

УДК 576.7

Роль Na/K-насоса в возбудимых тканях (обзор)

Александр А. Болдырев*

Международный Биотехнологический Центр МГУ им. Ломоносова,
Воробьевы горы, Москва, 119991 Россия¹

Received 26.08.2008, received in revised form 2.09.2008, accepted 9.09.2008

Na/K-АТФаза – основной фермент, обеспечивающий асимметричное распределение ионов натрия и калия по обе стороны клеточной мембраны животных. В обзоре обсуждается современное состояние проблемы функционирования Na-насоса. Приведены данные о молекулярных свойствах и упаковке фермента в мембране. Изложены представления об олигомерной организации Na/K-АТФазы и регуляции аденозинтрифосфатом взаимоотношения протомеров в олигомерном комплексе. Приведены факты, свидетельствующие об участии этого фермента в процессах передачи сигнала от внешней мембраны внутрь клетки.

Ключевые слова: Na/K-АТФаза, олигомерная организация, АТФ, натрий, калий, внутриклеточная сигнализация.

Введение: как начиналась проблема

Na/K-АТФазы

Na/K-АТФаза (Na-насос) представляет собой интегральный трансмембранный олигомерный белок, превращающий энергию АТФ в энергию градиента одновалентных катионов. Он содержит центры связывания и гидролиза АТФ, ионные центры и обладает высокой конформационной лабильностью – способностью принимать несколько устойчивых конформаций, различающихся по средству к переносимым ионам и ориентации ион-связывающих центров.

Энергия АТФ при работе этой системы используется для «оплаты» перехода из конформации с высоким средством к одному из переносимых ионов (натрию) в конформацию с высоким средством к другому иону (калию). Возвращение в исходную конформацию про-

исходит спонтанно по так называемой релаксационной кинетике (Блюменфельд, 1977, 2002). Термин «транспортные АТФазы» – синоним термина «ионные насосы».

Промежуточным продуктом гидролиза АТФ является фосфофермент, возникающий при переносе терминального фосфата аденозинтрифосфорной кислоты на белок с образованием «макроэргической» ацилфосфатной связи. По этой причине транспортные АТФазы относят к АТФазам «Р-типа».

История исследования Na/K-АТФазы началась в 1957 г., когда датский ученый Йенс Кристиан Скоу занялся изучением феномена ионной асимметрии и ее утраты, происходящей при хранении клеток при пониженной температуре (Skou, 1957). К тому времени из исследований А. Ходжкина было известно, что процессы возбуждения обеспечиваются

* Corresponding author E-mail address: aaboldyrev@mail.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

неравновесным распределением ионов натрия и калия на мембране возбудимых клеток (Ходжкин, 1965). Классическим объектом исследования служил гигантский аксон кальмара, но много опытов было поставлено и на скелетных мышцах. Длительное выдерживание препаратов на холоде (при 4 °С) уменьшало величину ионных градиентов и снижало возбудимость аксона. Ранее Г. Шатцман показал, что утраты Na-градиента можно достичь гораздо быстрее, если выдерживать клетки в присутствии какого-нибудь сердечного гликозида – строфантина или убаина (Schatzmann, 1953).

Эксперимент, поставленный Й. Скоу в 1957 г., заключался в том, что измельченные нервы краба (гомогенат) были подвергнуты инкубации при разных соотношениях хлористого натрия и хлористого калия в присутствии магния и АТФ и была измерена АТФазная активность гомогената. Соотношение Na/K изменялось от 0/150 до 150/0 мМ, и пропорционально изменению этого коэффициента изменялась способность препарата гидролизовать АТФ. Максимум АТФазной активности приходился на 130 мМ Na⁺ и 20 мМ K⁺. АТФаза, активируемая совместным присутствием натрия и калия, ингибировалась убаином. В опубликованной статье Й. Скоу сообщил, что им найдена ферментная система, ответственная за асимметричное распределение ионов натрия и калия на мембране возбудимых клеток; он назвал ее Na/K-зависимой Mg-активируемой АТФазой (Skou, 1957). С этой публикации и началась история исследования участия Na-насоса в функционировании возбудимых клеток.

Свойства Na/K-АТФазы

Фермент Na/K-АТФаза входит в состав наружных плазматических мембран всех клеток животных в качестве интегрального

белка. Он обеспечивает превращение энергии АТФ в энергию градиентов одновалентных ионов натрия и калия в стехиометрии 1 АТФ : 3 иона натрия : 2 иона калия. Термин Na/K-насос является синонимом термина Na/K-АТФаза. Функциональная единица фермента (называемая протомером) представлена глобулой, состоящей из двух пептидных цепей, называемых α - и β -субъединицами. Большая субъединица (α) имеет молекулярную массу около 100 кДа и несколько протяженных последовательностей, составленных гидрофобными аминокислотами, что позволяет ей прошивать плазматическую мембрану 10 раз, при этом и С- и N-концы обращены в цитоплазму. В цитоплазму клетки обращены и гидрофильные петли между 2-м и 3-м и между 4-м и 5-м сегментами. На последней петле расположен активный центр фермента. Ионные центры также формируются на α -субъединице. В связывании ионов принимают участие карбоксильные группы дикарбоновых аминокислот, локализованных на 3-м и 6-м трансмембранных сегментах.

β -субъединица представляет собой гликопротеин, белковая часть которого соответствует молекулярной массе 35 кДа, а полная масса колеблется в зависимости от типа ткани и других факторов в пределах 45-55 кДа. Эта субъединица пронизывает мембрану один раз, и ее N-конец обращен в цитоплазму. С-концевая часть содержит четыре цистеиновых остатка, соединенных двумя дисульфидными связями. Эта часть пептидной цепи смотрит во внешнюю среду и содержит участки, подвергаемые гликозилированию.

Схема работы фермента

Как типичная АТФаза Р-типа, Na/K-АТФаза обладает способностью находиться в двух основных конформациях, обладающих высоким сродством к ионам натрия (E1) или

калия (E2). Исходной конформацией можно считать E1, поскольку примерно 70 % молекул находится в этой конформации в среде, где не присутствуют ни натрий, ни калий. Переход между конформациями можно индуцировать добавлением соответствующих катионов, хотя для этого требуются значительно большие концентрации ионов, чем имеются в клетке.

E2 – E1 переход существенно ускоряется при защелачивании среды. АТФ также служит активатором этого перехода, причем активными являются концентрации, соответствующие физиологическим (>0,5 мМ). АТФ увеличивает сродство фермента к ионам натрия и снижает сродство к ионам калия. Таким образом, по завершении гидролитического цикла трансформация E2 в E1 усиливается при связывании ферментом АТФ, если он присутствует в концентрациях свыше 0,5 мМ.

Это свойство фермента объясняет, почему фермент демонстрирует две константы связывания АТФ – натриевая и калиевая конформации фермента различаются по сродству к субстрату. Упаковка обеих конформаций фермента представлена на рис. 1, из которого

видно, что конформация фермента в мембране изменяется при конформационном переходе.

Указанные конформации различаются и по чувствительности к специфическому ингибитору убаину. Центр связывания убаина формируется на конформере E2, но практически отсутствует в конформации E1. По этой причине убаин, как и другие сердечные гликозиды, эффективно связывается с работающими молекулами фермента (в момент образования калиевого конформера E2) и практически не влияет на фермент в неактивном состоянии.

В самом начале исследований Na/K-АТФазы Й. Скоу заинтересовался фосфорилированным интермедиатом, возникающим при инкубации фермента с АТФ- P^{32} в присутствии ионов натрия. Уровень интермедиата может быть понижен при последующей инкубации суспензии с ионами калия или с C^{14} -меченым АДФ. В последнем случае образуется АДФ, несущий двойную метку – C^{14} и P^{32} . При добавлении ионов магния дефосфорилирующий эффект калия сохраняется, но АДФ уже не способен вызывать дефосфорилирование EP.

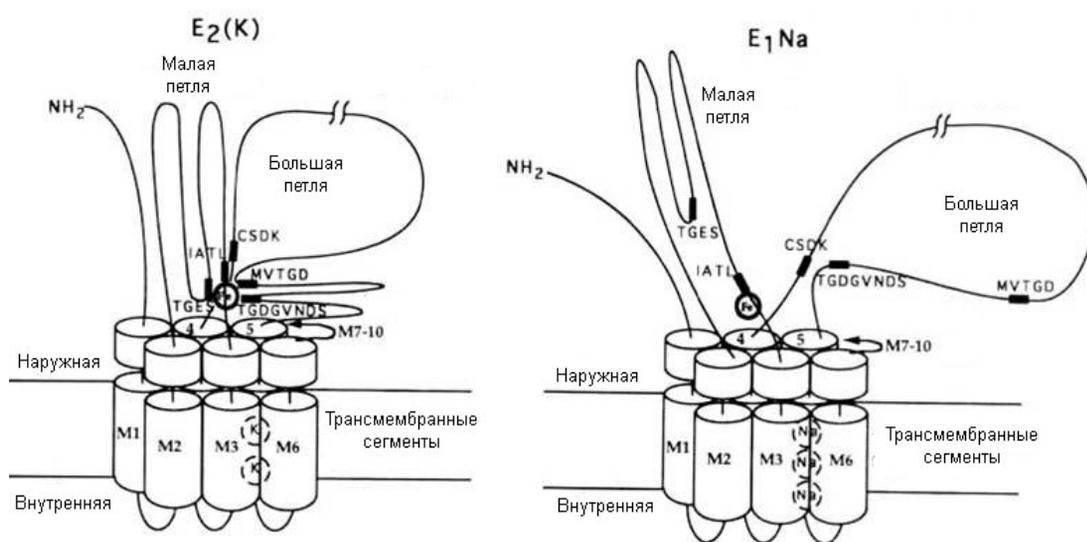


Рис. 1. Две конформации Na/K-АТФазы

Й. Скоу интерпретировал эти данные таким образом, что две конформации фермента способны находиться в фосфорилированном состоянии, но образование E1P из АТФ обратимо, и фосфат можно «возвратить» в адениловую систему. E1 способен частично превращаться в E2, и этот переход ускоряется ионами магния. Образующийся E2P может дефосфорилироваться в присутствии ионов калия только с образованием неорганического фосфата. Таким образом, натрий выступает как активатор стадии фосфорилирования, а калий – дефосфорилирования, причем магний ускоряет необратимый E1 – E2 переход. Таким образом постулировалось, что энергия АТФ расходуется на перевод молекулы фермента из Na-конформации в K-конформацию. В первом случае фермент связывает натрий (со стороны цитоплазмы), во втором – отдает натрий и связывает калий (с внешней стороны) за счет изменившегося сродства к этим ионам. В соответствии с изменяющимся сродством АТФазы к ионам натрия и калия находится и кривая зависимости активности от соотношения Na/K – она напоминает, по выражению Й. Скоу, шляпу Наполеона (рис. 2А).

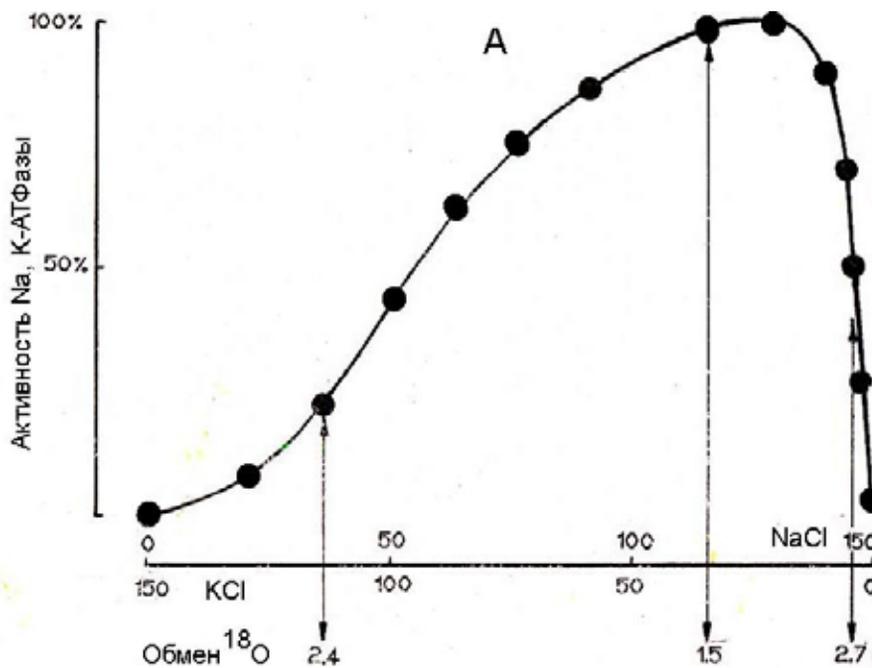
Поначалу эти представления стали объектом критики, вызванной необычностью свойств данной транспортной системы. Главное возражение выдвинул Роберт Пост, обративший внимание на то, что фосфофермент можно получить только в среде, не содержащей ионов калия – в его присутствии EP быстро гидролизует. Если при одновременном добавлении к препарату фермента и натрия, и калия фосфофермент не удастся зарегистрировать, разве это не значит, что EP образуется и в процессе циклической работы фермента?

Ответ на этот вопрос был основным для выбора кинетической схемы работы Na/K-

АТФазы. Он был получен в опытах с применением тяжелой воды H_2O^{18} . Используя эту воду как среду реакции, можно было рассчитывать, что в продукте АТФазы, неорганическом фосфате, будет обнаруживаться по крайней мере один атом «тяжелого» кислорода. Если в ходе АТФазной реакции образуется фосфофермент, время жизни которого сравнимо со скоростью O^{18} -обмена (см. рис. 2Б), в неорганическом фосфате должно обнаружиться более одного атома O^{18} , причем величина включения должна быть прямо пропорциональна длительности существования EP (Пантелеева, 1975). При достаточно длительной инкубации фермента в реакционной смеси, содержащей все компоненты реакции, полный гидролиз добавленного АТФ позволял накопить эквивалентное количество неорганического фосфата P_i и измерить с помощью масс-спектрометра соотношение O^{18}/P . Эти опыты показали, что при работе Na/K-АТФазы в одну фосфатную группу включается достоверно большее количество «тяжелого» кислорода, чем один атом, что соответствует образованию EP в ходе работы фермента (Болдырев, Твердислов, 1978).

Более того, оказалось, что увеличение концентрации ионов магния в среде инкубации, активирующее гидролиз АТФ, снижало величину O^{18}/P , а изменение соотношения Na/K в обе стороны от оптимального увеличивало этот коэффициент. Другими словами, магний увеличивал число оборотов фермента (уменьшая время жизни EP), а неоптимальное соотношение ионов-активаторов Na и K проявляло противоположное действие (Смирнова и др., 1977).

Интересно, что в присутствии уабаина, являющегося необратимым неконкурентным ингибитором этого фермента, длительность времени, необходимого для полного гидролиза АТФ, возрастала, но значение коэффици-



Б

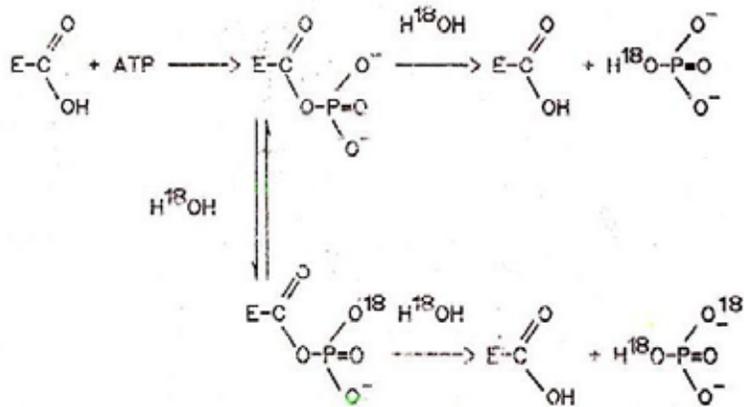


Рис. 2. Зависимость активности Na/K-АТФазы от соотношения Na/K (А) и схема гидролиза АТФ в среде с тяжелой водой (H_2O^{18}) (Б). Величина ^{18}O -обмена в ходе работы фермента указана под кривой зависимости гидролиза АТФ от соотношения Na/K

ента $^{18}\text{O}/\text{P}$ не изменялось, поскольку убаин выключал из работы часть молекул АТФазы, а оставшиеся активными молекулы продолжали работать по той же схеме. В настоящее время общепринятая схема гидролиза АТФ Na/K-АТФазой включает стадии образования и превращения фосфофермента.

Регулирующая роль АТФ

Анализ кривых активации фермента при изменении соотношения Na/K в присутствии разных концентраций АТФ или нуклеозидтрифосфатов разной природы, привел Й. Скоу к еще одному важному заключению. Как видно на рис. 3А, $K_{0,5}$ для натрия при низкой концентрации АТФ составляет около 115 мМ и снижается пропорционально увеличению концентрации субстрата. Другими словами, АТФ способен увеличивать сродство АТФазы к натрию (эффект на сродство к калию противоположен, но не заметен на приведенном рисунке из-за исходно большего сродства фермента к этому иону). Замена АТФ на другие субстраты изменяет профиль ионной кривой в таком же направлении, что и снижение концентрации АТФ. Все это позволило утверждать, что АТФ является не только субстратом, но и модулятором Na/K-АТФазы, регулирующим ее сродство к переносимым катионам. Другие нуклеотиды не способны модулировать сродство к переносимым ионам, хотя их гидролиз также приводит к активному транспорту ионов (Болдырев, Твердислов, 1978). На рис. 3Б видно, что замена АТФ на другие нуклеозидтрифосфаты равноценна уменьшению концентрации АТФ в инкубационной среде.

Действительно, при тех концентрациях АТФ, которые имеются в возбудимых клетках, за окончанием АТФазного цикла и образованием E2 конформации фермента должен быстро следовать E2 – E1 переход, индуцируемый высокими концентрациями АТФ. Суб-

стратная зависимость Na/K-АТФазы показывает, что с ростом концентрации субстрата наблюдается отклонение кривой от типичной «Михаэлисовской» зависимости и появление промежуточного плато (рис. 4А). Фактически, строгий анализ этой сложной кинетической кривой показывает, что она представлена суммой кривых – похожей на гиперболу при низких концентрациях субстрата (кривая 2) и выступающей в качестве сигмоиды при концентрациях АТФ свыше 0,5 мМ (кривая 3).

Первая часть зависимости, регистрируемая при низких концентрациях субстрата, характеризуется отрицательной кооперативностью по АТФ (коэффициент Хилла <1). Сигмоида, возникающая при повышении концентрации субстрата, отражает положительную кооперативность фермента по АТФ, эта часть кривой соответствует коэффициенту Хилла, существенно большему 2 и зависящему от условий инкубации (температура, присутствие детергентов). Как отрицательная, так и положительная кооперативности могут иметь различную природу, основывающуюся и на внутрибелковых, и на межбелковых взаимодействиях (Корниш-Боуден, 1979; Курганов, 1978).

Для прояснения этого вопроса было проведено сравнение свойств нативного (связанного с мембраной) фермента и фермента, солюбилизованного неионным детергентом C_{12}E_8 . Оказалось, что после обработки фермента детергентом начальная часть субстратной кривой оставалась без изменения, сохраняя отрицательную кооперативность по АТФ; вторая часть кривой исчезала (рис. 4Б). Поскольку обработка детергентом разрушает белковые ассоциаты, полученные данные свидетельствуют, что сигмоидальная кривая отражает взаимодействие между белковыми протомерами, а отрицательная кооперативность присуща протомеру самому по себе.

Согласно классической кинетике, ферменты, включающие в свой цикл стадию релаксации, должны характеризоваться кинетикой Рэбина, проявляя отрицательную кооперативность по субстрату (Болдырев, Мельгунов, 1985). То, что обработка детергентом не устраняет отрицательной кооперативности по АТФ, подтверждает релаксационный характер работы Na/K-насоса как молекулярной машины. Одновременно зависимость кооперативности в работе фермента от факторов, влияющих на упаковку мембранного бислоя (температура, обработка детергентами, концентрация АТФ), указывает на способность Na/K-насоса образовывать олигомеры, функциональная активность которых может контролироваться АТФ.

Интересно, что субстратная зависимость Na/K-АТФазы после атаки свободными радикалами приобретает вид кривой, присущей не взаимодействующим протомерам. Другими словами, окислительное повреждение приводит к утрате способности протомеров фермента взаимодействовать друг с другом. Аналогично этому и Na/K-АТФаза, выделенная из мозга животных после экспериментальной ишемии мозга (инсульта), при гидролизе АТФ демонстрирует субстратную зависимость, характерную для солубилизованного фермента.

Насколько важна способность фермента реагировать повышением активности при возрастании концентрации АТФ, можно видеть на рис. 5. Измерение субстратной зависимости для Na/K-АТФазы мозга при разных значениях pH обнаруживает важную закономерность: закисление среды до pH 6 приводит к вырождению сложной кривой в зависимость, подобную гиперболе. Это действие pH обратимо, и при восстановлении нормальной кислотности среды (до pH 7,4) восстанавливает типичную кривую с промежуточным плато. Если учесть,

что защелачивание среды ускоряет E2 – E1 переход (а закисление среды замедляет его), мы поймем, что манипуляции pH являются способом регулировать скорость – лимитирующую стадию реакции. В мозге, где нарушения кровоснабжения особенно губительны и могут привести к ацидозу, одним из следствий ацидоза будет торможение Na/K-насоса за счет замедления лимитирующей стадии. Это, конечно, приведет к сбережению клеточных запасов энергии (Na/K-насос затрачивает около 40 % всей энергии нейрона), но поставит под угрозу жизнеспособность и функциональную активность клетки.

Для этого опасения имеются две причины: одна очевидна и состоит в ускоренном исчезании ионных градиентов; другая обнаружена недавно и будет обсуждена в конце этого обзора – она состоит в том, что с помощью специальных механизмов Na/K-АТФаза вовлекается в процессы внутриклеточной сигнализации и, находясь в состоянии активности, препятствует накоплению активных форм кислорода (АФК) в нейрональной клетке (Boldyrev et al., 2003). Угнетение активности фермента в нейронах приведет к накоплению АФК и созданию условий для окислительного стресса.

Действие АТФ на Na/K-насос следует считать высокоспецифичным, поскольку другие нуклеозидтрифосфаты, также «макроэргические» соединения, гидролизуемые ферментом и обеспечивающие активный транспорт натрия и калия, не проявляют положительной кооперативности в координатах Хилла. Данные по кооперативности Na/K-АТФазы сведены в табл. 1. В ней для сравнения приведены результаты расчета коэффициентов Хилла по натрию и калию, величина которых не зависит от свойств липидного окружения фермента.

Таким образом, было постулировано, что АТФ не только субстрат и источник энергии

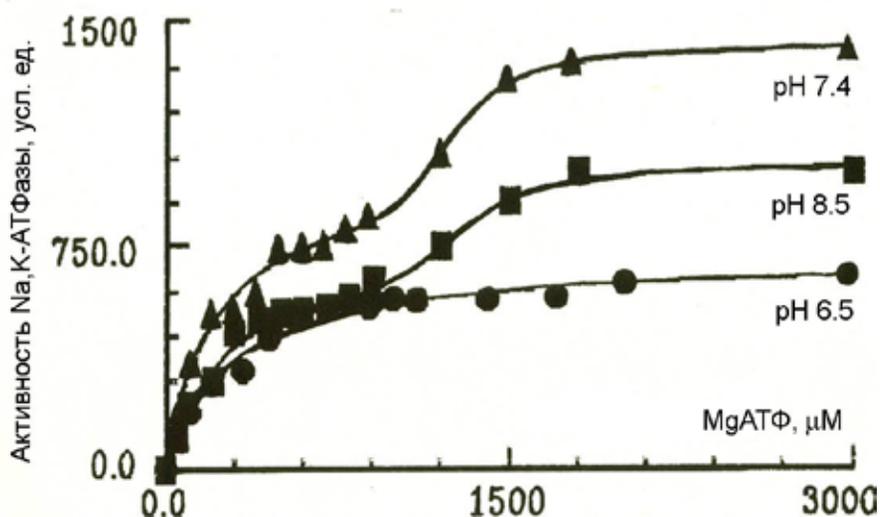


Рис. 5. Зависимость субстратной кривой для Na/K-АТФазы при различных значениях кислотности среды

Таблица 1. Коэффициенты Хилла для Na/K-АТФазы по субстратам и ионам-активаторам, измеренные в разных условиях

Анализируемый лиганд	Условия инкубации		
	в области низких концентраций субстрата	в области физиологических концентраций субстрата	обработка детергентом
АТФ	0,8-0,9	3,4	1,1
ГТФ	1,0	1,0	
УТФ	1,0	1,0	
Na ⁺		2,3	2,3
K ⁺		1,2	1,3

для транспорта ионов, но и модулятор Na/K-насоса, способный выполнять какую-то еще функцию, не присущую другим макроэнергетическим субстратам. В соответствии с этим графики Аррениуса, которые отражают липидный контроль за работой мембранного фермента, резко различаются для АТФ и других нуклеотидов. Как иллюстрирует рис. 6, на температурной зависимости гидролиза АТФ Na/K-АТФазой в координатах Аррениуса выявляется анаморфоза в той же температурной области, при которой наблюдается фазовый переход мембранных липидов. Более того, солюбилизация фермента и реконструкция его в искусственное липидное окружение ме-

няет характер температурной зависимости таким образом, что сдвигает температуру перехода в область, характерную для липида, применяемого для реконструкции (при реконструкции фермента в «жидкий» диолеилфосфатидилглицерин, DOPG, перегиба на графике Аррениуса не наблюдается вообще). По общепринятой точке зрения (Блюменфельд, 1977; Болдырев, Твердислов, 1978), анаморфоза на графике Аррениуса отражает чувствительность межбелковых взаимодействий к фазовым перестройкам мембранных липидов – до фазового перехода микровязкость липидов в большей степени ограничивает белок-белковые взаимодействия, чем при

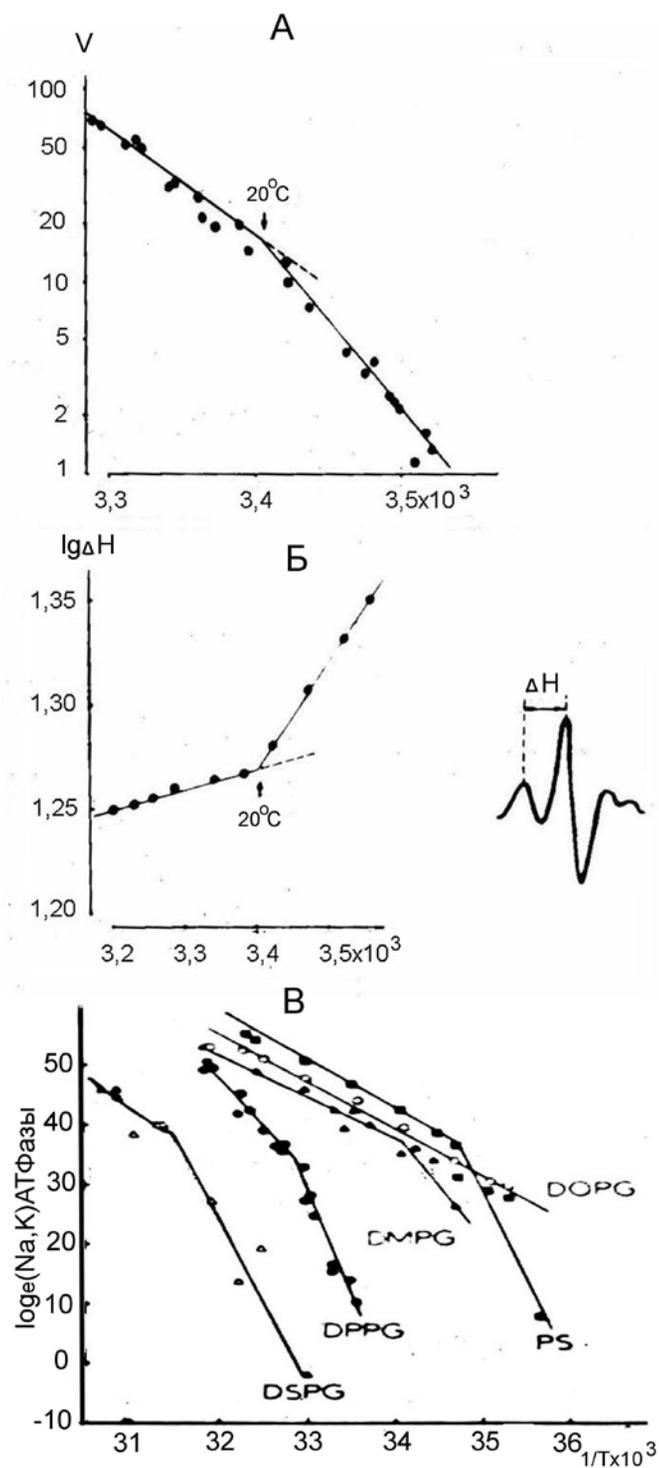


Рис. 6. Температурная зависимость (в координатах Аррениуса) Na/K-АТФазы (А) и микровязкости мембранного окружения (Б), измеренной с помощью мембранного зонда – производного холестерина; В – графики Аррениуса для Na/K-АТФазы, реконструированной в различные фосфолипиды (видно, что характер температурной зависимости определяется свойствами липидного окружения фермента)

более высоких температурах, когда липиды оказываются упакованными более рыхло.

Олигомерная организация Na/K-АТФазы в мембране

Простое сравнение графиков Аррениуса для Na/K-АТФазы, гидролизующей АТФ или другие нуклеотиды (УТФ, ГТФ), выявляет механизм, по которому АТФ выполняет свою роль регулятора активности фермента. Графики Аррениуса для других субстратов оказываются линейными. Следовательно, можно предположить, что фермент, который при гидролизе АТФ выступает как олигомер, используя другие субстраты, теряет способность к межбелковым контактам. Иными словами, модифицирующее действие АТФ выражается в его способности организовывать молекулы Na/K-насоса в олигомерные ансамбли.

Однако кинетическое поведение фермента, свидетельствующее о его возможной олигомерной природе, может рассматриваться только как указание на такую возможность. Доказательством олигомерного устройства фермента кинетический анализ быть не может. Однако недавно появились и прямые доказательства того, что Na/K-АТФаза функционирует как олигомер. Одним из наиболее прямых физических методов, позволивших рассчитать молекулярные размеры функциональной единицы фермента, служат метод «флаш-фотолиза» (строгое название метода в англоязычной литературе «Time-resolved phosphorescence decay»). Ковалентное мечение препарата Na/K-АТФазы флуоресцентными метками (например, эозинизотиоцианатом) позволяет измерить поляризацию флуоресценции метки после ее кратковременного возбуждения вспышкой лазера. Характер затухания сигнала показывает, сколькими экспоненциальными компонентами описывается измеряемая кривая, а скорость затухания по-

зволяет рассчитать молекулярные размеры глобулы, к которой прикреплена метка. Метод имеет ряд допущений (одним из условий является значительное различие между молекулярными размерами метящихся глобул, чтобы можно было ответить на вопрос, сколько экспоненциальных компонент вносит вклад в кривую затухания сигнала). Важно также иметь быстродействующую систему измерения и иметь возможность начинать измерения как можно раньше после окончания лазерной вспышки. Но если все эти ограничения преодолены, можно рассчитать и размеры функциональных единиц, и соотношение между разными по размеру частицами в присутствии различных лигандов.

Применение этого подхода к исследованию Na/K-насоса позволило показать, что в мембранных препаратах транспортных АТФаз эозинизотиоцианатом метящаяся частица трех сортов – сигнал от самых малоподвижных пропадает после обработки препаратов детергентом – он принадлежит метке, севшей на крупные агрегаты; сигнал от наиболее быстрых принадлежит метке, вращающейся вместе с цилиндром, соответствующим по размерам протомеру Na/K-насоса (Рубцов и др., 1994). Вращательная подвижность этой метки не зависит от присутствия лигандов. Средние по вращательной подвижности частицы соответствуют, по крайней мере, димерам, состоящим из двух протомеров ($\alpha\beta$)₂. Измерение вращательной подвижности этих частиц зависит от условий инкубации (табл. 2).

Эти эксперименты позволяли предполагать, что в ходе гидролитического цикла интенсивность взаимодействия протомеров может изменяться, так что на одних стадиях цикла взаимодействия ослабляются, и они выступают как индивидуальные белки, а на других стадиях они могут объединяться в более высокомолекулярные ансамбли. Воз-

Таблица 2. Вращательная подвижность Na/K-АТФазы (Boldyrev, Quinn, 1994). Представлены значения радиуса частиц, рассчитанные из величин вращательной подвижности быстрой и медленной компонент затухания фосфоресценции в присутствии ионов калия (конформация E2) или натрия (конформация E1) при различных значениях pH. Расчеты сделаны с учетом измеренной микровязкости мембран, равной 7,8 пуаз (20 °C) (Birmachu, Thomas, 1990)

Условия инкубации	E2-форма		E1-форма	
	быстрая	медленная	быстрая	медленная
pH				
6,0	2,4	13,2	2,2	6,9
6,5	2,5	12,2	2,4	7,9
7,0	2,4	11,0	2,4	7,7
7,5	2,4	9,8	2,3	8,4
8,0	2,4	10,3	2,4	9,4
8,5	2,3	5,9	2,4	9,7

можно, именно это обстоятельство объясняет различия в данных разных лабораторий, приписывающих функциональным комплексам Na/K-насоса структуру димера, тетрамера или даже еще более высокомолекулярных образований (Hayashi et al., 1983).

Представляет интерес проследить, как было доказано это предположение и выяснен механизм модифицирующего влияния АТФ на мембранные преобразователи энергии. При сравнении структуры нуклеотидов можно обнаружить, что АТФ (в отличие от других рассматриваемых соединений) имеет группу, способную протонироваться при физиологических значениях pH. Другими словами, присоединяясь к активному центру, АТФ может акцептировать протон от какой-либо подходящей группы фермента.

Действительно, обнаружилось, что такой группой является имидазольное кольцо гистидина, локализованного недалеко от N-конца α -субъединицы, – отщепление 13-членного фрагмента, содержащего гистидиновый остаток, лишает фермент способности воспринимать регулирующее действие АТФ. Таким образом, АТФ, в отличие от уже протонированных ГТФ, УТФ и ИТФ, по-видимому, способен делать то же самое, что делает защелачивание среды, выявляя сложную зависи-

мость активности от концентрации субстрата (рис. 5).

Исключением, казалось бы, служит ЦТФ, также имеющий группу, способную к обратному протонированию в физиологическом интервале pH. На самом деле ЦТФ только подтверждает сделанное заключение, поскольку в модельных экспериментах он проявляет схожие с АТФ регуляторные способности.

Таким образом, можно утверждать, что присоединение АТФ к активному центру фермента, находящегося в конформации E2, оттягивает протон от Гис-13 и вызывает целую серию изменений в расположении водородных и солевых связей в протомере, приводящих в итоге к конформационному переходу E2 – E1 (к понижению сродства к калию и возрастанию – к натрию).

И тут очень пригодились данные, полученные в разных лабораториях, пытавшихся вырастить двумерные кристаллы фермента в среде с ионами натрия или калия. Кристаллы получались разной конфигурации, и использование их для рентгеноструктурного анализа позволило выявить, что натриевая (E1) конформация кристаллизуется преимущественно в виде протомера, а калиевая (E2) – преимущественно в виде димера (Pagel et al., 2003; Morth et al., 2007).

Следовательно, индуцированный АТФ E2 – E1 переход может сопровождаться и изменением размеров олигомерного комплекса (или степенью ассоциации входящих в него протомеров). Вопрос о том, происходит ли изменение олигомерного состояния фермента и с какой стадией АТФазного цикла это связано, был решен с помощью метода молекулярной мишени. Этот метод был предложен в 1968 г. Дж. Кепнером и Р. Мейси для определения молекулярной массы мембранных белков, для очистки которых в то время еще не было разработано адекватных методов (Кернер, Масеу, 1968). Суть его заключается в том, что мембранные препараты любой степени очистки подвергаются облучению пучком нейтронов (обычно используется кобальтовая пушка) и измеряется зависимость остаточной активности от дозы облучения (которая убывает по экспоненциальному закону). Авторы метода вывели эмпирическую зависимость степени угнетения функции от дозы радиации:

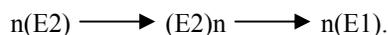
$$M_r = 6,4 \cdot 10^5 / D_{37},$$

где M_r – молекулярная масса белка в кДа, D – доза радиации, снижающая измеряемую активность до 37 % от исходной величины (мРад).

При помощи этого уравнения можно получить довольно точное значение молекулярной массы белка, осуществляющего анализируемую функцию. Авторы проверили этот метод на недавно очищенной F_0 -АТФазе митохондрий. Позже его успешно применили для оценки размеров рианодинового рецептора.

Применение этого подхода для оценки молекулярных размеров Na/K-АТФазы позволило выяснить, какова эффективная масса фермента, осуществляющего так называемые частные реакции общего цикла.

Как видно из табл. 3, молекулярный размер белка, выполняющего Na-АТФазную реакцию, соответствует массе α -субъединицы. Такого же размера белок, осуществляющий K-зависимую фосфатазу. Весь цикл Na/K-АТФазы, идущий в присутствии низких концентраций АТФ (соответствующих области отрицательной кооперативности, см. рис. 4), проводится белком несколько большего размера, соответствующим массе $\alpha\beta$ -протомера. Если концентрацию АТФ увеличить до физиологических значений (3 мМ), наблюдаемый размер функциональной единицы ощутимо возрастет. Следовательно, в ходе реализации гидролитического цикла размеры АТФазного ансамбля (или потребность во взаимодействии отдельных белковых молекул) изменяется так, что Na-зависимая АТФаза, E1P – E2P переход и K-зависимая фосфатаза осуществляются каждой α -субъединицей независимо, в завершении цикла принимает участие и β -субъединица, а при большей концентрации АТФ наступает кратковременная ассоциация $\alpha\beta$ -протомеров в более крупные E2-ассоциаты, которые более легко способны превратиться в E1, в этом и заключается механизм стимулирующего действия АТФ – в ускорении конформационного перехода



Мы видим из приведенных примеров, что в присутствии высоких концентраций АТФ фермент работает с гораздо большей молекулярной активностью. В чем же заключается выигрыш в образовании короткоживущих олигомеров в ходе осуществления гидролитического цикла? Этот выигрыш иллюстрирует рис. 7. Суммарная реакция гидролиза АТФ является экзергонической. Но частные реакции цикла носят как экзергонический, так и эндергонический характер, то есть протекают

Таблица 3. Молекулярные размеры Na/K-АТФазы на разных стадиях цикла (Болдырев, 1995)

Стадия цикла	Условия измерения	Молекулярная масса
Na-АТФаза	Na, Mg, АТФ	95 кДа
К-фосфатаза	K, Mg – p-нитрофенилфосфат	90 кДа
Na/K-АТФаза	100 мкМ АТФ	135 кДа
Na/K-АТФаза	3 мМ АТФ	360 кДа
Na/K-АТФаза	3 мМ ГТФ	125 кДа

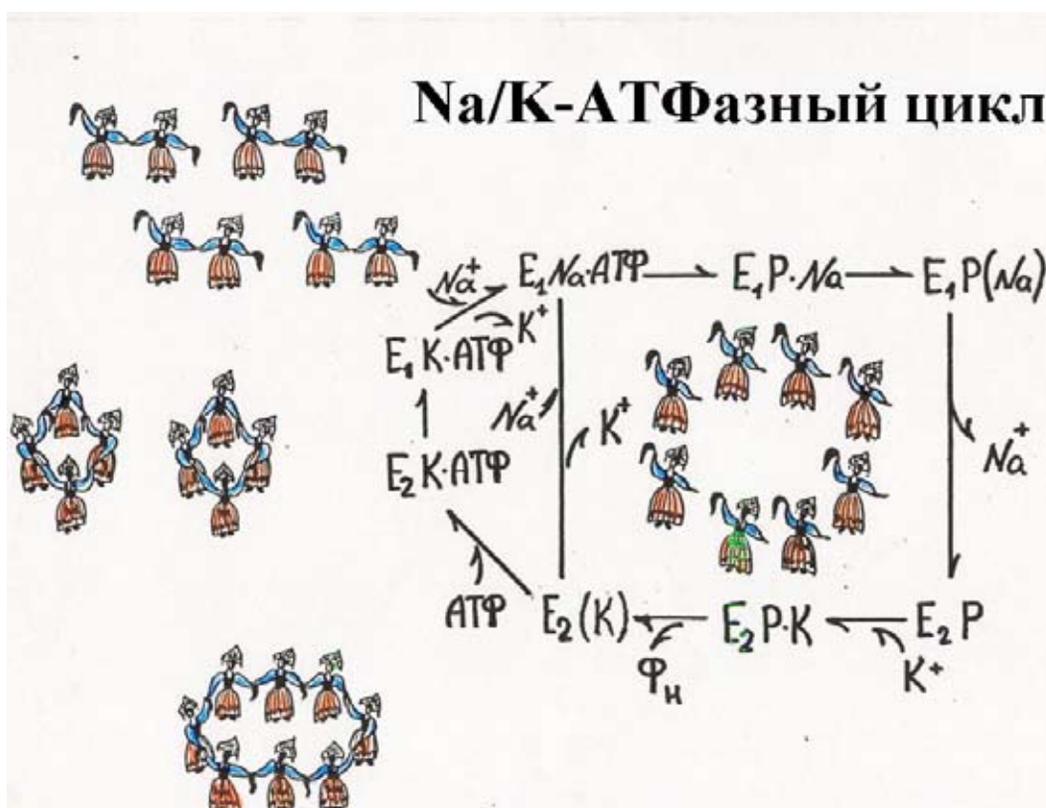


Рис. 7. Изменение олигомерного состояния фермента в ходе АТФазного цикла

как с выделением, так и с поглощением тепла. «Заслуга» АТФ заключается в такой организации работы олигомеров, при которой они трудятся со сдвигом по фазе (синфазно), то есть экзергоническая стадия одного протомера совпадает с эндергонической стадией другого – происходит «подпитка энергией» соседних белковых структур. Ясно, что субстраты, не способные к регуляции такого рода, гидролизуются Na/K-АТФазой с меньшей скоростью.

Таким образом, Na/K-насос является системой, регулируемой субстратом и концентрацией переносимых ею ионов, настраивающейся с помощью этой регуляции на текущие нужды клетки. Однако для тонкой настройки ее работы имеются и дополнительные способы регуляции. Уже давно было замечено, что некоторые препараты фермента содержат низкомолекулярный белок, очистка которого происходит параллельно с очисткой α -субъединицы. Он был назван γ -субъединицей, но до последнего времени его роль в работе насоса не была выявлена. Оказалось, что γ -субъединица входит в многочисленные белки, для которых характерна последовательность аминокислот (F-X-Y-D); их стали называть FXYP-белками. Их молекулярная масса составляет от 8 до 15 кДа, они выполняют разнообразные регуляторные функции. В настоящее время описано около 10 таких мембранных белков, в их числе фосфоламбан, сарколипин, фосфолеман и γ -субъединица Na/K-АТФазы. В клеточной мембране последняя взаимодействует только с Na/K-АТФазой, в результате чего сродство фермента к ионам натрия и калия понижается. Вне комплекса с ферментом γ -субъединица не стабильна и быстро разрушается (Лопина, 2000).

Еще одной группой природных регуляторов Na/K-АТФазы являются сердечные гликозиды. Наиболее широко употребим уба-

ин, гликозид растительного происхождения, обладающий способностью при связывании «выключать» молекулы Na/K-АТФазы. Исследователи широко использовали высокое сродство убаина к ферменту для идентификации этого белка в препаратах и для оценки специфической активности Na/K-АТФазы, не задумываясь о природе такой чувствительности фермента животного происхождения к представителю растительного мира. Однако в дальнейшем были накоплены данные о том, что в тканях животных синтезируется эндогенное убаин-подобное соединение, выполняющее функции регулятора Na/K-АТФазы. Стационарный уровень этого соединения очень низок, и В. Шонеру (Schoner, Scheiner-Bobis, 2007) понадобилось несколько сотен килограммов надпочечников, чтобы выделить несколько миллиграммов препарата для его идентификации.

Оказалось, что инкубация с убаином вызывает всплеск образования АФК в миоцитах (Liu et al., 2002) и нейронах (Boldyrev et al., 2003). Этот фактор вызывает активацию факторов трансляции и экспрессию определенных белков. Таким образом, Na/K-насос оказывается вовлеченным во внутриклеточные сигнальные процессы. Этим, в частности, объясняется заметная гипертрофия сердечной мышцы у пациентов, вынужденных регулярно принимать сердечные гликозиды для компенсации кальциевой недостаточности. Эта особенность основана на тесной связи Na/K-АТФазы и Na/Ca-обменника в ряде клеток, в том числе в клетках сердечной мышцы. Их одновременная высокая чувствительность к сердечным гликозидам позволяет при приеме гликозидов обменивать внутриклеточный натрий (появляющийся в результате частичного торможения Na/K-насоса) на внеклеточный кальций за счет работы Na/Ca-обменника. Дополнительным результатом приема глико-

зидов является рост АФК внутри клеток и систематическая активация синтеза клеточных белков.

Участие Na/K-АТФазы во внутриклеточной сигнализации

Обнаружение эндогенного убаина и участие Na/K-насоса во внутриклеточной передаче сигналов вновь обратили внимание исследователей на то, что разные ткани демонстрируют различную чувствительность к сердечным гликозидам – сердечная мышца и нервные клетки характеризуются высоким сродством к убаину, а почки – гораздо более низким. Это отражает экспрессию различных изоформ фермента в разных тканях. Известно несколько изоформ как у α -, так и у β -субъединиц, экспрессируемых в разных тканях, причем избирательность их по отношению друг к другу не абсолютна. В почках и печени экспрессируется только $\alpha 1$ изоформа, в клетках глии и скелетных мышцах – $\alpha 1$ и $\alpha 2$, а в нейронах зрелого мозга обнаруживается исключительно $\alpha 3$ (табл. 4).

Биологический смысл экспрессии различных изоформ насоса в разных тканях заключается в их разной чувствительности к регуляторным факторам. Так, $\alpha 1$ изоформа устойчива к окислению и одновременно обладает низким сродством к убаину по сравнению с другими изоформами фермента, которые, напротив, легко окисляются активными формами кислорода; они характеризуются высокой чувствительностью к сердечным гликозидам. В сердечной мышце экспрессируются две изоформы α -субъединицы – $\alpha 1$ и $\alpha 2$, причем в ходе развития первая частично замещается второй. Интересно, что после экспериментального инфаркта в сердце крыс наблюдается замена чувствительной к окислению изоформы $\alpha 2$ на более устойчивую к окислению $\alpha 1$, то

есть происходит возврат к экспрессии изоформ, присущих онтогенетически менее зрелым клеткам (рис. 8).

То же самое наблюдение было сделано в отношении мозга – после ишемического эпизода наблюдается уменьшение доли $\alpha 3$ субъединицы и возрастание доли $\alpha 1$ субъединицы. Поскольку первая изоформа экспрессируется преимущественно в нейронах, наблюдаемые изменения, вероятно, отражают перестройку метаболизма поврежденных нейронов мозга, аналогичную той, что наблюдается в условиях окислительного стресса в сердце. Смысл этих изменений становится понятным, если учесть, что $\alpha 1$ субъединица резистентна не только к убаину, но и к окислительной модификации – одним из отличий ее первичной структуры является более замаскированное расположение SH-групп в структуре белка (кроме того, $\alpha 1$ имеет на одну SH-группу меньше, чем $\alpha 3$). Таким образом, можно заключить, что преимущественное замещение менее резистентной к окислительному повреждению изоформы на более резистентную есть адаптационный ответ ткани на окислительный стресс. Однако не менее важен и вопрос о том, что теряет ткань, лишаясь АФК-чувствительной изоформы, поскольку одновременно она и убаин-чувствительна.

Имитация окислительного стресса в нейронах за счет инкубации с высокой концентрацией нейротоксина NMDA приводит к избыточной продукции АФК, которые атакуют клеточные макромолекулы. Одной из главных мишеней для АФК в нейроне является Na/K-АТФаза, причем особенно ее убаин-чувствительная форма (Boldyrev et al., 2003). Таким образом, в нейроне (где синтезируются $\alpha 1$ и $\alpha 3$ субъединицы) $\alpha 3$ -субъединица представляет сенсор АФК с обратной связью – в активном состоянии она препятству-

Таблица 4. Распространение изоформ Na/K-АТФазы в разных тканях

Ткани	α				β		
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$
Почки	+				+		
Тимус	+					+	
Легкие	+				+		+
Печень	+				+		+
Сердце	+	+			+		
Скелетная мышца	+	+			+	+	+
Гипофиз	+		+			+	
Семенники	+			+			+
Мозг нейроны глия	+		+		+		
	+	+				+	

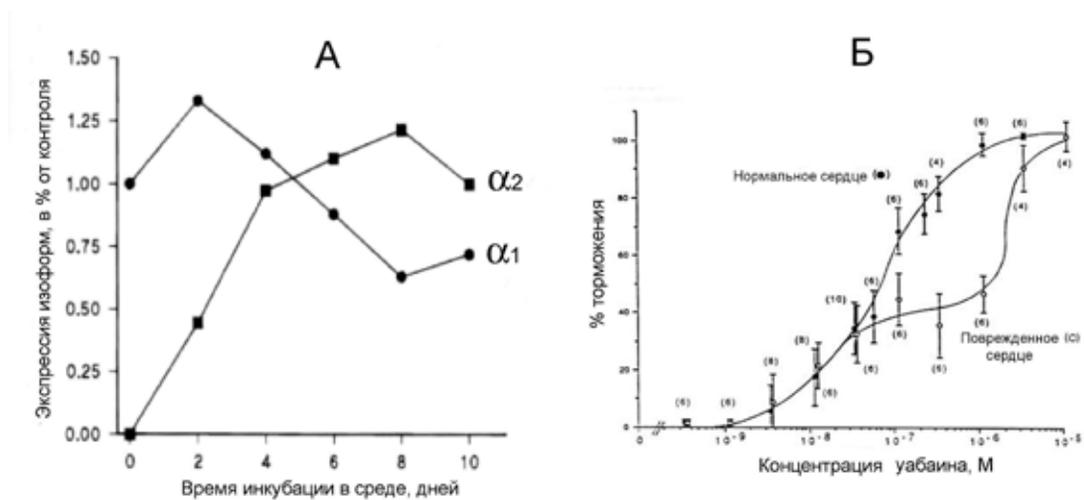


Рис. 8. Смена изоформ Na/K-АТФазы при дифференцировке миоцитов сердца в культуре (А) и изменение формы кривой ингибирования Na-насоса убаином после экспериментальной ишемии сердца взрослой крысы (Б)

ет росту свободных радикалов, а избыточная продукция АФК приводит к подавлению ее активности. Следовательно, Na/K-АТФаза выступает как фактор окислительной устойчивости нейрональной клетки, протектор от окислительного стресса. Без такого протектора нейронам было бы невозможно использовать АФК в качестве сигнальных молекул. Более того, поскольку АФК регулируют активность митоген-активируемой протеинкиназы (МАР киназы), этот фермент также оказывается под контролем Na-насоса (Карпова и др., 2008).

Недавно в лаборатории Дж. Лингрела в США получены изящные доказательства участия убаин-чувствительной АТФазы в еще одной функции мозга (Lingrel et al., 2007). Известно, что один из существенных участков первичной структуры α -субъединицы, определяющих сродство к убаину, представлен двумя аминокислотными остатками у N-конца – L111 и N122. С помощью генно-инженерных подходов были получены мыши, содержащие замены в этих аминокислотах: L111R и N122D. Они не отличались от нормальных животных по длительности жизни

и показателям сердечно-сосудистой системы в нормальных условиях, хотя Na/K-АТФаза в их почках обладала высоким сродством к убаину. Введение этим мышам АКТГ, индуцирующего выделение из надпочечников эндогенного убаин-подобного соединения, повышало кровяное давление таким же образом, как и у контрольных животных. Однако линия мышей, у которых в дополнение к вышеуказанной замене $\alpha 2$ субъединица утрачивала высокое сродство к убаину, теряла способность отвечать адекватным повышением кровяного давления на введение АКТГ. Убаин-подобный фактор выделялся в кровь, но не находил своей мишени. Это указывает, что тканевая специфичность чувствительности Na/K-АТФазы к убаину имеет прямое отношение к регуляции тонуса сосудов.

Таким образом, накопленный массив данных явным образом иллюстрирует не только участие Na/K-насоса в создании асимметричного распределения ионов по обе стороны клеточной мембраны, но и заметную роль в восприятии клеткой различных сигналов и в передаче их во внутреннее пространство клетки.

Список литературы

- Блюменфельд Л.А. (1977) Проблемы биологической физики, М., Наука, 336 с.
- Блюменфельд Л.А. (2002) Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики, М., УРСС, 158 с.
- Болдырев А.А. (1995) Олигомерная организация транспортных АТФаз в мембранном бислое. Ж. эвол. биохим. физиол. 3: 375-386.
- Болдырев А.А., Мельгунов В. И. (1985) Транспортные АТФазы. Итоги науки и техники ВИНТИ. Т. 17, 241 с.
- Болдырев А.А., Твердислов В.А. (1978) Молекулярная организация и механизм функционирования Na-насоса. Итоги науки и техники ВИНТИ. Т. 10, 147 с.
- Карпова Л.В., Аккуратов Е.Е., Булыгина Е.Р., Болдырев А.А. (2008) Убаин-чувствительная и убаин-резистентная изоформы Na⁺,K⁺-АТФ-азы гранулярных клеток мозжечка регулирует активность МАР-киназы. Биол. мембр. 25: 156-160.
- Корниш-Боуден Э. (1979) Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 280 с.
- Курганов Б.И. (1978) Аллостерические ферменты, М., Наука, 248 с.

- Пантелеева Н.С. (1975) Миозин (^{18}O -обмен и фосфорилирование), Л., Изд-во ЛГУ, 199 с.
- Лопина О.Д. (2000) Na/K-АТФаза: структура, механизм и регуляция. Биол. мембр. 13: 721-744.
- Рубцов А.М., Янг Л., Лопина О.Д., МакСтэй Д., Куинн П.Дж., Болдырев А.А. (1994) Вращательная подвижность мембраносвязанной Na/K-АТФазы. Биохимия. 59: 1900-1909.
- Смирнова И.Н., Скворцевич Е.Г., Болдырев А.А., Пантелеева Н.С. (1977) ^{18}O -обмен в процессе гидролиза АТФ и п-нитрофенилфосфата Na/K-АТФазой из мозга быка. Биохимия. 42: 2035-2038.
- Ходжкин А. (1965) Нервный импульс, М., Мир, 220 с.
- Birmachu W., Thomas D. (1990) Rotational dynamics of the Ca-ATPase in sarcoplasmic reticulum studied by time-resolved phosphorescence anisotropy. Biochemistry. 29: 3904-3914.
- Boldyrev A., Bulygina E., Carpenter D., Schoner W. (2003) Glutamate receptors communicate with Na⁺/K⁺-ATPase in rat cerebellum granule cells: demonstration of differences in the action of several metabotropic and ionotropic glutamate agonists on intracellular reactive oxygen species and the sodium pump. J. Molec. Neurochem. 21: 213-222.
- Boldyrev A., Bulygina E., Yuneva M., Schoner W. (2003) Na/K-ATPase regulates intracellular ROS level in cerebellum neurons. Ann. N.-Y. Acad. Sci. 986: 519-521.
- Boldyrev A., Quinn P. (1994) E1/E2 type cation transport ATPases: evidence for transient associations between protomers. Int. J. Biochem. 26: 1323-1331.
- Hayashi Y., Takagi T., Maezawa Sh., Matsui H. (1983) Molecular weights of alpha beta-protomeric and oligomeric units of soluble (Na⁺,K⁺)-ATPase determined by low-angle laser light scattering after high-performance gel chromatography. Biochim. Biophys. Acta. 748: 153-167.
- Kepner G.R., Macey R.I. (1968) Membrane enzyme systems. Molecular size determinations by radiation inactivation. Biochim. Biophys. Acta. 163: 188-203.
- Lingrel J.B., Williams M.T., Vorhees C.V., Moseley A.E. (2007) Na,K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. Bioenerg. Biomembr. 39: 385-389.
- Liu J., Tian J., Haas M., Shapiro J.I., Askari A., Xie Z. (2002) Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. J. Biol. Chem. 275: 27838-27844.
- Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sørensen T.L., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B., Nissen P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. Nature. 450 (7172): 1043-1049.
- Pagel P., Zatti A., Kimura T., Duffield A., Chauvet V., Rajendran V., Caplan M.J. (2003) Ion pump-interacting proteins: promising new partners. Ann. N.-Y. Acad. Sci. 986: 360-368.
- Schatzmann H.J. (1953) Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane. Helv. Physiol. Acta. 11: 346-354.
- Schoner W., Scheiner-Bobis G. (2007) Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. Am. J. Cardiovasc. Drugs. 7: 173-189.
- Skou J. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta. 23: 394-401.

Function of Na/K-pump in Excitable Tissues (Review)

Alexander A. Boldyrev

*International Biotechnological Center
of Lomonosov Moscow State University,
Vorobievsky Gory, Moscow, 119991 Russia*

Na/K-ATPase is a key enzyme supporting asymmetric distribution of Na and K ions on the outer cell membrane of animal tissues. In the review, current state of Na-pump function is discussed. The data are presented describing molecular properties and location of the enzyme molecule within the cell membrane. Evidence on oligomeric structure of Na/K-ATPase and regulation of the protomers within the complex by ATP are shown. New data illustrating participation of Na/K-pump in cell signaling are presented.

Key words: Na/K-ATPase, oligomeric structure, ATP, sodium, potassium, cell signaling
