

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

KATEDRA EXPERIMENTÁLNEJ FYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Detekcia interakcií Na^+/K^+ -ATPázy s biologicky aktívnymi
látkami metódami fluorescenčnej spektroskopie**

Vypracoval: Miroslav Huličiak

Študijný obor: Biofyzika

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

Ďakujem RNDr. Martinovi Kubalovi, Ph.D. a Mgr. Marike Janovskej za ich obetavú pomoc a spoluprácu pri tvorbe tejto práce.

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne, pod vedením RNDr. Martina Kubalu, Ph.D. a Mgr. Mariky Janovskej a za použitia literatúry uvedenej v záveru práce.

V Olomouci dňa 26.4.2010

.....

Zoznam skratiek

ADP – adenzindifosfát

Amidol – 2,4-diaminofenol dihydrochlorid

ATP – adenzin trifosfát

DFDS – difenyldiselenid

DFDT – difenylditelurid

EDTA – etyléndiamintetraoctová kyselina

m⁷Gua – 7-metyl guanín

m⁷Guo – 7-metyl guanozín

NMR – nukleárna magnetická rezonancia

P_i – anorganický fosfát

SDS – dodecylsulfát sodný

SERCA - Ca²⁺-ATPáza nachádzajúca sa v sarko(endo)plazmatickom retikulu

TCA – kyselina trichlóroctová

TNP-ATP - 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenyl) adenzín 5'-trifosfát, fluorescenčný analóg ATP

Zhrnutie

V prvej časti sa táto práca venuje transportným ATPázam, ich rozdeleniu a ich funkciám v bunke. Ďalej sa zameriava na delenie ATPáz P-typu a špeciálne sa venuje Na^+/K^+ -ATPáze, jej štruktúre, mechanizmu, jej úlohe v metabolizme a miestami pre väzbu prirodzených ligandov a inhibítorov. V druhej časti sa práca venuje biologicky významným látkam, ktoré majú vplyv na aktivitu tohto enzýmu a metódam na meranie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy, ktoré pomáhajú odhaliť interakcie týchto látok s pumpou. Špeciálne sa venujeme vplyvu dvoch toxických látok difenyldiselenidu a difenylditeluridu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy. Na odhalenie týchto interakcií sme využili dve metódy. Ako prvú sme použili absorbančnú metódu založenú na farebnej reakcii vyvinutého fosfátu s niektorými látkami. Ako druhú sme použili fluorescenčnú metódu založenú na zmene intenzity fluorescencie v dôsledku reakcie niektorých látok s fosfátom. V závere práce sú porovnávané výsledky dosiahnuté oboma metódami s doposiaľ publikovanou literatúrou. Podarilo sa nám potvrdiť, že difenyldiselenid a difenylditelurid sa pri koncentráciách nižších ako $100\mu\text{M}$ správajú ako inhibítory aktivity Na^+/K^+ -ATPázy. Naopak pri vyšších koncentráciách sa tieto látky správajú ako aktivátory tohto enzýmu, čo doposiaľ nebolo publikované. V porovnaní metód na meranie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy sa nám lepšie javí fluorescenčná metóda, pretože bola presnejšia a menej náročnejšia na čas a materiály.

Abstract

The first part of this work is devoted to ATPases, their sorting and their cellular functions. Farther, it is focused on P-type ATPases and specially on the Na^+/K^+ -ATPase, its structure, mechanism, role in metabolism and binding sites for native ligands and inhibitors. The second part deals with biologically important chemicals that influence the activity of this enzyme and methods of measuring the activity of Na^+/K^+ -ATPase, which help to reveal these interactions of this chemical with pump. We pay special attention to the influence of two toxic chemicals diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride on the activity of Na^+/K^+ -ATPase. To reveal this interaction, we used two methods. The first was absorption method based on color reaction of emerged phosphate with some chemicals. The second method was a fluorescence method, which is based on intensity change of fluorescence resulting from reaction of some chemicals with phosphate. The end of my work deals with comparison of results coming from both methods and contemporary literature. We confirmed that diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride cause inhibition of activity Na^+/K^+ -ATPase by the concentration less than $100\mu\text{M}$. On the other hand, when the concentration is higher, these chemicals behave as activators of this enzyme, which has not been reported yet. Fluorescence method seems to be better for measuring the activity of Na^+/K^+ -ATPase, because it was more precise and less time- and materials-consuming.

Obsah

1. Úvod	1
2. Teória	2
2.1 Transportné ATPázy	2
2.1.1 ATPázy P-typu.....	3
2.1.2 ATPázy F-typu.....	5
2.1.3 ATPázy V-typu	6
2.1.4 ATPázy ABC-typu	7
2.2 Na^+/K^+ -ATPáza	10
2.2.1 Kinetický mechanizmus Na^+/K^+ -ATPázy	11
2.2.2 Štruktúra Na^+/K^+ -ATPázy.....	12
2.3 Meranie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy.....	21
2.4 Interakcia Na^+/K^+ -ATPázy s biologicky aktívnymi látkami.....	22
2.5 Difenyldiselenid.....	23
2.6 Difenylditelurid	23
3. Materiály a metódy.....	24
3.1 Na^+/K^+ -ATPáza	24
3.2 Difenyldiselenid a difenylditelurid	24
3.3 Absorbačná metóda	25
3.4 Fluorescenčná metóda	26
4. Výsledky a diskusia.....	28
4.1 Absorbančná metóda	28
4.2 Fluorescenčná metóda	30
4.3 Porovnanie metód.....	36
5. Záver.....	37
6. Referencie.....	38

1. Úvod

Život bez proteínov tak ako ho poznáme by nebol možný. Proteíny majú v organizme niekoľko nezastupiteľných funkcií, ako napríklad štruktúrnu, enzýmovú, regulačnú, pohybovú, transportnú a iné. Bez proteínov by nebol možný aktívny transport. Aktívny transport cez bunkovú membránu sa uskutočňuje proti spádu elektrochemického gradientu a preto naň bunka spotrebúva energiu. Tento transport sa uskutočňuje pomocou membránových proteínov. Jedným z nich je aj Na^+/K^+ -ATPáza. Jedná sa o integrálny membránový proteín, ktorý počas hydrolýzy jednej molekuly ATP transportuje tri katióny sodíka von z eukaryotickej bunky výmenou za dva katióny sodíka. Tento jedinečný proteín patrí do rodiny ATPáz P-typu, ktorých spoločnou vlastnosťou je, že vytvárajú fosforylačný medzistupeň počas reakcie s ATP na konzervovanom aspartyle. ATPázy, patriace do tejto rodiny majú taktiež podobnú štruktúru. Nedávno sa ešte poznatky o štruktúre Na^+/K^+ -ATPázy získavali najmä porovnávaním so štruktúrou Ca^{2+} -ATPázy, ktorej štruktúra je známa od roku 2000 (Toyoshima a kol. 2000). Od roku 2007 je už známa aj kryštálová štruktúra Na^+/K^+ -ATPázy v rozlíšení 3,5Å (Morth a kol.). Nedávno boli publikované ďalšie kryštály v rozlíšení 2,4Å (Shinoda a kol. 2009) a 2,8Å (Ogawa a kol. 2009). Na^+/K^+ -ATPáza je esenciálny proteín pre všetky živočíchy a preto látky, ktoré majú vplyv na jeho aktivitu, sú veľmi významné. Cieľom mojej práce bolo vypracovať metódu na meranie aktivity Na^+/K^+ - ATPázy, ktorá by sa dala čo najefektívnejšie aplikovať na naše podmienky. Ďalej pomocou zistenej metódy na meranie aktivity zistiť vplyv toxických látok difenyldiselenid a difenylditelurid na aktivitu pumpy. V tejto práci som sa venoval dvom metódam na meranie aktivity Na^+/K^+ - ATPázy a následne zistil, aký vplyv majú difenyldiselenid a difenylditelurid na aktivitu pumpy.

2. Teória

2.1 Transportné ATPázy

Transportné ATPázy sa nachádzajú v biologických membránach všetkých živých organizmov od baktérií, húb, rastlín až po živočíchy. Cez membránu transportujú veľa rozličných typov iónov a molekúl a na tento transport využívajú energiu z ATP, preto dostali spoločný názov transportné ATPázy. Niektoré dokonca pracujú opačne a vytvárajú ATP. Dnes sa transportné ATPázy delia na 4 hlavné skupiny: F–typu, V–typu, ABC–typu a P–typu. Ako prvá bola objavená Na^+/K^+ -ATPáza v roku 1957. Objavil ju dánsky prírodovedec Jens Christian Skou v krabích nervoch (Skou 1957). Neskôr bolo zistené, že vytvára kovalentný fosforylačný medzistupeň a podľa tohto medzistupňa dostala názov celá skupina transportných ATPáz, teraz známych ako P–typ. V roku 1958 Efran Racker a jeho kolegovia publikovali práce na mitochondriách (Pullman a kol. 1958). Spoločne publikovali, že ATPázy z hovädzieho srdca v mitochondriálnych fragmentoch dokážu vytvárať ATP syntézou z ADP a P_i . ATPázy boli pomenované F_1 . Dnes sa už vie, že celá pumpa sa skladá z častí F_1 a F_0 a nazýva sa ATP-syntáza. Bola nájdená v baktériách, rastlinných chloroplastoch a mitochondriách. Dnes je súčasťou skupiny ATPáz F–typu. V roku 1981 japonský vedci Yoshinori Ohsumi a Yasuihiro Anraku publikovali objav ATPázy z vakuoly kvasiniek a položili tak základ k vytvoreniu ďalšej skupiny transportných ATPáz V–typu (Ohsumi a Anraku 1981). Štvrtá a ďaleko najväčšia skupina transportných ATPáz je označovaná ABC. Prvýkrát boli zorganizované a zaradené do superrodiny Christopherom Higginsom a jeho kolektívom v roku 1986 (Higgins a kol 1986).

2.1.1 ATPázy P-typu

ATPázy P-typu vytvárajú rodinu integrálnych membránových proteínov, ktoré aktívne transportujú katióny alebo aminofosfolipidy cez membránu, v spojení s hydrolýzou ATP. Sú tiež často nazývané E_1 - E_2 ATPázy, pretože počas svojho cyklu sa vyskytujú v dvoch hlavných konformačných stavoch E_1 a E_2 . Počas katalytického cyklu je γ -fosfátová skupina z ATP presunutá na konzervované aspartylové rezíduum enzýmu a vytvára fosfo-enzýmový medzistupeň, ktorý je charakteristický pre všetky ATPázy P-typu. Všetky ATPázy tejto rodiny potrebujú Mg^{2+} ako esenciálny kofaktor a všetky sú inhibované vanadátom. ATPázy P-typu sa delia na 5 podskupín a tie sa ďalej delia na jednotlivé triedy.

I. skupina obsahuje dve triedy: I.A a I.B.

I.A trieda zahŕňa ATPázy, ktoré sa nachádzajú len u prokaryot, všetky majú podobnú topológiu a mechanizmus.

I.B trieda obsahuje ATPázy, ktoré transportujú meď a ťažké kovy.

II. skupina je najpočetnejšia, pozostáva z tried II.A, II.B, II.C, II.D.

II.A trieda obsahuje vápnikové pumpy, ktoré viažu dva Ca^{2+} ióny, majú často regulačnú podjednotku a nachádzajú sa hlavne vo vnútorných membránach.

II.B trieda zahŕňa vápnikové pumpy, ktoré viažu jeden Ca^{2+} ión, ich súčasťou býva autoinhibičná terminálna doména a vyskytujú sa hlavne v plazmatickej membráne.

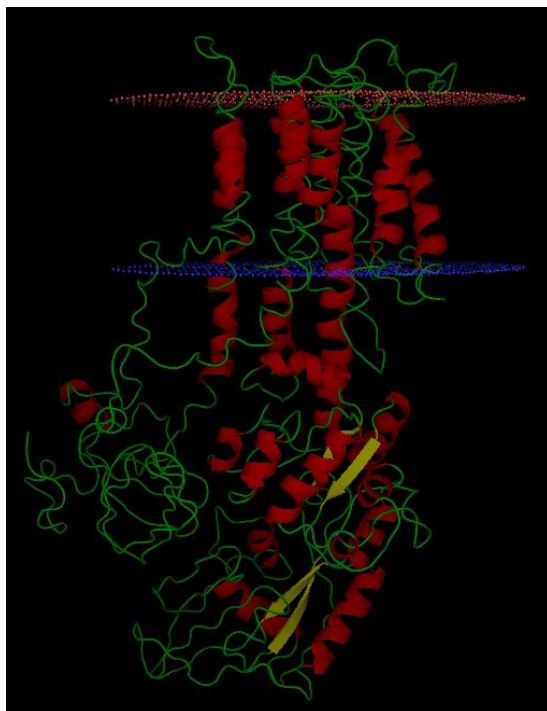
II.C trieda obsahuje Na^+/K^+ -ATPázu a H^+/K^+ -ATPázu

II.D trieda zahŕňa pumpy, ktoré sú zodpovedné za transport sodného alebo draselného iónu.

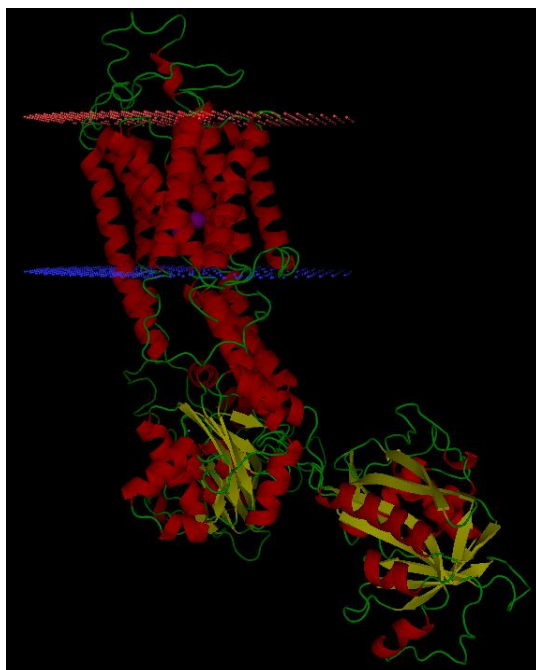
III. skupina pozostáva z ATPáz, ktoré majú podobnú topológiu ako ATPázy z II. skupiny. Obsahuje napríklad H^+ -ATPázu a Mg^{2+} -ATPázu, ktoré sa nachádzajú v bunkách húb a baktérií.

IV. skupina obsahuje aminofosfolipidovú ATPázu (flipázu). Tá sa bežne vyskytuje u prvokov a v bunkách cicavcov. Jej funkcia však zatiaľ nie je dôkladne preskúmaná.

V. skupina je poslednou skupinou ATPáz P-typu a obsahuje ATPázy, ktorých funkcia doposiaľ nebola celkom objasnená (Thever a Saier 2009).



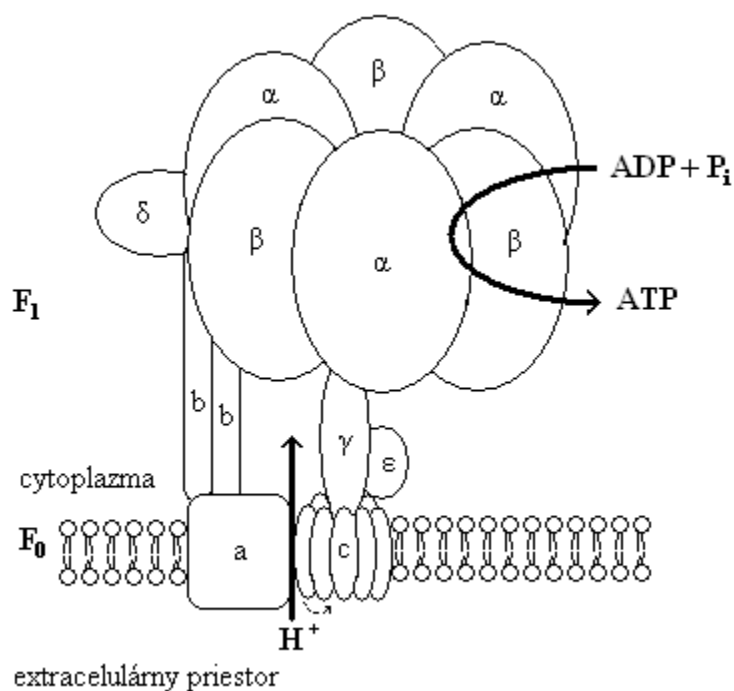
Obr. 1 H^+ -ATPáza z *Arabidopsis Thaliana*. Patrí do III. triedy ATPáz P-typu. Modrá rovina ohraňuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **3b8c**. Obrázky kryštálových štruktúr boli vytvorené pomocou programu PyMol.



Obr. 2 Ca^{2+} -ATPáza zo sarkoendoplazmatického retikula z *Oryctolagus Cuniculus*. Patrí do II.A triedy ATPáz P-typu. Ióny vápnika sú sfarbené fialovo. Modrá rovina ohraňuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **1su4**.

2.1.2 ATPázy F-typu

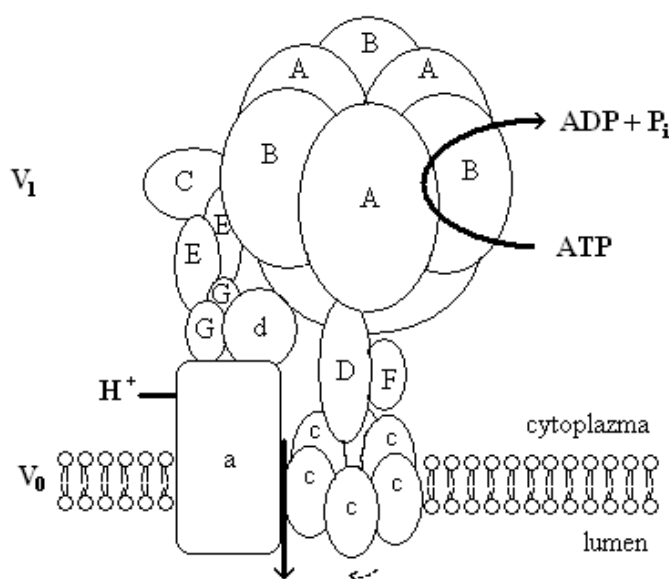
ATPázy F–typu sa vo väčšine buniek nesprávajú ako klasické ATPázy, ale ako ATP-syntázy. Dokážu vytvárať ATP z ADP a P_i za účasti Mg^{2+} a využívajú elektrochemický gradient protónov, ktorý bol vytvorený elektrónovým transportným reťazcom. Tieto ATP-syntázy sa nachádzajú v bakteriálnych membránach, v membránach mitochondrií a v tylakoidných membránach chloroplastov rastlín. Možno ich nájsť aj na povrchu niektorých endotelových buniek. ATP syntázy sú veľké proteínové komplexy pozostávajúce z dvoch domén nazývaných F_1 a F_0 . Obe časti F_1 aj F_0 slúžia ako motory, ktoré sú poháňané tokom protónov, pričom F_0 býva označovaný ako stator a F_1 ako rotor. Kryštálová štruktúra celej ATPázy zatiaľ ešte nebola publikovaná. Je zaujímavé, že štruktúra esenciálnych častí ATPsyntáz je konzervovaná cez celú evolúciu, aj keď sa ATPsyntázy v rôznych organizmoch mierne líšia (Pedersen 2008).



Obr. 3 Schématický obrázok ATPázy F-typu (Copyright Nelson a kol. 2002). Kryštálová štruktúra kompletnej ATPázy F-typu doposiaľ nebola publikovaná.

2.1.3 ATPázy V-typu

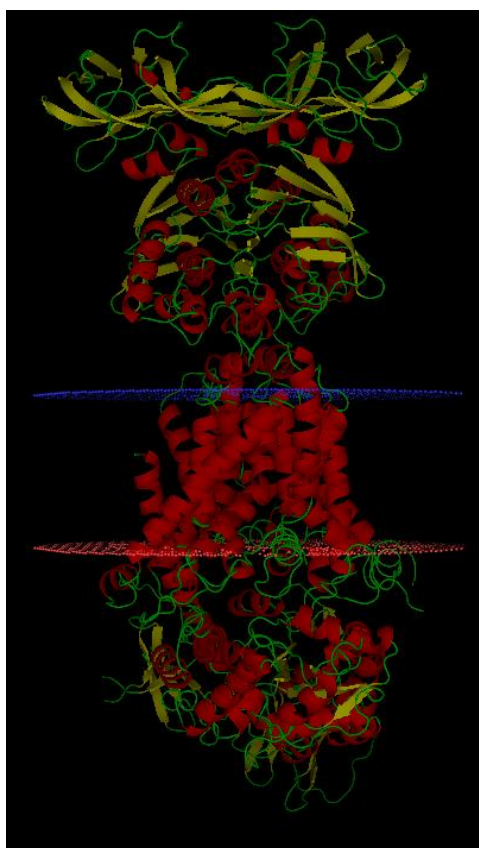
Život každej eukaryotickej bunky je závislý na funkcii ATPáz V–typu. Svojou štruktúrou a mechanizmom sú veľmi podobné ATPázam F–typu, dokonca niektoré podjednotky týchto ATPáz majú pravdepodobne spoločný pôvod. Hlavná štruktúra F–a V–typov ATPáz je celkom podobná. Oba enzýmy sú zložené z katalytických sektorov F_1 respektíve V_1 a membránových sektorov F_0 respektíve V_0 . Zatiaľ čo primárnou funkciou ATPáz F–typu je tvorba ATP, funkciou ATPáz V–typu je, že pracujú ako protónové pumpy. Sú súčasťou niektorých bunkových organel, ako napríklad lyzozómy, Golgiho aparát a vakuoly. Každá z týchto vnútrobunkových organel vyžaduje špecifické vnútorné pH, ktoré je vytvárané práve aktivitou ATPáz V–typu. Ďalej sa zúčastňujú niektorých esenciálnych funkcií medzi ktoré patria endocytóza, posttranslačná modifikácia, proteínová degradácia, a sekundárny transport (Saroussi a Nelson 2009).



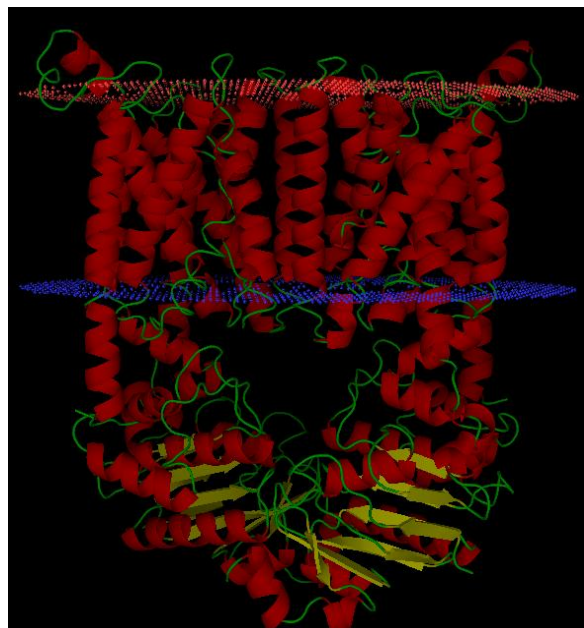
Obr. 4 Schématický obrázok ATPázy V-typu (Copyright Nelson a kol. 2002). Kryštálová štruktúra kompletnej ATPázy V-typu doposiaľ nebola publikovaná.

2.1.4 ATPázy ABC-typu

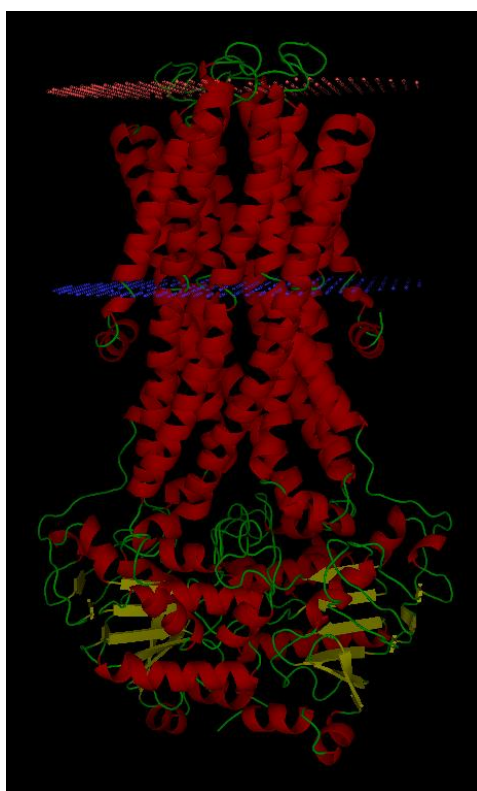
ABC ATPázy (názov dostali podľa skratky z anglického ATP binding cassette) sú integrálne membránové proteíny, ktoré využívajú energiu z väzby a hydrolýzy ATP na transport rozličných substrátov cez membránovú dvojvrstvu. Tvorí najväčšiu skupinu transportných ATPáz. ABC transportéry môžu byť rozdelené na dve hlavné skupiny. Prvou z nich sú ABC importéry, ktoré sú zodpovedné za transport látok do bunky a nachádzajú sa len u prokaryot. Druhou skupinu tvoria ABC exportéry a tie naopak zodpovedajú za transport látok opačným smerom. Ich základná štruktúra pozostáva z dvoch transmembránových domén, ktoré vytvárajú kanál pre substrát a dvoch cytoplazmatických domén, ktoré sú zodpovedné za väzbu a hydrolýzu ATP. Často transportujú viacero substrátov. V súčasnosti je známych viac ako 50 ATPáz ABC-typu a boli publikované niektoré kryštálové štruktúry týchto pozoruhodných ATPáz. Poruchy niektorých týchto ATPáz sú dokonca spájané s chorobami ako sú napríklad rakovina alebo cystická fibróza. (Hollenstein a kol. 2007).



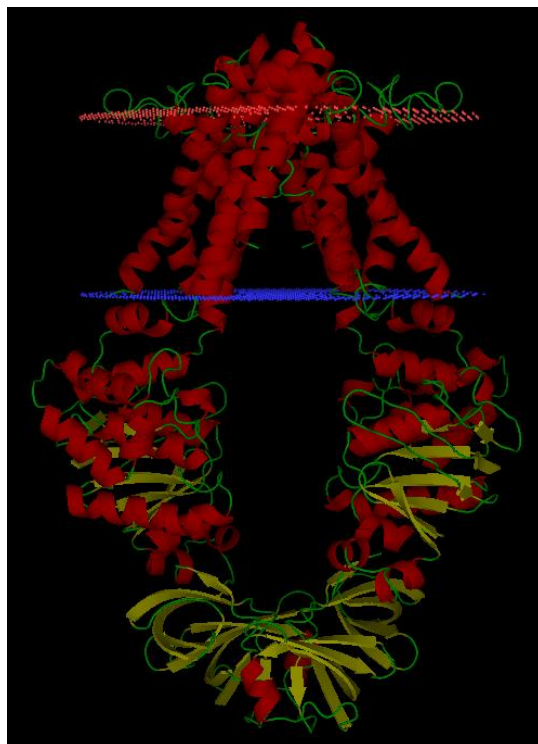
Obr. 5 Maltózový transportér z *Escherichia Coli*. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **2r6g**.



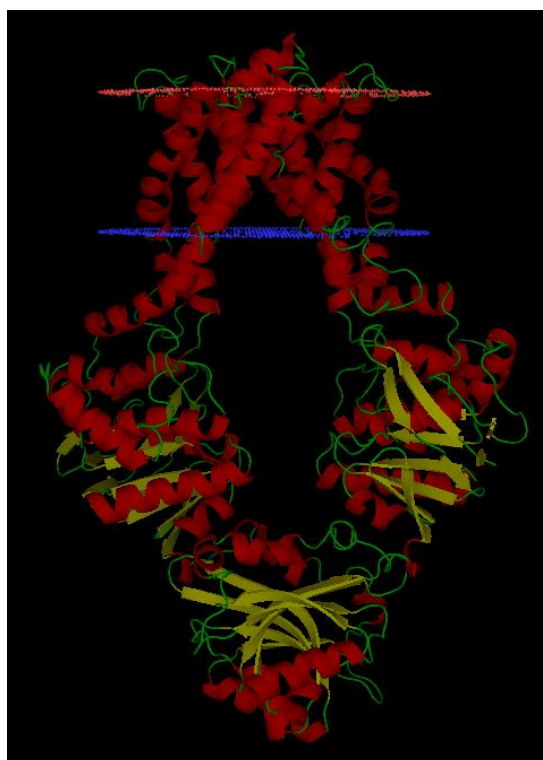
Obr. 6 Vitamín B12 transportér z *Escherichia Coli*. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **1I7V**.



Obr. 7 Lipidový exportér z *Salmonella typhimurium*. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **3b60**.



Obr. 8 Molybdátový importér z *Methanosarcina acetivorans*. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **3d31**.



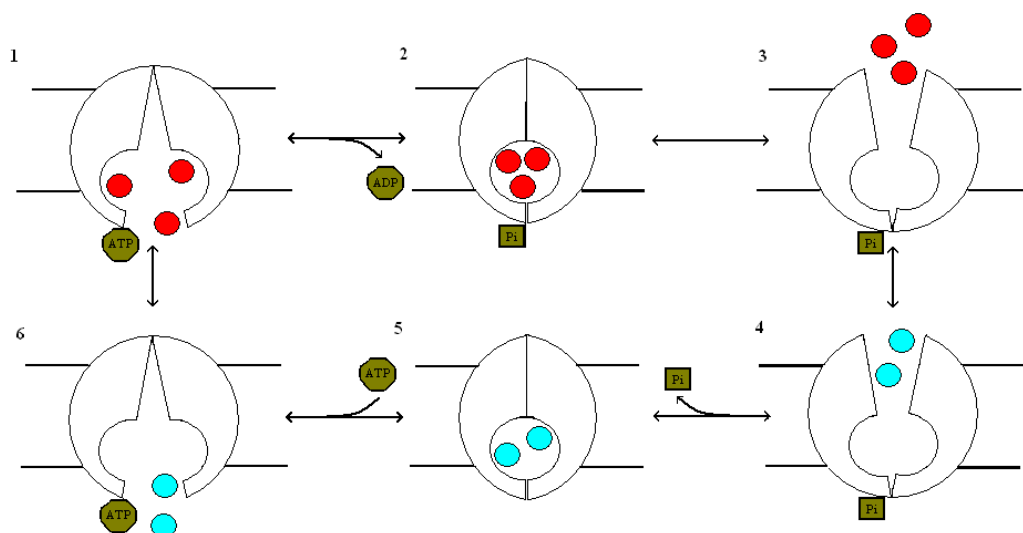
Obr. 9 Methionínový importér z *Escherichia Coli*. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **3dhw**.

2.2 Na^+/K^+ -ATPáza

Tento pozoruhodný enzým bol objavený dánskym prírodovedcom Jensom Christianom Skouom v roku 1957 v krabích nervoch (Skou 1957). Za objav tejto ATPázy obdržal v roku 1997 Nobelovu cenu. Na^+/K^+ -ATPáza patrí do rodiny ATPáz P-typu a je to najdlhší proteínový komplex z tejto rodiny. Vytvára koncentračný gradient pre draslík a sodík, ktorý je esenciálny pre všetky bunky živočíchov, výmenou dvoch draselných iónov za tri ióny sodíka cez plazmatickú membránu počas hydrolýzy jednej molekuly ATP. Nachádza sa v bunkách všetkých druhov živočíchov, pričom každá jedna bunka môže obsahovať 800 000 až 3 000 000 púmp. V pokoji spotrebúva 20 až 30% ATP bunky. Gradienty draslíka a sodíka sa využívajú na udržanie membránového potenciálu a na sekundárny transport. Pomocou sekundárneho transportu sa do bunky prenášajú napríklad ióny vápnika, molekuly glukózy a iné. Látky získané pomocou sekundárneho transportu sa ďalej využívajú v metabolizme, pomáhajú pri udržiavaní homeostázy, stáleho bunkového objemu, stáleho vnútrobunkového pH a stáleho osmotického tlaku. Transport je sprostredkovaný konformačnými zmenami enzýmu, ktoré sa označujú E_1 - E_2 . Pumpa v týchto dvoch stavoch selektívne viaže tri ióny sodíka a dva ióny draslíka pričom platí, že E_1 konformácia má vysokú afinitu k Na^+ a k ATP a nízku afinitu k K^+ . Naopak E_2 konformácia má vysokú afinitu k K^+ a nízku afinitu k Na^+ a k ATP. Pre správne fungovanie pumpy je nevyhnutný kofaktor Mg^{2+} , ktorý však nie je cez membránu prenášaný (Jorgensen a kol. 2003).

2.2.1 Kinetický mechanizmus Na^+/K^+ -ATPázy

Mechanizmus popisujúci translokáciu katiónov cez plazmatickú membránu je známy ako Albers–Postov mechanizmus (Obr. 10).



Obr.10 Albers-Postov mechanizmus.

Mechanizmus pozostáva z nasledujúcich krokov: 1. Na pumpu v E_1 konformácii na ktorej je naviazaná ATP sa z intracelulárneho priestoru naväzujú 3 sodné katióny. 2. ATP sa štiepi na ADP a P_i . Pumpa sa zatvára. 3. E_1 konformácia sa mení na E_2 konformáciu. Tri sodné katióny sú vypustené von. 4. Z extracelulárneho priestoru sa naväzujú 2 katióny draslíka. 5. Odpája sa P_i . Pumpa sa zatvára. 6. Naväzuje sa ATP. Pumpa sa otvára a vypúšťa katióny draslíka do intracelulárneho priestoru a cyklus sa môže zopakovať (Jorgensen a kol. 2003).

2.2.2 Štruktúra Na^+/K^+ -ATPázy

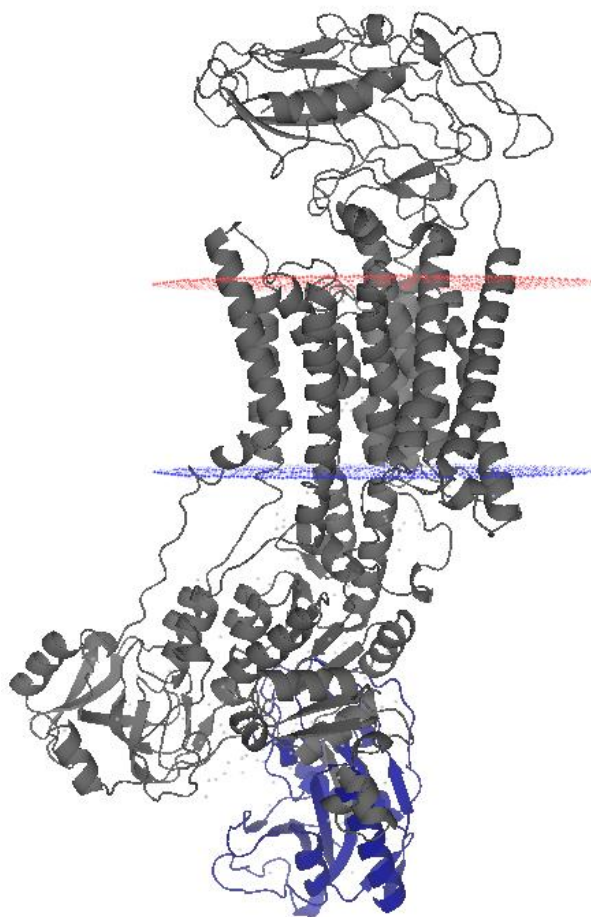
Väčšina ATPáz P–typu je tvorená jedným polypeptidovým reťazcom. Len dva enzýmy z tejto superodiny sú zložené z dvoch podjednotiek. Jedná sa o H^+/K^+ -ATPázu a Na^+/K^+ -ATPázu. Prvá podjednotka je označovaná ako α a je homologická s ostatnými ATPázami P–typu. Druhá podjednotka je označovaná ako β . Podjednotka β je glykoproteín zodpovedný za zabudovanie α podjednotky do plazmatickej membrány, je nevyhnutná pre správne zbalenie proteínu a pravdepodobne sa zúčastňuje aj pri transporte draselných iónov. Nedávno bola identifikovaná rodina malých tkanivovo špecifických transmembránových proteínov, ktorých sekvencia obsahuje FXYPD motív. Tento proteín pravdepodobne slúži ako regulátor Na^+/K^+ -ATPázy. Pri purifikácii enzýmu z obličiek býva tento regulačný proteín v komplexe s podjednotkami α a β a býva preto označovaný ako podjednotka γ . Stechiometrický pomer $\alpha:\beta:\gamma$ je 1:1:1 (Jorgensen a kol. 2003).

2.2.2.1 Podjednotka α

Podjednotku α tvorí desať transmembránových α helixov značených M1 až M10 a cytoplazmatická časť zložená z troch domén označovaných A (actuator), N (nucleotide-binding) a P (phosphorylation). Doména A sa skladá z polypeptidového reťazca N–konca a kľučky medzi M2 a M3. Domény P a N sú tvorené kľučkou medzi M4 a M5. Molekulová hmotnosť α podjednotky je asi 110kD a skladá sa z približne 1000 aminokyselín. Podjednotka α Na^+/K^+ -ATPázy je homologická s ostatnými podjednotkami ATPáz P–typu ako napríklad H^+/K^+ -ATPázy a Ca^{2+} -ATPázy. U ľudí bola nájdená v 4 izoformách ($\alpha 1$ – $\alpha 4$). Izoforma $\alpha 1$ bola nájdená vo všetkých bunkách, $\alpha 2$ sa vyskytuje v bunkách srdca, $\alpha 3$ v nervoch a izoforma $\alpha 4$ v semeníkoch. (Jorgensen a kol. 2003)

2.2.2.2 N doména

Táto doména môže byť izolovaná z enzýmu a naďalej si zachováva svoju terciálnu štruktúru. Štruktúra tejto domény bola odhalená už v roku 2003 nezávisle na sebe pomocou rentgenovej kryštalografie (Hakansson 2003) a pomocou NMR (Hilge 2003). N doména obsahuje miesto pre väzbu ATP. Je vložená do P domény a skladá sa z 8 listového antiparalelného β -sheetu. Z tohto β -sheetu sa vysúvajú dva dlhé segmenty, prvý sa nachádza medzi najvzdialenejšími listami tohto β -sheetu, teda listami 3 a 4 a druhý segment medzi listami 6 a 7. Každý z týchto segmentov obsahuje β -vlásenku a dva alebo tri helixy. Miesto pre väzbu ATP sa nachádza v hydrofóbnom vrecku ohraničenom listami 4,5,6 a 7. Na^+/K^+ -ATPáza oproti Ca^{2+} -ATPáze neobsahuje niektoré reziduá, prvý rozdiel je medzi listami 1 a 2, druhý rozdiel je na C-konci helixu Asp443-Cys457 (Jorgensen a kol. 2003).



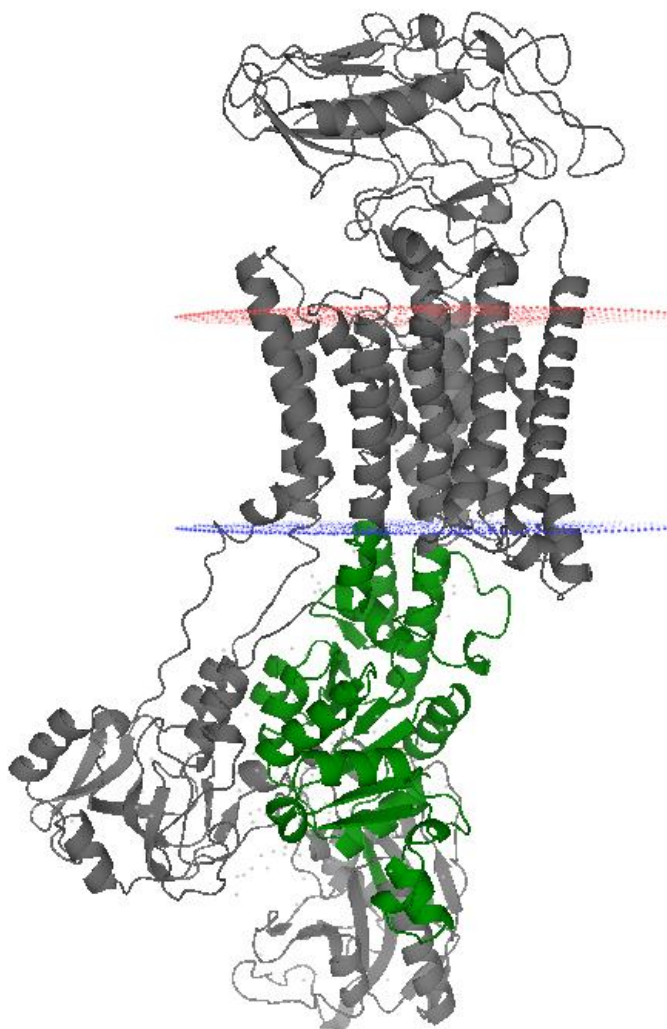
Obr.11 Na^+/K^+ -ATPáza. N-doména je sfarbená modrou farbou. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **2zXe**.

2.2.2.3 Miesto pre väzbu ATP

Na prvé pokusy odhaliť miesto pre väzbu ATP bolo používané chemické značenie. Použitím proteín-reaktívnych analógov 2-azido-ATP a 8-azido-ATP (Tran a kol. 1994) bolo možné označiť a identifikovať Gly502 a Lys480 ako možné miesta pre rozpoznanie ATP (McIntosh a kol. 1996). Experimenty s 5'-diphospho-5'-adenozínom a pyridoxal fosfátom ukazujú, že Lys480 rozpoznáva fosfátovú časť nukleotidu (Hinz a Kirley 1990). Ďalej bolo ukázané, že reziduá Lys501 a Lys515 ležia vo vnútri väzobného vrečka pre ATP (Gatto a kol. 1997). K odhaleniu ďalších aminokyselín zodpovedných za väzbu ATP prispel vývoj molekulárnej biológie. Pomocou bodových mutácií bolo ukázané, že mutácie reziduí Phe475, Lys 480, Lys501 a Arg544 vedú k podstatnému potlačenie aktivity enzýmu (Teremachi a kol. 2002). Mutačné experimenty s izolovanou N-doménou ukázali potlačenie afinity k TNP-ATP i k ATP po mutácii Glu446, Phe475 a Gln482 (Kubala a kol. 2003). Podobne, mutačné experimenty na SERCA odhalili, že mutácie Phe487, Arg489, Lys492 (McIntosh a kol. 1996), Lys515 (Maruyama a MacLennan 1988), Arg560 (Hua a kol. 2002) a v menšej miere i Gly516 (Maruyama a MacLennan 1988) viedli k potlačeniu väzby nukleotidu alebo aktivity enzýmu. Hodnotnú informáciu poskytla kombinácia mutácií a fotooznačujúcich experimentov. Odhaľuje, že Thr441, Glu442, Phe487, Arg489, Lys492, Lys515, Arg560 a Leu562 sú rozhodujúce reziduá pre interakciu ATP so SERCA (Clausen a kol. 2003, McIntosh a kol. 2003). Je však nutné poznamenať, že štúdie, v ktorých boli použité ATP analógy sa musia posudzovať veľmi opatrne. Súčasné mutačné štúdie ukazujú, že ATP časť z fluorescenčného analógu TNP-ATP zaujíma mierne odlišnú pozíciu vo väzbovom vrečku ako čisté ATP. Navyše bolo odhalené, že ATP analógy spôsobujú odlišné konformačné zmeny ako čisté ATP (Kubala 2006).

2.2.2.4 P doména

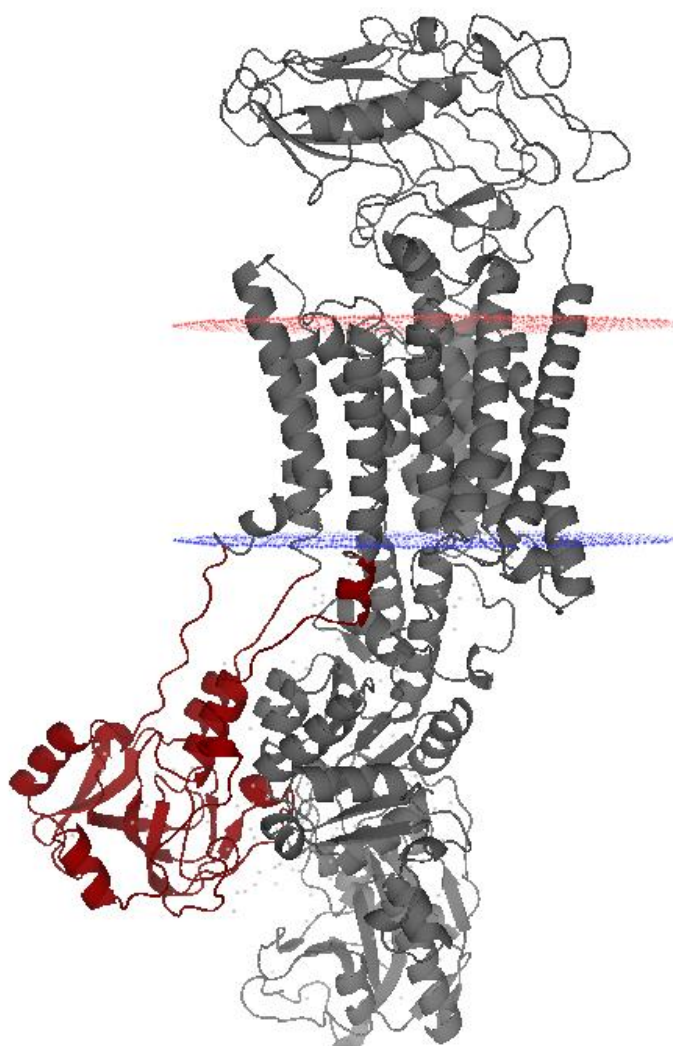
Túto doménu tvorí paralelný β -sheet, zložený zo šiestich listov vytvorených z dvoch Rossmannových motívov, ktoré sú zboku chránené jedným paralelným a jedným antiparalelným β -listom. Medzi druhým a tretím listom je vsunutá N doména. Na P doméne sa nachádzajú tri konzervované motívy. Sú usporiadané vedľa seba a blízko väzobných miest pre Mg^{2+} a fosfát. Prvý z týchto motívov, 369-DKTGTL v Na^+/K^+ -ATPáze obsahuje asparagovú kyselinu, ktorá je fosforylovaná počas katalýzy. Druhý konzervovaný motív je 610-TGD na treťom liste. Tretí motív, 708-TGDGVND, je ohraničený šiestym β -listom P domény kde sa nachádza Asp710, ktorý je potrebný pre väzbu Mg^{2+} (Jorgensen a kol. 2003).



Obr.12 Na^+/K^+ -ATPáza. P-doména je sfarbená zelenou farbou. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **2zXe**.

2.2.2.5 A doména

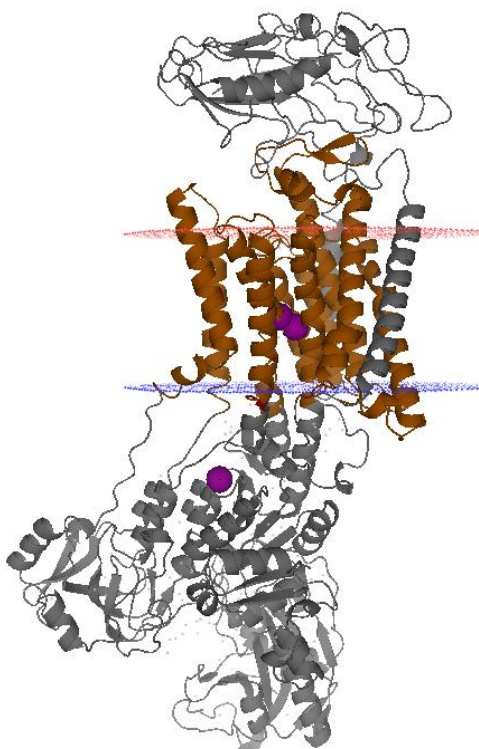
Táto doména je najmenšia cytoplazmatická doména α - podjednotky Na^+/K^+ -ATPázy. Skladá sa z N-koncového segmentu (Gly1–Gln88) a kľučky medzi M2 a M3 (Lys205–Glu312). V Ca^{2+} -ATPáze cytoplazmatická kľučka tvorí deformovanú zvinutú štruktúru, kde sa nachádzajú 2 krátke helixy zo 40 aminokyselín na N-koncovom segmente. Konzervované motívy na tejto doméne sú 212-TGES, 275-TPI, 357-VETLG a 827-RXPK (Jorgensen a kol. 2003). A doména pravdepodobne pomáha pri konformačných zmenách enzýmu z E_1 do E_2 . Ďalej sa pravdepodobne zúčastňuje pri procese fosforylácie (Grycova a kol. 2009).



Obr.13 Na^+/K^+ -ATPáza. A-doména je sfarbená červenou farbou. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **2zXe**.

2.2.2.6 Transmembránová oblasť

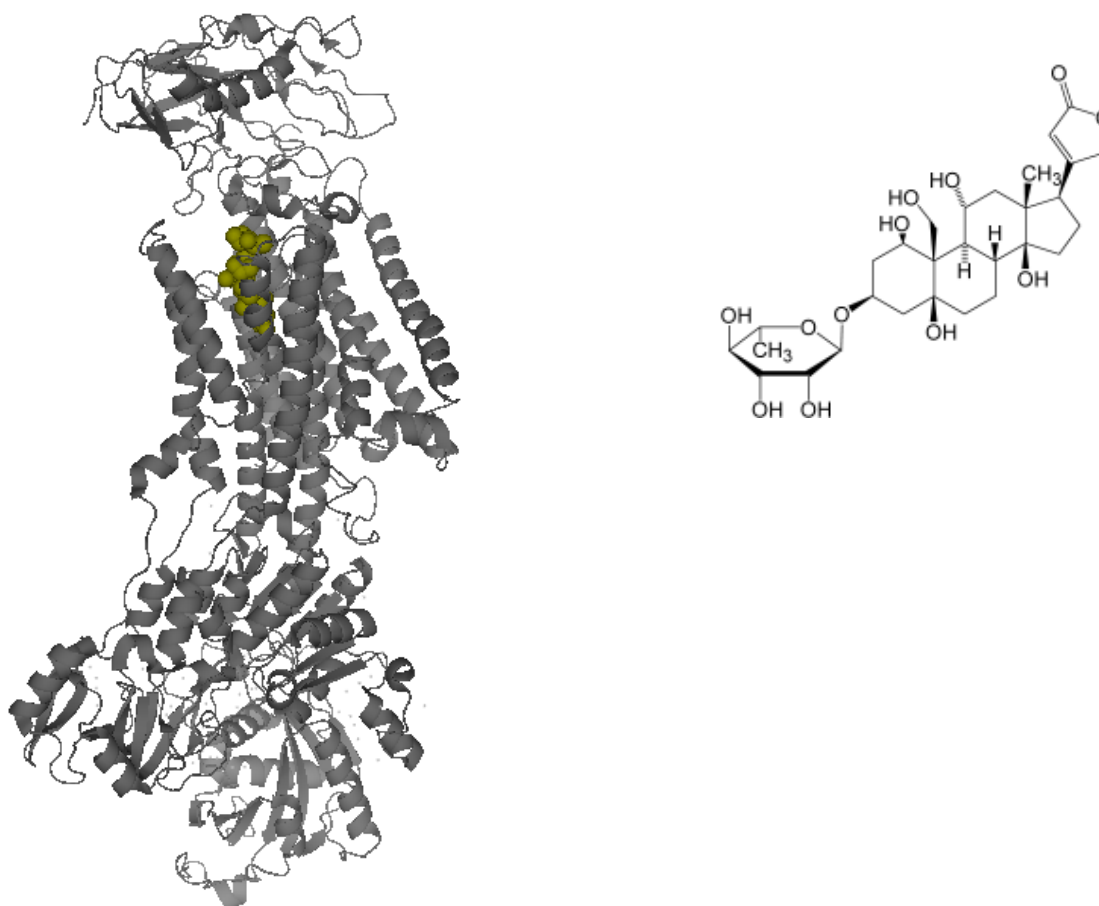
Túto oblasť tvorí 10 transmembránových α -helixov označovaných M1 až M10. Nachádzajú sa tu väzobné miesta pre ióny. Miesta pre väzbu draslíka sa označujú ako I a II. Miesto I esenciálne tvorí len päť kyslíkových atómov, pozostávajúcich z jedného hlavného reťazca rezidua Thr779, tromi postrannými reťazcami reziduí Ser782, Asn783 a Asp811 a jednej molekuly vody. Miesto II je posunuté o 1,3Å k extracelulárnej strane oproti väzobnému miestu I. Je tvorené tromi hlavnými reťazcami karboxylov Val329, Ala330 a Val 332, tromi alebo štyrmi atómami kyslíka z postranných reťazcov reziduí Asn783, Glu786, Asp811 a možno Glu334 a žiadna molekula vody k väzbe neprispieva. Tieto miesta sú zodpovedné aj za väzbu dvoch z trojice sodných iónov. Ďalej sa zistilo, že k väzbe sodíka prispieva aj Asp815 (Shimoda a kol. 2009). Ďalej bolo navrhnuté, že za väzbu tretieho sodného iónu zodpovedajú reziduá Tyr771(M5), Thr807(M6) a Glu954(M9) (Morth a kol. 2007). Je pravdepodobné, že priamy kontakt C konca s M5 a s kľučkou medzi M8 a M9 slúži na optimalizáciu väzby tretieho sodného iónu (Morth a kol. 2007).



Obr.14 Na^+/K^+ -ATPáza. Transmembránová oblasť je sfarbená hnedou farbou. Miesta pre väzbu iónov sú sfarbené fialovou farbou. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. PDB kód **2zXe**.

2.2.2.7 Miesto pre väzbu ouabainu

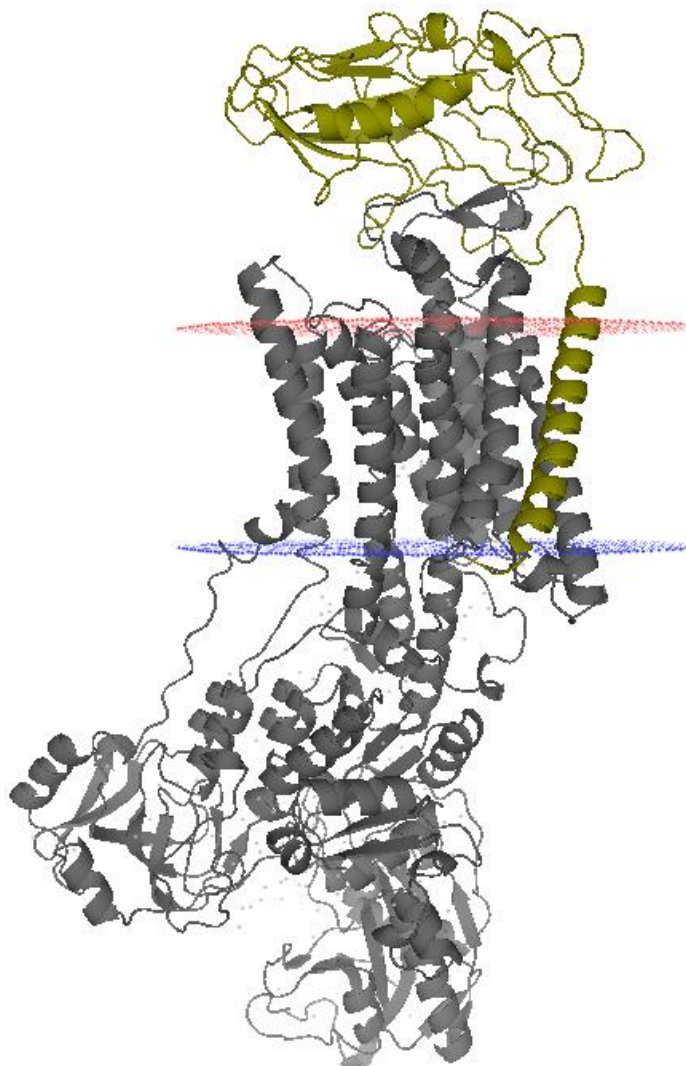
Ouabain je špecifický inhibítor Na^+/K^+ -ATPázy. Bol získaný z rastliny *Strophanthus gratus* a patrí medzi srdcové glykosidy. Používa sa pri liečbe porúch srdca viac než dvesto rokov. Vďaka tomu, že inhibuje aktivitu sodno draselnej pumpy spôsobuje nárast intracelulárnej koncentrácie Na^+ , to má za následok aktiváciu Na^+/Ca^+ pumpy, ktorá vyúsťuje v nárast koncentrácie intracelulárneho Ca^+ a to vedie k silnejšej kontrakcii srdcovej svaloviny. Miesto pre väzbu ouabainu bolo predmetom mnohých mutačných experimentov. V súčasnosti je už dostupná kryštálová štruktúra Na^+/K^+ -ATPázy s naviazaným ouabainom, ktorá miesto pre jeho väzbu pomohla odhaliť (Ogawa a kol. 2009). Reziduá, ktoré sú zodpovedné za väzbu ouabainu sú podľa najnovšej štruktúry Cys111, Gln118, Asp128, Asn129, Glu313, Glu319, Ile 322, Phe323, Ile325, Ile328, Val 329, Asn331, Ile787, Phe 790, Phe793, Leu800, Ile804, Arg887.



Obr.15 vľavo, Na^+/K^+ -ATPáza. Molekula ouabainu je znázornená žltou farbou. PDB kód **2zXe**. vpravo, štruktúrny vzorec ouabainu.

2.2.2.8 Podjednotka β

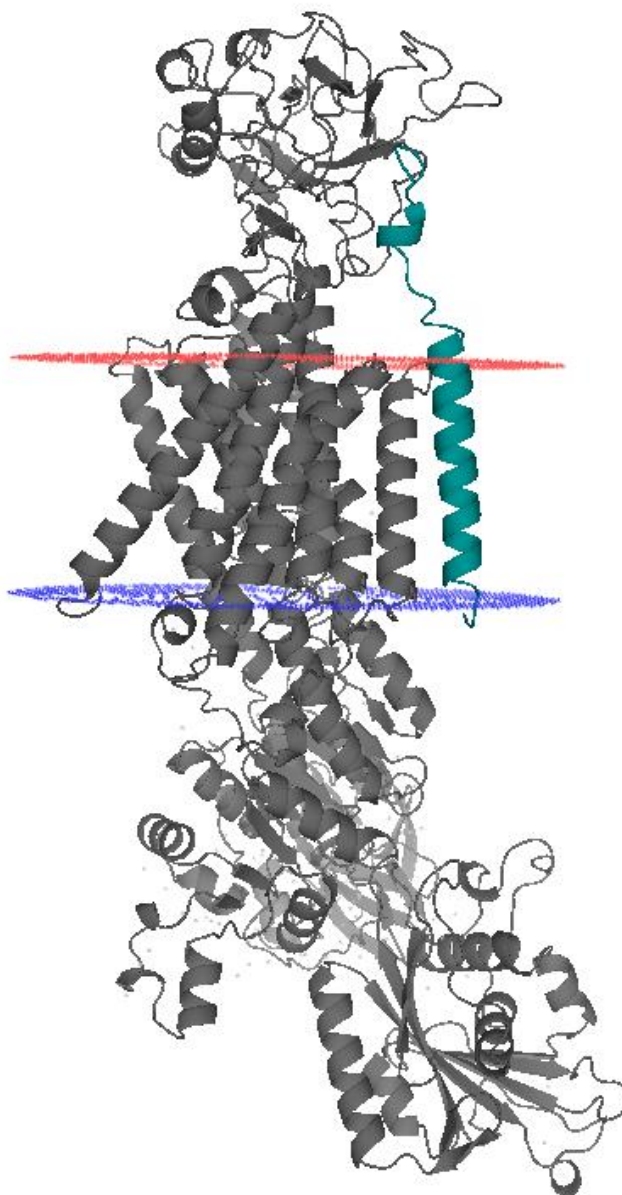
Podjednotka β je unikátna pre P- typy ATPáz, ktoré prenášajú K^+ (Na^+/K^+ -ATPáza a H^+/K^+ -ATPáza). Jej molekulová hmotnosť je 55kDa. Vyskytuje sa v 3 izoformách ($\beta 1$ - $\beta 3$). Je nutná pre správne zabudovanie α -podjednotky do plazmatickej membrány a pre transport draselných iónov. Skladá sa z jedného transmembránového segmentu, krátkeho intracelulárneho N-konca a z veľkej extracelulárnej domény, ktorá je glykozylovaná (Jorgensen a kol. 2003).



Obr.16 Kryštál Na^+/K^+ -ATPázy. β - podjednotka je sfarbená žltou farbou. Modrá rovina ohraňuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny.

2.2.2.9 Podjednotka γ

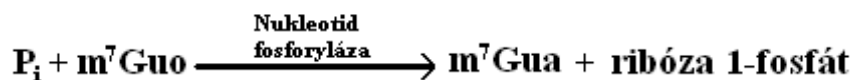
Nachádza sa v Na^+/K^+ -ATPáze v obličkách. Táto podjednotka patrí do rodiny FXYP proteínov. FXYP je skupina siedmich krátkych jednoduchých transmembránových proteínov označená podľa konzervovaného motívu FXYP. Slúžia ako tkanivovo špecifické regulačné podjednotky (Garty a Karlsh 2006).



Obr.17 Kryštál Na^+/K^+ -ATPázy. γ -podjednotka je sfarbená bledomodrou farbou. Modrá rovina ohraničuje intracelulárny priestor, červená rovina extracelulárny. Štruktúra intracelulárnej časti γ -podjednotky ešte nebola experimentálne určená.

2.3 Meranie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy

Všetky ATPázy potrebujú na svoju činnosť ATP. Hydrolýzou ATP na ADP a P_i vzniká energia, ktorá je v biologických systémoch využívaná na rozličné procesy. Tohto faktu sa dá využiť pri meraní aktivity ATPáz a teda aj samotnej Na^+/K^+ -ATPázy. Na meranie aktivity existuje veľa metód a väčšina z nich sú založené na detekcii uvoľneného fosfátu. Niektoré metódy používajú ^{32}P -značené ATP a pritom sa meria uvoľnenie fosfátu (Brattin a Waller 1983). Ďalšie metódy sú založené na farebnej reakcii vzniknutého fosfátu s niektorými látkami a následne sa meria absorbancia. K meraniu aktivity Na^+/K^+ -ATPázy sa dá využiť aj fluorescencia, pretože bolo pozorované, že pri reakcii fosfátu s niektorými látkami a za účasti špecifického enzýmu vznikajú látky, ktoré majú iný kvantový výťažok fluorescencie ako pôvodné látky. Následne je možné z tohto rozdielu zistiť aktivitu. V tejto práci sme sa venovali meraniu aktivity Na^+/K^+ -ATPázy jednou fluorescenčnou (Banik a Roy 1990) a jednou absorbančnou metódou (Fiske a Subbarow 1925). Ako prvú sme použili absorbačnú metódu podľa článku, ktorý publikovali Fiske a Subbarow v roku 1925. Táto metóda využíva fakt, že Na^+/K^+ -ATPáza spotrebúva na svoju činnosť ATP a rozkladá ho na ADP a P_i . Vzniknutý fosfát ďalej môže reagovať s dodecylsíránom sodným, amidolom a molybdátom amónnym, pričom táto reakcia vyvolá modré zafarbenie roztoku, ktoré závisí na množstve fosfátu vyprodukovaného Na^+/K^+ -ATPázou. Meraním absorbancie sa potom dá určiť množstvo vyprodukovaného fosfátu a teda aj aktivita Na^+/K^+ -ATPázy. Ako druhú sme použili fluorescenčnú metódu podľa článku, ktorý publikovali Banik a Roy v roku 1990. Táto metóda taktiež využíva fakt, že Na^+/K^+ -ATPáza spotrebúva na svoju činnosť ATP a rozkladá ho na ADP a P_i . Vzniknutý fosfát môže ďalej reagovať s 7-metyl guanozínom (m^7Guo) za účasti enzýmu nukleotid fosforylázy za vzniku 7-metyl guanínu (m^7Gua) a ribózy 1-fosfát. Schematické znázornenie týchto reakcií je zobrazené nižšie.



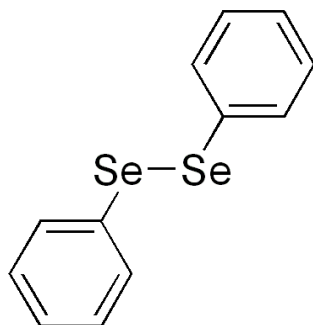
Obe z týchto látok, 7-metyl guanozín a 7-metyl guanín sú fluorescenčne aktívne, pričom 7-metyl guanín poskytuje menší kvantový výťažok fluorescence. Tohto faktu sa dá využiť na meranie aktivity ATPázy a teda aj Na^+/K^+ -ATPázy.

2.4 Interakcia Na^+/K^+ -ATPázy s biologicky aktívnymi látkami

Na^+/K^+ -ATPáza je esenciálny proteín pre všetky živočíchy. Svojou činnosťou vytvára koncentračný gradient pre sodík a draslík. Tento gradient je potrebný pre údržbu membránového potenciálu a pre sekundárny transport. Sekundárnym transportom sú potom do bunky transportované živiny a ďalšie látky, ktoré pomáhajú pri udržiavaní homeostázy, stáleho vnútrobunkového objemu, stáleho vnútrobunkového pH a stáleho osmotického tlaku. Preto látky, ktoré majú vplyv na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy, sú veľmi významné. Uplatňujú sa hlavne v medicíne, kde sa využívajú na liečenie rôznych chorôb. Väčšinou sa jedná o látky, ktoré majú na tento enzým inhibičný účinok. Tieto látky sa dajú rozdeliť do troch hlavných skupín: anorganické ióny, malé organické molekuly a biomakromolekuly. Do skupiny anorganických iónov, ktoré inhibujú Na^+/K^+ -ATPázu patria: Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} , Ba^{2+} , Al^{2+} (Boiko a kol. 2004). Medzi malé organické molekuly s rovnakým účinkom na tento enzým patria: aspartam (Schulpis a kol. 2005), marinobufagerin, resibufogenin (Vu a kol. 2006), ouabain (Stimac a kol. 2005), homocystein (Schulpis a kol. 2006) a dopamín (Chen a kol. 2006). Poslednú skupinu zastupujú amyloid β (Mantha a kol. 2005), agrin (Hilgenberg a kol. 2006), guanidinoacetát (Zungo a kol. 2005). Niektoré z týchto látok sú vysoko toxické. Naopak látok, ktoré by spôsobovali zvýšenie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy je veľmi málo. Do tejto skupiny možno zaradiť napríklad kortikosteroidy (Kim a kol. 2006).

2.5 Difenyldiselenid

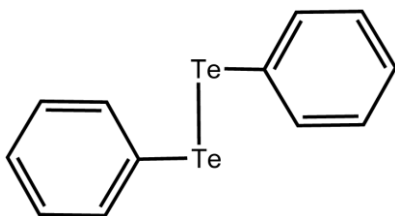
Táto látka tvorí žlté kryštály. Je nerozpustná vo vode a dobre sa rozpúšťa v alkoholoch, éteroch a xyléne. Jej molekulová hmotnosť je 312,13g/mol, bod topenia 59 °C a teplota varu 155 °C. Molekula difenyldiselenidu je stredovo súmerná, pričom stred súmernosti sa nachádza medzi atómami selénu. Vzďialenosť týchto dvoch atómov je 2,29Å. V priemysle sa používa ako zdroj fenylselénu. Difenyldiselenid je toxický pre vodné prostredie a bolo ukázané, že in vitro inhibuje aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy z krysieho mozgu (Borges a kol. 2005).



Obr. 18 Molekula difenyldiselenidu.

2.6 Difenylditelurid

Vyskytuje sa vo forme červeno oranžových kryštálov. Je nerozpustný vo vode. Jeho molekulová hmotnosť je 409,41g/mol a bod topenia 66 °C. V priemysle sa používa ako dôležitý medzičlánok pri syntéze niektorých látok. Pre niektoré organizmy (napr. hlodavce) je silne toxický a spôsobuje neurotoxické efekty. Bolo ukázané, že in vitro inhibuje aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy z krysieho mozgu (Borges a kol. 2005).



Obr. 19 Molekula difenylditeluridu.

3. Materiály a metódy

3.1 Na⁺/K⁺-ATPáza

Pri našich experimentoch sme používali Na⁺/K⁺-ATPázu z hovädzieho mozgu od firmy Sigma, ktorá sa nachádzala vo forme lyofilizovaného prášku. Bola rozpustená v roztoku detergentu octaetylénglycolmonododecylétheru a Tris-HCl s pH 7,5 tak, aby výsledná koncentrácia bola 4,4mg/ml. Bola rozdelená na alikvóty a skladovaná pri teplote -20°C. Kontrolná analýza pomocou SDS-PAGE ukázala, že čistota proteínu je viac než 90%.

3.2 Difenyldiselenid a difenylditelurid

Difenyldiselenid (Aldrich) a difenylditelurid (Aldrich) boli rozpustené v dimetylsulfoxide (Lachema). Pri meraní sme používali zásobný roztok s koncentráciou 50mM.

3.3 Absorbačná metóda

Meranie absorbancie boli vykonané na prístroji Thermo Spectronic UV500. Pri meraní bola použitá vlnová dĺžka 660nm. Ako blank bola použitá deionizovaná voda.

Najskôr bolo treba určiť kalibračnú rovnicu. Tou rozumieme závislosť absorbancie na koncentrácii fosfátu. Na zistenie kalibračnej rovnice sme použili nasledujúce chemikálie (73% (w/v) testovací roztok 1, 5% (w/v) kyselina trichlóroctová (TCA) (Lach-Ner), 0,3mM-2,5mM Na_2HPO_4 (Lachema)). Zloženie testovacieho roztoku 1 bolo nasledovné:

56mM histidínový pufr (Sigma) pH7,4

160mM NaCl (Fluka),

25mM KCl (Lachema),

5mM MgCl_2 (Fluka)

Na farbenie sme použili (1,2% (w/v) SDS (Fluka), 0,73% (w/v) Na_2SO_3 (Lachema), 0,073% (w/v) amidol (Aldrich), 4,3mg/ml molybdát amónny (Lachema), 1,5% (w/v) H_2SO_4 (Lach-Ner)). Roztok amidolu musí byť vždy čerstvý. Roztok molybdátu amónneho sme pridávali do vzorku ako posledný, pričom každá vzorka reagovala presne 20 minút. Z tejto závislosti sme získali smernicu, ktorú sme potom použili na výpočet aktivity.

Na meranie aktivity sme použili nasledovné chemikálie (73% (w/v) testovací roztok 2, 0,001mg/ml Na^+/K^+ -ATPáza, 2,7mM ATP (Sigma), 4,5% (w/v) TCA (Lach-Ner). Zloženie testovacieho roztoku 2 bolo nasledovné:

43mM histidínový pufr (Sigma) pH 7,4

186mM NaCl (Fluka)

29mM KCl (Lachema)

5,7mM MgCl_2 (Fluka)

Na^+/K^+ -ATPáza bola rozpustená v roztoku (20mM histidín (Sigma), 250mM sacharóza (Lachema), 0,9mM EDTA (Fluka) pH 7,0). Do vzorku boli ešte pridané skúmané látky difenylselenid a difenylditelurid v rozsahu koncentrácií 1 μ M až 1mM. Látky sme spolu nechali reagovať 30 minút pri teplote 0°C. Potom sme túto zmes temperovali 1,5 minúty na

37°C, pridali sme ATP a nechali reagovať 5 minút vo vodnej lázni. Reakciu sme zastavili pridaním TCA. Na farbenie sme použili tie isté látky, ako pri kalibrácii.

Merania boli vykonané štyrikrát a výsledky sú prezentované ako priemer $\pm$ smerodajná odchýlka. Bolo overené, že zmena koncentrácie difenyldiselenidu a difenylditeluridu nemá vplyv na absorbanciu.

3.4 Fluorescenčná metóda

Merania boli uskutočnené na fluorescenčnom spektrofotometri Hitachi F4500 a boli vykonané v režimoch time scan a photometry. V režime time scan sa jedná o kontinuálne meranie závislosti intenzity fluorescence na čase. V režime photometry sa jedná o okamžité meranie intenzity fluorescence. Nastavenie spektrofotometra bolo nasledovné: excitačná vlnová dĺžka 310nm, emisná vlnová dĺžka 390nm, šírka excitačnej štrbiny 10nm, šírka emisnej štrbiny 20nm. V režime photometry bol navyše nastavený integračný čas 3s a intenzita fluorescence bola zmeraná každé tri minúty. Zostávajúci čas bola vzorka držaná mimo dosah priameho svetla. Merania boli uskutočnené pri teplote 37°C.

Pred každým meraním musela byť vykonaná kalibrácia pomocou roztoku Na_2HPO_4 (Lachema) v rozmedzí koncentrácií 3 μM do 25 μM . Koncentrácie ďalších látok boli nasledovné (0,1unit/ml nukleotid fosforyláza (Sigma), 50 μM m^7Guo (Sigma)). Tieto látky boli rozpustené v pufrí (140mM NaCl (Fluka), 20mM KCl (Lachema), 50mM Tris (Sigma), pH 7,4). Z nameraných hodnôt sme získali závislosť intenzity fluorescence na koncentrácii fosfátu a z následnej rovnice sme získali smernicu, ktorá nám ďalej pomohla pri výpočte aktivity.

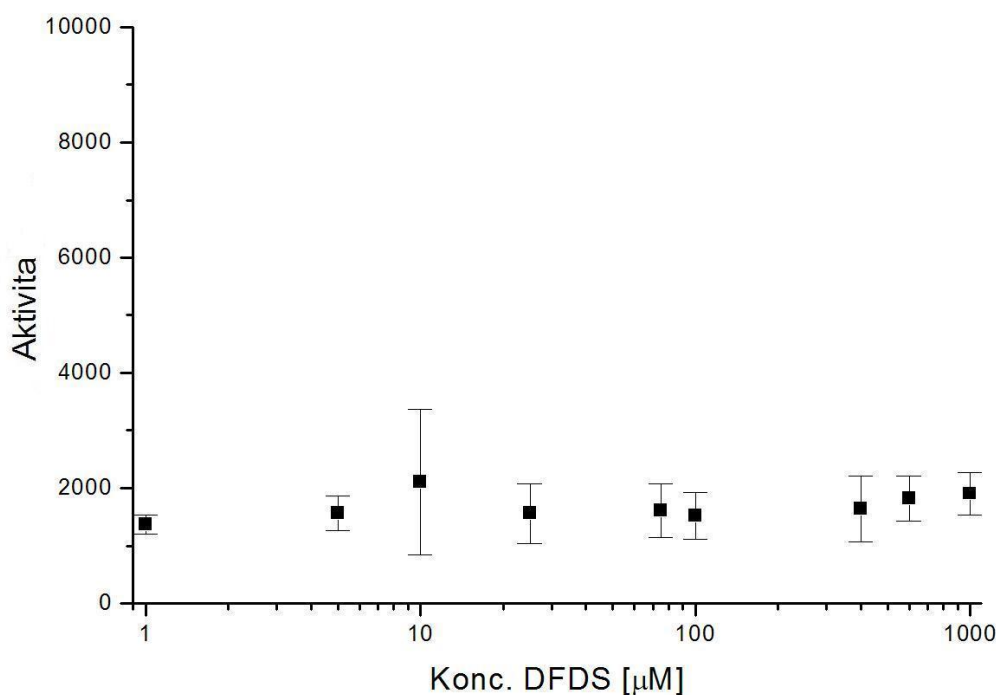
Na meranie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy boli použité nasledujúce chemikálie (0,1unit/ml nukleotid fosforyláza (Sigma), 50 μM m^7Guo (Sigma), 3mM MgCl_2 (Fluka), 88 $\mu\text{g/ml}$ Na^+/K^+ -ATPáza, 100 μM ATP (Sigma)). Tieto látky boli rozpustené v pufrí (140mM NaCl (Fluka), 20mM KCl (Lachema), 50mM Tris (Sigma), pH 7,4). Pred samotným meraním bolo potrebné 10 minút nechať roztok reagovať, aby sa skúmaná látka stihla naviazať na Na^+/K^+ -ATPázu. Reakciu sme štartovali pridaním ATP a roztok sme nechali 2 minúty reagovať, aby bol spotrebovaný fosfát, ktorý vzniká samovoľným rozpadom ATP. Následne sme merali aktivitu v režime time scan a potom aj v režime photometry. Z následného grafu sme získali smernicu, z ktorej sme za použitia smernice z kalibračnej rovnice následne vypočítali aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy.

Merania boli vykonané trikrát a výsledky sú prezentované ako priemer $\pm$ smerodatná odchýlka. Bolo zistené, že koncentrácie difenylidiselenidu a difenyditeluridu väčšie ako 0,5mM ovplyvňujú kalibračnú rovnicu a preto bolo treba spraviť korekcie na tento efekt.

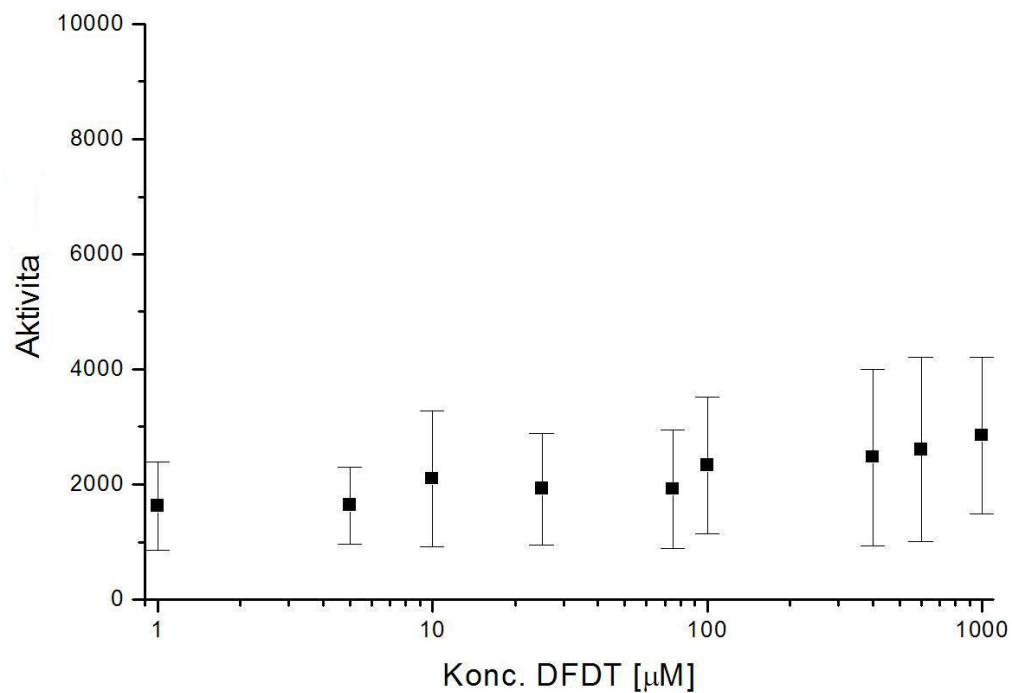
4. Výsledky a diskusia

4.1 Absorbančná metóda

Na meranie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy s difenyldiselenidom a difenylditeluridom sme použili dve nezávislé metódy. Ako prvú sme použili absorbačnú metódu. Nameraná aktivita Na^+/K^+ -ATPázy dobre odpovedá hodnotám z iných publikovaných prác (Janovská a kol. 2010). Z našich meraní vyplýva, že difenyldiselenid a difenylditelurid sa správali ako slabé aktivátory Na^+/K^+ -ATPázy. Avšak rozdiely v aktivite sú menšie ako je chyba merania, preto na základe tejto metódy nemôžeme vyvodzovať spoľahlivé závery. Aktivita Na^+/K^+ -ATPázy v závislosti na koncentrácii difenyldiselenidu je zobrazená na obrázku 20 a aktivita Na^+/K^+ -ATPázy v závislosti na koncentrácii difenylditeluridu je zobrazená na obrázku 21.



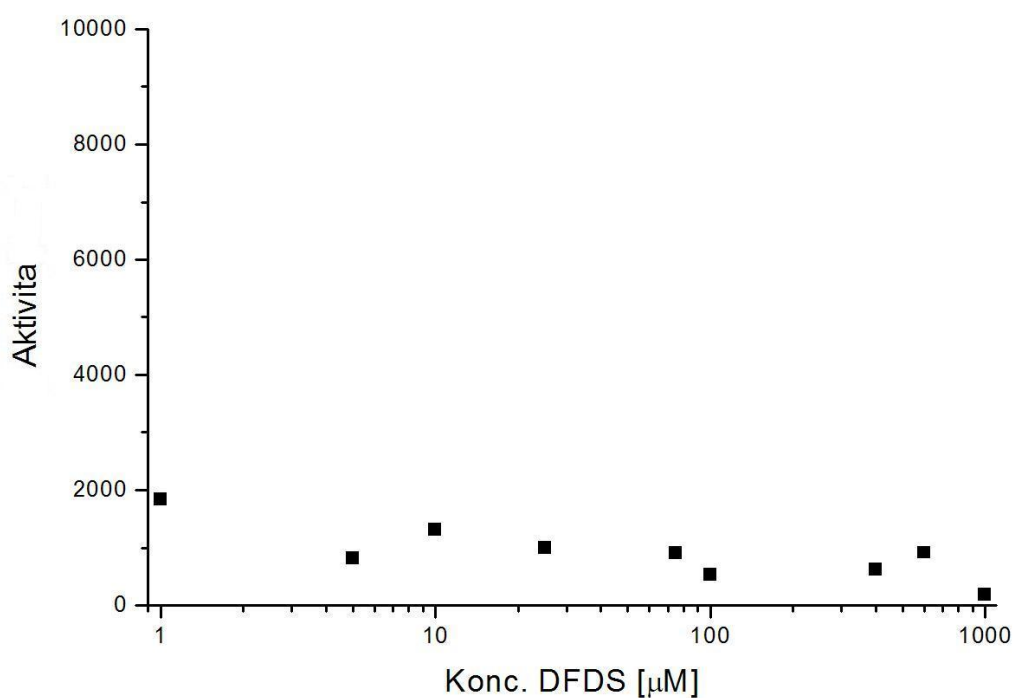
Obr. 20 Závislosť aktivity Na^+/K^+ -ATPázy na koncentrácii difenyldiselenidu. Aktivita bola vyhodnocovaná v jednotkách $\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Aktivita samotnej Na^+/K^+ -ATPázy bola $1700 \pm 200 \mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Kvôli vysokým chybám merania nie je možné spoľahlivo určiť vplyv difenyldiselenidu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy.



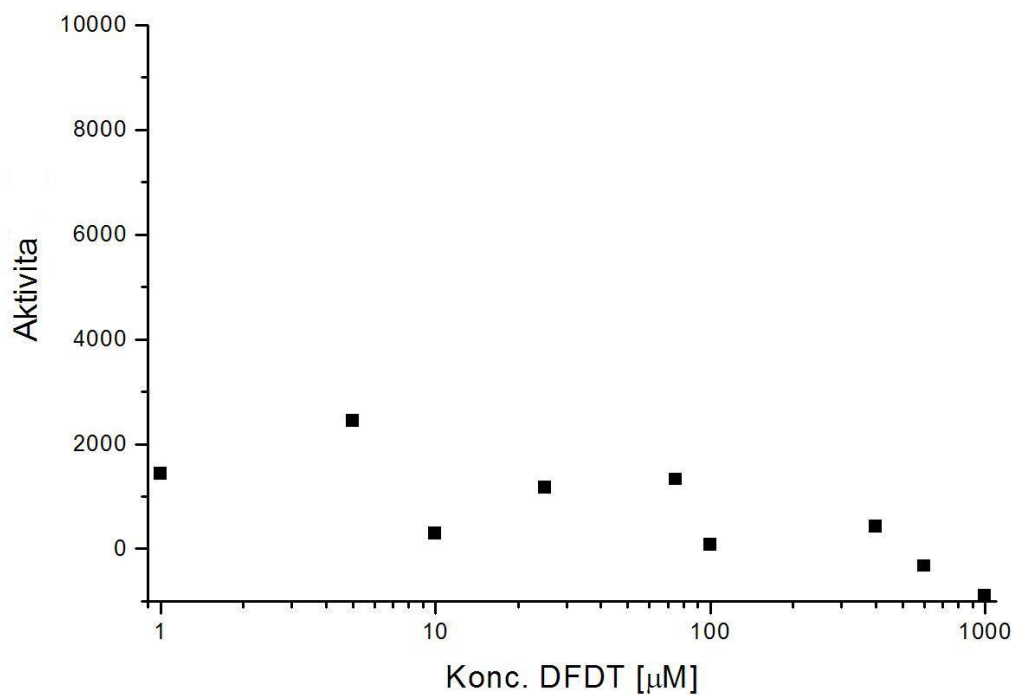
Obr. 21 Závislosť aktivity Na^+/K^+ -ATPázy na koncentrácii difenylditeluridu. Aktivita bola vyhodnocovaná v jednotkách $\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Aktivita samotnej Na^+/K^+ -ATPázy bola $1700 \pm 400 \mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Kvôli vysokým chybám merania nie je možné spoľahlivo určiť vplyv difenylditeluridu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy.

4.2 Fluorescenčná metóda

Aktivita Na^+/K^+ -ATPázy v závislosti na koncentrácii difenyldiselenidu meraná v režime time scan je zobrazená na obrázku 22 a aktivita Na^+/K^+ -ATPázy v závislosti na koncentrácii difenylditeluridu meraná v režime time scan je zobrazená na obrázku 23. Je však zrejmé, že tieto výsledky nie sú správne, pretože pri niektorých koncentráciách nám vyšla dokonca záporná aktivita, čo je z princípu nemožné. Na základe výsledkov merania aktivity fluorescenčnou metódou v režime time scan nie sme schopný určiť vplyv difenyldiselenidu a difenylditeluridu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy. Bolo potrebné zistiť dôvod týchto chýb a prípadne navrhnúť iný režim na meranie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy fluorescenčnou metódou.

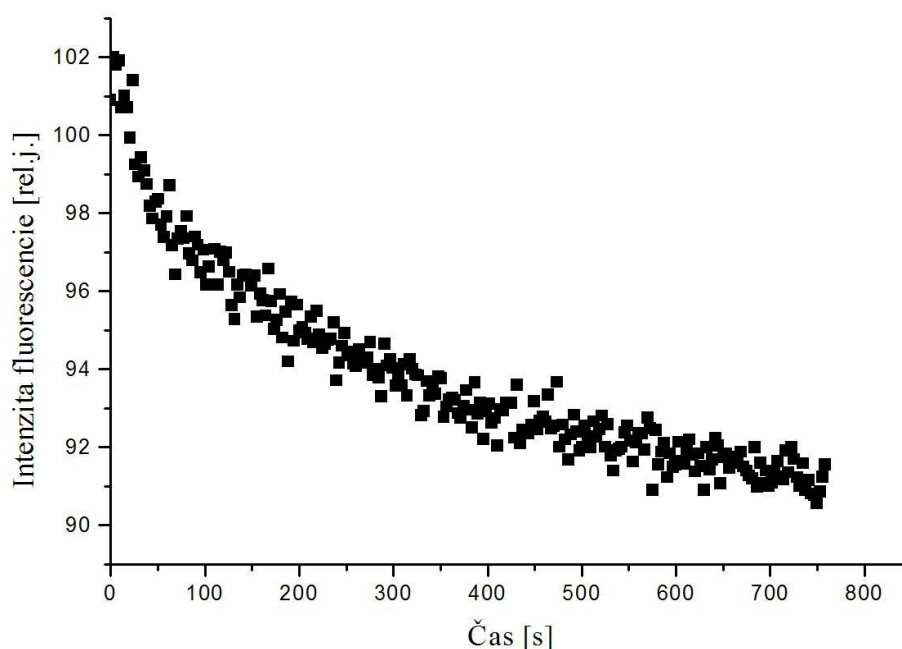


Obr. 22 Závislosť aktivity Na^+/K^+ -ATPázy na koncentrácii difenyldiselenidu v režime time scan. Aktivita bola vyhodnocovaná v jednotkách $\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Aktivita samotnej Na^+/K^+ -ATPázy bola $540\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Z týchto hodnôt nie je možné spoľahlivo určiť vplyv difenyldiselenidu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy.



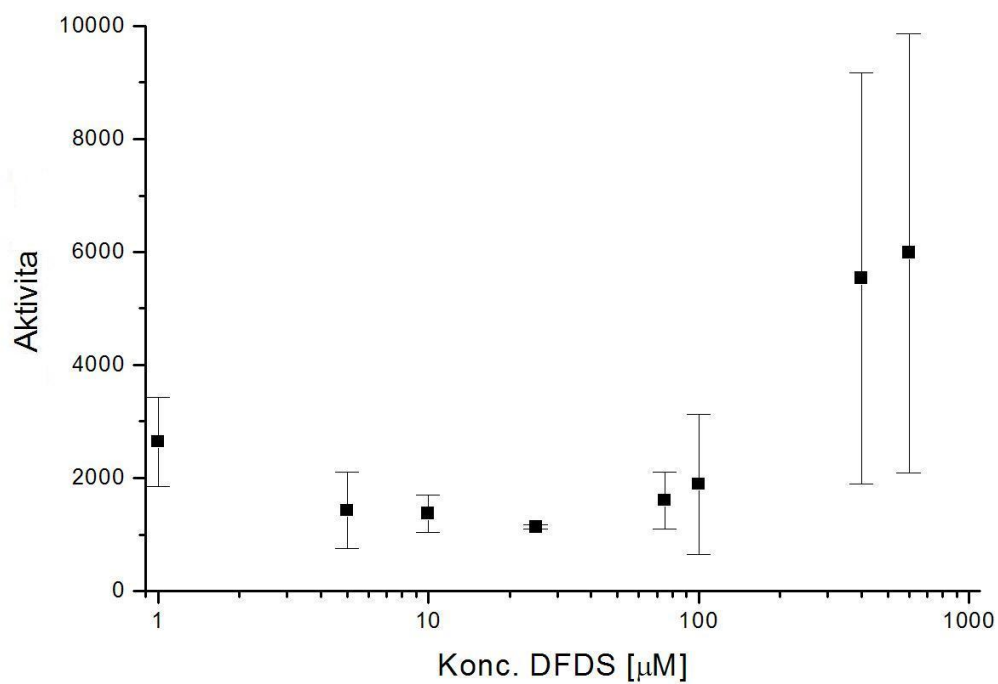
Obr. 23 Závislosť aktivity Na^+/K^+ -ATPázy na koncentrácii difenyliditeluridu v režime time scan. Aktivita bola vyhodnocovaná v jednotkách $\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Aktivita samotnej Na^+/K^+ -ATPázy bola $833\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Z týchto hodnôt nie je možné spoľahlivo určiť vplyv difenyliditeluridu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy. Pri koncentráciách $600\mu\text{M}$ a 1mM vyšla hodnota aktivity dokonca záporná, čo je principiálne nemožné.

Napokon sa nám dôvod týchto chýb podarilo zistiť. Zistili sme, že $m^7\text{Gou}$ môže degradovať vplyvom svetla. Degradácia $m^7\text{Guo}$ vplyvom svetla je zobrazená na obrázku 24. Z toho vyplýva, že režim time scan opísaný v pôvodnej práci (Banik a Roy 1990) je prakticky nepoužiteľný, pretože pozorované zmeny sú väčšie, ako zmeny pozorované v dôsledku fosfatázovej aktivity enzýmu. Preto sme sa rozhodli režim time scan, v ktorom je vzorka ožarovaná svetlom kontinuálne, nahradiť režimom photometry, v ktorom dochádza ku krátkym ožiareniam vzorky a tá je po zvyšok merania držaná bez prístupu svetla. Z tohto faktu však vyplývajú ďalšie nároky na prípravu vzoriek. Zistili sme, že treba zamedziť prístupu svetla na vzorky počas ich prípravy a aj počas samotného merania aktivity.

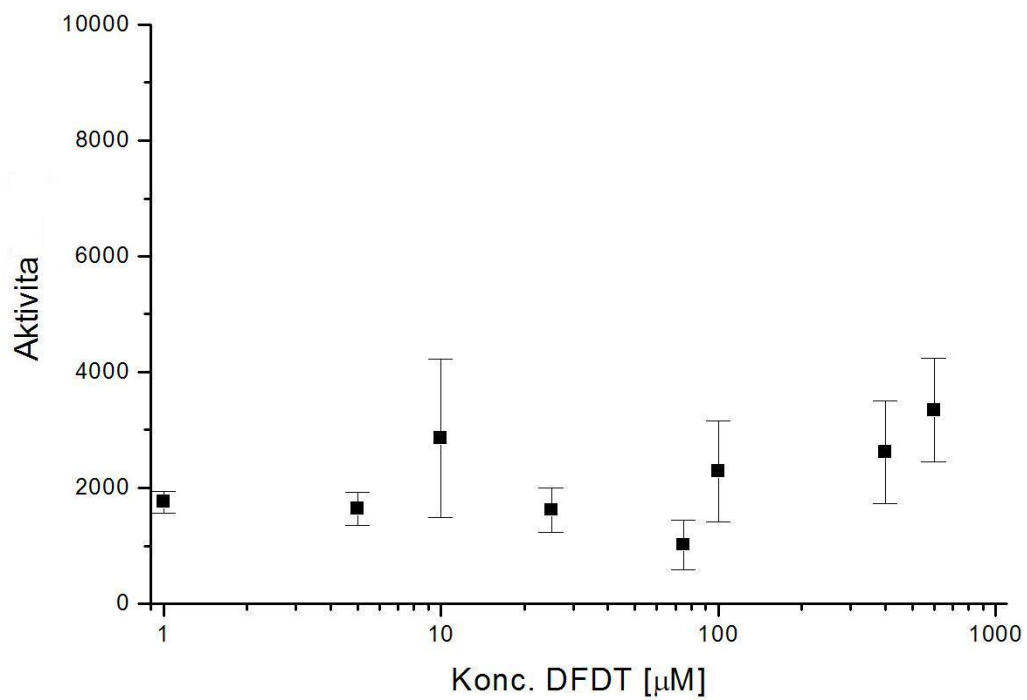


Obr. 24 Degradácia $m^7\text{Gou}$ vplyvom svetla. Z obrázka vyplýva, že dochádza k výraznému poklesu intenzity fluorescence v čase. K poklesu intenzity fluorescence o 10% dochádza už po ôsmich minútach.

Navrhovaný režim time scan sme teda museli nahradiť režimom photometry, kde vzorky sú osvetlené iba na veľmi krátky čas. Pri použití tohto režimu sme dosiahli hodnoty aktivity Na^+/K^+ -ATPázy zrovnateľné s výsledkami v iných publikáciách (Janovská a kol. 2010). Vplyv difenyldiselenidu a difenylditeluridu na aktivitu enzýmu vyšiel taktiež zrovnateľne s literatúrou (Borges a kol. 2005). Zistili sme, že obe látky v koncentráciách nižších ako $100\mu\text{M}$ inhibujú aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy. Ako pôsobia difenyldiselenid a difenylditelurid na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy pri vysokých koncentráciách doposiaľ nebolo známe. Z našich meraní vyplýva, že pri koncentráciách vyšších ako $100\mu\text{M}$ sa obe látky správajú ako aktivátory Na^+/K^+ -ATPázy. Aktivita Na^+/K^+ -ATPázy v závislosti na koncentrácii difenyldiselenidu meraná v režime photometry je zobrazená na obrázku 25. Z obrázka 25 vyplýva, že nízke koncentrácie difenyldiselenidu pôsobia na Na^+/K^+ -ATPázu ako inhibítor. Pri vyšších koncentráciách difenyldiselenidu dochádza naopak k zvýšeniu aktivity Na^+/K^+ -ATPázy. Z obrázka vyplýva, že k najväčšej inhibícii (69%) aktivity enzýmu dochádza pri $25\mu\text{M}$ koncentrácii difenyldiselenidu, čo je zrovnateľné s publikovanými výsledkami (Borges a kol. 2005). Aktivita Na^+/K^+ -ATPázy v závislosti na koncentrácii difenylditeluridu meraná v režime photometry je zobrazená na obrázku 26. Z obrázka 26 vyplýva, že inhibičný vplyv difenylditeluridu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy nie je taký zrejмый ako v prípade difenyldiselenidu. Pri koncentrácii difenylditeluridu $75\mu\text{M}$ však vidieť zjavný pokles aktivity enzýmu (52%). Pri vyšších koncentráciách možno naopak pozorovať nárast aktivity Na^+/K^+ -ATPázy.



Obr. 25 Závislosť aktivity Na^+/K^+ -ATPázy na koncentrácii difenyldiselenidu v režime photometry. Aktivita bola vyhodnocovaná v jednotkách $\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Aktivita samotnej Na^+/K^+ -ATPázy bola $3100 \pm 900 \mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu.



Obr. 26 Závislosť aktivity Na^+/K^+ -ATPázy na koncentrácii difenyliditeluridu v režime photometry. Aktivita bola vyhodnocovaná v jednotkách $\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu. Aktivita samotnej Na^+/K^+ -ATPázy bola 2100 ± 600 $\mu\text{M}_{\text{Pi}}/\text{mg}$ proteínu za hodinu.

4.3 Porovnanie metód

V tejto práci sme sa venovali meraniu aktivity Na^+/K^+ -ATPázy v závislosti na koncentrácii difenyldiselenidu a difenylditeluridu dvomi nezávislými metódami, absorbčnou metódou podľa práce Fiske a Subbarow z roku 1925 a fluorescenčnou metódou podľa práce Banik a Roy z roku 1990. V porovnaní absorbačnej metódy s fluorescenčnou metódou sme lepšie výsledky dosiahli pomocou fluorescenčnej metódy. Pri použití absorbačnej metódy sme pri meraní dosiahli príliš veľké chyby merania, ktoré nám nedovolili vyvodiť spoľahlivé závery o pôsobení skúmaných látok na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy. Táto metóda je aj časovo veľmi náročná a vyžaduje veľkú presnosť pri príprave vzoriek, ktoré spolu musia reagovať presne stanovený čas. Pri stanovovaní aktivity touto metódou je taktiež vysoká spotreba látok v porovnaní s inými metódami. Naproti tomu, fluorescenčná metóda v režime photometry bola presnejšia, čas merania bol približne polovičný a počet použitých chemikálií oveľa menší. Avšak pri tejto metóde sme spotrebovali stokrát viac proteínu ako pri absorbačnej metóde. Výsledky dosiahnuté fluorescenčnou metódou sa naviac lepšie zhodovali s literatúrou. Nevýhodou tejto metódy je už spomínaná degradácia m^7Guo vplyvom svetla a z toho vyplývajúce nároky na prípravu vzoriek. Príprava vzoriek ako aj samotné meranie aktivity musí byť uskutočnené bez vplyvu priameho svetla.

5. Záver

V tejto práci sme zrovnávali dve metódy na meranie ATPázovej aktivity. Z našich meraní vyplýva, že lepšie výsledky je možno dosiahnuť fluorescenčnou metódou založenou na poklese fluorescencie vplyvom premeny $m^7\text{Gou}$ na $m^7\text{Gua}$. Ďalej z našich výsledkov vyplýva, že túto metódu nemožno použiť tak, ako bolo publikované (Banik a Roy 1990), ale navrhovaný režim time scan treba zameniť za režim photometry. Táto metóda nie je použiteľná v režime s kontinuálnym osvetlením vzorku, pretože dochádza k degradácii $m^7\text{Gou}$ vplyvom svetla. Kontinuálny režim osvetlenia je treba zameniť za diskontinuálny, teda aktivitu meriame pomocou krátkych zábleskov a ďalej treba zamedziť vplyvu priameho svetla na vzorky tak počas merania, ako aj počas prípravy vzoriek. Pomocou tejto metódy na meranie aktivity Na^+/K^+ -ATPázy sa nám podarilo overiť vplyv difenyldiselenidu a difenylditeluridu ako produktov priemyselného znečistenia na aktivitu tohoto fyziologicky významného enzýmu. V zhode s publikovanou literatúrou sme potvrdili inhibičný účinok oboch týchto toxických látok na Na^+/K^+ -ATPázu pri koncentráciách nižších ako $100\mu\text{M}$ (Borges a kol. 2005). Vplyv vyšších koncentrácií difenyldiselenidu a difenylditeluridu na aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy doposiaľ nebol publikovaný. Z našich meraní vyplýva, že pri vyšších koncentráciách týchto látok dochádza naopak ku zvýšeniu aktivity. V budúcnosti by sa tohto zistenia možno dalo využiť v medicíne.

6. Referencie

- [1]. Argüello JM, Whitis J, Cheung MC, Lingrel JB. Functional role of oxygen-containing residues in the fifth transmembrane segment of the Na,K-ATPase alpha subunit. *Arch Biochem Biophys*. 1999;364(2):254-63.
- [2]. Argüello JM, Peluffo RD, Feng J, Lingrel JB, Berlin JR. Substitution of glutamic 779 with alanine in the Na,K-ATPase alpha subunit removes voltage dependence of ion transport. *J Biol Chem*. 1996;271(40):24610-6.
- [3]. Argüello JM, Lingrel JB. Substitutions of serine 775 in the alpha subunit of the Na,K-ATPase selectively disrupt K⁺ high affinity activation without affecting Na⁺ interaction. *J Biol Chem*. 1995;270(39):22764-71.
- [4]. Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol*. 1998;46(1):84-101.
- [5]. Banik U, Roy S. A continuous fluorimetric assay for ATPase activity. *Biochem J*. 1990;266(2):611-4
- [6]. Boiko NM, Tselevych MV, Sanahurs'kyi DI. Effect of heavy metal cations on the activity of membrane Na⁺, K⁺ -ATPase in embryos of loach (*Misgurnus fossilis* L.). *Ukr Biokhim Zh*. 2004;76(2):59-63.
- [7]. Borges VC, Rocha JB, Nogueira CW. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology*. 2005;215(3):191-7.
- [8]. Brattin WJ, Waller RL. Calcium inhibition of rat liver microsomal calcium-dependent ATPase. *J Biol Chem*. 1983;258(11):6724-9.
- [9]. Clausen JD, McIntosh DB, Vilsen B, Woolley DG, Andersen JP. Importance of conserved N-domain residues Thr441, Glu442, Lys515, Arg560, and Leu562 of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase for MgATP binding and subsequent catalytic steps. Plasticity of the nucleotide-binding site. *J Biol Chem*. 2003;278(22):20245-58.
- [10]. Einholm AP, Jensen MT, Andersen JP, Vilsen B. Mutation of Gly-94 in transmembrane segment M1 of Na⁺,K⁺-ATPase interferes with Na⁺ and K⁺ binding in E2P conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(32):11254–11259.
- [11]. Einholm AP, Andersen JP, Vilsen B. Importance of Leu99 in Transmembrane Segment M1 of the Na⁺,K⁺-ATPase in the Binding and Occlusion of K⁺, *J. Biol. Chem*. 2007;282(33):23854-23866.

- [12]. Eguchi H, Morii M, Takahashi Y, Sakai H, Nakano M, Ochiai H, Shirahata A, Hara Y, Kawamura M, Takeda K. Functional consequences of various leucine mutations in the M3/M4 loop of the Na⁺,K⁺-ATPase alpha-Subunit. *J Membr Biol*. 2008;221(3):133-40
- [13]. Farley RA, Elquza E, Müller-Ehmsen J, Kane DJ, Nagy AK, Kasho VN, Faller LD. 18O-exchange evidence that mutations of arginine in a signature sequence for P-type pumps affect inorganic phosphate binding. *Biochemistry*. 2001;40(21):6361-70.
- [14]. Farley RA, Heart E, Kabalin M, Putnam D, Wang K, Kasho VN, Faller LD. Site-directed mutagenesis of the sodium pump: analysis of mutations to amino acids in the proposed nucleotide binding site by stable oxygen isotope exchange. *Biochemistry*. 1997;36(4):941-51.
- [15]. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem*. 1925; 66: 375-400
- [16]. Garty H, Karlisch SJ. Role of FXYD proteins in ion transport. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:431-59.
- [17]. Gatto C, Lutsenko S, Kaplan JH. Chemical modification with dihydro-4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate reveals the distance between K480 and K501 in the ATP-binding domain of the Na,K-ATPase. *Arch Biochem Biophys*. 1997;340(1):90-100.
- [18]. Grycova L, Sklenovsky P, Lansky Z, Janovska M, Otyepka M, Amler E, Teisinger J, Kubala M. ATP and magnesium drive conformational changes of the Na⁺/K⁺-ATPase cytoplasmic headpiece. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(5):1081-91.
- [19]. Håkansson KO. The crystallographic structure of Na,K-ATPase N-domain at 2.6Å resolution. *J Mol Biol*. 2003;332(5):1175-82.
- [20]. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, et al. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*. 1986;323(6087):448-50.
- [21]. Hilge M, Siegal G, Vuister GW, Güntert P, Gloor SM, Abrahams JP. ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nat Struct Biol*. 2003;10(6):468-74.
- [22]. Hilgenberg LG, Su H, Gu H, O'Dowd DK, Smith MA. Alpha3Na⁺/K⁺-ATPase is a neuronal receptor for agrin. *Cell*. 2006;125(2):359-69.
- [23]. Hinz HR, Kirley TL. Lysine 480 is an essential residue in the putative ATP site of lamb kidney (Na,K)-ATPase. Identification of the pyridoxal 5'-diphospho-5'-adenosine and pyridoxal phosphate reactive residue. *J Biol Chem*. 1990;265(18):10260-5.
- [24]. Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2007;17(4):412-8.

- [25]. Horisberger JD. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology* (Bethesda). 2004;19:377-87.
- [26]. Chen Z, Krmar RT, Dada L, Efendiev R, Leibiger IB, Pedemonte CH, Katz AI, Sznajder JI, Bertorello AM. Phosphorylation of adaptor protein-2 $\mu 2$ is essential for Na^+ , K^+ -ATPase endocytosis in response to either G protein-coupled receptor or reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Jul;35(1):127-32. Epub 2006 Feb 23.
- [27]. Imagawa T, Yamamoto T, Kaya S, Sakaguchi K, Taniguchi K. Thr-774 (Transmembrane Segment M5), Val-920 (M8), and Glu-954 (M9) Are Involved in Na^+ Transport, and Gln-923 (M8) Is Essential for Na,K-ATPase Activity, *J. Biol. Chem.*, 2005; 280(19):18736-18744.
- [28]. Janovská M, Kubala M, Simánek V, Ulrichová J. Interaction of sanguinarine and its dihydroderivative with the Na^+/K^+ -ATPase. Complex view on the old problem. *Toxicol Lett*. 2010. [Epub ahead of print]
- [29]. Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:817-49.
- [30]. Kim CR, Sadowska GB, Petersson KH, Merino M, Sysyn GD, Padbury JF, Stonestreet BS. Effects of postnatal steroids on Na^+/K^+ -ATPase activity and $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -subunit protein expression in the cerebral cortex and renal cortex of newborn lambs. *Reprod Fertil Dev*. 2006;18(4):413-23.
- [31]. Kubala M. ATP-binding to P-type ATPases as revealed by biochemical, spectroscopic, and crystallographic experiments. *Proteins*. 2006;64(1):1-12.
- [32]. Kubala M, Hofbauerová K, Ettrich R, Kopecký V Jr, Krumscheid R, Plásek J, Teisinger J, Schoner W, Amler E. Phe(475) and Glu(446) but not Ser(445) participate in ATP-binding to the α -subunit of Na^+/K^+ -ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297(1):154-9.
- [33]. Kubala M, Teisinger J, Ettrich R, Hofbauerová K, Kopecký V Jr, Baumruk V, Krumscheid R, Plásek J, Schoner W, Amler E. Eight amino acids form the ATP recognition site of Na^+/K^+ -ATPase. *Biochemistry*. 2003;42(21):6446-52.
- [34]. Kuntzweiler TA, Argüello JM, Lingrel JB. Asp⁸⁰⁴ and Asp⁸⁰⁸ in the Transmembrane Domain of the Na,K-ATPase α Subunit Are Cation Coordinating Residues, *J. Biol. Chem.*, 1996;271(47):29682-29687
- [35]. Kuntzweiler TA, Wallick ET, Johnson CL, Lingrel JB. Amino acid replacement of Asp369 in the sheep $\alpha 1$ isoform eliminates ATP and phosphate stimulation of [3H]ouabain binding to the Na^+ , K^+ -ATPase without altering the cation binding properties of the enzyme. *J Biol Chem*. 1995;270(27):16206-12.

- [36]. Lánský Z, Kubala M, Ettrich R, Kutý M, Plásek J, Teisinger J, Schoner W, Amler E. The hydrogen bonds between Arg423 and Glu472 and other key residues, Asp443, Ser477, and Pro489, are responsible for the formation and a different positioning of TNP-ATP and ATP within the nucleotide-binding site of Na(+)/K(+)-ATPase. *Biochemistry*. 2004;43(26):8303-11.
- [37]. Mantha AK, Moorthy K, Cowsik SM, Baquer NZ. Membrane associated functions of neurokinin B (NKB) on Abeta (25-35) induced toxicity in aging rat brain synaptosomes. *Biogerontology*. 2006 Feb;7(1):19-33.
- [38]. Maruyama K, MacLennan DH. Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca²⁺ transport activity of the Ca²⁺-ATPase expressed in COS-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(10):3314-8.
- [39]. McIntosh DB, Woolley DG, Vilsen B, Andersen JP. Mutagenesis of segment 487Phe-Ser-Arg-Asp-Arg-Lys492 of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase produces pumps defective in ATP binding. *J Biol Chem*. 1996;271(42):25778-89.
- [40]. McIntosh DB, Clausen JD, Woolley DG, MacLennan DH, Vilsen B, Andersen JP. ATP binding residues of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;986:101-5.
- [41]. Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sørensen TL, Petersen J, Andersen JP, Vilsen B, Nissen P. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*. 2007;450(7172):1043-9.
- [42]. Nelson N, Sacher A, Nelson H. The significance of molecular slips in transport systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(11):876-81.
- [43]. Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13742-7.
- [44]. Ohsumi Y, Anraku Y. Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1981;256(5):2079-82.
- [45]. Paula S, Tabet MR, Ball WJ Jr. Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure-activity relationship models for ligand binding to the E2-Pi form of the enzyme versus activity inhibition. *Biochemistry*. 2005;44(2):498-510.
- [46]. Pedersen PL. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39(5-6):349-55.

- [47]. Pedersen PA, Jorgensen JR, Jorgensen PL. Importance of Conserved α -Subunit Segment ⁷⁰⁹GDGVND for Mg²⁺ Binding, Phosphorylation, and Energy Transduction in Na,K-ATPase, J. Biol. Chem., 2000;275(48):37588-37595.
- [48]. Price EM, Lingrel JB. Structure-function relationships in the Na,K-ATPase alpha subunit: site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme. Biochemistry. 1988;27(22):8400-8.
- [49]. Pullman ME, Penefsky H, Racker E. A soluble protein fraction required for coupling phosphorylation to oxidation in submitochondrial fragments of beef heart mitochondria. Arch Biochem Biophys. 1958;76(1):227-30.
- [50]. Saroussi S, Nelson N. The little we know on the structure and machinery of V-ATPase. J Exp Biol. 2009;212(Pt 11):1604-10
- [51]. Scheiner-Bobis G, Schreiber S. Glutamic acid 472 and lysine 480 of the sodium pump alpha 1 subunit are essential for activity. Their conservation in pyrophosphatases suggests their involvement in recognition of ATP phosphates. Biochemistry. 1999;38(29):9198-208.
- [52]. Schneider H, Scheiner-Bobis G. Involvement of the M7/M8 extracellular loop of the sodium pump alpha subunit in ion transport. Structural and functional homology to P-loops of ion channels. J Biol Chem. 1997;272(26):16158-65.
- [53]. Schulpis KH, Giannoulia-Karantana A, Papaconstantinou ED, Parthimos T, Tjamouranis I, Tsakiris S. Erythrocyte membrane Na⁺,K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities in subjects with methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C-->T genotype and moderate hyperhomocysteinaemia. The role of L-phenylalanine and L-alanine. Clin Chem Lab Med. 2006;44(4):423-7.
- [54]. Schulpis KH, Papassotiriou I, Parthimos T, Tsakiris T, Tsakiris S. The effect of L-cysteine and glutathione on inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity by aspartame metabolites in human erythrocyte membrane. Eur J Clin Nutr. 2006 May;60(5):593-7.
- [55]. Shi HG, Mikhaylova L, Zichittella AE, Argüello JM. Functional role of cysteine residues in the (Na,K)-ATPase alpha subunit. Biochim Biophys Acta. 2000;1464(2):177-87.
- [56]. Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. Nature. 2009;459(7245):446-50.
- [57]. Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta. 1957;23(2):394-401.
- [58]. Stimac R, Kerek F, Apell HJ. Mechanism of the Na,K-ATPase inhibition by MCS derivatives. J Membr Biol. 2005;205(2):89-101.

- [59]. Strugatsky D, Gottschalk KE, Goldshleger R, Karlsh SJ. D443 of the N domain of Na⁺,K⁺-ATPase interacts with the ATP-Mg²⁺ complex, possibly via a second Mg²⁺ ion. *Biochemistry*. 2005;44(49):15961-9.
- [60]. Su P, Scheiner-Bobis G. Lys691 and Asp714 of the Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunit are essential for phosphorylation, dephosphorylation, and enzyme turnover. *Biochemistry*. 2004;43(16):4731-40.
- [61]. Teramachi S, Imagawa T, Kaya S, Taniguchi K. Replacement of several single amino acid side chains exposed to the inside of the ATP-binding pocket induces different extents of affinity change in the high and low affinity ATP-binding sites of rat Na/K-ATPase. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37394-400.
- [62]. Thever MD, Saier MH Jr. Bioinformatic characterization of p-type ATPases encoded within the fully sequenced genomes of 26 eukaryotes. *J Membr Biol*. 2009;229(3):115-30.
- [63]. Toustrup-Jensen M, Vilsen B. Importance of Glu²⁸² in Transmembrane Segment M3 of the Na⁺,K⁺-ATPase for Control of Cation Interaction and Conformational Changes, *J. Biol. Chem*. 2002;277(41):38607-38617.
- [64]. Toustrup-Jensen M, Hauge M, Vilsen B. Mutational effects on conformational changes of the dephospho- and phospho-forms of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry*. 2001;40(18):5521-32.
- [65]. Toustrup-Jensen M, Vilsen B. Importance of conserved Thr214 in domain A of the Na⁺,K⁺ -ATPase for stabilization of the phosphoryl transition state complex in E2P dephosphorylation. *J Biol Chem*. 2003;278(13):11402-10.
- [66]. Toustrup-Jensen M, Vilsen B. Interaction between the Catalytic Site and the A-M3 Linker Stabilizes E₂/E₂P Conformational States of Na⁺,K⁺-ATPase, *J. Biol. Chem.*, 2005;280(11):10210-10218.
- [67]. Toustrup-Jensen M, Vilsen B. Functional Consequences of Alterations to Ile²⁷⁹, Ile²⁸³, Glu²⁸⁴, His²⁸⁵, Phe²⁸⁶, and His²⁸⁸ in the NH₂-terminal Part of Transmembrane Helix M3 of the Na⁺,K⁺-ATPase, *J. Biol. Chem*. 2003;278(40):38653-38664.
- [68]. Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*. 2000;405(6787):647-55.
- [69]. Tran CM, Huston EE, Farley RA. Photochemical labeling and inhibition of Na,K-ATPase by 2-Azido-ATP. Identification of an amino acid located within the ATP binding site. *J Biol Chem*. 1994;269(9):6558-65.
- [70]. Vilsen B. Leucine 332 at the boundary between the fourth transmembrane segment and the cytoplasmic domain of Na⁺,K⁺-ATPase plays a pivotal role in the ion translocating conformational changes. *Biochemistry*. 1997;36(43):13312-24.

- [71]. Vilsen B. Mutant Glu781-->Ala of the rat kidney Na⁺,K⁺-ATPase displays low cation affinity and catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. *Biochemistry*. 1995;34(4):1455-63.
- [72]. Vu H, Ianosi-Irimie M, Danchuk S, Rabon E, Nogawa T, Kamano Y, Pettit GR, Wiese T, Puschett JB. Resibufogenin corrects hypertension in a rat model of human preeclampsia. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(2):215-20.
- [73]. Wang K, Farley RA. Lysine 480 is not an essential residue for ATP binding or hydrolysis by Na,K-ATPase. *J Biol Chem*. 1992;267(6):3577-80.
- [74]. Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, Chang G. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist . *ProcNatlAcadSciU S A*. 2007;104(48): 1900 5-10.
- [75]. Xu G, Kane DJ, Faller LD, Farley RA. The role of loop 6/7 in folding and functional performance of Na,K-ATPase. *J Biol Chem*. 2004;279(44):45594-602.
- [76]. Zugno AI, Scherer EB, Schuck PF, Oliveira DL, Wofchuk S, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Intrastriatal administration of guanidinoacetate inhibits Na⁺, K⁺-ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. *Metab Brain Dis*. 2006;41-50.