

УДК 577.1

## ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ К КАРДИОТОНИЧЕСКИМ СТЕРОИДАМ $\alpha 1$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы ИЗ ПОЧЕК ПРИ СВЯЗЫВАНИИ УАБАИНА, ДИГОКСИНА И МАРИНОБУФАГЕНИНА

© 2020 г. А. М. Тверской<sup>a</sup>, В. А. Локтева<sup>b</sup>, С. Н. Орлов<sup>a, c, d</sup>, О. Д. Лопина<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

<sup>b</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119234 Россия

<sup>c</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

<sup>d</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: od\_lopina@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2019 г.

После доработки 17.05.2019 г.

Принята к публикации 28.05.2019 г.

Известно, что сродство  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы к кардиотоническим стероидам (КТС) у грызунов примерно в 1000 раз меньше, чем у других млекопитающих. В клетках грызунов экспрессируется  $\alpha 1$ -резистентная ( $\alpha 1R$ ) к действию КТС изоформа  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы, в то время как в клетках других млекопитающих –  $\alpha 1$ -чувствительная (sensitive) ( $\alpha 1S$ ) изоформа. Ранее установлено, что добавление уабаина в концентрациях, полностью ингибирующих  $\alpha 1$ -изоформу  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы, приводит к смерти эндотелиальных и гладкомышечных клеток человека ( $\alpha 1S$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза), но не крысы ( $\alpha 1R$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза). Ключевую роль в процессе выживания и смерти клеток играют конформационные переходы, которые происходят при связывании КТС с ферментом. В данной работе был проведен анализ продуктов трипсинолиза  $\alpha 1$ -субъединицы в двух основных конформациях  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы (E1 и E2-P) для доказательства существования различий в конформации  $\alpha 1R$ - и  $\alpha 1S$ -субъединиц  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы, которые индуцируются связыванием трех КТС: двух карденолидов (уабаин, дигоксин) и одного буфадиинолида (маринобуфагенин). Обработка трипсином  $\alpha 1S$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы из почек свиньи в конформации E1 приводит к существенному снижению количества  $\alpha 1S$ -субъединицы, появлению фрагментов с молекулярной массой 40, 35, 23 и 19 кДа. При преинкубации этого фермента с 1 мМ уабаина и дигоксина также наблюдается снижение количества  $\alpha 1S$ -субъединицы, увеличение количества полипептидного фрагмента с молекулярной массой около 40 кДа и существенное возрастание количества белка с молекулярной массой 35.5 кДа, который не обнаруживается после преинкубации фермента с маринобуфагенином (1 мМ). В отсутствие КТС трипсинолиз  $\alpha 1S$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы в конформации E2-P приводит к уменьшению количества  $\alpha 1$ -субъединицы, увеличению количества продуктов протеолиза с молекулярной массой 40 кДа и 35.5 кДа. Преинкубация фермента в этой конформации с любым из исследуемых КТС вызывает появление большого количества дополнительного фрагмента с молекулярной массой 45 кДа. Преинкубация  $\alpha 1R$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы из почек крысы с любым из исследованных КТС не изменяет набора продуктов протеолиза и их молекулярной массы в случае пребывания фермента в обеих конформациях (E1 и E2-P). Предполагается, что структура центра связывания КТС и конформационный ответ на их связывание с  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азой в значительной степени определяются первичной структурой ее  $\alpha 1$ -субъединицы.

**Ключевые слова:**  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза, конформация E1, конформация E2-P, кардиотонические стероиды, трипсинолиз

DOI: 10.31857/S0233475520010089

### ВВЕДЕНИЕ

$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза – АТФ-аза Р-типа, осуществляющая обмен трех ионов внутриклеточного натрия на два иона внеклеточного калия против

электрохимического градиента. В состав фермента входят как минимум два типа субъединиц: каталитическая  $\alpha$ - и регуляторная  $\beta$ -субъединица с молекулярными массами ~100 кДа и ~55–65 кДа соответственно. В ходе катализа фермент пребы-

вает в двух основных конформациях (E1 и E2), которые обладают разным сродством к ионам натрия и калия. Для E1-конформации характерно более высокое сродство к  $\text{Na}^+$ , для E2 — к  $\text{K}^+$ . Процесс катализа сопряжен с переносом концевой фосфорильной группы АТФ на консервативный остаток аспарагиновой кислоты активного центра фермента в конформации E1 (с образованием E1-P) с последующим переходом в конформацию E2-P и дефосфорилированием фермента, индуцированным связыванием фермента с внеклеточным  $\text{K}^+$ . Эти процессы сопряжены с переносом катионов через мембрану [1, 2].

Каталитическая  $\alpha$ -субъединица  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы представлена четырьмя изоформами ( $\alpha 1$ – $\alpha 4$ ).  $\alpha 1$ -изоформа экспрессируется во всех типах клеток, экспрессия остальных изоформ тканеспецифична [3]. В почках млекопитающих обнаружена только  $\alpha 1$ -изоформа. Изоформы  $\alpha$ -субъединицы различаются по сродству к АТФ, ионам-активаторам и специфическому ингибитору — убаину, принадлежащему к классу кардиотонических стероидов (КТС) [4]. В клетках грызунов экспрессируется резистентная к КТС  $\alpha 1$ -изоформа ( $\alpha 1R$ )  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, сродство которой к этим ингибиторам снижено в 1000 раз по сравнению с  $\alpha 1$ -чувствительной (*sensitive*) изоформой  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы ( $\alpha 1S$ ), обнаруженной в клетках других млекопитающих. Это различие обусловлено заменой в  $\alpha 1S$ - $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азе двух аминокислотных остатков: глутамина и аспарагина в позициях 111 и 122 на остатки аргинина и аспарагиновой кислоты в  $\alpha 1R$ - $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азе [5].

Среди КТС, в состав которых входит стероидное ядро и лактоновое кольцо в 17-м положении, выделяют две основных группы: карденолиды, которые содержат 5-ти членный лактон, и буфаденолиды, содержащие 6-ти членный лактон. Большинство карденолидов в 3-м положении стероидного ядра содержит остатки сахаров, буфаденолиды часто представляют собой агликаны [4]. Карденолиды в значительных количествах содержатся в растениях, тогда как буфаденолиды — у земноводных (в основном в слизи тропических жаб). Недавно было обнаружено, что в небольших количествах КТС синтезируются в организмах млекопитающих, включая человека [6, 7].

КТС не только ингибируют  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азу, но, связавшись с ферментом, индуцируют различные сигнальные пути за счет связывания с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азой белков-партнеров. Таким путем (независимо от ингибирования фермента) убаин вызывает смерть эпителиальных клеток почек собаки (линия C7-MDCK) [8, 9]. Это сопровождается фосфорилированием р38 MAPK [8]. Однако у грызунов убаин не вызывает смерти

клеток в концентрациях, которые полностью подавляют активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, при этом активируется другая MAPK — ERK $\frac{1}{2}$ . Экспрессия в клетках грызунов только  $\alpha 1$ -чувствительной изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы приводит к смерти клеток под действием убаина. Эти данные позволили предположить, что особенности в аминокислотной последовательности  $\alpha 1S$ - и  $\alpha 1R$ -изоформ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы определяют различия в конформациях фермента и, соответственно, приводят к связыванию с ними различных белков, индуцируя в клетках грызунов и других млекопитающих различные сигнальные каскады, один из которых приводит к смерти клеток, а другой, напротив, к их выживанию [10]. До настоящего времени в литературе не описано различий в конформации  $\alpha 1S$ - и  $\alpha 1R$ -изоформ  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы при связывании с КТС.

Протеолиз является широко используемым методом анализа общей структуры и конформации белков. В случае  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы для этих целей часто используют трипсин, поскольку он расщепляет только  $\alpha$ -субъединицу фермента, не затрагивая ее  $\beta$ -субъединицу [11]. Поэтому после обработки фермента трипсином обнаруживаются только пептидные фрагменты  $\alpha$ -субъединицы.

Классическая картина трипсинолиза  $\alpha$ -субъединицы была описана Питером Йоргенсеном (Peter Jørgensen) [12]. В конформации E1 трипсин осуществляет быстрый протеолиз пептидной связи перед Lys30 и более медленный перед Arg262. В результате происходит накопление большого протеолитического фрагмента с молекулярной массой около 77 кДа и минорных фрагментов. При трипсинолизе  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в конформации E2 трипсин обеспечивает накопление полипептидов с молекулярной массой 58 и 41 кДа. При длительном протеолизе (30–60 мин) обеих конформаций фермента наблюдается накопление фрагментов с молекулярной массой 44, 37, 23 и 15 кДа [13–15]. Эти эксперименты были проведены на препаратах  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы из почек кролика, собаки и свиньи при соотношении трипсин/ $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза = 1/25 или 1/20.

Цель настоящей работы заключается в доказательстве существования различий в конформации чувствительной и резистентной  $\alpha 1R$ - и  $\alpha 1S$ - $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, которые индуцируются связыванием трех КТС: двух карденолидов (убаин, дигоксин) и одного буфаденолида (маринобуфагенин). В качестве метода исследования мы использовали ограниченный протеолиз  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, поскольку известно, что изменение конформации может сопровождаться экспозицией или маскировкой участков протеолиза, доступных трипсину [13].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы.** Трипсин бычий и ингибитор трипсина из плодов сои были куплены у фирмы ПанЭко (Россия). Остальные реактивы были поставлены компанией Sigma (США), ThermoScientific (США), Bio-Rad (США).

**Выделение фермента.**  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азу из наружного медуллярного слоя почек свиньи и почек крысы получали в соответствии с методами, описанными ранее [16, 17]. Конечный осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 25 мМ имидазола (рН 7.5), 1 мМ EDTA, 0.25 М сахарозы, до концентрации белка 5–10 мг/мл, после чего суспензию разливали в пробирки по 20–50 мкл и хранили в замороженном состоянии при  $-80^\circ\text{C}$ .

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавторов [18]. Для растворения мембранных белков вместо воды добавляли 0.1% раствор дезоксихолата натрия. В качестве стандарта использовали коммерческий раствор бычьего сывороточного альбумина в концентрации 2 мг/мл (ThermoScientific, США).

**Определение активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы.** Активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы в полученных препаратах определяли по методу Ратбуна и Бетлах [19], измеряя накопление неорганического фосфата в среде следующего состава: 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3 мМ АТФ, 30 мМ имидазола (рН 7.4). Концентрация белка составляла 1–5 мкг/мл. Реакцию начинали внесением АТФ в пробу. Более подробно этот метод описан нами ранее [20].

**Трипсинолиз.** Трипсинолизу подвергали  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азу из почек свиньи и почек крысы, которую предварительно переводили в E1 или E2-Р конформацию. Для этого фермент разводили в 20 раз в буфере А (E1-конформация) или буфере Б (E2-Р- конформация). Состав буфера А: 10 мМ NaCl, 30 мМ имидазола, 1 мМ EDTA (рН 7.4); состав буфера Б: 30 мМ имидазола, 1 мМ EDTA, 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3 мМ  $\text{P}_i$ /Трис (рН 7.4). Далее фермент преинкубировали 10 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$  с 1 мМ уабаина, дигоксина или маринобуфагина. Трипсинолиз проводили в течение 5 или 10 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Соотношение трипсин/ $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-аза (w/w) составляло 1/10. Протеолиз останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов в 2-х кратном избытке по отношению к трипсину (w/w). Затем проводили анализ триптических фрагментов методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS).

**Электрофорез в полиакриламидном геле.** Электрофорез проводили в 6% концентрирующем и в

12% разделяющем ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли [21]. Белки на геле окрашивали Кумасси G-250. Образцы готовили на 4-х кратном буфере, содержащем 250 мМ Трис-HCl (рН 6.8), 8% SDS, 40% сахарозу и бромфеноловый синий, затем прогревали в течение 15 мин при  $50^\circ\text{C}$ . Электрофорез проводили при силе тока: 25мА на одно стекло в концентрирующем геле и 50мА на одно стекло в разделяющем геле. Полученные гели сканировали и обрабатывали (денситометрировали фрагменты протеолиза) с помощью программного пакета TotalLab TL120.

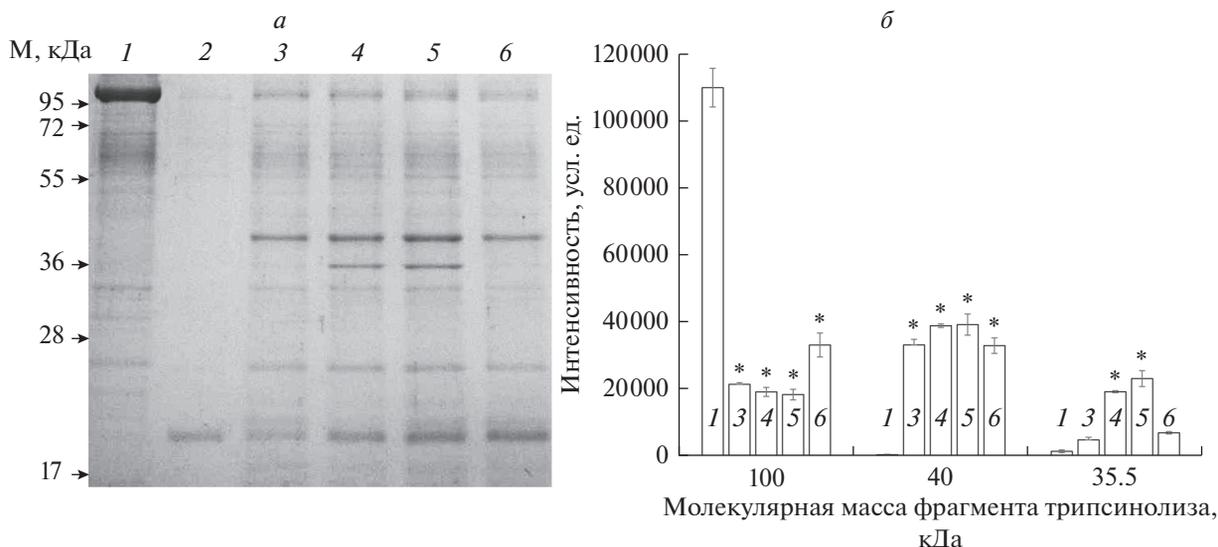
**Статистические различия.** Статистические различия определяли с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (One Way ANOVA), различия считали статистически значимыми при  $p < 0.01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Препараты  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, использованные в нашей работе, были получены из медуллярного слоя почек свиньи и крысы. Активность препаратов  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы из почек свиньи и крысы составляла 1800–2000 и 500–800 мкмоль  $\Phi_n$ /(мг белка в ч) соответственно при  $37^\circ\text{C}$ . Эта активность полностью ингибировалась высокими концентрациями уабаина (1 мМ для фермента из почек свиньи и 5 мМ для фермента из почек крысы).

На гелях, полученных после проведения электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, препаратов из почек свиньи и крысы обнаруживается белковая полоса с подвижностью, соответствующей белку молекулярной массой около 100 кДа (рис. 1а, 3а) и размытая полоса, соответствующая белку с молекулярной массой 55–65 кДа. Белок с молекулярной массой 100 кДа, обнаруженный в обоих препаратах, при иммуноблоттинге окрашивался специфическими антителами против  $\alpha 1$ -субъединицы (не показано). Это позволяет нам идентифицировать эти белки как  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. В препарате  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы из почек свиньи обнаруживаются и другие белки, общее содержание которых, рассчитанное по интенсивности окрашивания Кумасси G-250, не превышало 15%.

В препарате из почек крысы присутствовал также белок с молекулярной массой около 130 кДа. Наши попытки удалить его из препарата путем внесения модификаций в процедуру выделения не привели к успеху. Мы проанализировали белки этой полосы с использованием метода хромато-масс-спектрометрии (LC/MS) и обнаружили пептидные фрагменты трех белков:  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы, аланиламинопептидазы и мембранной аланиламинопептидазы. При обра-



**Рис. 1.** Результаты трипсинолиза  $\alpha 1S$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы из почек свиньи в конформации Е1 в присутствии КТС (1 мМ). Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза/трипсин 10/1. *а* – Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов  $\alpha 1S$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: 1 – исходный препарат  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы (7.7 мкг); 2 – трипсин и ингибитор трипсина; 3 –  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза и трипсин; 4 – комплекс  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза–уабаин и трипсин; 5 – комплекс  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза–дигоксин и трипсин; 6 – комплекс  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза–маринобуфагенин и трипсин. *б* – Интенсивность окрашивания белковых полос, соответствующих  $\alpha 1$ -субъединице  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы и ее пептидных фрагментов с молекулярной массой 40 и 35.5 кДа. Представлены результаты трех экспериментов, показаны стандартные отклонения; \* –  $p < 0.01$ .

ботке фермента трипсином количество белка в этой полосе уменьшалось незначительно (рис. 3), таким образом, его протеолиз не изменял общую картину трипсинолиза  $\alpha$ -субъединицы.

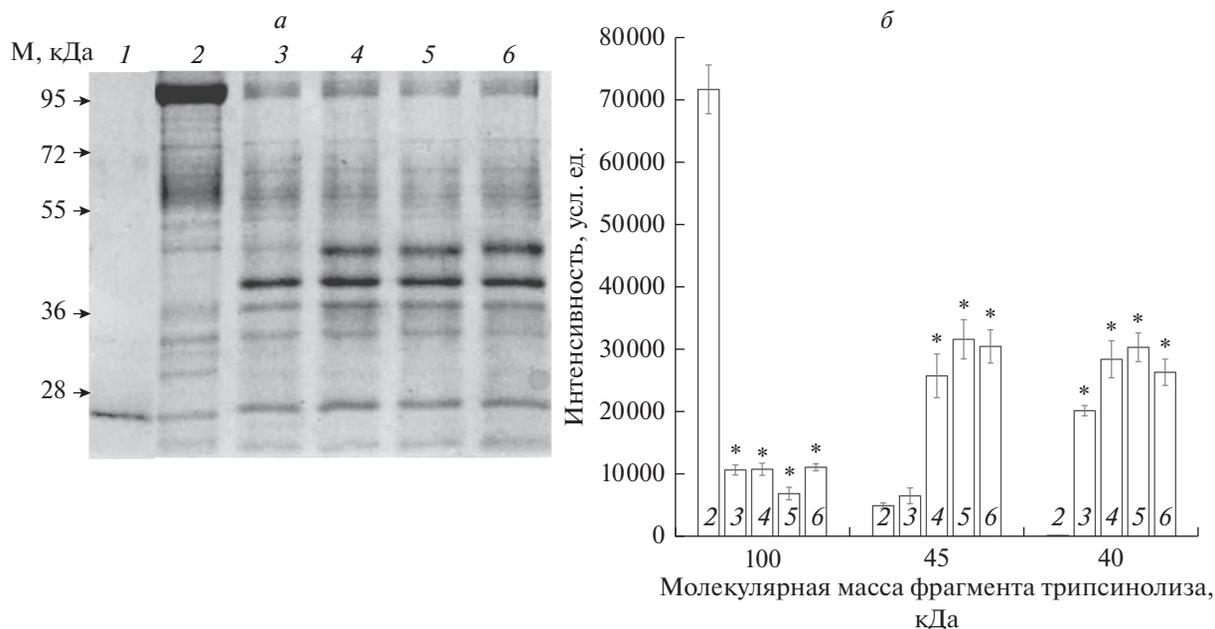
В нашей работе соотношение трипсин/ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза (w/w) составляло 1/10, а время инкубации с трипсином – 5 мин. Это обусловлено тем, что связывание КТС значительно увеличивает скорость трипсинолиза [17].

На рис. 1 представлены данные электрофоретического анализа продуктов трипсинолиза, полученных из  $\alpha 1S$ -субъединицы  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы почек свиньи в конформации Е1 (соотношение трипсин/ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза 1/10, 5 мин при 37°C). Видно, что интенсивность окрашивания  $\alpha 1S$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы (~100 кДа) после протеолиза существенно снижается (дорожки 1 и 3). При этом образуется пептидный фрагмент с молекулярной массой около 40 кДа и небольшое количество пептидного фрагмента с молекулярной массой около 35.5 кДа. В небольших количествах появляются еще два пептидных фрагмента с молекулярными массами около 23 и 19 кДа, которые отсутствовали в препарате фермента до протеолиза.

Преинкубация фермента из почек свиньи с уабаином и дигоксином в концентрациях, полностью ингибирующих  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азу (1 мМ), приводит к существенному и практически одинаковому снижению количества  $\alpha 1S$ -субъединицы

$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы и увеличению количества полипептидного фрагмента с молекулярной массой около 40 кДа. В то же время в результате преинкубации  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы с карденолидами уабаином и дигоксином существенно возрастает количество белка с молекулярной массой 35.5 кДа. Этот белок не обнаруживается после преинкубации фермента с буфадиенолидом маринобуфагенином и последующего трипсинолиза (рис. 1а, дорожка б). Таким образом, в присутствии карденолидов на поверхности белка экспонируется дополнительный участок расщепления полипептидной цепи трипсином, который недоступен для протеолиза, если фермент преинкубирован с маринобуфагенином. Это означает, что конформация  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы после ее связывания с уабаином и дигоксином отличается от конформации, индуцированной связыванием маринобуфагенина.

На рис. 2 представлены результаты, полученные при электрофоретическом разделении продуктов протеолиза  $\alpha 1$ -субъединицы  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы из почек свиньи в конформации Е2-Р (условия трипсинолиза такие же, как на рис. 1). В результате протеолиза в отсутствие КТС наблюдается уменьшение количества  $\alpha 1$ -субъединицы, увеличивается количество продуктов протеолиза с молекулярной массой 40 кДа и 35.5 кДа. Но преинкубация с любым из исследуемых кардиотониче-



**Рис. 2.** Результаты трипсинолиза  $\alpha 1S-Na^+,K^+-ATP$ -азы из почек свиньи в конформации E2-P в присутствии КТС (1 мМ). Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение  $Na^+,K^+-ATP$ -азы/трипсин 10/1. *a* – Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов  $\alpha 1S-Na^+,K^+-ATP$ -азы методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: 1 – трипсин и ингибитор трипсина; 2 – исходный препарат  $Na^+,K^+-ATP$ -азы (7.7 мкг); 3 –  $Na^+,K^+-ATP$ -аза и трипсин; 4 – комплекс  $Na^+,K^+-ATP$ -аза–уабаин и трипсин; 5 – комплекс  $Na^+,K^+-ATP$ -аза–дигоксин и трипсин; 6 – комплекс  $Na^+,K^+-ATP$ -аза–маринобуфагенин и трипсин. *б* – Интенсивность окрашивания белковых полос, соответствующих  $\alpha 1$ -субъединице  $Na^+,K^+-ATP$ -азы и ее пептидных фрагментов с молекулярной массой 45 и 40 кДа. Представлены результаты трех экспериментов, показаны стандартные отклонения; \* –  $p < 0.01$ .

ских стероидов приводит к появлению большого количества дополнительного фрагмента с молекулярной массой 45 кДа. Это показывает, что в конформации E2-P связывание любого из кардиотонических стероидов обеспечивает одинаковое изменение конформации  $\alpha 1$ -субъединицы фермента.

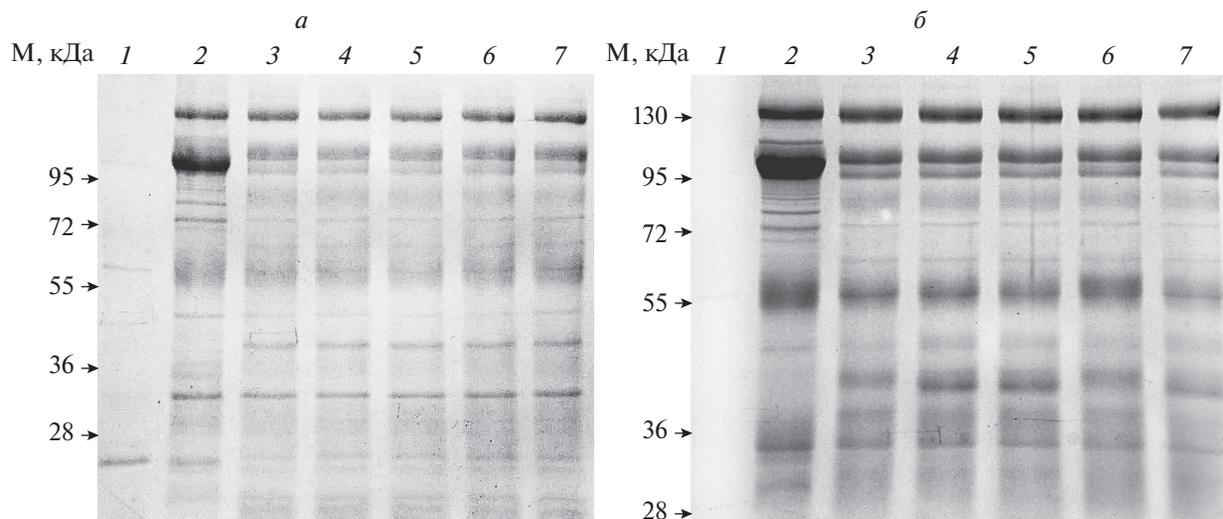
При протеолизе  $\alpha 1R-Na^+,K^+-ATP$ -азы из почек крысы в конформации E1 и E2-P мы наблюдали образование фрагментов с молекулярными массами 40 кДа и не обнаружили появления фрагментов с молекулярной массой 35.5 кДа. Преинкубация фермента с любым кардиотоническим стероидом не изменяла набора продуктов протеолиза и их молекулярной массы в случае пребывания фермента в обеих конформациях (рис. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные по протеолизу  $\alpha 1R-Na^+,K^+-ATP$ -азы из почек свиньи отличаются от данных, полученных ранее другими авторами: мы обнаружили, что под действием трипсина  $\alpha$ -субъединица расщепляется с получением в основном фрагмента с молекулярной массой 40 кДа и небольших количеств пептидных фраг-

ментов с молекулярной массой 35.5 кД, 23 и 19 кДа (причем в количественном отношении преобладает фрагмент с молекулярной массой около 40 кДа). Другие авторы сообщают о получении фрагментов с молекулярными массами 44, 37, 23 и 15 кДа. Однако различия в 3–4 кДа в величине молекулярных масс белков, определенных по электрофоретической подвижности, находятся в пределах ошибки самого метода. Поэтому можно полагать, что получены те же самые полипептиды, о которых сообщали другие авторы [13–15]. Доказать, что наши результаты не отличаются от результатов предшественников, можно лишь путем определения N-концевой последовательности этих пептидов, однако это не являлось целью нашего исследования. Более того, эти авторы не идентифицировали указанные фрагменты таким способом.

В результате нашей работы установлено, что при протеолизе  $Na^+,K^+-ATP$ -азы из почек свиньи в конформации E1 (но не E2-P) образуется статистически значимое количество пептида с молекулярной массой около 35.5 кДа только в том случае, если с ферментом связаны карденолиды уабаин или дигоксин, но не буфадиенолид маринобуфагенин. В присутствии маринобуфагенина



**Рис. 3.** Результаты трипсинолиза  $\alpha 1R$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы из почек крысы в конформации E1 (а) и в конформации E2-P (б) в присутствии КТС. Время трипсинолиза 5 мин при 37°C. Соотношение  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза/трипсин 10/1. Результаты разделения препарата белков и протеолитических фрагментов  $\alpha 1R$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На дорожки нанесены: 1 – трипсин и ингибитор трипсина; 2 – исходный препарат  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы (7.7 мкг); 3 –  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза и трипсин; 4 – комплекс  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза–уабаин и трипсин; 5 – комплекс  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза–дигоксин и трипсин; 6 – комплекс  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза–маринобуфагенин и трипсин; 7 – комплекс  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-аза–уабаин и трипсин. Концентрация кардиотонических стероидов при преинкубации  $\alpha 1R$ - $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы с уабаином, дигоксином и маринобуфагенином на дорожках 4–6 – 1 мМ, на дорожке 7 – 10 мМ.

этот фрагмент при трипсинолизе вообще не образуется. Это позволяет считать, что маринобуфагенин при связывании с  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азой (по крайней мере, в E1-конформации) обеспечивает создание конформации, отличной от таковой, что создается в присутствии уабаина и дигоксина. Это согласуется с другими нашими данными, полученными на клеточной культуре MDCK [22]. Ранее мы показали, что уабаин индуцирует смерть клеток эпителия почек при значительно более низкой концентрации, чем маринобуфагенин. Возможно, это обусловлено тем, что маринобуфагенин, связываясь с  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азой не способен создавать конформацию необходимую для связывания с белком-партнером, который индуцирует сигнальный каскад, приводящий к гибели клетки.

Также нами установлено отсутствие различий в продуктах протеолиза, полученных после трипсинолиза комплекса  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы из почек крысы со всеми тремя исследованными КТС, как в конформации E1, так и в конформации E2-P. Эти данные показывают, что  $\alpha 1S$ - и  $\alpha 1R$ -изоформы фермента различаются не только по их чувствительности к КТС, но и по их способности переходить вследствие связывания КТС в конформацию, которая характерна для  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы из почек свиньи и, по-видимому, необходима для связывания нужного белка-партнера. Именно по этой причине

$\alpha 1S$ - и  $\alpha 1R$ -изоформы  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФ-азы после их связывания с КТС способны, по-видимому, инициировать различные сигнальные каскады.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00308.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skou J.C., Esmann N. 1992. The Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 249–261.
2. Clausen M.V., Hilbers F., Poulsen H. 2017. The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front. Physiol.* **8**, 371.
3. Blanco G., Mercer R.W. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol. Physiol.* **275**, F633–F650.
4. El-Seedi H.R., Khalifa S.A.M., Taher E.A., Farag M.A., Saeed A., Gamal M., Hegazy M.E.F., Youssef D., Musharraf S.G., Alajlani M.M., Xiao J., Efferth T. 2019. Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility. *Pharmacol. Res.* **141**, 123–175.
5. Lingrel J.B., Argüello J.M., Huysse J., Kuntzweiler T.A. 1997. Cation and cardiac glycoside binding sites of the Na,K-ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **834**, 194–206.
6. Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V. 2009. Endogenous cardiotonic steroids: Physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* **61**, 9–38.
7. Schoner W., Scheiner-Bobis G. 2007. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: Their roles in hyperten-

- sion, salt metabolism, and cell growth. *Am. J. Physiol. Physiol.* **293**, C509–C536.
8. Akimova O.A., Lopina O.D., Rubtsov A.M., Hamet P., Orlov S.N. 2010. Investigation of mechanism of p38 MAPK activation in renal epithelial cell from distal tubules triggered by cardiotonic steroids. *Biochem.* **75**, 971–978.
  9. Akimova O.A., Pchejetski D., Hamet P., Orlov S.N. 2006. Modest intracellular acidification suppresses death signaling in ouabain-treated cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **451** (4), 569–578.
  10. Akimova O.A., Tverskoi A.M., Smolyaninova L.V., Mongin A.A., Lopina O.D., La J., Dulin N.O., Orlov S.N. 2015. Critical role of the  $\alpha 1$ -Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain. *Apoptosis.* **20**, 1200–1210.
  11. Giotta G.J. 1975. Native (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>) dependent adenosine triphosphatase has two trypsin sensitive sites. *J. Biol. Chem.* **250**, 5159–5164.
  12. Jørgensen P.L., Collins J.H. 1986. Tryptic and chymotryptic cleavage sites in sequence of alpha-subunit of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase from outer medulla of mammalian kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* **860**, 570–576.
  13. Dergousova E.A., Poluektov Y.M., Klimanova E.A., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Lopina O.D. 2018. Glutathionylation of Na,K-ATPase alpha-subunit alters enzyme conformation and sensitivity to trypsinolysis. *Biochem.* **83**, 969–981.
  14. Jørgensen P.L. 1977. Purification and characterization of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. *Biochim. Biophys. Acta.* **466**, 97–108.
  15. Jørgensen P.L., Andersen J.P. 1988. Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na, K-pump and Ca-pump proteins. *J. Membr. Biol.* **103** (2), 95–120.
  16. Jørgensen P.L. 1988. Purification of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: Enzyme sources, preparative problems, and preparation from mammalian kidney. *Methods Enzymol.* **156**, 29–43.
  17. Akayama M., Nakada H., Omori K., Masaki R., Takedani S., Tashiro Y. 1986. The (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)ATPase of rat kidney: Purification, biosynthesis, and processing. *Cell Struct. Funct.* **11**, 259–271.
  18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
  19. Rathbun W.B., Betlach M.V. 1969. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* **28**, 436–445.
  20. Klimanova E.A., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Anashkina A.A., Orlov S.N., Makarov A.A., Lopina O.D. 2015. Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na,K-ATPase and depends on the enzyme conformation. *FEBS Lett.* **589**, 2668–2674.
  21. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
  22. Akimova O.A., Bagrov A.Y., Lopina O.D., Kameritsky A.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2005. Cardiotonic steroids differentially affect intracellular Na<sup>+</sup> and [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-independent signaling in C7-MDCK cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 832–839.

## Binding of Ouabain, Digoxin, or Marinobufagenin Induces Different Conformational Changes in Kidney $\alpha 1$ -Na,K-ATPase Isoforms, Resistant and Sensitive to Cardiotonic Steroids

A. M. Tverskoi<sup>1</sup>, V. A. Lokteva<sup>2</sup>, S. N. Orlov<sup>1, 3, 4</sup>, O. D. Lopina<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>Department of Physics, Moscow Lomonosov State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>3</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

<sup>4</sup>Siberian Medical State University, Tomsk, 634050 Russia

\*e-mail: od\_lopina@mail.ru

The affinity of rodent Na,K-ATPase  $\alpha 1$ -subunit to cardiotonic steroids (CTS) is known to be approximately 1000-fold less than the affinity of Na,K-ATPase  $\alpha 1$ -subunit from other mammals. The CTS-resistant isoform of Na,K-ATPase  $\alpha 1$ -subunit ( $\alpha 1R$ ) is expressed in rodent cells, in contrast to the CTS-sensitive isoform of the  $\alpha 1$ -subunit ( $\alpha 1S$ ), which is expressed in cells of other mammals. Earlier we have established that incubation with ouabain in concentrations that completely suppressed the activity of Na,K-ATPase  $\alpha 1$ -isoform ( $\alpha 1S$ -Na,K-ATPase) led to a death of human endothelial and smooth muscle cells but did not affect the survival of rat cells expressing  $\alpha 1R$ -Na,K-ATPase. Conformational transitions that are induced by CTS binding to Na,K-ATPase play a key role in the process of cell survival. To reveal differences in the CTS-induced conformational changes of  $\alpha 1R$ - and  $\alpha 1S$ -Na,K-ATPase isoforms, we used three different CTS (two cardenolids, ouabain and digoxin, and one bufadienolid, marinobufagenin) and analyzed the trypsinolysis products of  $\alpha 1$ -subunits in two main conformations of Na,K-ATPase (E1 and E2-P). The treatment of the pig kidney  $\alpha 1S$ -Na,K-ATPase in E1 conformation by trypsin results in a significant decrease of the amount of  $\alpha 1S$ -subunit and in the appearance of protein fragments with molecular masses of about 40, 35, 23, and 19 kDa. Preincubation of Na,K-ATPase in E1 conformation with ouabain or with digoxin (1 mM) leads to a decrease of the amount of

$\alpha$ 1S-subunit, increase of the amount of polypeptide fragment with molecular mass of about 40 kDa, and a significant rise of the amount of fragment with molecular mass of about 35.5 kDa, which was not found after the preincubation of the Na,K-ATPase in E1 conformation with marinobufagenin (1 mM). In the absence of CTS the trypsinolysis of  $\alpha$ 1S-Na,K-ATPase in E2-P conformation results in a decrease of the amount of  $\alpha$ 1S-subunit and an increase of the amount of proteolytic products with molecular mass of about 40 and 35.5 kDa. Preincubation of the Na,K-ATPase in E2-P conformation in the presence of any of the CTS studied induces the appearance of big amount of an additional peptide fragment with molecular mass of about 45 kDa. Preincubation of  $\alpha$ 1R-Na,K-ATPase from rat kidney with any of the CTS does not change the composition of proteolytic products and their molecular masses in either E1 or E2-P conformation. The results suggest that the structure of the CTS-binding site and a conformational response of  $\alpha$ 1-Na,K-ATPase to binding of CTS is mainly determined by the primary structure of the CTS-resistant and CTS-sensitive  $\alpha$ 1-subunits of the Na,K-ATPase.

**Keywords:** Na,K-ATPase, conformation E1, conformation E2-P, cardiotonic steroids, trypsinolysis