. Biol. Chem.* **277**, 18694 (2002).
129. G. A. Knock, V. A. Snetkov, Y. Shaifta, et al., *Cardiovasc. Res.* **80**, 453 (2008).
130. A. MacAuley and J. A. Cooper, *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2648 (1989).
131. W. Xu, S. C. Harrison, and M. J. Eck, *Nature* **385**, 595 (1997).
132. S. W. Cowan-Jacob, G. Fendrich, P. W. Manley, et al., *Structure* **13**, 861 (2005).
133. J. Tian, T. Cai, Z. Yuan, et al., *Mol. Biol. Cell.* **17**, 317 (2006).
134. J. Liu, J. Tian, M. Haas, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 27838 (2000).
135. M. Haas, A. Askari, and Z. Xie, *J. Biol. Chem.* **275**, 27832 (2000).
136. A. Aydemir-Koksoy, J. Abramowitz, and J. C. Allen, *J. Biol. Chem.* **276**, 46605 (2001).
137. M. Haas, H. Wang, J. Tian, Z. Xie, *J. Biol. Chem.* **277**, 18694 (2002).
138. L. Liu, J. Li, J. Liu, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 1548 (2006).
139. J. Liu, J. Tian, M. Haas, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 27838 (2000).
140. J. Tian, J. Liu, K. D. Garlid, et al., *Mol. Cell Biochem.* **242**, 181 (2003).
141. Z. Xie, P. Kometiani, J. Liu, et al., *J. Biol. Chem.* **274**, 19323 (1999).
142. A. Boldyrev, E. Bulygina, M. Yuneva, and W. Schoner, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 519 (2003).
143. Y. T. Huang, S. C. Chueh, C. M. Teng, J. H. Guh, *Biochem. Pharmacol.* **67**, 727 (2004).
144. M. Kajikawa, S. Fujimoto, Y. Tsuura, et al., *Diabetes* **51**, 2522 (2002).
145. Y. Yan, A. P. Shapiro, S. Haller, et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 34249 (2013).
146. Y. Yan, A. P. Shapiro, B. R. Mopidevi, et al., *J. Am. Heart Assoc.* **5**, e003675 (2016).
147. Y. Wang, Q. Ye, C. Liu, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **71**, 415 (2014).
148. A. Y. Zhang, F. Yi, G. Zhang, et al., *Hypertension* **47**, 74 (2006).
149. W. Han, H. Li, V. A. M. Villar, et al., *Hypertension* **51**, 481 (2008).
150. P. N. Seshiah, D. S. Weber, P. Rocic, et al., *Circ. Res.* **91**, 406 (2002).
151. R. M. Touyz, G. Yao, and E. L. Schirin, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 981 (2003).
152. K. J. Bubb, A. B. Birgisdottir, O. Tang, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **109**, 61 (2017).
153. D. E. Heppner, C. M. Dustin, C. Liao, et al., *Nat. Commun.* **9** (1), 4522 (2018).
154. E. Giannoni and P. Chiarugi, *Antioxid. Redox Signal.* **20** (13), 2011 (2014).
155. A. C. Montezano, R. M. Touyz, *Antioxid. Redox Signal.* **20** (1), 164 (2014).
156. J. Tian, X. Gong, and Z. Xie, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281** (5), H1899 (2001).
157. R. D. Pratt, C. R. Brickman, C. L. Cottrill, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2600 (2018).
158. J. Liu, M. Liang, L. Liu, et al., *Kidney Int.* **67**, 1844 (2005).
159. R. Hosoi, T. Matsuda, S. Asano, et al., *J. Neurochem.* **69** (5), 2189 (1997).
160. D. J. Kennedy, S. Vetteth, S. M. Periyasamy, et al., *Hypertension* **47**, 488 (2006).
161. F. K. Khalaf, P. Dube, A. Mohamed, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **19**(9), E2576 (2018).
162. M. Banerjee, Q. Duan, Z. Xie, *PLoS One* **10**, e0142119 (2015).
163. Z. Li, T. Cai, J. Tian, et al., *J. Biol. Chem.* **284**, 21066 (2009).
164. Z. Li and Z. Xie, *Pflug. Arch.* **457**, 635 (2009).
165. L. Reinhard, H. Tidow, M. J. Clausen, and P. Nissen, *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 205 (2013).
166. L. V. Karpova, E. R. Bulygina, and A. A. Boldyrev, *Cell Biochem. Funct.* **28** (2), 135 (2010).
167. H. Yu, X. Cui, J. Zhang, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **314**, C202 (2018).
168. N. Madan, Y. Xu, Q. Duan, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **00199**, 02016 (2016).
169. E. Yosef, A. Katz, Y. Peleg, et al., *J. Biol. Chem.* **291**, 11736 (2016).
170. K. M. Weigand, H. G. Swarts, N. U. Fedosova, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1269 (2012).
171. M. E. Gable, S. L. Abdallah, S. M. Najjar, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 1151 (2014).
172. E. A. Klimanova, I. Yu. Petrushanko, V. A. Mitkevich, et al., *FEBS Lett.* **589**, 2668 (2015).
173. P. K. Lauf, T. Alqahtani, K. Flues, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **308**, C51 (2015).
174. P. K. Lauf, J. Heiny, J. Meller, et al., *Cell. Physiol. Biochem.* **3**, 257 (2013).
175. G. A. Morrill, A. B. Kostellow, and A. Askari, *Steroids* **77**, 1160 (2012).
176. P. Pasdois, C. L. Quinlan, A. Rissa, et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H1470 (2007).
177. В. А. Лакунина, К. М. Бурнышева, В. А. Митькевич и др., *Молекуляр. биология* **51**, 172 (2017).

## Molecular Mechanisms of Redox Regulation of the Na,K-ATPase

I.Yu. Petrushanko, V.A. Mitkevich, and A.A. Makarov

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,  
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

This review is dedicated to the molecular mechanisms of redox regulation of the Na,K-ATPase. The Na,K-ATPase creates a transmembrane gradient for the ions of sodium and potassium, which is necessary for the vital activity of all animal cells, and is also a receptor for cardiotonic steroids that regulate cell proliferation and apoptosis. The functioning of the Na,K-ATPase depends on redox status in the cells. Initially, it was shown that the enzyme is inhibited during oxidative stress, but it is now clear that redox regulation of Na,K-ATPase activity is a complex process and cannot be explained only by oxidative damage to the protein. The activity of the enzyme is maximal under physiological oxygen concentration and decreased by both hypoxia and hyperoxia, as well as due to decreased or increased intracellular glutathione concentration. Thus, the Na,K-ATPase reaches its maximal activity within a specific range of redox conditions. Today, it is obvious that a disturbance of the Na,K-ATPase activity in a number of pathologies such as hypoxia, ischemia, diabetes, Alzheimer's disease is associated with a change in redox status in the cells. Receptor function of the Na,K-ATPase also depends on redox status in the cells and should be taken into account while studying the effects of cardiotonic steroids on cells and tissues. In this review special focus is placed on redox modifications of thiol groups of various Na,K-ATPase subunits and on study of the regulatory processes in which these subunits are involved in normal and pathological conditions. Gaining insight into the molecular mechanisms of redox regulation can help us to understand what is needed to prevent the impairment of Na,K-ATPase function in pathological conditions thereby reducing cell damage.

*Keywords: Na,K-ATPase, redox regulation, glutathionylation, nitrosylation, oxidation, cysteine residues, cardiotonic steroids*