

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

## Modelovanie izoforiem $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - ATPázy

Bakalárska práca

Autor:	Jana Macúchová
Vedúci práce :	Mgr. Petra Čechová
Študijný program:	B 1407 Chémia
Študijný obor:	Aplikovaná chémia
Forma štúdia:	Prezenčná

Olomouc 2016

# Bibliografická identifikácia

<b>Meno a priezvisko autora</b>	Jana Macúchová
<b>Názov práce</b>	Modelovanie izoforiem $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - ATPázy
<b>Typ práce</b>	Bakalárska
<b>Pracovisko</b>	Katedra biofyziky
<b>Vedúci práce</b>	Mgr. Petra Čechová
<b>Rok obhajoby</b>	2016
<b>Abstrakt</b>	<p>Cieľom tejto predloženej bakalárskej práce bolo vytvorenie homológnych modelov sodno–draselnej pumpy, ktorá sa v ľudskom tele nachádza v rôznych izoformách. Modely rôznych izoforiem vytvorené pomocou molekulového modelovania nám poskytli náhľad, ako sa môžu od seba navzájom líšiť. Všetky modely boli následne vyhodnotené pomocou Ramachandranového diagramu a G-faktoru.</p>
<b>Kľúčové slová</b>	$\text{Na}^+/\text{K}^+$ - ATPáza, izoformy, molekulové modelovanie, heterodiméry
<b>Počet strán</b>	54
<b>Jazyk</b>	Slovenčina

# Bibliographical identification

<b>Author's first name and surname</b>	Jana Macúchová
<b>Title</b>	Modeling of the Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - ATPase Isoforms
<b>Type of thesis</b>	Bachelor
<b>Department</b>	Department of Biophysics
<b>Supervisor</b>	Mgr. Petra Čechová
<b>The year of presentation</b>	2016
<b>Abstract</b>	<p>The aim of this bachelor thesis was create homology model of sodium–potassium pump, which is located in human body in different isoforms. Models of various isoforms created using molecular modelling gave us a preview, how these isoforms may be different from each other. Models were eventually evaluated by Ramachandran plot and G–factor.</p>
<b>Keywords</b>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - ATPase, isoforms, molecular modelling, heterodimers
<b>Number of pages</b>	54
<b>Language</b>	Slovak

Prehlasujem, že túto bakalársku prácu som vypracovala samostatne za pomoci citovanej literatúry a zdrojov pod vedením Mgr. Petry Čechovej.

V Olomouci, júl 2016

.....

Podpis

Chcela by som poďakovať predovšetkým Mgr. Petre Čechovej za trpezlivosť, pochopenie a cenné rady, ktoré mi venovala pri vedení mojej bakalárskej práce . Ďalej chcem poďakovať konzultantovi doc. RNDr. Martinovi Kubalovi, Ph.D za cenné pripomienky k tejto práci.

# Obsah

1. ÚVOD .....	8
2. Teoretická časť .....	9
2.1 Membrána .....	9
2.2 ATPázy.....	9
2.2.1 ATPázy P-typu .....	9
2.2.1.1 Mechanizmus $E_1$ a $E_2$ .....	11
2.3 $Na^+/K^+$ -ATPáza .....	12
2.3.1 Výskyt a význam.....	12
2.3.2 Transport iónu cez bunkovú membránu.....	12
2.3.3 Štruktúra NKA .....	13
2.3.3.1 Podjednotka $\alpha$ .....	13
2.3.3.2 Podjednotka $\beta$ .....	15
2.3.3.3 Podjednotka $\gamma$ - FXYD protein.....	16
2.3.4 Izoformy podjednotiek NKA .....	17
2.3.5 Mutácie a choroby.....	21
2.4 Molekulové modelovanie.....	21
2.4.1 Kryštalická štruktúra 2ZXE .....	22
2.4.2 Kryštalická štruktúra 4HQJ .....	23
2.4.3 Silové pole.....	23
2.4.4 Ramachandranov diagram.....	24
2.4.5 G-faktor .....	25
3. Experimentálna časť .....	26
3.1 Metódy .....	26
3.1.1 Software .....	26
3.1.2 Sodno-draselná pumpa .....	26
3.1.3 Molekulové modelovanie.....	26
3.2 Výsledky a diskusia.....	28
3.2.1 Alignment.....	28
3.2.2 Modely izoforiem NKA .....	29
3.2.2.1 Izoformy NKA kryštalickej štruktúry 2ZXE.....	29
3.2.2.2 Izoformy NKA kryštalickej štruktúry 4HQJ.....	38
4. Záver .....	48

5. Summary .....	49
6. Použitá literatúra .....	50
7. Zoznam skratiek .....	54
8. Prílohy .....	55
Príloha 1 .....	55

# 1. ÚVOD

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza (NKA) sa radí medzi transmembráné proteíny, ktoré sú prítomné vo všetkých živočíšnych bunkách. Od objavenia NKA bol zaznamenaný veľký pokrok v oblasti štúdií jej vlastností, štruktúry či funkcií pomocou experimentálnych alebo teoretických metód. Hlavnou funkciou tohto proteínu je transport sodných a draselných iónov cez cytoplazmatickú membránu. Odlišná koncentrácia oboch iónov tvorí membránový potenciál, ktorý je nutný pre správne fungovanie bunky. Zmeny v tomto deji môžu ovplyvniť i iné procesy, čo môže vyústiť do rôznych porúch a chorôb.

NKA sa skladá z minimálne dvoch podjednotiek  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky. V niektorých tkanivách sa tieto podjednotky nachádzajú i s  $\gamma$  podjednotkou. Avšak v rôznych tkanivách ľudského tela sa NKA vyskytuje v izoformách týchto podjednotiek a ich rôznymi kombináciami a odlišnosťami vznikajú mutácie, ktoré môžu spôsobiť vážne ochorenia nervovej a pohybovej sústavy.

V súčasnosti sa k skúmaniu biomolekúl - v biochémií najmä proteínov, využívajú okrem experimentálnych metód aj metódy molekulovej mechaniky a dynamiky. Pomocou molekulovej mechaniky a modelovania sa dokážu pripraviť modely nie len z biologickej oblasti, ale aj z oblastí fyziky či chémie. V predloženej bakalárskej práci je študovaným modelovým systémom práve NKA a jej rôzne izoformy, ktoré boli vytvorené pomocou homológneho modelovania na základe dvoch kryštalických štruktúr, ktoré zachytávajú rôzne kroky jej reakčného cyklu. Tieto izoformy zároveň odpovedajú ľudským sekvenciám. V práci sú tiež porovnávané kvality modelov jednotlivých izoformiem.



## 2. Teoretická časť

### 2.1 Membrána

K základným komponentom bunky patria membrány, ktoré zabezpečujú správne fungovanie bunky ako je napr. transport, rast či prenos signálov medzi bunkou a prostredím či bunkami navzájom. Avšak okrem týchto nevyhnutných procesov ohraničuje vnútorné bunkové orgány s rôznym vnútorným zložením a funkciou (jadro, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát atď.) a separuje bunky od okolia.

Základom biologických membrán je fosfolipidová dvojvrstva, kde sú zakotvené peptidy a proteíny, ktoré sú v tejto vrstve uložené rôzne hlboko a majú rozdielne štruktúry a funkcie, najmä katalyzovať rôzne chemické deje. Zložky fosfolipidovej dvojvrstvy sú však nerovnomerne umiestnené a vzniká tak asymetria medzi vonkajším a vnútorným povrchom. Zatiaľ, čo na vnútornej strane membrány sa nachádzajú molekuly fosfolipidov s hydrofóbnymi (nepolárnymi) vlastnosťami, na vonkajšej strane sú fosfolipidy s hydrofilnými (polárnymi) reťazcami. Najčastejšie sa v biomembránach vyskytujú lipidy zo skupiny fosfolipidov, glykolipidov a sterolov - najmä cholesterol. Medzi zástupcov fosfolipidov v membráne patria napríklad fosfatidylcholín (PC) a fosfatidylserín (PS). Lipidy obsahujúce PC pri fyziologických hodnotách pH sú elektricky neutrálne a lipidy, ktoré obsahujú PS sú záporne nabité<sup>1,2</sup>.

### 2.2 ATPázy

Nevyhnutnou podmienkou pre život bunky je aktívny transport látok cez bunkovú membránu. Aby mohol tento transport prebehnúť, musí bunka vynaložiť množstvo energie, ktorú získava najmä z molekúl ATP. Proteíny, ktoré získavajú energiu z molekúl ATP sa nazývajú ATPázy<sup>3</sup>. V súčasnosti sa ATPázy delia do štyroch skupín F-, V-, „ABC- a P-typ<sup>4</sup>. Ako prvá objavená bola Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> – ATPáza, patriaca do skupiny ATPáz P-typu, ktorú skúmal Jens Skou v roku 1957 na krabích nervoch<sup>5</sup>.

#### 2.2.1 ATPázy P-typu

ATPázy P-typu patria medzi početnú rodinu integrálnych membránových transportérov, ktoré boli nájdené v rôznych formách života od archeonov až po človeka<sup>6</sup>. Členovia tejto rodiny vytvárajú a udržiavajú chemické gradienty tým, že presúvajú katióny, ťažké kovy a lipidy cez bunkovú membránu.

Počas cyklu hydrolyzy ATP sa uvoľnený fosfát z ATP pripája na proteín prostredníctvom aminokyseliny aspartátu. Tieto vytvorené medzistupne na konzervovanom aspartátovom reziduu počas funkčného cyklu patria medzi základné charakteristiky ATPáz P–typu<sup>3</sup>.

Väčšina ATPáz sa nachádza takmer vo všetkých živočíšnych bunkách, avšak nájdu sa aj také, ktoré sa nevyskytujú v živočíšnych bunkách, ale nájdeme ich napr. v kvasinkách. Primárnu štruktúru ATPáz P–typu tvoria cytoplazmatické domény: doména N je schopná naviazať nukleotidy, doména A zaisťuje konformačné zmeny proteínov a na doménu P sa naviaže fosfátová skupina z ATP. Transmembránovú doménu M tvorí osem až desať helixov, ktoré sú zároveň spoločným znakom pre všetky ATPázy typu P<sup>7</sup>. Táto skupina sa delí na päť podskupín (I - V) a niektoré z nich majú ešte triedy.

Podskupina I. má dve triedy - I.A a I.B.

I.A obsahuje ATPázy nachádzajúce sa u baktérií.

I.B zahŕňa transportéry medi a ťažkých kovov.

Najpočetnejšia je podskupina II pozostávajúca z II.A, II.B, II.C, II.D triedy.

II.A obsahuje vápnikové pumpy, ktoré viažu dva  $\text{Ca}^{2+}$  ióny.

II.B zahŕňa taktiež vápnikové pumpy, ktoré viažu jeden  $\text{Ca}^{2+}$  ión.

II.C obsahuje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  – ATPázu,  $\text{H}^+/\text{K}^+$  – ATPázu.

II.D zahŕňa pumpy, ktoré sú zodpovedné za transport sodného iónu v hubách.

Podskupina III obsahuje napríklad  $\text{H}^+/\text{K}^+$  – ATPázu a  $\text{Mg}^{2+}/\text{K}^+$  – ATPázu objavenú v droždí, rastlinách a prvokoch, ale nie u mnohobunkových živočíchov.

Podskupina IV bola nájdená v ľudských bunkách, ktoré obsahujú aminofosfolipidovú ATPázu (flipázu) bežne sa vyskytujúcu u prvokov, v bunkách cicavcov, ale zatiaľ funkcia tohto proteínu nebola objasnená.

Poslednou podskupinou je V, ktorá sa vyskytuje v eukaryotických bunkách avšak jej funkcia nie je úplne objasnená<sup>8</sup>. Ale predpokladá sa, že má za úlohu riadiť funkciu mRNA rôznych tkanivách, no môže plniť aj špecifickú funkciu v tkanivách mozgu, pečeni a žalúdku<sup>9</sup>.

ATPázy P–typu sa tiež nazývajú aj E1 a E2 ATPázy, pretože sa vyskytujú v dvoch konformáciách E1 a E2 a líšia sa v mnohých vlastnostiach napr. afinitou k príslušným iónom, citlivosťou k ATP alebo ADP atď. Najviac štúdií vykonaných v súvislosti s E1 a E2 konformáciami boli vykonané na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  – ATPáze. Tieto štúdie poukázali na fakt, že transport iónov cez bunkovú membránu sa realizuje na základe týchto zmien v konformácii, ktoré sú poháňané hydrolýzou ATP<sup>10</sup>.

### 2.1.1.1 Mechanizmus E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub>

K dosiahnutiu aktívneho transportu katiónov cez bunkovú membránu proti elektrochemickému gradientu je potrebné zabrániť otvoreniu priechodu, čo by viedlo k rýchlemu spätnému toku iónov, a tým by došlo k narušeniu koncentračného gradientu. Aby tento presun iónov cez bunkovú membránu mohol prebehnúť, musí prebiehať v určitých krokoch, pri ktorých dochádza k striedavému otváraniu proteínu na opačnej strane. V prvom kroku sa vytvorí fosforylovaný medziprodukt, reakciou enzýmu s MgATP. Vzniká medziprodukt (E1P), ktorý má vysokú energiu a môže dochádzať ku defosforylácii za uvoľnenia ADP. V druhom kroku dochádza k zmenám vo vnútri proteínu, čo umožňuje transport katiónov cez bunkovú membránu, pričom dochádza ku zmene kovalentne viazaného fosfátu na nízkoenergetický typ E2P. Súčasne s premenou E1P na E2P sa uvoľnia katióny na druhej strane membrány. E2 stav má nižšiu afinitu k  $\text{Na}^+$  a je schopný naviazať protionty. Odstránenie fosfátu z enzýmu prebehne v treťom kroku a následne v štvrtom kroku sa cyklus vráti do pôvodného stavu E1<sup>11</sup>.

ATPáza je zložená z troch cytoplazmatických domén, a to domény N, ktorá je schopná viazať nukleotidy, domény P obsahujúcej miesto pre naviazanie fosfátu a domény A, ktoré je zodpovedná za konformačné zmeny. Poloha molekuly ATP slúžiacej k hydrolýze je zásadná pre funkciu ATPázy. Molekula ATP je viazaná v doméne N, pričom fosfát smeruje k reaktívnemu aspartátu v doméne P.  $\text{Mg}^{2+}$  kofaktor a lysín na jednej strane postranného reťazca aspartátu stabilizuje jeho konformáciu, pričom môže dochádzať k naviazaniu  $\gamma$  - fosfátu z ATP, čo môže spôsobiť delokalizáciu záporného náboja a zníženie elektrostatického odpudzovania. Ďalšie  $\text{Mg}^{2+}$  stabilizuje odstupujúcu skupinu ADP pomocou interakcie s  $\alpha$  a  $\beta$  - fosfátom<sup>12</sup>. Prenos  $\gamma$  - fosfátu preruší spojenie medzi doménami N a P, čo umožňuje vzdialenie domény N, uvoľnenie ADP a následnú väzbu ATP. Doména A sa potom otočí do priestoru a spája sa s fosforylovanou P doménou a zabraňuje samovoľnej hydrolýze aspartyl - fosfoanhydridu. ATP väzba podporuje uvoľnenie fosfátu, čo spôsobuje odpojenie

A domény od miesta fosforylácie a návrat do E1 stavu <sup>13</sup>. Pri otočení domény A dochádza k zmene sklonu a polohy transmembránových helixov M1, M2, M3 a M4 a vytvárajú tak vstupné miesto pre ióny <sup>13</sup>. Pohyb hore a dole vzhľadom k membráne vykonáva doména P, zároveň sa deformuje miesto pre naviazanie iónov, čo vedie k zvýšeniu alebo zníženiu afinity k príslušným iónom a ich následné uvoľnenie <sup>14</sup>.

## **2.3 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza**

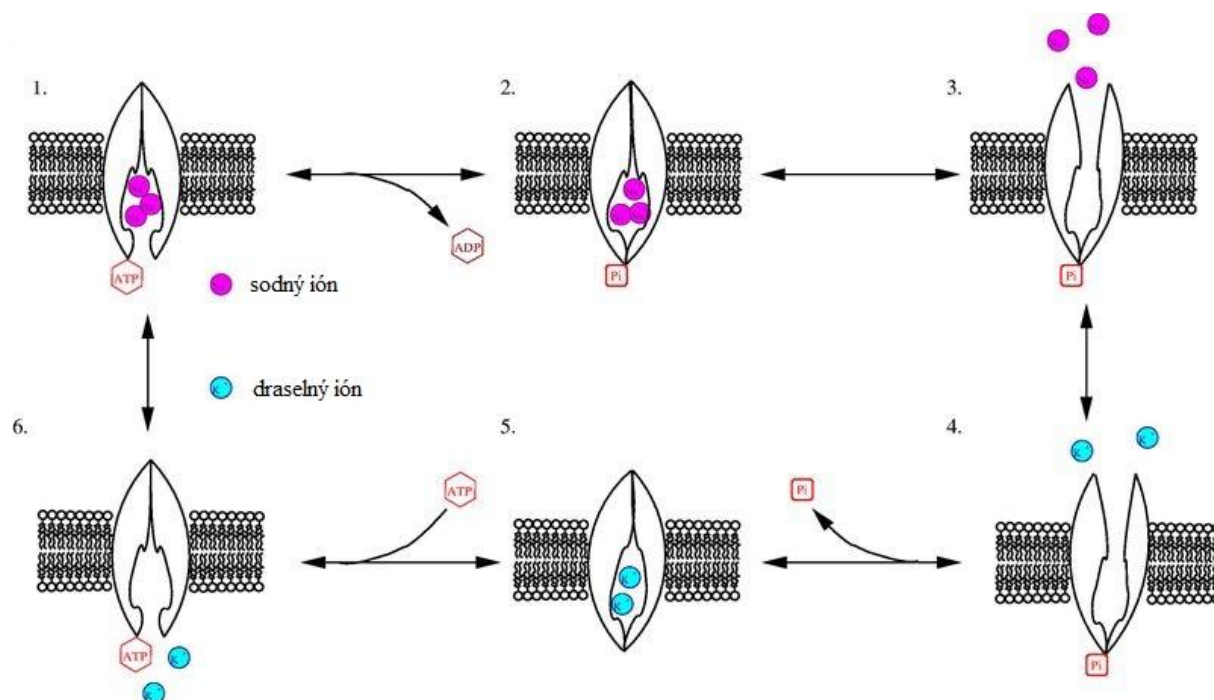
### **2.3.1 Výskyt a význam**

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPáza (sodno–draselná pumpa, NKA) patrí do veľkej skupiny ATPáz P–typu, ktoré zabezpečujú aktívny transport iónov cez biologické membrány<sup>8</sup>. Tento esenciálny membránový proteín sa vyskytuje vo všetkých živočíšnych bunkách. Využitím hydrolýzy jednej molekuly ATP transportuje tri ióny sodíka von z bunky a dva draselné ióny do vnútra bunky. Tento aktívny transport vytvára elektrochemický gradient, ktorý napomáha udržiavať osmotický tlak v bunke a napomáha vytvárať membránový potenciál. Tento potenciál je využívaný aj pre príjem ďalších látok do bunky ako sú napr. živiny, ióny, či neurotransmitery. Medzi ďalšie funkcie tohto potenciálu patrí regulácia bunkového objemu a udržiavanie stáleho pH vo vnútri bunky<sup>11</sup>. Tento proteín hrá významnú úlohu pri reabsorpcii iónov Na<sup>+</sup> a vody v obličkách a je nevyhnutný i pre udržanie homeostázy a telesných tekutín<sup>15,16</sup>.

### **2.3.2 Transport iónu cez bunkovú membránu**

Mechanizmus transport iónov na väzbové miesta v proteínoch je spojený s otváraním a zatváraním priestoru pre naviazané katióny z cytoplazmy alebo extracelulárnej oblasti, ktoré súvisí s konformačnými zmenami E1 a E2 a nazýva sa Post - Albertsov model<sup>16</sup>. Pumpa v E1 konformácii s naviazaným ATP má vysokú afinitu ku trom iónom sodíka, pričom po naviazaní Na<sup>+</sup> dochádza k fosforylácii proteínu z intracelulárnej strany (cytoplazmy) – konformácia E1P. Energia z hydrolýzy ATP je využitá na konformačnú zmenu proteínu a ióny sodíka sa nachádzajú vo vnútornej časti jeho membrány. Následne dochádza ku prechodu na konformáciu E2P a uvoľnia sa sodné ióny do extracelulárneho priestoru. Pumpa v tejto konformácii má vysokú afinitu k naviazaniu dvoch draselných iónov. Aby došlo k uzatvoreniu draselných iónov do vnútra membránovej časti proteínu, musí dochádzať ku uvoľneniu fosfátu - konformácia E2. Naviazaním ATP dochádza k navráteniu pumpy

do konformácie E1 a draselné ióny sú vypustené do cytoplazmy a cyklus sa môže zopakovať (viz obrázok č.1)<sup>17</sup>.



**Obrázok 1.** Schematický cyklus Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy<sup>18</sup>. (1) Pumpa s naviazaným ATP má vysokú afinitu ku trom iónom sodíka v E1 konformácii. (2) Na konformačnú zmenu proteínu je využitá energia z hydrolýzy ATP, pričom sodné ióny sú vo vnútri membrány. (3) Zmenou konformácie z E1 na E2 dochádza k uvoľneniu sodných iónov do extracelulárneho priestoru. (4) Pumpa s naviazaným fosfátom v konformácii E2 má vysokú afinitu ku dvom iónom draslíka. (5) Uvoľnením fosfátu dochádza ku konformačnej zmene proteínu a draselné ióny sú vo vnútri membrány. (6) Naviazaním ATP dochádza k navráteniu pumpy do konformácie E1, dochádza k uvoľneniu draselných iónov do cytoplazmy a cyklus sa môže opäť zopakovať<sup>17</sup>.

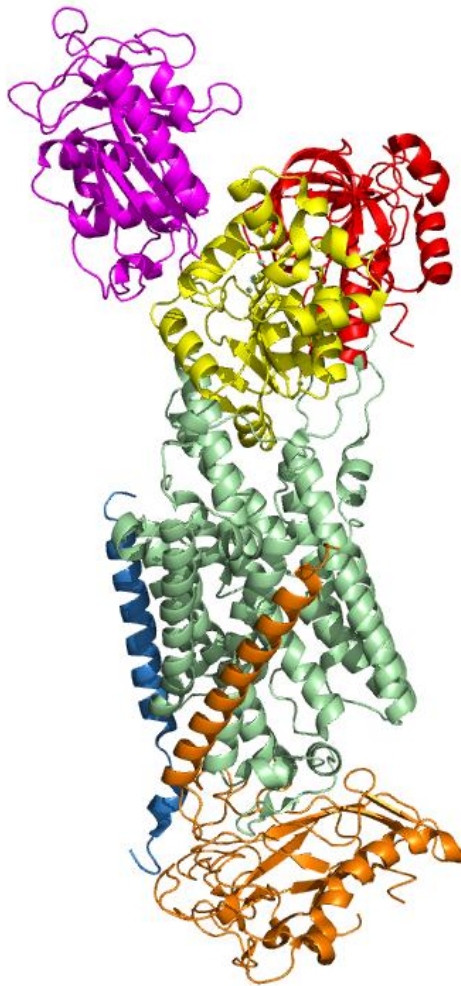
### 2.3.3 Štruktúra NKA

Sodno - draselná pumpa je zložená minimálne z dvoch hlavných polypeptidov – podjednotky α a β. V niektorých tkanivách sa tieto podjednotky nachádzajú i s γ podjednotkou.

#### 2.3.3.1 Podjednotka α

Podjednotka α NKA obsahuje väzbové miesta pre katióny a ATP, molekulovú hmotnosť má približne 110 kDa a tvorí ju približne 1000 aminokyselín. Túto podjednotku

tvorí desať transmembránových helixov (M1-M10), C–koniec a N–koniec smerujúci do cytoplazmy. Ďalej pozostáva z predĺžených segmentov, ktoré vytvárajú cytoplazmatické domény – domény A, N a P , pričom každá z nich má inú funkciu. Doména A riadi konformačné zmeny proteínu, zatiaľ čo doména N umožňuje naviazať nukleotidy a P doména obsahuje miesto, kde sa naviaže fosfátová skupina z ATP. Cytoplazmatický segment, ktorý spája  $\alpha$  helixy M4 a M5 (sľučka C45) tvorí doménu N a P. Tento segment obsahuje miesto, kde je naviazané aspartátové reziduum Asp 369 (v ľudskej sekvencii sa označuje ako D376), kde sa v procese fosforylácie naviaže fosfát z ATP počas katalytického cyklu<sup>7</sup>. Ďalší cytoplazmatický segment spájajúci helixy M2 a M3 (sľučka C23) a N–koniec tvorí doménu A. Väzbové miesta pre naviazanie iónov sú spoločné pre oba ióny, nachádzajú sa v membránovej časti podjednotky  $\alpha$  a to medzi helixami M4 a M5, M6 a M8. Helixy M7 a M10 sa dotýkajú transmembránovej časti podjednotky  $\beta$ , M9 helix je spojený s  $\gamma$  podjednotkou (viz obrázok 2)<sup>11,19,20</sup>.



**Obrázok 2:** Štruktúra  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy. Podjednotku  $\alpha$  tvorí desať transmembránových helixov (zelená) a cytoplazmatické domény. Cytoplazmatická sľučka C45 tvorí doménu N (fialová) a doménu P (žltá). Doménu A (červená) tvorí N koniec a sľučka C23. Podjednotka  $\beta$  je zobrazená oranžovou farbou a helix podjednotky  $\gamma$  je znázornený modrou farbou (PDB kód 2ZXE).

### 2.3.3.2 Podjednotka $\beta$

Ďalšou dôležitou súčasťou NKA je podjednotka  $\beta$ , ktorej molekulová hmotnosť je približne 55 kDa a tvorí ju približne 300 aminokyselín. V extracelulárnom priestore sa nachádza väčšia časť tejto podjednotky a do cytoplazmy zasahuje len N-koniec transmembránového helixu<sup>17</sup>. Doména v extracelulárnej časti sa vyznačuje 3 S-S mostíkmi medzi cysteínom a N-glykozidickej väzby. Časť proteínu, ktorý sa nachádza

na transmembránom helixe a je umiestnený medzi prvým mostíkom S-S obsahuje miesto, kde sa spája so sľučkou medzi helixom M7 a M8 s  $\alpha$  podjednotkou<sup>21</sup>.

Podjednotka  $\beta$  má hlavnú funkciu ako molekulárny chaperon, ktorý napomáha k správne mu skladaniu štruktúry  $\alpha$  podjednotky, čím ju napomáha ukotviť v membráne a zabraňuje tak degradácii proteínu. Okrem funkcie chaperonu a konformačnej stability  $\alpha$  podjednotky, má vplyv aj na aktivitu NKA, či afinitu k draselným alebo sodným iónom<sup>22</sup>.

### 2.3.3.3 Podjednotka $\gamma$ - FXYD protein

Tretí proteín, ktorý sa v niektorých tkanivách vyskytuje spolu s podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ , pochádza zo skupiny FXYD. Názov tejto skupiny pochádza zo sekvencie aminokyselín FXYD: F pre fenylalanín, X pre ľubovoľnú aminokyselinu, Y pre tyrosín a D pre aspartát<sup>23</sup>. Tento malý polypeptid zo skupiny špecifických tkanivových proteínov má približnú molekulárnu hmotnosť od 8 do 14 kDa a obsahuje 61-95 aminokyselín. Tvorí ho jeden transmembránový helix s C-koncom, ktorý zasahuje do cytosolu a hrá dôležitú úlohu v regulácii enzymatickej aktivity v bunkách<sup>17,24</sup>.

V súčasnej dobe u cicavcov poznáme sedem proteínov so sekvenciou FXYD. FXYD1 (phospholemman) spolu s podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$  má najväčšie zastúpenie najmä v srdci, kostrovej svalovine, pečeni či ľadvinách. Účastní sa tiež regulácie objemu bunky a hrá úlohu pri svalovej kontrakcii. Z experimentov vyplýva, že FXYD1 je pomocnou jednotkou NKA, avšak jej úloha nie je zatiaľ známa, preto sa nemôže posúdiť či tento proteín má schopnosť znižovať afinitu NKA k sodným alebo draselným iónom.

FXYD2 (alebo  $\gamma$  podjednotka sodno–draselnej pumpy) sa vyskytuje v dvoch variantách FXYD2a a FXYD2b a nachádza sa predovšetkým v obličkách. Tieto varianty sa líšia aminokyselinami na ich N konci. Pri väzbe FXYD2 na NKA sa zvyšuje afinita k ATP, ktorá súvisí s konformačnými zmenami, ale súvisí aj so zvyšovaním či znižovaním afinity k sodným alebo draselným iónom.

FXYD3 (Mat-8) je exprimovaný v maternici, žalúdku a hrubom čreve, ale nájdeme ho i vo vaječníkoch, pľúcach či prsiach. Ale pôvodne bol identifikovaný v rakovinových nádoroch na prsiach, prostate, ale i črevách. Svojimi účinkami je podobný proteínu FXYD1, ale preukazuje aj vlastnosti, ktoré nie sú typické pre ostatné FXYD proteíny. Tomuto polypeptidu sa neštiepi signálna sekvencia, čo dokazuje prítomnosť dvoch



transmembránových domén. Ďalšou odlišnosťou je jeho schopnosť asociovať s  $H^+/K^+$ -ATPázou a hrá úlohu v spracovaní glykoproteínov.

FXYP4 (CHIF) sa nachádza v hrubom čreve a v zbernom kanáliku obličiek, kde napomáha reabsorpcii iónov aj pri nízkych vnútrobunkových koncentráciách a zvyšuje tak afinitu k sodným iónom. V hrubom čreve sa musia kontrolovať procesy reabsorpcie sodných iónov liečbou glukokortikoidmi, aby sa neznížilo množstvo draselných iónov<sup>25</sup>. Pri spojení FXYP4 s NKA je transport iónov asi štyrikrát rýchlejší ako u FXYP2.

FXYP5 sa prevažne nachádza v rakovinových bunkách, kde spôsobuje rast nádorov a rozširovanie metastáz.

FXYP6 je exprimovaný v mozgu, kde jeho úloha súvisí s nervovými vzruchmi. Tento proteín spolu s FXYP 5 nemá súvis s NKA.

FXYP7 je nájdený len v mozgu, pričom má zastúpenie v neurónoch a gliových bunkách. Stabilitu proteínu dodáva O-glykolyzácia na jeho N-konci. Od ostatných proteínov zo skupiny FXYP sa odlišuje tým, že zvyšuje svoju afinitu k draselným iónom za účelom podráždenia neurónu. Avšak tieto účinky sa prejavujú len v asociácii s  $\alpha_1\beta_1$  protomérom a čiastočne i s  $\alpha_2\beta_2$  protomérom<sup>24,26</sup>.

### 2.3.4 Izoformy podjednotiek NKA

U ľudí boli objavené rôzne izoformy podjednotiek sodno-draselnej pumpy (obrázok 3 a 4). Tieto izoformy sa odlišujú nie len svojou rôznou afinitou k draselným či sodným iónom, ale i poradím aminokyselín v jednotlivých reťazcoch. U podjednotky  $\alpha$  boli objavené 4 izoformy:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  a  $\alpha_4$ , pričom každá z nich sa vyskytuje v rôznych tkanivách. Takmer vo všetkých tkanivách najmä v obličkách dominuje izoforma  $\alpha_1$ . Izoforma  $\alpha_2$  prevláda najviac v kostrových svaloch, ale i v mozgu, srdci, očiach či tukových tkanivách a jej úlohou je aj upravovať krvný tlak ako odpoveď na stres<sup>27</sup>. Izoformu  $\alpha_1$  taktiež môžeme nájsť na povrchu membrány svalových buniek - sarkolemy, zatiaľ čo izoforma  $\alpha_2$  sa nachádza v transversálnych tubuloch preliáčenej sarkolemy. V stave relaxácie svalu je prenos  $Na^+/K^+$  neaktívny, ale pri kontrakcii svalov sa nároky na prenos týchto iónov zvyšuje. Aby kontrakcia svalu bola správna a dostatočne silná, musí obsahovať  $\alpha_2$  izoformu a na to, aby napomáhala odolať únave, je jej prítomnosť v tubuloch sarkolémy dôležitá. Preto izoforma  $\alpha_1$  nie je schopná úplne nahradiť  $\alpha_2$ <sup>28</sup>.

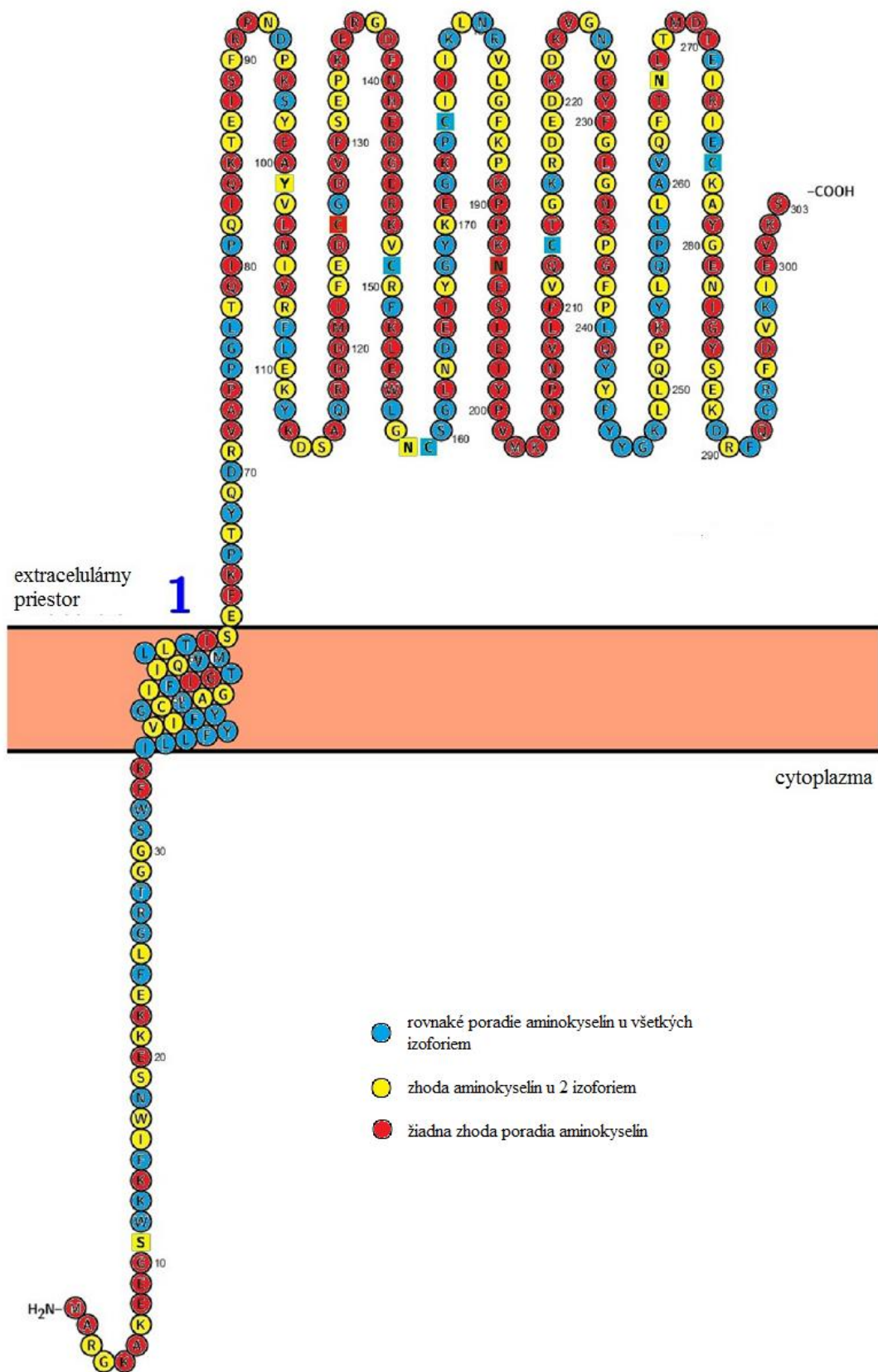
Neurónom a bunkám srdcovej svaloviny dominuje  $\alpha_3$  izoforma, ktorá má zásadnú úlohu pri synaptickej aktivite. Izoforma  $\alpha_3$  má nižšiu afinitu k sodným iónom ako  $\alpha_1$  a jej

úplnou inhibíciou sa zistilo, že stráca schopnosť obnoviť koncentráciu intracelulárneho  $\text{Na}^+$  v neurónoch. Ak však inhibícia nebola úplná a hladina  $\text{Na}^+$  bola obnovená, tak sa zvýši aktivita sodno-draselné pumpy s čím je spojené aj zvýšenie spotreby energie. Dokonca i malý vplyv inhibície  $\text{Na}^+$  majú veľký dopad na membránový potenciál<sup>29</sup>.

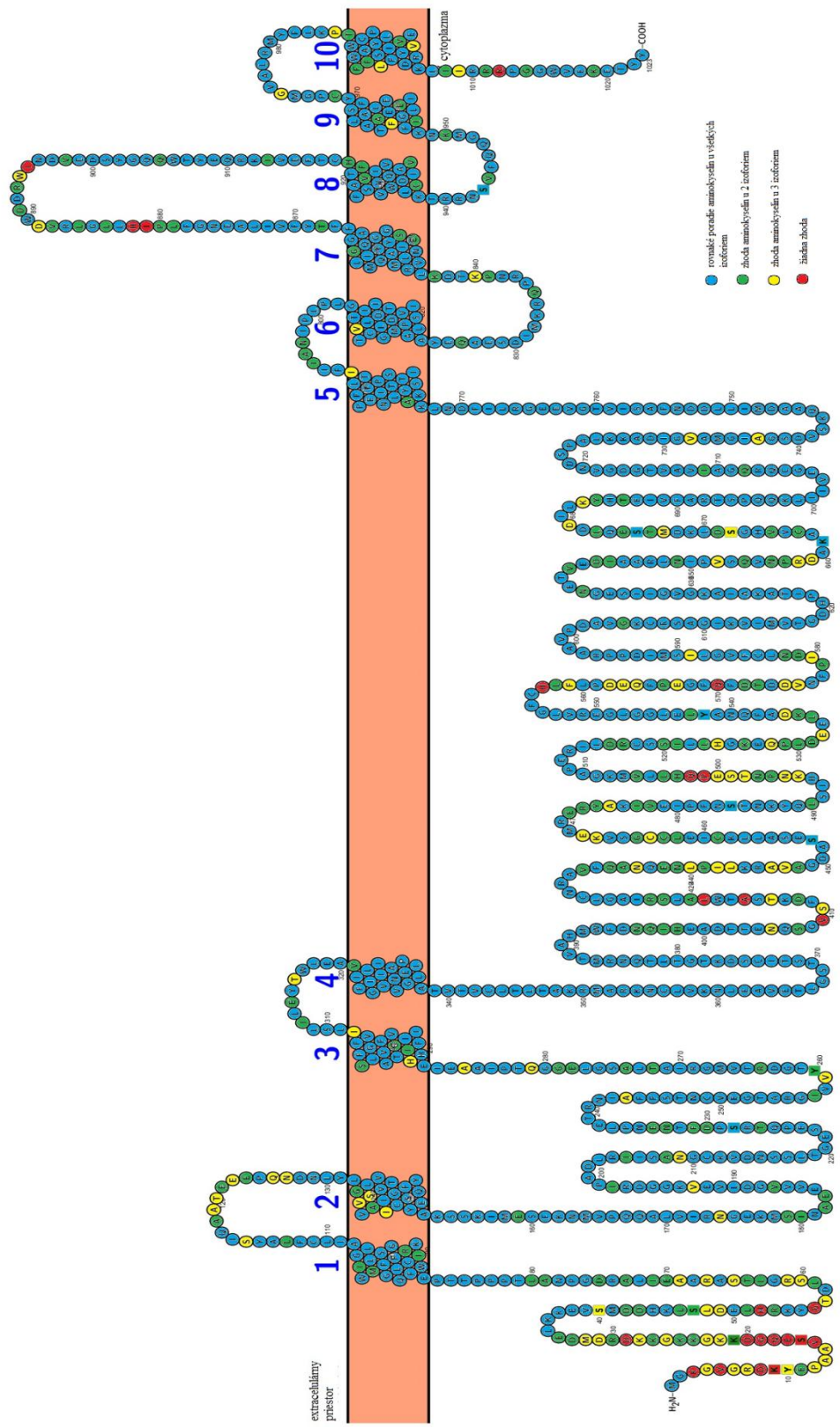
Poslednou izoformou je  $\alpha 4$ , ktorá sa nachádza v spermiách<sup>30,31</sup>. Izoformy môžu byť ovplyvňované aj prítomnosťou extracelulárneho  $\text{Na}^+$ , pričom  $\alpha 4$  izoforma je menej ovplyvňovaná zmenami  $\text{Na}^+$  než  $\alpha 1$ . Izoforma  $\alpha 4$  udržuje iónové gradienty počas procesu kapacitácie (proces dozrievania vajícok a spermií pred oplodnením), aby nedošlo k zníženiu membránového potenciálu a inhibícii extracelulárnym sodíkom<sup>32</sup>.

Podjednotka  $\beta$  má len 3 izoformy na rozdiel od  $\alpha$  podjednotky. Izoforma  $\beta 1$  je všadeprítomná a nachádza sa vo väčšine tkanív spoločne s izoformou  $\alpha 1$ <sup>33</sup>. V neurónoch a bunkách srdcovej svaloviny je dominantne exprimovaná  $\beta 2$  izoforma a v spermiách spolu s  $\alpha 4$  izoformou prevažuje  $\beta 3$ <sup>34,35</sup>.

K heterogenite NKA prispieva fakt, že jednotlivé izoformy  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky sa spájajú v rôznych kombináciách do  $\alpha\beta$  heterodimérov. V epifýze sú prítomné izoenzýmy a to  $\alpha 1\beta 2$  a  $\alpha 3\beta 2$ <sup>36</sup>. Kombinácia izoformiem  $\alpha 3\beta 2$  vytvára heterodimér nachádzajúci sa v sietnici buniek fotoreceptorov<sup>36,37</sup>, zatiaľ čo v sieti krvných ciev v každej komore mozgu sa nachádza izoenzým skladajúci sa s  $\alpha 1\beta 1$  a  $\alpha 1\beta 2$ <sup>38</sup>. V každej bunke ľudského tela sa nachádzajú rôzne heterodiméry  $\alpha$  a  $\beta$  izoformiem, ktoré sa navzájom líšia, ako napr.  $\alpha 2\beta 2$  má najnižšiu afinitu k draselným iónom a je menej stabilný ako ostatné heterodiméry nachádzajúce sa v mozgu<sup>27</sup>.



Obrázok 3: Poradie aminokyselín u izoformiem  $\beta$  podjednotky nachádzajúce sa ľudskom tele.



Obrázok 4: Poradie aminokyselín u izoform  $\alpha$  podjednotky v ľudskom tele.

### 2.3.5 Mutácie a choroby

Ľudské ochorenia sú spojené s mutáciami izoforiem jednotlivých podjednotiek. U ľudí sa objavujú ochorenia, ktoré sú spôsobené mutáciou  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$  génov, ako sú ochorenia génov na autozómoch (autozomálna dominantná porucha). Mutácia  $\alpha 2$  izoformy spôsobujú haploinsuficienciu spojenú s dedičnou hemiplegickou migrénou typu II (FHM II) a sporadickou hemiplegickou migrénou (SHM). Táto disfunkcia nervového systému môže uviesť chorého človeka do kómy, môže spôsobiť epileptické záchvaty, čiastočné ochrnutie tela či poruchu koordinácie pohybov a rovnováhy<sup>39</sup>. Mutácia  $\alpha 3$  môže spôsobiť ochorenie nazývané RDP, ktoré sa prejavuje rýchlym nástupom dystonických kŕčov, čo je nedobrovoľná svalová kontrakcia v priebehu niekoľkých hodín až dní. Prvé príznaky sa prejavujú drobnými poraneniami hlavy, emočným stresom, infekciami, môže nastať i po pôrode, či behu<sup>40</sup>. Medzi prvé príznaky patrí trasenie tela, pomalé pohyby sprevádzané kŕčmi. Toto ochorenie sa môže objaviť u všetkých vekových kategórií<sup>41</sup>.

Ďalšou poruchou mutácie  $\alpha 3$  sa prejavuje už v detstve a nazýva sa striedavá hemiplégia. Táto choroba patrí medzi vzácne ochorenia nervového systému, pri ktorom sa strieda ochrnutie pravej alebo ľavej časti tela (hemiplégia). Čo spôsobuje stratu citlivosti v končatinách, ktorá trvá minúty, hodiny alebo až dni a zvyčajne sa strieda so spánkom.

Väčšina príznakov tejto choroby sa prejaví v rannom detstve, zvyčajne do 18. mesiaca. Táto dysfunkcia je spojená s ťažkosťami dýchania, problémy s rečou, nadmerné potenie, nepokoj, triaška, teploty<sup>42</sup>.

## 2.4 Molekulové modelovanie

Proteíny sú veľmi dôležité makromolekuly, prítomné vo všetkých živých organizmoch a hrajú veľmi významnú úlohu v metabolizme. Tieto makromolekuly sa skladajú z množstva aminokyselín, ktorých sekvencie poskytnú informácie na určenie 3D štruktúry každého proteínu. K získaniu štruktúry proteínu sa využívajú metódy experimentálne (ako napr. röntgenová kryštalografia a NMR spektroskopia), metódy homologného modelovania či molekulová dynamika.

Dva proteíny sú homologické, ak štruktúry týchto proteínov sú si podobné alebo ich štruktúry sa od seba len veľmi málo líšia. Homológne modelovanie sa skladá z nasledujúcich krokov: najskôr sa porovnávajú neznáme sekvencie s príslušnými databázami predlôh štruktúr bielkovín, následne sa identifikovaná neznáma štruktúra zarovná ("align")

s predlohou už známej štruktúry z databázy, aby sa zistili štruktúrne podobnosti a nakoniec sa porovná homológny model so známym modelom<sup>43</sup>. Ak je výsledný model zhodný na viac ako 50% so známym modelom, tak predpoveď by mala byť správna. Avšak, ak je zhoda identity v rozmedzí 30% až 50%, chyba sa môže vyskytovať v modelovaní kľučiek, pokiaľ je zhoda 30% , tak sú modely štruktúrne odlišné<sup>44</sup>.

V databáze Protein Data Bank (PDB) sa nachádza viac ako stotisíc biomolekúl, vrátane proteínov a nukleových kyselín. Údaje o každej štruktúre sú zvyčajne získané pomocou röntgenovej kryštalografie či NMR spektroskopie<sup>45</sup>.

#### **2.4.1 Kryštalická štruktúra 2ZXE**

Táto kryštalická štruktúra NKA je získaná zo žraločej žľazy rekta a skladá sa z podjednotiek  $\alpha$  a  $\beta$  a z proteínu FXYD, ktoré sú zároveň homológne modely odpovedajúce ľudským sekvenciám. ATPáza je v konformačnom stave E2-2K<sup>+</sup>-P<sub>i</sub>, čo znamená že ATPáza má vysokú afinitu k draselným iónom a dokáže stále viazať fosfát. V tomto stave je prítomný nie len fosfát, ale i fosfátový analóg (MgF<sub>4</sub>)<sup>2-</sup>, a dokonca je tu miesto na väzbu steroidného inhibítora ouabainu<sup>46</sup>.

Pri prenose fosfátu sa preruší prepojenie medzi N a P doménou, čo umožní N doméne sa vzdialiť, A doména sa otočí do medzery vo fosfoenzýme, čo vedie k sklonu transmembránových helixov M1-M4 a doména P sa voči membráne posúva hore a dole. Transmembránový helix M7 má zásadný význam pre viazanie jedného z draselných iónov v blízkosti povrchu cytoplazmatickej membrány<sup>47</sup>.

Ďalšou súčasťou NKA je molekula cholesterolu, ktorá chráni časť helixu M7 od lipidov. Jeho prítomnosť je veľmi dôležitá, pretože aktivita NKA je od molekuly cholesterolu závislá<sup>48</sup>.

Podjednotka  $\beta$  hrá úlohu v stabilizácii , tiež má vplyv na naviazanie iónov a ďalšie transportné vlastnosti. Jeho extracelulárna doména je bohatá na aromatické zvyšky a je glykolyzovaná. Vďaka vodíkovým väzbám a dvom transmembránovým helixom  $\alpha$  podjednotky je táto podjednotka naklonená rovnobežne s helixom M7. NKA obsahuje regulačný proteín FXYD napomáhajúci v upevňovaní  $\beta$  podjednotky v membráne, na ktorú je orientovaná kolmo<sup>47</sup>.

### 2.4.2 Kryštalická štruktúra 4HQJ

NKA udržiava elektrochemické gradienty  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  pri transporte cez cytoplazmatickú membránu. Táto štruktúra NKA je získaná z obličky prasat'a a predstavuje stav, pri ktorom sa  $\text{Na}^+$  dokáže naviazať (E1P).

Predpokladá sa, že intracelulárny C-koniec  $\alpha$  podjednotky hrá dôležitú úlohu pri naviazaní  $\text{Na}^+$ . NKA dokáže naviazať tri sodné ióny na väzbových miestach umiestnených vo vnútri membrány. Jedným z miest pre naviazanie sodného iónu sa nachádza medzi helixami M6, 8 a 9 a druhé je v oblasti helixov M5, M7 a M8. Tieto miesta, na ktoré sa viažu sodné ióny môžu mať rozdielne chovanie voči transportu iónu, na čo môže pôsobiť aj vplyv mutácií<sup>41,49</sup>.

Pri defosforylácii sa doména A voči doméne P rotuje a premiestňuje sa, podobne sa aj doména N otáča smerom k doméne P. Doména P sa otáča aj vzhľadom k transmembránovým helixom M7 a M10 a presúva sa spolu s kľučkou medzi helixami M6 a M7 bližšie k oblasti transmembránových helixov v oblasti C konca. Transmembránová časť sa pomaly posúva k doméne P<sup>50</sup>.

Podjednotka  $\beta$  hrá rolu v konformačných zmenách vzhľadom k  $\alpha$  a  $\gamma$  podjednotke v prechode z E2 do E1 stavu. Avšak štruktúra podjednotky sa nezmenila v porovnaní so štruktúrou 2ZXE<sup>50</sup>.

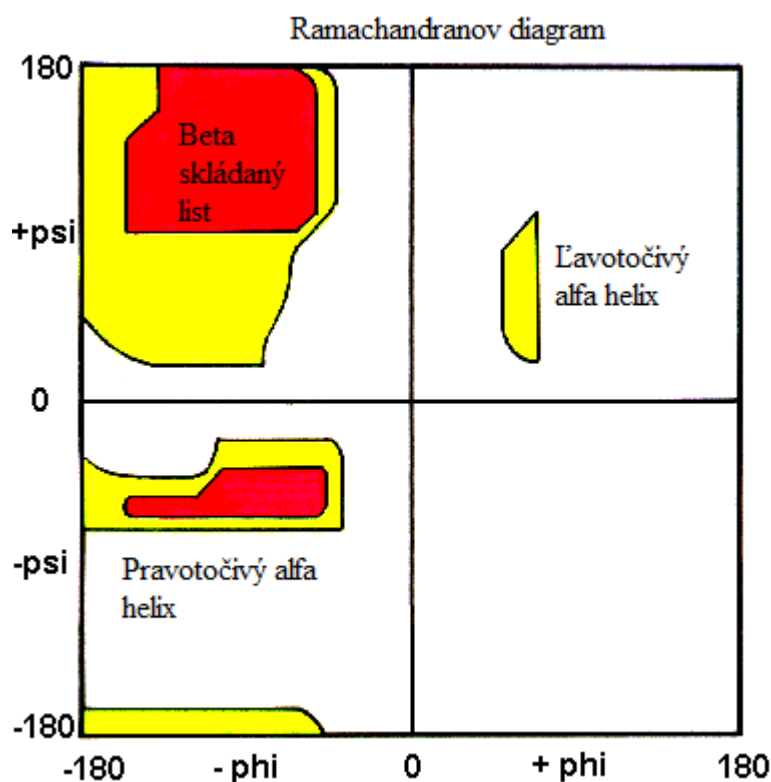
### 2.4.3 Silové pole

V molekulovom modelovaní sa pojem silové pole používa v súvislosti s parametrami použitých na výpočet potenciálnej energie systému atómov v molekulárnej mechanike. Toto silové pole je zostavené z dvoch odlišných zložiek, ktoré opisujú interakcie medzi časticami a atómami. Prvou zložkou je množina rovníc alebo teda tzv. potenciálnych funkcií, ktoré slúžia na generovanie potenciálnej energie a jej sily a druhú zložku tvoria parametre použité v množine rovníc.

Existujú tri typy silových polí: silové pole pre všetky typy atómov, kde parametre sú stanovené pre každý atóm v rámci systému. Ďalším typom silové pola sú tzv. spojené atómy, pričom parametre zahŕňajú všetky atómy okrem nepolárnych vodíkov. Tretím typom silového pola je „hrubo zrnité“ (coarse-grain) a abstraktne zobrazuje zoskupenie niekoľkých atómov do tzv. super atómov<sup>51</sup>.

#### 2.4.4 Ramachandranov diagram

Ramachandranov diagram sa využíva na overenie kvality štruktúrnych modelov rôznych proteínov v trojrozmernom priestore získaných pomocou homológneho modelovania alebo röntgenovou difrakciou<sup>52</sup>. Tento diagram zobrazuje kombináciu torzných uhlov ( $\psi$  a  $\phi$ ) v peptidovom reťazci. Uhol  $\phi$  (phi) predstavuje rotáciu okolo väzby N-C $_{\alpha}$  a uhol  $\psi$  (pôvodne  $\phi'$ ) zobrazuje rotáciu okolo väzby C $_{\alpha}$ -C. Podľa toho v akej kombinácii sú väzbové uhly  $\psi$  a  $\phi$ , delíme ich do niekoľkých skupín: povolené, zakázané a tie, ktoré sú prednostne zaujímavé (viz obrázok 5).



Obrázok č.5: Ramachandranov diagram<sup>53</sup>

V diagrame sa nachádza niekoľko oblastí, kde sa nachádzajú aminokyseliny, ktoré sa podieľajú na vytvorení sekundárnej štruktúry. Bielej oblasti grafu odpovedajú konformácii, kde sa atómy v reťazci dostanú bližšie, než je súčet ich van der Waalsových polomerov – tieto oblasti sú zakázané pre všetky zvyšky aminokyselín. Avšak výnimkou sú zvyšky glycínu, ktoré majú povolenú akúkoľvek polohu, pretože postranný reťazec má nahradený atómom vodíka a taktiež aj zvyšky prolínu, keďže má cyklický postranný reťazec. Červenej oblasti odpovedajú povolené oblasti, v ktorých sa nachádzajú konformácie  $\alpha$  helixov a  $\beta$  skladaných



listov a patria tiež do skupiny prednostne zaujímaných kombinácií. Žlté oblasti predstavujú oblasti, kde sa znižujú van der Waalsove polomery a táto oblasť je čiastočne povolená. V oblasti ľavotočivého helixu sa nachádzajú L-aminokyseliny, ktoré nedokážu tvoriť rozvinuté ľavotočivé špirály, pretože ich postranné reťazce sú blízko k proteínovej kostre, preto tieto štruktúry sú menej stabilné než pravotočivé helixy<sup>53-54</sup>. To do akej oblasti budú patriť aminokyseliny nezáleží len od postranného reťazca, ale aj od prítomnosti  $\beta$  uhlíku, ktorý ovplyvňuje kombináciu torzných uhlov<sup>55</sup>.

#### **2.4.5 G-faktor**

G-faktor slúži ako meradlo stereochemických vlastností, počíta sa pre každé residuum  $\psi$ - $\phi$  a  $\chi_1$ - $\chi_2$ . Nízke hodnoty G-faktora označujú, že pre daný proteín je nízka pravdepodobnosť konformácie, ako napr. zvyšky aminokyselinových residuí, ktoré spadajú do zakázaných oblastí Ramachandranového diagramu budú mať veľmi nízke hodnoty G-faktora. Ak má proteín veľa zvyškov s nízkym G-faktorom, môže ísť o poruchu v geometrii tohto proteínu<sup>56</sup>.

## 3. Experimentálna časť

### 3.1 Metódy

#### 3.1.1 Software

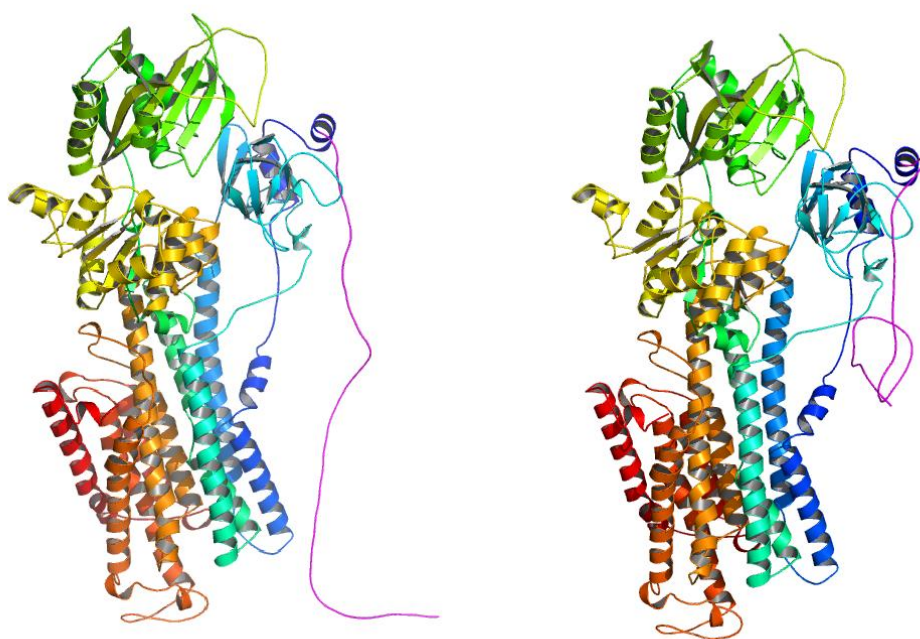
K väčšej časti prípravy molekulárneho modelovania a vizualizácie jednotlivých štruktúr bol použitý program PyMol<sup>57</sup>. K získaniu štruktúr jednotlivých podjednotiek s ľudskou sekvenciou bol využitý program Chimera 1.10.2<sup>58</sup> s prístupom na stránku Modeller<sup>59</sup>. Ako metódu hodnotenia kvality bol použitý program Protein Structure Validation Software suite<sup>60</sup>, z ktorého bol použitý G-faktor a Ramachandranov diagram z Richardsonovho laboratória MolProbability<sup>61</sup>.

#### 3.1.2 Sodno-draselná pumpa

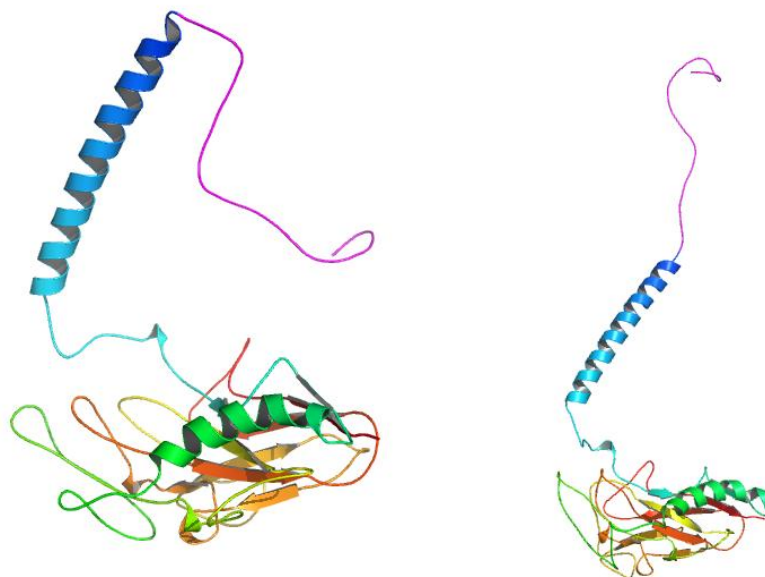
Použitá štruktúra na zobrazenie modelu v E2 konformácii bola 2ZXE zo serveru RSCB PDB, ktorá bola následne upravená na štruktúry odpovedajúce ľudskej sekvencii pomocou parametrov Modelleru. Parametre Modelleru boli pôvodne nastavené na Blosum - 62. Podobne bola vymodelovaná štruktúra E1 konformácie, avšak použitou štruktúrou bola 4HQJ z toho istého serveru. V tejto bakalárskej práci sa použili modely NKA pozostávajúce z rôznych izoforiem každej podjednotky. Boli použité heterodiméry, ktoré sa najčastejšie vyskytujú v ľudskom tele:  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  a  $\alpha 4\beta 1$  spolu s proteínom FXVD2 ( $\gamma$  podjednotka) v oboch konformáciách.

#### 3.1.3 Molekulové modelovanie

Prvým krokom prípravy proteínu bola štruktúra NKA získaná z databáze RSCB PDB, ktorá bola pomocou Modelleru upravená na štruktúry odpovedajúce ľudskej sekvencii. Ďalším krokom bol alignment štruktúr s ľudskou sekvenciou so štruktúrami známymi z databáze PDB (PDB ID: 2ZXE, 4HQJ). Následne boli jednotlivé podjednotky zložené tak, aby odpovedali proteínu NKA, pričom boli upravené aj koncové časti  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky (viz obrázok 5 a 6). Po úprave a zložení NKA, pre všetky homológne izoformy bol vyhotovený Ramachandranov diagram a G-faktoru, čím bola zistená kvalita modelu.



**Obrázok 5:** Úprava koncov alfa podjednotky -upravený koniec (vpravo) znázornený ružovou farbou.

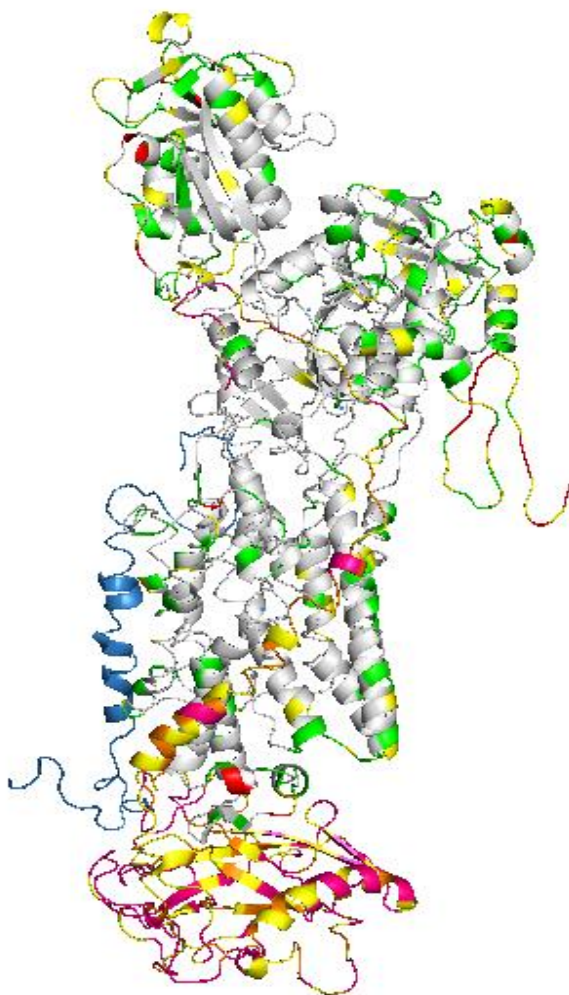


**Obrázok 6:** Úprava koncov beta podjednotky - upravený koniec (vpravo) znázornený ružovou farbou.

## 3.2 Výsledky a diskusia

### 3.2.1 Alignment

Každá izoforma NKA sa líši tým, že má iné usporiadanie aminokyselín v jednotlivých reťazcoch. Na zistenie tohto usporiadania bol využitý alignment, kde bola každá podjednotka porovnaná s pôvodnou štruktúrou z PDB databáze (viz obrázok 7). Alignment štruktúry proteínov v E1 a E2 konformácii bol urobený zvlášť, pretože tieto vzorové štruktúry pochádzajú z rôznych živočíchov a preto majú odlišné sekvencie aminokyselín (viz Príloha 1).



**Obrázok 7:** Mutácie aminokyselín u izoformách NKA: modrou farbou je znázornený proteín FXYP 2 ( $\gamma$  podjednotka), u podjednotky  $\alpha$  sivá farba predstavuje rovnaké poradie aminokyselín v izoformách, žiadnu zhodu predstavuje farba červená, zhoda troch

aminokyselín predstavuje farba žltá, zelená predstavuje zhodu dvoch aminokyselín, u podjednotky  $\beta$  je zhoda dvoch aminokyselín vyjadrená farbou žltou a farba ružová predstavuje žiadnu zhodu a oranžová farba predstavuje rovnaké poradie aminokyselín.

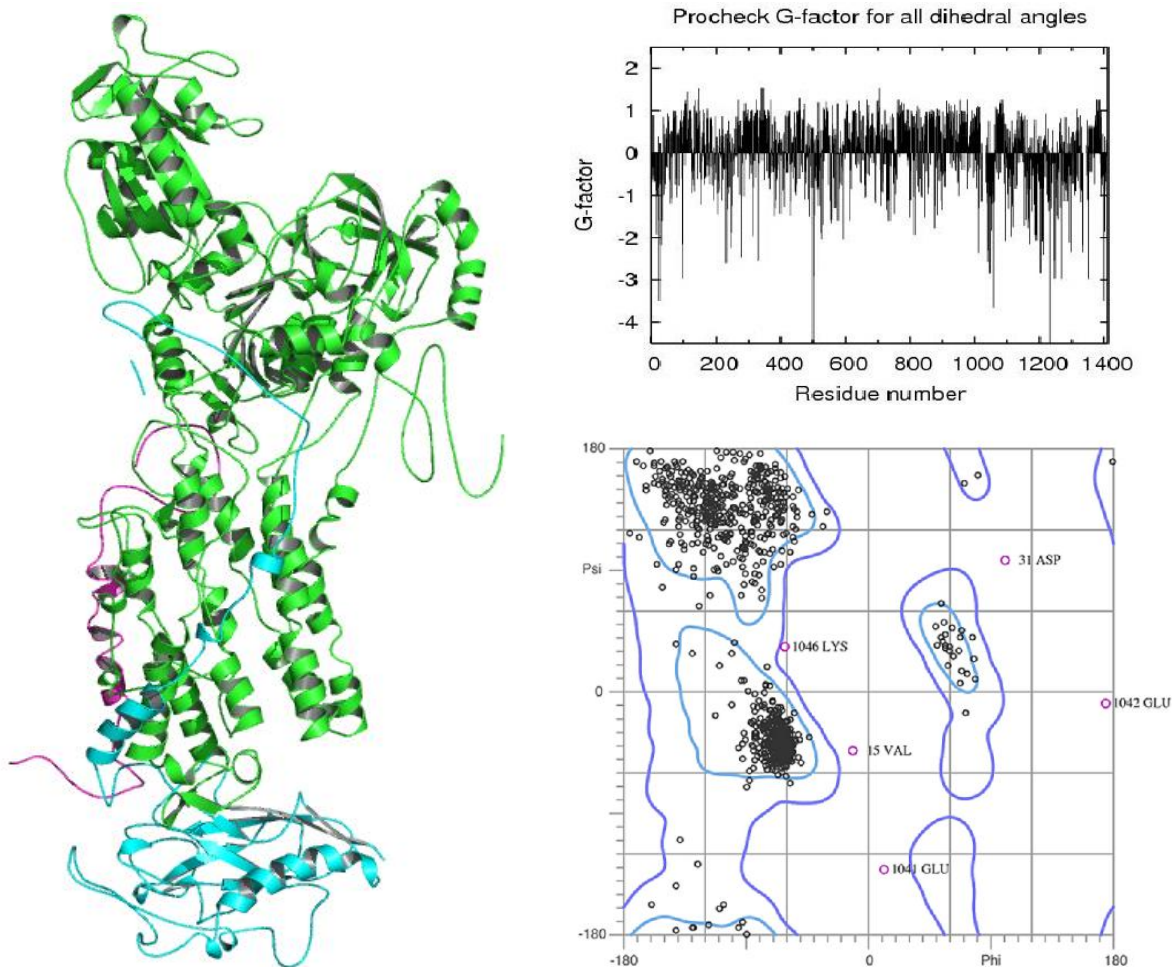
### 3.2.2 Modely izoforiem NKA

Modely boli vytvorené pomocou dvoch kryštalických štruktúr, ktoré boli následne upravené na štruktúry odpovedajúce ľudským sekvenciám. Kvalita modelu každého heterodiméru bola hodnotená pomocou Ramachandranového diagramu a G-faktoru. Kvalita homológneho modelu sa určuje podľa toho, koľko aminokyselinových residuí sa nachádza práve v najpravdepodobnejšej oblasti, pretože to vyjadruje najvýhodnejšie kombinácie hodnôt  $\psi$ . Aby sa model mohol označovať za „kvalitný“ musí do povolenej oblasti patriť približne 90% residuí jednotlivých aminokyselín. Zvyšná oblasť, ktorá je vyznačená v Ramachandranovom diagrame silno modrou farbou, by mala obsahovať zvyšných 10% residuí a v zakázanej oblasti by sa nemali vyskytovať žiadne residuá okrem glycínu a prolínu.

#### 3.2.2.1 Izoformy NKA kryštalickej štruktúry 2ZXE

Pomocou kryštalickej štruktúry 2ZXE bolo vytvorených osem heterodimérov, ktoré boli vyhodnotené pomocou Ramachandranového diagramu (Obrázok 8-15) a G-faktoru. Modely NKA rôznych izoforiem majú rovnakú štruktúru ako štruktúra 2ZXE, z ktorej boli vytvorené, líšia sa len poradím aminokyselín, dĺžkou reťazca v jednotlivých podjednotkách a rôznymi súradnicami iónov ako sú horčík a draslík, avšak ich poloha sa výrazne nelíši od pôvodnej štruktúry.

Z Ramachandranových diagramov vyplýva, že väčšina aminokyselinových residuí spadá do regiónov prednostne obsadzovaných (slabo modrá oblasť), čo je oblasť  $\alpha$  helixov a  $\beta$  skladaných listov, a len malá časť aminokyselín patrí do oblasti zakázanej - približne 10% z celkového počtu aminokyselín v podjednotkách (biela časť), pričom prolín a glycín môžu zaberat' akúkoľvek časť tohto diagramu. V povolených oblastiach Ramachandranových diagramov sa líši počet aminokyselín u vytvorených modelov. U heterodiméru  $\alpha 2\beta 1$  je počet residuí v povolenej oblasti je najvyšší - približne 96,9% zatiaľ čo u izoformy  $\alpha 1\beta 3$  je počet residuí najmenší - 95,9%. U ostatných izoforiem sa počet residuí pohybuje v rozsahu 96–96,6%. Počet glycínov v nasledujúcich tabuľkách označuje, aký počet residuí zo zakázanej oblasti predstavuje glycín.

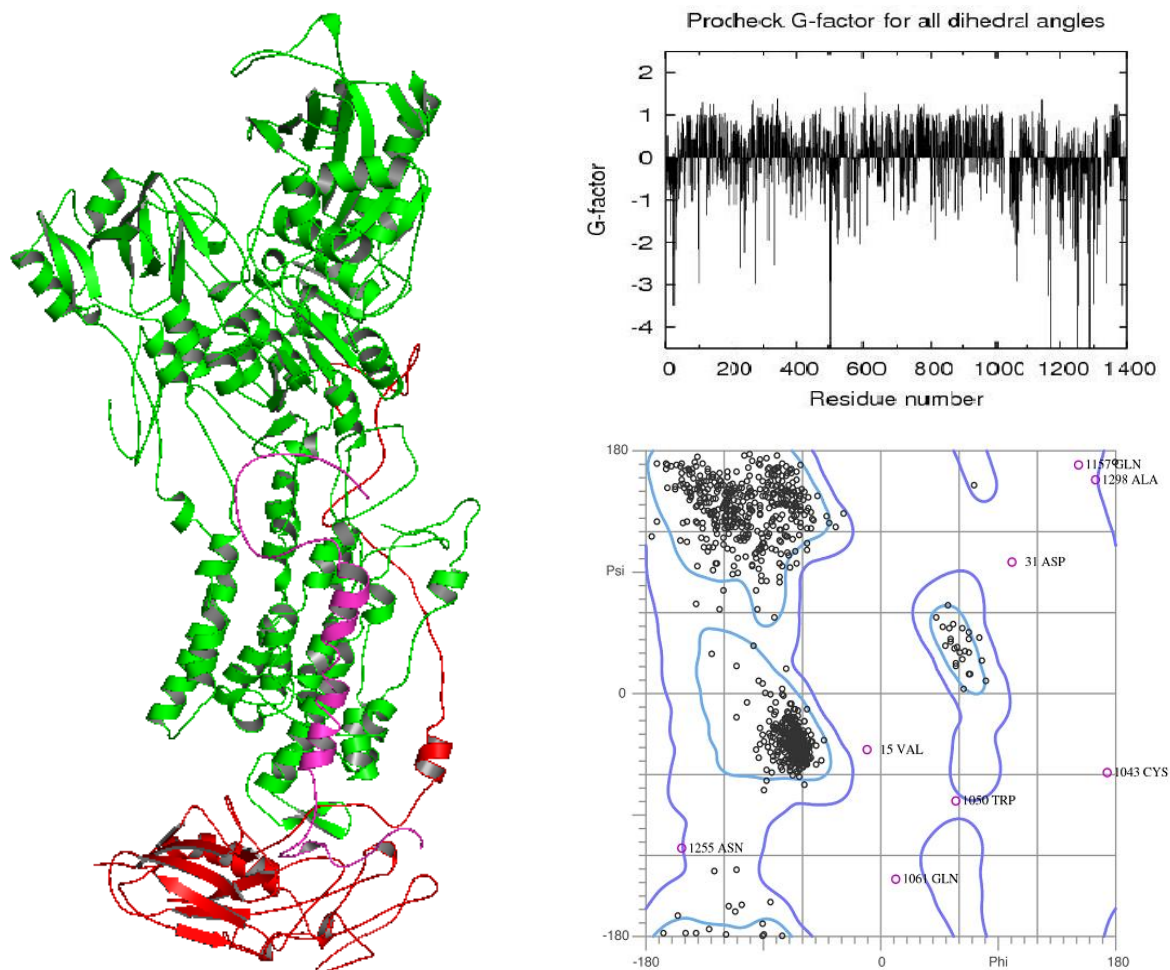


**Obrázok 8:** Model ( $\alpha$  podjednotka zobrazená zelenou farbou,  $\beta$  podjednotka je modrou farbou a fialová farba predstavuje  $\gamma$  podjednotku), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 1\beta 1$  v E2 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1336	96,4%
Čiastočne povolená oblasť	41	3,0%
Glycín	2	0,14%
Zakázaná oblasť	9	0,6%

Model  $\alpha 1\beta 1$  má celkom 1392 aminokyselín z toho 96,4% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 3,0% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa residuá nachádzajú v transmembránovej časti. Avšak nachádza sa tu väčšina residuí upravovaných koncov, ako sú V15, D31 u podjednotky  $\alpha$ , konce u podjednotky  $\beta$  sú E1041, E1042, K1047.

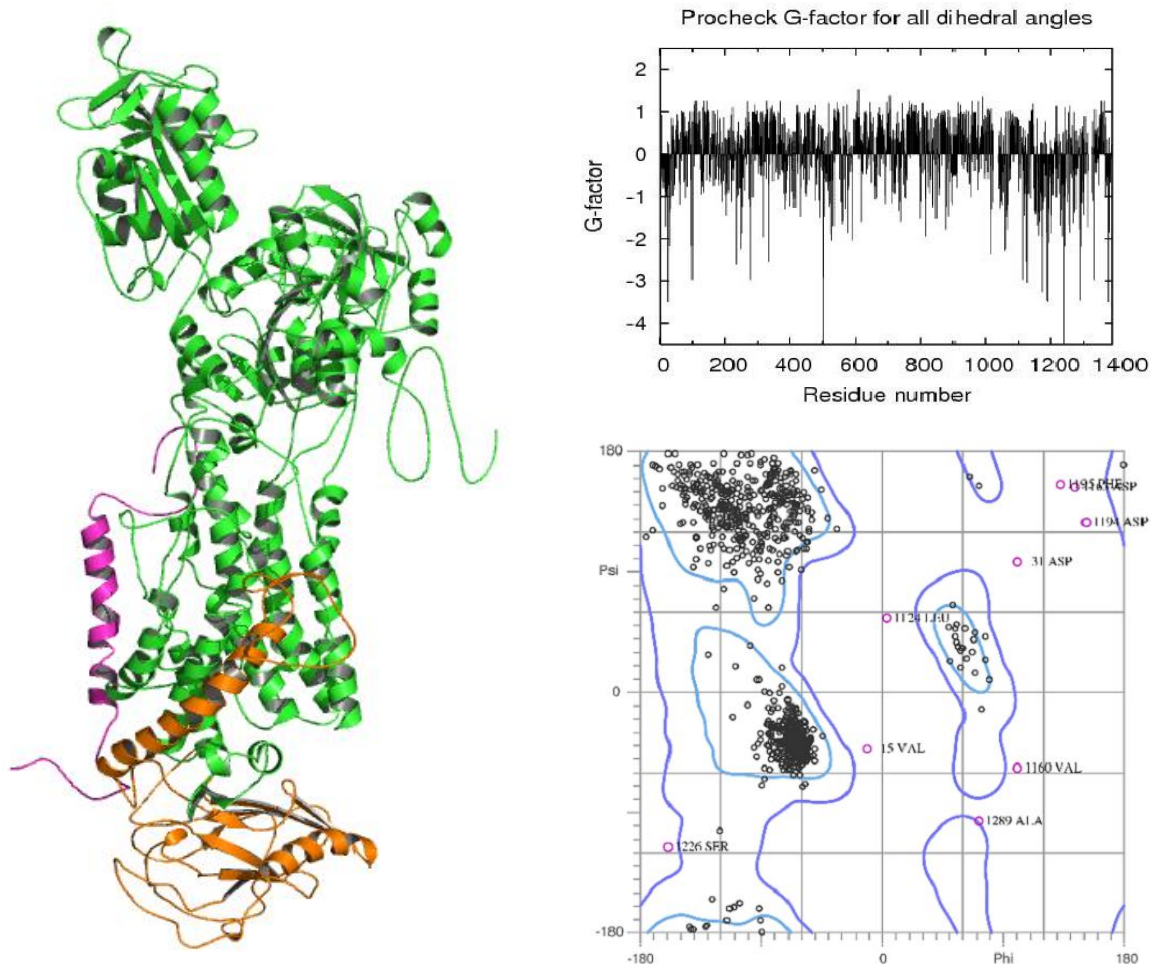




**Obrázok 9:** Model ( $\alpha$  podjednotka zobrazená zelenou farbou, červená farba predstavuje  $\beta$  podjednotky,  $\gamma$  podjednotku je zobrazená fialovou farbou), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 1\beta 2$  v E2 konformácii

Najpravdepodobnejšia oblasť	1321	96,2%
Čiastočne povolená oblasť	38	2,8%
Glycín	2	0,15%
Zakázaná oblasť	14	1,0%

Tento model  $\alpha 1\beta 2$  má celkom 1379 aminokyselín z toho 96,2% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 2,8% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa nachádzajú residuá upravovaných koncov, a to sú u podjednotky  $\alpha$  V15, D31, u podjednotky  $\beta$  sú to C1043, W1050, Q1061 a nachádzajú sa v transmembránovej časti.

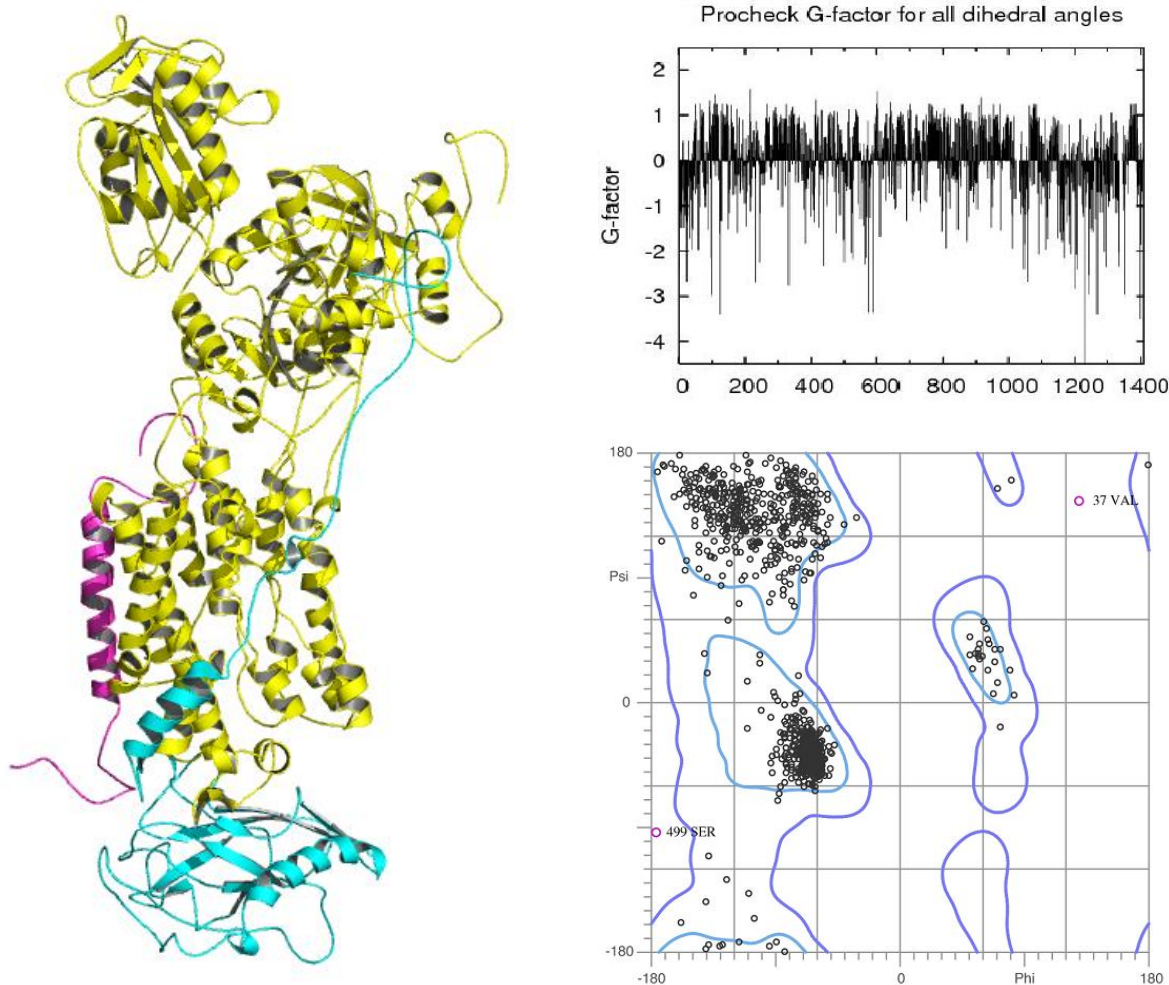


**Obrázok 10:** Model ( $\alpha$  podjednotka je zobrazená zelenou farbou,  $\beta$  podjednotka je znázornená farbou oranžovou, fialová farba zobrazuje  $\gamma$  podjednotku), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 1\beta 3$  v E2 konformácii

Najpravdepodobnejšia oblasť	1306	95,9%
Čiastočne povolená oblasť	43	3,2%
Glycín	1	0,07%
Zakázaná oblasť	13	1,0%

Tento model  $\alpha 1\beta 3$  má celkom 1368 aminokyselín z toho 95,9% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 3,2% v čiastočne povolenej oblasti. Do zakázanej oblasti patria residuá upravovaných koncov len u podjednotky  $\alpha$  a sú to V15, D31.

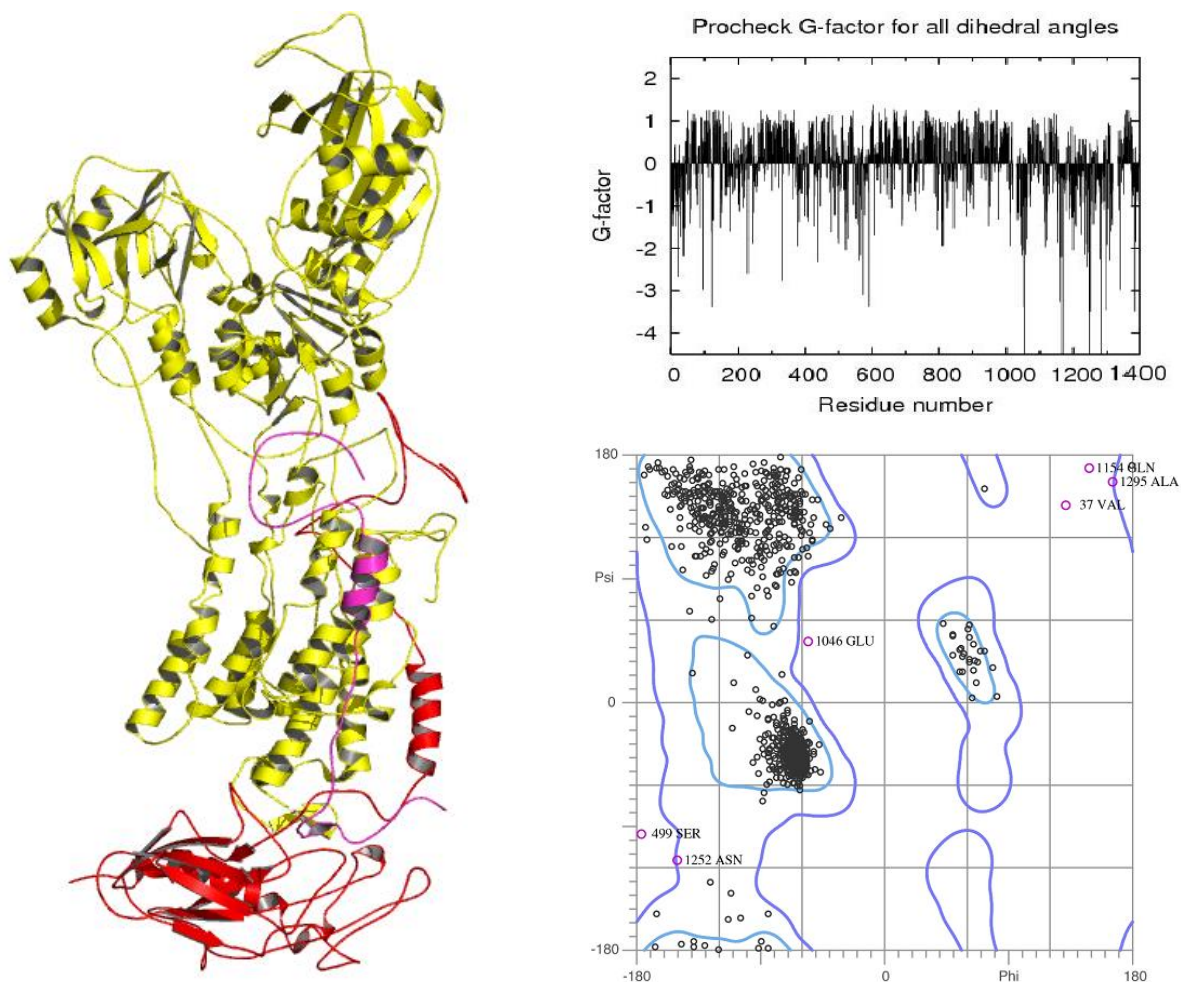




**Obrázok 11:** Model (žltá farba predstavuje  $\alpha$  podjednotku,  $\beta$  podjednotka je znázornená modrou farbou a  $\gamma$  podjednotka je zobrazená fialovou farbou), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 2\beta 1$  v E2 konformácii

Najpravdepodobnejšia oblasť	1340	96,9%
Čiastočne povolená oblasť	40	2,9%
Glycín	0	0%
Zakázaná oblasť	3	0,2%

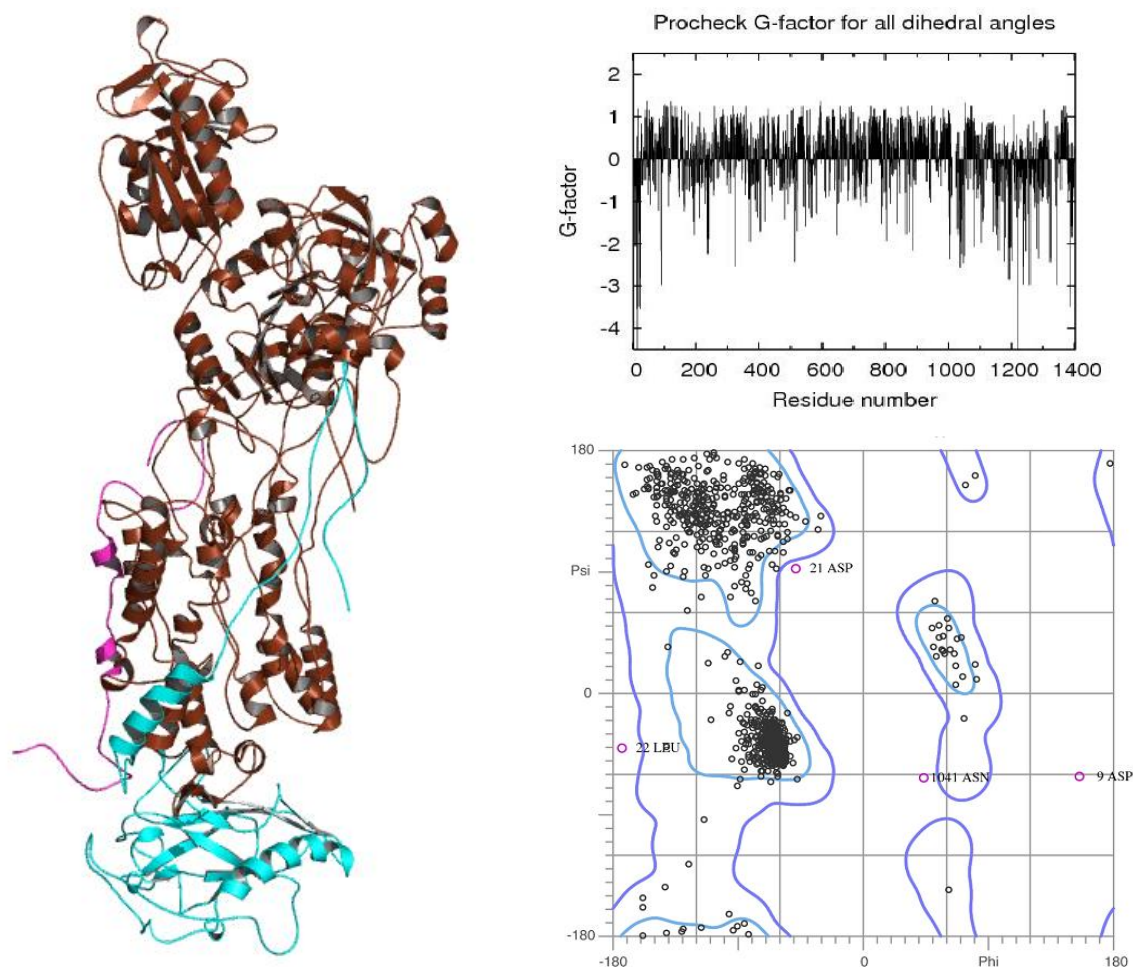
Tento model  $\alpha 2\beta 1$  má celkom 1389 aminokyselín z toho 96,9% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 2,9% v čiastočne povolenej oblasti, v zakázanej oblasti sa nenachádzajú residuá upravovaných koncov, patria sem residuá, ktoré sa nachádzajú v cytoplazme a v extracelulárnom priestore.



**Obrázok 12:** Model ( $\alpha$  podjednotka zobrazená žltou farbou, červená farba predstavuje  $\beta$  podjednotku a  $\gamma$  podjednotka je fialovou farbou), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 2\beta 2$  v E2 konformácii

Najpravdepodobnejšia oblasť	1321	96,4%
Čiastočne povolená oblasť	37	2,7%
Glycín	1	0,07%
Zakázané	12	0,9%

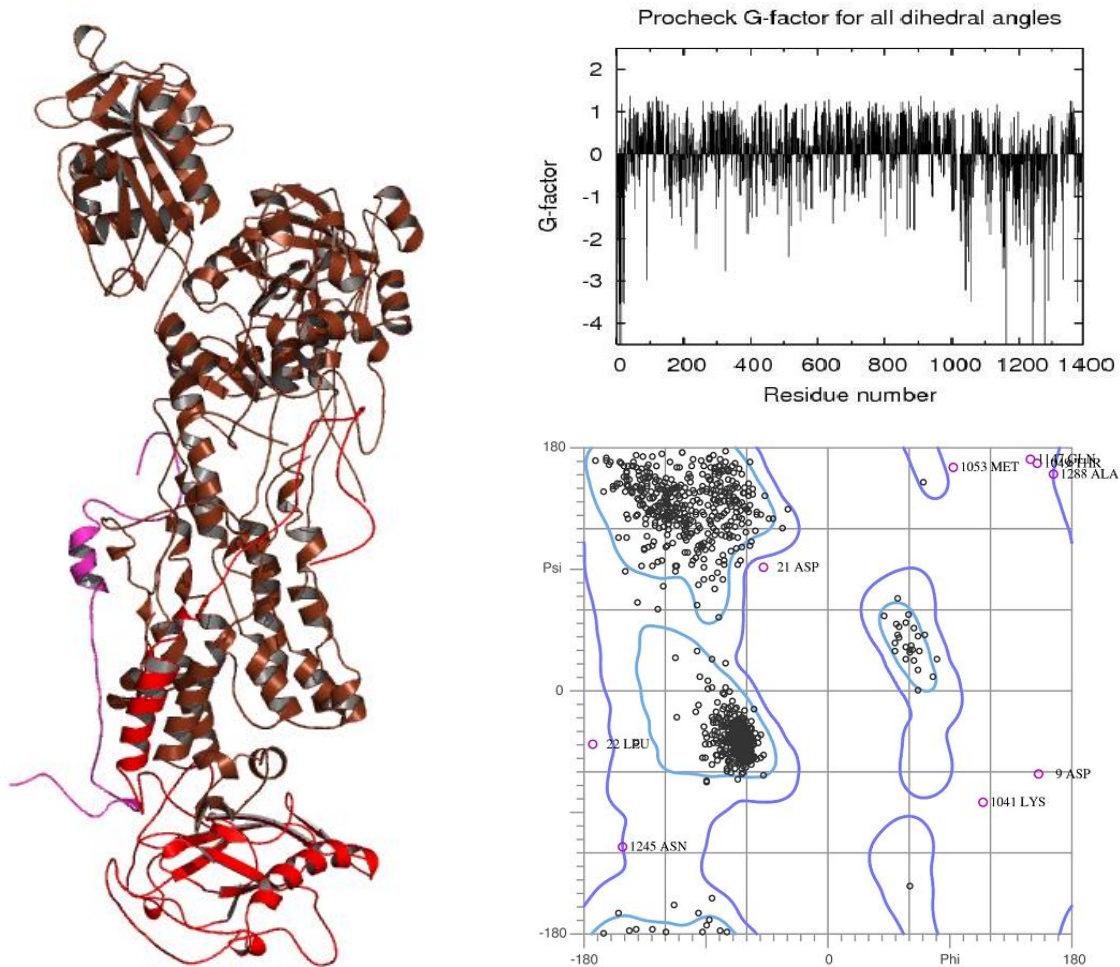
Tento model  $\alpha 2\beta 2$  má celkom 1376 aminokyselín z toho 96,4% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 2,7% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa nachádzajú residuá upravovaných koncov, a to sú u podjednotky  $\beta$  E1046, N1053, P1054,



**Obrázok 13:** Model (hnedá farba predstavuje  $\alpha$  podjednotka,  $\beta$  podjednotka zobrazuje modrá farba, fialová farba predstavuje  $\gamma$  podjednotka), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha\beta\gamma$  v E2 konformácii

Najpravdepodobnejšia oblasť	1328	96,5%
Čiastočne povolená oblasť	41	3,0%
Glycín	0	0,0%
Zakázané	7	0,5%

Tento model  $\alpha\beta\gamma$  má celkom 1382 aminokyselín z toho 96,5% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 3,0% v čiastočne povolenej oblasti, v zakázanej oblasti sú residuá D9, P11, D21, L22, u podjednotky  $\alpha$  a u podjednotky  $\beta$  N1041, väčšina z residuí je v transmembránovej oblasti.

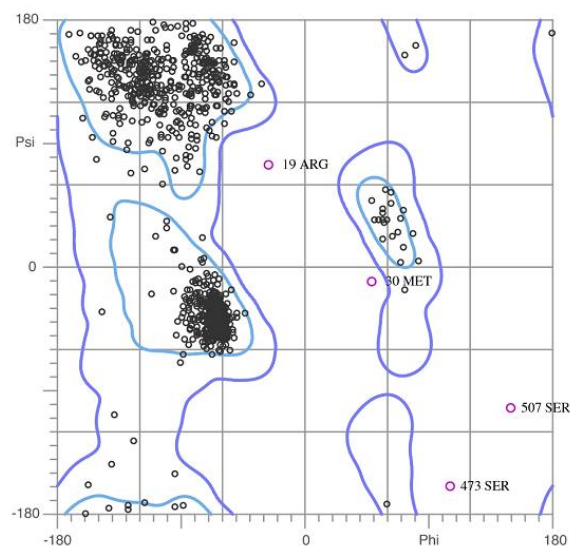
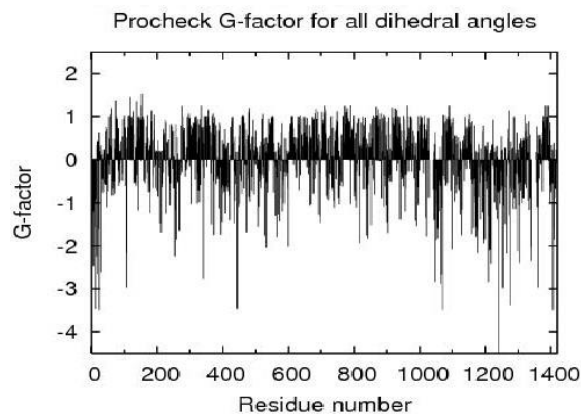
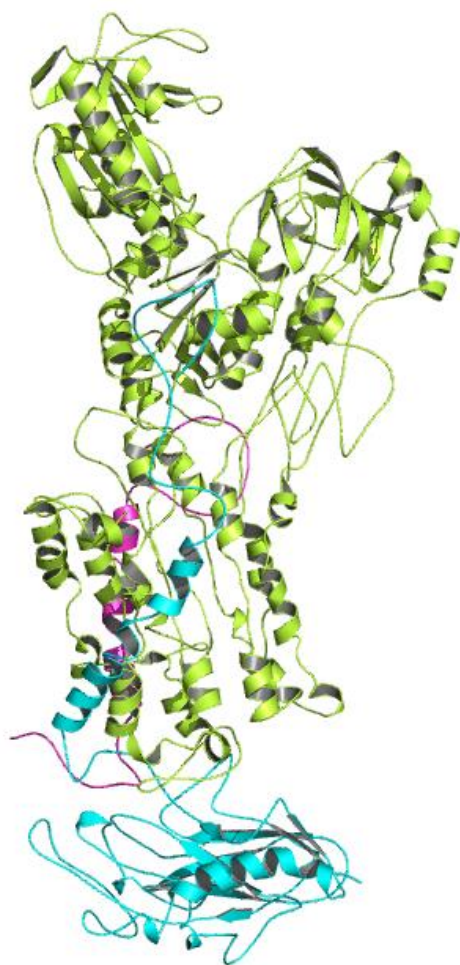


**Obrázok 14:** Model ( $\alpha$  podjednotka je zobrazená hnedou farbou, červená farba predstavuje  $\beta$  podjednotku a fialovou farbou je znázornená  $\gamma$  podjednotka), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 3\beta 2$  v E2 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1311	96,2%
Čiastočne povolená oblasť	37	2,7%
Glycín	2	0,15%
Zakázané	15	1,1 %

Tento model  $\alpha 3\beta 2$  má celkom 1369 aminokyselín z toho 96,2% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 2,7% v čiastočne povolenej oblasti. Do zakázanej oblasti patria aj residuá upravovaných koncov a sú to, u podjednotky  $\alpha$  D9, P11, D21, L22, u podjednotky  $\beta$  sú to K1041, T1049, M1053.





**Obrázok 15:** Model ( $\alpha$  podjednotka je znázornená žltozelenou farbou,  $\beta$  podjednotka je modrou farbou, fialová farba predstavuje  $\gamma$  podjednotku), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 4\beta 1$  v E2 konformácii.

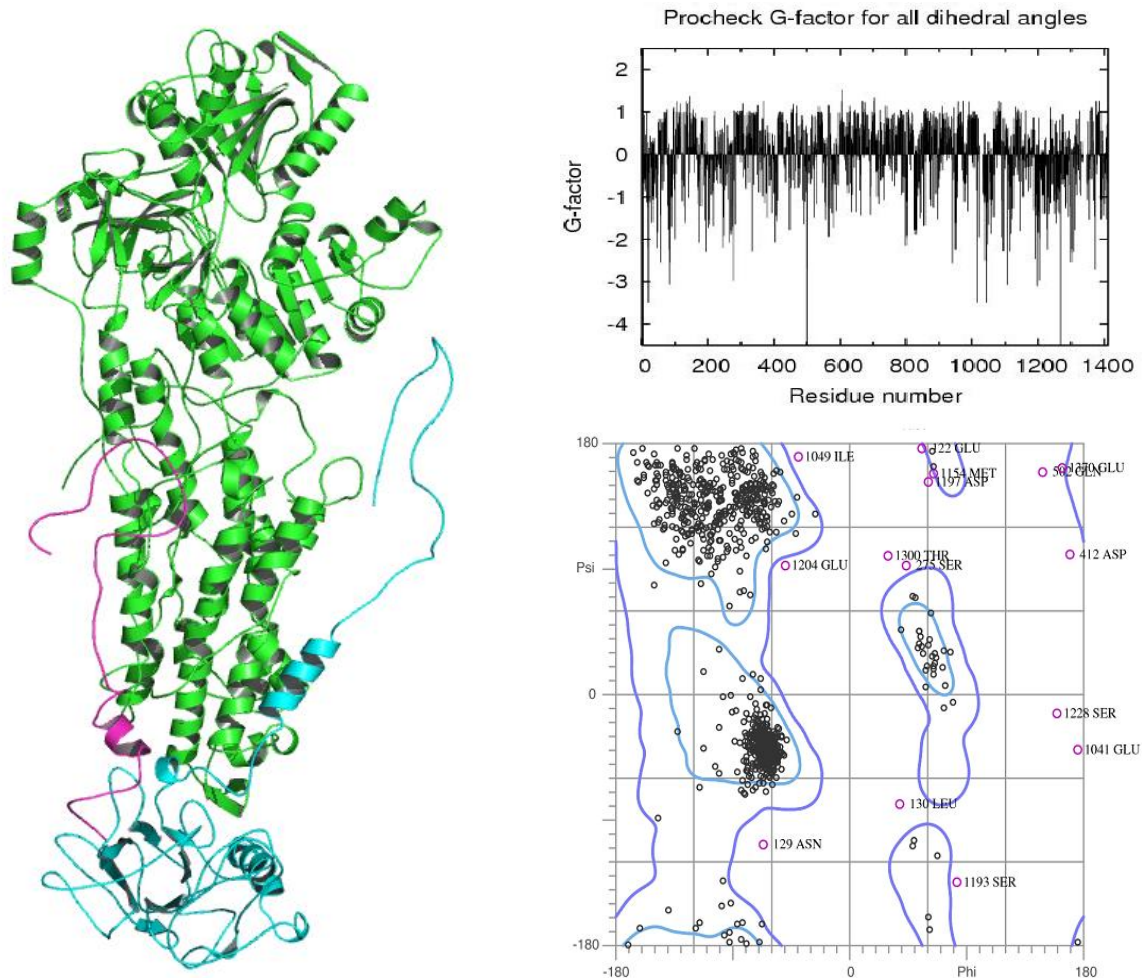
Najpravdepodobnejšia oblasť	1345	96,6%
Čiastočne povolená oblasť	39	2,8%
Glycín	2	0,14%
Zakázané	8	0,6%

Tento model  $\alpha 4\beta 1$  má celkom 1392 aminokyselín z toho 96,6% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 2,8% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa nachádzajú residuá upravovaných koncov len u podjednotky  $\alpha$  A11, R19, P21, M30.

### 3.2.2.2 Izoformy NKA kryštalickej štruktúry 4HQJ

Rovnako ako u kryštalickej štruktúry 2ZXE aj u štruktúry 4HQJ bolo vytvorených osem modelov pre rôzne kombinácie podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$ , ktoré boli vyhodnotené Ramachandranovým diagramom a G-faktorom. Líšia sa opäť len dĺžkou poradia aminokyselín či súradnicami iónov - sodíka a horčíka. Avšak štruktúrne modely zostávajú rovnaké ako je štruktúra 4HQJ.

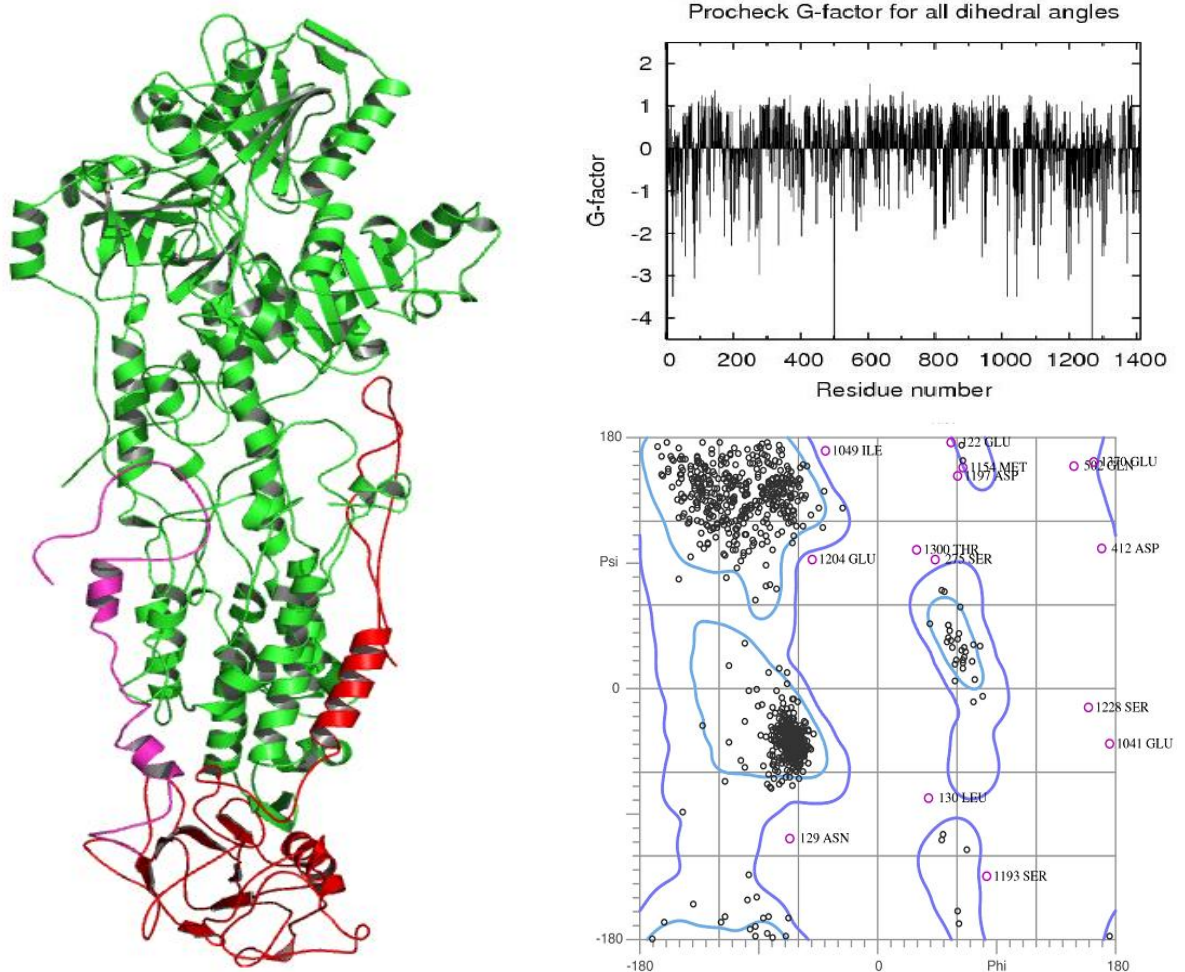
Od najpravdepodobnejšej oblasti (slabo modrá farba) Ramachandranového diagramu závisí kvalita modelu. Podobne ako u modelov odvodených od štruktúry 2ZXE, patrí väčšina aminokyselín práve do tejto oblasti. Do zakázaného regiónu patrí približne 10% residuí z celkového počtu. Najväčší počet residuí patriacich do povolenej oblasti má izoforma  $\alpha 2\beta 1$  a hodnota je približne 95,3%. Najnižší počet residuí má izoforma  $\alpha 3\beta 2$ , ktorá má 93,7% residuí v tejto oblasti. Zvyšok heterodimérov má približne 94–95,1% residuí v oblasti  $\alpha$  helixov a  $\beta$  skladaných listov. Počet glycínov v nasledujúcich tabuľkách opäť označuje, aký počet residuí zo zakázanej oblasti predstavuje glycín.



**Obrázok 16:** Model ( $\alpha$  podjednotka je znázornená zelenou farbou, modrou farbou je zobrazená  $\beta$  podjednotka a fialou farbou je  $\gamma$  podjednotka), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha\beta 1$  v E1 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1312	94,7%
Čiastočne povolená oblasť	53	3,8%
Glycín	1	0,07%
Zakázané	21	1,5%

Tento model  $\alpha\beta 1$  má celkom 1392 aminokyselín z toho 94,7% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 3,8% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa nachádzajú residuá z transmembránovej časti a sú tu aj residuá upravovaných koncov, a vyskytujú sa u podjednotky  $\beta$  E1041, I1049, T1050.

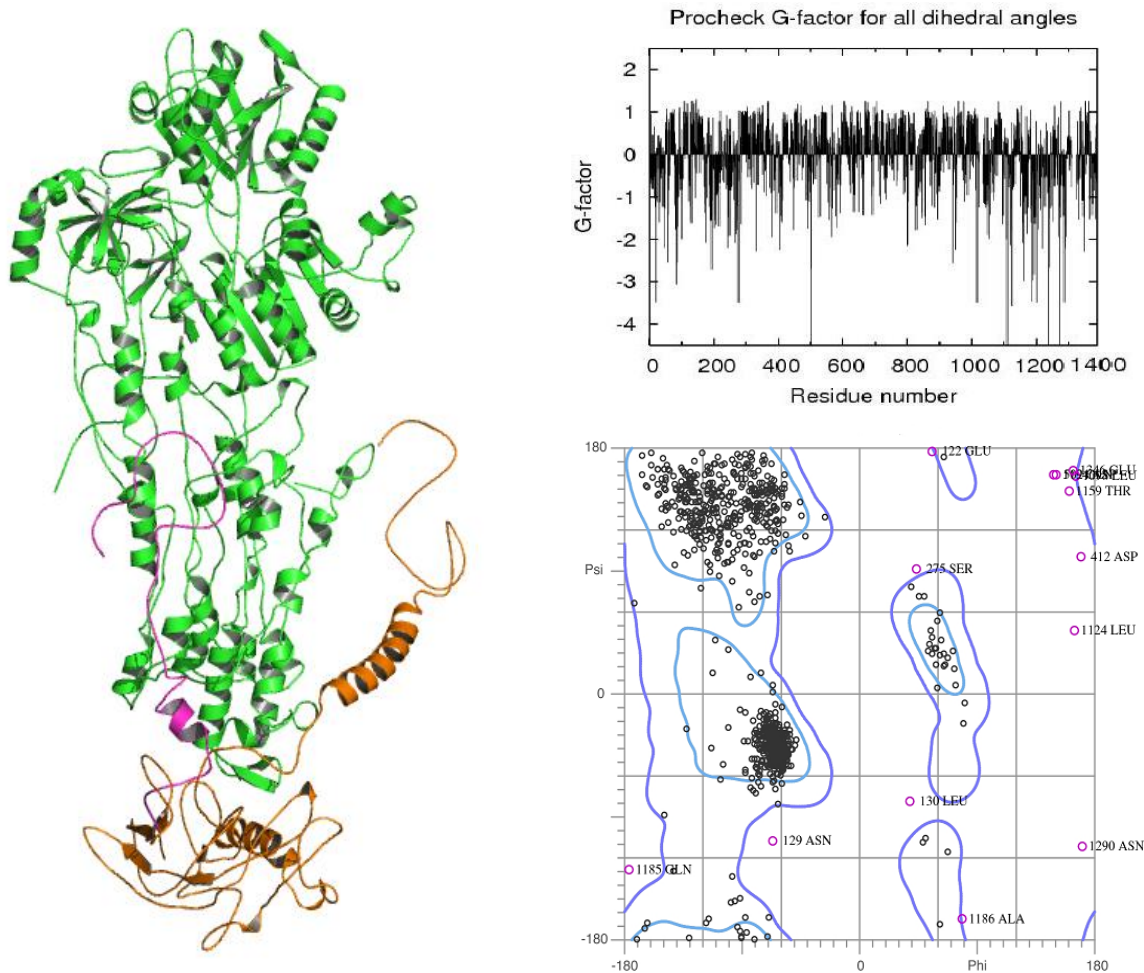


**Obrázok 17:** Model ( $\alpha$  podjednotka je znázornená zelenou,  $\beta$  podjednotku predstavuje červená farba a  $\gamma$  podjednotku fialová farba), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha\beta\gamma$  v E1 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1291	94,0%
Čiastočne povolená oblasť	56	4,1%
Glycín	0	0%
Zakázané	26	1,9%

Tento model  $\alpha\beta\gamma$  má celkom 1379 aminokyselín z toho 94,0% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 4,1% v čiastočne povolenej oblasti. Do zakázanej oblasti patria aj residuá upravovaných koncov a sú to, u podjednotky  $\beta$  sú to C1043, E1048, N1056, R1065.

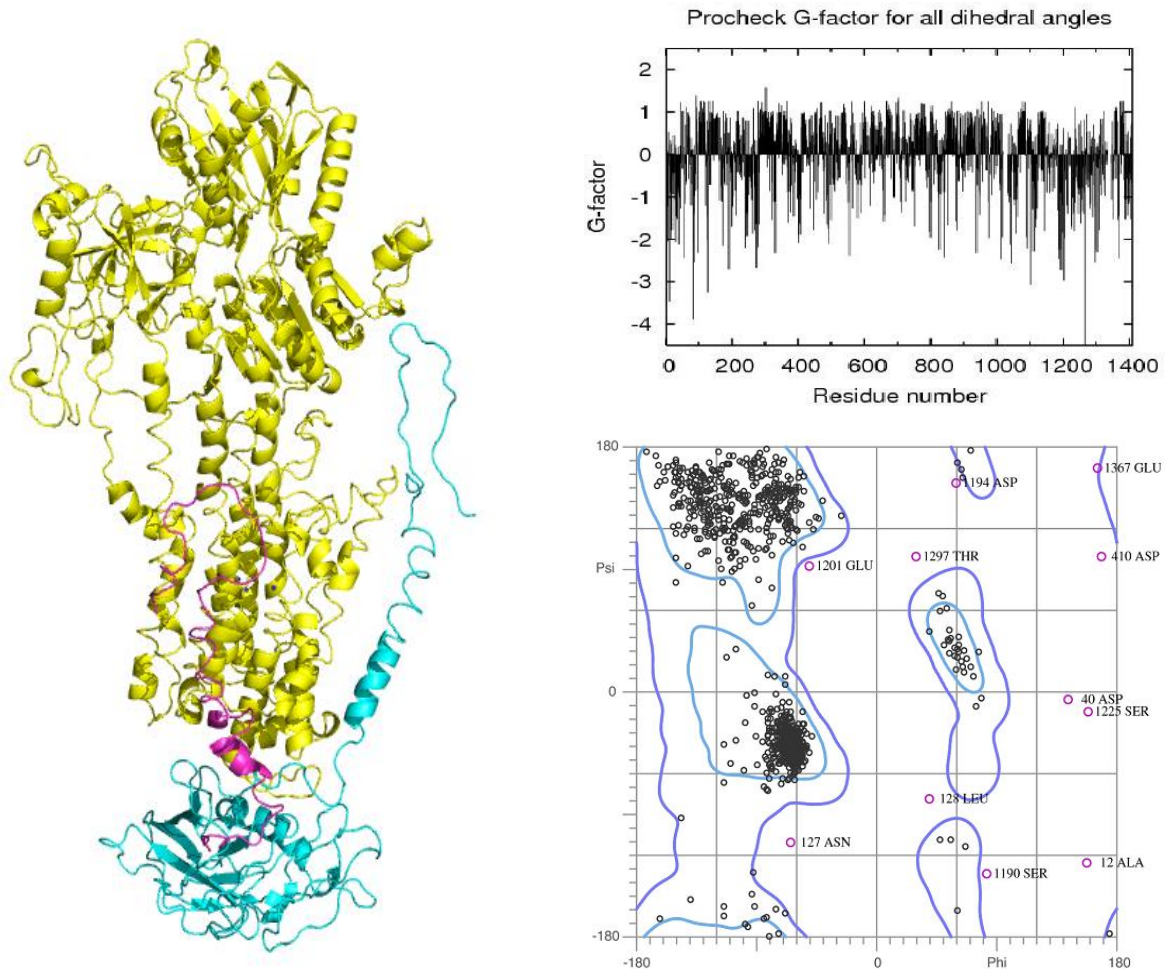




**Obrázok 18:** Model (zelená farba predstavuje  $\alpha$  podjednotku, oranžová farba  $\beta$  podjednotku a fialová farba  $\gamma$  podjednotku), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 1\beta 3$  v E1 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1285	94,3%
Čiastočne povolená oblasť	55	4,0%
Glycín	0	0%
Zakázané	22	1,6%

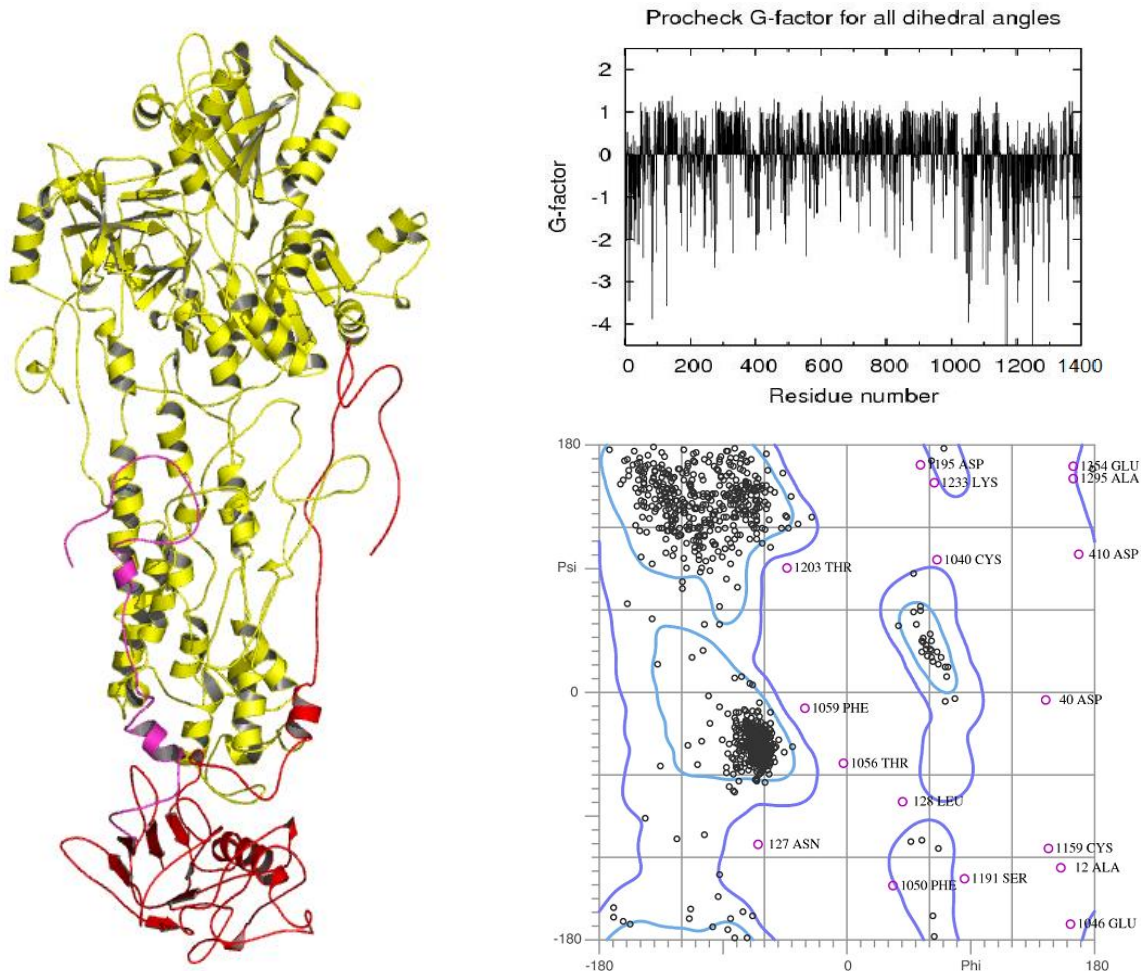
Tento model  $\alpha 1\beta 3$  má celkom 1368 aminokyselín z toho 94,3% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 4,0% v čiastočne povolenej oblasti. Do zakázanej oblasti patria residuá najčastejšie nachádzajúce sa v transmembránovej oblasti.



**Obrázok 19:** Model ( $\alpha$  podjednotka je zobrazená žltou farbou,  $\beta$  podjednotka modrou farbou, fialovou farbou je znázornená  $\gamma$  podjednotka), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 2\beta 1$  v E1 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1318	95,3%
Čiastočne povolená oblasť	51	3,7%
Glycín	0	0%
Zakázané	14	1,0%

Tento model  $\alpha 2\beta 1$  má celkom 1389 aminokyselín z toho 95,3% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 3,7% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa väčšina residuú nachádza v transmembránovej časti. Avšak nachádzajú sa tu aj residuá upravovaných koncov, ako sú A12, D40, u podjednotky  $\alpha$ .

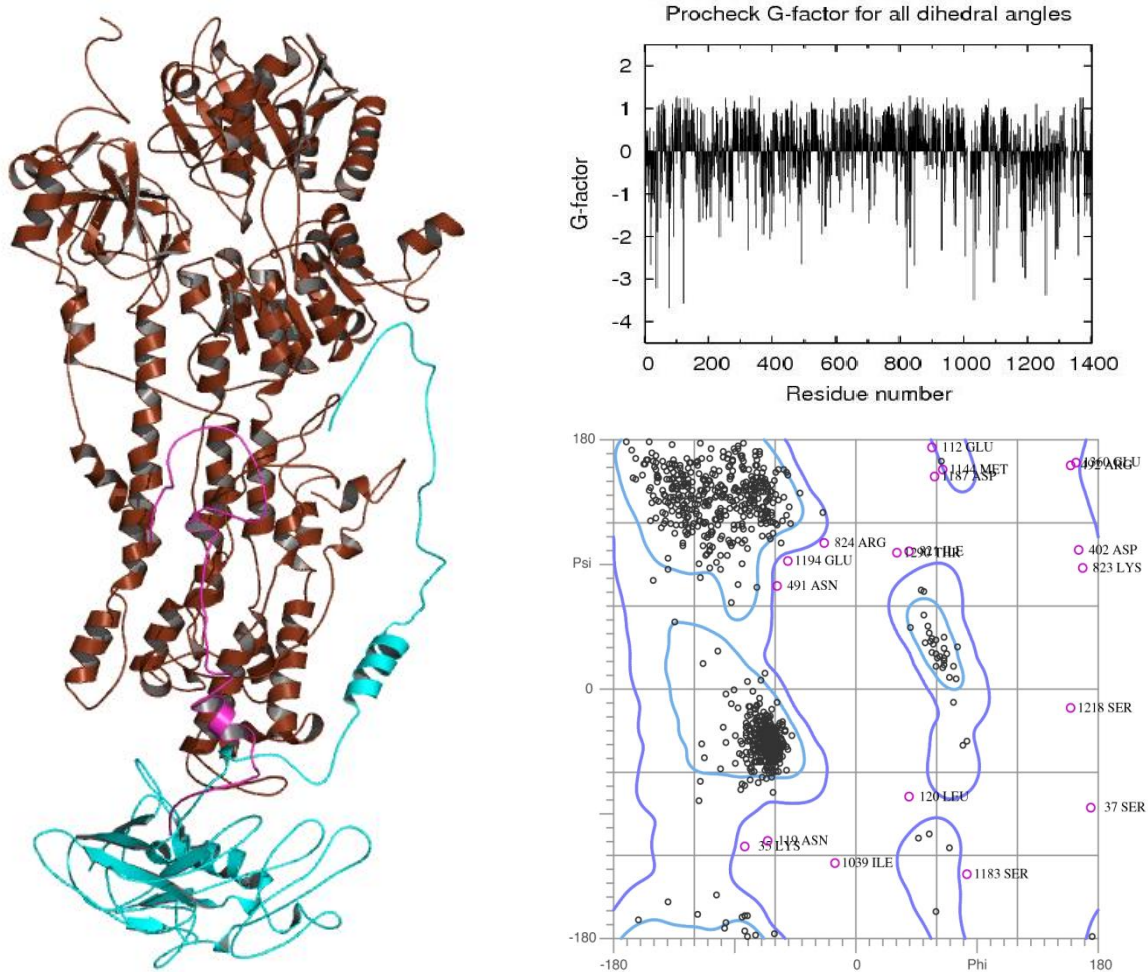


**Obrázok 20:** Model ( $\alpha$  podjednotku predstavuje farba žltá,  $\beta$  podjednotku čevená farba a  $\gamma$  podjednotka je zobrazená fialovou farbou), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 2\beta 2$  v E1 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1293	94,4%
Čiastočne povolená oblasť	54	3,9%
Glycín	1	0,07%
Zakázané	23	1,7%

Tento model  $\alpha 2\beta 2$  má celkom 1376 aminokyselín z toho 94,4% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 3,9% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa nachádzajú residuá upravovaných koncov, a to sú u podjednotky  $\alpha$  A12, D40, u podjednotky  $\beta$  sú to C1040, F1050, T1056, F1059, väčšina z residuí je v transmembránovej časti.

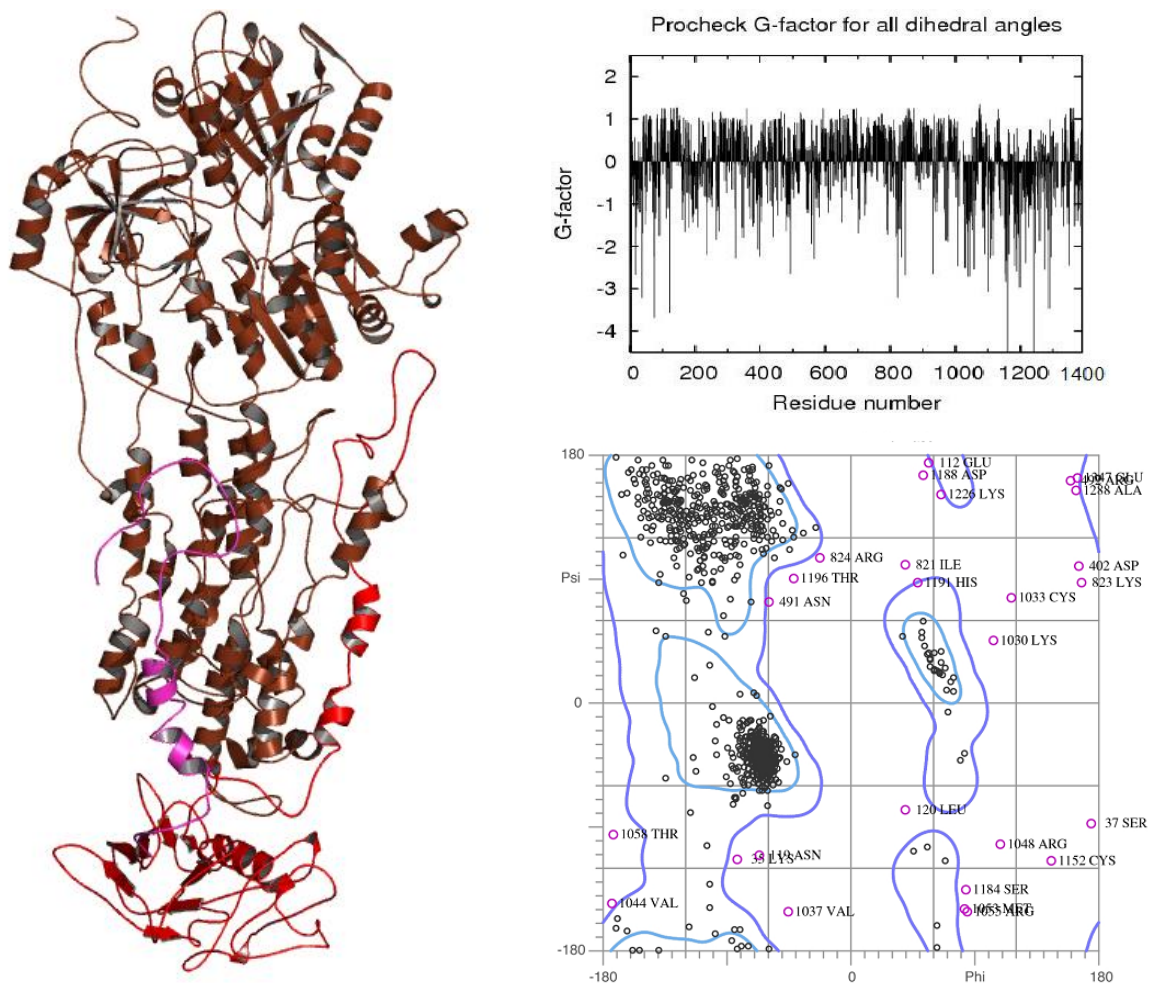




**Obrázok 21:** Model ( $\alpha$  podjednotka je zobrazená hnedou farbou,  $\beta$  podjednotka modrou farbou,  $\gamma$  podjednotka je fialovoou farbou), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 3\beta 1$  v E1 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1306	94,9%
Čiastočne povolená oblasť	47	3,4%
Glycín	1	0,07%
Zakázané	23	1,7%

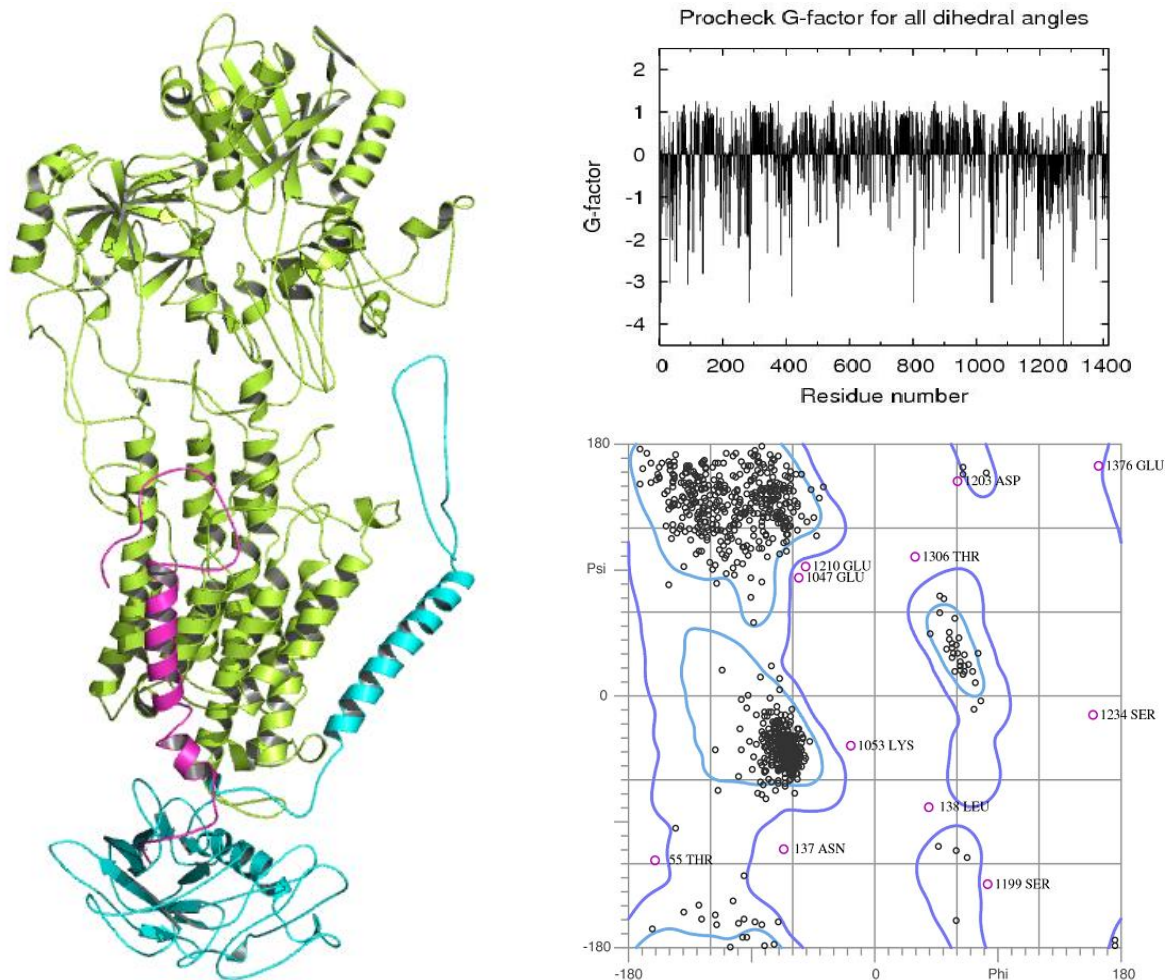
Tento model  $\alpha 3\beta 1$  má celkom 1382 aminokyselín z toho 94,9% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 3,4% v čiastočne povolenej oblasti. Do zakázanej oblasti patria aj residuá upravovaných koncov a u podjednotky  $\beta$  je to I1039. Zvyšné residuá sa nachádzajú prevažne v transmembránovej časti.



**Obrázok 22:** Model ( $\alpha$  podjednotku predstavuje farba hnedá,  $\beta$  podjednotku farba červená a  $\gamma$  podjednotka je zobrazená fialovou farbou), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha\beta\gamma$  v E1 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1277	93,7%
Čiastočne povolená oblasť	54	4,0%
Glycín	0	0%
Zakázané	32	2,3%

Tento model  $\alpha\beta\gamma$  má celkom 1369 aminokyselín z toho 93,7% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 4,0% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa väčšina residuí nachádza v transmembránovej časti, nachádzajú sa tu však aj residuá upravovaných koncov, u podjednotky  $\beta$  sú to K1030, C1033, V1037, V1044, R1048, M1053, R1055.



**Obrázok 23:** Model (žltozelená farba predstavuje  $\alpha$  podjednotku,  $\beta$  podjednotka je zobrazená modrou farbou a  $\gamma$  podjednotka fialovou farbou), Ramachandranov diagram a G-faktor izoformy  $\alpha 4\beta 1$  v E1 konformácii.

Najpravdepodobnejšia oblasť	1324	95,1%
Čiastočne povolená oblasť	52	3,7%
Glycín	1	0,07%
Zakázané	16	1,1%

Tento model  $\alpha 4\beta 1$  má celkom 1398 aminokyselín z toho 95,1% je v najpravdepodobnejšej oblasti, 3,7% v čiastočne povolenej oblasti. V zakázanej oblasti sa nachádzajú residuá upravovaných koncov, a to je u podjednotky  $\beta$  K1053. Väčšina residuí v zakázanej oblasti sa prevažne nachádza v transmembránovej oblasti.

Vytvorené modely šestnástich kombinácií izoforiem  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky odvodených od kryštalických štruktúr 2ZXE a 4HQJ sa štruktúrne nelíšia, líšia sa však tým, že odpovedajú ľudským sekvenciám, čo zmenilo poradie aminokyselín v jednotlivých podjednotkách. Správnosť výsledného modelu bola posudzovaná na základe výsledkov z Ramachandranového diagramu a G-faktoru. Kvalitu modelu odráža povolená oblasť, alebo teda slabo modrá časť Ramachandranového diagramu, ktorá by mala obsahovať 90% residuí z celkového počtu. Povolená oblasť vytvorených modelov rôznych izoforiem obsahovala približne 93,7–96,9% residuí. V čiastočne povolenom regióne tohto diagramu by sa malo nachádzať zvyšných 10% residuí. Vytvorené modely majú v tejto silno modrej oblasti približne 2,7–4,1% residuí. V zakázanej oblasti by sa nemali vyskytovať žiadne residuá, avšak vo vytvorených modeloch je táto hodnota približne 0,2–1,9% residuí. Glycín a prolín v diagrame sa môže nachádzať v ktorejkoľvek časti diagramu, preto sa nezahŕňajú do výsledných percent residuí. Izoformy v E1 konformácii majú vyšší počet residuí v zakázanej oblasti ako izoformy v E2 konformácii. U izoforiem v E1 konformácii sa residuá upravovaných koncov nachádzajú v zakázanej oblasti takmer u všetkých  $\beta$  podjednotiek.

Ďalším hodnotením kvality modelu bol G-faktor. Z výsledných grafov G-faktorov je vidieť, že hodnoty G-faktorov u izoforiem v E1 konformácii sú nižšie ako u izoforiem v E2 konformácii. Vplyv na hodnoty G-faktora majú aj zakázané oblasti Ramachandranového diagramu, keďže vytvorené heterodiméry majú svoje residuá aj v tejto oblasti preto sú hodnoty G-faktora u izoforiem odvodených od štruktúry 4HQJ nižšie.

Vytvorené homológne modely NKA a jej rôznych izoforiem mali nízke hodnoty G-faktora a aminokyselinové residuá sa nachádzali v zakázanej oblasti Ramachandranového diagramu, čo mohlo byť spôsobené tým, že väčšina residuí sa nachádza v membránovej časti.

## 4. Záver

V tejto práci som sa zaoberala štúdiom NKA, ktorý je jeden z najdôležitejších proteínov v živočíšnej ríši. Nesprávne fungovanie tohto proteínu môže spôsobiť rôzne ochorenia a poruchy. Proteín NKA sa skladá z podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  a každá z nich má svoje izoformy. Pomocou molekulového modelovania boli vytvorené homológne modely NKA v rôznych kombináciách izoforiem podjednotiek  $\alpha$  a  $\beta$ . Boli vytvorené heterodiméry  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  a  $\alpha 4\beta 1$ , ktoré sa najčastejšie vyskytujú v ľudskom tele a ktoré predstavujú dva odlišné kroky funkčného cyklu NKA.

Zo šestnástich modelov NKA všetky odpovedajú normám kvality modelu, avšak ich residuá sa nachádzajú aj v zakázanej oblasti Ramachandranového diagramu, čo týmto normám nevyhovuje. Mohlo to byť spôsobené úpravou koncov, po prípade ich chybnému uloženiu k podjednotkám oproti pôvodnej štruktúre. Väčšina rozdielov medzi izoformami u podjednotky  $\alpha$  je na vonkajšej strane cytoplazmatických domén A a N, ale i v oblasti extracelulárnej slučky medzi helixami M7 a M8, zatiaľ čo rozdiely medzi izoformami u podjednotky  $\beta$  sú oveľa väčšie a nachádzajú sa na strane, ktorá sa dotýka s podjednotkou  $\alpha$ .

Tieto vytvorené modely rôznych heterodimérov NKA by mohli slúžiť ako základ pre molekulárne dynamické simulácie a prispieť tak k pochopeniu rôznych vlastností izoforiem.



## 5. Summary

In this thesis I studied protein NKA, which is one of the most important proteins in the animal kingdom. Malfunctions of this protein can cause various diseases and disorders. The protein NKA consists of subunits  $\alpha$  and  $\beta$  and each one has isoforms. Using molecular modelling we created homologous models NKA in various combinations of isoforms subunits  $\alpha$  and  $\beta$ . Heterodimers were created  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 4\beta 1$ , which are mostly located in the human body and represent two different steps of the functional cycle NKA.

The sixteen models of NKA, all of them comply with quality standards of models, but the residue can be found in a disallowed area of Ramachandran plot, which does not comply with these standards. It could be caused by editing the terminus of subunits or incorrect composition of the terminus of subunits against the original structure. Most differences between isoforms of subunit  $\alpha$  are on the outside cytoplasmic domain N, but also in the extracellular loop between helices M7 and M8, while differences between the isoforms of subunit  $\beta$  are much larger and they are located on the side, which is in contact with subunit  $\alpha$ .

These models of different heterodimers of NKA could be the basis for molecular dynamic simulations and could help the understanding of the diverse properties of isoforms.

## 6. Použitá literatura

1. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
2. Uhríková, D. *Vybrané kapitoly Biofyziky*. (Univerzita Komenského v Bratislave, 2015).
3. Palmgren, M. G. & Nissen, P. P-Type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 243–266 (2011).
4. Pedersen, P. L. & Carafoli, E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 146–150 (1987).
5. Skou, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 2170–2177 (1998).
6. Horisberger, J.-D. Recent Insights into the Structure and Mechanism of the Sodium Pump. *Physiology* **19**, 377–387 (2004).
7. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. & Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**, 647–55 (2000).
8. Axelsen, K. B. & Palmgren, M. G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**, 84–101 (1998).
9. Schultheis, P. J. *et al.* Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 731–8 (2004).
10. Biophysica, A. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Mol. Biol.* **1187**, 296–300 (1994).
11. Glynn, I. M. Annual review prize lecture. 'All hands to the sodium pump'. *J. Physiol.* **462**, 1 (1993).
12. Sorensen, T. L., Moller, J. V & Nissen, P. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science (80-. )*. **304**, 1672–1675 (2004).
13. Olesen, C., Sorensen, T. L., Nielsen, R. C., Moller, J. V & Nissen, P. Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. *Science (80-. )*. **306**, 2251–2255 (2004).
14. Bublitz, M., Morth, J. P. & Nissen, P. P-type ATPases at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 2515–2519 (2011).
15. Geering, K. The functional role of  $\beta$  subunits in oligomeric P-type ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **33**, 425–438 (2001).
16. Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O. & Karlsh, S. J. D. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 817–849 (2003).

17. Kaplan, J. H. Biochemistry of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATP-ase. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 511–535 (2002).
18. Gastrein-Phi. Cycle de la pompe sodium. (2005).
19. Toyoshima, C., Kanai, R. & Cornelius, F. First crystal structures of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: New light on the oldest ion pump. *Structure* **19**, 1732–1738 (2011).
20. Kubala, M. *et al.* Changes in electrostatic surface potential of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase cytoplasmic headpiece induced by cytoplasmic ligand(s) binding. *Biophys. J.* **97**, 1756–1764 (2009).
21. Colonna, T. E., Huynh, L. & Fambrough, D. M. Subunit interactions in the Na,K-ATPase explored with the yeast two- hybrid system. *J. Biol. Chem.* **272**, 12366–12372 (1997).
22. Geering, K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**, 526–532 (2008).
23. Sweadner, K. J. & Rael, E. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics* **68**, 41–56 (2000).
24. Geering, K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *AJP - Ren. Physiol.* **290**, F241–F250 (2006).
25. Goldschmidt, I. *et al.* Kidney and Colon Electrolyte Transport in CHIF Knockout Mice. *Cell. Physiol. Biochem.* **14**, 113–120 (2004).
26. Geering, K. Function of FXYD proteins, regulators of Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 387–392 (2005).
27. Tokhtaeva, E., Clifford, R. J., Kaplan, J. H., Sachs, G. & Vagin, O. Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase  $\alpha$ - $\beta$  heterodimers. *J. Biol. Chem.* **287**, 26115–26125 (2012).
28. Radzyukevich, T. L. *et al.* Tissue-specific role of the Na,K-ATPase  $\alpha$ 2 isozyme in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **288**, 1226–1237 (2013).
29. Azarias, G. *et al.* A specific and essential role for Na,K-ATPase  $\alpha$ 3 in neurons co-expressing  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 3. *J. Biol. Chem.* **288**, 2734–2743 (2013).
30. Woo, A. L., James, P. F. & Lingrel, J. B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 20693–20699 (2000).
31. Morth, J. P. *et al.* The structure of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364**, 217–227 (2009).
32. Voldsgaard Clausen, M., Nissen, P. & Poulsen, H. The  $\alpha$ 4 isoform of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is tuned for changing extracellular environments. *FEBS J.* **283**, 282–293 (2016).

33. Jewell, E. A. & Lingrel, J. B. Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  isoforms expressed in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 16925–16930 (1991).
34. Shyjan, A. W., Gottardi, C. & Levenson, R. The Na,K-ATPase beta 2 subunit is expressed in rat brain and copurifies with Na,K-ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 5166–9 (1990).
35. Malik, N., Canfield, V. A., Beckers, M. C., Gros, P. & Levenson, R. Identification of the mammalian Na,K-ATPase  $\alpha 3$  subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 22754–22758 (1996).
36. Schneider, B. G. & Kraig, E. Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase of the photoreceptor: selective expression of alpha 3 and beta 2 isoforms. *Exp. Eye Res.* **51**, 553–564 (1990).
37. Schneider, B. G., Shyjan, A. W. & Levenson, R. Co-localization and polarized distribution of Na,K-ATPase alpha 3 and beta 2 subunits in photoreceptor cells. *J Histochem Cytochem* **39**, 507–517 (1991).
38. Zlokovic, B. V., Mackic, J. B., Wang, L., McComb, J. G. & McDonough, a. Differential expression of Na,K-ATPase alpha and beta subunit isoforms at the blood-brain barrier and the choroid plexus. *J. Biol. Chem.* **268**, 8019–8025 (1993).
39. Fusco, M. De *et al.* Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump  $\alpha 2$  subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat. Genet.* **33**, 192–196 (2003).
40. Lee, J. Y., Gollamudi, S., Ozelius, L. J., Kim, J. Y. & Jeon, B. S. ATP1A3 mutation in the first Asian case of rapid-onset dystonia- parkinsonism. *Mov. Disord.* **22**, 1808–1809 (2007).
41. Brashear, A. *et al.* The phenotypic spectrum of rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and mutations in the ATP1A3 gene. *Brain* **130**, 828–835 (2007).
42. Silver, K. & Andermann, F. Alternating hemiplegia of childhood: a study of 10 patients and results of flunarizine treatment. *Neurology* **43**, 36–41 (1993).
43. Batool, M. *Protein Modelling&Molecular Docking.* (2012).
44. Baker, D. & Sali, a. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* **294**, 93–96 (2001).
45. [http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general\\_information/about\\_pdb/index.html](http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general_information/about_pdb/index.html), citované dňa 20.04.2016.
46. Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F. & Toyoshima, C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13742–13747 (2009).
47. Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F. & Toyoshima, C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459**, 446–450 (2009).

48. Sotomayor, C. P., Aguilar, L. F., Cuevas, F. J., Helms, M. K. & Jameson, D. M. Modulation of pig kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by cholesterol: Role of hydration. *Biochemistry* **39**, 10928–10935 (2000).
49. Einholm, A. P., Toustrup-Jensen, M. S., Holm, R., Andersen, J. P. & Vilsen, B. The rapid-onset dystonia parkinsonism mutation D923N of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 3 isoform disrupts Na<sup>+</sup> interaction at the third Na<sup>+</sup> site. *J. Biol. Chem.* **285**, 26245–26254 (2010).
50. Nyblom, M. *et al.* Crystal Structure of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the Na<sup>+</sup>-bound state. *Science* (80-. ). **342**, 123–127 (2013).
51. [http://www.gromacs.org/Documentation/Terminology/Force\\_Fields](http://www.gromacs.org/Documentation/Terminology/Force_Fields), citované dňa 25.04.2016.
52. Laskowski, R. a, Rullmann, J. a, MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486 (1996).
53. [http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS95/course/3\\_geometry/rama.html](http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS95/course/3_geometry/rama.html), citované dňa 19.04.2016.
54. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95–99 (1963).
55. Voet, D. & Voet, J. G. *Biochemistry 4e. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki* (2010).
56. [http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/nmr\\_manual/man\\_gf.html](http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/nmr_manual/man_gf.html), citované dňa 25.07.2016.
57. Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System. *Schrödinger LLC wwwpymol.org Version 1.*, <http://www.pymol.org> (2010).
58. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–12 (2004).
59. Webb, B. & Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **47**, 5.6.1–5.6.32 (2014).
60. Bhattacharya, A., Tejero, R. & Montelione, G. T. Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **66**, 778–795 (2007).
61. Lovell, S. C. *et al.* Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* **50**, 437–450 (2003).

## 7. Zoznam skratiek

### Aminokyseliny

A	Alanín	G	Glycín	M	Methionín	S	Serín
C	Cysteín	H	Histidín	N	Asparagín	T	Threonín
D	Aspartát	I	Izoleucín	P	Prolín	V	Valín
E	Glutamát	K	Lyzín	Q	Glutamín	W	Tryptofan
F	fenylalanín	L	Leucín	R	Arginín	Y	Tyrozín

Číslo za skratkou aminokyseliny uvádza pozíciu v sekvencii proteínu NKA, ako napríklad V15 znamená valín na pozícii 15.

### Ďalšie skratky

NKA	sodno–draselná pumpa
PC	fosfatidylcholín
PS	fosfatidylserín
ATP	adenozíntrifosfát
ADP	adenozíndifosfát
E1	konformácia NKA s vysokou afinitou ku sodným iónom
E2	konformácia NKA s vysokou afinitou ku draselným iónom
RDP	rapid onset dystonia parkinsonism - parkinsonova dysfunkcia
NMR	nukleárna magnetická rezonancia

## 8. Prílohy

### Príloha 1

#### Alfa podjednotka

1

**2ZXE:** ---- MGKGT – ASDKYEPAATSENATKSKKKGKKDKIDKKRDLDELKKEVS

**α 1:** ---- MGKGV–GRDKYEPAAVSEQGDKKGGKGGKKD ----- RDMDELKKEVS

**α 2 :** —— MGRG — AGREYSPAATTAENGGGKKK ----- QKEKELDELKKEVA

**α 3:** ----- MGDKK – DDKDSPKKNKGKERRDLDDLKKEVA

**α 4:** MGLWGKKGTVAPHDQSPRRRPKKGLIKKKMVKREK — QKRNMEELKKEVV

51

**2ZXE:** MDDHKLSLDELHNKYGTDLTRGLTNARAKEILARDGPNLTPPPTTPEWI

**α 1:** MDDHKLSLDELHRKYGTDLSRGLTSARAAEILARDGPNALTPPPTTPEWI

**α 2:** MDDHKLSLDELGRKYQVDLSKGLTNQRAQDVLARDGPNALTPPPTTPEWV

**α 3:** MTEHKMSVEEVCRKYNTDCVQGLTHSKAQEILARDGPNALTPPPTTPEWV

**α 4:** MDDHKLTLEELSTKYSVDLTKGHSHQRAKEILTRGGPNTVTPPPTTPEWV

101

**2ZXE:** KFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAATEDEPANDNLYLGVVVSTVV

**α 1:** KFCRQLFGGFSMLLWIGAILCFLAYSQAATEEPPQNDNLYLGVVLSAVV

**α 2:** KFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAAMEDEPSNDNLYLGVVLAADV

**α 3:** KFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAGTEDDPSGDNLYLGIVLAADV

**α 4:** KFCKQLFGGFSLLLWTGAILCFVAYSIIYFNNEPTKDNLYLSIVLSVVV

**151**

**2ZXE:** IVTGCFSYYQEAKSSRIMDSFKNMVPQQALVIRDGEKSTINAEFVVAGDL

**$\alpha$  1:** IITGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIRNGEKMSINAEFVVAGDL

**$\alpha$  2:** IVTGCFSYYQEAKSSKIMDSFKNMVPQQALVIREGEKMQINAEFVVAGDL

**$\alpha$  3:** IITGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIREGEKMQVNAEFVVAGDL

**$\alpha$  4:** IVTGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIRGGKMQINVQEVVLGDL

**201**

**2ZXE:** VEVKGGDRIPADLRIISAHGCKVDNSSLTGESEPQTRSPEFSSENPLETR

**$\alpha$  1:** VEVKGGDRIPADLRIISANGCKVDNSSLTGESEPQTRSPDFTNENPLETR

**$\alpha$  2:** VEVKGGDRVPADLRIISAHGCKVDNSSLTGESEPQTRSPEFTHENPLETR

**$\alpha$  3:** VEIKGGDRVPADLRIISAHGCKVDNSSLTGESEPQTRSPDCTHDNPLETR

**$\alpha$  4:** VEIKGGDRVPADLRLISAQGCKVDNSSLTGESEPQSRSPDFTHENPLETR

**251**

**2ZXE:** NIAFFSTNCVEGTARGVVVYTGDRITVMGRIATLASGLEVGRTPIAIEIEH

**$\alpha$  1:** NIAFF STNCVEGTARGIVVYTGDRITVMGRIATLASGLEGGQTPIAAEIEH

**$\alpha$  2:** NICFFSTNCVEGTARGIVIAITGDRTVMGRIATLASGLEVGRTPIAMEIEH

**$\alpha$  3:** NITFFSTNCVEGTARGVVVATGDRTVMGRIATLASGLEVGKTPIAIEIEH

**$\alpha$  4:** NICFFSTNCVEGTARGIVIAITGDSTVMGRIASLTSGLA VGQTPIAAEIEH

**301**

**2ZXE:** FIHIITGVAVFLGV SFFILSLILGYSWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATV

**$\alpha$  1:** FIHIITGVAVFLGV SFFILSLILEYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATV

**$\alpha$  2:** FIQLITGVAVFLGV SFFVLSLILGYSWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATV



**$\alpha$  3:** FIQLITGVAVFLGVSSFILSLILGYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATV

**$\alpha$  4:** FIHLITVVAVFLGVTFVALSLLLGYGWLEAIIFLIGIIVANVPEGLLATV

**351**

**2ZXE:** TVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAH

**$\alpha$  1:** TVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAH

**$\alpha$  2:** TVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAH

**$\alpha$  3:** TVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAH

**$\alpha$  4:** TVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAH

**401**

**2ZXE:** MWFDNQIHEADTTENQSGAAFDKTSATWSALSRIAALCNRAVFQAGQDNV

**$\alpha$  1:** MWFDNQIHEADTTENQSGVSFDKTSATWLALSRIAGLCNRAVFQANQENL

**$\alpha$  2:** MWFDNQIHEADTTEDQSGATFDKRSPTWTALSRIAGLCNRAVFKAGQENI

**$\alpha$  3:** MWFDNQIHEADTTEDQSGTSFDKSSHTWVALSHIAGLCNRAVFKGGQDNI

**$\alpha$  4:** MWFDMTVYEADTTEEQTGKTFTKSSDTWFMLARIAAGLCNRADFKANQEIL

**451**

**2ZXE:** PILKRSVAGDASESALLKCIELCCGSVQGMRRNPKIVEIPFNSTNKYQL

**$\alpha$  1:** PILKRAVAGDASESALLKCIELCCGSVKEMRERYAKIVEIPFNSTNKYQL

**$\alpha$  2:** SVSKRDTAGDASESALLKCIELSCGSVRKMRDRNPKVAEIPFNSTNKYQL

**$\alpha$  3:** PVLKRDVAGDASESALLKCIELSSGSVKLMRERNKKVAEIPFNSTNKYQL

**$\alpha$  4:** PIAKRATTGDASESALLKFIEQSYSSVAEMREKNPKVAEIPFNSTNKYQM

**501**

**2ZXE:** SIHENEKSSERYLLVMKGA PERILDR CSTILLNGAEEPLKEDMKEAFQN

**$\alpha$  1:** SIHKNPNTSEPQHLLVMKGA PERILDR CSSILLHGKEQPLDEELKDAFQN

**$\alpha$  2:** SIHEREDSPQS–HVLVMKGA PERILDR CSTILVQGKEIPLDKEMQDAFQN

**$\alpha$  3:** SIHETEDPNDNRYLLVMKGA PERILDR CSTILLQGKEQPLDEEMKEAFQN

**$\alpha$  4:** SIHLREDSSQT – HVLMMKGA PERILEFCSTFLLNGQEYSMNDEMKEAFQN

**551**

**2ZXE:** AYLELGGLGERVLGFCHFALPEDKYNEGYPFDADEPNFPTDLCFVGLMA

**$\alpha$  1:** AYLELGGLGERVLGFCHLFLPDEQFPEGFQFDTDDVNFIDNLCFVGLIS

**$\alpha$  2:** AYMELGGLGERVLGFCQLNLPSGKFPRGFKFDDELNFPTEKLCFVGLMS

**$\alpha$  3:** AYLELGGLGERVLGFCHYYLPEEQFPKGFAFDCDDVNFTDNLFCFVGLMS

**$\alpha$  4:** AYLELGGLGERVLGFCFLNLP – SSFSKGFNFNTDEINFMDNLCFVGLIS

**601**

**2ZXE:** MIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNET

**$\alpha$  1:** MIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNET

**$\alpha$  2:** MIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNET

**$\alpha$  3:** MIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNET

**$\alpha$  4:** MIDPPRAAVPDAVSKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGTET

**651**

**2ZXE:** IEDIAARLNIPIGQVNPRDAKACVVHGSDLKDLSTEVLDLHYHTEIVF

**$\alpha$  1:** VEDIAARLNIPVSQVNPRDAKACVVHGSDLKDMTSEQLDDILKYHTEIVF

**$\alpha$  2:** VEDIAARLNIPMSQVNPREAKACVVHGSDLKDMTSEQLDEILKNHTEIVF

**$\alpha$  3:** VEDIAARLNIPVSQVNPRDAKACVIHGTDLKDFTSEQIDEILQNHTEIVF

**$\alpha$  4:** AEEVAARLKIPISKVDASAAKAIVVHGAELKDIQSKQLDQILQNHPEIVF

**701**

**2ZXE:** ARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGISGSD

**$\alpha$  1:** ARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGSD

**$\alpha$  2:** ARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGIAMGISGSD

**$\alpha$  3:** ARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGSD

**$\alpha$  4:** ARTSPQQKLIIVEGCQRLGAVVAVTGDGVNDSPALKKADIGIAMGISGSD

**751**

**2ZXE:** VSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIAYTTLTSNIPEITPF

**$\alpha$  1:** VSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIAYTTLTSNIPEITPF

**$\alpha$  2:** VSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIAYTTLTSNIPEITPF

**$\alpha$  3:** VSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIAYTTLTSNIPEITPF

**$\alpha$  4:** VSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIMYTLTSNIPEITPF

**801**

**2ZXE:** LVFIIGNVPLPLGTVTILCIDLGTMVPAISLAYEQAESDIMKRQPRNPK

**$\alpha$  1:** LIFIIANIPLPLGTVTILCIDLGTMVPAISLAYEQAESDIMKRQPRNPK

**$\alpha$  2:** LLFIIANIPLPLGTVTILCIDLGTMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNSQ

**$\alpha$  3:** LLFIMANIPLPLGTITILCIDLGTMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNPR

**$\alpha$  4:** LMFIIIGIPLPLGTITILCIDLGTMVPAISLAYESAESDIMKRLPRNPK

**851**

**2ZXE:** TDKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFSYFVILAENGFLPMDLIGKRVRW

**$\alpha$  1:** TDKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGFLPIHLLGLRVDW  
 **$\alpha$  2:** TDKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGFLPSRLLGIRLDW  
 **$\alpha$  3:** TDKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFSYFVILAENGFLPGNLVGIRLNW  
 **$\alpha$  4:** TDNLVNHRLIGMAYGQIGMIQALAGFFTYFVILAENGFRPVDLLGIRLHW  
**901**

**2ZXE:** DDRWISDVEDSFGQQWTYEQRKIVEFTCHTSFFISIVVVQWADLIICKTR  
 **$\alpha$  1:** DDRWINDVEDSYGQQWTYEQRKIVEFTCHTAFFVSIVVVQWADLVICKTR  
 **$\alpha$  2:** DDRTMNDLEDSYGQEWTYEQRKVVEFTCHTAFFASIVVVQWADLIICKTR  
 **$\alpha$  3:** DDRTVNDLEDSYGQQWTYEQRKVVEFTCHTAFFVSIVVVQWADLIICKTR  
 **$\alpha$  4:** EDKYLNDLEDSYGQQWTYEQRKVVEFTCQTAFFVTIVVVQWADLIISKTR  
**951**

**2ZXE:** RNSIFQQGMKNKILIFGLFEETALAAFLSYCPGTDVALRMYPKPSWWFC  
 **$\alpha$  1:** RNSVFQQGMKNKILIFGLFEETALAAFLSYCPGMGVALRMYPKPTWWFC  
 **$\alpha$  2:** RNSVFQQGMKNKILIFGLLEETALAAFLSYCPGMGVALRMYPKVTWWFC  
 **$\alpha$  3:** RNSVFQQGMKNKILIFGLFEETALAAFLSYCPGMDVALRMYPKPSWWFC  
 **$\alpha$  4:** RNSLFQQGMRNKVLIFGILEETLLAAFLSYTPGMDVALRMYPKITWWLC  
**1001**

**2ZXE:** AFPYSLIIFLYDEMRRFIIRSPGGWVEQETYY  
 **$\alpha$  1:** AFPYSLIFVYDEVKLIIRRRPGGWVEKETYY  
 **$\alpha$  2:** AFPYSLIFIYDEVKLIILRRYPGGWVEKETYY  
 **$\alpha$  3:** AFPYSFLIFVYDEIRKLIILRRNPGGWVEKETYY  
 **$\alpha$  4:** AIPYSILIFVYDEIRKLLIRQHPDGWVERETYY

1

**4HQJ:** ----- KEVSMD

**α 1:** -----MGKGVGRDKYEPAAVSEQDKKGGKGGKDRDMDDELKKEVSMD

**α 2:** -----MGRGAGREYSPAATTAENGGGKKKQKEKELDELKKEVAMD

**α 3:** -----MGDKKDDKDSPKKNKGKERRDLDDLKKEVAMT

**α 4:** MGLWGKKGTVAPHDQSPRRRPKKGLIKKKMVKREKQKRNMEELKKEVMD

51

**4HQJ:** DHKLSLDELHRKYGTDLSRGLTPARAAEILARDGPNALTPPPTTPEWVKF

**α 1:** DHKLSLDELHRKYGTDLSRGLTSARAAEILARDGPNALTPPPTTPEWIKF

**α 2:** DHKLSLDELGRKYQVDLSKGLTNQRAQDVLARDGPNALTPPPTTPEWVKF

**α 3:** EHKMSVEEVCRKYNTDCVQGLTHSKAQEILARDGPNALTPPPTTPEWVKF

**α 4:** DHKLTLEELSTKYSVDLTKGHSHQRAKEILTRGGPNTVTPPPTTPEWVKF

101

**4HQJ:** CRQLFGGFSMLLWIGAILCFLAYGIQAATEEEPQNDNLYLGVVLSAVVII

**α 1:** CRQLFGGFSMLLWIGAILCFLAYSIQAATEEEPQNDNLYLGVVLSAVVII

**α 2:** CRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAAMEDEPSNDNLYLGVVLAADVIV

**α 3:** CRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAGTEDDPSGDNLYLGVVLAADVII

**α 4:** CKQLFGGFSLLLWTGAILCFVAYSIIQIYFNEEPTKDNLYLSIVLSVVIV

151

**4HQJ:** TGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIRNGEKMSINAEVVVVDLVE

**α 1:** TGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIRNGEKMSINAEVVVVDLVE

**α 2:** TGCFSYYQEAKSSKIMDSFKNMVPQQALVIREGEKMQINAEVVVVDLVE

**$\alpha$  3:** TGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIREGEKMQVNAAEEVVVGD LVE

**$\alpha$  4:** TGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIRGGKMQINVQEVVLGD LVE

**201**

**4HQJ:** VKGGDRIPADLRIISANGCKVDNSSLTGESEPQTRSPDFTNENPLETRNI

**$\alpha$  1:** VKGGDRIPADLRIISANGCKVDNSSLTGESEPQTRSPDFTNENPLETRNI

**$\alpha$  2:** VKGGDRVPADLRIISSHGCKVDNSSLTGESEPQTRSPEFTHENPLETRNI

**$\alpha$  3:** IKGDRVPADLRIISAHGCKVDNSSLTGESEPQTRSPDCTHDNPLETRNI

**$\alpha$  4:** IKGDRVPADLRLISAQGCKVDNSSLTGESEPQRSRSPDFTHENPLETRNI

**251**

**4HQJ:** AFFSTNCVEGTARGIVVYTGDR TVMGRIATLASGLEGGQTPIAAEIEHFI

**$\alpha$  1:** AFFSTNCVEGTARGIVVYTGDR TVMGRIATLASGLEGGQTPIAAEIEHFI

**$\alpha$  2:** CFFSTNCVEGTARGIVIATGDRTVMGRIATLASGLEVGRTPIAMEIEHFI

**$\alpha$  3:** TFFSTNCVEGTARGVVVATGDRTVMGRIATLASGLEVGKTPIAIEIEHFI

**$\alpha$  4:** CFFSTNCVEGTARGIVIATGDSTVMGRIASLTSGLA VGQTPIAAEIEHFI

**301**

**4HQJ:** HIITGVA VFLGV SFFILSLILEYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTV

**$\alpha$  1:** HIITGVA VFLGV SFFILSLILEYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTV

**$\alpha$  2:** QLITGVA VFLGV SFFVLSLILGYSWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTV

**$\alpha$  3:** QLITGVA VFLGV SFFILSLILGYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTV

**$\alpha$  4:** HLITVVA VFLGV TFFALSLLLGYGWLEAIIFLIGIIVANVPEGLLATVTV

351

**4HQJ:** CLTLAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMW

**$\alpha$  1:** CLTLAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMW

**$\alpha$  2:** CLTLAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMW

**$\alpha$  3:** CLTLAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMW

**$\alpha$  4:** CLTLAKRMARKNCLVKNLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMW

401

**4HQJ:** SDNQIHEADTTENQSGVSFDKTSATWLALSRIAGLCNRAVFQANQENLPI

**$\alpha$  1:** FDNQIHEADTTENQSGVSFDKTSATWLALSRIAGLCNRAVFQANQENLPI

**$\alpha$  2:** FDNQIHEADTTEDQSGATFDKRSPTWTALSRIAGLCNRAVFKAGQENISV

**$\alpha$  3:** FDNQIHEADTTEDQSGTSFDKSSHTWVALSHIAGLCNRAVFKGGQDNIPV

**$\alpha$  4:** FDMTVYEADTTEEQTGKTFTKSSDTWFMLARIAGLCNRADFKANQEILPI

451

**4HQJ:** LKRAVAGDASESALLKCIELCCGSVKEMRERYTKIVEIPFNSTNKYQLSI

**$\alpha$  1:** LKRAVAGDASESALLKCIELCCGSVKEMRERYAKIVEIPFNSTNKYQLSI

**$\alpha$  2:** SKRDTAGDASESALLKCIELSCGSVRKMRDRNPKVAEIPFNSTNKYQLSI

**$\alpha$  3:** LKRDVAGDASESALLKCIELSSGSVKLMRERNKKVAEIPFNSTNKYQLSI

**$\alpha$  4:** AKRATTGDASESALLKFIEQSYSSVAEMREKNPKVAEIPFNSTNKYQMSI

501

**4HQJ:** HKNPNTAEPRHLLVMKGAPERILDRCSSILIHGKEQPLDEELKDAFQNAV

**$\alpha$  1:** HKNPNTSEPQHLLVMKGAPERILDRCSSILLHGKEQPLDEELKDAFQNAV

**$\alpha$  2:** HEREDSPQ–SHVLVMKGAPERILDRCSSTILVQGKEIPLDKEMQDAFQNAV

**$\alpha$  3:** HETEDPNDNRYLLVMKGA PERILDR CSTILLQGKEQPLDEEMKEAFQNAV

**$\alpha$  4:** HLREDSSQ – THVLMKGA PERILEFCSTFLLNGQEYSMNDEMKEAFQNAV

**551**

**4HQJ:** LELGGLGERVLGFCHLFLPDEQFPEGFQFD TDDVNFPLDNLCFVGLISMI

**$\alpha$  1:** LELGGLGERVLGFCHLFLPDEQFPEGFQFD TDDVNFPI DNLCFVGLISMI

**$\alpha$  2:** MELGGLGERVLGFCQLNLPSGKFPRGFKFD TDELNFPTEKLCFVGLMSMI

**$\alpha$  3:** LELGGLGERVLGFCHYYLPEEQFPKGFA FDCDDVNFTTDNLCFVGLMSMI

**$\alpha$  4:** LELGGLGERVLGFCFLNLP – SSFSKGFP FNTDEINFPMDNLCFVGLISMI

**601**

**4HQJ:** DPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNETVE

**$\alpha$  1:** DPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNETVE

**$\alpha$  2:** DPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNETVE

**$\alpha$  3:** DPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGNETVE

**$\alpha$  4:** DPPRAAVPDAVSKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGVGIISEGTETAE

**651**

**4HQJ:** DIAARLNIPVSQVNPRDAKACVVHGSDLKDMTSEQLDDILKYHTEIVFAR

**$\alpha$  1:** DIAARLNIPVSQVNPRDAKACVVHGSDLKDMTSEQLDDILKYHTEIVFAR

**$\alpha$  2:** DIAARLNIPMSQVNPREAKACVVHGSDLKDMTSEQLDEILKNHTEIVFAR

**$\alpha$  3:** DIAARLNIPVSQVNPRDAKACVIHGTDLKDFTSEQIDEILQNHTEIVFAR

**$\alpha$  4:** EVAARLKIPISKVDASAAKAI VVHGAELKDIQSKQLDQILQNHPEIVFAR

**701**

**4HQJ:** TSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPASKKADIGVAMGIAGSDVS



**$\alpha$  1:** TSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGSDVS  
 **$\alpha$  2:** TSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGIAMGISGSDVS  
 **$\alpha$  3:** TSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGSDVS  
 **$\alpha$  4:** TSPQQKLIIVEGCQRLGAVVAVTGDGVNDSPALKKADIGIAMGISGSDVS

**751**

**4HQJ:** KQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA YTLTSNIPEITPFLI

**$\alpha$  1:** KQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA YTLTSNIPEITPFLI

**$\alpha$  2:** KQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA YTLTSNIPEITPFLI

**$\alpha$  3:** KQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA YTLTSNIPEITPFLI

**$\alpha$  4:** KQAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIMYTLTSNIPEITPFLM

**801**

**4HQJ:** FIIANIPLPLGTVTILCIDLGTDMVPAISLAYEQAESDIMKRQPRNPKTD

**$\alpha$  1:** FIIANIPLPLGTVTILCIDLGTDMVPAISLAYEQAESDIMKRQPRNPKTD

**$\alpha$  2:** FIIANIPLPLGTVTILCIDLGTDMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNSQTD

**$\alpha$  3:** FIMANIPLPLGTITILCIDLGTDMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNPRTD

**$\alpha$  4:** FIILGIPLPLGTITILCIDLGTDMVPAISLAYESAESDIMKRLPRNPKTD

**851**

**4HQJ:** KLVNEQLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGFLPIHLLGLRVNWDD

**$\alpha$  1:** KLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGFLPIHLLGLRVDWDD

**$\alpha$  2:** KLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGFLPSRLLGIRLDWDD

**$\alpha$  3:** KLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFSYFVILAENGFLPGNLVGIRLNWDD

**$\alpha$  4:** NLVNHRLIGMAYGQIGMIQALAGFFTYFVILAENGFRPVDLLGIRLHWED

901

**4HQJ:** RWINDVEDSYGQQWTYEQRKIVEFTCHTPFFVTIVVVQWADLVICKTRRN

**$\alpha$  1:** RWINDVEDSYGQQWTYEQRKIVEFTCHTAFFVSIVVVQWADLVICKTRRN

**$\alpha$  2:** RTMNDLEDSYGQEWTYEQRKVVEFTCHTAFFASIVVVQWADLIICKTRRN

**$\alpha$  3:** RTVNDLEDSYGQQWTYEQRKVVEFTCHTAFFVSIVVVQWADLIICKTRRN

**$\alpha$  4:** KYLNDLEDSYGQQWTYEQRKVVEFTCQTAFFVTIVVVQWADLIISKTRRN

951

**4HQJ:** SVFQQGMKNKILIFGLFEETALAAFLSYCPGMGVALRMYPLKPTWWFCAF

**$\alpha$  1:** SVFQQGMKNKILIFGLFEETALAAFLSYCPGMGVALRMYPLKPTWWFCAF

**$\alpha$  2:** SVFQQGMKNKILIFGLLEETALAAFLSYCPGMGVALRMYPLKVTWWFCAF

**$\alpha$  3:** SVFQQGMKNKILIFGLFEETALAAFLSYCPGMDVALRMYPLKPSWWFCAF

**$\alpha$  4:** SLFQQGMRNKVLIFGILEETLLAAFLSYTPGMDVALRMYPLKITWWLCAI

1001

**4HQJ:** PYSLLIFVYDEVKLIIRRRPGGWVEKETYY

**$\alpha$  1:** PYSLLIFVYDEVKLIIRRRPGGWVEKETYY

**$\alpha$  2:** PYSLLIFIYDEVKLIIRRRPGGWVEKETYY

**$\alpha$  3:** PYSFLIFVYDEIRKLIIRRRPGGWVEKETYY

**$\alpha$  4:** PYSILIFVYDEIRKLLIRQHPDGWVERETYY

**Beta podjednotka**

1

**2ZXE:** MARGKSKETD—GGWKKFLWDSEKKEFLGRTGSSWFKIFLYLIFYGC

**$\beta$  1:** MARGKAKE-EG—SWKKFIWNSEKKEFLGRTGGSWFKILLFYVIFYGC

**β 2:** MVIQKEKKSCGQVVEEWKEFVWNPRTHQFMGRTGTSWAFILLFYLVFYG

**β 3:** – MTKNEKKSLNQSLAEWKLFIYNPTTGEFLGRTAKSWGLILLFYLVFYGF

**51**

**2ZXE:** LAGIFIGTIQVLLLTLSDFEPKYQDRVAPPGLSHAPY–AIKTEISFSISN

**β 1:** LAGIFIGTIQVMLLTISEFKPTYQDRVAPPGLTQIPQ–IQKTEISFRPND

**β 2:** LTAMFTLTMWVMLQTVSDHTPKYQDRLATPGLMIRPK–TENLDVIVNVSD

**β 3:** LAALFSFTMWVMLQTLNDEVPKYRDQIPSPGLMVFPKPVTALEYTFSRSD

**101**

**2ZXE:** PKSYESFVKSMHKLMDLYNESSQAGNSPFEDCSDTPADYIKRGDLDDSQG

**β 1:** PKSYEAYVLNIVRFLEKYKDSAQRDDMIFEDCGDVPSEPKERGFDFNHERG

**β 2:** TESWDQHVQKLNKFLEPYNDSIQAQKN—DVCR—PGRYYEQPDNGVLNY

**β 3:** PTSYAGYIEDLKKFLKPYTLEEQKNLTVCPD—————GALFEQKG

**151**

**2ZXE:** Q–KKACRFSRMWLKNCSGLDDTT–YGYAEGKPCVVAKLNRIIGFYPKPLK

**β 1:** E–RKVCRFKLEWLGNCGLNDET–YGYKEGKPCIIIKLNRLVGLFKPKPPK

**β 2:** P–KRACQFNRTQLGNCSGIGDSTHYGYSTGQPCVFIKMNRVINFYAGANQ

**β 3:** PVYVACQFPISLLQACSGMND–PDFGYSQGNPCILVKMNRIIGLKPE——

**201**

**2ZXE:** NTTDLPEELQANYNQYVLPRLCAAKREEDREKIGSIEYFGLGGYAGFPLQ

**β 1:** NES–LET YPVMKYNPVLPVQCTGKRDEDKDKVGNVEYFGLGNSPGFPLQ

**β 2:** S—————MNVTCAGKRDEDAENLGNFVMFPANG——NIDLM

**β 3:** ————— GVPRIDCVSKNED ——— IPNVAVYPHNGM — IDLK

**251**

**2ZXE:** YYPYYGKRLQKKYLQPLLAIQFTNLTQNM — ELRIECKVYG – ENIDY – SE

**β 1:** YYPYYGKLLQPKYLQPLLAVQFTNLTMDT—EIRIECKAYG–ENIGY–SE

**β 2:** YFPYYGKKFHVNYTQPLVAVKFLNVTPNV—EVNVECRINA–ANIATDDE

**β 3:** YFPYYGKKLHVGYLQPLVAVQVSFAPNNTGKEVTVECKIDGSANLKSQDD

**301**

**2ZXE:** KDRFRGRFEVKIEVKS–

**β 1:** KDRFQGRFDVKIEVKS–

**β 2:** RDKFAGRVAFKLRINKT

**β 3:** RDKFLGRVMFKITARA

**1**

**4HQJ:** ————— SEKKEFLGRTGGSWFKILLFYVIFYGC

**β 1:** ——— MARGKAKEEGSWKKFIWNSEKKEFLGRTGGSWFKILLFYVIFYGC

**β 2:** MVIQKEKKSCGQVVEEWKEFVWNPRTHQFMGRTGTSWAFILLFYLVFYGF

**β 3:** – MTKNEKKSLNQSLAEWKLFYINPTTGEFLGRTAKSWGLILLFYLVFYGF

**51**

**4HQJ:** LAGIFIGTIQVMLLTISEFKPTYQDRVAPPGLTQIPQ – SQKTEISFRPND

**β 1:** LAGIFIGTIQVMLLTISEFKPTYQDRVAPPGLTQIPQ — IQKTEISFRPND

**β 2:** LTAMFTLTMWVMLQTVSDHTPKYQDRLATPGLMIRPK – TENLDVIVNVSD

**β 3:** LAALFSFTMWVMLQTLNDEVPKYRDQIPSPGLMVFPKPVTALEYTFSRSD

101

4HQJ: PQSYESYVVSIVRFLEKYKDL — AQKDDMIFEDCGNVPSELKERGEYNNE

β 1: PKSYEAYVLNIVRFLEKYKDS—AQRDDMIFEDCGDVPSEPKERGDFNHE

β 2: TESWDQHVQKLNKFLEPYNDSIQAQKNDVC—————RPGRYYEQPDNGVL

β 3: PTSYAGYIEDLKKFLKPY—TLEEQKNLTVCPDGAL—————FEQK

151

4HQJ: RGERKVCRSRLEWLGNC SGLNDET—YGYKDGKPCVIIKLN RVLGFKPKPP

β 1: RGERKVCRFKLEWLGNC SGLNDET—YGYKEGKPCIIKLN RVLGFKPKPP

β 2: NYPKRACQFNRTQLGNC SGIGDSTHYGYSTGQPCVFIKMNRVIN F—YAG

β 3: GPVYVACQFPISLLQACSGMND—PDFGYSQGNPCILVKMNR IIGLKPE —

201

4HQJ: KNESLETYPVMKYNPYVLPVHCTGKRDEDKEKVG TM EYFGLGGYPGFPLQ

β 1: KNESLETYPVMKYNPVLPVQCTGKRDEDKDKVGNVEYFGLGNSPGFPLQ

β 2: ANQSMN—————VTCAGKRDEDAENLGNFVMFPANG—NIDL M

β 3: —————GVPRIDCVSKNED ———IPNVAVYPHNGM — IDLK

251

4HQJ: YYPYYGKLLQPKYLQPLMAVQFTNLTMDT—EIRIECKAYG – ENIGY – SE

β 1: YYPYYGKLLQPKYLQPLAVQFTNLTMDT—EIRIECKAYG–ENIGY–SE

β 2: YFPYYGKKFHVNYTQPLVAVKFLNVTPNV—EVNVECRINA–ANIATDDE

β 3: YFPYYGKKLHVGYLQPLVAVQVSFAPNNTGKEVTVECKIDGSANLKSQDD

301

**4HQJ:** KDRFQGRFDVKIEVKS-

**β 1:** KDRFQGRFDVKIEVKS-

**β 2:** RDKFAGRVAFKLRINKT

**β 3:** RDKFLGRVMFKITARA-

**Gama podjednotka (FXYD 2)**

1

**2ZXE:** -----MDPEG-PDND-ERFTYDYRLRVVGLIVAAVLCVIGIILLAGKC

**GAMA:** MTGLSMDGGGSPKGDVDPFYDYETVRNGGLIFAGLAFIVGLLILLSRRF

51

**2ZXE:** RCKFNQNKRTRSNSGTATAQHLLQPGEATEC

**GAMA:** RCGGNKKRRQINEDEP-----

1

**4HQJ:** -----FYDYETVRNGGLIFAALAFIVGLIILLS---

**GAMA:** MTGLSMDGGGSPKGDVDPFYDYETVRNGGLIFAGLAFIVGLLILLSRRF

51

**4HQJ:** -----

**GAMA:** RCGGNKKRRQINEDEP