

Univerzita Palackého v Olomouci

Prírodovedecká fakulta

Katedra biofyziky

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Sledovanie kinetiky Na⁺/K⁺-ATPázy metódou stopped-flow

Vypracovala: Bc. Alžbeta Kubištelová

Študijný odbor: Molekulárna biofyzika

Vedúci diplomovej práce: Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

Ďakujem vedúcemu diplomovej práce Doc. RNDr. Martinovi Kubalovi, Ph.D. za vedenie, za všetky cenné rady a za praktickú pomoc pri práci v laboratóriu. Ďalej ďakujem za pomoc v laboratóriu aj Bc. Tereze Štenclovej. RNDr. Tomášovi Fürstovi, Ph.D. za prvotný návrh skriptu v programe MatLab, Ing. Martinovi Bulkovi za pomoc pri práci v programe MatLab a Mgr. Kláre Kubištelovej za pomoc pri finálnych úpravách diplomovej práce.

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, pod vedením Doc. RNDr. Martina Kubalu, Ph.D. a s použitím literatúry uvedenej v závere práce.

V Olomouci dňa 19. 7. 2018

.....

ZHRNUTIE

Cieľom práce bola izolácia Na^+/K^+ -ATPázy a optimalizácia merania kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy metódou stopped-flow. Teoretická časť práce sa venuje membránovému transportu, štruktúre a mechanizmu fungovania Na^+/K^+ -ATPázy. Ďalej sú rozoberané jednotlivé metódy, ktoré sa využívajú na sledovanie kinetiky ATPáz. V praktickej časti je popísaná izolácia Na^+/K^+ -ATPázy a meranie kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy. Pre meranie bolo použité fluorescenčné farbivo RH421. Bola sledovaná zmena intenzity fluorescencie po rýchlom zmiešaní dvoch roztokov, kde jeden obsahoval farbivo inkubované s Na^+/K^+ -ATPázou a druhý len ATP. Pri optimalizácii metódy sa vyskytol problém s rôznym počiatkom spustenia reakcie, čo predstavuje zmiešanie dvoch roztokov. Tento problém bol vyriešený pomocou programu vytvoreného v MatLabe špeciálne pre túto prácu. Následne sa merala kinetika pri rôznych podmienkach, jednalo sa o zmenu koncentrácie RH421 a ATP. Pri meraní s rôznou koncentráciou RH421 boli dosiahnuté porovnateľné výsledky s literatúrou. Avšak meranie s rôznou koncentráciou ATP neposkytli výsledky odpovedajúce literatúre a toto meranie bude potrebovať ďalšie optimalizácie.

SUMMARY

The aim of this thesis was the isolation and optimization of kinetics measurements of Na⁺/K⁺-ATPase by stopped-flow method under different conditions. The theoretical part of the thesis is devoted to membrane transport, structure and mechanism of Na⁺/K⁺-ATPase. Subsequently, we focused on kinetics methods used for monitoring of enzyme kinetics. In the practical part, we described isolation and measurement of kinetics of Na⁺/K⁺-ATPase. The fluorescent dye RH421 was used for measurements. The change of fluorescence intensity was monitored after fast mixing two solutions, when one contained Na⁺/K⁺-ATPase incubated with the dye and the other only ATP solution. During the optimization of method few problems have occurred with the different starting time of the reaction, such as mixing solutions together. This problem was solved by program created in MatLab especially composed for this work. Afterward, we measured the kinetics under different conditions that means the alternation of concentration of RH421 and ATP. During the measurement with different concentration of RH421, comparable results with literature were achieved. However, measurement with different concentration of ATP failed to provide comparable results with literature and this measurement will need further optimization.

ZOZNAM SKRATIEK

5-IAF - jódoacetamidfluoresceín

$^{32}\text{P}_i$ - rádioaktívne značený anorganický fosfát

ADP – adenzíndifosfát

ATP – adenzíntрифосфát

ATPáza - adenzíntрифосфátáza

BIPM - N-[p-benzimidazolyl]fenylmaleimid

EDTA – etyléndiamíntetraoctová kyselina

FITC – fluoresceín-5'-izotiokyanát

LDH – laktát dehydrogenáza

NAD^+ - oxidovaná forma nikotínadenín dinukleotidfosfátu

NADH - nikotínadenín dinukleotidfosfát

NADP^+ - oxidovaná forma nikotínamidadenín dinukleotidu

NADPH - nikotínamidadenín dinukleotid

NBD – nucleotide-binding domain (nukleotidová-väzbová doména)

PEP – fosfoenolpyruvát

P_i - anorganický fosfát

PK – pyruvát kináza

RH421 - N-(4-sulfobutyl)-4-(4-(p-dipentylaminofenyl)-butadienyl)-pyrimidiová vnútorná soľ

SDS - dodecylsulfát sodný

SDS PAGE - sodium polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovom géle za prítomnosti dodecylsulfátu sodného)

TMD – transmembrane domain (hydrofóbná transmembránová doména)

Obsah

Obsah.....	7
Úvod.....	9
1 Membránový transport	10
1.1 Membránové proteíny	11
1.2 Typy membránových proteínov	11
1.3 Aktívny a pasívny transport	13
2 ATPázy.....	15
2.1 Sodno – draselná pumpa (Na^+/K^+ -ATPáza).....	17
2.1.1 Štruktúra Na^+/K^+ -ATPázy.....	19
2.1.1.1 Podjednotka α	19
2.1.1.2 Podjednotka β	20
2.1.1.3 Podjednotka γ	20
2.1.2 Mechanizmus fungovania Na^+/K^+ -ATPázy	21
3 Metódy merania kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy	23
3.1 End point metódy	23
3.1.1 Kolorimetrické metódy	23
3.1.2 Metóda využívajúca rádioaktívne značenie ATP.....	24
3.2 Kontinuálne sledovanie kinetiky	25
3.2.1 Coupled enzyme assay (Spriahnuté reakcie).....	25
3.2.2 Coupled enzyme pre sledovanie ATPázovej aktivity	26
3.3 Sledovanie kinetiky parciálnych reakcií katalyckého cyklu	27
3.3.1 Metóda stopped-flow.....	27
3.3.1.1 Stopped-flow aparátúra	30
4 Fluorescenčné farbivá	32
4.1 Kovalentne viažúce sa sondy	32
4.2 Nekovalentne viažúce sa fluorescenčné sondy	32
4.3 Farbivá citlivé na napätie	33
4.3.1 Pomalé farbivá.....	33
4.3.2 Rýchle farbivá	34
5 RH421	35
5.1 Reakcie detekované pomocou RH421	36
Materiály a Metódy	38

6 Izolácia Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy	38
6.1 Titrácia SDS	39
6.2 Meranie ATPázovej aktivity – Baginského metóda.....	41
6.2.1 Kalibrácia	41
6.1.2 Meranie aktivity	43
7 Stopped-flow	45
7.1 Spracovanie výsledkov v programe MATLAB	47
Výsledky merania.....	49
8 Izolácia Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy	49
9 Optimalizácia metódy stopped-flow	50
10 Meranie metódou stopped-flow pre rôzne koncentrácie RH421	52
11 Meranie metódou stopped-flow pre rôzne koncentrácie ATP	70
Diskusia.....	88
Záver.....	90
Zoznam použitej literatúry	91

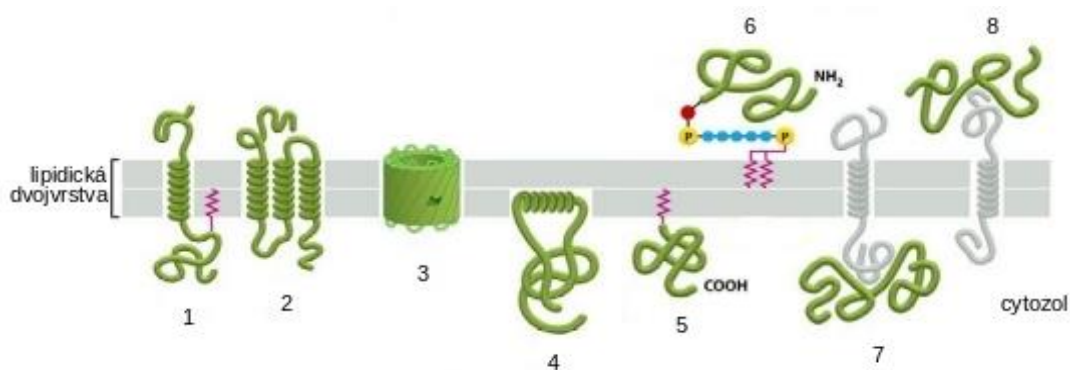
Úvod

Sodno - draselná pumpa (Na^+/K^+ -ATPáza) je membránový proteín, ktorý sa nachádza vo všetkých živočíšnych bunkách. Aktívnym transportom, za pomoci hydrolýzy ATP, transportuje 3 Na^+ ióny von z bunky a 2 K^+ ióny do bunky. Činnosť tejto pumpy je dôležitá pre reguláciu vnútrobunečného pH, objemu vody, osmotického tlaku, sekundárneho transportu a prenosu vzruchu v nervových bunkách (MacKnight a Leaf 1977; Thomas 1972). Sledovaním kinetiky enzýmu je možné stanoviť rýchlosť čiastočných reakcií reakčného cyklu enzýmu. V prípade Na^+/K^+ -ATPázy sa často sleduje takzvaná rýchla a pomalá fáza. U rýchlej fázy sa sleduje fosforylácia enzýmu a jeho následná konformačná zmena $\text{E}_1\text{ATP}(\text{Na}^+)_3 \rightarrow \text{E}_2\text{P}(\text{Na}^+)_3 + \text{ADP}$ s rýchlostnou konštantou v rozmedzí 180 - 200 s^{-1} . Pomalá fáza predstavuje konformačnú zmenu $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$ a až po tom nastáva fosforylácia enzýmu. Tento prechod je charakterizovaný rýchlostnou konštantou v rozmedzí 8 - 30 s^{-1} (Kane a kol. 1997; Lüpfer a kol. 2001). Na sledovanie kinetiky enzýmu je možné využiť rôzne metódy. V tejto práci sa na sledovanie kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy využíva metóda stopped-flow (metóda zastaveného toku). Je to metóda, ktorá zahŕňa rýchle zmiešanie dvoch reakčných roztokov v pozorovacej komore, čím sa spúšťa reakcia. Jedná sa o vhodnú metódu pre sledovanie priebehu rýchlych reakcií. Cieľom práce bola izolácia Na^+/K^+ -ATPázy a optimalizácia meranie jej kinetiky metódou stopped-flow.

Teória

1 Membránový transport

Plazmatická membrána obklopuje bunku, definuje jej hranice a udržiava rozdiely medzi cytozolom a extracelulárnym prostredím. Lipidická membrána slúži ako bariéra, ktorá reguluje prechod látok do bunky a von z bunky, a poskytuje základnú štruktúru biologickým membránam. Malé nepolárne molekuly ako kyslík alebo oxid uhličitý a malé nenabité polárne molekuly ako voda alebo močovina, cez ňu prechádzajú jednoduchou difúziou. Naopak pre všetky ióny a nabité molekuly, bez ohľadu na ich veľkosť, je membrána takmer celkom nepriepustná. Pre ich prenos cez membránu sa využívajú transmembránové proteíny, ktoré zabezpečujú väčšinu typických úloh membrány a poskytujú každej membráne charakteristické funkčné výhody. Z hľadiska štruktúry a väzby s membránou sú veľmi variabilné. Membránové proteíny sú amfifilné, teda majú hydrofóbnu a hydrofilnú oblasť. Spôsoby ako sa môže membránový proteín viazať na membránu sú znázornené na obrázku 1 (Alberts a kol. 2008, str. 629).



Obrázok 1: Rôzne spôsoby asociácie membránových proteínov s lipidickou dvojvrstvou. Väčšina membránových proteínov prechádza cez membránu ako jeden α -hélix (1); viacnásobný α -hélix (2); β -skladaný list (3). Niektoré membránové proteíny sú asociované len s jednou vrstvou lipidickej dvojvrstvy prostredníctvom α -hélixu (4); kovalentnou väzbou (5); väzbou na fosfatidylozitol z extracelulárnej strany bunky (6). Membránové proteíny sú asociované nekovalentnou väzbou na iný proteín včlenený do membrány (7, 8). Spracované podľa: Alberts a kol. 2008, str. 630.

1.1 Membránové proteíny

Najčastejšie zastúpenie majú integrálne membránové proteíny (obrázok 1, príklad 1, 2, 3). Ich hydrofóbná oblasť prechádza cez membránu a interagujú s hydrofóbnymi koncami lipidických molekúl vo vnútri dvojvrstvy, čím sú oddelené od vody. Ich hydrofilné oblasti sú vystavené vode na oboch stranách membrány. Týmto spôsobom vytvárajú kontinuálnu proteínovú cestičku cez membránu, čím môžu prechádzať transportované látky bez priameho kontaktu s hydrofóbnym vnútrom lipidickej dvojvrstvy. Iné typy membránových proteínov sú umiestnené v cytozole a spojené sú s jednou vrstvou lipidickej dvojvrstvy pomocou amfifilného α -hélixu (obrázok 1, príklad 4) alebo sa viažu na jednu vrstvu lipidickej dvojvrstvy, a to pomocou jednej alebo viacerými kovalentnými väzbami (obrázok 1, príklad 5). Ďalší typ asociácie s membránou sú membránové proteíny, ktoré sú umiestnené vo vonkajšom prostredí bunky. Viažu sa na membránu kovalentnou väzbou cez špecifický oligosacharid na fosfatidylinozitol na vonkajšej strane membrány (obrázok 1, príklad 6). Posledným typom sú membránové proteíny, ktoré nie sú včlenené do hydrofóbného vnútra membrány, ale viažu sa na povrch membrány prostredníctvom nekovalentnej väzby (obrázok 1, príklad 7, 8). Touto väzbou sa naviažu na iný proteín včlenený do membrány. Tento typ membránových proteínov sa nazýva periférne membránové proteíny (Alberts a kol. 2008, str. 630).

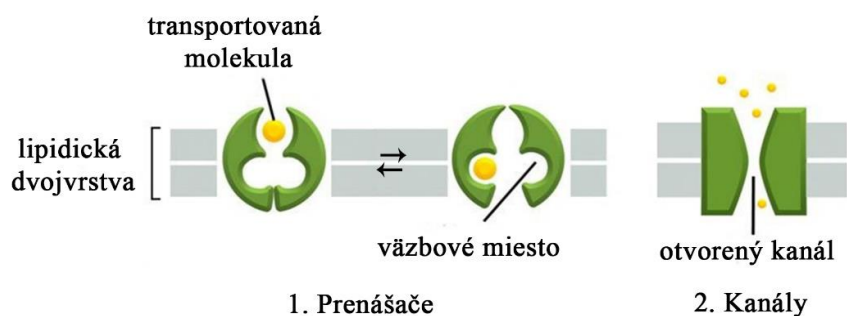
1.2 Typy membránových proteínov

Membránové transportné proteíny sú rozdelené do štyroch tried: iónové kanály, prenášače, aquaporíny a pumpy poháňané hydrolýzou ATP, ktorým sa bližšie venuje nasledujúca kapitola. Kanály vytvárajú v membráne úzke hydrofilné póry, ktorými môžu látky prechádzať cez membránu (obrázok 2, príklad 2). Väčšinou môžu prechádzať len anorganické ióny a preto sa týmto kanálom hovorí iónové kanály. Iónové kanály sa na krátko otvárajú a opäť zatvárajú. Na to má vplyv zmena napätia na membráne, naviazanie ligandu na kanál alebo mechanická sila. Umožňujú transport len látok s vhodným nábojom a veľkosťou (Alberts a kol. 2008, str. 651-654). Medzi

transportovanou látkou a kanálom je veľmi slabá interakcia, a látka je transportovaná s veľmi veľkou efektivitou (s rýchlosťou až 10^8 s^{-1}) (Camerino a kol. 2008).

Prenášače viažu látku do väzbového miesta a sériou konformačných zmien ju transportujú do bunky alebo von z bunky (obrázok 2, príklad 1). Rýchlosť transportu je okolo 10^2 - 10^4 s^{-1} , čo je teda oveľa pomalšie ako transport pomocou iónových kanálov, pretože v tomto prípade dochádza k interakciám medzi transportovanou látkou a proteínom. Každá transportovaná látka sa musí správne naviazať do väzbového miesta proteínu. Takýmto spôsobom sú prenášané malé organické molekuly alebo anorganické ióny. V eukaryotických bunkách transportéry zabezpečujú pohyb iónov, cukrov, aminokyselín a ďalších látok cez membránu organel (Vasiliou a kol. 2009).

Aquaporíny sú jedinečná trieda transportérov. Sú to špecifické štruktúrne póry, ktoré poskytujú cestu pre transport vody cez lipidickú dvojvrstvu do bunky aj von z bunky. Umožňujú transport len molekulám vody a blokujú transport iónov tým, že kanál je príliš úzky pre iné transportované látky. Hnacou silou pre aquaporíny je osmotický gradient (Benga 2009).

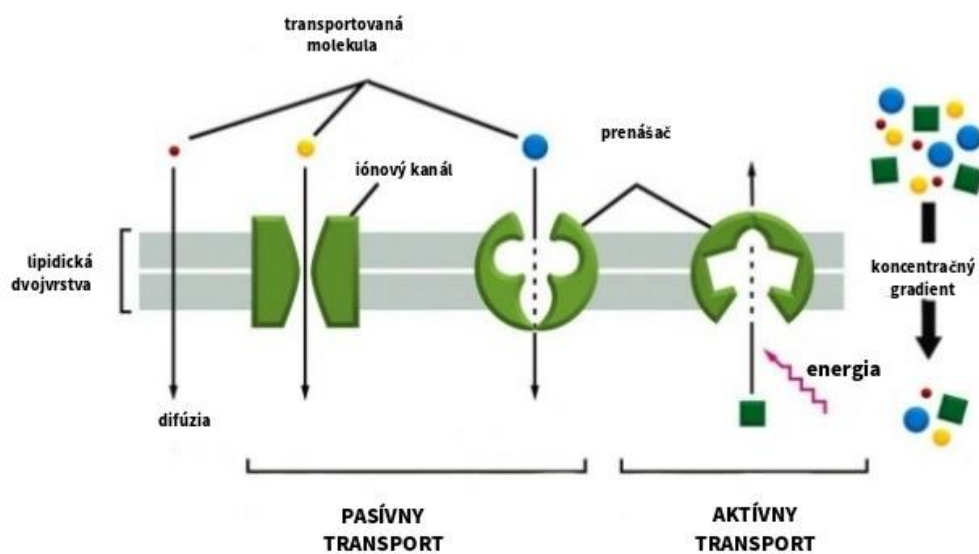


Obrázok 2: Dve triedy membránových transportných proteínov, prenášače a kanály. Pri transporte látky pomocou prenášačov musí nastať interakcia medzi transportovanou látkou a prenášačom. Väzbové miesta pre transportovanú látku sú prístupné z oboch strán lipidickej dvojvrstvy vďaka tomu, že prenášače môžu meniť svoju konformáciu. Kanály naopak tvoria pór cez lipidickú dvojvrstvu, čím môžu prechádzať len špecifické ióny pomocou difúzie.

Spracované podľa: Alberts a kol. 2008, str. 653.

1.3 Aktívny a pasívny transport

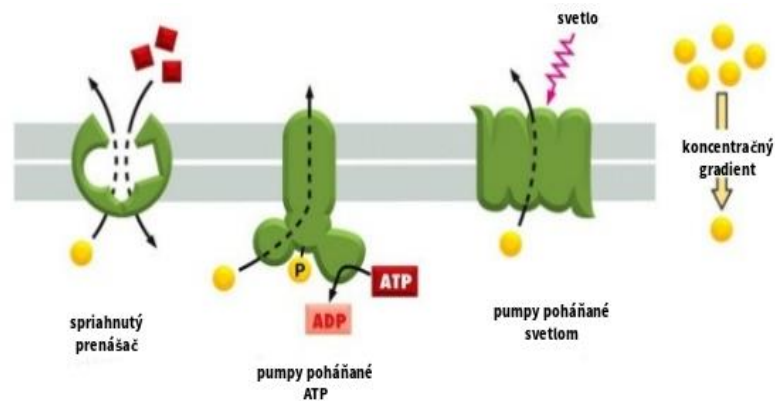
Membránové transportné proteíny môžu vykonávať pasívny alebo aktívny transport. Všetky iónové kanály a niektoré prenášače prenášajú látky pasívnym transportom (obrázok 3). Látka je transportovaná z membránovej strany, kde je vyššia koncentrácia látok na membránovú stranu, kde je ich nižšia koncentrácia. Transport je poháňaný koncentračným gradientom a je vykonaný bez spotreby energie zo strany transportného proteínu. V prípade, že je transportovaná molekula elektricky nabitá vstupuje do jej transportu aj iná sila. U väčšiny membrán medzi ich povrchmi existuje napätie, ktoré vzniká v dôsledku rozdielneho elektrického potenciálu na opačných stranách membrány. Tento potenciál sa nazýva membránový potenciál. Celková sila, ktorá prenáša látku cez membránu sa skladá z dvoch zložiek. Z koncentračného gradientu a membránového potenciálu, ktoré sa spoločne nazývajú gradient elektrochemického potenciálu (Alberts a kol. 2008, str. 651-654).



Obrázok 3: Porovnanie pasívneho a aktívneho transportu. Pasívny transport je v smere elektrochemického gradientu. Transport z miesta s vyššou koncentráciou na miesto s nižšou koncentráciou. Jedná sa o jednoduchú difúziu. V prípade aktívneho transportu je potrebné dodať energiu pre transport proti smeru koncentračného gradientu. Spracované podľa: Alberts a kol. 2008, str. 654.

K presunu látky proti gradientu elektrochemického potenciálu je potrebné dodať energiu. V takom prípade sa myslí aktívny transport (obrázok 3). Energia sa získava troma spôsobmi:

1. Spriahnuté prenášače – využívajú transport jednej látky v smere gradientu na transport druhej látky proti tomuto smeru (obrázok 4);
2. Pumpy poháňané ATP – využívajú energiu z hydrolýzy ATP na transport látky proti gradientu elektrochemického potenciálu (obrázok 4);
3. Pumpy poháňané svetlom – využívajú svetelnú energiu na transport látky proti gradientu elektrochemického potenciálu. Takéto pumpy sa nachádzajú len u halobaktérií (obrázok 4). (Alberts a kol. 2008, str. 651-654)



Obrázok 4: Tri typy spôsobu získavania energie pre aktívny transport. Aktívne transportovaná molekula je zobrazená pomocou žltej farby. Zdroj energie je zobrazený červenou farbou.

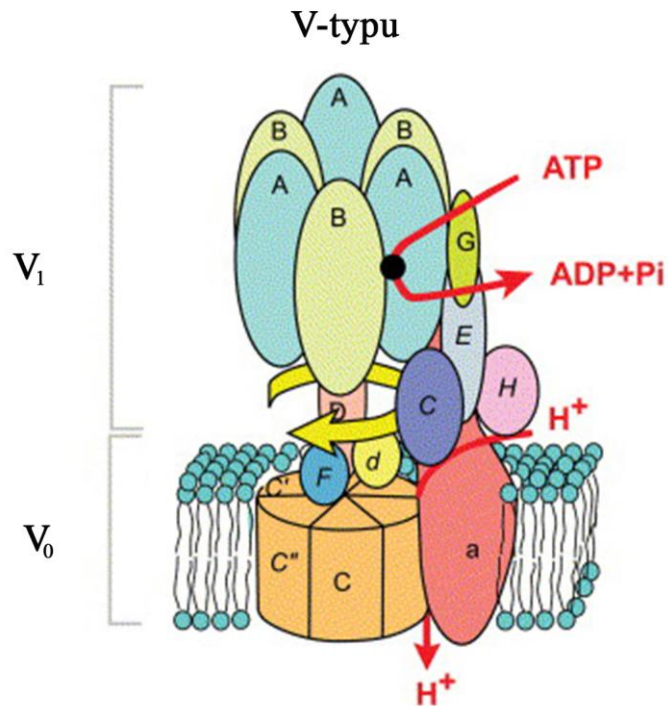
Spracované podľa: Alberts a kol. 2008, str. 656.

2 ATPázy

Pumpy riadené pomocou ATP sa nazývajú ATPázy, kvôli hydrolýze ATP na ADP a P_i . Energiju z hydrolýzy využívajú na transport iónov alebo iných látok cez membránu. Poznáme tri triedy ATPázových púmp:

1. ATPázy P-typu – sú transmembránové proteíny, ktoré sa počas cyklu fosforylujú, s čím súvisí aj ich názov. Je to veľká trieda všadeprítomných proteínov, ktoré pumpujú ióny cez bunečnú membránu alebo cez membránu organel. Tieto iónové pumpy transportujú rozdielne typy kationov ako H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} a Hg^{2+} (Palmgren a Axelsen 1998; Moller a kol. 1996). V bunkách cicavcov je až 30% ATP spotrebovanej ATPázami P-typu (Rolfe a Brown 1997). Po naviazaní a hydrolýze ATP, koncová fosfátová skupina ATP je pripojená k asparagovej kyseline proteínu, ktorá je fosforylovaná (Kaplan 2002). Základný transportný mechanizmus ATPázy P-typu je obvyčajne popísaný cez E_1/E_2 model založený na cyklickej zmene medzi dvoma konformačnými enzýmovými stavmi. Do tejto triedy ATPáz patrí práve Na^+/K^+ -ATPáza (Albers 1967). Tomuto typu ATPáz je venovaná nasledujúca kapitola.

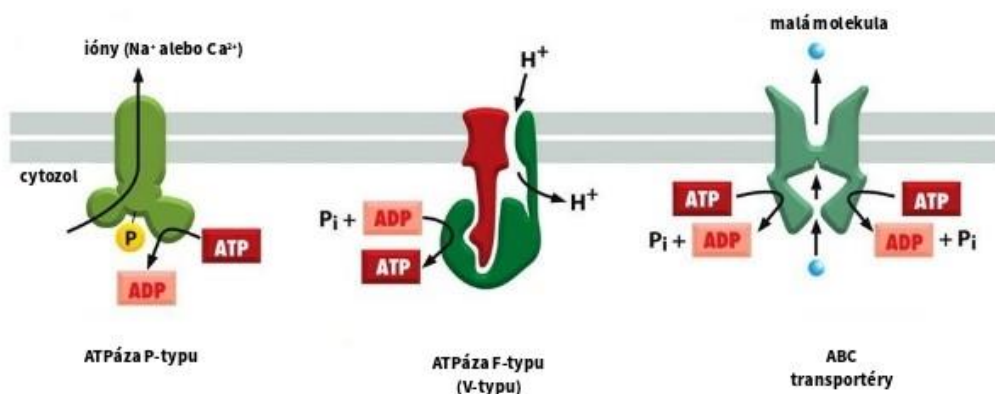
2. ATPázy F-typu a V-typu – sú transmembránové proteíny, ktoré sa často nazývajú aj ATP syntázy. Využívajú H^+ gradient pre syntézu ATP z ADP a P_i . Nachádzajú sa v plazmatickej membráne baktérií, vo vnútornej membráne mitochondrií a v tylakoidnej membráne chloroplastov. Tieto ATPázy majú štruktúrnu a funkčne podobnosť, v princípe je funkcia oboch ATPáz reverzibilná. V eukaryotickej bunke ATPáza F-typu produkuje ATP a ATPáza V-typu ju redukuje (Hirata a kol. 2000). ATPázy V-typu a F-typu sú multipodjednotkové proteíny tvorené až 14 rozdielnymi polypeptidmi, ktoré sú spojené do dvoch kruhových štruktúr. Prvá štruktúra je periférny V_1 alebo F_1 komplex (400 - 600 kDa), ktorý interaguje s ATP, ADP alebo anorganickým fosfátom. Druhá štruktúra je integrovaný membránový V_0 alebo F_0 komplex (150 - 350 kDa), ktorý sprostredkúva transport H^+ alebo Na^+ . V_1 komplex je tvorený ako globulárna hlavička s dvoma podjednotkami A a B, ktoré sa striedajú a tvoria kruh. Centrálna časť, je rotačná stopka tvorená jednou kópiou podjednotky D a F. Posledná časť je periférna stopka tvorená podjednotkami C, E, G a H. Podjednotky A a B sprostredkujú hydrolýzu ATP (Murata a kol. 2005). Štruktúru ATPázy V-typu vidíme na obrázku 5.



Obrázok 5: Usporiadanie podjednotiek ATPázy V-typu. Schématicky je znázornená katalýza a protónový transport. Integrálny membránový komplex V_0 je tvorený najmenej štyrmi rozdielnymi podjednotkami. Periférny V_1 komplex je tvorený ôsmymi rozdielnymi podjednotkami.

Zdroj obrázka: Sun-Wada a kol. 2004, so súhlasom editora časopisu *Biochimica et Biophysica Acta*.

3. ABC transportéry – z anglického ATP binding cassette, sú transmembránové proteíny, ktoré tvoria veľkú, rozmanitú a všadeprítomnú triedu. Cez membránu transportujú rôzne substráty, vrátane lipidov, ťažkých kovov, anorganických kyselín, peptidov, cukrov, aminokyselín a druhotných metabolitov (Higgins 1992; Rea a kol. 1998). ABC proteíny majú charakteristickú štruktúru, ktorá má dve základné štruktúrne prvky. Hydrofóbnú transmembránovú doménu (TMD) tvorenú šiestimi membránovými slučkami α -hélixu a cytoplazmatickú doménu. Táto oblasť sa označuje ako nukleotidová-väzbová doména (nucleotide-binding domain, NBD) (Higgins 1992). Jadro sa skladá zo štyroch domén, dve predstavujú NBD a dve TMD. Zatiaľ, čo NBD viaže a hydrolyzuje ATP, TMD sa zúčastňuje rozpoznania transportovanej látky a jej transportu cez lipidickú membránu (Vierrier a kol. 2008).



Obrázok 6: Porovnanie ATPázových púmp. ATPáza P-typu a F-typu transportujú ióny. ATPázy P-typu na transport spotrebujú jednu molekulu ATP. ATPázy F-typu a V-typu využívajú H^+ gradient pre syntézu ATP z ADP a P_i . ABC transportéry naopak transportujú prevažne malé molekuly a na transport spotrebujú dve molekuly ATP. Spracované podľa: Alberts a kol. 2008, str. 660.

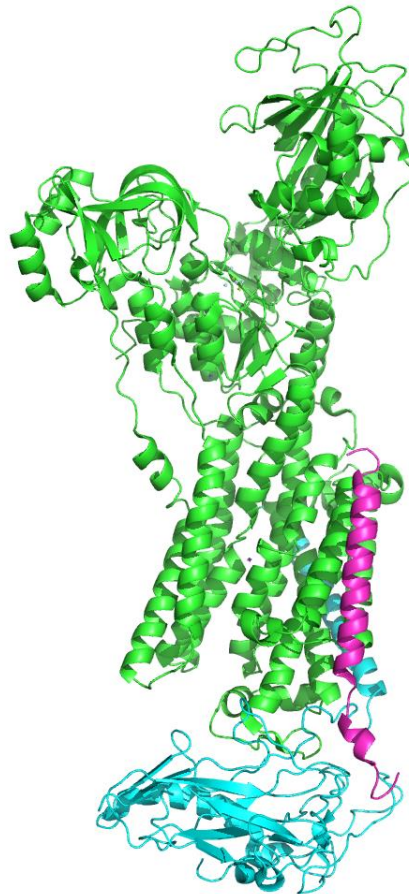
2.1 Sodno – draselná pumpa (Na^+/K^+ -ATPáza)

Na^+/K^+ -ATPáza (obrázok 7) alebo aj sodno – draselná pumpa je membránový proteín nachádzajúci sa vo všetkých živočíšnych bunkách a je nevyhnutná pre život, pretože zabezpečuje viacero dôležitých funkcií bunky. Bola objavená dánskym vedcom J. C. Skou, ktorý ako prvý publikoval článok o transportných ATPázach a skúmal ich transportné vlastnosti v závislosti od rôznych katiónov (Skou 1957). Jedná sa o objav enzýmu v plazmatickej membráne, ktorý sa správa ako pumpa a vymieňa Na^+ a K^+ ióny. V roku 1997 za tento objav získal Nobelovú cenu za chémiu.

Patrí medzi proteíny ATPáz P-typu, ktoré ako zdroj energie pre transport rôznych iónov cez membránu využívajú hydrolýzu ATP (Axelsen a Palmgren 1998). Na^+/K^+ -ATPáza transportuje tri Na^+ ióny z bunky a dva K^+ ióny do bunky. Tým sa vytvára iónový gradient, ktorý je dôležitý pre transport rôznych živín, ako sú glukóza alebo aminokyseliny do bunky (Ullrich 1979), pohyb iónov ako Ca^{2+} alebo H^+ cez membránu (Langer 1982; Aronson 1985), udržiavanie osmotickej rovnováhy a regulácie objemu bunky (MacKnight a Leaf 1977). Aj keď sú transportované tri katióny von z bunky, ale len dva katióny do bunky, je tento nerovnovážny transport iónov cez

membránu veľmi dôležitý pre udržiavanie kľudového membránového potenciálu a pre elektrickú aktivitu svalových a nervových buniek (Thomas 1972). Na^+/K^+ -ATPáza hrá aj dôležitú úlohu pri pohybe tekutín cez epitel v tráviacom trakte (Bland a Boyd 1986).

Ďalší dôležitý ión pre Na^+/K^+ -ATPázu je Mg^{2+} . Tento kation nie je transportovaný počas cyklu, ale je potrebný ako kofaktor pre hydrolyzu ATP. Predpokladalo sa, že na enzýme sa viaže spolu s nukleotidom ako komplex MgATP , avšak experimenty poukázali, že sa Mg^{2+} a ATP sa viažu v samostatnom kroku a väzbové miesto sa nachádza v cytoplazmatickej N doméne (Grycova a kol. 2009). Len v prítomnosti Mg^{2+} je možná fosforylácia špecifického aspartátu v P doméne (Jorgensen a Andersen 1988). Je známe, že v bunke je voľná koncentrácia $\text{Mg}^{2+} \leq 2$ nM. Tento kation má vplyv na pokles afinity enzýmu ku K^+ kationom v E_1 konformačnom stave, ale nemá žiadny efekt na rýchlostnú konštantu konformačnej zmeny $\text{E}_1\text{K} \rightarrow \text{E}_2\text{K}$ (Smirnova a Faller 1993).



Obrázok 7: Štruktúra Na^+/K^+ -ATPázy, zelenou farbou je zobrazená podjednotka α , modrou farbou je zobrazená podjednotka β , ružovou farbou je zobrazená podjednotka γ . PDB kód: 2zXe.

2.1.1 Štruktúra Na⁺/K⁺-ATPázy

Minimálna funkčná jednotka Na⁺/K⁺-ATPázy je heterodimér, tvorený z podjednotiek α a β (Jorgensen a Andersen 1988). V niektorých tkanivách sa vyskytuje aj tretia podjednotka označovaná ako podjednotka γ (Kuster a kol. 2000; Sweadner a Rael 2000). U cicavcov existuje podjednotka α v štyroch izoformách, podjednotka β existuje v troch izoformách (Lingrel a kol. 1990).

2.1.1.1 Podjednotka α

Podjednotka α má hmotnosť okolo 110 kDa a obsahuje väzbové miesta pre naviazanie katiónov a ATP. Je homológna s katalytickými podjednotkami ostatných ATPáz P-typu. Izoformy podjednotky α sa líšia v aminokyselínovej sekvencii, a aj výskytom v jednotlivých tkanivách. α_1 je prítomná vo väčšine tkanív, vrátane obličiek, nervov a v pľúcach. α_2 je prítomná v kostrových svaloch a v srdci, α_3 v mozgu, a α_4 je v semenníkoch (Kaplan 1985). Táto podjednotka je tvorená desiatimi transmembránovými α -hélixami (označovanými ako M1-M10), ktoré tvoria transportnú cestičku pre katióny a troma doménami na cytoplazmatickej strane membrány. Tieto domény sa označujú ako doména N (z anglického „nucleotide-binding“), doména P („phosphorylation“) a doména A („actuator“) (Lingrel a Kuntzweiler 1994; Kaplan 2002). N doména a P doména sú umiestnené medzi veľkým cytoplazmatickým segmentom spájajúcim štvrtý (M4) a piaty (M5) transmembránový hélix. A doména je tvorená malým cytoplazmatickým segmentom spájajúcim druhý (M2) a tretí (M3) transmembránový hélix a cytoplazmatickým N-koncom polypeptidového reťazca (Moller a kol. 1996; Morth a kol. 2007).

N doména je miesto pre väzbu ATP. Rozprestiera sa od miesta fosforylácie Asp369 až po C-koniec 586-DPPR pántovej oblasti. Táto doména je tvorená ôsmymi skrútenými antiparalelnými β -skladanými listami. Miesto väzby ATP sa nachádza v hydrofóbnom vaku a je obklopený 4, 5, 6 a 7 vláknom na jednej strane a N-koncovou časťou hélixu Asp443-Cys467 na druhej strane (Jorgenson 2003).

P doména je počas katalytického cyklu fosforylovaná. Tvorí ju šesť vláknový β -skladaný list, kde medzi 2 a 3 vláknom sa nachádza N doména. Miesto fosforylácie je

motív značený ako 369-DKTGTL, ktorý obsahuje asparagovú kyselinu a práve táto kyselina je fosforylovaná (Walderhaug a kol. 1985; Pedersen a kol. 1996).

A doména sa skladá z N-koncového segmentu (Gly1-Gln88) a slučky medzi M2 a M3 (Lys205-Glu312) a je najmenšou cytoplazmatickou doménou podjednotky α . N-koncový segment je dlhý 33 reziduí. Väzba N-konca na Lys30 a Arg438 umožňuje interakciu A domény s N doménou v konformačnom stave E₂[2K] enzýmu (Jorgensen a Andersen 1988). Napomáha pri zmene konformácie, ktorá je nevyhnutná pre transport katiónov. Väzbové miesta pre katióny sú lokalizované v transmembránovej doméne a týmto väzbovým miestam sú priradené slučky M4, M5, M6 a M8 (Toyoshima a kol. 2000).

2.1.1.2 Podjednotka β

Podjednotka β má hmotnosť okolo 55 kDa a jedenkrát pretína membránu. Dôležitá je pre zabudovanie podjednotky α do plazmatickej membrány, jej správne zloženie a zúčastňuje sa prenosu K⁺ iónov (Kubala 2006; Morth a kol. 2011). Vyskytuje sa v troch izoformách a taktiež je tkanivovo špecifická. β_1 je prítomná vo všetkých tkanivách, β_2 je v kostrových svaloch a srdci, a β_3 je prítomná v semenníkoch a v centrálnom nervovom systéme (Kotyk a Amler 1995).

2.1.1.3 Podjednotka γ

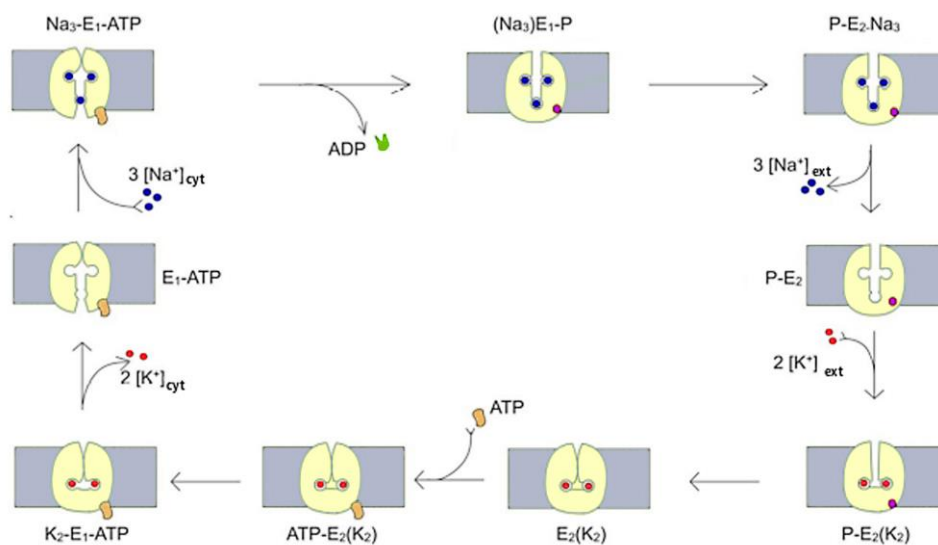
Podjednotka γ je hydrofóbná podjednotka s molekulárnou hmotnosťou okolo 12 kDa a rovnako ako podjednotka β len jedenkrát pretína membránu. Patrí do rodiny malých membránových proteínov, ktorá sa označuje FXYD. Táto rodina sa vyznačuje 35 aminokyselinovou signálnou sekvenčnou doménou, začínajúcou so sekvenciou FXYD a obsahujúcou sedem nemenných a šesť vysoko konzervovaných aminokyselin. Táto rodina má 7 tried, kde práve druhá trieda je FXYD2 (podjednotka γ Na⁺/K⁺-ATPázy) (Geering 2006). Ak je v Na⁺/K⁺-ATPáze prítomná aj FXYD2 (podjednotka γ) mení sa tým afinita enzýmu. Komplex $\alpha_1\beta_1\gamma$ má nižšiu afinitu k Na⁺ a K⁺ iónom ako komplex $\alpha_1\beta_1$ (Arystarkhova a kol. 1999).

2.1.2 Mechanizmus fungovania Na⁺/K⁺-ATPázy

V rámci jedného reakčného cyklu je hydrolyzovaná jedna molekula ATP, čím sa presunú tri Na⁺ ióny z bunky a dva K⁺ ióny do bunky. Tento prenos sa deje proti smeru elektrochemického gradientu, teda jedná sa o aktívny transport. Pre správnu funkciu je potrebná prítomnosť ATP, Mg²⁺ a Na⁺ na cytoplazmatickej strane proteínu a K⁺ na extracelulárnej strane (Glynn 1985; Jorgensen 1992; Läuger 1991). Schéma mechanizmu sa popisuje pomocou Post – Albersovho cyklu. Schéma cyklu je na obrázku 8.

Počas cyklu enzým prechádza dvoma konformačnými zmenami, E₁ a E₂. V stave E₁ vykazuje enzým vysokú afinitu k Na⁺ iónom a k ATP, v stave E₂ vykazuje vysokú afinitu ku K⁺ iónom a nízku afinitu k ATP. Väzbové miesta pre Na⁺ ióny sa nachádzajú v transmembránovej doméne v stave E₁ a sú otvorené do cytoplazmy (Janovská a kol. 2010). Väzbové miesta pre K⁺ sú rovnaké ako väzbové miesta pre Na⁺, avšak v stave E₂ sú väzbové miesta prístupné z extracelulárnej strany.

Prvým krokom cyklu je nadviazanie troch Na⁺ iónov a ATP z intracelulárnej strany. Dochádza k hydrolyze jednej molekuly ATP na ADP a P_i. Enzým sa v konformačnom stave E₁ fosforyluje nadviazaním fosfátovej skupiny, čím mení svoju konformáciu na stav E₂, cez medzi stav (Na₃)E₁-P. V tomto stave sa Na⁺ ióny nachádzajú vo vnútri enzýmu. Konformačný stav E₂ má nízku afinitu k Na⁺ iónom, preto sú uvoľnené do extracelulárneho priestoru. V ďalšom kroku sa naviažu K⁺ ióny, čím sa enzým defosforyluje a prechádza do konformačného stavu E₁ cez medzi stav E₂(K₂). V tomto stave sa K⁺ ióny nachádzajú vo vnútri enzýmu. Dochádza k nadviazaniu ATP, čím sa mení konformácia na stav E₁ a K⁺ sú uvoľnené do vnútorného priestoru. Uvoľnením K⁺ sa enzým vracia do pôvodného stavu a cyklus sa opakuje (Bühler a kol. 1991).



Obrázok 8: Post – Albersová schéma mechanizmu fungovania Na⁺/K⁺-ATPázy. E₁ a E₂ sú konformačné stavy enzýmu s väzbovými miestami v cytoplazme a v extracelulárnom priestore. Cyklus začína v konformačnom stave E₁, kde sa naň naviaže ATP. V konformačnom stave E₁ má enzým vysokú afinitu k Na⁺ iónom, ktoré sa naviažu z cytozolu (Na₃-E₁-ATP). Následne dochádza k hydrolyze ATP a tri Na⁺ ióny sa nachádzajú vo vnútri enzýmu (Na₃E₁-ATP → (Na₃)E₁-P). Zmena konformácie na stav E₂ vedie k uvoľneniu Na⁺ iónov do extracelulárneho priestoru. V konformačnom stave E₂ má enzým vysokú afinitu ku K⁺ iónom, ktoré sa následne naviažu z extracelulárneho priestoru. Naviazanie K⁺ iónov vedie k defosforylácii enzýmu a dva K⁺ ióny sa nachádzajú vo vnútri enzýmu (P-E₂(K₂) → E₂(K₂)). Následným naviazaním jednej molekuly ATP sa mení konformácia na stav E₁, čím sa uvoľnia K⁺ ióny a cyklus sa zopakuje.

Spracované podľa: <http://memprotein.org/projects/bridge-1-conformational-transitions-in-p-class-atpases>.

3 Metódy merania kinetiky Na⁺/K⁺-ATPázy

ATP hydrolyza je vhodný spôsob pre meranie enzýmovej aktivity. Veľa metód sa zameriava na množstvo uvoľneného P_i alebo ADP. Pre meranie enzymatickej aktivity si predstavíme najčastejšie používané metódy.

3.1 End point metódy

Jedná sa o metódy, v ktorých sa spustí reakcia a nechá sa vyvíjať. Po určitom presne stanovenom inkubačnom čase sa reakcia zastaví pomocou špeciálneho činidla a sleduje sa výťažok reakcie.

3.1.1 Kolorimetrické metódy

Tieto metódy sa zameriavajú na množstvo uvoľneného anorganického fosfátu (P_i) ako konečný produkt hydrolyzy ATP s využitím kolorimetrických činidiel. Je to vhodná metóda pre homogenáty, membránové frakcie alebo purifikované enzýmy. Aby bol enzým aktívny musí mať prístup pre ATP, Mg²⁺ a Na⁺ z cytoplazmatickej strany, a K⁺ z extracelulárnej strany. Medzi kolorimetrické metódy patria napríklad: žltá metóda (yellow method), Fiske - Subbarowa metóda a SDS metóda, ktoré budú ďalej predstavené. Prvé dve metódy sa líšia len rozdielnym spôsobom v kroku farbenia reakcie. Posledná metóda využíva modifikáciu krokov pri príprave vzorky a to tak, aby daná vzorka mala vysokú aktivitu.

Pre všetky tieto metódy sú rovnaké základné kroky:

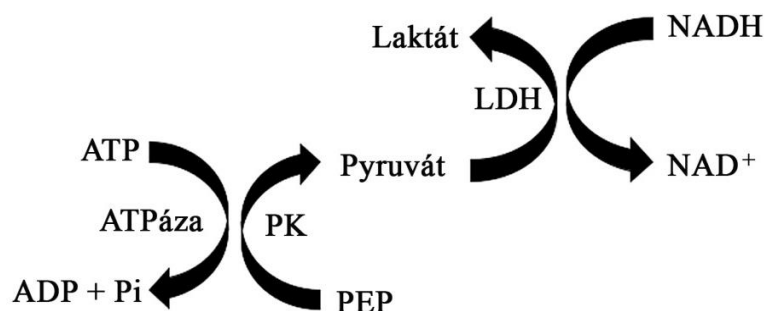
- hydrolyza ATP → ADP + P_i,
- zastavenie reakcie pridaním kyseliny,
- prídanie molybdátu,
- P_i + molybdát → farebná reakcia (modrá alebo žltá, v závislosti od oxidačného kroku) (Sweadner 2016, str. 90).

Fiske - Subbarowa metóda bola odvodená a upravená z ATPázovej assaye v roku 1950. Je založená na redukcii fosfomolybdátu, pričom poskytuje modré zafarbenie (Esmann 1988). Žltá metóda sa príliš často nepoužíva, pretože krok farbenia je príliš zložitý, avšak u lipozómov je to jediná použiteľná metóda. Odlišnosť tejto metódy od metódy Fiske - Subbarowa je vynechanie redukujúceho kroku. Bez tohto kroku je zafarbenie roztoku bledo žlté. Pri využití ^{32}P -ATP v spojitosti s touto metódou, je možné zvýšiť citlivosť metódy pre preparáty s nízkou aktivitou alebo pri malom množstve vzorky. Metóda SDS sa líši od predchádzajúcich dvoch, len spôsobom prípravy vzorky. SDS je relatívne silný detergent, ktorý modifikuje homogenát, napríklad takým spôsobom, že redukuje aktivitu iných ATP-hydrolyzujúcich enzýmov, ale Na^+/K^+ -ATPáza je rezistentná voči tomuto detergentu. Výsledkom tejto metódy je taktiež modré zafarbenie roztoku.

Pri meraní môže byť prítomná aj ATPázová aktivita iného enzýmu, ako toho, ktorý meriame. Preto je potrebné odčítať pozadie takejto ATPázovej aktivity od celkovej ATP hydrolyzy. Čo dosiahneme pomocou merania aktivity v prítomnosti a pri absencii inhibítora. Pre Na^+/K^+ -ATPázu je inhibítorom ouabain, stropantidin a digoxin. Inhibítor rovnako ako K^+ musí byť prístupný z extracelulárnej strany enzýmu. Hlavným nedostatkom pri meraní ATPázovej aktivity kolorimetrickými metódami je výskyt veľkého pozadia signálu, ktorý je spôsobený nešpecificitou assaye alebo neenzymatickou hydrolyzou ATP (Fiske a Subbarow 1925).

3.1.2 Metóda využívajúca rádioaktívne značenie ATP

V tejto metóde sa využíva ^{32}P -ATP, ktorá ak sa použije pri hydrolyze sprostredkovanej ATPázou P-typu, je hydrolyzovaná na ADP a $^{32}\text{P}_i$ (radioaktívne značený anorganický fosfát). Predchádzajúce techniky sú limitované rozsahom koncentrácií ATP, ktoré môžu byť použité pri meraní. Táto metóda umožňuje meranie v širokom rozsahu koncentrácií ATP (0,1 μM - 10 mM). Keď sa zastaví ATPázová reakcia, nadbytočná ^{32}P -ATP môže byť jednoducho oddelená od $^{32}\text{P}_i$ centrifugáciou (Swarts a Koendrink 2016, str. 121-122).



Obrázok 9: Metóda coupled enzyme je založená na reakcií, v ktorej je spojená hydrolýza ATP s oxidáciou NADH. V každom cykle sa premení fosfoenolpyruvátu (PEP) na pyruvát, za prítomnosti pyruvát kinázy (PK). Počas toho je ATP hydrolyzovaná na ADP a Pi. Pyruvát je v následnej reakcií premenený na laktát, za prítomnosti enzýmu L-laktát dehydrogenázy (LDH) a dochádza k oxidácií jednej molekuly NADH na NAD⁺. Sleduje sa pokles absorbancie NADH pri 340 nm. Spracované podľa: Sehgal a kol. 2016, str. 106.

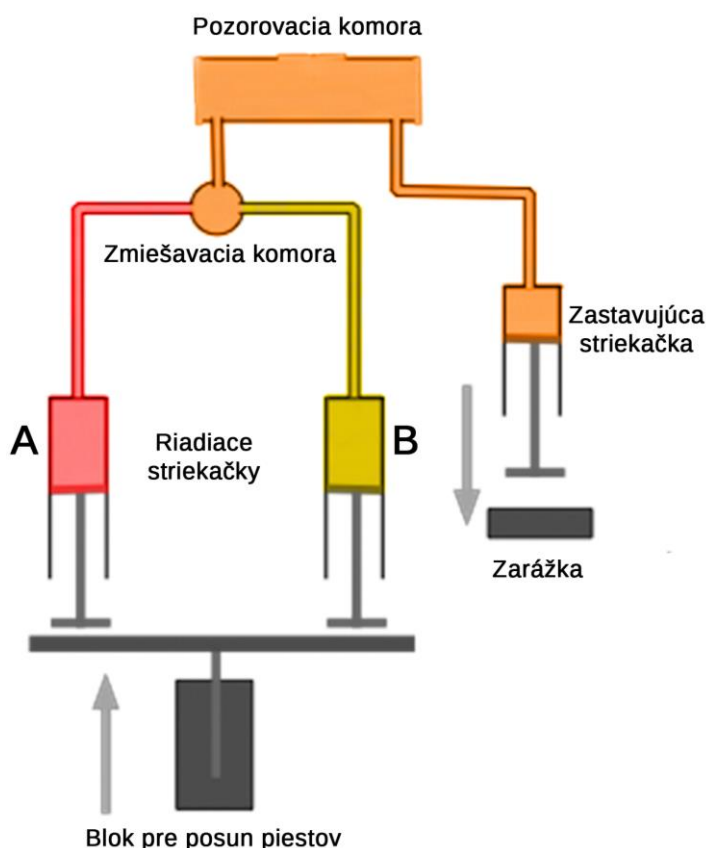
3.3 Sledovanie kinetiky parciálnych reakcií katalyckého cyklu

Táto metóda umožňuje sledovanie kinetiky čiastočných reakcií katalyckého cyklu. Zameriava sa na spustenie a meranie reakcie určitej časti cyklu, ktorej kinetika je sledovaná.

3.3.1 Metóda stopped-flow

Stopped-flow je pravdepodobne najjednoduchšia technika zo všetkých techník využívaných pre meranie rýchlych reakcií. Nie je to špecifická metóda pre pumpy, kanály alebo prenášače, ale v kombinácií s fluorescenčnou sondou citlivou na napätie poskytuje hodnotné informácie o ich kinetike a mechanizme. Metóda zahŕňa rýchle zmiešanie dvoch reakčných roztokov, každý súčasne dopravených do pozorovacej komory potom, čo je tok reaktantov zastavený. Základné komponenty techniky, ktoré sa využívajú aj dnes sú dve riadiace striekačky poháňané manuálne alebo automaticky cez

pneumatický prístroj, čo umožňuje dvom reakčným tokom byť rýchlo vpraveným do zmiešavacej komory. Potom je tok rýchlo zastavený pomocou tretej striekačky, takzvanej zastavujúcej striekačky (obrázok 10) (Gomez-Hens a Perez-Bendito 1990).

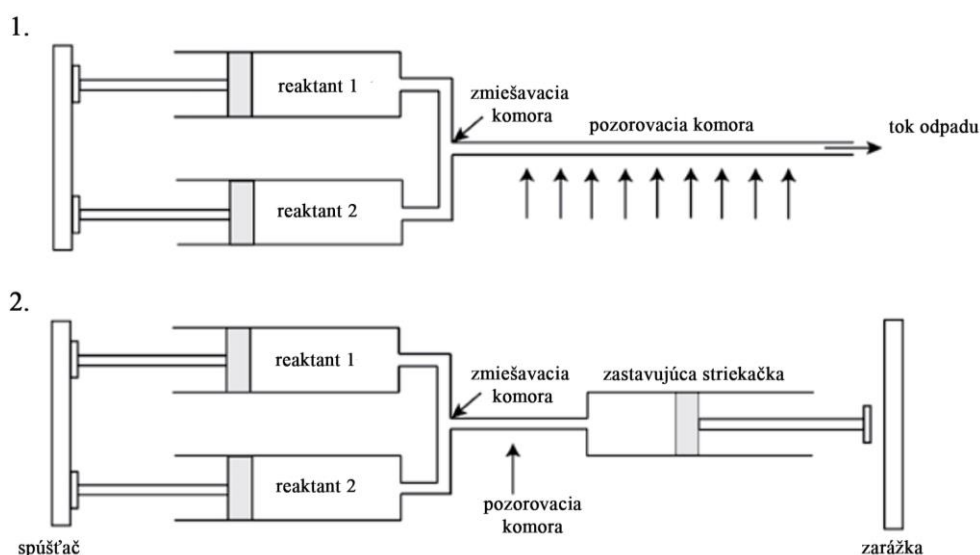


Obrázok 10: Schematické zobrazenie metódy stopped-flow. V riadiacich striekačkách sa nachádzajú rozdielne roztoky. V tomto prípade červenou farbou je zobrazený roztok Na^+/K^+ -ATPázy s farbivom RH421 a žltou farbou je znázornený roztok ATP. Oranžová farba zobrazuje zmiešané roztoky. Šípky predstavujú pohyb roztokov prístrojom. Posunom bloku s piestom sú roztoky rýchlo vpravené do zmiešavacej komory a odtiaľ už zmiešané putujú do pozorovacej komory, kde je možné sledovať fluorescenciu alebo absorbanciu. Zmiešané roztoky sa po prechode pozorovacou komorou dopravujú do zastavujúcej striekačky. Tým sa tok zastaví. Objem roztoku v zastavujúcej striekačke je obmedzený v závislosti od polohy zárážky. Piest zastavujúcej striekačky je posunutý tokom roztokov.

Spracované podľa:

[https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/General_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Chem1_\(Lower\)/17%3A_Chemical_Kinetics_and_Dynamics/17.7%3A_Experimental_methods_of_chemical_kinetics](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/General_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Chem1_(Lower)/17%3A_Chemical_Kinetics_and_Dynamics/17.7%3A_Experimental_methods_of_chemical_kinetics)

Historicky sa stopped-flow technika vyvinula z continuous-flow (kontinuálny tok), čo je technika, ktorá zahŕňa zmiešanie dvoch reaktantov, ktoré následne prúdia s konštantnou rýchlosťou dlhou trubicou (obrázok 11). Táto metóda bola prvýkrát vyvinutá v roku 1897 Rutherfordom, ktorý spolupracoval s J. J. Thompsonom (Rutherford 1897). V roku 1940 Britton Chance navrhol a rozvinul stopped-flow techniku (Chance 1940). V tejto technike je tok náhle zastavený a priebeh reakcie je monitorovaný v pozorovacej komore. Napriek tomu, že časové rozlíšenie nie je také dobré ako pri metóde continuous-flow, metóda stopped-flow značne redukuje spotrebu chemikálií. Kľúčová výhoda stopped-flow techniky pred inými technikami sledujúcimi rýchle reakcie, je rýchle získanie dát. V základnom detekčnom móde môžeme sledovať absorbanciu alebo fluorescenciu.



Obrázok 11: Porovnanie metódy stopped-flow a continuous-flow. V metóde continuous-flow nie je zastavený tok roztokov a zmiešané roztoky naďalej prúdia dlhou trubicou do odpadovej nádoby. Oproti metóde stopped-flow je tu značná spotreba chemikálií.

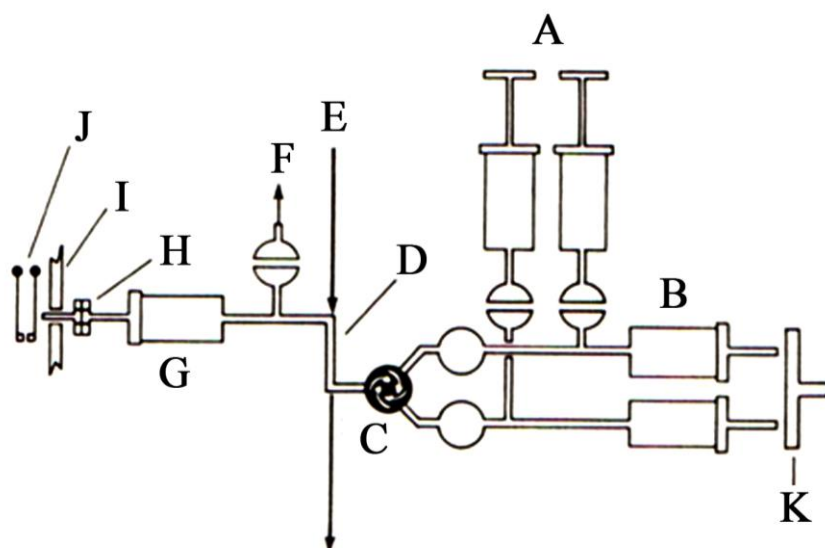
Spracované podľa: Eccleston a kol. 2001.

Dôležitým parametrom metódy stopped-flow je mŕtvy čas. Ako je vidieť na obrázku 10 tak bod, v ktorom dochádza k zmiešaniu roztokov nie je bod, v ktorom je reakcia pozorovaná. Pre získanie spoľahlivých výsledkov je dôležité, aby boli reaktanty zmiešané ešte predtým ako vstúpia do pozorovacej komory. Preto pozorovacia komora musí byť umiestnená v určitej vzdialenosti od miesta zmiešania roztokov. To znamená, že roztok, ktorého reakciu sledujeme, už krátky čas reaguje. Termín mŕtvy čas sa používa, pretože v tomto iniciálnom kroku reakcie nie sú zaznamenané žiadne dáta.

Rozsah mŕtveho času závisí od rýchlosti toku a zvyčajne je to 1-2 ms. Pre meranie je výhodnejšie ak je tento čas kratší, avšak ak je príliš krátky môže sa stať, že roztoky nie sú dostatočne dobre zmiešané, keď vstupujú do pozorovacej komory. Hodnota mŕtveho času je teda kompromisom. Pretože tento čas musí byť dostatočne dlhý, aby došlo k zmiešaniu látok skôr ako vstúpia do pozorovacej komory, ale zároveň dosť krátky, aby sa nestratilo príliš veľa informácií zo sledovanej reakcie (Clarke a Khalid 2015, str. 179-181).

3.3.1.1 Stopped-flow aparátúra

Roztoky sú umiestnené do 2 ml riadiacich striekačiek (B na obrázku 12), následne sú piestom vtlačené do prístroja (K na obrázku 12), na to slúži hydraulická jednotka alebo môžu byť vtlačené manuálne (piest posunutý ručne). Reaktanty prechádzajú cez zmiešavaciu komoru (C na obrázku 12) a následne tok prechádza cez pozorovaciu komoru (D na obrázku 12) a odtiaľ do 2 ml zastavujúcej striekačky (G na obrázku 12), kde tok posunie piest striekačky, ktorý sa zastaví o zádržku, čím sa zastaví tok prístrojom (I na obrázku 12) (Gibson a Milne 1963).



Obrázok 12: Náčrt stopped-flow aparátúry. A, striekačky so zásobným roztokom; B, riadiace striekačky; C, zmiešavacia komora; D, pozorovacia komora; E, prechádzajúci lúč svetla; F, smer prúdenia odpadu; G, zastavujúca striekačka; H, nastaviteľný poloha zádržky, ktorá určuje objem zastavujúcej striekačky; I, stop/zarážka piestu; J, spúšťač

(trigger) riadený zarážkou zastavujúcej striekačky; K, páka pre manuálne alebo pneumatické vstriednutie roztokov do zmiešavacej komory.

Spracované podľa: Mottola 1988.

4 Fluorescenčné farbivá

Pri meraniach konformačných zmien ATPázových enzýmov sú pozorované rozdielne kinetické správania v závislosti na prítomnosti alebo absencii ATP. Tieto zmeny závisia aj od sondy, ktorá sa používa. Sondy môžeme deliť z hľadiska väzby na enzým, teda na kovalentne a nekovalentne viažuce sa sondy.

4.1 Kovalentne viažuce sa sondy

Existuje veľké množstvo fluorescenčných molekúl, ktoré sa môžu kovalentne viazať na proteíny. Najčastejšie používaná fluorescenčná značka je fluoresceín. Pre pripojenie tejto sondy na aminokyselinové rezíduum proteínu je potrebné spájacie činidlo. Najčastejšie využívané spájacie činidlá sú jódoacetamid, maleimid a izotiokyanát. Jódoacetamid a maleimid atakujú tiolovú skupinu a odtiaľ majú cieľ cysteínové reziduá proteínu. Izotiokyanát atakuje amíny a jeho cieľom sú aminokyselinové reziduá ako lyzín a arginín. Pre značenie Na^+/K^+ -ATPázy sa využíva FITC (fluoresceín-5'-izotiokyanát), ktorý značí lyzín-501 na proteíne. Najväčšou nevýhodou pri sledovaní kinetiky za pomoci FITC je, že sonda blokuje väzbu ATP na enzýme, takže inhibuje hydrolýzu ATP (Farley a kol. 1984; Scheiner-Bobis a kol. 1993). Ak označíme Na^+/K^+ -ATPázu fluoresceínom, ale ako spájacie činidlo sa použije 5-IAF (jódoacetamid), je možné sledovať značnú zmenu fluorescencie, keď Na^+/K^+ -ATPáza interaguje s Na^+ , K^+ a ATP. V porovnaní s FITC nie je ovplyvnená ATPázová aktivita (Kapakos a Steinberg 1982). Ďalšou kovalentnou fluorescenčnou sondou pre štúdium Na^+/K^+ -ATPázy je BIPM (N-[p-benzimidazolyl]fenylmaleimid). Podobne ako 5-IAF, ani BIPM nemá žiaden vplyv na Na^+/K^+ -ATPázovú aktivitu a poskytuje dobré výsledky pri sledovaní zmeny fluorescencie (Nagai a kol. 1986).

4.2 Nekovalentne viažuce sa fluorescenčné sondy

Tieto sondy chemicky nemodifikujú proteín počas merania, ale modifikujú jeho funkciu. Preto je pri meraní dôležité vedieť, či daná sonda náhodou nebráni v získavaní

potrebných dát. Nekovalentne viažuca sa sonda, ktorá sa často používa pre techniku stopped-flow pri meraní reakcií Na^+/K^+ -ATPázy je eozín Y. Eozín sa viaže s relatívne vysokou afinitou na väzbové miesto pre ATP. Blokovanie ATP väzbovej strany eozínom znemožňuje jeho použitie v kinetických štúdiách zahŕňajúcich ATP hydrolyzu. Preto sa eozín používa v stopped-flow len pre štúdium zmeny rýchlosti medzi konformačnými stavmi E_1 a E_2 , kedy sa sleduje väzba Na^+ a K^+ iónov na enzým, ktorá sa v prítomnosti eozínu prejaví ako zmena fluorescencie (Skou a Esmann 1981 a 1983).

4.3 Farbivá citlivé na napätie

Načastejšie používané nekovalentne viažuce sa fluorescenčné farbivá pre štúdium kinetiky enzýmov sú farbivá citlivé na napätie. Pri transporte iónov cez membránu sa vytvára tok, ktorý generuje tvorbu transmembránového potenciálu na opačných stranách membrány. Konformačná zmena, ktorej proteíny podliehajú počas transportu iónov môže taktiež spôsobiť lokálnu zmenu potenciálu na jednej strane membrány. Tieto farbivá dávajú odpoveď na zmenu potenciálu a môžu nepriamo reagovať na aktivitu púmp, kanálov alebo transportérov. Nemusia sa priamo viazať na membránový proteín, aby boli schopné sledovať jeho aktivitu, avšak nie je vylúčené, že dochádza k väzbe medzi proteínom a farbivom. Farbivá citlivé na napätie sa delia na dve triedy: rýchle a pomalé farbivá, na základe ich časovej odozvy na zmeny transmembránového potenciálu. V prípade rýchlych farbív je časová odozva kratšia ako niekoľko milisekúnd, u pomalých farbív je časová odpoveď dlhšia ako niekoľko milisekúnd. Čas odozvy farbiva určuje aj druh informácie, ktoré sú získané z mechanizmu púmp, kanálov alebo transportérov (Clarke a Khalid 2015, str. 184 - 190).

4.3.1 Pomalé farbivá

Do tejto skupiny farbív patria tri triedy pomalých farbív: karbocyaniny, oxonoly a rodaminové deriváty. Tieto farbivá sú kationové alebo aniónové fluorochromy s delokalizovaným nábojom cez celú fluorochromovú štruktúru. Táto delokalizácia umožňuje ich vysokú priepustnosť cez membránu (Waggoner 1979; McLaughlin 1977).

Pomalé farbivá prechádzajú cez membránu v rozsahu sekúnd až minút. Ich priepustnosť sa mení v závislosti od ich štruktúry, napríklad farbivá s dlhším reťazcom prechádzajú rýchlejšie cez membránu vďaka väčšej priepustnosti a tým poskytujú rýchlejšiu odpoveď (Sims a kol. 1974; Waggoner a kol. 1975).

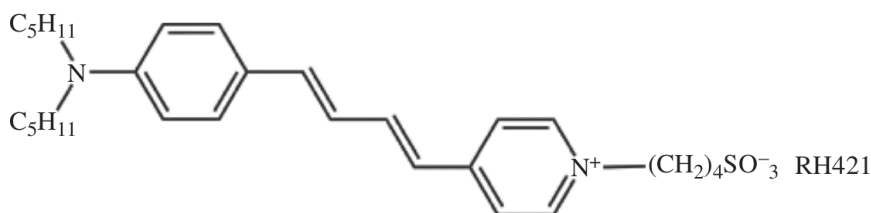
Na zmenu transmembránového potenciálu farbivá odpovedajú pohybom cez membránu. Napríklad, ak sa cytoplazma stane viac pozitívna vzhľadom k extracelulárnej tekutine, aniónové farbivá sa nahromadia v cytoplazme. Rovnako, ak sa cytoplazma stane viac negatívna oproti extracelulárnej tekutine, kationové farbivá sa nahromadia v cytoplazme. Vo väčšine prípadoch je celkový vnútorný objem suspenzií v bunke oveľa menší ako celkový objem extracelulárnej tekutiny. Takže nahromadením farbiva v cytoplazme sa očakáva nárast väzby farbiva na membránu. Ak je fluorescencia farbiva viažuceho sa na membránu iná ako vo vodnom prostredí, odpoveď farbiva na zmenu transmembránového potenciálu bude tiež pozorovaná ako fluorescenčná zmena. Ich dlhšia časová odozva je dôsledok ich mechanizmu. Veľa čiastočných reakcií v mechanizme púmp, kanálov alebo transportérov je oveľa rýchlejšia ako sú schopné zaznamenať tieto farbivá, preto je ich aplikácia v kinetických štúdiách limitovaná (Clarke a Khalid 2015, str. 84 - 190).

4.3.2 Rýchle farbivá

Rýchle farbivá reagujú na zmenu vnútromembránovej intenzity elektrického poľa cez zmenu orientácie farbiva molekuly vo vnútri membrány. Amplitúda ich fluorescenčnej odpovede je celkovo menšia ako u pomalých farbív, ale pre kinetické merania sú oveľa vhodnejšie vďaka ich rýchlemu času odozvy. Pre sledovanie kinetiky iónových púmp sa najčastejšie používa farbivo RH421. Princíp funkcie týchto farbív bude vysvetlený pomocou tohto farbiva v nasledujúcej kapitole.

5 RH421

Styrylpyrimidiové farbivo RH421 (N-(4-sulfobutyl)-4-(4-(p-dipentylaminofenyl)-butadienyl)-pyrimidiová vnútorná soľ) (obrázok 13) je často využívané v laboratóriách pre sledovanie charakteristickej väzby iónov a ich prenos cez membránu (Waggoner 1979). Tieto farbivá majú delokalizovaný pozitívny náboj v pyridiniovom komplexe a lokalizovaný negatívny náboj v sulfátovej skupine na konci molekuly (Clarke a kol. 1995). Vďaka amfifilnej štruktúre sa RH farbivá môžu zabudovať do lipidickej dvojvrstvy. Sulfátová skupina čelí vodnému prostrediu a zvyšok molekuly je ponorený do nepolárnej časti membrány, čo zaisťuje, že dlhá os molekuly farbiva leží kolmo k membránovému povrchu (Loew a Simpson 1981; Loew a kol. 1979).



Obrázok 13: Styrylpyrimidiové farbivo RH421.

Zdroj obrázka: Clarke 1997, so súhlasom editora časopisu *Biochimica et Biophysica Acta*.

Farbivo reaguje na zmeny membránového potenciálu cez elektrochromický mechanizmus. Podstata tohto mechanizmu sa prejavuje zmenou rozdelenia elektrónov po absorpcii fotónu. Molekula bude mať rozdielny dipólový moment v základnom a excitovanom stave. Ak má molekula fixovanú polohu v membráne, transmembránové elektrické pole bude mať rozdielny stupeň stabilizácie alebo destabilizácie v základnom a excitovanom stave, čo sa prejaví v posune absorpčného spektra (Waggoner a Grinvald 1977; Low a kol. 1978; Liptay 1969).

Farbivo RH421 reaguje na zmenu elektrického napätia a je schopné detekovať pohyb náboja spojeného s väzbou katiónov a disociáciou na extracelulárnej

a cytoplazmatickej strane proteínu. Poskytuje špecifickú odpoveď pri premiestnení tretieho Na^+ iónu (Domaszewicz a Apell 1999).

Interakcia farbiva s membránovými proteínmi môže prispievať k spektrálnej zmene. Farbivo nie je indikátor membránového potenciálu, ale skôr indikátor proteínovej konformačnej zmeny (Clarke a kol. 1995).

Dôležitý parameter pri kinetických meraniach je koncentrácia farbiva. V prípade RH421 mikromolárna koncentrácia inhibuje aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy (Frank a kol. 1996). Mikromolárna koncentrácia nemá vplyv na fosforyláciu Na^+/K^+ -ATPázy, ale inhibuje reakcie až po fosforylácií, teda pravdepodobne prechod medzi E_1P na E_2P konformačným stavom enzýmu, ktorý zahŕňa uvoľnenie Na^+ katiónov do extracelulárneho priestoru. Mikromolárna koncentrácia môže viesť k tomu, že farbivo priamo interaguje s väzbovým miestom pre ATP, rovnako ako v prípade eozínu (Kane a kol. 1997).

5.1 Reakcie detekované pomocou RH421

Najčastejšie sa toto farbivo využíva pre reakcie s Na^+/K^+ -ATPázou. Existujú tri spôsoby, v ktorých sa dá použiť stopped-flow pre zisťovanie rýchlostnej konštanty reakčného kroku cyklu (Clarke a Khalid 2015, str. 200 - 204):

- zmiešanie Na^+/K^+ -ATPázy s ATP v prítomnosti Na^+ a Mg^{2+} , ale v absencii K^+ . Nastáva nasledujúca reakcia: $\text{E}_1(\text{Na}^+)_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{E}_1\text{P}(\text{Na}^+)_3 + \text{ADP}$, priamo nasledovaná reakciou $\text{E}_1\text{P}(\text{Na}^+)_3 \rightarrow \text{E}_2\text{P} + 3\text{Na}^+$. Fluorescencia RH421 narastá.
- zmiešanie Na^+/K^+ -ATPázy s Na^+ a s ATP alebo bez ATP, ale bez prítomnosti Mg^{2+} a K^+ . Nastáva nasledujúca reakcia: $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1(\text{Na}^+)_3$ alebo $\text{E}_2\text{ATP} \rightarrow \text{E}_1(\text{Na}^+)_3\text{ATP}$. Fluorescencia RH421 poklesne.
- zmiešanie Na^+/K^+ -ATPázy s Na^+ , Mg^{2+} , ATP a K^+ . Nastáva nasledujúca reakcia: $\text{E}_2\text{P} + 2\text{K}^+ \rightarrow \text{E}_2\text{P}(\text{K}^+)_2$ nasledovaná ďalšou reakciou $\text{E}_2\text{P}(\text{K}^+)_2 \rightarrow \text{E}_2(\text{K}^+)_2 + \text{P}_i$. Fluorescencia RH421 poklesne.

V každom z týchto rozdielnych experimentov, Na^+/K^+ -ATPáza obsahujúca membránové fragmenty musí byť inkubovaná s RH421, ktorá je pridaná z etanolového zásobného roztoku, pretože včlenenie farbiva do membránových fragmentov je relatívne pomalý proces, ktorý trvá desiatky sekúnd. Následne je Na^+/K^+ -ATPáza

obsahujúca membránové fragmenty nekovalentne značené s RH421 umiestnená do jednej striekačky a substrát, s ktorým sa má enzým zmiešať je pridaný do druhej striekačky.

Materiály a Metódy

6 Izolácia Na⁺/K⁺-ATPázy

Purifikácia bola spracovaná s úpravami podľa Fedosova 2016. Všetky roztoky boli pripravené s použitím deionizovanej vody. Všetky roztoky, nástroje a prístroje boli vopred schladené. Izolácia prebiehala v chladenej miestnosti s teplotou 4 °C.

Materiál:

- Čerstvé prasacie obličky (udržiavané v chlade)
- Homogenizátor Potterovho typu
- Skalpel a chirurgické kliešte
- Pufer 1: 30 mM L-histidin (Roth), 250 mM sacharóza (Lachner), pH 7,3; celkový objem pufru 1 l
- Pufer 2: 25 mM imidazol (Roth), 250 mM sacharóza (Lachner), 1mM EDTA (Fluka), pH 7,4; celkový objem pufru 6 l
- Pufer 3: 20 mM L-histidin (Roth), 250 mM sacharóza (Lachner), 0,9 mM EDTA (Fluka), pH 7,0; celkový objem pufru 6 l
- Ľadové kocky pripravené z pufru 2

Metódy:

1. Obličky pozdĺžne nakrájame na tenké rezy (0,5 – 1 cm).
2. Pomocou chirurgických klieští alebo skalpela vyrežeme tmavé červené tkanivo, ktoré uchováваме na ľade v pufré 1 v pomere 1:1 (tkanivo:pufer 1; w:v).
3. Tkanivo nahrubo homogenizujeme skalpelom a odstránime prebytočný tuk.
4. Opatrne odlejeme prebytočný pufer 1. Tkanivo zmiešame s ľadovými kockami pufru 2 v pomere 1:3 (tkanivo:pufer 2; w:w).
5. Zmes dáme do vychladeného mixéra a rozmixujeme na homogénnu zmes, ktorú následne prelejeme do vychladeného homogenizátora Potterovho typu a niekoľkokrát prejdeme piestom na dno sklenenej nádoby homogenizátora.

6. Homogenát uchováame na ľade a následne centrifugujeme v 50 ml falkonkách s parametrami: 3700 g, 20 min, 4°C.
7. Supernatant (S1) uchováame na ľade. Pelet (P1) rozsuspendujeme v pufre 2 a prelejme ho do kadičky uchovávanej na ľade.
8. Rozsuspendovaný pelet (P1) s pufrom 1 a 2 opäť homogenizujeme pomocou Potterovho homogenizátora ako v bode 5.
9. Dvakrát zhomogenizované tkanivo opäť centrifugujeme ako v bode 6.
10. Pelet (P2) odstránime a supernatant (S2) zmiešame so supernatantom (S1). Zmiešané supernatanty (S1+S2) následne centrifugujeme s týmito parametrami: 7400 g, 20 min, 4°C.
11. Pelet (P3) odstránime a supernatant (S3) ďalej centrifugujeme. Pre získanie mikrozomálnej frakcie nasleduje vysokorýchlostná centrifugácia s týmito parametrami: 38 000 g, 40 min, 4°C.
12. Supernatant (S4) odstránime a pelet (P4) rozsuspendujeme vo vychladenom pufre 2, ktorý následne homogenizujeme pomocou ručného skleneného homogenizátora. Takýto roztok je mikrozomálna frakcia, ktorá môže byť dlhodobo (až niekoľko mesiacov) uskladnená pri teplote -80°C.
13. Koncentráciu určíme pomocou metódy Bradfordovej (Bradford 1976).
14. Pre ďalšiu analýzu si pripravíme vzorky 3 x 1,5 ml. Zvyšok roztoku rozdelíme po 10 ml do vychladených 15 ml falkoniek a zamrazíme sa na -80°C.

6.1 Titracia SDS

Material:

1 % SDS (Bio-Rad) v pufre 2

Metódy:

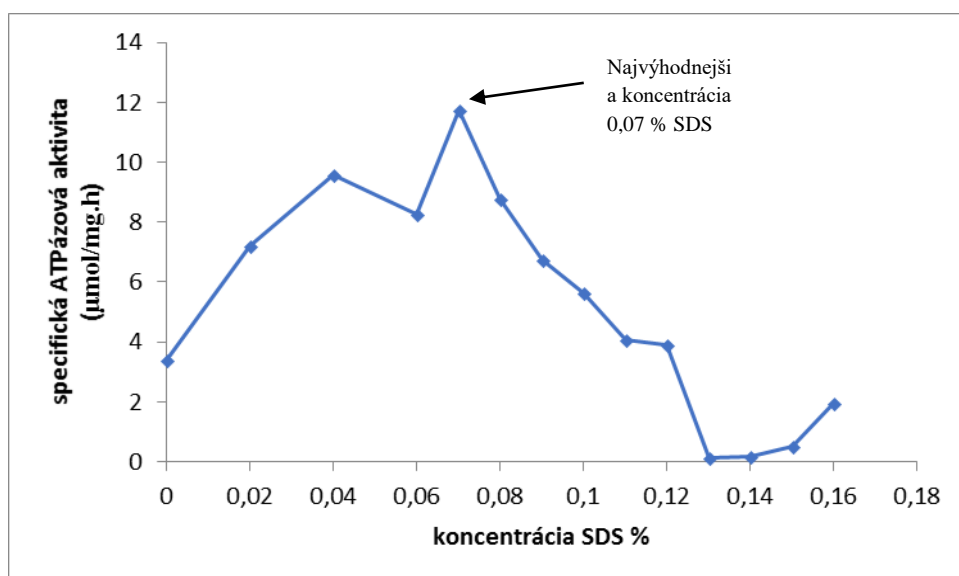
1. Mikrozómy necháme pomaly rozmraziť. Nariedime ich na výslednú koncentráciu proteínu 4,6 mg/ml.
2. Pripravíme koncentračnú radu podľa tabuľky 1. Pripravíme 14 vzoriek: 80 µl mikrozómov s koncentráciou 4,6 mg/ml + 20 µl roztoku SDS o vybranej koncentrácií podľa tabuľky 1. Vzorky inkubujeme pri teplote 20°C cez noc.

Tabuľka 1: Koncentračná rada pre SDS

Číslo vzorky	Finálna koncentrácia SDS [%]	µl 1% SDS zásobného roztoku	µl pufru 2
1	0,0	0	1000
2	0,10	100	900
3	0,20	200	800
4	0,30	300	700
5	0,35	350	650
6	0,40	400	600
7	0,45	450	550
8	0,50	500	500
9	0,55	550	450
10	0,60	600	400
11	0,65	650	350
12	0,70	700	300
13	0,75	750	250
14	0,80	800	200

3. Pomocou Baginského metódy (Baginsky a kol. 1966) (alebo inej metódy pre určenie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy) určíme aktivitu každej vzorky. Vytvoríme graf závislosti aktivity na finálnej koncentrácii SDS (obrázok 14). Na^+/K^+ -ATPázová aktivita je definovaná ako rozdiel v produkcii fosfátu v prítomnosti a pri absencii 1 mM ouabainu. Maximum zvonovitej krivky predstavuje optimálnu SDS koncentráciu pre najvyššiu aktivitu pumpu. Zvyčajne je to v rozsahu 0,08-0,1 % (obrázok 13).
4. Pre najvhodnejšiu koncentráciu SDS zopakujeme celý postup.
5. Rozmrazíme mikrozómy, nariedime ich pufrom 2 na koncentráciu 4,6 mg/ml a pridáme SDS tak, aby sme dosiahli zvolenú koncentráciu a roztok necháme inkubovať na magnetickej miešačke cez noc pri teplote 20 °C.
6. Nasleduje ultracentrifugácia (Himac CP90WX, Hitachi, USA) s týmito parametrami: 127 000 g, 50 min, 4°C.
7. Supernatant (S5) odstránime a pelet (P5) rozsuspendujeme vo vychladenom pufr 3 a zhomogenizujeme ručným homogenizátorom.

8. Ultracentrifugácia a rozsuspendovanie zopakujeme štyrikrát.
9. Pri poslednom rozsuspendovaní určíme koncentráciu proteínu pomocou Bradfordovej metódy.
10. Pre určenie ATPázovej aktivity použijeme Baginského metódu.
11. Čistotu proteínu určíme pomocou SDS PAGE (obrázok 18). Pre vyhodnotenie čistoty gélu bol použitý gél skener (Amersham Imager 600, GE Healthcare Bio-Science AB, Švédsko).
12. Proteín nariedime pufrom 3 na výslednú koncentráciu 1 mg/ml a rozdelíme do ependorfiek po 1 ml a zmrazíme na -80°C na dlhodobé uskladnenie.



Obrázok 14: Určenie najvýhodnejšej koncentrácie SDS; každá hodnota zodpovedá priemeru z ôsmich meraní

6.2 Meranie ATPázovej aktivity – Baginského metóda

6.2.1 Kalibrácia

Materiály:

Zásobné roztoky (rozpúšťadlo: H_2O pre všetky roztoky)

- 10 % molybdát amónny (Sigma)
- 35 % HCl (Lachner)
- 20 % SDS (Bio-Rad)

- 1 mM KH_2PO_4 (Sigma)

Roztok 1

- 10 % molybdát amónny (Sigma)

Roztok 2 (vždy čerstvý)

- 0,43 g kyseliny askorbovej (Sigma)
- pridať 1,48 ml HCl (35 %) (Lachner)
- pridať 2,145 ml SDS (20 %) (Bio-Rad)
- tesne pred použitím pridať 715 μl roztoku 1
- doplniť vodou do objemu 15 ml

Roztok 3 (skladovať bez prístupu svetla)

- 1,75 g citrátu bizmutitého (Sigma) rozpustiť v H_2O (max 25 ml)
- pridať 4,93 ml Hcl (Sigma)
- pridať 1,75 g citrátu sodného (Sigma)
- doplniť vodou do objemu 50 ml

Metódy:

1. Podľa tabuľky 2 si pripravíme roztoky fosfátu o rôznej koncentrácii.
2. Do titračnej doštičky napipetujeme 50 μl jednotlivých roztokov fosfátu.
3. Následnými krokmi spustíme meranie reakcie. Reakciu odštartujeme pridaním 75 μl roztoku 2 do každej jamky.
4. Nasleduje 8 minútová inkubácia pri izbovej teplote.
5. Reakciu zastavíme pridaním 125 μl roztoku 3 do každej jamky.
6. Ak sa v jamke vytvoria bublinky je potrebné ich odstrániť (popraskať) pred meraním absorbancie. Absorbanciu vzorky meriame pri 710 nm.
7. Kalibráciu zmeriame trikrát.

Tabuľka 2: Kalibračná rada roztoku fosfátu

Finálne molárne množstvo [nmol]	Finálna koncentrácia [mM]	K ₂ HPO ₄ [μl]	H ₂ O [μl]
0	0	0	1000
2,5	0,05	50	950
5	0,1	100	900
10	0,2	200	800
17,5	0,35	350	650
25	0,5	500	500

6.1.2 Meranie aktivity

Materiály:

Zásobné roztoky (rozpušťadlo: H₂O pre všetky roztoky)

- 1 M NaCl (Lachner)
- 1 M KCl (Fluka)
- 1 M MgCl₂ (Sigma)
- 1 M imidazol (Roth) (skladovať v tme)
- 10 mM ATP (Sigma)
- 5 mM ouabain (Sigma)

Roztok 2 (vždy čerstvý; udržiavať v tme)

- 0,43 g kyseliny askorbovej (Sigma) (rozpustiť v 10 ml H₂O)
- pridať 1,48 ml HCl (35 %) (Lachner)
- pridať 2,145 ml SDS (20 %) (Bio-Rad)
- doplniť vodou do objemu 15 ml
- tesne pred použitím pridať 715 μl roztoku 1

2 x pufr ATPázovej aktivity

- 260 mM NaCl (Lachner)
- 40 mM KCl (Fluka)

- 8 mM MgCl₂ (Sigma)
- doplniť vodou do objemu 50 ml; pH 7,2

1 x pufr ATPázovej aktivity

- 511 µl 2 x pufr ATPázovej aktivity
- 189 µl MiliQ voda
- 300 µl 10 mM ATP (Sigma)

1 x ouabainový pufr

- 511 µl 2 x pufr ATPázovej aktivity
- 89 µl MiliQ water
- 100 µl 5 mM ouabain (Sigma)
- 300 µl 10 mM ATP (Sigma)

Metódy:

1. Do jamky napipetujeme 48 µl pufru ATPázovej aktivity alebo 48 µl ouabainového pufru.
2. Reakciu odštartujeme pridaním 2 µl vzorky = mikrozómy s Na⁺/K⁺-ATPázou.
3. Inkubujeme 6 minút.
4. Reakcia zastavíme pridaním 75 µl roztoku 2.
5. Inkubujeme 8 minút, počas toho sa vyvíja sfarbenie.
6. Vyvíjanie zastavíme pridaním 125 µl roztoku 3.
7. Ak vznikli bublinky, opäť je potrebné ich odstrániť pred meraním absorbancie. Absorbanciu vzorky meriame pri 710 nm. Meranie absorbancie prebehlo pomocou spektrometra (SynergyMx, BioTek, USA).

7 Stopped-flow

Materiál:

Zásobné roztoky (rozpúšťadlo: H₂O pre všetky roztoky)

- 4,6 mg/ml Na⁺/K⁺-ATPáza
- 50 μM RH421 (Sigma) (rozpúšťadlo: etanol (Lachner))
- 7,5 mM ATP (Sigma)
- 1 M NaCl (Lachner)
- 1 M MgCl₂ (Sigma)
- 30 mM imidazol

Metódy:

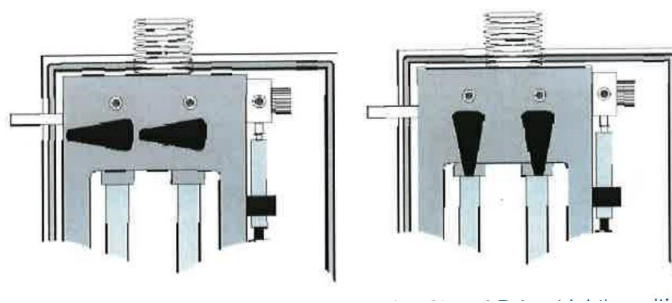
1. Pripravíme si 20 ml zásobné roztoky, ako rozpúšťadlo použijeme imidazol. Jeden roztok obsahuje Na⁺/K⁺-ATPázu (s výslednou koncentráciou v roztoku 10 μg/ml) inkubovanú s RH421 (s výslednou koncentráciou v roztoku 75 nM) a druhý roztok je ATP (s výslednou koncentráciou v roztoku 25 μM). Jednotlivé roztoky uchovávame v ľade.
2. Do zásobných striekačiek napustíme roztoky. Hlavný ventil nastavíme na pozíciu „load“ (obrázok 15), čím otvoríme prietok medzi zásobnými striekačkami a riadiacimi striekačkami. Rostoky vpravíme do riadiacich striekačiek posunom ich piestov.
3. Kontrolný ventil prietoku nastavíme do uzavretej pozície 1 podľa obrázka 16. V takejto pozícii nie je možný vtok roztokov do zmiešavacej komory.
4. Hlavný spínač dáme do pozície „drive“ (obrázok 15), v tejto pozícii je umožnení tok z riadiacich striekačiek do pozorovacej komory.
5. Kontrolný ventil prietoku nastavíme na pozíciu 2 podľa obrázka 16, čím otvoríme prietok medzi riadiacimi striekačkami a striekačkou na odpad. Ak máme takéto nastavenie, tak celý objem zo zásobných striekačiek prejde cez pozorovaciu komoru a následne do odpadovej striekačky.
6. Pri taktom nastavení celý objem z riadiacich striekačiek prejde systémom. Hlavný ventil a kontrolný ventil prietoku nastavíme na pôvodné pozície ako je popísané v bode 3. a 4. a doplníme objem v riadiacej striekačke.

7. Hlavný spínač dáme opäť do pozície „drive“, ale kontrolný ventil prietoku nastavíme na pozíciu 3 podľa obrázka 16, čím prepojíme riadiace striekačky a zastavujúcu striekačku. V tomto prípade neprejde systémom celý objem riadiacich striekačiek, ale len určitý objem v závislosti od pozície zarážky.
8. Pre vypustenie objemu zo zastavujúcej striekačky nastavíme pozíciu kontrolného ventilu prietoku na pozíciu 4 podľa obrázka 16, čím prepojíme zastavujúcu a odpadovú striekačku. Posunom piestu zastavujúcej striekačky vytlačíme z nej objem do odpadovej striekačky.
9. Nastavením kontrolného ventilu prietoku na pozíciu 3 podľa obrázka 16, čím opäť prepojíme zastavujúcu striekačku a riadiace striekačky a môžeme opakovať bod 7. a 8.

Nastavenie prístroja:

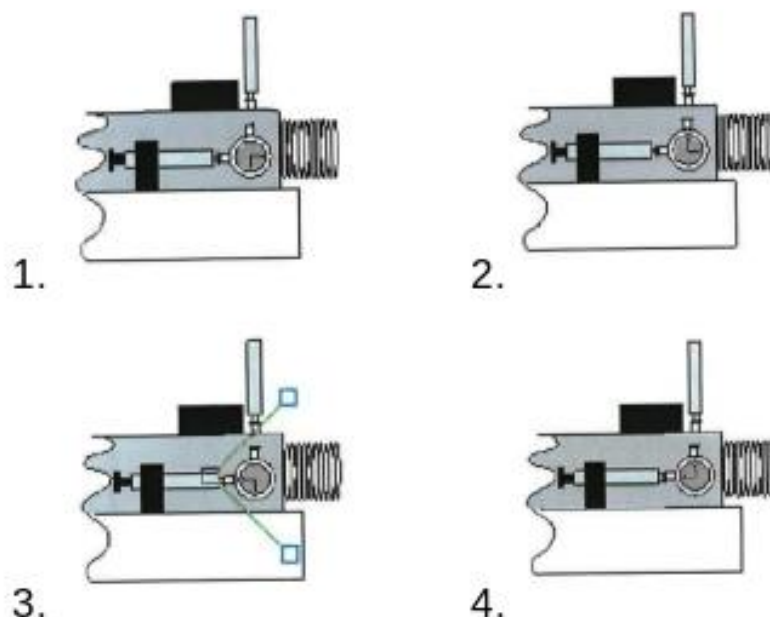
Meranie prebiehalo na prístroji stopped-flow (RX2000-Rapid Mixing Stopped-flow unit, AppliedPhotophysics, Veľká Británia) a fluorescencia bola detekovaná fluorometrom (Fluorolog-3, Horiba Scientific, Francúzsko).

- excitačná vlnová dĺžka: 577 nm; nastavenie štrbín (slit): 14 nm
- emisná vlnová dĺžka: 635 nm; nastavenie štrbín: 14 nm
- integračný čas: 0,002 s
- time increment (čas zvyšovania): 0,002 s
- total time (celkový čas): 4 s



Obrázok 15: Nastavenie pozície hlavného ventilu. Vľavo je pozícia „load“, teda otvorený prietok medzi zásobnými striekačkami a riadiacimi striekačkami. Vpravo je pozícia „drive“, v tejto pozícii je umožnení tok z riadiacich striekačiek do pozorovacej komory.

Zdroj obrázka: *Manuál stopped-flow 2013.*



Obrázok 16: Nastavenie kontrolného ventilu. 1. Uzavretá pozícia - nie je možný vtok roztokov do zmiešavacej komory. 2. Otvorený prietok medzi riadiacimi striekačkami a striekačkou na odpad. Pri tomto nastavení celý objem zo zásobných striekačiek prejde cez pozorovaciu komoru a následne do odpadovej striekačky. 3. Prepojenie riadiacej striekačky a zastavujúcej striekačky. V tomto prípade neprejde systémom celý objem riadiacich striekačiek, ale len určitý objem. 4. Prepojenie zastavujúcej a odpadovej striekačky. Posunom piestu zastavujúcej striekačky z nej vytlačíme objem do odpadovej striekačky.

Zdroj obrázka: Manuál stopped-flow 2013.

7.1 Spracovanie výsledkov v programe MATLAB

Pri vyhodnocovaní nameraných výsledkov bol problém s určením počiatku spustenia reakcie, pretože každé meranie bolo spustené ručne a každé meranie malo iný čas, kedy boli roztoky vpravené do zmiešavacej komory. Pre vyhodnotenie výsledkov, teda pre zrovnanie počiatku reakcie, bol vytvorený špeciálny skript pre toto meranie v

programe MatLab, ktorý vidíme na obrázku 17. Skript bol vytvorený na základe Otsuovej metódy (Otsu 1979), ktorá sa používa na segmentáciu čiernobieleho obrazu.

```

1 clear
2 clc
3 close all
4
5 num = xlsread('vzormerania.xlsx'); % nazov suboru s datami
6
7 cas = num(:, 1);
8 y_raw = num(:, 2:end);
9 y = y_raw(:, all( ~isnan(y_raw) ) );
10
11
12
13 %% najdi "zaciatok"
14 % najde bod medzi cas=0.5 a cas=1, kde se da signal rozdelit
15 % tak, ze soucet varianci obou kusu bude minimalni
16
17 od = find(cas>0.5, 1); % pociatocny cas pre hladanie prechodu,
18 to = find(cas>1, 1); % konecny cas pre hladanie prechodu
19
20
21
22 for j=1:size(y,2)
23     pos = 0;
24     for i=od:to
25         pos = pos+1;
26         left = y(1:i, j);
27         right = y((i+1):end, j);
28         pom(j) = var(left) + var(right);
29
30         vysl(pos,j, 1) = i;
31         vysl(pos,j, 2) = pom(j);
32     end
33 end
34
35
36 for j=1:size(y,2)
37     rat = vysl(:,j,2);
38     [min_val, min_id] = min(rat(:) );
39
40     idx(j) = vysl(min_id,j,1); % toto je "zaciatok" y1
41     fprintf( 'Datalist No. %d: Beginning of y at t = %s s \n', j, num2str( cas(idx(j)) ) )
42 end
43
44
45 newx=cas-cas(idx)'; % odsadi pre kazdy stlpec cas, tak aby sedel moment prechodu
46
47
48 % Definicia filtra
49 % https://www.mathworks.com/help/signal/ref/butter.html?requestedDomain=true
50 % Lowpass Butterworth Transfer Function
51 f_cutoff=15;
52 f_sample=500 ; % sampling rate (rychlost vzorkovania)
53 [coef_b coef_a]=butter(6,f_cutoff/(f_sample/2));
54 yfilt=filter(coef_b,coef_a, y);
55
56
57 figure
58 a=[1:5 6:size(y,2)]; % moznost vyberu, ktore stlpec sa vykreslia
59 plot(newx(:,a),yfilt(:,a))
60
61 xoffset=75 ;
62 newx2=newx(xoffset:size(y,1), :);
63 yfilt2=yfilt(xoffset:size(y,1), :);
64 plot(newx2(:,a),yfilt2(:,a))
65
66
67 return

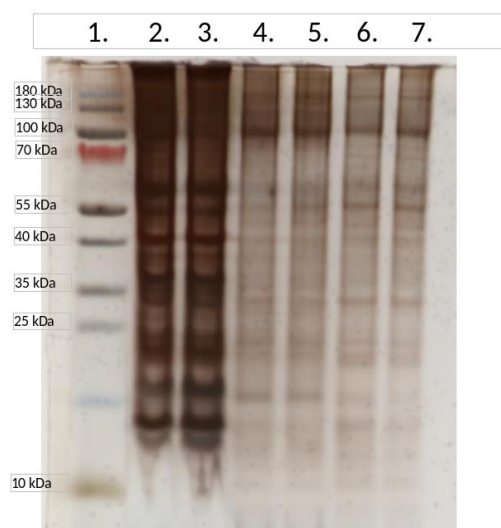
```

Obrázok 17: Program pre zrovnanie výsledných dát na rovnakú počiatok spustenia reakcie.

Výsledky merania

8 Izolácia Na^+/K^+ -ATPázy

Výsledok čistoty proteínu určeného metódou SDS PAGE, je zobrazený na obrázku 18. Pre metódu stopped-flow sa ďalej využíval proteín v mikrozomálnej frakcii.

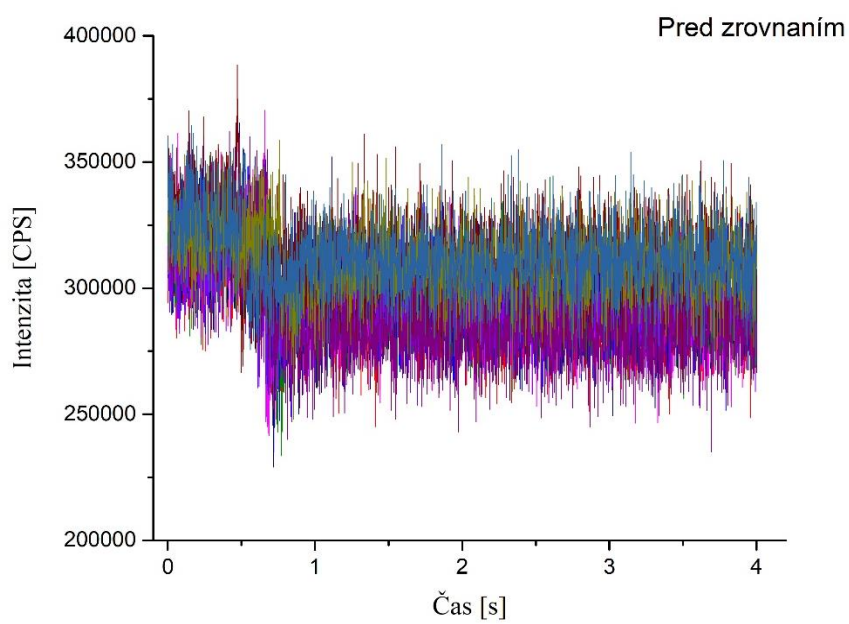


Obrázok 18: Výsledok elektroforetickej separácie v polyakrylamidovom gély. Gél bol vizualizovaný pomocou komerčného kitu Proteo Silver-Silver Stain Kit (Sigma). Dráha 1 – marker; dráha 2, 3 – mikrozómy 4,6 mg/ml; dráha 4, 5 – izolovaný proteín 1 mg/ml; dráha 6, 7 – kontrolná vzorka proteínu 1 mg/ml.

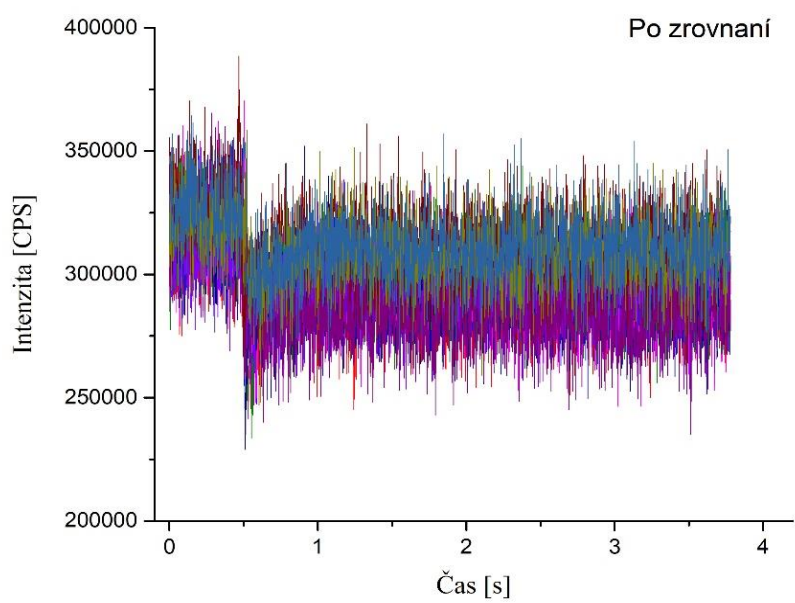
9 Optimalizácia metódy stopped-flow

Experiment bol založený na meraní podľa článku (Kane a kol. 1997), avšak s miernymi úpravami. Počiatočné meranie bolo optimalizované pri koncentrácií 75 nM RH421 a 25 μ M ATP, pri teplote 25°C a pH 7,4, $\lambda_{\text{ex}} = 577$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 635$ nm, s nastavením prístroja ako je uvedené v kapitole Materiály a Metódy, v podkapitole Stopped-flow. Pričom roztoky v 1. striekačke boli (uvádzané sú koncentrácie po zmiešaní roztokov): 25 μ M ATP, 30 mM imidazol, 5 mM MgCl₂, 130 mM NaCl; a v 2. striekačke: 10 μ g/ml Na⁺/K⁺-ATPázy, 75 nM RH421, 30 mM imidazol, 5 mM MgCl₂, 130 mM NaCl.

Pri vyhodnocovaní výsledkov bol problém so zrovnaním počiatkov reakcií. Každé meranie bolo spustené ručne a z tohto dôvodu malo každé meranie iný počiatočný čas. Na zrovnanie slúži program vytvorený špeciálne pre toto meranie. Skript programu sa nachádza v kapitole Materiály a Metódy, obrázok 17. Porovnanie nameraných výsledkov pred zrovnaním a po zrovnaní, sú zobrazené na obrázkoch 19 a 20.



Obrázok 19: Zobrazené výsledky pred zrovnanim počiatkov.



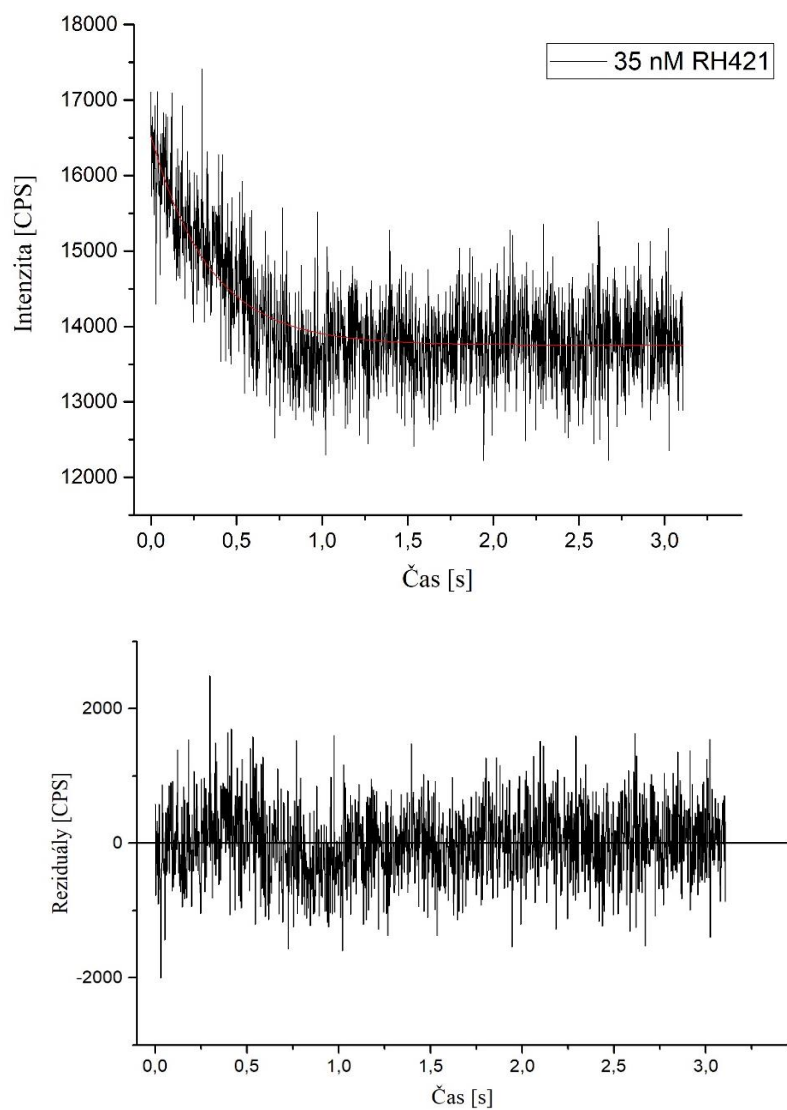
Obrázok 20: Zobrazené výsledky po zrovnani počiatkov.

10 Meranie metódou stopped-flow pre rôzne koncentrácie

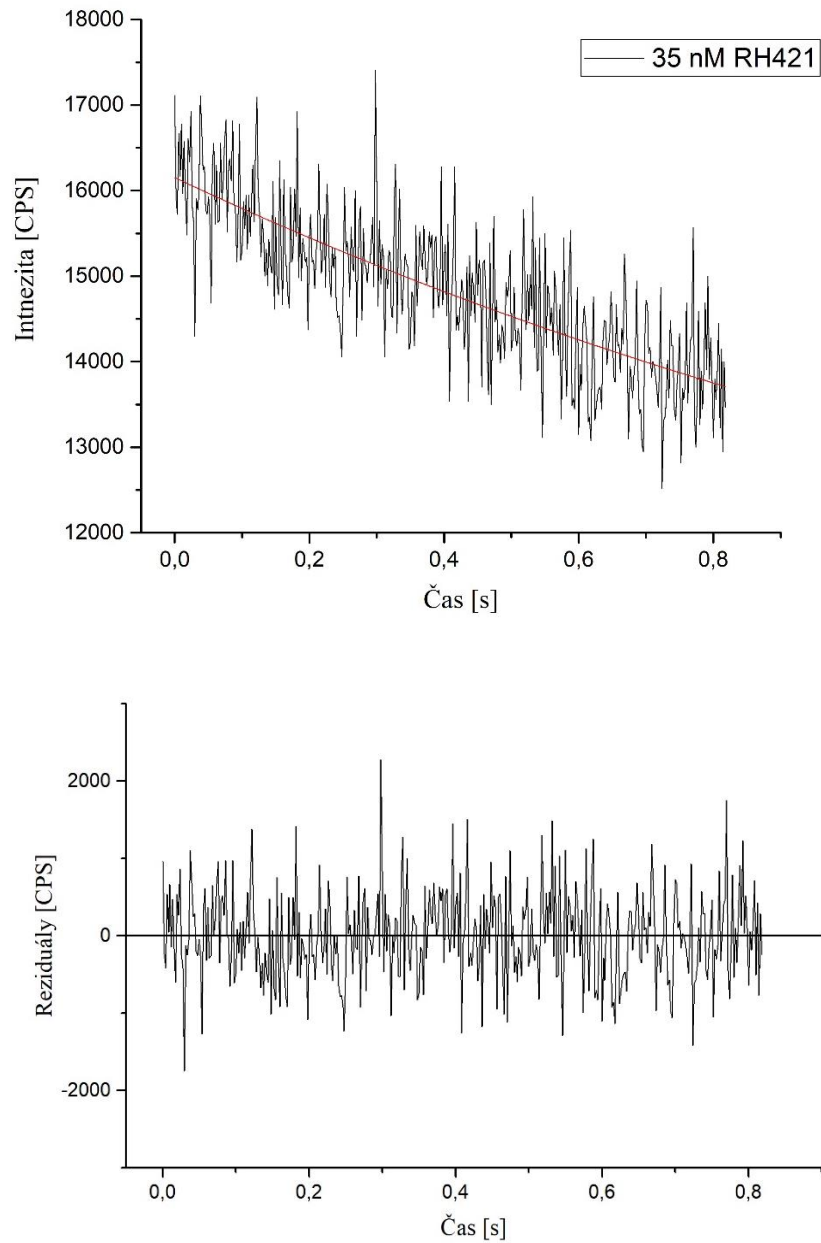
RH421

Po optimalizácií metódy a vyriešení problému s rôznym počiatkom merania bola následne menená koncentrácia RH421 a ATP, a ostatné podmienky merania boli zachované. V každom meraní bola Na^+/K^+ -ATPáza inkubovaná s RH421, pretože včlenenie farbiva do membránových fragmentov je relatívne pomalý proces, ktorý trvá desiatky sekúnd. Výsledné grafy odpovedajú 30 - 40 meraniam a uvádzané sú ich priemery. Namerané výsledky sú zobrazené na obrázkoch 21 - 35.

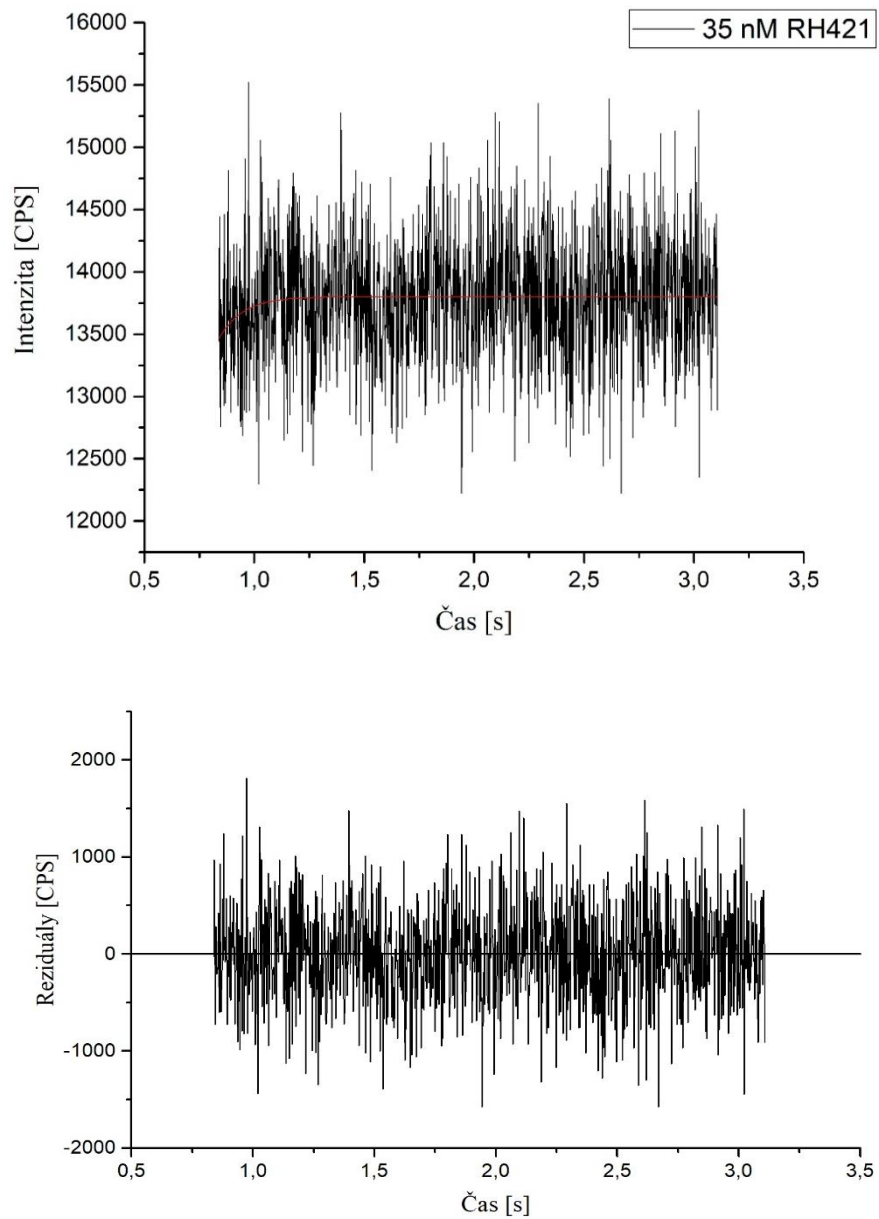
Porovnanie jednotlivých rýchlostných konštánt v závislosti od rôznej koncentrácie RH421 je v tabuľke 3. Pre vyhodnotenie výsledkov bol použitý jednoexponenciálny fit. Pre každú koncentráciu je uvedený samostatný fit pre klesajúcu a rastúcu časť grafu, pre lepšie vyhodnotenie výsledkov, pretože bol v jednotlivých grafoch viditeľný pokles intenzity, a aj menej výrazný nárast intenzity fluorescence. Podľa tabuľky 3 a obrázkov 36, 37, závislosti rýchlostnej konštanty od koncentrácie, RH421 je možné určiť, že pri vyššej koncentrácií sondy bola pozorovaná rýchlejšia časová odozva meranej reakcie.



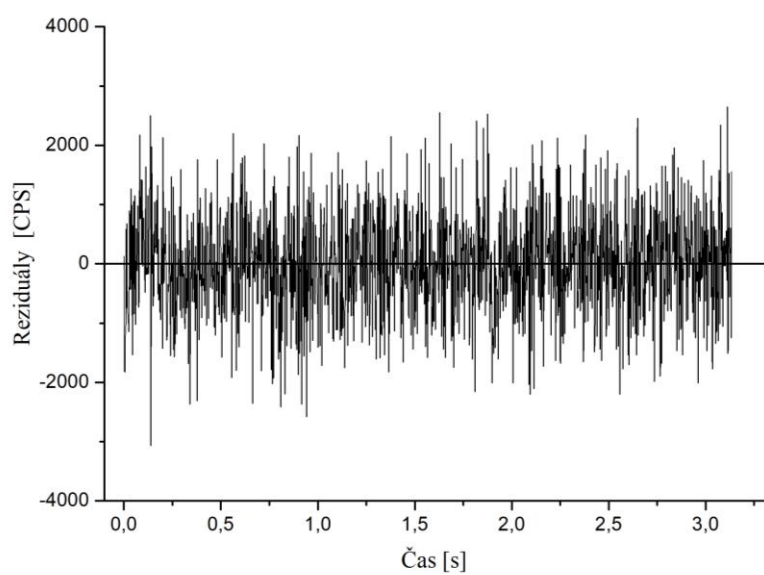
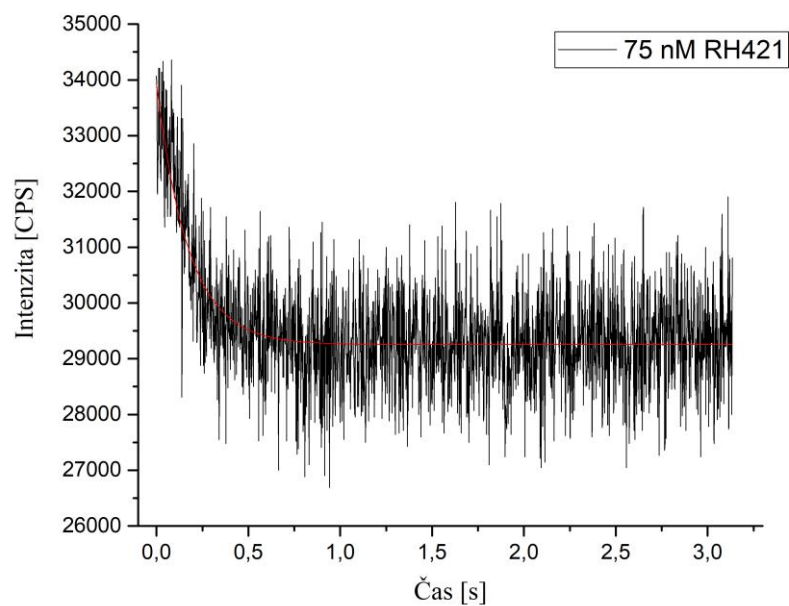
Obrázok 21: *Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (35 nM) metódou stopped-flow (hore). Reziďuálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).*



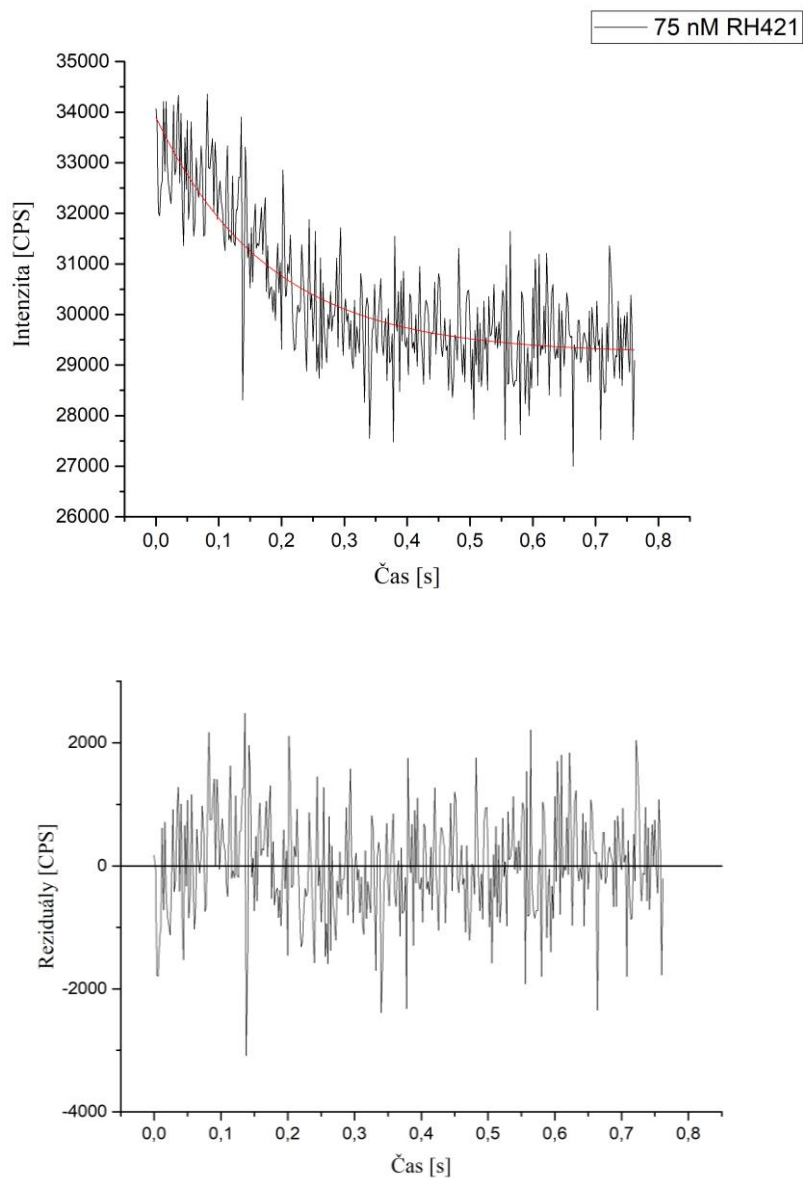
Obrázok 22: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (35 nM) metódou stopped-flow pre časť poklesu intenzity (hore). Reziiduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



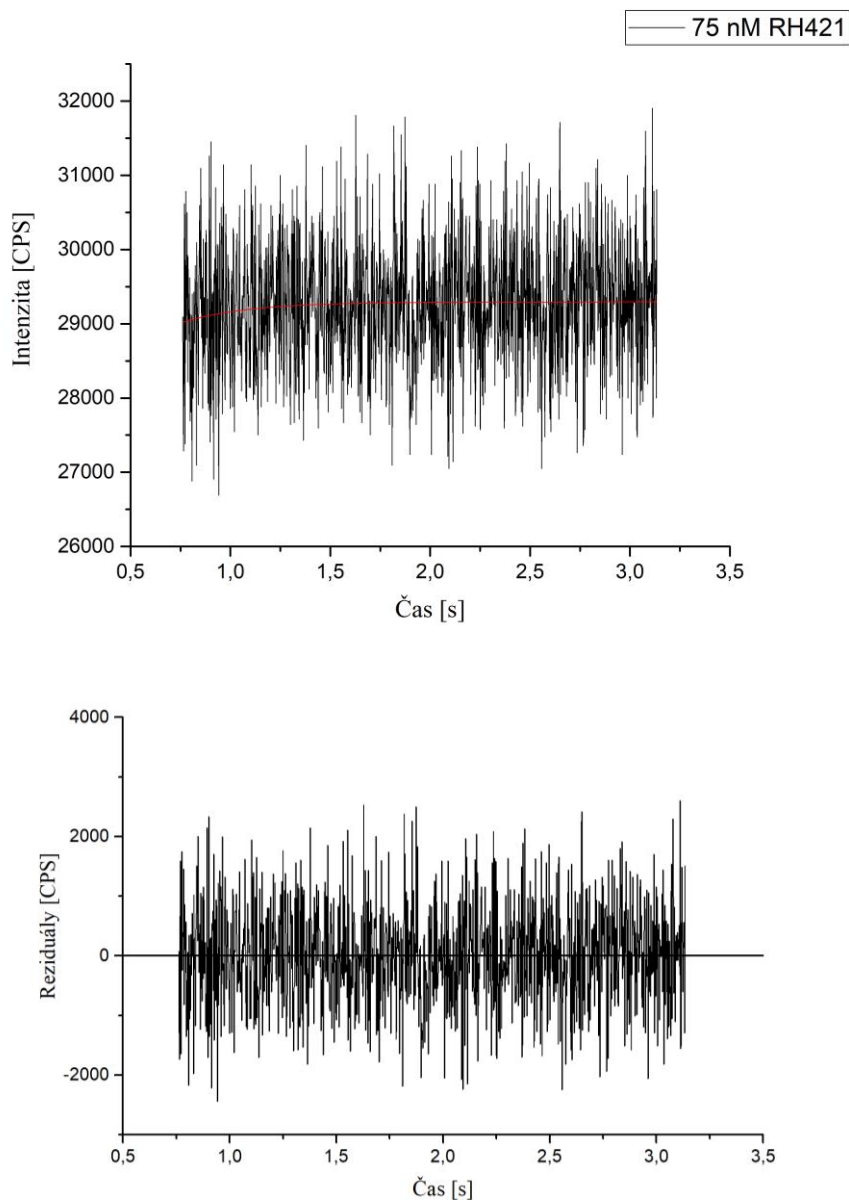
Obrázok 23: Nameraná zmena intenzity fluorescence rýchlej fázy Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (35 nM) metódou stopped-flow pre časť nárastu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).



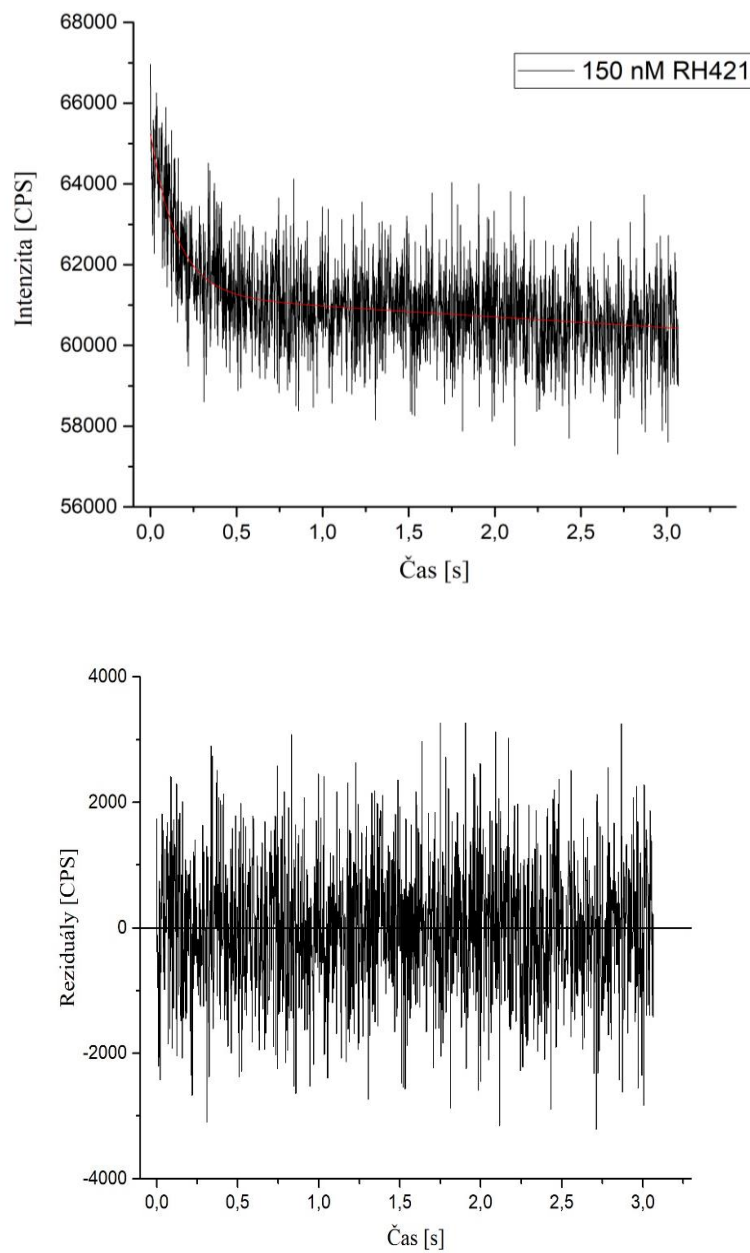
Obrázok 24: *Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (75 nM) metódou stopped-flow (hore). Reziďuálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).*



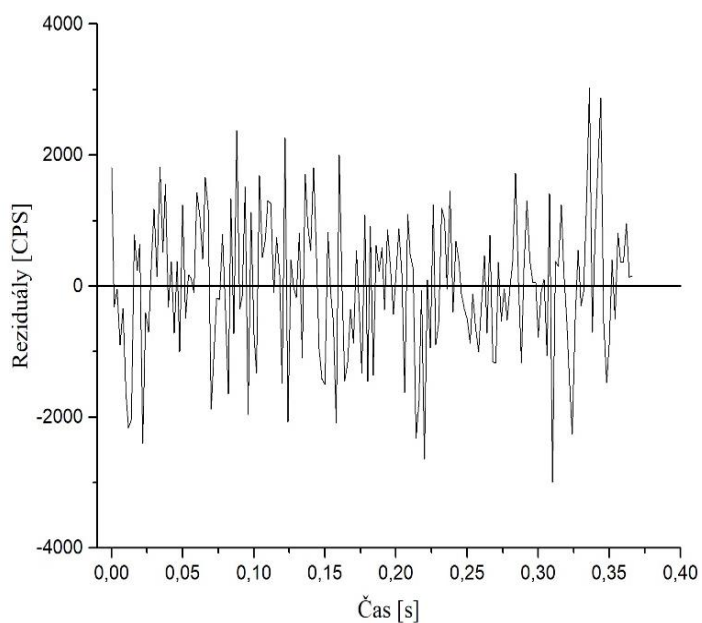
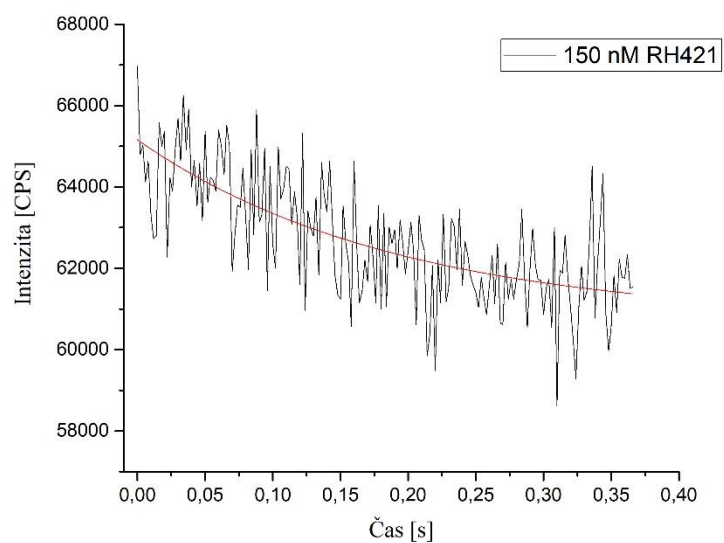
Obrázok 25: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (75 nM) metódou stopped-flow pre časť poklesu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



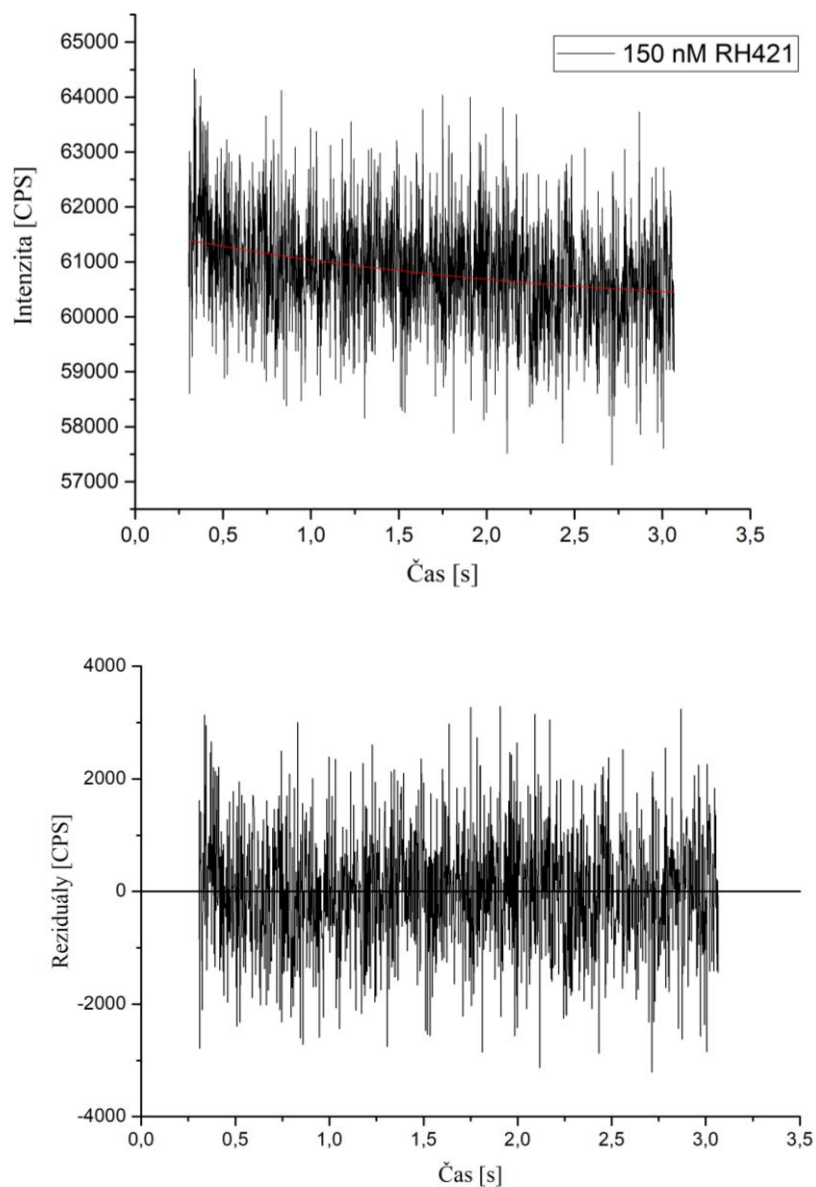
Obrázok 26: *Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (75 nM) metódou stopped-flow pre časť nárastu intenzity (hore). Reziiduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).*



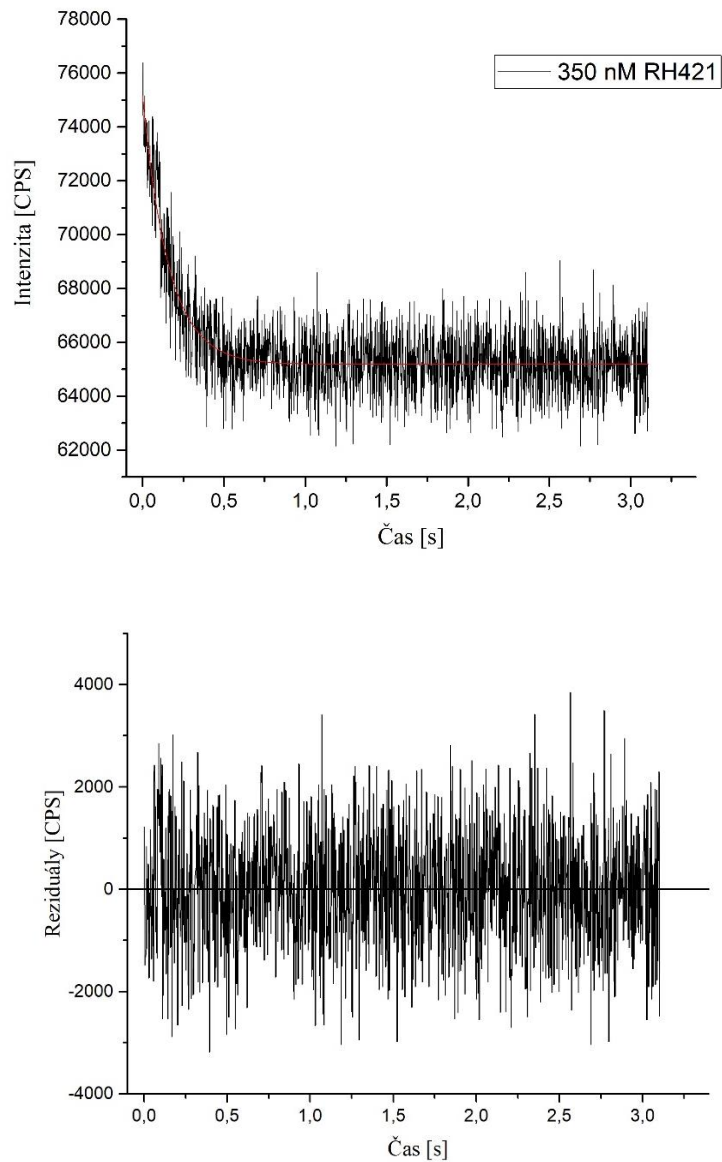
Obrázok 27: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (150 nM) metódou stopped-flow (hore). Reziďuálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



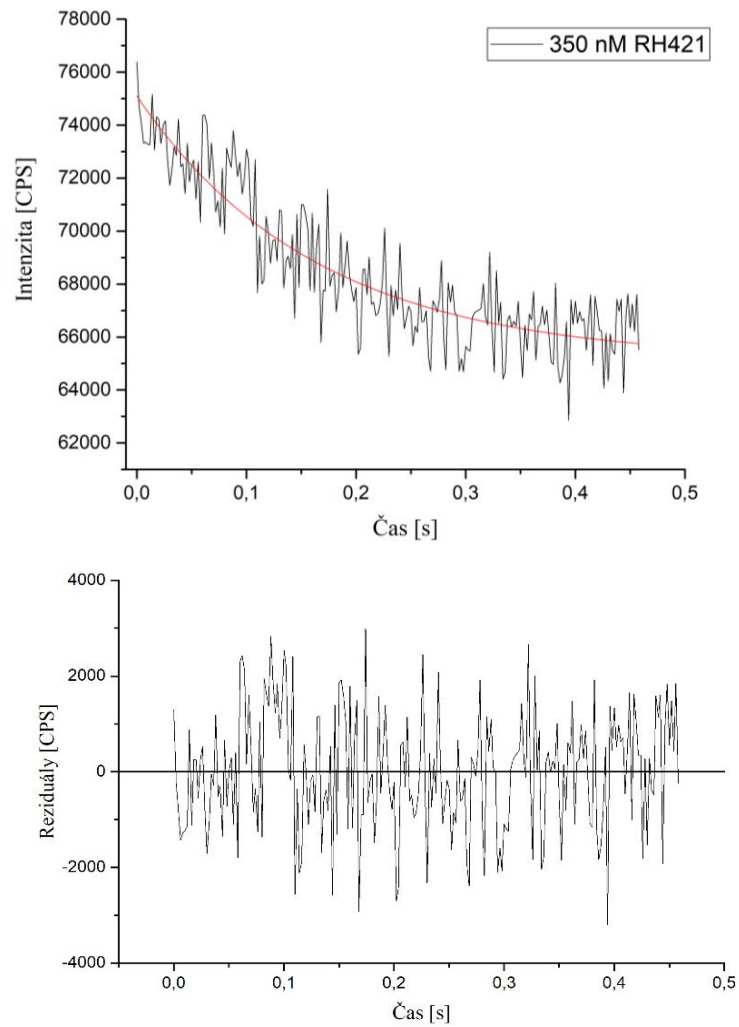
Obrázok 28: Nameraná zmena intenzity fluorescence pomalej fázy Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (150 nM) metódou stopped-flow pre časť poklesu intenzity (hore). Reziďuálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).



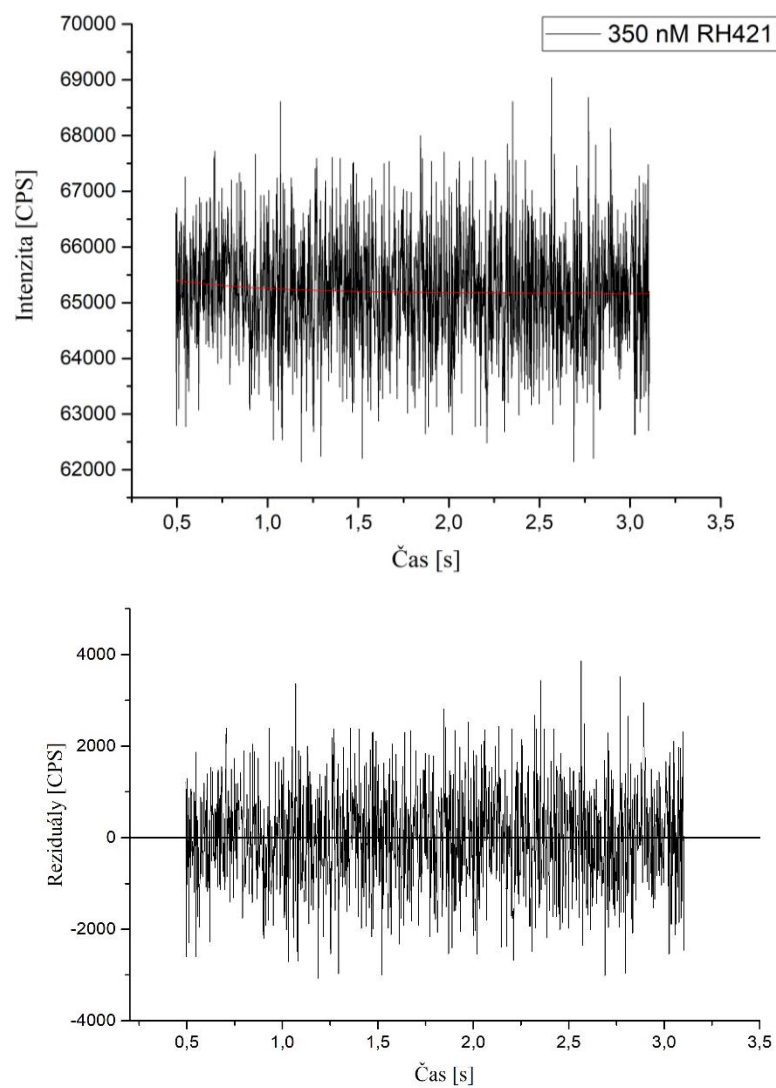
Obrázok 29: Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (150 nM) metódou stopped-flow pre časť nárastu signálu (hore). Reziiduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).



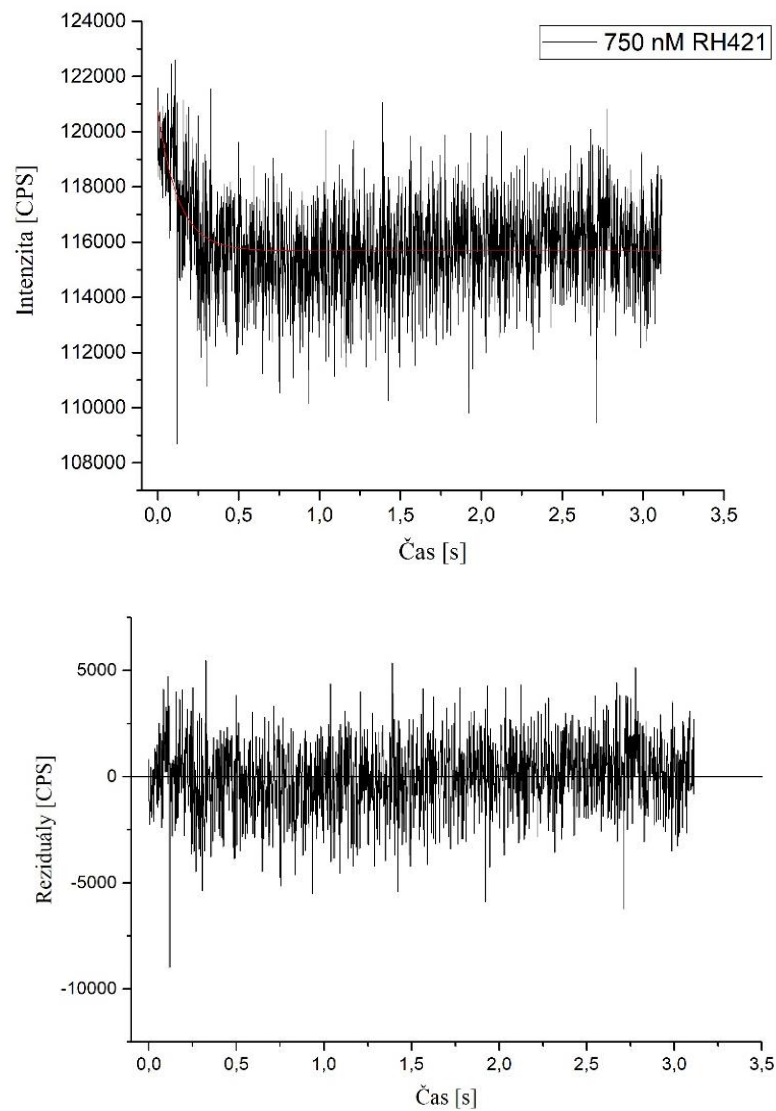
Obrázok 30: *Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (350 nM) metódou stopped-flow (hore). Reziduálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).*



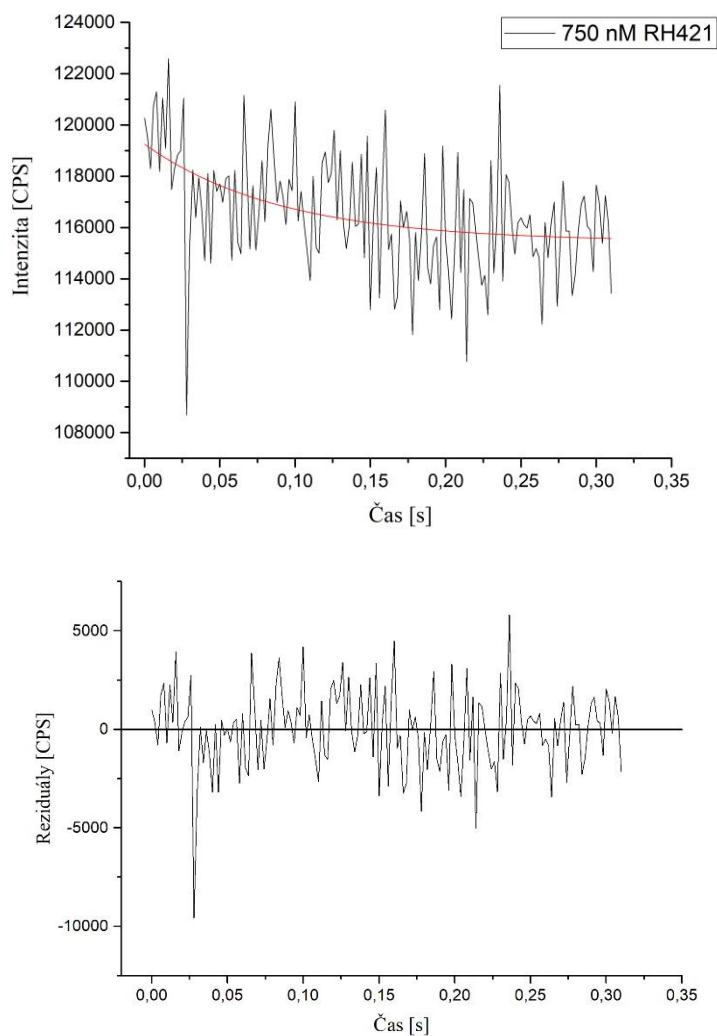
Obrázok 31: *Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (350 nM) metódou stopped-flow pre časť poklesu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).*



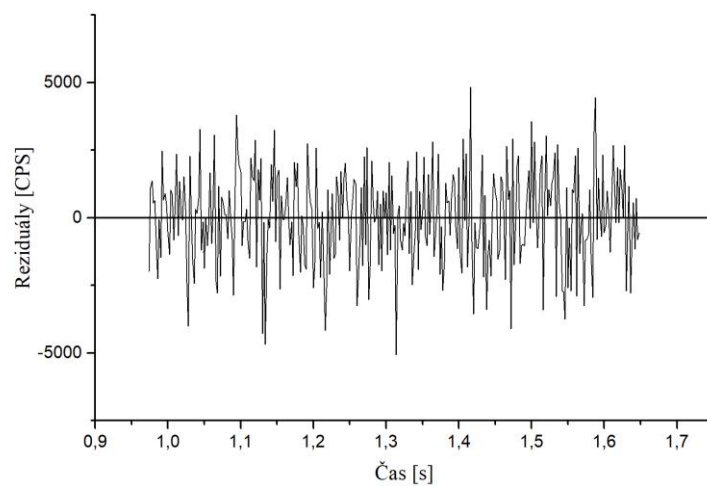
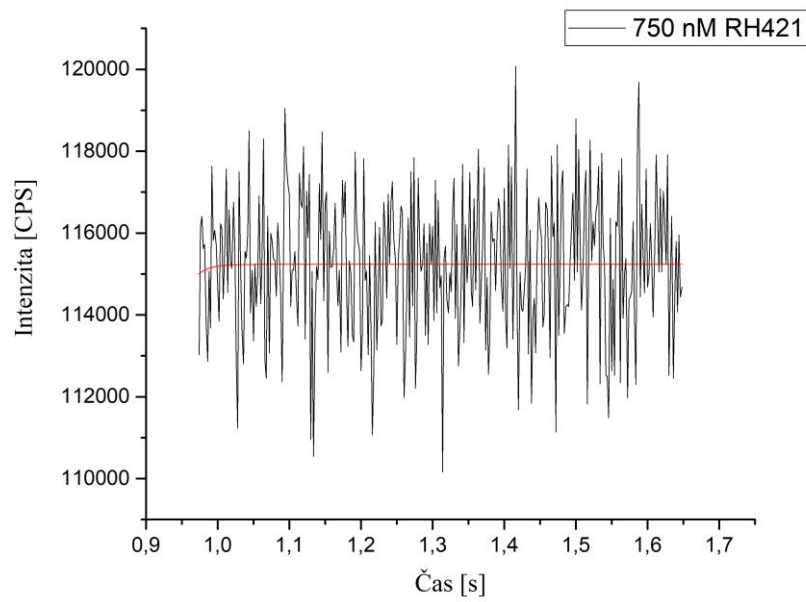
Obrázok 32: *Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (350 nM) metódou stopped-flow pre časť nárastu intenzity (hore). Reziiduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).*



Obrázok 33: *Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) metódou stopped-flow (hore). Reziiduálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).*



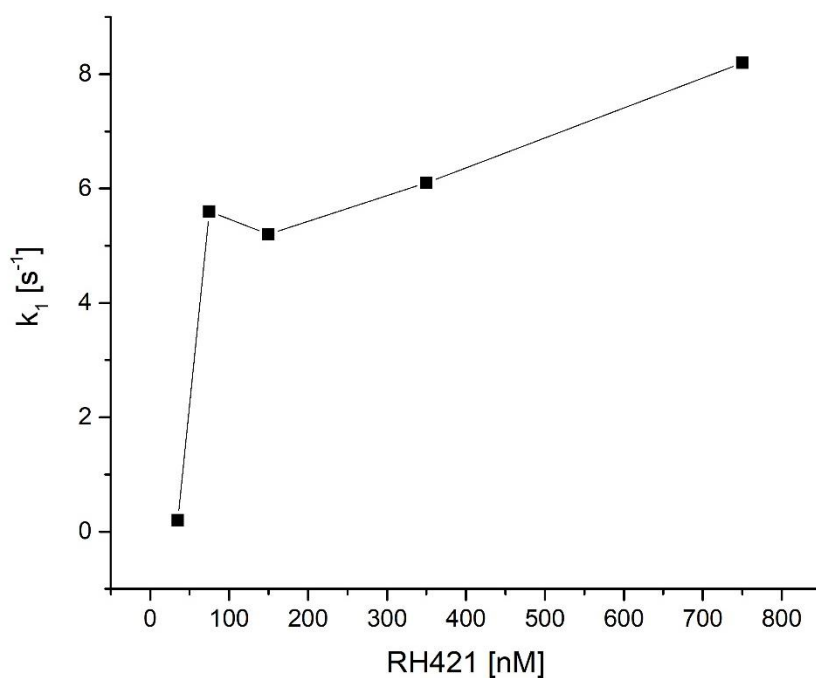
Obrázok 34: *Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) metódou stopped-flow pre časť poklesu intenzity (hore). Reziiduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).*



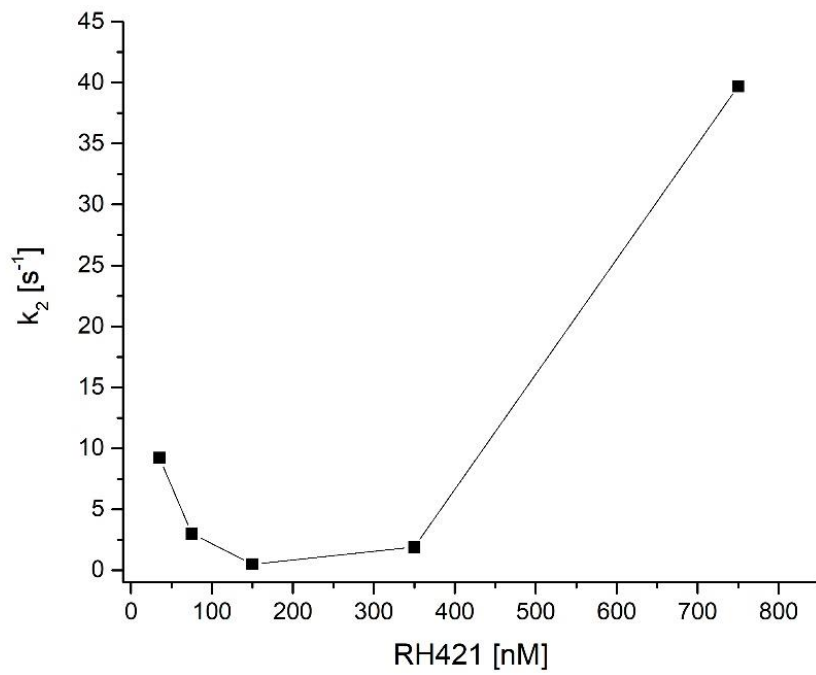
Obrázok 35: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) metódou stopped-flow pre čas poklesu intenzity (hore). Reziiduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).

Tabuľka 3: Rýchlostné konštanty pre rôzne koncentrácie farbiva RH421, k_1 predstavuje pokles intenzity fluorescence, k_2 predstavuje nárast intenzity fluorescence.

RH421	k_1 [s^{-1}]	k_2 [s^{-1}]
35 nM	$0,6 \pm 0,7$	$9,2 \pm 0,9$
75 nM	$5,6 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,9$
150 nM	$5,2 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,7$
350 nM	$6,1 \pm 0,1$	$1,9 \pm 1,2$
750 nM	$11,0 \pm 0,5$	$39,7 \pm 4,2$



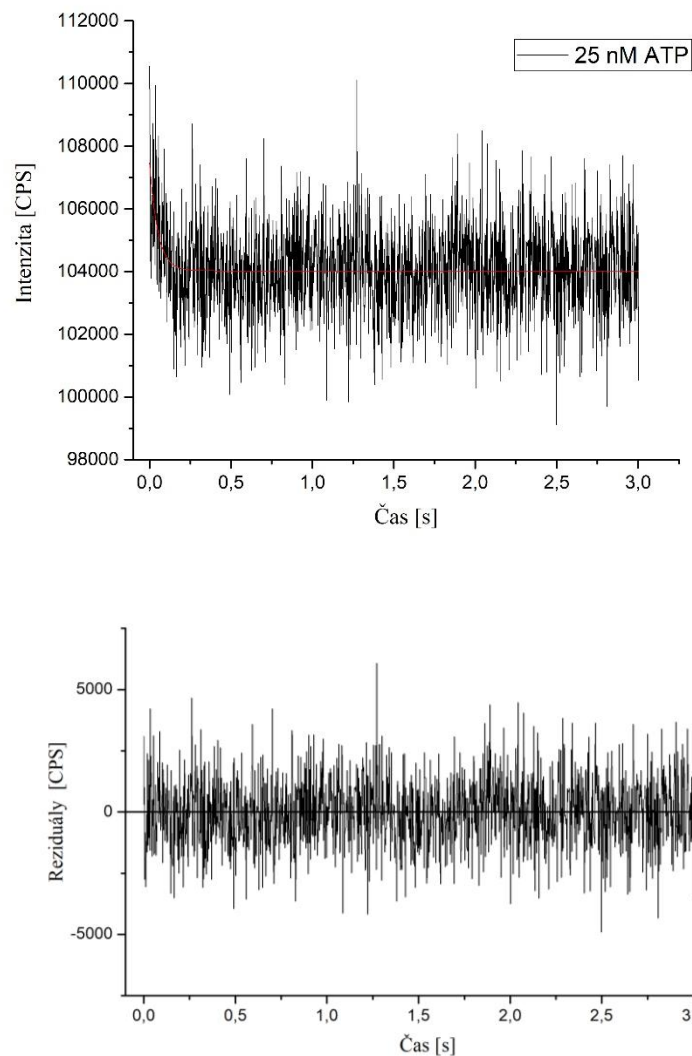
Obrázok 36: Závislosť rýchlostnej konštanty na koncentrácii RH421, pre časť poklesu intenzity fluorescence.



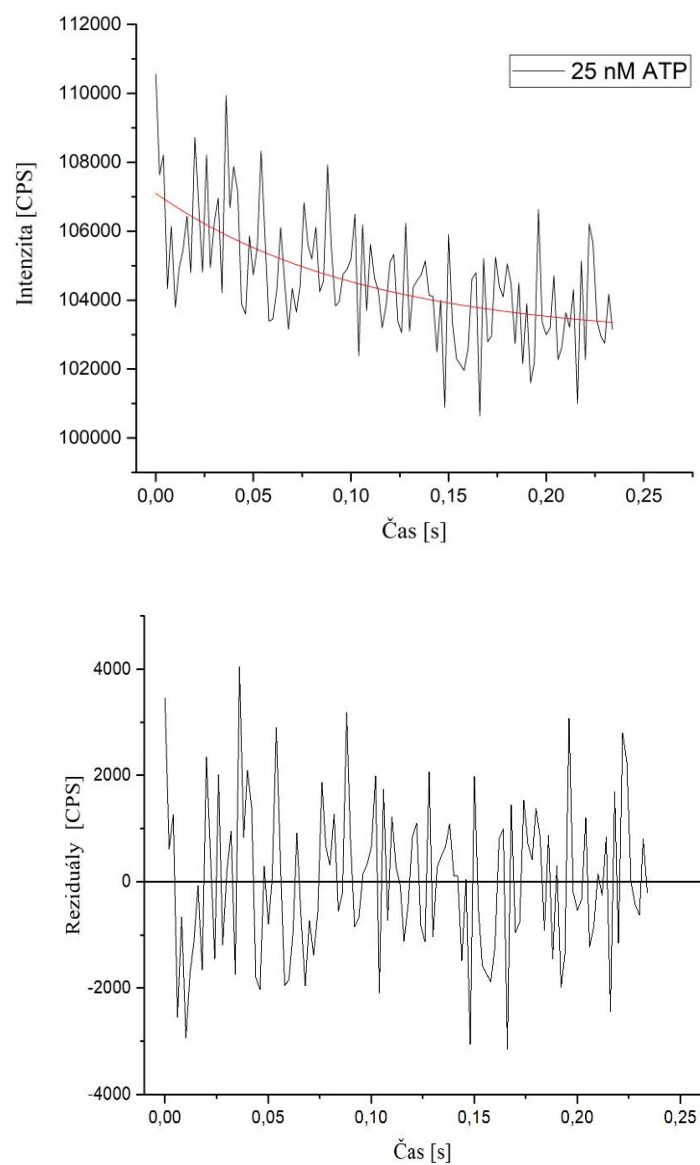
Obrázok 37: Závislosť rýchlostnej konštanty na koncentrácií RH421, pre časť nárastu intenzity fluorescencie.

11 Meranie metódou stopped-flow pre rôzne koncentrácie ATP

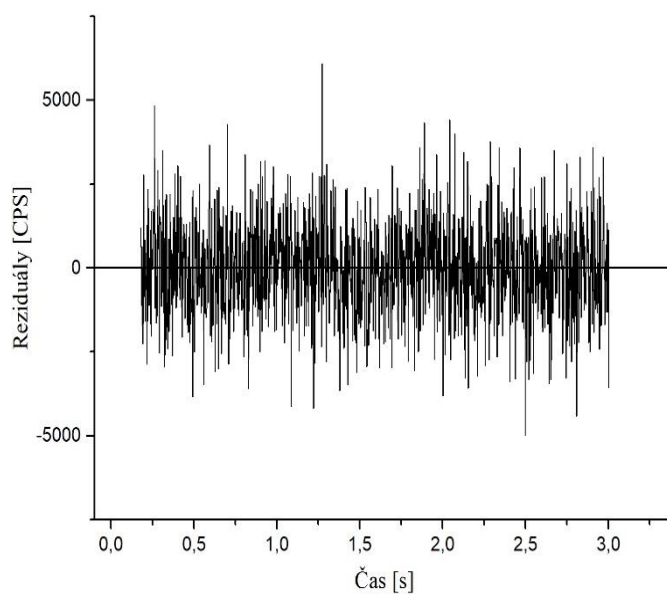
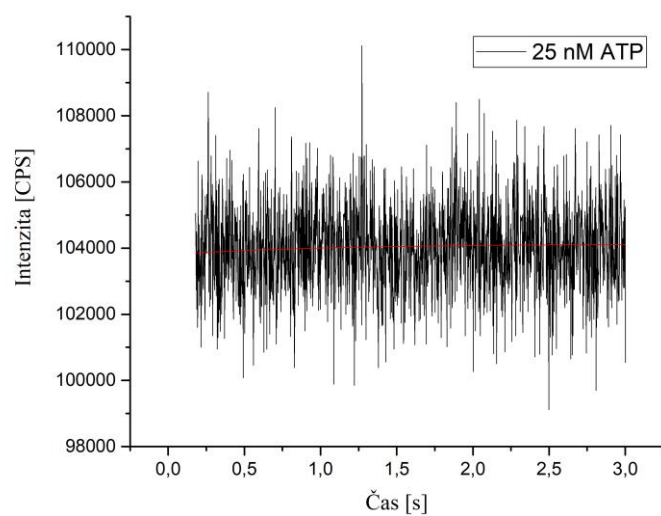
Následne bola meraná kinetika Na^+/K^+ -ATPázy pre rôzne koncentrácie ATP. Všetky merania prebiehali pri koncentrácii RH421 750 nM, pretože pri tejto koncentrácii bola najlepšie viditeľná zmena fluorescencie a bola získaná najrýchlejšia rýchlostná konštanta. Enzým bol opäť inkubovaný so sondou a až potom nasledovalo meranie kinetiky. Uvedené sú výsledky sú zobrazené na obrázkoch 38 - 52. Aj v tomto prípade sú uvádzané výsledky pre klesajúcu a rastúcu časť grafu. V tabuľke 4 sú zobrazené rýchlostné konštanty pre jednotlivé koncentrácie. Závislosť rýchlostnej konštanty od koncentrácie ATP je zobrazená na obrázkoch 53, 54.



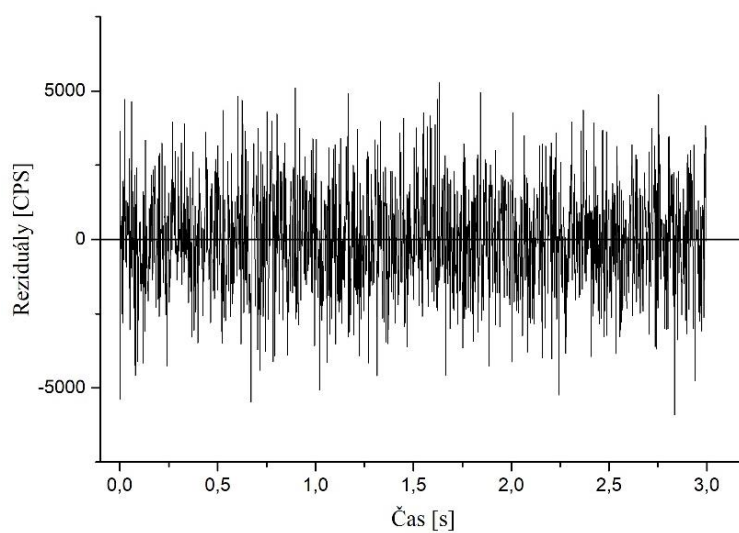
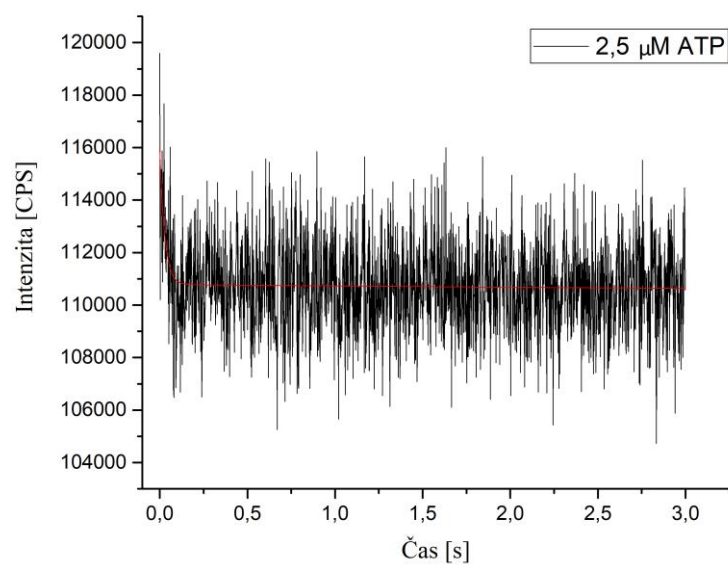
Obrázok 38: *Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácii 25 nM ATP metódou stopped-flow (hore). Reziďuálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).*



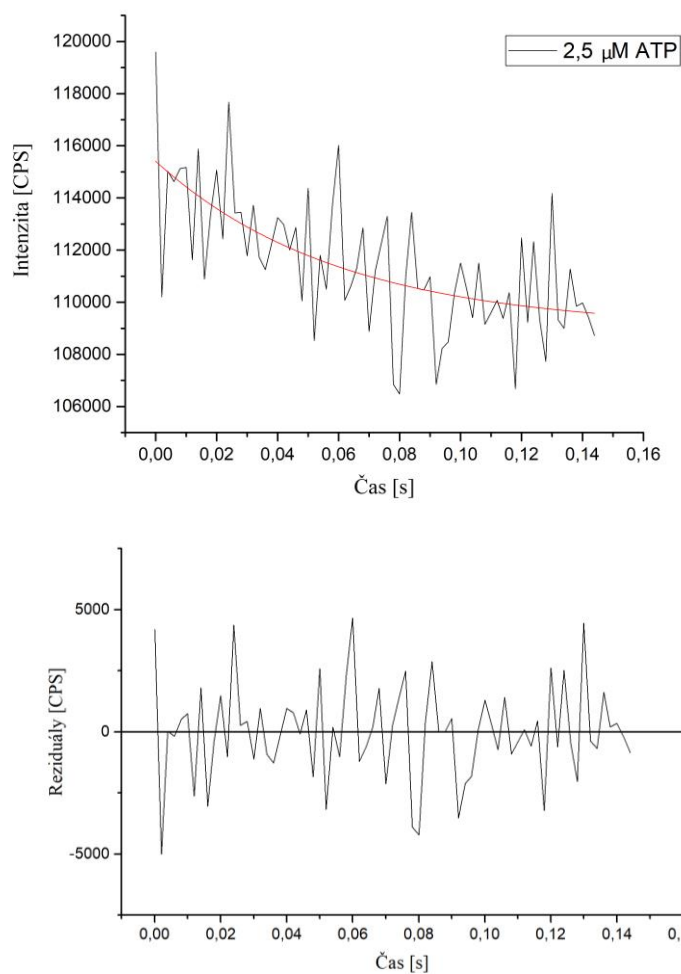
Obrázok 39: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácii 25 nM ATP metódou stopped-flow pre časť poklesu signálu (hore). Reziiduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



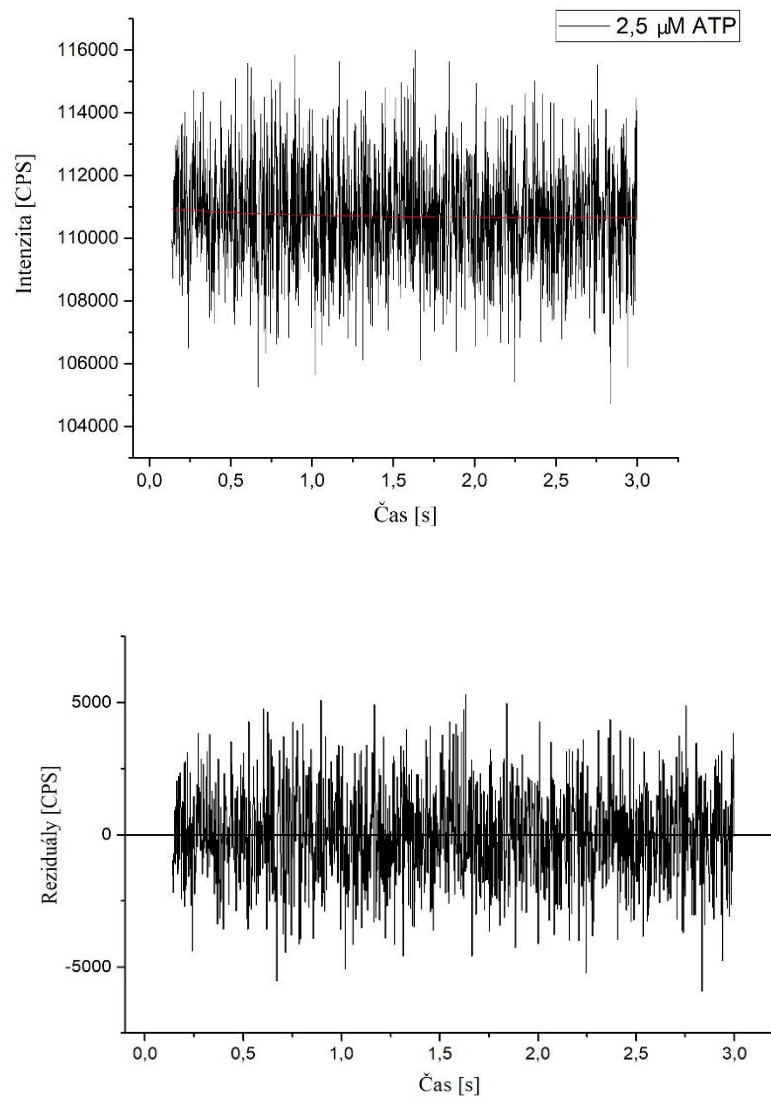
Obrázok 40: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácii 25 nM ATP metódou stopped-flow pre časť nárastu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



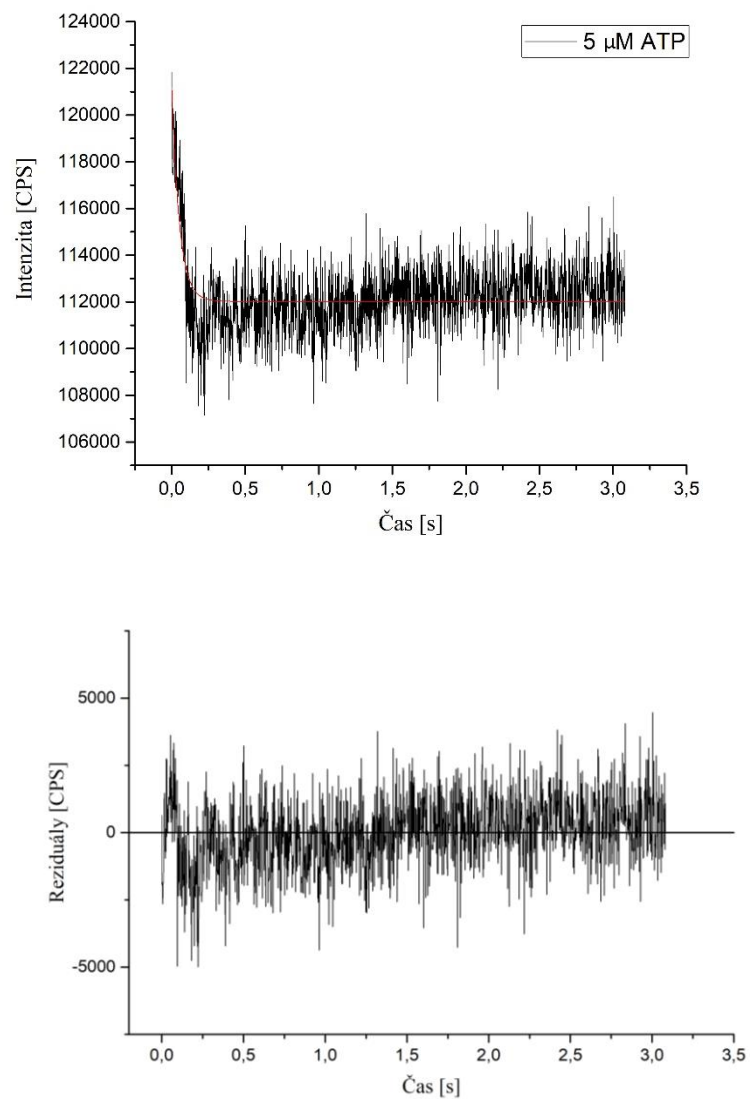
Obrázok 41: *Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentracii 2,5 μM ATP metódou stopped-flow (hore). Reziduálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).*



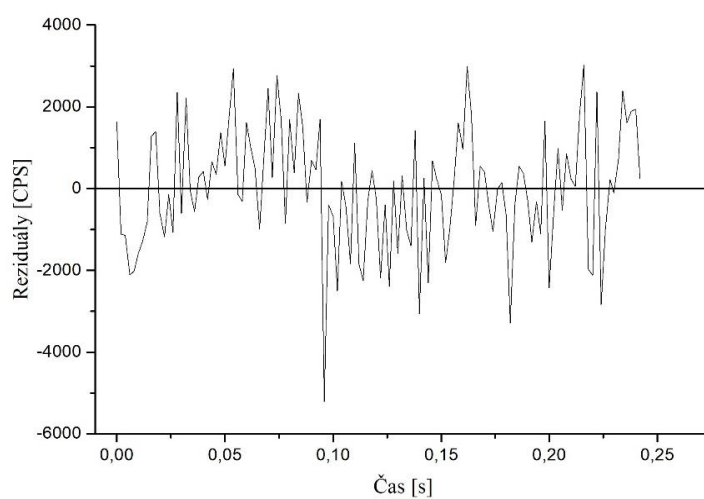
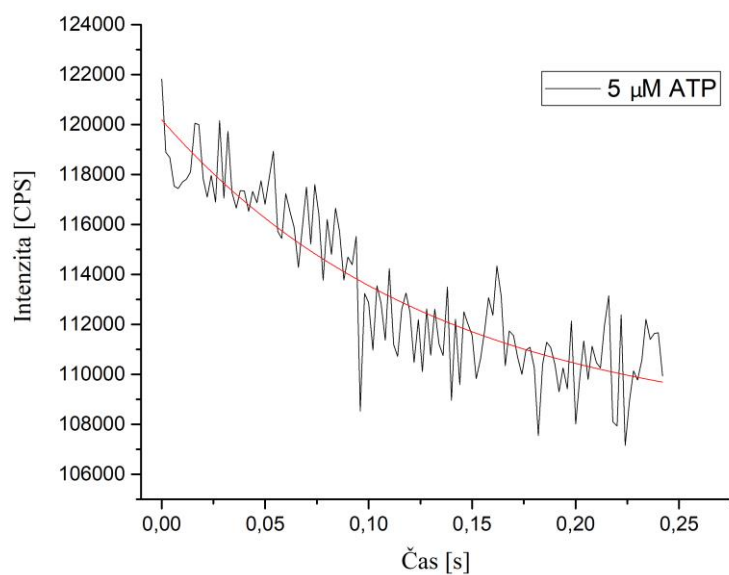
Obrázok 42: Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentracii 2,5 μM ATP metódou stopped-flow pre časť (hore). Reziduálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).



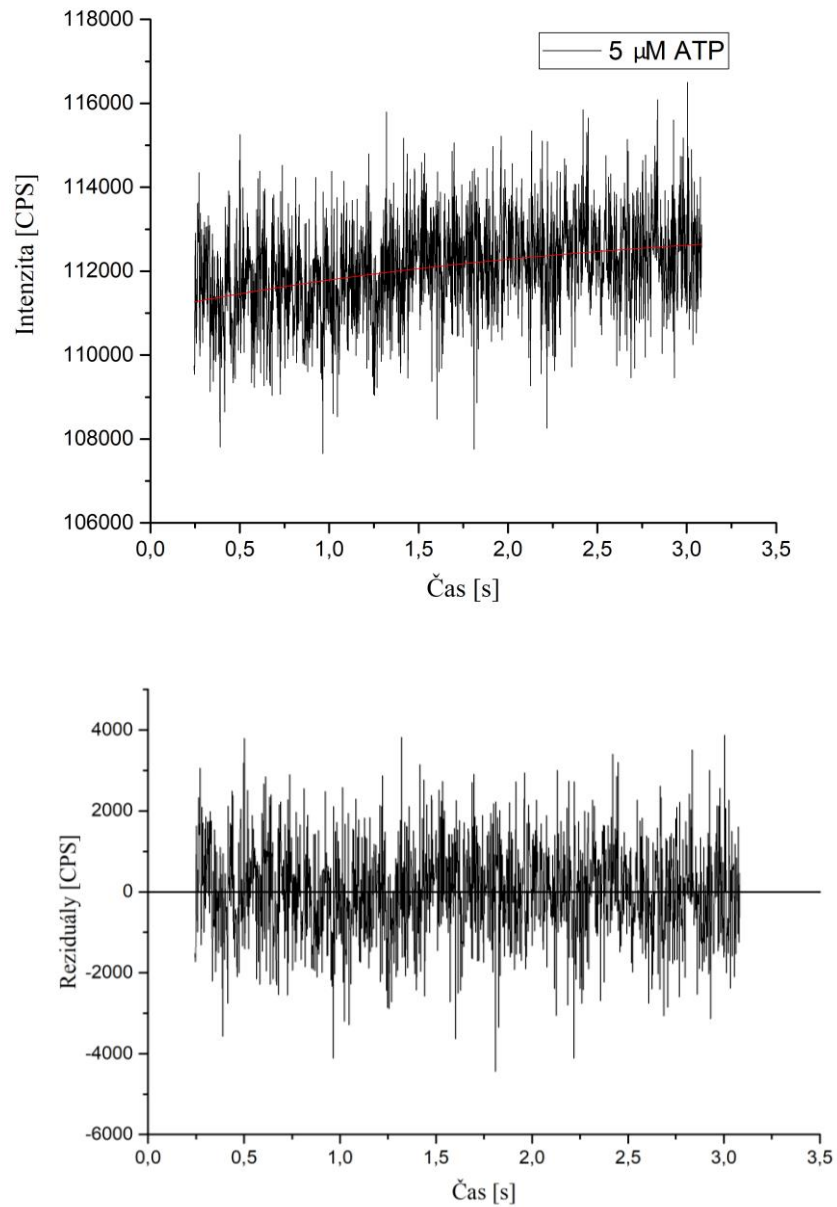
Obrázok 43: *Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentracii 2,5 μM ATP metódou stopped-flow pre časť nárastu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).*



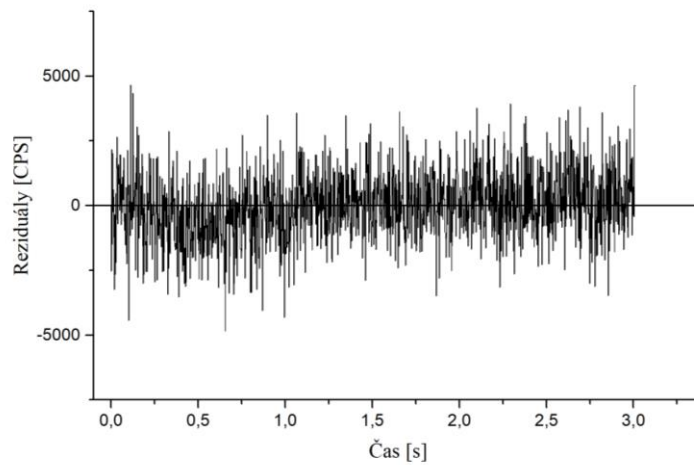
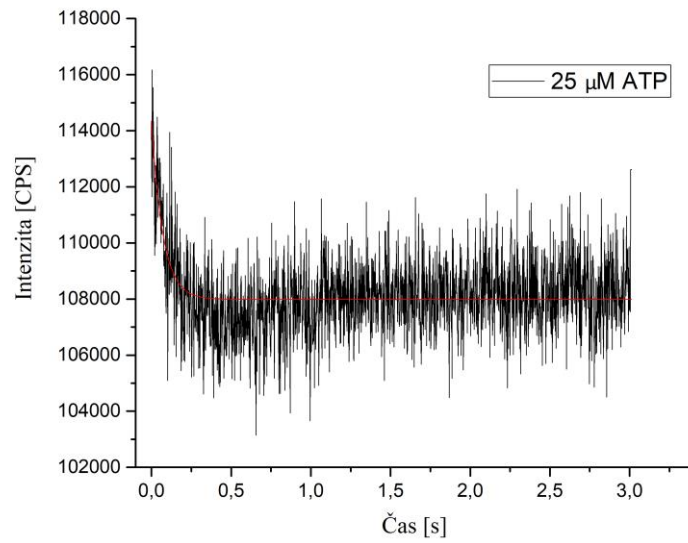
Obrázok 44: *Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácii 5 μM ATP metódou stopped-flow (hore). Reziiduálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).*



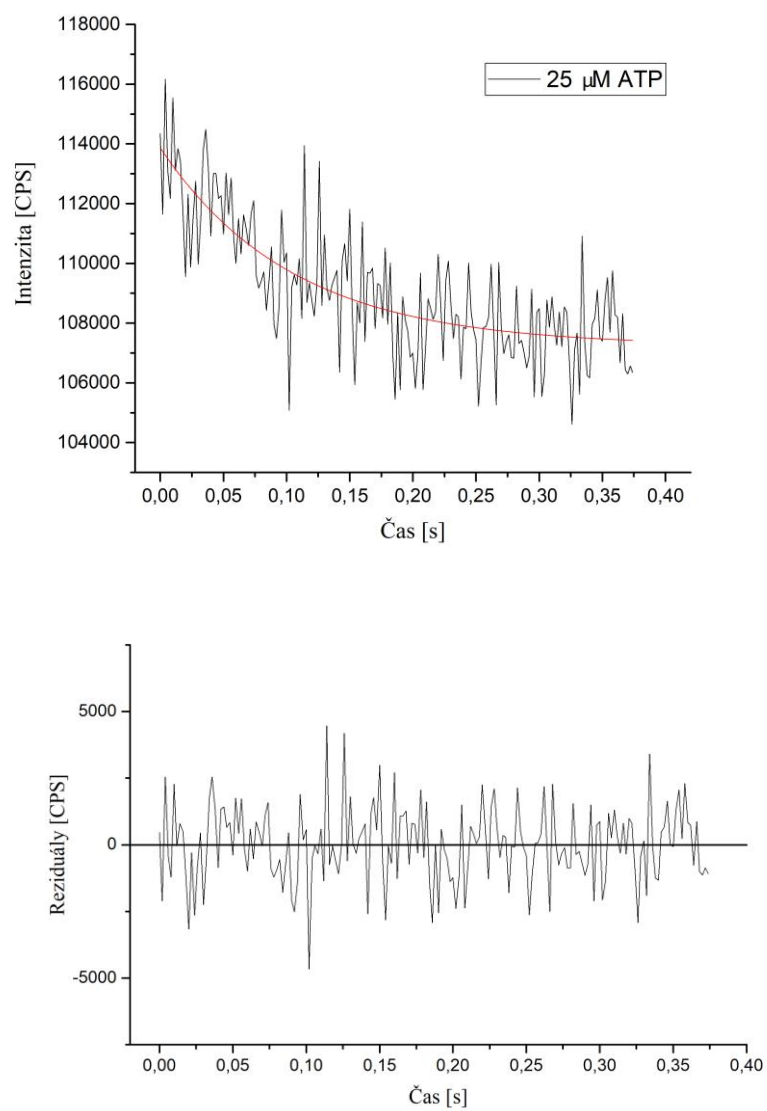
Obrázok 45: Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácii $5 \mu\text{M}$ ATP metódou stopped-flow pre časť poklesu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).



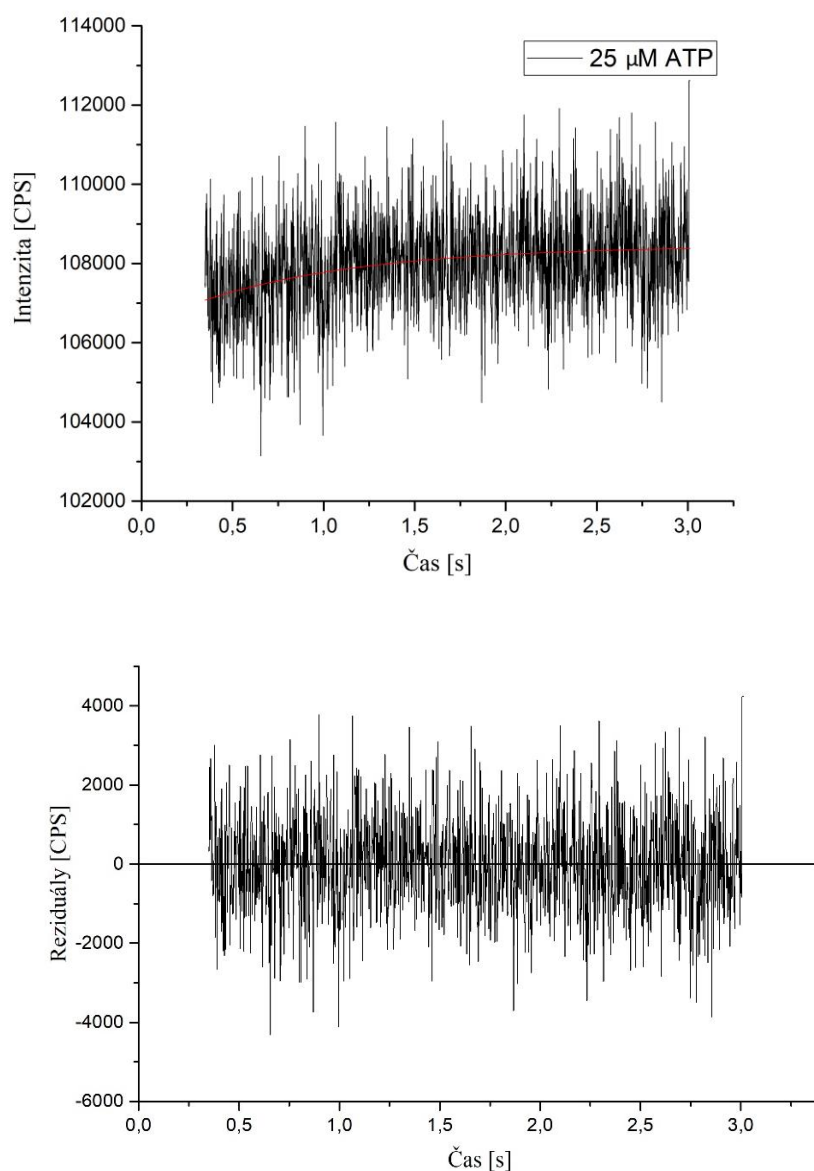
Obrázok 46: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácii 5 μM ATP metódou stopped-flow pre časť nárastu intenzity (hore). Reziiduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



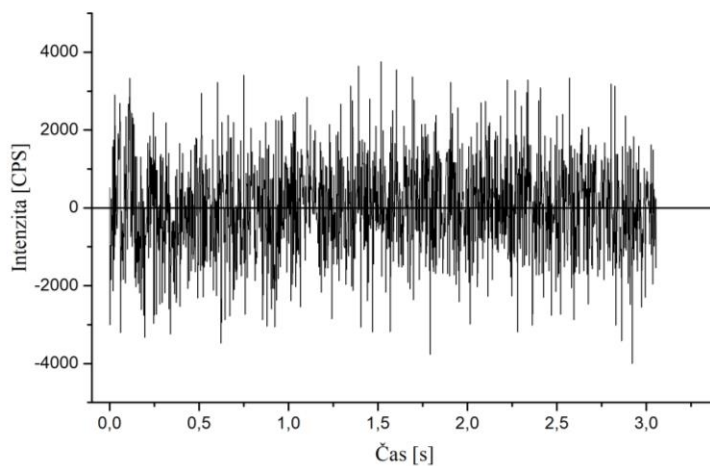
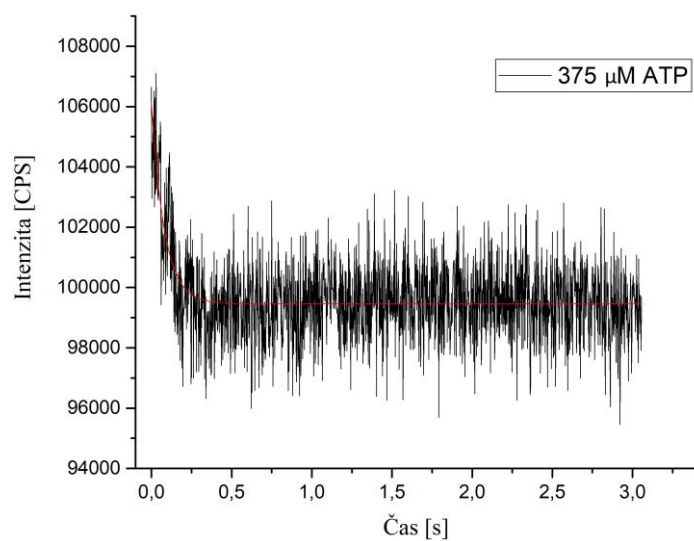
Obrázok 47: Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácií 25 μM ATP metódou stopped-flow (hore). Reziduálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).



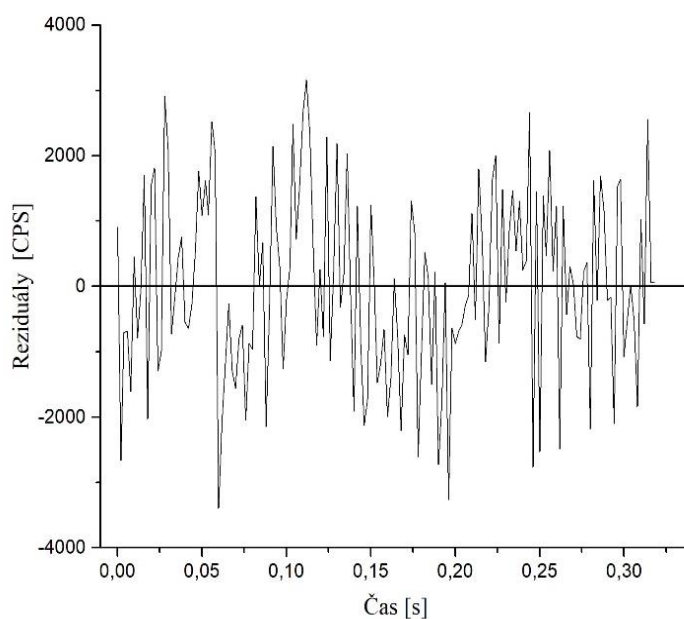
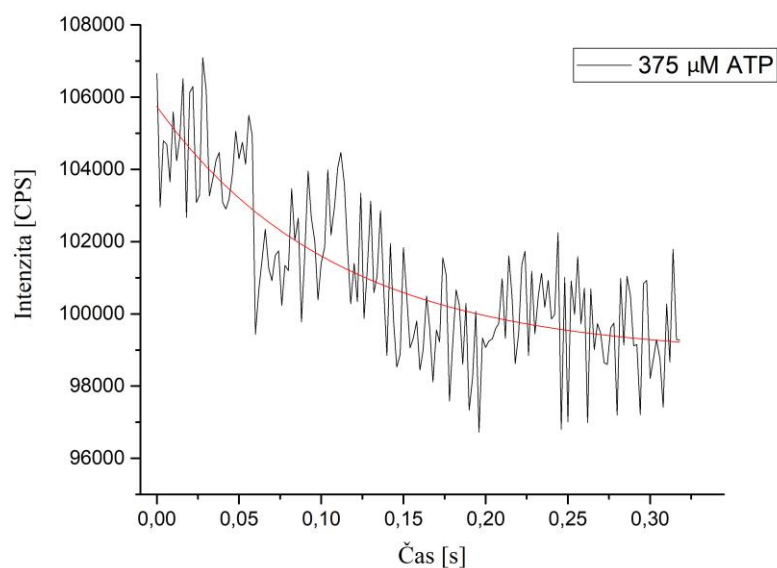
Obrázok 48: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácií 25 μM ATP metódou stopped-flow pre časť poklesu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



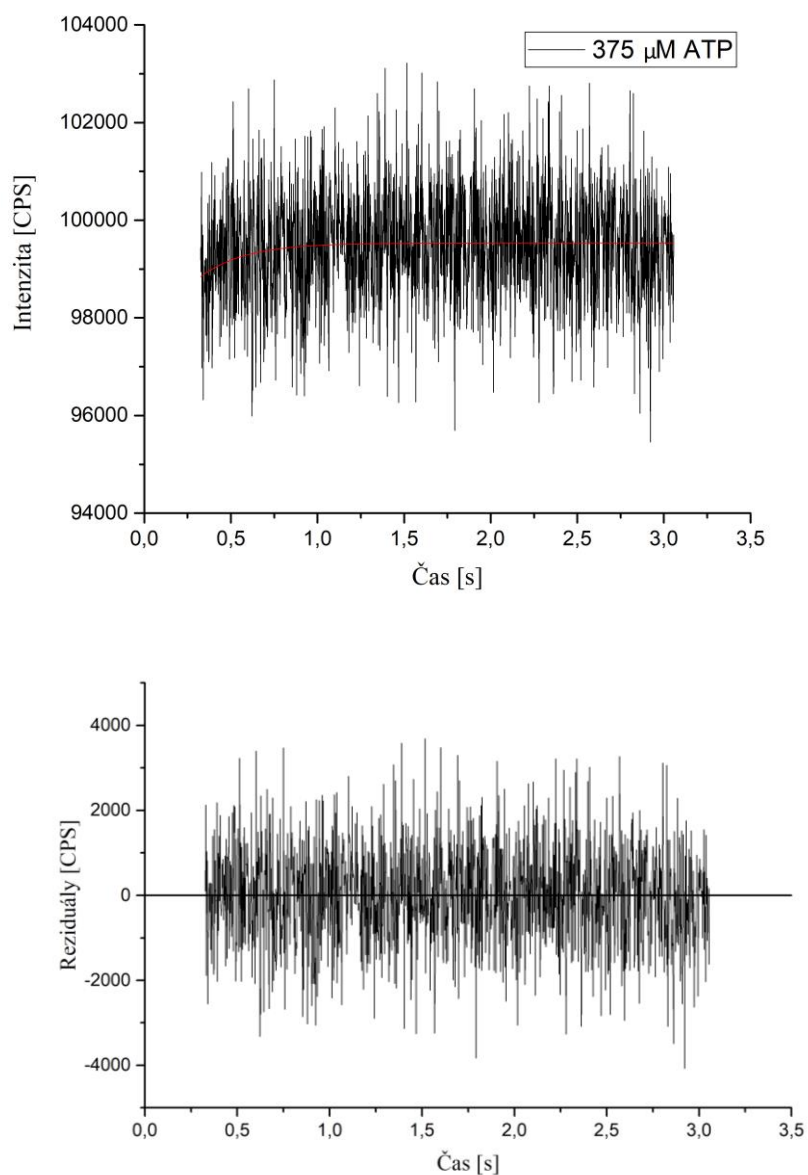
Obrázok 49: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácií 25 μM ATP metódou stopped-flow pre časť nárastu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



Obrázok 50: Nameraná zmena intenzity fluorescence Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácii 375 μM ATP metódou stopped-flow (hore). Reziduálny diagram dvojexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescence (dole).



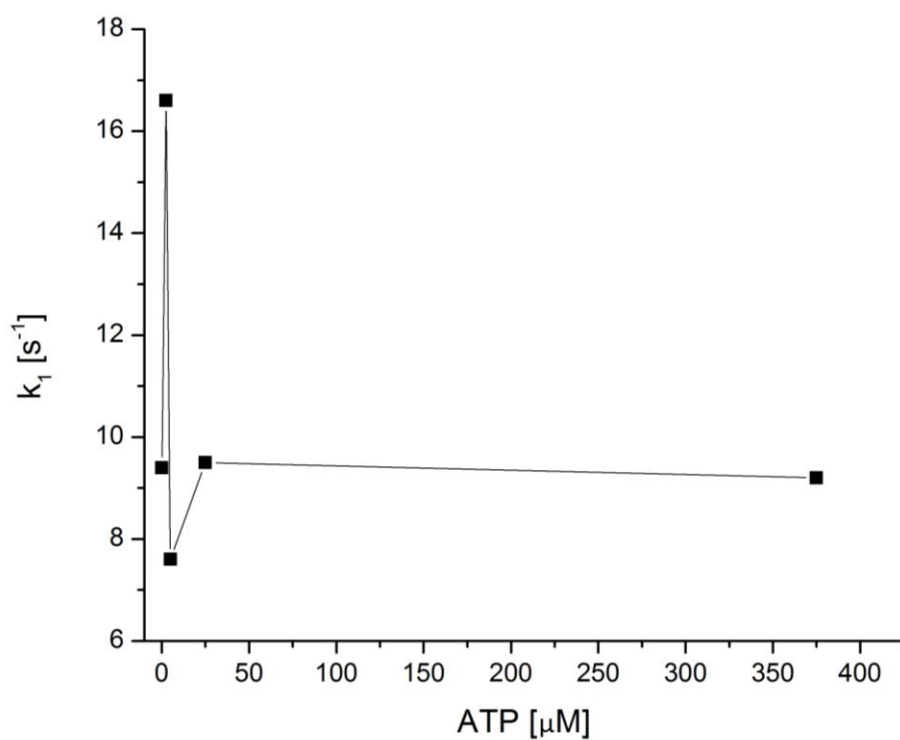
Obrázok 51: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na⁺/K⁺-ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentrácií 375 μM ATP metódou stopped-flow pre časť poklesu intenzity (hore). Reziduálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).



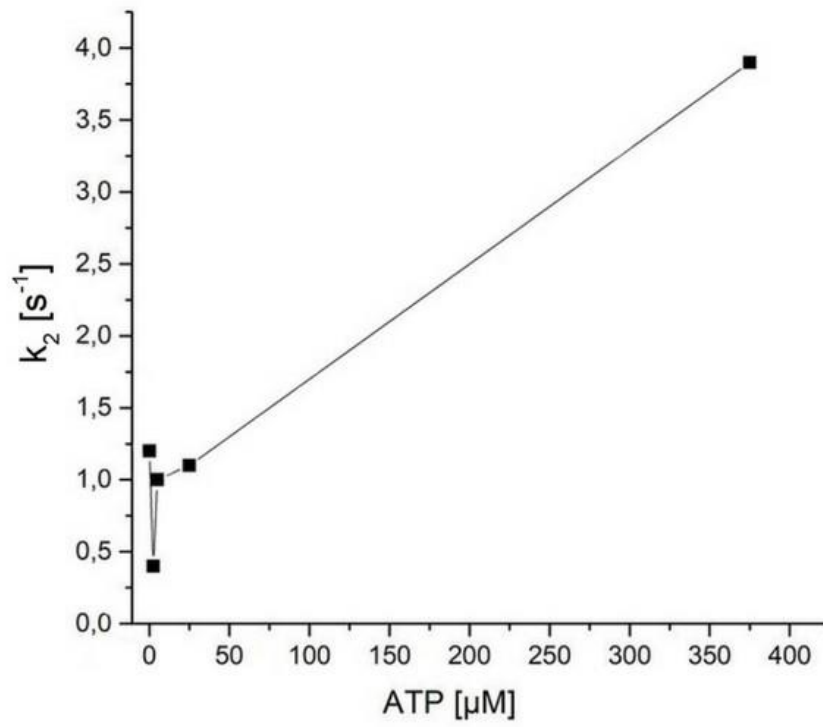
Obrázok 52: Nameraná zmena intenzity fluorescencie Na^+/K^+ -ATPázy z prasacích obličiek nekovalentne značenej s RH421 (750 nM) pri koncentracii 375 μM ATP metódou stopped-flow pre časť nárastu intenzity (hore). Reziďuálny diagram jednoexponenciálneho fitu zmeny intenzity fluorescencie (dole).

Tabuľka 4: Rýchlostné konštanty pre rôzne koncentrácie ATP, k_1 predstavuje pokles intenzity fluorescence, k_2 predstavuje nárast intenzity fluorescence.

ATP	k_1 [s^{-1}]	k_2 [s^{-1}]
25 nM	$9,4 \pm 0,5$	$1,2 \pm 1,8$
2,5 μ M	$16,6 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,6$
5 μ M	$7,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 1,8$
25 μ M	$9,5 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$
375 μ M	$9,2 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,5$



Obrázok 53: Závislosť rýchlostnej konštanty na koncentrácii ATP, pre časť poklesu intenzity fluorescence.



Obrázok 54: Závislosť rýchlostnej konštanty na koncentrácii ATP, pre časť nárastu intenzity fluorescencie.

Diskusia

V tejto práci bola sledovaná kinetika fluorescenčne značenej prasacej Na⁺/K⁺-ATPázy pomocou techniky stopped-flow v prítomnosti Na⁺, Mg²⁺ kationov a ATP. Pri meraní bolo použité nekovalentne viažuce sa fluorescenčné farbivo RH421.

Pri sledovaní kinetiky Na⁺/K⁺-ATPázy je možné sledovať jej pomalú alebo rýchlu fázu. Dominantná rýchla fáza je pripisovaná fosforylácií enzýmu a jeho následnej konformačnej zmene: E₁ATP(Na⁺)₃ → E₂P(Na⁺)₃ + ADP, teda hovoríme o prechode E₁ → E₂. Rýchlostná konštanta pre túto fázu je okolo 180 - 200 s⁻¹. Pomalá fáza predstavuje prechod pumpy zo stavu E₂ → E₁ a až po tomto kroku nastáva fosforylácia enzýmu s rýchlostnou konštantou v rozmedzí 8 - 30 s⁻¹ (Kane a kol. 1997; Lüpfer a kol. 2001).

Na rýchlostné konštanty má vplyv aj koncentrácia Na⁺. S rastúcou koncentráciou narastá rýchlostná konštanta od hodnoty nerozoznateľnej od nuly, v prípade absencie Na⁺ až k hodnote 200 s⁻¹ pri 130 mM Na⁺. Toto správanie je zhodné s ideou zhrnutou v Post - Albersovom modeli, teda fosforylácia Na⁺/K⁺-ATPázy môže nastať len vtedy, ak sú obsadené všetky Na⁺ väzbové miesta. V prípade pomalej fázy sa taktiež ukazuje nárast rýchlostnej konštanty s narastajúcou koncentráciou Na⁺ iónov, dosahuje hodnoty v rozmedzí 30 – 45 s⁻¹ pri 130 mM (Kane a kol. 1997, Clarke a kol. 1995). Z tohto dôvodu bola zvolená 130 mM koncentrácia Na⁺ iónov pre tento experiment.

Pre podmienky, ktoré boli nastavené v tomto experimente, bol očakávaný konformačný stav E₁, ale výsledky rýchlostných konštánt a ani zjavný pokles intenzity fluorescencie tomu nenasvedčuje. Intenzita fluorescencie je rozdielna v závislosti od toho, v akom konformačnom stave sa Na⁺/K⁺-ATPáza nachádza. Jednotlivé konformačné zmeny sú sprevádzané rozdielnou zmenou fluorescencie. Prípady merania s RH421 je uvedený v kapitole 5. Pokles intenzity fluorescencie je očakávaný v dvoch prípadoch b alebo c (uvedené v kapitole 5). V tomto experimente nastal pravdepodobne stav b, ktorý ponúka dve možnosti zmeny konformácie: E₂ → E₁(Na⁺)₃ alebo E₂ATP → E₁(Na⁺)₃ ATP. Enzým sa nachádzal v stave E₂ a bola meraná pomalá fáza, oproti očakávanému stavu E₁ a rýchlej fázy. Tento problém môže byť spojený s nedostatočne dlhým časom inkubácie sondy a enzýmu. Namerané hodnoty sú však stále príliš nízke oproti literatúre, čo môže súvisieť so zmenou niektorých podmienok (rôzne

zloženie pufru, odlišná koncentrácia Mg^{2+} , odlišné laboratórne podmienky) merania voči literatúre.

So zvýšením koncentrácie RH421 sa očakával nárast intenzity fluorescencie a taktiež najvyššia rýchlostná konštanta. Tento predpoklad súhlasí s výsledkami merania a s hodnotami uvedenými v tabuľke 3 a na obrázku 36.

V ďalšom meraní sa menila koncentrácia ATP a bola použitá 750 nM RH421, pretože pri tejto koncentrácii bola najvyššia rýchlostná konštanta $11,0 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$. Podľa tabuľky 5 najvyššia rýchlostná konštanta bola dosiahnutá pri koncentrácii 2,5 μM ATP, $16,6 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$. Pri porovnaní výsledkov s literatúrou pre ATP v rozmedzí koncentrácií 0 - 500 μM sú rýchlostné konštanty pre rýchlu fázu a pomalú fázu približne rovnaké ako u zvyšujúcej sa koncentrácie Na^+ a to v rozmedzí $160 - 180 \text{ s}^{-1}$ pre rýchlu fázu, pre pomalú fázu sú v rozmedzí $30 - 45 \text{ s}^{-1}$ (Kane a kol. 1997). Pre rôzne koncentrácie ATP sa odporúča opätovné premeranie, prípadne zmena podmienok merania. Výsledky môžu byť tiež ovplyvnené dlhou dobou skladovania enzýmu pri -80°C (približne 10 mesiacov od izolácie).

Záver

Cieľom práce bolo meranie kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy metódou stopped-flow. Meranie prebiehalo s mikrozomálnou frakcou Na^+/K^+ -ATPázy, ktorá bola ako súčasť tejto práce izolovaná z prasacích obličiek. Sledovala sa kinetika Na^+/K^+ -ATPázy inkubovaná s fluorescenčnou sondou RH421 za určitých podmienok, teda jednalo sa o zmenu koncentrácie fluorescenčnej sondy RH421 a ATP.

Pri meraní s RH421 je dôležité dbať na koncentráciu tejto sondy, pretože μM koncentrácia inhibuje Na^+/K^+ -ATPázu (Frank a kol. 1996). V tejto práci bola použitá koncentrácia v nM rozsahu. Pri zvyšujúcej sa koncentrácii sondy sa zvyšovala intenzita fluorescencie a taktiež bola zistená pri vyššej koncentrácii rýchlejšia časová odozva. Avšak namerané hodnoty pri daných podmienkach nedosahujú hodnoty udávané v literatúre. To môže súvisieť s inými laboratórnymi podmienkami. Pre ďalšie merania bola vybraná najvyššia koncentrácia RH421 a to 750 nM, pre ktorú bola nameraná najvyššia rýchlostná konštanta $11,0 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$.

Pri zmene koncentrácie ATP neboli dosiahnuté porovnateľné výsledky s literatúrou. Aj v tomto prípade sa očakávala vyššia hodnota rýchlostnej konštanty pri vyššej koncentrácii ATP, avšak takéto výsledky neboli namerané. Najvyššia hodnota rýchlostnej konštanty bola nameraná pre koncentráciu 2,5 μM ATP, teda pri desaťkrát nižšej koncentrácii ako pri koncentrácii, pre ktorú bola optimalizovaná metóda. Pre toto meranie sa navrhuje ďalšia optimalizácia merania ako úprava podmienok pre meranie.

Zoznam použitej literatúry

Albers R. W. (1967): Biochemical aspects of active transport. *Annual Review of Biochemistry* 36, 727-756.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): Molecular biology of the cell. Fourth edition. Garland Science, New York, USA.
ISBN 978-0-8153-4106-2.

Aronson P. S. (1985): Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger. *Annual Review of Physiology* 47, 545-560.

Arystarkhova E., Wetzel R. K., Asinovski N. K., Sweadner K. J. (1999): The gamma subunit modulates Na(+) and K(+) affinity of the renal Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 33183-33185.

Axelsen K. B., Palmgren M. G. (1998): Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 46, 84-101.

Baginsky E., Foa P., Zak B. (1966): Determination of phosphorus. *Clinical Chemistry* 12, 546-552.

Benga G. (2009): Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: Past, present, and future. *The Journal of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 61, 112-133.

Bland R. D., Boyd C. A. R. (1986): Cation transport in lung epithelial cells derived from fetal, newborn and adult rabbits. *Journal of Applied Physiology* 61, 507-515.

Bradford M. M. (1976): Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brooks S. P. J., Espinola T., Suelter C. H. (1984): Theory and practical application of coupled enzyme reactions: one and two auxiliary enzymes. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 62, 945-955.

Bühler R., Sturmer W., Apell H.-J., Lauger P. (1991): Charge translocation by the Na,K-pump: I. Kinetics of local field changes studied by time-resolved fluorescence measurements. *The Journal of Membrane Biology* 121, 141-161.

Camerino D. C., Desaphy J. F., Tricarico D., Pierno S., Liantonio A. (2008): Therapeutic approaches to ion channel diseases. *Advances in Genetics* 64, 81-145.

Clarke R. J. (1997): Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1327, 269-278.

Clarke R. J., Khalid M. A. A. (2015): Pump, Channel and Transporters: Methods of Functional Analysis, First edition. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA. ISBN 978-1-118-85880-6.

Clarke R., Zouni A., Holzwarth J.F. (1995): Voltage sensitivity of fluorescent probe RH421 in model membrane system. *Biophysical Journal* 68, 1406-1415.

Domaszewicz W., Appel H.J. (1999): Binding of the third Na⁺ ion to the cytoplasmic side of the Na,K-ATPase is electrogenic. *Febs Letters*, 485, 7034-7044.

Eccleston J. F., Hutchinson J. P., White H. D. (2001): Stopped-flow techniques, in: S.E. Harding and B.Z. Chowdhry (Eds.), Protein-Ligand Interactions: Structure and Spectroscopy. A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford. ISBN-13: 978-0199637508, 201-237.

Esmann M. (1988): ATPase and phosphatase activity of Na⁺/K⁺-ATPase: molar and specific activity, protein determination. *Methods Enzymol* 156, 105-115.

Farley R. A., Tran C. M., Carilli C. T., Hawke D., Shively J. E. (1984): The amino acid sequence of a fluorescein-labeled peptide from the active site of (Na,K)-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 9532–9535.

Fedosova N. U. (2016): Apurification of Na,K-ATPase from Pig Kidney, in: Maiké Bublitz (Ed.), P-Type ATPases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, ISBN-13: 978-1493931781, Humana Press New York, str. 5-10.

Fiske C. H., Subbarow Y. (1925): Colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry* 66, 375-400.

Frank J., Zouni A., van Hoek A., Visser A. J. W. G., Clarke R. J. (1996): Interaction of the fluorescent probe RH421 with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and with Na⁺,K⁺-ATPase membrane fragments. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1280, 51–64.

Geering K. (2006): FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 290, 241-250.

Gibson Q. H., Milnes L. (1963): Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. *Biochemical Journal* 91, 161-172.

Gomez-Hens A., Perez-Bendito D. (1990): The stopped-flow technique in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* 242, 147-177.

Grycova L., Sklenovsky P., Lansky Z., Janovska M., Otyepka M., Amler E., Teisinger J., Kubala M. (2009): ATP and magnesium drive conformational changes of the Na⁺/K⁺-ATPase cytoplasmic headpiece. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* 1788, 1081–1091.

Higgins C. F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8, 67-113.

Hirata T., Nakamura N., Omote H., Wada Y., Futai M. (2000): Regulation and reversibility of vacuolar H⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 386-389.

Chance B. (1940): The accelerated flow method for rapid reactions, Part I. Analysis. *Journal of The Franklin Institute* 229, 455–476.

Janovská M., Kubala M., Šimánek V., Ulrichová J. (2010): Interaction of sanguinarine and its dihydroderivative with Na⁺/K⁺-ATPase. Complex view of old problem. *Toxicology Letters* 196, 56-59.

Jorgensen P. L., Andersen J. P. (1988): Structural basis for E₁-E₂ conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. *The Journal of Membrane Biology* 103, 95–120.

Kane D. J., Fendler K., Grell E., Bamberg E., Taniguchi K., Froehlich J., Clarke R. J. (1997): Stopped-flow kinetic investigations of conformational changes of pig kidney Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* 36, 13406–13420.

Kapakos J. G., Steinberg M. (1982): Fluorescent labeling of (Na⁺+K⁺)-ATPase by iodoacetamido-fluorescein. *Biochimica et Biophysica Acta* 693, 493–496.

Kaplan J. H. (1985): Ion movements through the sodium pump. *Annual Review of Physiology* 47, 535-544.

Kaplan J. H. (2002): Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry* 71, 511-535

Kotyk A., Amler E. (1995): Na,K-adenosinetriphosphatase: the paradigm of a membrane transport protein. *Physiological Research* 44, 261-274.

Kubala M. (2006): ATP-binding to P-type ATPases as revealed by biochemical, spectroscopic and crystallographic experiments. *Proteins* 64, 1-12.

Langer G. A. (1982): Sodium-calcium exchange in the heart. *Annual Review of Physiology* 44, 435-449.

Lingrel J. B., Orlowski J., Shull M. M., Price E. M. (1990): Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 38, 37–89.

Lingrel J. B., Kuntzweiler T. (1994): Na⁺,K⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 19659-19662.

Liptay W. (1969): Electrochromism and solvatochromism. *Angewandte Chemie International Edition in English* 8; 177-188.

Loew L. M., Scully S., Simpson L., Waggoner A.S. (1979): Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential. *Nature* 281, 497-499.

Loew L. M., Simpsons L. (1981): Charge shift probes of membrane potential: a probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophysical Journal* 34, 353-356.

MacKnight A. D. C., Leaf A. (1977): Regulation of cellular volume. *Physiological Reviews* 57, 510-573.

Manuál výrobcu k prístroju stopped-flow RX2000, 2013.

McLaughlin S. (1977): Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. *Current Topics in Membranes Transports* 9, 71-144.

Moller J. V., Juul B., le Maire M. (1996): Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1286, 1-51.

Morth J. P., Pedersen B. P., Buch-Pedersen M. J., Andersen J. P., Vilsen B., Palmgren M. G., Nissen P. (2011): A structural overview of the plasma membrane

Na⁺/K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 60-70.

Morth J. P., Pedersen B. P., Toustrup-Jensen M. S., Sorensen T. L., Petersen J., Andersen J. P., Vilsen B., Nissen P. (2007): Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450, 1043-1049.

Mottola H. A. (1988): Kinetics aspects of analytical chemistry (Chemical Analysis Series, Vol 96). Willey: New York, 12-178.

Murata, T., Yamato I., Kakinuma Y., Leslie A. G. W. and Walker J. E. (2005): Structure of the rotor of the V-type Na⁺ -ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* 308, 654-659.

Nagai M., Taniguchi K., Kangawa K., Matsuo H., Nakamura S., Iida S. (1986): Identification of N-[p-(2-benzimidazolyl)phenyl]maleimide-modified residue participating in dynamic fluorescence changes accompanying Na⁺,K⁺-dependent ATP hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 13197–13202.

Otsu N. (1979): A threshold selection method from gray-level histograms. *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on.* 9, 62-66.

Palmgren M. G., Axelsen K. B. (1998): Evolution of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1365, 37-45.

Pedersen P. A., Rasmussen J. H., Jorgensen P. L. (1996): Consequences of mutations to the phosphorylation site of the alpha-subunit of Na,K-ATPase for ATP binding and E1-E2 conformational equilibrium. *Biochemistry* 35, 16085–16093.

Rea P. A., Li Z. S., Lu Y. P., Drozdowicz Y. M., Martinoia E. (1998): From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 727-760.

Rolfe D. F. S., Brown G. C. (1997): Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* 77, 731-758.

Rutherford E. (1897): The velocity and rate of recombination of the ions of gases exposed to röntgen radiation. *Philosophical Magazine* 44, 422–440.

Sehgal P., Plesen C., Moller J. V. (2016): ATPase activity measurements by an enzyme-coupled spectrophotometric assay, in: Maiké Bublitz (Ed.), P-Type ATPases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. ISBN-13: 978-1493931781, Humana Press New York, str. 105-107.

Scheiner-Bobis G., Antonipillai J., Farley R. A. (1993): Simultaneous binding of phosphate and TNP-ADP to FITC-modified Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* 32, 9592–9599.

Sims J., Waggoner A. S., Wang C. H., Hoffman J. F. (1974): Studies on the mechanism by which cyanine dye measures membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 13, 3315-3330.

Skou J. C. (1957): The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nerve. *Biochimica et Biophysica Acta* 23, 394-401.

Skou J. C., Esmann M. (1981): Eosin, a fluorescent probe of ATP binding to the (Na⁺+K⁺)-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 647, 232–240.

Skou J. C., Esmann M. (1983): The effects of Na⁺ and K⁺ on the conformational transitions of (Na⁺+K⁺)-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 746, 101–113.

Smirnova I. N., Faller L. D. (1993): Role of Mg²⁺ ions in the conformational change reported by fluorescein 5'-isothiocyanate modification of Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* 32, 5967–5977.

Sun-Wada G. H., Wada Y., Futai M. (2004): Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochimica et Biophysica Acta* 1658, 106–114.

Swarts H. G. P., Koenderink J. B. (2016): ATPase activity measurements using radiolabeled ATP, in: Maiké Bublitz (Ed.), P-Type ATPases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press New York, str. 121-122, ISBN-13: 978-1493931781

Sweadner K. J. (2016): Colorimetric assay of Na,K-ATPase, in: Maiké Bublitz (Ed.), P-Type ATPases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press New York, str. 90, ISBN-13: 978-1493931781.

Sweadner K. J., Rael E. (2000): The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics* 68, 41–56.

Thomas R. C. (1972): Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiological Reviews* 52, 563-594.

Toyoshima M., Nakasako H., Nomura H., Ogawa H. (2000): Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 angstrom resolution. *Nature* 405, 647-655.

Ullrich K. J. (1979): Sugar, amino acid, and Na⁺ cotransport in the proximal tubule. *Annual Review of Physiology* 41, 181-195.

Vasiliou V., Vasiliou K., Nebert D. W. (2009): Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics* 3, 281-290.

Waggoner A. S. (1979): Dye indicators of membrane potential. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 8, 47-68.

Waggoner A. S., Sirkin D. W., Tolles R. L., Wang C. H. (1975): Rate of membrane penetration of potential-sensitive dyes. *Biophysical Journal*, 15.

Waggoner A.S., Grinvald A. (1977): Mechanisms of rapid optical changes of potential sensitive dyes. *Annals of the New York Academy of Science* 303, 217-241.

Walderhaug M. O., Post R. L., Saccomani G., Leonard R. T., Briskin D. P. (1985): Structural relatedness of three ion-transport adenosine triphosphatases around their active sites of phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 3852-3859.