

**Interakcie Na⁺/K⁺-ATPázy s biologicky
aktívnymi látkami**

Dizertačná práca



Obsah

Pod'akovanie	I
Prehlásenie	II
Zoznam skratiek	III
Zoznam publikácií.....	V
Abstract	VI
Zhrnutie	VII
1 Úvod.....	10
1.1 ATPázy P-typu.....	10
1.2 Na ⁺ /K ⁺ -ATPáza	11
1.3 Fluoronové farbivá.....	14
1.4 Cisplatina	16
1.5 RH421	18
2 Materiály a metódy	19
2.1 Chemikálie	19
2.2 Príprava cytoplazmickej kľučky C45 a jej tryptofanových mutantov	19
2.3 Izolácia Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy	20
2.4 Meranie ATPázovej aktivity.....	21
2.5 Kryštalizácia a vytvorenie štruktúry	22
2.6 Steady-state fluorescenčné merania	23
2.7 Časovo rozlíšené merania fluorescencie	23
2.8 Časovo rozlíšené zhášanie fluorescencie a určenie zhášacích konštánt	24
2.9 Kapilárna elektroforéza.....	25
2.10 Chronopotenciometrická analýza interakcií cisplatiny s kľučkou C45	26
2.11 Hmotnostná spektrometria	26
2.12 MALDI-TOF peptide mass fingerprinting.....	27
2.13 FRET	27
2.14 Kvantové výťahy.....	28
2.15 Určenie Försterovej vzdialenosti R ₀	28
2.16 Určenie vzdialenosti medzi donorom a akceptorom.....	29
2.17 Určenie limitov κ ²	29
2.18 Výpočet r _{min} a r _{max}	30
2.19 Molekulárny doking.....	31

3 Výsledky a diskusia	32
3.1 Interakcia Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy s fluoronovými farbami	32
3.1.1 Eozín Y	33
3.1.2 5(6)-karboxyeozín	33
3.1.3 Erytrozín B	34
3.1.4 Bengal Rose.....	34
3.1.5 Fluoresceín	35
3.1.6 Molekulárny doking	40
3.1.7 Diskusia o fluoronových farbivách	42
3.2 Interakcia Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy s RH421	44
3.2.1 Identifikácia izoméru RH421	44
3.2.2 Expresia a purifikácia jedno-tryptofánových C45 mutantov	45
3.2.3 Titračné experimenty.....	47
3.2.4 FRET	49
3.2.5 Molekulárny doking	52
3.2.6 Kompetícia RH421 s ATP.....	53
3.2.7 Väzba RH421 na C45 a lipidy.....	54
3.2.8 Diskusia o RH421	56
3.3 Interakcia Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy s cisplatinou.....	59
3.3.1 Aktivita Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy.....	59
3.3.2 MALDI-TOF experimenty	60
3.3.3 Elektrochemické štúdie interakcie cisplatinu s kľučkou C45	62
3.3.4 Kryštály Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy s naviazanou cisplatinou.....	64
3.3.5 Diskusia o cisplatine.....	66
4. Záver	70
5. Referencie	71
6. Publikácie.....	78

Pod'akovanie

Moja najväčšia vd'aka patrí Doc. RNDr. Martinovi Kubalovi Ph.D., vedúcemu tejto práce, za jeho obetavú pomoc a cenné rady počas celého štúdia ako aj pri tvorbe tejto práce.

Ďalej by som rád poďakoval prof. Poulovi Nissenovi a Dr. Linde Reinhard za ich pomoc a spoluprácu počas mojej stáže v Dánsku.

V neposlednom rade by som rád poďakoval svojej rodine a priateľom, ktorí ma vždy podporovali v mojej práci.

Táto práca vznikla vd'aka finančnej podpore projektu Inovace a zvýšení atraktivity studia biofyziky, reg.č.: CZ.1.07/2.2.00/15.0309, projektu Českého ministerstva zdravotnictví NT11071-4/2012 a projektom Študentskej grantovej súťaže na UP (PrF 2013 017 a PrF 2014 029).

Prehlásenie

Prehlasujem, že som dizertačnú prácu vypracoval samostatne, pod vedením Doc. RNDr. Martina Kubalu Ph.D. a za použitia literatúry uvedenej na konci práce.

V Olomouci 9. 6. 2014

Mgr. Miroslav Huličiak

Zoznam skratiek

Aminokyseliny

A	Ala	alanín	I	Ile	izoleucín	R	Arg	arginín
C	Cys	cysteín	K	Lys	lyzín	S	Ser	serín
D	Asp	aspartát	L	Leu	leucín	T	Thr	threonín
E	Glu	glutamát	M	Met	methionín	V	Val	valín
F	Phe	fenylalanín	N	Asn	asparagín	W	Trp	tryptofan
G	Gly	glycín	P	Pro	prolín	X		ľubovoľná aminokyselina
H	His	histidín	Q	Gln	glutamín	Y	Tyr	tyrozín

Číslo za aminokyselinovou skratkou uvádza jej pozíciu v sekvencii proteínu, napríklad: Phe482 znamená fenylalanín na pozícii 482.

Mutácie

Skratka F482W znamená, že fenylalanín na pozícii 482 bol nahradený tryptofanom. Obdobne to platí aj pre ostatné mutácie.

Ďalšie skratky

ADP	adenozíndifosfát
AdT CPSA	elektrochemická metóda založená na meraní elektrického potenciálu vzoriek prichytených na elektróde s využitím stripovacej analýzy
ATP	adenozíntrifosfát
C23	časť Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy medzi druhým a tretím transmembránovým segmentom
C45	časť Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy medzi štvrtým a piatym transmembránovým segmentom
CisPt	cisplatina
DPPC	dipalmitoylfosfatyldilcholin
E1	konformácia Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy s vysokou afinitou pre sodné ióny
E2	konformácia Na ⁺ /K ⁺ -ATPázy s vysokou afinitou pre draselné ióny

EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
FRET	Försterov rezonančný prenos energie
HDME	elektróda s visiacou kvapkou ortuti
CHCA	α -cyano-4-hydroxyškoricová kyselina
IRF	prístrojová funkcia
k_q	bimolekulárna zhášacia konštanta
$m^7\text{Gua}$	m^7 guanín
$m^7\text{Guo}$	m^7 guanozín
MALDI-TOF	typ hmotnostnej spektrometrie založený na laserovej ionizácii vzorku za prítomnosti matrice a s analyzátorom doby letu
P_i	anorganický fosfát
RH421	N-(4-sulfobutyl)-4-(4-(p-dipentylaminofenyl)-butadienyl)-pyrimidiová vnútorná soľ, fluorescenčná sonda
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v prítomnosti dodecylsírane sodného
SERCA	Ca^{2+} -ATPáza zo sarco(endoplazmatického retikula
TCSPC	fluorescenčná metóda časovo korelovaného počítania jednotlivých fotónov
TFA	trifluóroctová kyselina
TIRF	fluorescenčná metóda totálneho vnútorného odrazu

Zoznam publikácií

Predkladaná práca je založená na nasledujúcich publikáciách:

Huliciak M, Vacek J, Sebela M, Orolinova E, Znaleziona J, Havlikova M, et al. Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na⁺/K⁺-ATPase by binding to its cytoplasmic part. *Biochemical Pharmacology* 2012;83:1507-13.

Havlikova M, **Huliciak M**, Bazgier V, Berka K, Kubala M. Fluorone dyes have binding sites on both cytoplasmic and extracellular domains of Na,K-ATPase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2013;1828:568-76.

Kubala M, Geletičová J, **Huličiak M**, Zatloukalová M, Vacek J, Šebela M. Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by cisplatin and consequence for cisplatin nephrotoxicity. *Biomedical Paper - Olomouc* 2014;akceptované na publikáciu

Huličiak M, Reinhard L, Laursen M, Fedosova NU, Nissen P, Kubala M. Crystals of Na⁺/K⁺-ATPase with bound cisplatin. 2014;v recenznom konaní.

Huličiak M, Bazgier V, Berka K, Kubala M. RH421 binds into the ATP-binding site on the Na⁺/K⁺-ATPase. 2014;v príprave.

Abstract

Na^+/K^+ -ATPase (sodium potassium pump) is a member of P-type ATPases, which generates concentration gradients of sodium and potassium ions across the plasma membrane of all animal cells. This protein pumps three sodium ions out and two potassium ions into the cell for each ATP molecule and maintains their electrochemical potential gradients, required for electrical excitability and transport of other ions, nutrients, and neurotransmitters, as well as for regulation of cell volume and intracellular pH. Change of activity of this enzyme can influence these mechanisms and can potentially result in variety of diseases, therefore species, which can interact with Na^+/K^+ -ATPase, deserve particular attention. During my study, I studied interactions of the Na^+/K^+ -ATPase with fluorone dyes, fluorescent probe RH421 and cisplatin.

Fluorone dyes are large group of chemicals used mainly in food industry and in medicine, therefore possible interactions of these chemicals with Na^+/K^+ -ATPase can present a potential health-risk. Using fluorescence spectroscopy, we discovered that fluorone dyes bind to Na^+/K^+ -ATPase and some of them can inhibit its function. To obtain detailed information, we performed measurements of fluorescence lifetimes and fluorescence quenching and with combination of results from molecular docking, we discovered that there are two binding sites of these dyes on the protein.

Fluorescence probe RH421 is used in many laboratories for monitoring Na^+/K^+ -ATPase kinetics. The presumption is that RH421 binds to membrane and responses to the charge transfer across the membrane. Using fluorescence spectroscopy, we discovered that RH421 binds both to the membrane and to the protein and can influence its activity. Using FRET, we were able to determine binding site for RH421 and competitive experiments with ATP proved that RH421 and ATP bind to the same site.

Cisplatin is one of the most used drugs against cancer. However, treatment with cisplatin has many adverse effects and one of the most severe is the kidney damage. It is known that Na^+/K^+ -ATPase is in high concentration in kidney, therefore we tried to verify hypothesis that adverse effects during treatment by cisplatin can be caused by interaction of the Na^+/K^+ -ATPase with this drug. Measurements of the protein activity showed that cisplatin inhibits Na^+/K^+ -ATPase. Further, mass spectroscopy, electrochemical measurements and protein crystallography showed some possible binding sites and we were able to suggest some mechanisms how cisplatin can inhibit Na^+/K^+ -ATPase.

Zhrnutie

Na^+/K^+ -ATPáza (sodno-draselná pumpa), ktorá patrí do rodiny ATPáz P-typu, vytvára koncentračné gradienty sodných a draselných iónov cez plazmatickú membránu buniek všetkých živočíchov. Tento proteín prenáša tri sodné ióny von z bunky a dva draselné ióny do bunky za spotreby energie z jednej molekuly ATP a tým vytvára elektrochemické gradienty týchto iónov, ktoré sú využívané pri sekundárnom transporte ďalších iónov, živín a neurotransmiterov, na reguláciu bunkového objemu, vnútrobunkového pH. Zmeny v aktivite tohto enzýmu môžu ovplyvniť tieto mechanizmy, a v konečnom dôsledku môžu vyústiť do rozličných porúch a chorôb. Preto si látky, ktoré dokážu ovplyvniť aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy zaslúžia veľkú pozornosť. Počas môjho štúdia som sa zaoberal možnými interakciami Na^+/K^+ -ATPázy s fluoronovými farbivami, fluorescenčnou sondou RH421 a cisplatinou.

Fluoronové farbivá sú veľkou skupinou látok používaných hlavne v potravinárskom priemysle a v medicíne, čo pri možnej interakcii s Na^+/K^+ -ATPázou môže predstavovať určité zdravotné riziko. S použitím fluorescenčnej spektroskopie sme objavili, že fluoronové farbivá sa viažu na tento proteín a niektoré z nich dokonca inhibujú jeho funkciu. Merania dohasínania fluorescence, zhášacie experimenty a molekulárny doking zase pomohli odhaliť dve väzobné miesta týchto látok na proteíne.

Fluorescenčná sonda RH421 je používaná v mnohých laboratóriách po celom svete na monitorovanie kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy. Predpokladá sa, že RH421 sa naviaže do membrány a dokáže reagovať na prenos náboja cez membránu. Za použitia fluorescenčnej spektroskopie sme objavili, že sonda sa viaže nielen do membrány, ale aj na samotný proteín a dokonca môže ovplyvniť jeho aktivitu. Väzobné miesto pre RH421 na proteíne bolo odhalené pomocou Försterovho rezonančného prenosu energie, a kompetitívne experimenty s ATP potvrdili, že RH421 a ATP sa viažu do rovnakého miesta.

Cislatina je jeden z najpoužívanejších liekov proti rakovine. Avšak liečba cisplatinou má veľa nežiaducich efektov a jeden z najvážnejších je poškodenie obličiek. Na^+/K^+ -ATPáza je v obličkách exprimovaná vo veľkom množstve, preto sme sa snažili overiť hypotézu, či poškodenie obličiek počas liečby rakoviny cisplatinou nemôže byť spôsobené interakciou Na^+/K^+ -ATPázy s týmto liekom. Merania proteínovej aktivity ukázali, že cisplatinou inhibuje Na^+/K^+ -ATPázu.

Ďalšie výsledky z hmotnostnej spektroskopie, elektrochemické merania a proteínová kryštalografia ukázali niekoľko možných väzobných miest, vďaka ktorým sme boli schopný navrhnúť niekoľko mechanizmov, ako cisplatina inhibuje Na^+/K^+ -ATPázu.

1 Úvod

1.1 ATPázy P-typy

Aktívny transport látok cez bunkovú membránu je pre život bunky nevyhnutnou podmienkou. Na tento transport musí bunka vynaložiť veľa energie. Proteíny, ktoré na tento transport získavajú energiu z molekúl ATP dostali meno ATPázy. Prvou objavenou ATPázou bola Na^+/K^+ -ATPáza, ktorú objavil v roku 1957 Jens Skou pri skúmaní krabích nervov [1]. Odvtedy bolo objavených veľa ďalších ATPáz, ktoré sa v súčasnosti delia do štyroch skupín: F-, V-, ABC- a P-typ [2].

ATPázy P-typy, ktoré tvoria veľkú rodinu integrálnych membránových transportérov, boli nájdené u všetkých živých organizmov od baktérií a húb až po rastliny a živočíchy. Názov tejto skupine dal fakt, že počas svojho cyklu tieto proteíny vytvárajú fosforylovaný medzistupeň na konzervovanom aspartátovom reziduu. Táto veľká skupina membránových proteínov sa ďalej delí na päť menších podskupín a tie sa ďalej delia na jednotlivé triedy podľa transportovaného substrátu [3].

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

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

I.B trieda zahrňuje 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,

II.B trieda zahrňuje vápnikové pumpy, ktoré viažu jeden Ca^{2+} ión.

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

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

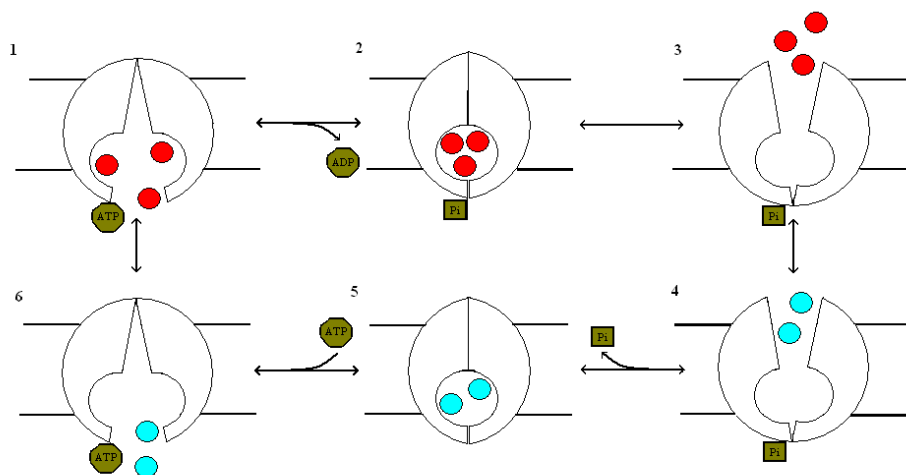
III. zahrňuje H^+ -ATPázu a Mg^{2+} -ATPázu, ktoré boli nájdené v bunkách húb a baktérií.

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

V. skupina je poslednou skupinou ATPáz P-typy a obsahuje ATPázy, ktorých funkcia doposiaľ nebola celkom objasnená [3].

1.2 Na⁺/K⁺-ATPáza

Na⁺/K⁺-ATPáza patrí do veľkej rodiny ATPáz P-typu, ktoré aktívne transportujú ióny cez biologické membrány [4]. Na⁺/K⁺-ATPáza transportuje tri sodné ióny von z bunky a dva draselné ióny do bunky za hydrolyzy jednej molekuly ATP. Tento aktívny transport vytvára elektrochemický gradient, ktorý je esenciálny pre elektrickú excitabilitu, príjem ďalších látok do bunky (ióny, živiny, neurotransmitery a iné) a pre reguláciu bunkového objemu a vnútrobunkového pH. Väzobné miesta pre kationy sú lokalizované v transmembránovej doméne tohto proteínu a transport iónov je spojený s otvaraním a zatváraním prístupu k týmto miestam z cytoplazmy alebo extracelulárnej oblasti, ktoré sú tradične označované ako E1 a E2 konformácie (obrázok 1) [5].



Obrázok 1. Zjednodušený cyklus Na⁺/K⁺-ATPázy. (1) Pumpa v E1 konformácii s naviazaným ATP má vysokú afinitu ku trom sodným iónom. (2) Energia z hydrolyzy ATP je využitá na konformačnú zmenu proteínu. (3) Dochádza ku zmene konformácie z E1 na E2 a následnému vypusteniu sodných iónov do extracelulárneho priestoru. (4) Pumpa v E2 konformácii s naviazaným fosfátom má vysokú afinitu ku dvom draselným iónom. (5) Odpojenie fosfátu a naviazanie ATP spôsobuje konformačnú zmenu proteínu. (6) Pumpa sa vracia do E1 konformácie, dochádza k vypusteniu draselných iónov do cytoplazmy a cyklus sa môže zopakovať.

Minimálna funkčná jednotka Na⁺/K⁺-ATPázy pozostáva z α - a β -podjednotky (obrázok 2).

Podjednotka α obsahuje väzobné miesta pre kationy a ATP a je homologická pre všetky ATPázy P-typu ako je napríklad Ca²⁺-ATPáza. Túto podjednotku tvorí desať transmembránových helixov a dva predĺžené cytoplazmické segmenty, ktoré vytvárajú tri cytoplazmické domény.

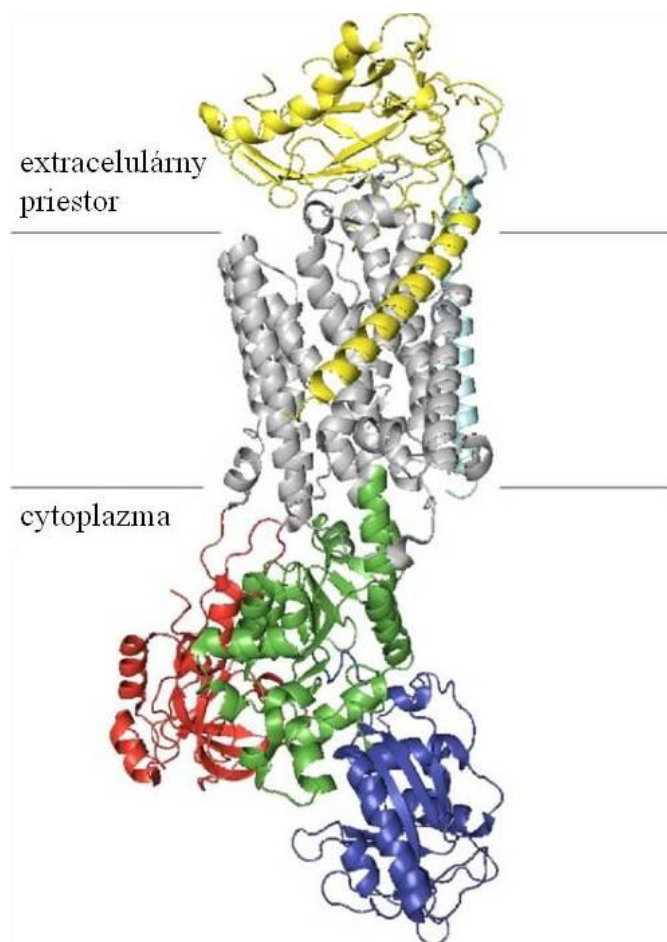
Tieto domény sa nazývajú N (viaže nukleotidy), P (obsahuje fosforylačné miesto) a A (zodpovedná za konformačné zmeny) [6, 7]. Veľký cytoplazmický segment, ktorý spája transmembránové helixy M4 a M5 (kľučka C45) vytvára N- a P- doménu. A- doména je tvorená menším cytoplazmickým segmentom spájajúcim helixy M2 a M3 (kľučka C23) a N-terminálnym koncom. U ľudí boli objavené štyri izoformy α -podjednotky Na^+/K^+ -ATPázy: izoforma $\alpha 1$ je prevládajúca a všadeprítomná, izoforma $\alpha 2$ je exprimovaná hlavne v kostiach, srdci a v hladkej svalovine. Ďalej bola nájdená v mozgu, pľúcach a v tukových tkanivách. Izoforma $\alpha 3$ je primárne exprimovaná v neurónoch a v bunkách srdcovej svaloviny [8]. Izoforma $\alpha 4$ je exprimovaná iba v spermiiach a niektoré publikácie ukazujú, že je zodpovedná za ich pohyb [9, 10].

Podjednotka β je unikátna pre ATPázy P-typu, ktoré transportujú draselné ióny, ako sú Na^+/K^+ -ATPáza a H^+/K^+ -ATPáza. Je potrebná na transport α - podjednotky do plazmatickej membrány z endoplazmatického retikula a napomáha transportu draselných iónov. Podjednotka β sa vyskytuje v troch izoformách: $\beta 1$ bola nájdená vo väčšine tkanív a je všadeprítomná [11], $\beta 2$ je exprimovaná hlavne neurónmi a bunkami srdcovej svaloviny [12], izoforma $\beta 3$ sa nachádza v spermiiach [13].

Komplex podjednotiek α a β býva často spájaný s malým proteínom patriacim do rodiny FXYD proteínov (podľa konzervovaného motívu FXYD). V tkanive z obličiek je tento proteín nazývaný ako γ - podjednotka. Jej transmembránová časť obsahuje približne 30 aminokyselín s prevažne α štruktúrou a predpokladá sa, že slúži ako regulačná podjednotka [14].

V súčasnosti naše znalosti o Na^+/K^+ -ATPáze boli výnimočne rozšírené vďaka nedávno publikovaným kryštálovým štruktúram s vysokým rozlíšením [15-18]. Avšak kryštalografia poskytuje iba statické obrázky, preto kinetické štúdie vykonávané za fyziologických podmienok sú stále významným zdrojom informácií, ktoré pomáhajú k pochopeniu mechanizmu Na^+/K^+ -ATPázy.

Cytoplazmická kľučka C45 reprezentuje približne 40% váhy α - podjednotky Na^+/K^+ -ATPázy a tvorí N- a P- domény (obrázok 2). Táto cytoplazmická kľučka obsahuje miesto pre väzbu ATP a konzervované aspartátové reziduum Asp369, ktoré je fosforylované počas katalytického cyklu. V niektorých publikáciách bolo ukázané, že kľučka C45 môže byť izolovaná od zvyšku enzýmu [19-21], pričom sa zachováva jej štruktúra [22], dynamické vlastnosti [19, 23] a schopnosť viazať nukleotidy [24-26]. Tento proteín môže byť ľahko exprimovaný s histidínovou kotvou v bakteriálnych bunkách [20]. Vďaka veľkému výťažku pri expresii a dobrej rozpustnosti, je tento proteín vynikajúcim modelom na skúmanie interakcií Na^+/K^+ -ATPázy s rozličnými látkami.



Obrázok 2. Štruktúra Na^+/K^+ -ATPázy. Podjednotka α je tvorená desiatimi transmembránovými helixami (šedá) a cytoplazmickou časťou. Cytoplazmické domény N (modrá) a P (zelená) sú tvorené veľkým segmentom, ktorý spája transmembránové helixy M4 a M5 (kľučka C45), doména A (červená) je tvorená N-koncom a kľučkou C23. Podjednotka β je zobrazená žltou farbou a transmembránový helix podjednotky γ je zobrazený slabomodrou farbou. (PDB kód 2ZXE).

1.3 Fluoronové farbivá

Fluoronové farbivá patria do skupiny xanténových farbív (obrázok 3). Tieto farbivá sú využívané v mnohých oblastiach. Sú používané v potravinárskom priemysle ako farbivá, ako súčasť niektorých liekov, v laseroch, v medicíne pri liečbe rakoviny a na lepšiu vizualizáciu telesných tekutín. Polymérové filmy obsahujúce tieto látky sa využívajú na optické nahrávanie informácií. Medzi tieto látky patria hlavne fluoresceín, bengal rose, eozín Y, 5(6)-karboxyeozín a erytrozín B. Majú podobnú štruktúru a spektrálne vlastnosti, ktoré závisia na tom, aká skupina sa nachádza na kostre farbiva [27].

Fluoresceín a jeho deriváty tvoria skupinu široko používaných organických fluorofórov, ktoré sú využívané na značenie a detekciu biomolekúl kvôli ich vysokému kvantovému výťažku a schopnosti viazať sa na biomolekuly [28]. Fluoresceín je používaný napríklad v medicíne pri artériografii, kde pomáha pri vizualizácii krvného obehu.

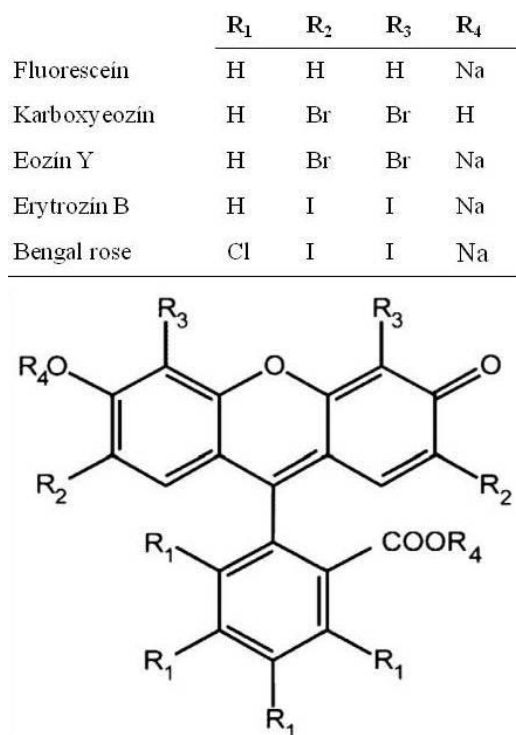
Bengal Rose je vo vode rozpustné xanténové farbivo, ktoré je v súčasnosti používané v oftalmológii pri diagnostike problémov zraku. Jeho spektrálne vlastnosti, ako je vysoký absorbný koeficient vo viditeľnom spektre a tvorba dlho žijúcich radikálov tejto látky sú využívané pri fotodynamickej terapii niektorých nádorov [29].

O erytrozín B, ktorý sa používa ako potravinové farbivo, sú známe jeho karcinogénne účinky. Toto farbivo je známe ako nešpecifický inhibítor mnohých proteín-proteínových interakcií [30].

Eozín Y je považovaný za reverzibilný inhibítor Na^+/K^+ -ATPázy, ktorý je kompetitívny s ATP pri absencii draselných iónov. Jeho spektrálne vlastnosti sú veľmi citlivé na konformačné zmeny tohto enzýmu. Bolo ukázané, že fluorescencia eozínu Y v prítomnosti Na^+/K^+ -ATPázy je zosilnená horečnatým kationom, ktorý je dôležitým kofaktorom enzýmovej aktivity [31].

Na základe štruktúrnej podobnosti s eozínom Y sa dá predpokladať, že všetky spomínané fluoronové farbivá interagujú s Na^+/K^+ -ATPázou. Na^+/K^+ -ATPáza patrí do skupiny membránových proteínov, ktoré sú významné potencionálne ciele pre rôzne liečivá. Spolu s faktom, že úloha Na^+/K^+ -ATPázy v bunke je esenciálna, môžu mať fluoronové farbivá výrazný vplyv na správne fungovanie celej bunky.

Pri skúmaní možných interakcií týchto farbív s Na^+/K^+ -ATPázu sme využili ich spektrálnych vlastností a sledovali sme doby života fluorescencie ako aj dohasínania fluorescencie. Pri meraniach sme používali celý enzým ako aj cytoplazmickú kľučku C45, z dôvodu získania detailnejších štruktúrnych informácií.



Obrázok 3. Štruktúry fluoronových farbív

1.4 Cisplatina

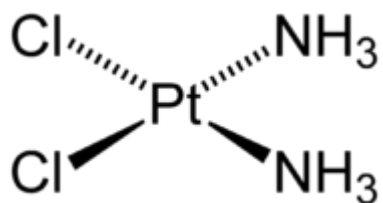
Cisplatina (cis-diamminodichloroplatina(II)) (obrázok 4) je jedno z najpoužívanejších chemoterapeutík v liečbe rakoviny. Má schopnosť kovalentne sa viazať na molekuly DNA v jadre rakovinových buniek, a tak zabraňuje replikácii DNA a bunkovému deleniu [32]. Cisplatina sa do bunky dostáva vďaka membránovému transportéru pre meď [33], alebo pomocou organického kationového transportéru OCT2 [34]. Transport do cytoplazmy je významný pre cisplatinovú aktivitu. V extracelulárnom prostredí, kde je veľká koncentrácia chlóru má cisplatina veľmi slabú reaktivitu. Po transporte do cytoplazmy, kde je koncentrácia chlóru nižšia, dochádza k nahradeniu atómov chlóru zo štruktúry cisplatiny a tá sa stáva reaktívnejšou [35].

Ako bolo spomínané vyššie, cisplatina je jeden z najpoužívanejších liekov proti rakovine. Avšak pacienti liečení cisplatinou sú vystavení mnohým nežiadúcim efektom ako sú napríklad nervové poruchy a strata sluchu [32, 36]. Jedným z najvážnejších nežiadúcich efektov je akútne zlyhanie obličiek, ktoré v minulosti postihovalo približne 20 až 30% pacientov počas prvého týždňa chemoterapie cisplatinou [37-39]. Dnes už je tento počet oveľa nižší, avšak poškodenie obličiek je stále limitujúci faktor pri použití cisplatiny. Ďalšie chemoterapeutiká obsahujúce platínu, ako sú napríklad oxaliplatina a karboplatina nepoškodzujú obličky, avšak sú účinné proti iným druhom rakoviny.

Primárna úloha obličiek je filtrovať odpadové produkty metabolizmu z krvi do močoviny a zároveň zachovať metabolicky hodnotné ióny a biomolekuly ako napríklad glukózu. Zatiaľ čo čistenie krvi, ktoré nastáva v glomeruluse (klbko vlásočnic) je jednoduchá filtrácia, spätné prijímanie vody, sodíka a ďalších hodnotných látok je poháňané sofistikovaným systémom špecifických membránových transportérov. Zdá sa, že hlavnú úlohu v tomto procese hrá kontrola koncentrácie sodných iónov.

Gradient sodných iónov je využívaný rozličnými sekundárnymi aktívnymi transportérmi napr. glukózovými, vápnikovými a vodíkovými transportérmi [40]. Je veľa transportérov, ktoré využívajú gradient sodných iónov, avšak je len jeden transportér, ktorý tento gradient vytvára a to je Na^+/K^+ -ATPáza. Preto zatiaľ čo zlyhanie jedného z niektorých sekundárnych transportérov vyústi v problémy s opätovným príjmom jednej látky, poškodenie alebo znefunkčnenie Na^+/K^+ -ATPázy môže vyústiť v kolaps celého systému. Je známe, že v obličkách je vysoká koncentrácia Na^+/K^+ -ATPázy [41], preto sme sa rozhodli overiť hypotézu, či cisplatina dokáže interagovať s Na^+/K^+ -ATPázou a ovplyvniť jej aktivitu, ktorá by mohla vyústiť v zlyhanie obličiek pri liečbe cisplatinou. Ďalej sme sa venovali zisťovaniu štruktúrnych informácií medzi cisplatinou a celou Na^+/K^+ -ATPázou ako aj s cytoplazmickými kľúčkami C45 a C23.

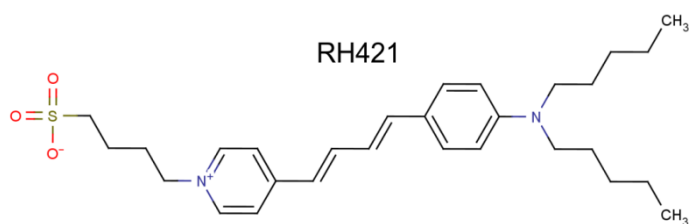
Tieto informácie môžu byť veľmi užitočné pri hľadaní spôsobu, ako zabrániť poškodeniu obličiek pri liečbe rakoviny cisplatinou.



Obrázok 4. Štruktúra cisplatiny

1.5 RH421

Fluorescenčná spektroskopia styrpyrimidiového farbiva RH421 (N-(4-sulfobutyl)-4-(4-(p-dipentylaminofenyl)-butadienyl)-pyrimidiová vnútorná soľ) (obrázok 5) je jednou z najpoužívanejších metód na monitorovanie kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy. V niektorých laboratóriách sa používa na sledovanie väzby iónov a ich prenos cez plazmatickú membránu. Farbivo RH421 reaguje na zmeny elektrického náboja v membráne a táto schopnosť môže byť využitá pri meraní prenosu náboja spojeného s väzbou iónov a ich následného vypustenia do extracelulárneho priestoru alebo cytoplazmy. Bolo objavené, že táto fluorescenčná sonda má špecifickú odozvu pri prenose tretieho sodného iónu Na^+/K^+ -ATPázy [42]. Ďalej bolo ukázané, že RH421 reaguje na konformačné zmeny proteínu [43, 44]. Nedávno bolo farbivo RH421 použité na skúmanie mechanizmu väzby Mg^{2+} na Na^+/K^+ -ATPázu [45] a na pozorovanie interakcií ATP s Na^+/K^+ -ATPázou [44, 46].



Obrázok 5. Štruktúra RH421.

2 Materiály a metódy

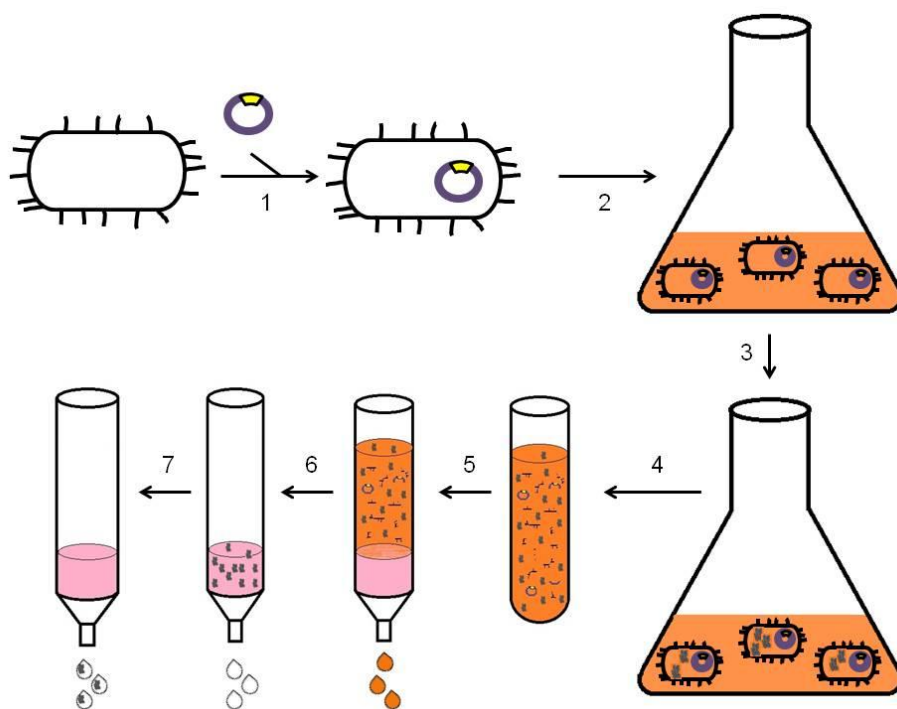
2.1 Chemikálie

Cisplatin bola rozpustená v deionizovanej vode na koncentráciu 1 mM. Pre ďalšie experimenty bol tento roztok používaný ako neaktivovaná cisplatin. Pridaním dvojnásobného molárneho množstva AgNO_3 (24 hodinová inkubácia) boli odstránené atómy chlóru zo štruktúry cisplatinu a tento roztok sme používali ako aktivovanú cisplatinu.

Všetky ostatné chemikálie použité pri meraniach boli v maximálnej komerčne dostupnej čistote a všetky roztoky boli pripravené za použitia deionizovanej vody. Detaily o chemikáliách, ich koncentráciách, ich pôvode a ďalšie informácie sú bližšie uvedené v článkoch Huličiak a kol. 2012, Havlíková a kol. 2013 a ďalších [47-51].

2.2 Príprava cytoplazmickej kľučky C45 a jej tryptofanových mutantov

Ako bolo spomínané v úvode, použitie cytoplazmickej kľučky C45 v niektorých prípadoch výrazne uľahčuje experimenty, preto sme ju v niektorých prípadoch uprednostňovali pred použitím celého proteínu. Detailná príprava cytoplazmickej kľučky C45 bola publikovaná v článku Gryčová a kol. 2006 [19] a jej zjednodušené schéma možno vidieť na obrázku 6. V krátkosti, DNA so zakódovanou sekvenciou pre kľučku C45 bola vložená do *Escherichia coli*, nasledovala inkubácia v LB médiu pri 37 °C dokiaľ hodnota absorpcie nebola medzi 0,6 a 0,8. Potom expresia proteínu bola naštartovaná pridaním 0,5 mM IPTG za zníženej teploty 17 °C. Bunky boli zozberané 15 minútovou centrifugáciou pri 5000 g. Všetky nasledujúce kroky boli vykonané pri teplote 4 °C, aby sa zabránilo degradácii proteínu. Pelet z centrifugácie bol rozpustený v purifikačnom pufry s inhibítormi proteáz. Bunky boli rozbité za použitia sonikátora a výsledný homogenát bol centrifugovaný 25 minút pri 15000 g. Na získanie čistého proteínu bola ďalej použitá afinitná chromatografia. Proteín obsahuje histidínovú kotvu, ktorá spôsobí, že proteín ostane zachytený na kolóne, zatiaľ čo ostané proteíny a nečistoty voľne prejdú kolónou. Na uvoľnenie proteínu z kolóny bol použitý imidazol a následne dialýza bola potrebná na odstránenie imidazolu zo vzoriek. Čistota proteínu bola overená pomocou SDS-PAGE a výsledná koncentrácia proteínu bola určená pomocou metódy Bradfordovej za použitia albumínu z hovädzieho séra ako štandardu [52].



Obrázok 6. Zjednodušené schéma prípravy cytoplazmickej kľučky C45. (1) vloženie plazmidu do baktérie, (2) rast a množenie baktérií v LB médiu za vhodných podmienok, (3) štart expresie proteínu pridaním IPTG, (4) zozberanie buniek centrifugáciou a sonikácia, (5) afinitná chromatografia výsledného homogenátu, (6) premytie kolóny, (7) elúcia proteínu pomocou imidazolu.

2.3 Izolácia Na^+/K^+ -ATPázy

Na^+/K^+ -ATPáza bola izolovaná z prasačích obličiek podľa protokolu uvedeného v článku Klodos a kol. 2002 [41]. Z čerstvých obličiek bolo opatrne vyrezané tmavo červené tkanivo, ktoré bolo potom následne rozpustené v pufrí 25 mM imidazol, 250 mM sacharóza, pH 7,5 v pomere 10 ml pufru na 1 gram tkaniva. Nasledovala homogenizácia pomocou teflónového homogenizátoru. Výsledný homogenát bol centrifugovaný 20 minút pri 9000g. Supernatant bol opatrne oddelený a znovu centrifugovaný 30 minút pri 47000g. Výsledný pelet bol rozpustený v celkovom objeme 30 ml v pufrí 25 mM imidazol, 250 mM sacharóza, pH 7,5 a homogenizovaný pomocou ručného skleneného homogenizátora. Po zmeraní koncentrácie boli mikrozómy (časti membrán s proteínom) nariadené na koncentráciu 5 mg/ml a uschované pri $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Druhým krokom je purifikácia enzýmu z mikrozómov. Bol pripravený nasledujúci roztok: 6,25 ml mikrozómov, 9,8 ml vody, 1,12 ml 1 M imidazol pH 7,5, 0,5 ml 0,1 M EDTA, 0,8 ml 0,1 M ATP a 6,4 ml 6,6 mM SDS. Ďalej boli pripravené kyvety s nespojitým gradientom sacharózy. Kyvety obsahovali 25%, 30% a 40% sacharózu. Roztok s mikrozómami bol pridaný na vrchol kyvety a nasledovala ultracentrifugácia 3 hodiny pri 200000g. Proteín, ktorý sa nachádza na rozhraní medzi 30% a 40% sacharózou bol opatrne odsatý a znova centrifugovaný 2 hodiny pri 200000g. Výsledný pelet bol rosuspendovaný v 25 mM imidazolovom pufri pH 7,5 a zriedený na koncentráciu 5 mg/ml.

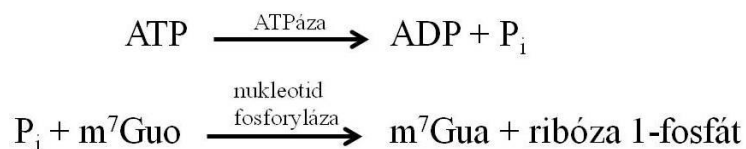
2.4 Meranie ATPázovej aktivity

Existuje veľa techník na meranie ATPázovej aktivity. Každá z týchto techník je založená na fakte, že ATPázy počas svojho cyklu využívajú energiu z hydrolýzy ATP (odtiaľ názov ATPázy), pričom ATP sa rozkladá na ADP a P_i . Vzniknutý fosfát dokáže veľmi rýchlo reagovať s ďalšími látkami a práve reakcia fosfátu s ďalšou látkou sa využíva na sledovanie aktivity ATPáz.

Tieto techniky možno rozdeliť do troch kategórií podľa toho, aká metóda sa pri nich využíva. Jedná sa o absorbančné metódy (zmena absorbancie nejakej látky po reakcii s fosfátom), fluorescenčné metódy (zmena intenzity fluorescencie nejakej látky po reakcii s fosfátom) a o rádioaktívne metódy (založené na sledovaní rádioaktívneho fosforu ^{32}P). Každá z týchto techník má svoje výhody a nevýhody. Pri meraní aktivity Na^+/K^+ -ATPázy sme používali fluorescenčnú metódu založenú na premene m^7 guanozínu na m^7 guanín pomocou enzýmu nukleotid fosforylázy, ako bolo publikované v článku Banik a Roy [53]. Schéma tejto reakcie je zobrazená na obrázku 7.

Počas merania aktivít sa nám však podarilo zistiť, že pôvodný protokol, tak ako je popísaný v literatúre, nevedie k reprodukovateľným výsledkom kvôli vybielovaniu (photobleaching) m^7 guanozínu. Z tohto dôvodu osvetľovanie vzorku kontinuálnym svetlom bolo nahradené krátkymi pulzmi svetla a merania boli vykonávané bez prístupu svetla, čo viedlo k oveľa lepším výsledkom.

Detaily o použitých chemikáliách, ich koncentráciách ako aj o presnom postupe merania sú uvedené v článku Huličiak a kol. 2012 [47].



Obrázok 7. Princíp fluorescenčnej metódy na meranie ATPázovej aktivity. Metóda je založená na reakcii fosfátu s m^7 guanozínom a jeho následnej premene na m^7 guanín. Obe tieto látky majú odlišné fluorescenčné vlastnosti a na základe zmien fluorescencie možno sledovať aktivitu ATPázy.

2.5 Kryštalizácia a vytvorenie štruktúry

(Kryštály boli pripravené autorom práce, ich následnú analýzu a vytvorenie štruktúry vykonali Dr. Reinhard a prof. Nissen)

Proteínová kryštalografia sa zameriava na vytvorenie priestorovej štruktúry proteínov pomocou difrakcie röntgenového žiarenia na monokryštáloch proteínov. Znalosť priestorovej štruktúry proteínov je nevyhnutná pri pochopení ich funkcie a úlohe v organizme. Takisto pomáha presne určiť väzobné miesta pre ligandy na proteíne.

Proces vytvorenia priestorovej štruktúry býva často veľmi zdĺhavý a namáhavý. Na začiatku je treba získať dostatočné množstvo proteínu vo veľkej čistote. Často odporúčaná čistota je viac než 95% [54]. Ďalším krokom je vytvorenie kryštálu proteínu. Tento proces býva veľmi komplikovaný a závislý na mnohých parametroch ako napríklad: koncentrácia a čistota proteínu, zloženia zrážadla, teplota, pH, tlak a veľa ďalších. Takisto záleží na použitej technike kryštalizácie. Z dôvodu veľkého počtu podmienok hľadanie vhodných parametrov pre kryštalizáciu môže byť časovo veľmi náročné (od týždňov až po niekoľko rokov). Ani získanie prvých kryštálov nemusí byť dostatočné na vytvorenie priestorovej štruktúry. Ich difrakčná kvalita nemusí byť dostatočná a často býva premenlivá. Preto je potrebné získať dostatočné množstvo kvalitných dát z testovania veľkého počtu kryštálov a takisto je potrebná optimalizácia kryoprotekcie.

Na analýzu proteínových kryštálov sa štandardne využívajú intenzívne zdroje röntgenového žiarenia, napríklad zdroj synchrotrónového žiarenia. Tieto merania sa uskutočňujú pri nízkych teplotách (obvykle s pomocou pár tekutého dusíku), aby sa zabránilo poškodeniu kryštálov. K určeniu priestorovej štruktúry je ďalej potreba určiť počiatočné hodnoty fáz štruktúrnych faktorov. Tieto hodnoty sa určujú buď porovnaním s už známou štruktúrou, alebo sa počiatočné fázy určujú experimentálne napríklad pomocou anomálneho rozptylu ťažkých atómov.

Finálne určenie priestorovej štruktúry proteínu sa uskutočňuje pomocou špecializovaného softwaru a závisí na veľkosti skúmanej štruktúry a na kvalite nameraných dát.

Kryštály Na^+/K^+ -ATPázy boli pripravené za použitia metódy visiacej kvapky pri 19 °C. 1 μL rozpusteného proteínu bol zmiešaný s kryštalizačným pufrom v pomere 1:1. Po trojtýždňovej inkubácii sme získali proteínové kryštály, ktoré boli dostatočne kvalitné na difrakčné štúdie. K proteínovým kryštálom bolo pridané malé množstvo cisplatinu vo forme prášku, pretože pridanie vodného roztoku cisplatinu spôsobovalo rozpad kryštálov. Po inkubácii cez noc, bol ku kryštálom pridaný glycerol z dôvodu ochrany pred poškodením, ktoré môže spôsobiť prudké zmrazenie v tekutom dusíku. Analýza kryštálov bola vykonaná na synchrotróne PXIII vo Švajčiarsku a dáta boli spracované pomocou programov: *XDS*, *XSCALE* a *TRUNCATE*. Detailné informácie o kryštalizácii a vytvorení priestorovej štruktúry sú uvedené v článku Huličiak a kol. 2014 [50].

2.6 Steady-state fluorescenčné merania

(Merania fluorescenčných spektier fluoronových farbív vykonala Dr. Havlíková, merania 3D fluorescenčného spektra RH421 a experimenty RH421 s lipidmi vykonal Doc. Kubala)

Fluorescenčné merania sa dajú rozdeliť do dvoch skupín: tzv. steady-state a časovo rozlíšené. Steady-state merania sú vykonávané s konštantným osvetlením vzorku a sleduje sa hlavne intenzita fluorescencie a emisné spektrum. Emisné spektrum fluorofóru závisí na jeho okolí, preto pomocou zmien v týchto spektrách možno napríklad sledovať väzbu fluorescenčných látok na proteíny.

Merania fluorescenčných spektier boli vykonávané na spektrofluorimetri F4500 (Hitachi, Japonsko). Viac detailov o meraní steady-state fluorescencie je uvedených v článkoch Havlíková a kol. 2013, Huličiak a kol. 2014 [48, 51].

2.7 Časovo rozlíšené merania fluorescencie

Časovo rozlíšené meranie fluorescencie prináša niektoré výhody oproti meraniu steady-state. Steady-state merania sú v jednoduchosti priemerom z dohasínania intenzity fluorescencie, preto merania dohasínania fluorescencie prinášajú viac informácií o vzorku. Pri týchto meraniach sú vzorky osvetľované pulzmi svetla, ktoré sú typicky kratšie než je dohasínanie vzorku. Výhodou oproti steady-state je, že dohasínanie fluorescencie nezávisí na koncentrácii.

Pomocou doby života fluorescencie možno sledovať zmeny v okolí fluoroforu ako napríklad polaritu, pH, prítomnosť zhášadla. Časovo rozlíšené meranie fluorescencie sme použili na určenie interakcie Na⁺/K⁺-ATPázy s fluoronovými farbami.

Pri našich experimentoch sme používali metódu časovo-korelovaného počítania fotónov (TCSPC) na spektrometri PicoHarp300 (PicoQuant, Nemecko). Ako zdroj sme používali pulznú diódu emitujúcu na vlnovej dĺžke 445 nm (PicoQuant, Nemecko). Frekvencia pulzov bola 10 MHz. Prístrojová funkcia (IRF) bola určená s použitím vody ako rozptylovača. Výsledky boli vyhodnocované pomocou softvéru FluoFit 4.2.1 (PicoQuant). Použitý model bol sumou exponenciál s dekonvolúciou prístrojovej funkcie:

$$I(t) = IRF \otimes \sum_i \alpha_i \times e^{-t/\tau_i}, \quad (1)$$

a intenzitou vážená doba života bola vypočítaná ako

$$\tau_M = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad (2)$$

Pre všetky vzorky sme boli schopný dosiahnuť fit s χ_R^2 blízko 1,00 a náhodnú distribúciu reziduí. Detailné nastavenie prístroja a ostatné parametre použité pri meraní sú uvedené v článku Havlíková a kol. 2013 [48].

2.8 Časovo rozlíšené zhášanie fluorescencie a určenie zhášacích konštánt

Zhášanie fluorescencie sa dá definovať ako proces, pri ktorom dochádza k poklesu kvantového výťažku fluorescencie bez zmeny emisného spektra a môže byť následkom rôznych procesov.

Zhášanie môže pomôcť pri približnom určení väzobného miesta. Skúmaním prístupnosti sondy pre zhášadlo sa dá usúdiť, či sa sonda viaže na povrch proteínu, alebo niekam hlboko do štruktúry proteínu a je tak pre zhášadlo neprístupná. Zhášacie experimenty sme použili na skúmanie interakcií fluoronových farbív s Na⁺/K⁺-ATPázou.

Merania dôb života boli uskutočnené na spektrometri PicoHarp300 (PicoQuant, Nemecko). Ako zdroj sme používali pulznú diódu emitujúcu na vlnovej dĺžke 445 nm (PicoQuant, Nemecko).

Ako zhášadlo sme používali jodid. Účinnosť zhášania bola určená podľa Stern-Volmerovej rovnice:

$$K_{SV} = \frac{\frac{\tau_0}{\tau} - 1}{[Q]} \quad (3)$$

kde τ_0 a τ sú doby života fluorescencie bez prítomnosti a v prítomnosti zhášadla. $[Q]$ je koncentrácia zhášadla a K_{SV} je Stern-Volmerova zhášacia konštanta. Prístupnosť fluorofóru je úmerná bimolekulárnej zhášacej konštante k_q , ktorá bola určená za použitia rovnice:

$$k_q = K_{SV} / \tau_0 \quad (4)$$

Detailné informácie o meraní zhášania fluorescencie fluoronových farbív sú uvedené v článku Havlíková a kol. 2013 [48].

2.9 Kapilárna elektroforéza

(Merania kapilárnej elektroforézy vykonal Dr. Vacek)

Kapilárna elektroforéza je metóda, ktorá slúži na separáciu látok na základe ich rôznej pohyblivosti v elektrickom poli. Táto separácia prebieha v kapiláre naplnenej elektrolytom.

Kapilárna elektroforéza bola použitá na analýzu cisplatinových komplexov a všetky experimenty boli vykonané pomocou Prince 550 Capillary Electrophoresis System (PrinCE Technologies, Essen, Holandsko) vybaveným Lambda 1010 UV-vis detektorom (Bishoff, Leonberg, Nemecko) nastaveným na 210 nm. Dáta boli analyzované pomocou programu DAX a separácia prebiehala na kapiláre vyplnenej taveným kremeňom. Detailnejšie informácie sú uvedené v článku Huličiak a kol. 2012 [47].

2.10 Chronopotenciometrická analýza interakcií cisplatiny s kľučkou C45

(Merania chronopotenciometrickej analýzy vykonal Dr. Vacek, proteínové vzorky poskytol autor práce)

Interakcie kľučky C45 s cisplatinou boli analyzované pomocou techniky adsorpčného prichytenia skombinovaného s chronopotenciometrickou stripovou analýzou konštantným prúdom (AdT CPSA). Táto metóda je založená na adsorbčnom zakoncentrovaní biomakromolekúl na elektróde, prenose adsorbovanej vrstvy do nového média s elektrolytom a následného merania napätia. Pri meraní bola použitá HMDE elektróda, ktorá funguje na princípe visiacej kvapky ortuti. Elektróda bola najskôr ponorená do roztoku vzorku, po inkubácii 30 sekúnd bola umytá deionizovanou vodou a následne umiestená do elektrochemickej cely s roztokom elektrolytu. Všetky merania boli vykonané pri izbovej teplote a pomocou μ Autolab III analyzátora (EcoChemie, Holandsko). Detailnejšie informácie sú uvedené v článku Huličiak a kol. 2012 [47].

2.11 Hmotnostná spektrometria

(Merania hmornostných spektier vykonal prof. Šebela, proteínové vzorky poskytol autor práce)

Hmotnostná spektrometria umožňuje kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu na základe tvorby nabitých častíc zo skúmaných látok, ktoré sú následne rozlíšené na základe pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z). Merania boli vykonávané na prístroji MALDI-TOF, ktorý predstavuje jeden z typov hmornostných spektrometrov. Jeho princípom je tvorba iónov za prítomnosti matrice s detektorom, ktorý meria dobu letu iónov. Pomocou hmornostnej spektrometrie sme určovali väzbu cisplatiny na kľučku C45.

Merania boli vykonávané na prístroji Microflex LRF20 MALDI-TOF (Bruker Daltonik, Brémy, Nemecko). Vzorky kľučky C45 boli inkubované s cisplatinou v pomere proteín:cisplatina 1:20 cez noc pri izbovej teplote. Ako matrica bola použitá kyselina sinapová v 0,1% TFA/acetonitril, 1:1, v/v. Potom malé množstvo skúmaného proteínu bolo umiestnené na meraciu doštičku, ktorá bola najskôr pokrytá tenkou vrstvou kyseliny sinapovej rozpustenej v acetóne a vzorky boli ponechané na vyschnutie na vzduchu. Tvorba iónov bola docielená použitím dusíkového lasera, ktorý vysiela pulzy na vlnovej dĺžke 337 nm a s frekvenciou 60 Hz.

Kalibrácia prístroja bola vykonaná pomocou za použitia zmesí proteínových kalibračných štandardov I a II (Bruker Daltonik, Nemecko). Detailné informácie o použitých objemov, koncentráciách a nastavení prístroja sú uvedené v článku Huličiak a kol. 2012 [47].

2.12 MALDI-TOF peptide mass fingerprinting

(Merania MALDI-TOF peptide mass fingerprinting vykonal prof. Šebela, proteínové vzorky poskytol autor práce)

Túto metódu sme použili na určenie častí proteínu, na ktorých dochádza k väzbe cislatiny. Vzorky proteínu boli najskôr inkubované s cisplatinou. Potom nasledovalo štiepenie štruktúry proteínu trypsínom a výsledné segmenty boli rozseparované pomocou polyakrylamidovej elektroforézy. Vzorky s rovnakou molekulovou hmotnosťou boli následne vyrezané z gélu a analyzované pomocou hmotnostného spektrometra. Segmenty z proteínu, ktorý bol inkubovaný s cisplatinou, boli porovnané so segmentami z neinkubovaného proteínu a takto bolo možné určiť segmenty, na ktoré sa viaže cisplatina.

Merania boli vykonávané na prístroji Microflex LRF20 MALDI-TOF (Bruker Daltonik, Brémy, Nemecko) vybavenom microSout iónovým zdrojom a 337 nm dusíkovým laserom s frekvenciou 60 Hz. Ako matrica bola použitý roztok, ktorý obsahoval 5 mg CHCA v 0,33 ml 2,5% TFA (v/v) a 0,66 ml acetonitrilu. Po pridaní matrice boli vzorky ponechané na vyschnutie na vzduchu. Hmotnostné spektrá boli zozberané po 100 až 300 laserových pulzov a zmes proteínov (Bruker Daltonik, Nemecko) bola použitá na kalibráciu. Získané spektrá boli spracované pomocou programov flexAnalysis 3.0 a Biotoools 3.2 (Bruker Daltonik, Nemecko). Viac detailov je uvedených v článku Huličiak a kol. 2012 [47].

2.13 FRET

Försterov rezonančný prenos energie je mechanizmus opisujúci nežiarivý prenos energie medzi dvomi látkami: donorom a akceptorom. Prenos energie nastáva pomocou interakcií dipól-dipól a platí, že emisné spektrum donoru sa musí prekrývať s absorbným spektrom akceptoru. Účinnosť prenosu energie je nepriamoúmerne závislá na šiestej mocnine vzdialenosti medzi donorom a akceptorom, čo umožňuje určiť vzdialenosť medzi týmito dvomi látkami.

FRET sme využili na určenie väzobného miesta fluorescenčného farbiva RH421 na veľkej cytoplazmickej kľučke C45. Princíp metódy je podrobnejšie vysvetlený v časti 3.2.4. Pri meraní FRETu je potrebné určiť kvantové výťažky, Försterove vzdialenosti a ďalšie parametry.

2.14 Kvantové výťažky

Kvantový výťažok je definovaný ako počet vyžiarených fotónov ku počtu fotónov absorbovaných. Jeho hodnota sa dá ľahko určiť porovnaním so štandardom, u ktorého je jeho kvantový výťažok známy.

Kvantové výťažky donoru vo všetkých mutantoch C45 boli určené pomocou rovnice [28]:

$$Q_Y = Q_R \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \frac{n^2}{n_R^2} \quad (7)$$

kde Q_Y je kvantový výťažok, I je integrovaná intenzita, OD je optická hustota a n je index lomu. Index n_R reprezentuje hodnoty štandardu (v našom prípade tryptofán, $Q_R = 0,13$ [55]). Z dôvodu zabráneniu vnútornému filtru, optická hustota bola počas merania držaná pod hodnotou 0,05. Merania boli vykonávané na spektorfluorimetri F4500 (Hitachi, Japonsko). Detailné informácie o meraniach sú uvádzané v článku Huličiak a kol. 2014 [51].

2.15 Určenie Försterovej vzdialenosti R_0

Försterová vzdialenosť je definovaná ako vzdialenosť, pri ktorej dochádza k nežiarivému prenosu energie medzi donorom a akceptorom s pravdepodobnosťou 50%. Jej určenie je nevyhnutné pri ďalšom určení skutočnej vzdialenosti medzi donorom a akceptorom. Försterova vzdialenosť sa dá vypočítať zo spektrálnych vlastností donoru a akceptoru a z kvantových výťažkov za použitia rovnice [28]:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (8)$$

kde Q_D je kvantový výťažok donoru bez prítomnosti akceptoru, n je index lomu média,

N je Avogadrova konštanta, $F_D(\lambda)$ je normalizovaná intenzita fluorescencie donoru, $\varepsilon_A(\lambda)$ je extinkčný koeficient akceptoru, a κ^2 je faktor, ktorý popisuje relatívnu orientáciu translačných dipólov donoru a akceptoru v priestore. Absorbčné spektrá boli merané na spektrofotometri Specord 250 (Analytic Jena, Nemecko). Fluorescenčné emisné spektrá boli merané na spektrofluorimetri F4500 (Hitachi, Japonsko). Detaily o určení Försterovej vzdialenosti sú uvedené v článku Huličiak a kol. 2014 [51].

2.16 Určenie vzdialenosti medzi donorom a akceptorom

Vzdialenosť medzi donorom a akceptorom môže byť vypočítaná za použitia rovnice pre účinnosť prenosu energie:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (9)$$

kde E je účinnosť prenosu energie, R_0 je Försterova vzdialenosť, r je vzdialenosť medzi donorom a akceptorom, F_{DA} je relatívna intenzita fluorescencie donoru v prítomnosti akceptoru a F_D je relatívna intenzita fluorescencie bez prítomnosti akceptoru. Merania boli vykonávané na spektrofluorimetri F4500 (Hitachi, Japonsko). Detaily o určení vzdialenosti medzi donorom a akceptorom sú uvedené v článku Huličiak a kol. 2014 [51].

2.17 Určenie limitov κ^2

Faktor κ^2 sa nedá určiť experimentálne a môže byť presne vypočítaný len pri niektorých špeciálnych prípadoch, ako je náhodná distribúcia mobilných donorov a akceptorov. V tomto prípade $\kappa^2 = 2/3$ [56]. Avšak pomocou porovnania steady-state anizotropie a fundamentálnej anizotropie je možné určiť limity κ^2 faktoru. Steady-state anizotropia bola spočítaná pomocou rovníc :

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (10)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (11)$$

kde r je anizotropia, I je intenzita fluorescencie, dolné indexy v a H znamenajú vertikálne resp. horizontálne orientované polarizátory. G -faktor reprezentuje korekciu pre odlišnú priepustnosť optiky prístroja pre vertikálne alebo horizontálne polarizované svetlo. Anizotropia bola meraná na spektrofluórometri Fluorog – 3 (HORIBA Jobin Yvon) vybavenom kremennými polarizátormi. Z anizotropie je možné vypočítať maximálne a minimálne limity κ^2 faktoru. Tieto hodnoty sú dané [28]:

$$\kappa_{\min}^2 = \frac{2}{3} \left[1 - \frac{(d_D^x + d_A^x)}{2} \right] \quad (12)$$

$$\kappa_{\max}^2 = \frac{2}{3} (1 + d_D^x + d_A^x + 3d_D^x d_A^x) \quad (13)$$

kde

$$d_i^x = (r_i / r_0)^{1/2} \quad (14)$$

je hodnota depolarizačných faktorov spôsobená segmentálnymi pohybmi donoru (d_D^x) alebo akceptoru (d_A^x), ktorá bola vypočítaná z nameranej stedy-state anizotropie (r_i) a fundamentálnej anizotropie (r_0) fluorofóru. Do výpočtov boli použité hodnoty fundamentálnej anizotropie 0,294 pre tryptofan a 0,37 pre RH421 [57, 58].

2.18 Výpočet r_{\min} a r_{\max}

Keď sú známe limitné hodnoty κ^2 , je možné určiť minimálne a maximálne vzdialenosti medzi donorom a akceptorom za použitia

$$r_{\min} = \left(\frac{\kappa_{\min}^2}{2/3} \right)^{1/6} r \left(\kappa^2 = \frac{2}{3} \right) \quad (15)$$

$$r_{\max} = \left(\frac{\kappa_{\max}^2}{2/3} \right)^{1/6} r \left(\kappa^2 = \frac{2}{3} \right) \quad (16)$$

kde $r(\kappa^2 = 2/3)$ je vzdialenosť vypočítaná s predpokladom $\kappa^2 = 2/3$. Model kľučky C45 založený na kryštálovej štruktúre Na⁺/K⁺-ATPázy bol použitý na určenie väzobného miesta. Pre každý atóm z kryštálovej štruktúry bolo spočítané, či sa nachádza vo sfére okolo tryptofanového rezidua a teda či spĺňa podmienky pre FRET. Ako stredy týchto sfér sme uvažovali dusíkové atómy na indolovom kruhu tryptofánového rezidua.

2.19 Molekulárny doking

(vykonali Dr. Berka a Dr. Bazgier)

Táto výpočetná metóda umožňuje určiť pravdepodobnú orientáciu dvoch molekúl u ktorých dochádza k väzbe. Pomocou znalostí tejto orientácie možno predpovedať, kde sa nachádza väzobné miesto, ktoré reziduá sú zodpovedné za interakciu a ďalej možno odhadnúť väzobnú energiu. Túto metódu sme využili na skúmanie interakcií fluorescenčných látok s kľučkou C45.

Štruktúry fluorescenčných sond boli pripravené pomocou programov Marvin 5.10 a Autodock Tools. Štruktúrny model C45 kľučky s naviazaným ATP bol použitý podľa článku Gryčova a kol. 2009 [19]. Samotné dokovanie bolo vykonané za použitia programu Autodock Vina. Detaily o molekulárnom dokingu fluorescenčných sond na C45 kľučku sú uvedené v článkoch Havlíkova a kol. 2013 [48] a Huličiak a kol. 2014 [51].

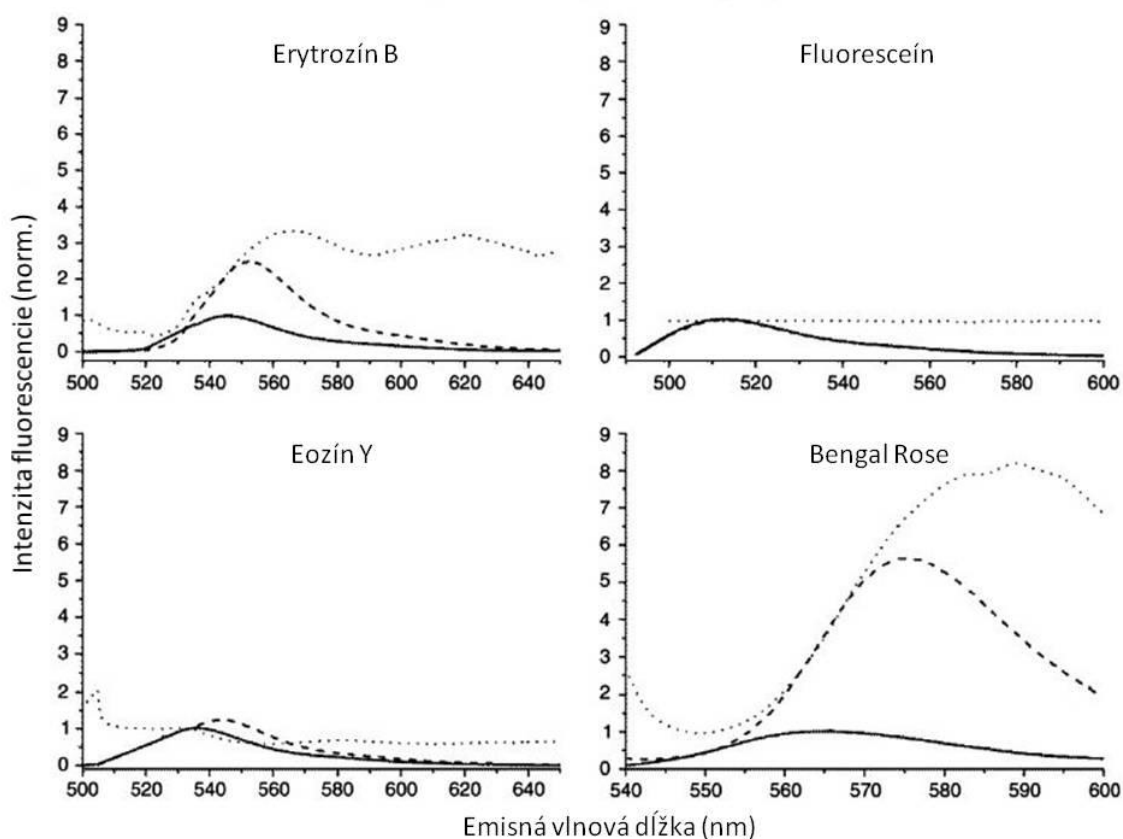
3 Výsledky a diskusia

3.1 Interakcia Na⁺/K⁺-ATPázy s fluoronovými farbami

Ako prvé sme zmerali emisné spektrá fluoronových farbív a sledovali zmeny spektier v prítomnosti celého proteínu alebo cytoplazmickej kľučky C45. Zmeny spektrálnych vlastností indukujú interakcie medzi skúmanou látkou a proteínom (obrázok 8, tabuľka 1).

Ďalšie merania časovo-rozlišenej fluorescence a žhášacie experimenty nám dovolili získať viac informácií o väzbe fluoronových farbív na Na⁺/K⁺-ATPázu. Tieto experimenty boli merané v prítomnosti rôznych ligandov (Na⁺, K⁺, ATP, P_i, Mg²⁺) a ich kombinácií z dôvodu zistenia interakcie fluoronových farbív s rozličnými stavmi Na⁺/K⁺-ATPázy spôsobenými týmito látkami.

Výsledky spektroskopických meraní pre každé farbivo sú ukázané nižšie.



Obrázok 8. Normované fluorescenčné spektrá fluoronových farbív v roztoku NaCl (celá čiara) a po pridaní kľučky C45 (prerušovaná čiara). Bodkovaná čiara reprezentuje pomer medzi intenzitou fluorescence farbiva bez a v prítomnosti proteínu. Excitačné vlnové dĺžky: Bengal Rose 545 nm, erytrozín B 527 nm, eozín Y 515 nm a fluoresceín 490 nm.

3.1.1 Eozín Y

Pri meraní emisných spektier eozínu Y sme pozorovali nárast intenzity fluorescence a spektrálny posun po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy alebo kľučky C45 (obrázok 8, tabuľka 1). Tieto zmeny dokazujú, že eozín Y interaguje so skúmanými proteínmi. Na fitovanie modelu dohasínania fluorescence voľného eozínu Y boli potrebné dve exponenciály a výsledný model ukázal strednú dobu života fluorescence $1,38 \pm 0,02$ ns. Po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy a C45 sme pozorovali významné zmeny v dohasínaní fluorescence. Troj-exponenciálny model dohasínania musel byť použitý na správne fitovanie dohasínania sondy v prítomnosti proteínov. Ďalej sme pozorovali nárast strednej doby života fluorescence eozínu Y, ktorá sa po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy zvýšila na 2,1 ns a po pridaní C45 na 1,44 ns. Tieto hodnoty závisia na prítomnosti ligandov, ale medzi sebou sa líšia len minimálne (tabuľky 2 a 3). Významný rozdiel je v dohasínaní fluorescence po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy v prítomnosti ATP a P_i , kde hodnoty dôb života fluorescence sú odlišné pre E1 a E2 konformácie.

Merania dohasínania fluorescence v prítomnosti aniónov jodidu boli vykonané z dôvodu získania ďalších informácií o interakcii fluoronových farbív s proteínmi. Doba života fluorescence vo všetkých prípadoch klesla, čo potvrdilo že jodid účinkuje ako dynamický zhášač fluorescence. Výpočet bimolekulárnej zhášacej konštanty je úmerný priestorovej prístupnosti fluorofóru. V prítomnosti proteínu (so všetkými kombináciami ligandov) hodnota bimolekulárnej zhášacej konštanty bola významne znížená oproti meraniu s voľnou sondou (tabuľka 4). Tento fakt takisto potvrdzuje, že dochádza k väzbe sondy na proteín, avšak citlivosť na zmenu konformácie bola menšia ako pri meraní dohasínania fluorescence.

3.1.2 5(6)-karboxyeozín

Zmeny v emisnom spektre 5(6)-karboxyeozínu po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy alebo kľučky C45 takisto naznačujú väzbu farbiva na proteíny (tabuľka 1). Na fitovanie dohasínania fluorescence musel byť znova použitý model s dvomi exponenciálmi. Stredná doba života fluorescence pre voľnú sondu sa rovná hodnote $1,22 \pm 0,05$ ns. Prítomnosť Na^+/K^+ -ATPázy a cytoplazmickej kľučky C45 opäť zvýšilo počet exponenciál na tri a nameraná stredná doba života dosiahla hodnotu 1,49 ns (tabuľky 2 a 3). V E1 konformácii hodnoty doby života fluorescence 5(6)-karboxyeozínu významne závisia na prítomnosti ATP (v prítomnosti aj bez Mg^{2+}) a líši sa od ostatných hodnôt. Experimenty so zhášaním fluorescence neposkytli ďalšie zaujímavé informácie.

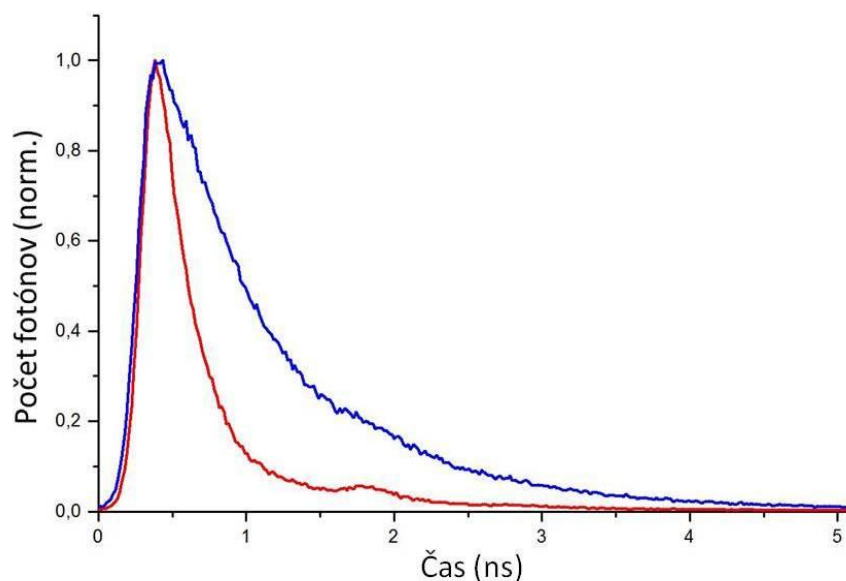
3.1.3 Erytrozín B

Tak ako v predošlých prípadoch, aj pre erytrozín B sme pozorovali spektrálne zmeny (posun spektra ku vyšším vlnovým dĺžkam a nárast intenzity fluorescence) po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy alebo kľučky C45 (obrázok 8, tabuľka 1). Znova bol potrebný model s dvomi exponenciálmi na fitovanie voľného eosínu B a stredná doba života fluorescence bola $0,4 \pm 0,1$ ns, zatiaľ čo model s tromi exponenciálmi bol potrebný na fitovanie dohasínania sondy v prítomnosti proteínov. V prítomnosti Na^+/K^+ -ATPázy, stredná doba života fluorescence vzrástla na 0,8 ns a bola odlišná od strednej doby života fluorescence voľnej sondy so všetkými kombináciami ligandov (tabuľka 2). V prítomnosti cytoplazmickej kľučky C45 doba života vzrástla len na 0,5 ns a štatisticky významné rozdiely boli pozorované len v prítomnosti Mg^{2+} alebo v NaCl pufrí v prítomnosti ATP (tabuľka 3).

V zhášacích experimentoch sme pozorovali významný rozdiel v E1 konformácii medzi k_q v prítomnosti Mg^{2+} a P_i a v prítomnosti Mg^{2+} . V E2 konformácii je rozdiel medzi k_q bez ligandov a v prítomnosti Mg^{2+} (tabuľka 4).

3.1.4 Bengal Rose

Pri meraní spektier Bengal Rose sme pozorovali najväčší nárast intenzity fluorescence a spektrálny posun k vyšším vlnovým dĺžkam po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy alebo kľučky C45 (obrázok 8, tabuľka 1). Model s tromi exponenciálmi bol potrebný na fitovanie dohasínaní fluorescencií pre voľnú sondu ako aj pre sondu v prítomnosti proteínov. Stredná doba života fluorescence vzrástla z hodnoty 0,4 ns pre voľnú sondu na hodnotu 0,8 ns po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy a 0,7 ns po pridaní kľučky C45 (obrázok 9). Naše merania ďalej ukázali, že Bengal Rose nie je citlivé na zmenu konformácie a ani na prítomnosť rôznych ligandov. Dokonca ani zhášacie experimenty nepriniesli nové informácie.



Obrázok 9. Reprezentatívny graf dohasínania strednej doby života fluorescencií fluoronových farbív. Červená farba prezentuje dohasínanie samotného Bengal Rose. Po pridaní Na^+/K^+ -ATPázy možno pozorovať nárast strednej doby života fluorescencie (modrá farba).

3.1.5 Fluoresceín

Fluoresceín má podobnú štruktúru ako predošlé farbivá, preto sme očakávali podobné zmeny vo fluorescencii farbiva po pridaní proteínov. Predpoveď z molekulárneho dockingu ukázala, že fluoresceín by sa mal viazať na Na^+/K^+ -ATPázu aj na C45. Avšak ani posun spektra, ani zmeny v intenzite fluorescencie neboli pozorované po pridaní proteínov (obrázok 8, tabuľka 1). Jediný dôkaz o väzbe fluoresceínu na skúmané proteíny priniesli zhášacie experimenty, kde sme pozorovali významný pokles bimolekulárnej zhášacej konštanty v prítomnosti proteínov. V prítomnosti zhášadla sme takisto pozorovali významné rozdiely medzi E1 a E2 konformáciami (tabuľka 4).

Farbivo	λ_{ex} (nm)	λ_{emF} (nm)	λ_{emP} (nm)
Rose bengal	545	565	575
Erytrozín B	527	546	555
Eozín Y	515	536	544
Karboxyeozín	520	536	540
Fluoresceín	490	512	512

Tabuľka 1. Maximum excitačného a emisného spektra pre rôzne fluoronové farbivá samotné (λ_{emF}) a v prítomnosti Na^+/K^+ -ATPázy alebo kľučky C45 (λ_{emP}). Koncentrácia farbív bola 0,8 μM a koncentrácia proteínov 5 μM .

Pufor	Substrát	RB	ErB	EY	Fl	CE
NaCl	Bez substrátu	0.81±0.06**	0.81±0.01**	2.05±0.01**	4.02±0.04	1.49±0.10*
	+Mg ²⁺	0.84±0.04**	0.80±0.02**	2.04±0.06**	4.09±0.14	1.48±0.13
	+ATP	0.82±0.01**	0.80±0.02**	2.05±0.02**#	4.01±0.01	1.30±0.10
	+P _i	0.83±0.01*	0.79±0.01*	2.05±0.02**#	4.03±0.02	1.42±0.04*
	+Mg ²⁺ +ATP	0.83±0.04**	0.81±0.02**	2.04±0.02**	4.04±0.06	1.26±0.08
	+Mg ²⁺ +P _i	0.84±0.03**	0.82±0.04*	2.07±0.03**	4.04±0.05	1.44±0.05*
KCl	Bez substrátu	0.81±0.04**	0.79±0.07**	2.13±0.07**	4.01±0.02	1.49±0.01**
	+Mg ²⁺	0.84±0.03**	0.81±0.07**	2.13±0.07**	4.00±0.02	1.61±0.14
	+ATP	0.84±0.02**	0.80±0.02*	2.10±0.02**#	4.00±0.03	1.48±0.01**
	+P _i	0.84±0.02**	0.80±0.06	2.09±0.03**#	3.99±0.02	1.50±0.01**
	+Mg ²⁺ +ATP	0.85±0.02**	0.83±0.04**	2.11±0.05**	3.99±0.02	1.50±0.00**
	+Mg ²⁺ +P _i	0.85±0.03**	0.80±0.05*	2.14±0.07**	4.01±0.03	1.51±0.01**

Tabuľka 2. Doby života fluorescence τ_M (ns) rozličných fluoronových farbív v prítomnosti Na⁺/K⁺-ATPázy, v prítomnosti rôznych pufrov a v prítomnosti rôznych kombinácií ligandov. Výsledky sú prezentované ako priemer z piatich meraní ± smerodatná odchýlka. Štatisticky významné rozdiely v τ_M v prítomnosti Na⁺/K⁺-ATPázy v porovnaní s τ_M samotnej sondy sú označené ako * pre $p < 0.05$ alebo ** pre $p < 0.01$. Doby života fluorescence viazanej sondy, ktoré boli významne odlišné v NaCl a KCl pufry sú označené symbolom # ($p < 0.05$). Ďalšie detaily sú uvedené v článku Havlíková a kol. 2013 [48].

Pufor	Substrát	RB	ErB	EY	Fl	CE
NaCl	Bez substrátu	0.07±0.06**	0.54±0.03	1.44±0.01*	4.02±0.00	1.18±0.02
	+Mg ²⁺	0.67±0.06**	0.57±0.06*	1.44±0.01**	4.02±0.00	1.21±0.01
	+ATP	0.66±0.03	0.60±0.10**	1.43±0.01*	4.01±0.01	1.21±0.03
	+P _i	0.70±0.08	0.55±0.06	1.45±0.03*	4.01±0.01	1.21±0.03
	+Mg ²⁺ +ATP	0.66±0.04*	0.55±0.04	1.44±0.01**	4.01±0.01	1.21±0.01
	+Mg ²⁺ +P _i	0.68±0.04**	0.58±0.08	1.43±0.02**	4.01±0.01	1.22±0.02
KCl	Bez substrátu	0.62±0.01**#	0.54±0.05	1.45±0.02**	4.02±0.01	1.21±0.02
	+Mg ²⁺	0.63±0.02*	0.56±0.08*	1.46±0.03**	4.02±0.00	1.23±0.02
	+ATP	0.63±0.03*	0.47±0.05	1.46±0.03**	4.01±0.00	1.22±0.02
	+P _i	0.63±0.02**	0.48±0.07	1.47±0.03**	4.02±0.01	1.21±0.04
	+Mg ²⁺ +ATP	0.63±0.03*	0.57±0.12	1.47±0.02**	4.01±0.01	1.22±0.02
	+Mg ²⁺ +P _i	0.64±0.03*	0.55±0.14	1.46±0.02**	4.01±0.02	1.22±0.04

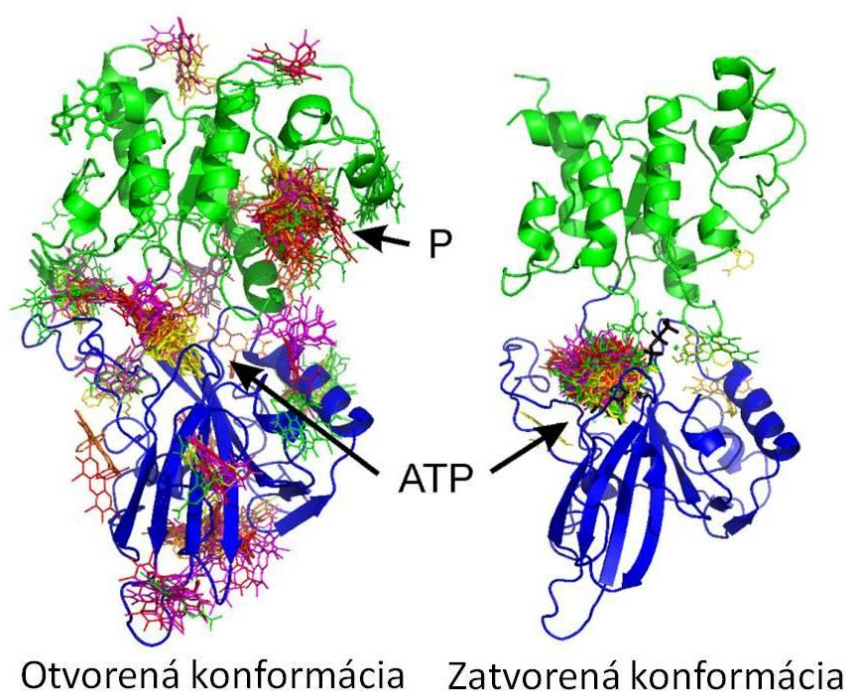
Tabuľka 3. Doby života fluorescence τ_M (ns) rozličných fluoronových farbív v prítomnosti kľučky C45, v prítomnosti rôznych pufrov a v prítomnosti rôznych kombinácií ligandov. Výsledky sú prezentované ako priemer z piatich meraní \pm smerodatná odchýlka. Štatisticky významné rozdiely v τ_M v prítomnosti kľučky C45 v porovnaní s τ_M samotnej sondy sú označené ako * pre $p < 0.05$ alebo ** pre $p < 0.01$. Doby života fluorescence viazanej sondy, ktoré boli významne odlišné v NaCl a KCl pufri sú označené symbolom # ($p < 0.05$). Ďalšie detaily sú uvedené v článku Havlíková a kol. 2013 [48].

Pufor	Substrát	RB	ErB	EY	Fl	CE
NaCl	Bez substrátu	0.74±0.17	1.02±0.47*	0.77±0.07**#	1.59±0.08**#	1.85±0.71
	+Mg ²⁺	0.68±0.18	1.70±0.34**	0.77±0.10	1.59±0.09#	1.00±0.09
	+ATP	0.60±0.29*	1.06±0.39**	0.80±0.07**#	1.55±0.03**#	0.93±0.32*
	+P _i	0.64±0.12	1.04±0.50	0.87±0.06*	1.57±0.06**#	1.15±1.14
	+Mg ²⁺ +ATP	0.67±0.25*	0.37±0.73	0.79±0.06**#	1.54±0.05**#	0.66±0.36*
	+Mg ²⁺ +P _i	0.61±0.24	0.97±0.16	0.87±0.10*	1.53±0.07**#	1.54±0.55
KCl	Bez substrátu	0.73±0.27	0.79±0.35	0.94±0.07**#	2.02±0.06**#	2.10±0.49
	+Mg ²⁺	0.65±0.14**	1.89±0.52	1.00±0.13*	1.98±0.06**#	2.09±0.49
	+ATP	0.65±0.22*	1.59±0.77*	0.99±0.16**	1.94±0.04**#	1.71±0.11
	+P _i	0.66±0.24*	1.78±0.83*	0.88±0.08**	1.99±0.03**#	1.76±0.13
	+Mg ²⁺ +ATP	0.79±0.24*	1.62±0.60*	0.94±0.09**	1.91±0.04**#	2.48±0.90
	+Mg ²⁺ +P _i	0.72±0.19*	1.47±0.30	0.96±0.07*	1.95±0.03**#	2.85±1.00

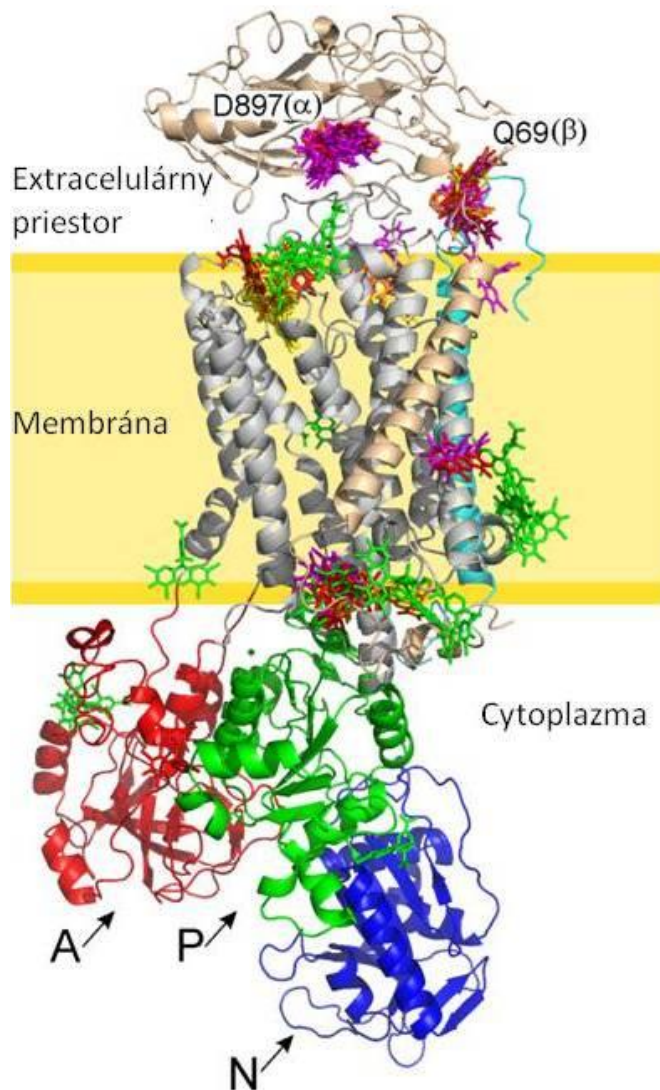
Tabuľka 4. Bimolekulárne zhášacie konštanty k_q ($\times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) rozličných fluoronových farbív v prítomnosti Na⁺/K⁺-ATPázy, v prítomnosti rôznych pufov a v prítomnosti rôznych kombinácií ligandov. Výsledky sú prezentované ako priemer z piatich meraní \pm smerodatná odchýlka. Štatisticky významné rozdiely v k_q v prítomnosti Na⁺/K⁺-ATPázy v porovnaní s k_q samotnej sondy sú označené ako * pre $p < 0.05$ alebo ** pre $p < 0.01$. Bimolekulárne zhášacie konštanty viazanej sondy, ktoré boli významne odlišné v NaCl a KCl purfi sú označené symbolom # ($p < 0.05$). Ďalšie detaily sú uvedené v článku Havlíková a kol. 2013 [48].

3.1.6 Molekulárny doking

Výsledky z molekulárneho dokingu na kľučku C45 ukázali, že fluoronové farbivá sa viažu na kľučku blízko väzobného miesta pre ATP (obrázok 10). Navyše, keď tieto experimenty boli vykonávané na proteíne v konformácii, ktorú má pri naviazanom ATP, tak sa farbivá viazali priamo do tohto miesta. Ďalšie možné väzobné miesto bolo identifikované na P-doméne v časti tvorenej segmentom od Cys656 až po Ala684. Dokovacie experimenty s celou Na^+/K^+ -ATPázou priniesli ešte dve možné väzobné miesta a to v blízkosti rezidua Asp897 na podjednotke α a v blízkosti rezidua Gln69 na podjednotke β (obrázok 11).



Obrázok 10. Molekulárny doking fluoronových farbív s kľučkou C45 v otvorenej a zatvorenej konformácii. P doména je zobrazená zelenou a N doména modrou farbou. Fluoronové farbivá sú zobrazené nasledovne: fluoresceín žltou, eozín Y oranžovou, erytrozín B červenou, bengal rose ružovou, 5(6)-karboxyeozín zelenou. Molekula ATP je zobrazená čiernou farbou.



Obrázok 11. Molekulárny doking fluoronových farbív s Na^+/K^+ -ATPázou. Transmembránová časť podjednotky α je zobrazená šedou farbou, A doména červenou, P domána zelenou a N doména modrou farbou. Podjednotky β a γ sú zobrazené slabou modrou a hnedou farbou. Fluoronová farbivá sú zobrazené nasledovne: fluoresceín žltou, eozín Y oranžovou, erytrozín B červenou, bengal rose ružovou, 5(6)-karboxyeozín zelenou.

3.1.7 Diskusia o fluoronových farbivách

Na^+/K^+ -ATPáza hrá dôležitú rolu v metabolizme všetkých živočíšnych buniek. Skúmané fluoronové farbivá sú používané ako potravinárske farbivá, v medicíne na lepšie zobrazenie buniek, ako súčasť niektorých liekov a v ďalších oblastiach. Avšak, pozorovaná interakcia s Na^+/K^+ -ATPázou znamená, že použitie týchto farbív môže byť škodlivé pre bunky aj pre celý organizmus. Dokonca už bolo ukázané, že eozín Y môže ovplyvniť aktivitu Na^+/K^+ -ATPázy [59].

Výsledky z našich experimentov ukázali, že fluoronové farbivá ukázali interagujú s Na^+/K^+ -ATPázou. Ďalej ukázali, že tieto farbivá môžu byť použité ako sondy na určenie štruktúry proteínu. Merania steady-state fluorescencie ukázali, že u eozínu Y, 5(6) karboxyeozínu, erytrozínu B a bengal rose dochádza k nárastu intenzity fluorescencie a k posunu emisného spektra k vyšším vlnovým dĺžkam v prítomnosti Na^+/K^+ -ATPázy alebo C45 kľučky. U fluoresceínu tento efekt nebol pozorovaný, avšak väzba na proteín bola odhalená pomocou zhasiacich experimentov.

Objavili sme, že existujú minimálne dve väzobné miesta pre eozín Y, erytrozín B, bengal rose a fluoresceín na Na^+/K^+ -ATPáze. Prvé väzobné miesto sa nachádza na C45 kľučke a druhé je lokalizované v extracelulárnej časti proteínu. V prípade 5(6)karboxyeozínu bolo nájdené len jedno väzobné miesto a to na cytoplazmickej kľučke.

Existenciou dvoch väzobných miest možno vysvetliť staršie experimenty vykonané Skouom a Esmanom, ktorí zistili, že eozín Y sa viaže do väzobného miesta pre ATP [60] a tiež zistenia publikované Oganom a kol. [59], že ATP a eozín Y sa môžu viazať na proteín zároveň. Existencia väzobného miesta v extracelulárnej časti Na^+/K^+ -ATPázy ponúka vysvetlenie týchto pozorovaní. Niektoré ďalšie štúdie na ATPázach P-typu ukázali, že nedochádza ku kompetícii medzi eozínom Y a ATP [61, 62].

Cytoplazmická kľučka C45 môže existovať v dvoch rôznych stavoch. Pri absencii ligandov nadobúda zatvorenú konformáciu (E2), zatiaľ čo v prítomnosti ATP sa proteín vyskytuje v otvorenej konformácii (E1) [19, 23]. Výsledky z molekulárneho dokingu ukázali, že fluoronové farbivá sa viažu priamo do väzobného miesta pre ATP v otvorenej konformácii, zatiaľ čo v zatvorenej konformácii dochádza ku väzbe blízko tohto miesta. Tieto výsledky podporujú zistenia Esmana a Fedosovej, ktorí ukázali, že v prítomnosti sodných iónov a bez prítomnosti draselných iónov (E1 konformácia) sa vzájomná väzba eozínu Y a ATP na Na^+/K^+ -ATPázu vylučuje [63]. Naše časovo rozlíšené experimenty odhalili, doba života fluorescencie eozínu Y v prítomnosti ATP je odlišná od ďalších stavov navodených prítomnosťou iných ligandov.

Ako bolo spomínané vyššie, v prípade dokingu do zatvorenej konformácie kľučky C45 nedochádzalo k väzbe fluoronových farbív do väzobného miesta pre ATP ale len do jeho blízkosti. Pozície jednotlivých farbív nie sú identické, ale závisia na tvare molekúl a ich veľkosti. Najmenšia z nich – fluoresceín sa viaže bližšie k väzobnému miestu pre ATP ako ostatné molekuly.

Merania kinetiky dohasínania fluorescence umožnili sledovať malé konformačné zmeny proteínu. Nedávne experimenty [19, 23] s izolovanou kľučkou odhalili, že cytoplazmické ligandy ATP a Mg^{2+} sa viažu na enzým počas dvoch krokov katalytického cyklu. Väzba ATP spôsobuje otvorenie cytoplazmickej kľučky a väzba Mg^{2+} vracia proteín do zatvorenej konformácie a tieto zmeny sa pravdepodobne prejavujú v transmembránovej časti. Avšak tieto zistenia nepotvrdzujú, či konformačné zmeny pozorované pre izolovanú kľučku môžu byť pozorované aj pre celý proteín. Väzba eozínu Y na celý proteín bola citlivá na rozdielne konformácie (E1 a E2) iba v prítomnosti ATP a Pi (bez Mg^{2+}). To odhaľuje, že konformácia proteínu v stavoch bez horčičku je odlišná a poskytuje silnú podporu pre predošlé hypotézy.

Naše výsledky ďalej ukázali, že fluoronové farbivá môžu slúžiť ako senzory na väzbu sodných a draselných iónov do transmembránovej domény a teda aj konformačných zmien.

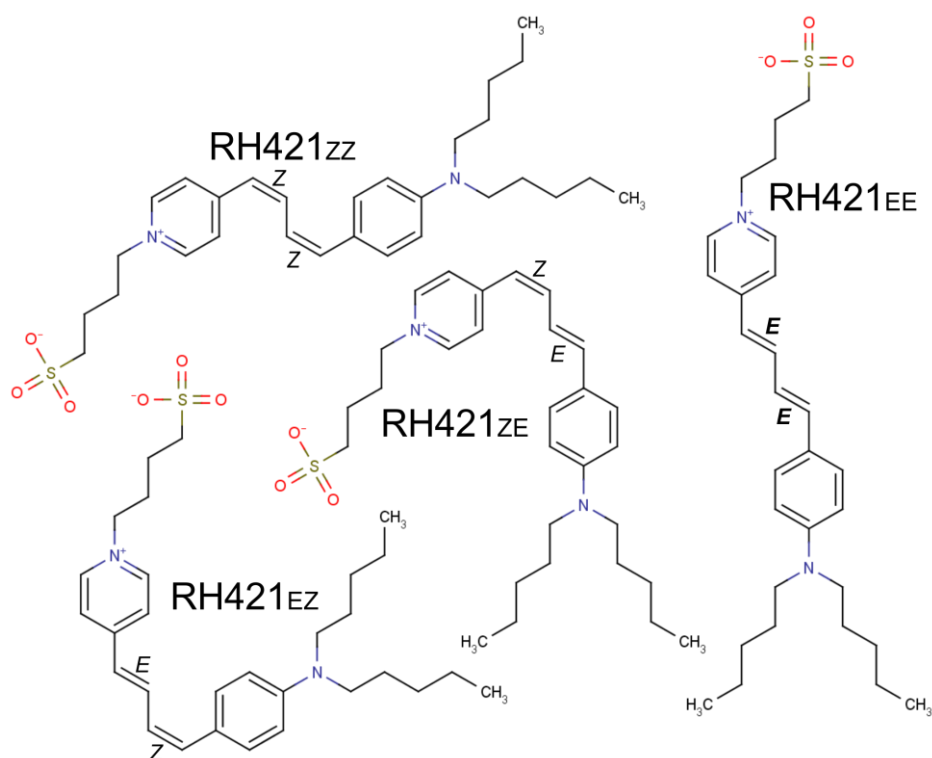
Molekulárny doking ukázal dve možné väzobné miesta v extracelulárnej časti proteínu s približne rovnakou väzobnou energiou. Jedno z nich je lokalizované blízko Asp897 na podjednotke α . Toto miesto sa nachádza na rozhraní podjednotiek α a β [15]. Druhé možné miesto sa nachádza blízko rezidua Gln69 na podjednotke β , ktoré je v priamom kontakte s konzervovaným motívom FXDY na podjednotke γ . Naše výsledky nedovoľujú presne určiť, ktoré z týchto miest je preferenčne okupované fluoronovým farbivom, ale obe tieto miesta sú pravdepodobne veľmi citlivé na vzájomne pohyby podjednotiek Na^+/K^+ -ATPázy počas konformačných zmien medzi E1 a E2.

Zdá sa, že fluoresceín má najväčšiu citlivosť na konformačné zmeny medzi E1 a E2. Rozdiely v dohasínaní fluorescence fluoresceínu medzi E1 a E2 boli odlišné pre všetky kombinácie cytoplazmických ligandov. Ďalším farbivom umožňujúcim sledovať zmeny medzi E1 a E2 konformáciami, bol eozín Y. Aj keď bolo navrhnuté že eozín Y nie je optimálny na sledovanie konformačných zmien Na^+/K^+ -ATPázy v prítomnosti detergentu [64], monitorovanie kinetiky dohasínania fluorescence nám dovolilo pozorovať tieto zmeny dokonca aj v jeho prítomnosti. Avšak súčasná citlivosť eozínu Y na zmeny v cytoplazmatickej aj extracelulárnej časti komplikuje interpretáciu dát, preto za najlepšie fluoronové farbivo na sledovanie zmien konformácií Na^+/K^+ -ATPázy považujeme fluoresceín.

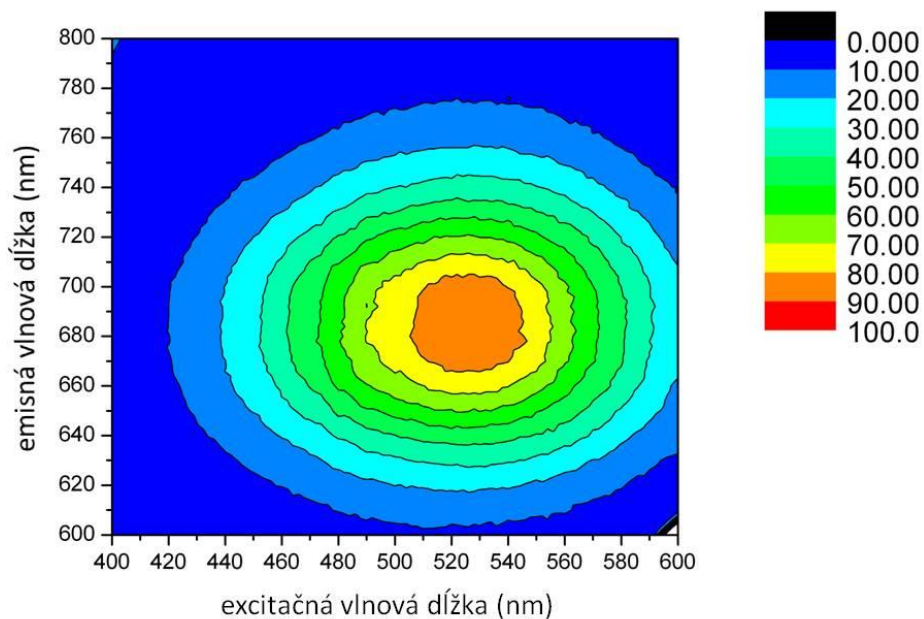
3.2 Interakcia Na^+/K^+ -ATPázy s RH421

3.2.1 Identifikácia izoméru RH421

Fluorescenčné farbivo RH421 obsahuje dve dvojité väzby, preto sa môže vyskytovať v štyroch rôznych konformáciách (obrázok 12). Všetky experimenty sme vykonávali s farbivom zakúpenom od firmy Sigma-Aldrich (Nemecko). Tá však neuvádza, o ktorý izomér RH421 sa jedná, preto izomérová čistota musela byť overená experimentálne. Izoméry sa dajú rozlíšiť na základe ich excitačných a emisných spektier. Výsledky z merania 3D-fluorescenčného spektra ukázali jeden pík s rovnakým emisným maximom pre všetky excitačné vlnové dĺžky (obrázok 13), ukazujúc tak izomérovú čistotu. Excitačný pík pri 526 nm a emisný pík pri 686 nm sú charakteristické pre trans-trans konformáciu RH421.



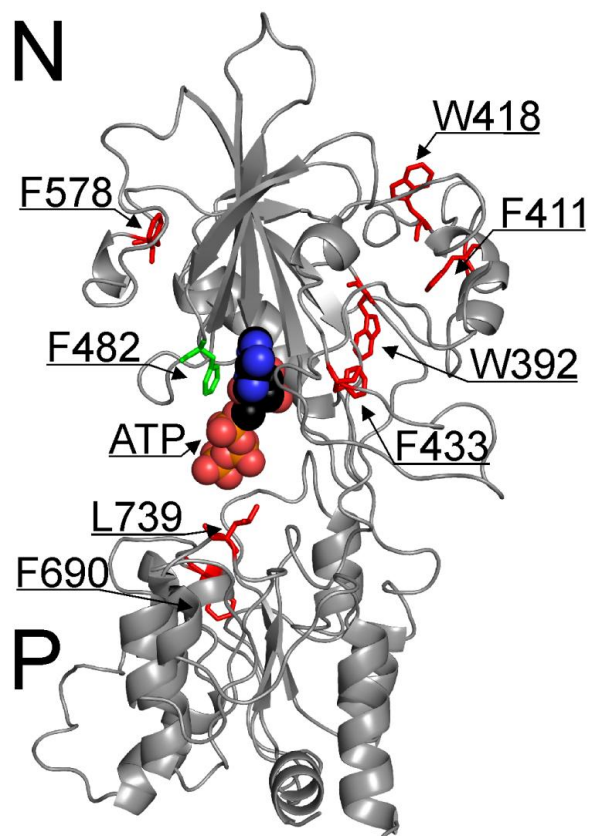
Obrázok 12. Možné konformácie RH421.



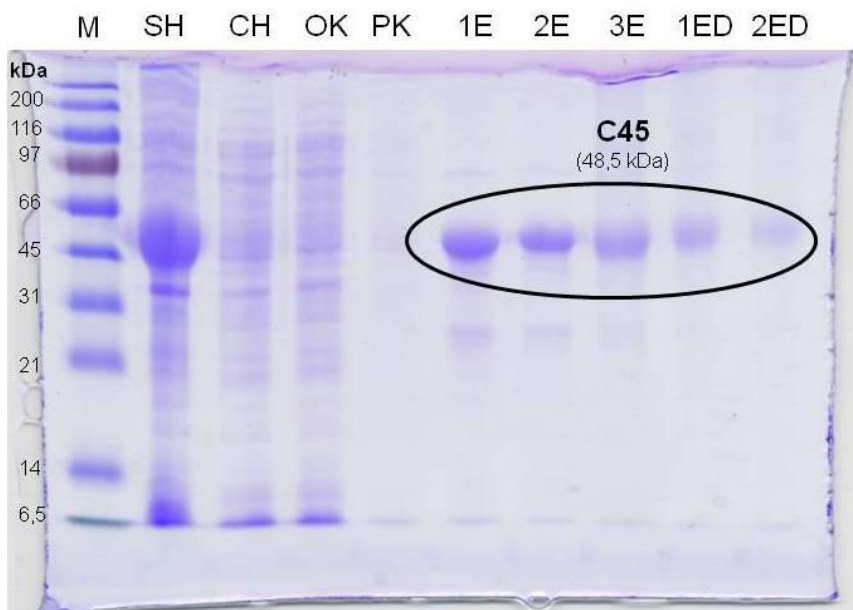
Obrázok 13. 3D-fluorescenčné spektrum RH421 v etanole. Spektrum ukazuje excitačný pík pri 526 nm a emisný pík pri 686 nm. Maximum emisie je nezávislé na excitačnej vlnovej dĺžke.

3.2.2 Expresia a purifikácia jedno-tryptofánových C45 mutantov

Šesť jedno-tryptofánových mutantov kľučky C45 bolo použitých na FRET experimenty s RH421. Prirodzená sekvencia C45 kľučky obsahuje dve tryptofánové reziduá. Tie boli nahradené fenylalanínmi a potom šesť jedno-tryptofánových mutantov bolo vytvorených podľa protokolu ako je opísané v článku Gryčová a kol. 2009 [19]. Tieto reziduá sa nachádzajú na povrchu kľučky C45 a len konzervatívne mutácie boli vybrané, aby bol minimalizovaný ich efekt na štruktúru proteínu (obrázok 14). Expresia všetkých mutantov viedla k veľkému množstvu rozpustného proteínu a ich kvalita bola overená pomocou SDS polyakrylamidovej elektroforézy (obrázok 15).



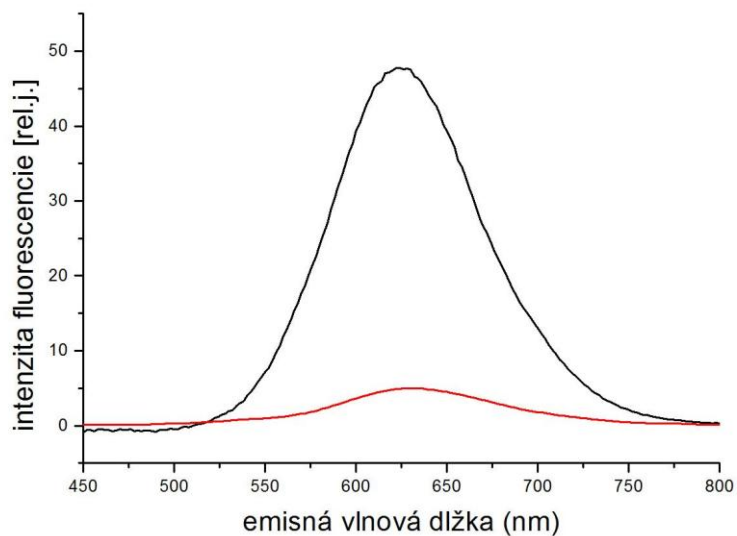
Obrázok 14. Veľká cytoplazmická kľučka C45 s vyznačenými aminokyselinami, ktoré boli vybrané na vytvorenie jedno-tryptofanových mutantov. Boli vybrané len reziduá na povrchu proteínu a len konzervované mutácie boli vykonané, aby bol minimalizovaný ich efekt na štruktúru proteínu. Phe482, ktorý bol určený ako reziduum, ktoré interaguje s RH421, je zobrazené zelenou farbou. Molekula ATP je zobrazená pomocou sfér v jej väzobnom mieste.



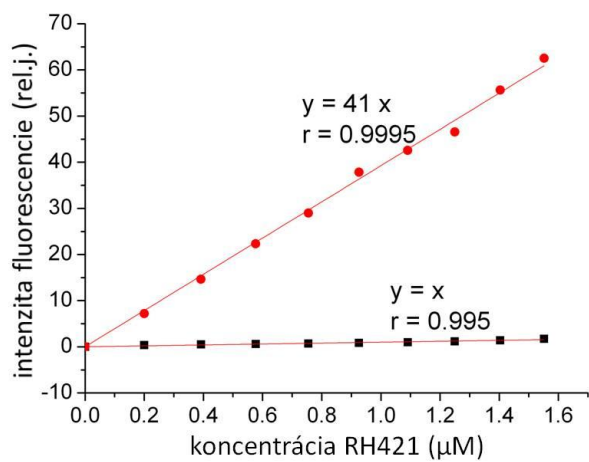
Obrázok 15. Overenie kvality a čistoty kľučky C45 pomocou polyakrylamidovej elektroforézy. Symbol M znamená marker, SH sonifikovaný homogenát, CH centrifugovaný homogenát, OK homogenát, ktorý pretečie kolónou, PK premytie kolóny, 1E 1. elúcia, 2E 2. elúcia, 3E 3. elúcia, 1ED 1. elúcia po dialýze, 2ED 2. elúcia po dialýze. Podobné výsledky boli dosiahnuté pre všetky jedno-tryptofanové mutanty.

3.2.3 Titračné experimenty

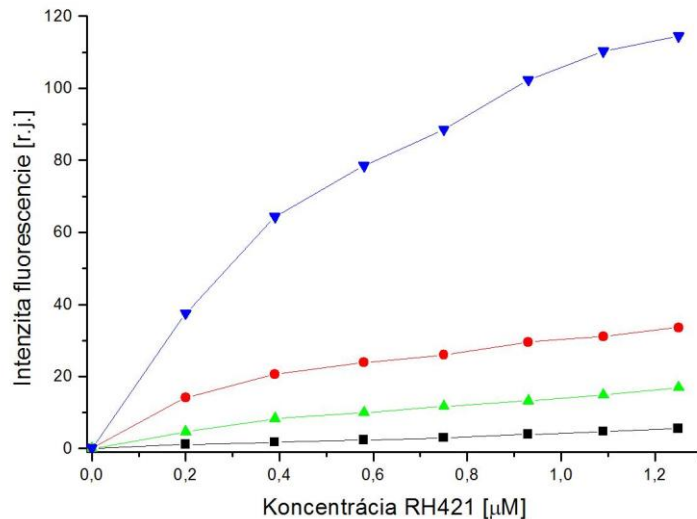
Väzba RH421 na kľučku C45 sa prejavila 41 násobným nárastom intenzity fluorescencie (obrázky 16 a 17). Titračné experimenty s RH421 v prítomnosti rôznych koncentrácií C45 takisto ukázali nárast intenzity fluorescencie. Výsledky z týchto experimentov sú ukázané na obrázku 18.



Obrázok 16. Emisné spektrum voľného 1 μM RH421 (červená) a RH421 v prítomnosti 6 μM kľučky C45 (čierna).



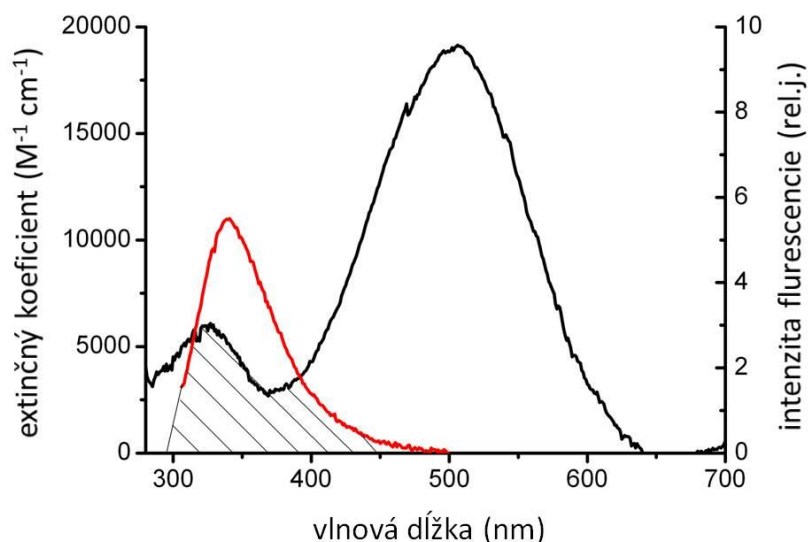
Obrázok 17. Nárast intenzity fluorescencie RH421 (čierna) po pridaní 60 μM kľučky C45 (červená).



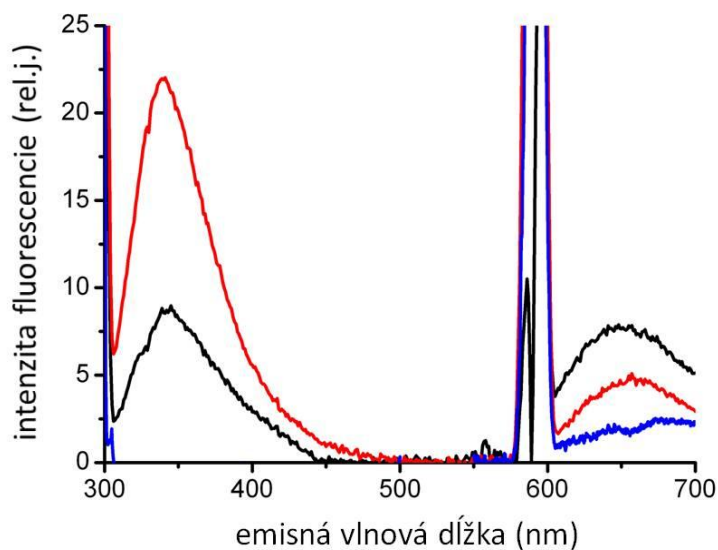
Obrázok 18. Zmeny v intenzite fluorescence RH421 po pridaní kľučky C45. Čierne štvorce reprezentujú samotné RH421 v roztoku. Nárast fluorescence bol pozorovaný v prítomnosti 0,1 µM (zelená), 1 µM (červená) alebo 5 µM (modrá) proteínu. Excitačná vlnová dĺžka bola 515 nm a emisná vlnová dĺžka bola 640 nm. Hodnoty boli normované, aby intenzita fluorescence 1 µM samotného RH421 bola rovná 1. Dáta sú prezentované ako priemer z piatich meraní.

3.2.4 FRET

Försterov rezonančný prenos energie medzi tryptofanom na povrchu kľučky C45 a RH421 bol použitý na odhalenie väzobného miesta RH421 na proteíne (obrázky 19 a 20). Prvým krokom bolo určenie Försterovej vzdialenosti, ktoré vyžaduje výpočet prekryvového integrálu a určenie kvantového výťažku donoru. Emisné spektrum tryptofanu závisí na hydrofobicite okolia a jeho kvantový výťažok je silne ovplyvnený interakciou so susedným reziduom. Z toho dôvodu Försterova vzdialenosť musela byť zmeraná a vypočítaná pre každý mutant samostatne. Zatiaľ čo emisné spektrá všetkých mutantov vyzerali podobne, pretože tryptofany sú lokalizované na povrchu proteínov, hodnoty kvantových výťažkov sa líšili od 0,055 (W578) do 0,294 (W418). To bol hlavný dôvod, prečo hodnoty R_0 boli v rozsahu medzi 2,24 nm až 2,93 nm pre rôzne mutanty (tabuľka 5).



Obrázok 19. Spektrálne prekrytie medzi absorbným spektrom naviazaného RH421 (čierna) a emisným spektrom tryptofanu na kľučke C45(červená).

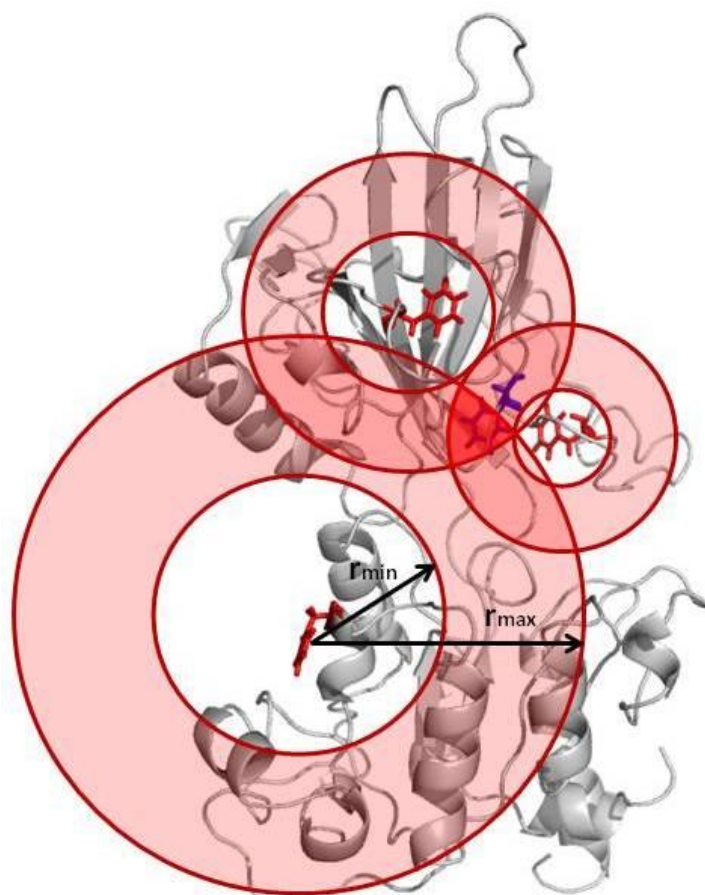


Obrázok 20. Dôkaz rezonančného prenosu energie medzi RH421 a tryptofanom na kľučke C45. Intenzita fluorescence zo samotného tryptofanu (červená) klesla, zatiaľ čo intenzita fluorescence RH421 pri vyšších vlnových dĺžkach narástla, čo indukuje nežiarivý prenos energie. Modrou farbou je znázornené emisné spektrum samotného RH421. Píky pri 590 nm sú spôsobené druhou harmonickou frekvenciou rozptýleného svetla a nepatria do spektra. Pri meraniach bola použitá excitačná vlnová dĺžka 295 nm.

Na určenie skutočnej vzdialenosti medzi tryptofánom a RH421, bolo potrebné určiť účinnosť prenosu energie (E) z emisného spektra donoru (Trp) v prítomnosti a bez akceptoru RH421 (tabuľka 5). Znalosť účinnosti prenosu energie dovoľuje určenie vzdialeností (r) medzi tryptofánom a naviazaným RH421 za použitia rovnice 8 a za predpokladu, že poznáme hodnotu κ^2 faktoru. Pre náhodnú orientáciu pohyblivých donorov a akceptorov sa hodnota κ^2 faktoru rovná 2/3. V našom prípade je však pohyblivosť tryptofánu na proteíne ako aj naviazaného RH421 obmedzená, preto nemôžeme použiť hodnotu 2/3. Presná hodnota κ^2 faktoru sa nedá určiť experimentálne, avšak merania steady-state anizotropie dovoľujú určiť limitné hodnoty κ^2 faktoru. Z týchto hodnôt je možné ďalej spočítať minimálne a maximálne vzdialenosti medzi tryptofánom a naviazaným RH421. Tieto vzdialenosti definujú guľové vrstvy o určitej hrúbke okolo tryptofanov a prekryv týchto vrstiev vymedzuje priestor, kde dochádza ku väzbe RH421 na proteín (obrázok 21). Výpočet odhalil 13 atómov, ktoré ležia v tomto priestore a všetky tieto atómy patria reziduu Phe482.

Pozícia	QY	R_0	E	$r_{(\kappa^2=2/3)}$	$r_{(Trp)}$	$r_{(RH421)}$	r_{min}	r_{max}	r_{calc}
Trp									
(W)392	0,064	2,29	0,67	2,04	0,24	0,28	1,42	2,67	1,96
(W)418	0,294	2,93	0,32	3,34	0,25	0,26	2,34	4,37	3,04
(F)433	0,114	2,52	0,39	2,72	0,23	0,26	1,94	3,55	2,28
(F)578	0,055	2,24	0,54	2,19	0,31	0,27	1,36	2,91	2,20
(F)690	0,087	2,53	0,59	2,27	0,21	0,26	1,67	2,96	1,99
(L)739	0,118	2,18	0,59	2,38	0,20	0,26	1,77	3,08	2,58

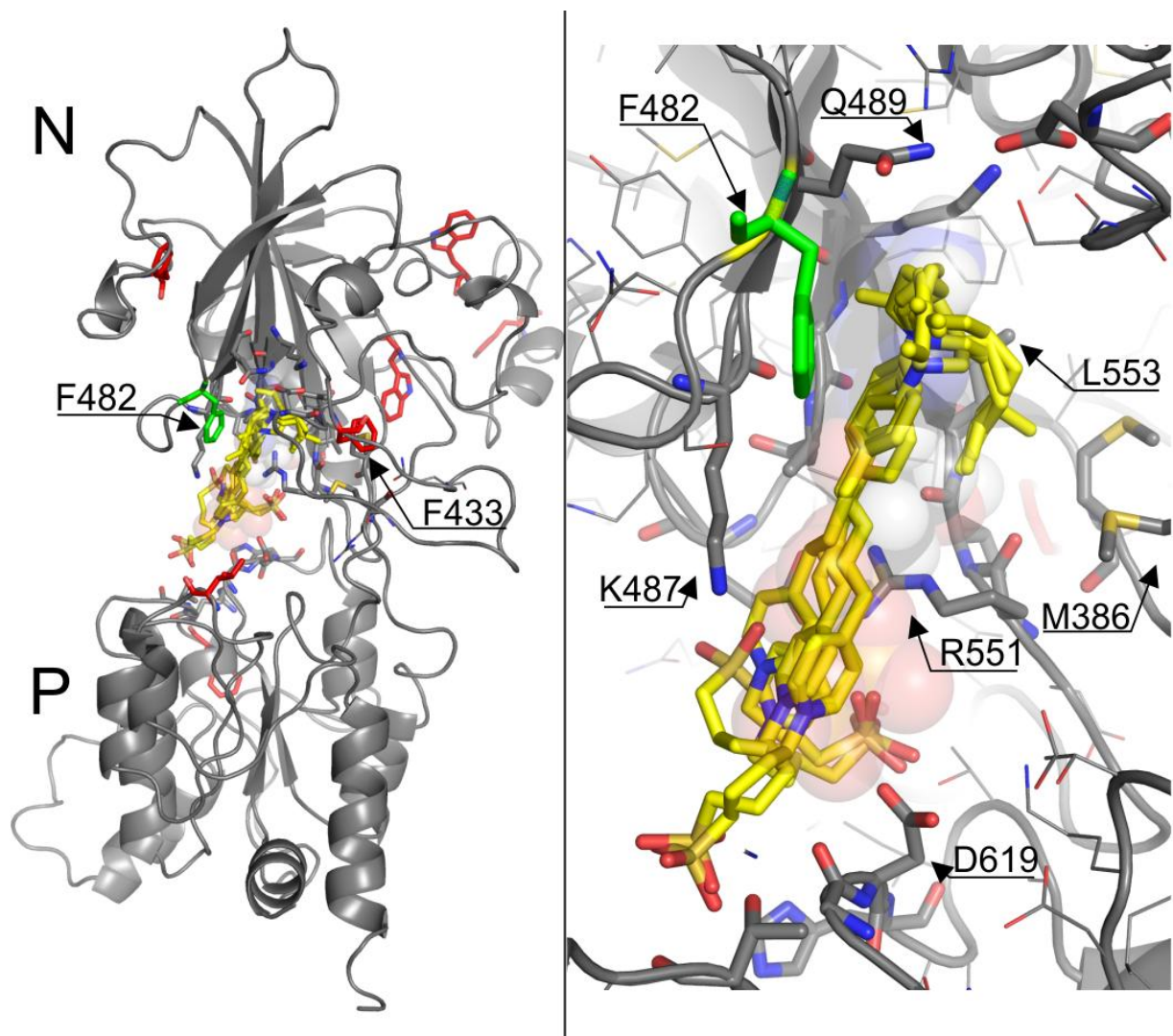
Tabuľka 5. Hodnoty parametrov meraných a spočítaných pri FRET experimentoch na odhalenie vzdialeností medzi tryptofanovými reziduami a naviazaným RH421. Všetky vzdialenosti sú v nm. QY znamená kvantový výťažok donoru, R_0 je Försterova vzdialenosť, E je účinnosť prenosu energie, $r_{(\kappa^2=2/3)}$ je vzdialenosť medzi tryptofánom a naviazaným RH421 za predpokladu $\kappa^2 = 2/3$, $r_{(Trp)}$ a $r_{(RH421)}$ sú anizotropie tryptofanu a naviazaného RH421. r_{min} a r_{max} sú minimálne a maximálne experimentálne určené vzdialenosti medzi tryptofánom a naviazaným RH421. r_{calc} je vzdialenosť určená z modelu.



Obrázok 21. Princíp určenia väzobného miesta RH421 na cytoplazmickej kľučke C45. Výsledky z FRET experimentov dovoľujú určiť minimálne a maximálne vzdialenosti medzi donorom a akceptorom. Tieto vzdialenosti definujú guľové vrstvy o určitej hrúbke okolo tryptofánov a prekryv týchto vrstiev vymedzuje priestor, kde dochádza ku väzbe RH421 na proteín.

3.2.5 Molekulárny doking

Výsledky z molekulárneho dokingu potvrdili zistenia z FRETu a ukázali možné pozície naviazaného RH421 na kľučke C45. Na obrázku 22 je zobrazených päť energeticky najvýhodnejších pozícií RH421 na proteíne. Všetky tieto pozície sa nachádzajú vo väzobnom mieste pre ATP a ukazujú interakciu RH421 s Phe482. Z výsledkov dokovania ďalej vyplýva, že RH421 môže interagovať s ďalšími aminokyselinami ako sú napríklad Lys487, Arg551 a Asp619.

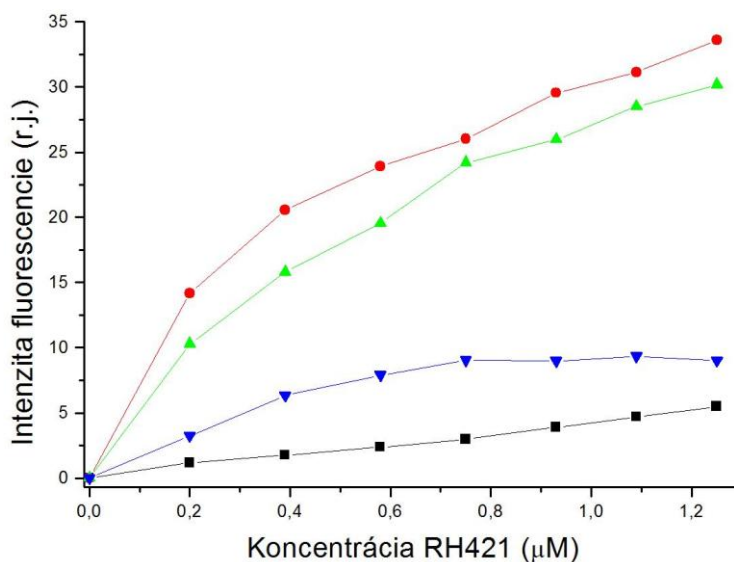


Obrázok 22. Pozícia naviazaného RH421 na kľučke C45. Ľavý panel ukazuje prvých päť energeticky najvýhodnejších pozícií naviazaného RH421. Všetky pozície ukazujú interakciu s Phe482, ktorý bol identifikovaný predošlými experimentami. Pravý panel ukazuje detaily všetkých pozícií a porovnanie s pozíciou ATP molekuly (priesvitné sféry).

3.2.6 Kompetícia RH421 s ATP

Výsledky z FRETu a molekulárneho dokingu odhalili, že RH421 sa viaže na proteín v blízkosti Phe482. Toto rezíduum leží vo väzobnom vrecku pre ATP na kľučke C45. To znamená, že ak sú naše výsledky správne, tieto dve látky sa nemôžu viazať obe naraz na proteín. Preto sme ďalej vykonali titračné experimenty v prítomnosti a bez ATP, aby sme podporili predošlé výsledky. Ako bolo spomínané skôr, väzba RH421 na proteín spôsobuje nárast intenzity fluorescence.

Tento efekt bol potlačený v pridaní ATP (obrázok 23), čo potvrdzuje myšlienku o spoločnom väzobnom mieste pre RH421 a ATP na proteíne.



Obrázok 23. Kompetícia medzi ATP a RH421. Čierne štvorce reprezentujú hodnoty voľného RH421 a červené kruhy reprezentujú hodnoty RH421 v prítomnosti 1 μM kľučky C45. Modré trojuholníky reprezentujú hodnoty RH421 v prítomnosti kľučky C45 a 1 mM MgATP, zelené trojuholníky reprezentujú hodnoty RH421 v prítomnosti kľučky C45 a 20 mM MgATP.

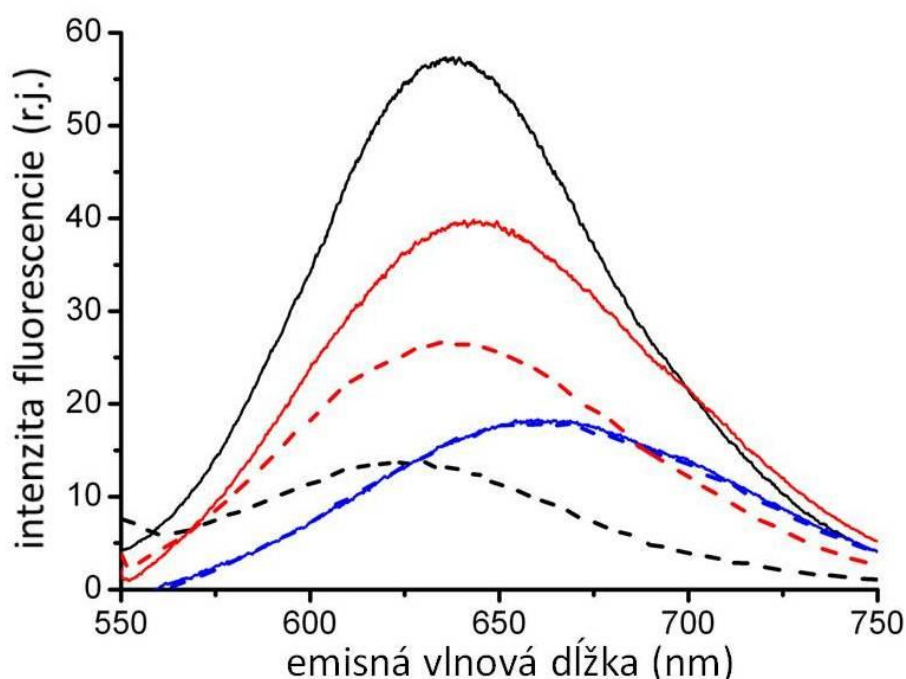
3.2.7 Väzba RH421 na C45 a lipidy

Kontrólne časové merania odhalili, že k väzbe RH421 na C45 kľučku dochádza ihneď po zmiešaní látok, zatiaľ čo ústálenie rovnováhy medzi RH421 a lipidmi trvá 15 až 20 minút, preto vzorky boli pred každým meraním inkubované 20 minút.

Ako bolo spomínané skôr, kvantový výťažok fluorescence RH421 značne vzrástol po pridaní kľučky C45 do roztoku a takisto došlo k posunu maxima emisného spektra na $\lambda_{\text{max}} = 637$ nm. Naproti tomu, pridanie DPPC (dipalmitoilfosfatyldilcholin) nemalo až taký vplyv na zvýšenie kvantového výťažku fluorescence ako v predchádzajúcom prípade, ale došlo k posunu excitačného spektra ku vyšším vlnovým dĺžkam s $\lambda_{\text{max}} = 662$ nm. Ako bolo očakávané, prítomnosť 5 mM MgATP ovplyvnilo fluorescenčný signál len v prítomnosti kľučky C45 a nie v prítomnosti lipidov (obrázok 24).

V snahe odhaliť, kam sa RH421 viaže preferenčne, boli vykonané aj merania emisných spektier RH421 v prítomnosti zmesi C45/DPPC. Bolo nájdené, že v membránových fragmentoch je pomer hmotností proteíny:lipidy približne 1:1 [65]. Pretože kľučka C45 tvorí približne jednu tretinu celkovej hmotnosti Na⁺/K⁺-ATPázy, experimenty boli vykonané s pomerom hmotností proteíny:lipidy 1:3.

Pri meraniach so zmesou C45/DPPC sme pozorovali nárast kvantového výťažku aj spektrálny posun emisného spektra, ktoré naznačujú že dochádza k väzbe RH421 na proteín a takisto na lipidy. Ďalsie merania s touto zmesou v prítomnosti ATP ukázali, že prítomnosť ATP iba čiastočne ovplyvňuje fluorescenčný signál RH421, čo podporuje naše predošlé výsledky.



Obrázok 24. Emisné spektrá 1 μM RH421 inkubovaného s 0,3 mg/ml (6 μM) C45 (čierna), 1 mg/ml DPPC suspenziou (modrá) a C45/DPPC zmesou (červená). Celá čiara prezentuje spektrá bez prítomnosti ATP, čiarkovaná čiara reprezentuje spektrá v prítomnosti 5 mM MgATP.

3.2.8 Diskusia o RH421

Počas posledných rokov sa fluorescenčná sonda RH421 stala jedným z najvýznamnejším nástrojom na sledovanie kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy. Niekoľko fluorescenčných parametrov sa mení počas cyklu Na^+/K^+ -ATPázy, ako napríklad intenzita fluorescencie [43, 44, 66, 67], emisné spektrum (obrázok 16) alebo doba života fluorescencie [66]. Interakcia RH421 s Na^+/K^+ -ATPázou nastáva veľmi rýchlo, čo bolo využité pri tzv. stopped-flow experimentoch [43, 44, 68]. Avšak Na^+/K^+ -ATPáza je komplikovaný enzým, ktorý počas svojho cyklu interaguje s veľkým počtom ligandov, preto interpretácia výsledkov pri meraní s fluorescenčnou sondou RH421 nemusí byť vždy jednoduchá a detailnejšie informácie o interakcii tejto sondy s Na^+/K^+ -ATPázou môžu byť veľmi nápomocné pri správnej prezentácii výsledkov.

Z dôvodu zjednodušenia problému sme skúmali interakciu RH421 len s veľkou cytoplazmickou kľučkou C45. Táto časť Na^+/K^+ -ATPázy napríklad neobsahuje väzobné miesta pre ióny, čo v konečnom dôsledku uľahčuje interpretáciu spektroskopických dát.

Pôvodne bola sonda RH421 vyvinutá na meranie membránového potenciálu. Preto sa predpokladá, že viaže do plazmatickej membrány a sledované zmeny fluorescenčných parametrov sú odpoveďou na prenos iónov cez membránu počas cyklu Na^+/K^+ -ATPázy. Experimenty s príbuzným proteínom H^+ -ATPázou z *Neurospora crassa* ukázali, že RH421 priamo interaguje s proteínom [69]. Ďalej experimenty s meraním doby života fluorescencie odhalili, že Na^+/K^+ -ATPáza interaguje s RH421 ako aj s lipidovou dvojvrstvou [70].

Výsledky z našich experimentov ukázali, že RH421 interaguje s cytoplazmickou kľučkou C45. Po pridaní proteínu sme pozorovali nárast intenzity fluorescencie RH421, ako aj posun emisného maxima. Podobné výsledky boli pozorované aj pri použití membránových fragmentov s celou Na^+/K^+ -ATPázou z králičích obličiek [66]. Títo autori takisto pozorovali inhibíciu aktivity Na^+/K^+ -ATPázy, ktorá nastala pri použití mikromolárnych koncentráciách RH421.

Emisné spektrá RH421 ukázali, že pri použití zmesi C45/DPPC je časť molekúl sondy naviazaná na proteín a časť v lipidovej dvojvrstve. Pridanie ATP iba ovplyvňuje fluorescenciu RH421 iba v prítomnosti kľučky C45. Na základe týchto poznatkov môžeme konštatovať, že RH421 interaguje s cytoplazmickou časťou Na^+/K^+ -ATPázy ako aj s lipidovou dvojvrstvou.

Dôkaz o tom že RH421 sa viaže do lipidovej dvojvrstvy možno nájsť v práci Schwappach a kol. 1994. V nej autori používali Na^+/K^+ -ATPázu, z ktorej bola selektívne odstránená cytoplazmická časť pomocou trypsínu. Napriek tomu, že bolo odstránené aj väzobné miesto pre ATP, pomocou zmien fluorescence RH421 bolo možné sledovať prenos sodných iónov [67].

V ďalších experimentoch sme sa zamerali na určenie väzobného miesta RH421 na C45 kľučke. Využili sme fakt, že absorpčné spektrum RH421 sa prekrýva s emisným spektrom tryptofanu a teda tvoria donor-akceptorový pár pre FRET (obrázok 19). Bolo ukázané, že po pridaní proteínu k RH421, kvantový výtlačok fluorescence z tryptofanu klesol, zatiaľ čo kvantový výtlačok fluorescence RH421 narástol, čo dokazuje, že dochádza k nežiarivému prenosu energie (obrázok 20). Znalosť FRETu dovoľuje určiť vzdialenosť medzi donorom a akceptorom. Avšak určenie vzdialenosti je jednoduché len pre prípad nežiarivého prenosu energie medzi jedným donorom a jedným akceptorom pri konštantnej vzdialenosti medzi nimi. Z tohto dôvodu, každý FRET experiment bol vykonaný s jednotryptofanovým mutantom kľučky C45. Pretože poloha tryptofanu na molekule proteínu je známa, výpočet vzdialeností medzi donorom a akceptorom viedol k tvorbe sfér okolo každého tryptofanu, pričom tieto sféry ohraničujú priestor, v ktorom sa nachádza RH421. Použitím šiestich jednotryptofanových mutantov s odlišnou polohou tryptofanu na proteíne sme boli schopní odhaliť miesto, kde dochádza k interakcii sondy s proteínom. Toto miesto sa nachádza v blízkosti rezidua Phe482, o ktorom je známe, že sa zúčastňuje väzby molekuly ATP [26].

Tento záver viedol k dokovacím štúdiám, ktorá ukázali najvýhodnejšie polohy RH421 v ATP väzobnom mieste v štruktúre kľučky C45. Najvýhodnejšie polohy RH421 v trans-trans konformácii sú v zhode s nameranými vzdialenosťami z FRET experimentov.

Je však nutné poznamenať, že kvôli slabšiemu rozlíšeniu, nie je možné presne určiť, ktoré reziduá sú priamo zodpovedné za väzbu RH421 na kľučke C45. Rozlíšenie je však dostatočné na to, aby väzobné miesto pre ATP v štruktúre kľučky C45 bolo určené ako miesto, kde dochádza k väzbe RH421. Presné určenie aminokyselín zúčastňujúcich sa väzby možno odhaliť pomocou mutačných štúdií.

Kompetitívne experimenty s ATP boli vykonané, aby potvrdili predošlé zistenia. Výsledky z titračných experimentov odhalili, že zmeny v fluorescencii RH421 sú závislé na prítomnosti ATP a ATP chráni proteín pred naviazaním RH421 z čoho jasne vyplýva, že dochádza ku kompetícii medzi ATP a RH421.

Tieto zistenia sú v súlade s predchádzajúcimi pozorovaniami, ktoré boli publikované v článku Clarke a kol. 2007, kde autori pozorovali heterogenitu v kinetike Na^+/K^+ -ATPázy závislú na ATP, ktorá zmizla pri použití vysokej koncentrácie ATP [44]. Tento efekt by mohol byť vysvetlený existenciou dvoch väzobných miest pre RH421. Jedným v cytoplazme a jedným v transmembránovej časti proteínu. Zmiznutie heterogenity by potom mohlo byť spôsobené nahradením molekuly RH421 molekulou ATP, ktorá bola naviazaná vo väzbovom mieste pre ATP.

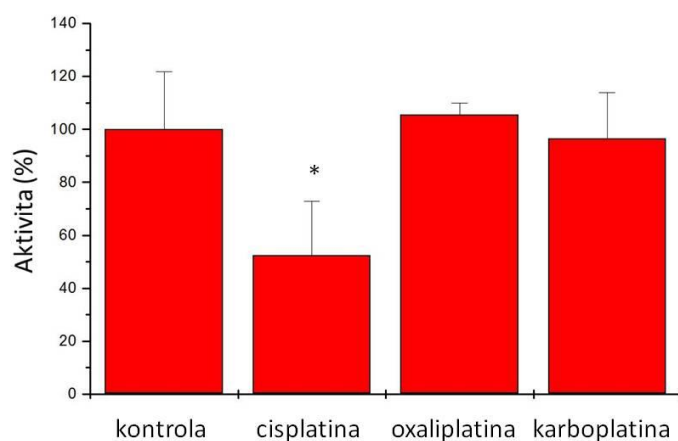
Pomocou našich zistení možno vysvetliť aj výsledky meraní, ktoré vykonali Domaszewicz a Apell 1999. Tí používali TIRF techniku na monitorovanie efektu väzby sodných iónov na štruktúru Na^+/K^+ -ATPázy. Autori pozorovali malý pohyb naviazaného RH421 v smere kolmom na membránu v prítomnosti sodných iónov. Tento efekt vysvetľujú ako zmeny v hrúbke membrány [42]. Pomocou našich zistení by mohol byť vysvetlený pohybom RH421 naviazaného na proteín. Vplyvom sodných iónov dochádza ku konformačným zmenám celého proteínu a teda aj k pohybom naviazaného RH421.

3.3 Interakcia Na⁺/K⁺-ATPázy s cisplatinou

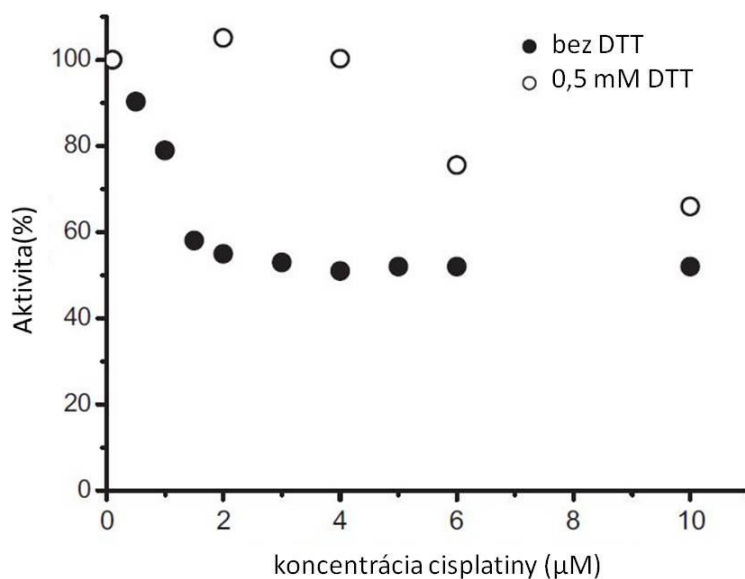
3.3.1 Aktivita Na⁺/K⁺-ATPázy

Skúmali sme vplyv niektorých platinových liekov na aktivitu Na⁺/K⁺-ATPázy. Zistili sme, že vysoké koncentrácie karboplatiny a oxaliplatiny, ktoré nepoškodzujú obličky, nemajú vplyv na aktivitu skúmaného proteínu, zatiaľ čo prítomnosť cisplatin mala výrazný vplyv na jeho aktivitu (obrázok 25). Väzba cisplatin spôsobovala inhibíciu aktivity Na⁺/K⁺-ATPázy na 50%. Ďalej bolo pozorované, že k maximálnej inhibícii proteínu dochádza pri molárnom pomere proteín:cisplatina 1:4 a vyššia koncentrácia cisplatin už nezvyšuje inhibičný účinok (obrázok 22). Tieto experimenty boli vykonané na komerčne dodávanom proteíne. Neskoršie merania s Na⁺/K⁺-ATPázou izolovanou z prasačích obličiek ukázali, že dochádza k úplnej inhibícii aktivity [49].

Ďalej sme zistili, že inhibičný efekt cisplatin možno čiastočne redukovať pridaním 0,5 mM DTT (obrázok 26) a 10 mM glutatiónu [49] a je možné, že látky obsahujúce thiolovú skupinu môžu slúžiť ako ochrana Na⁺/K⁺-ATPázy pred účinkami cisplatin.



Obrázok 25. Vplyv platinových liekov (10 μ M) na aktivitu Na⁺/K⁺-ATPázy (0,5 μ M). * znamená štatisticky významný rozdiel od kontroly ($p < 0,01$).



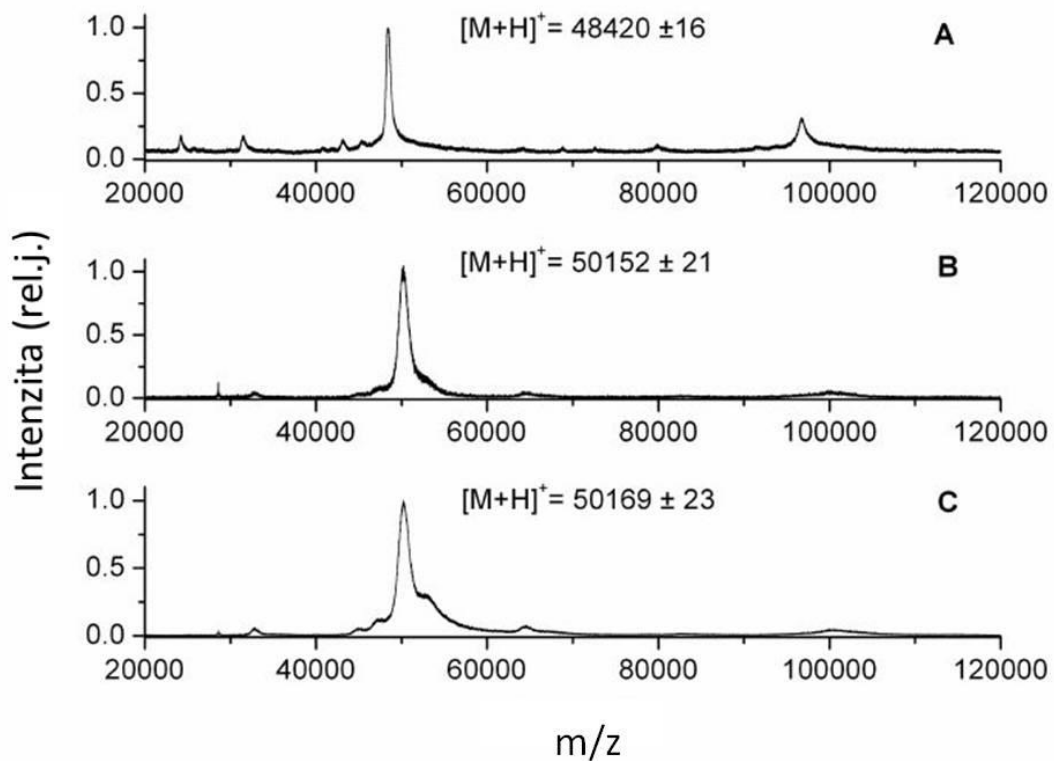
Obrázok 26. Inhibičný efekt vzrastajúcej koncentrácie cisplatin na aktivitu Na⁺/K⁺-ATPázy (0,5 µM).

3.3.2 MALDI-TOF experimenty

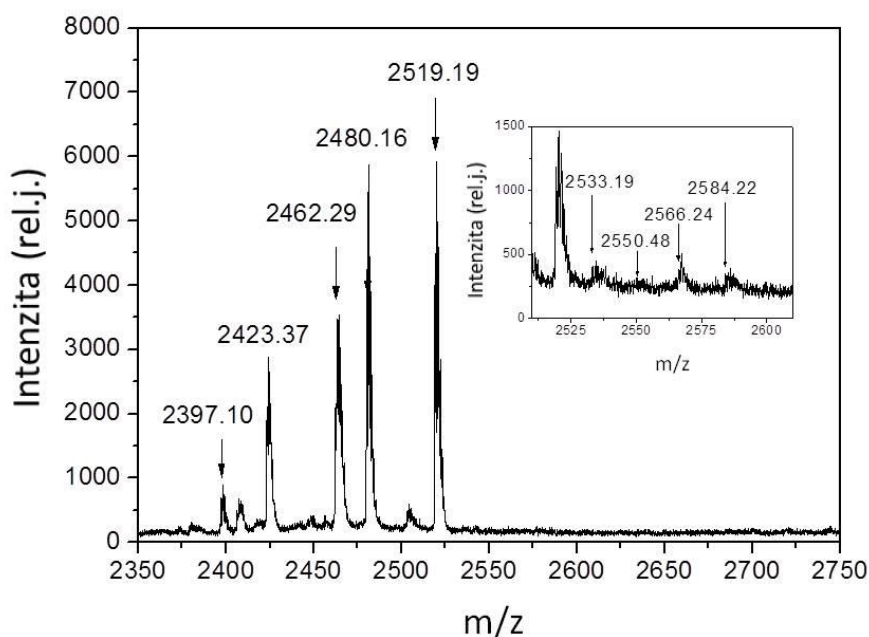
Pomocou MALDI-TOF hmotnostného spektrometra bola určená molekulová hmotnosť kľučky C45 na hodnotu 48419 ± 16 Da (obrázok 27A), čo je v zhode s aminokyselinovou sekvenciou. Po pridaní cisplatin sme pozorovali nárast molekulovej hmotnosti na 50151 ± 21 Da, čo dokazuje, že dochádza k väzbe cisplatin na proteín (27B). Rozdiel molekulových hmotností činí približne 1730 Da, a pretože molekulová hmotnosť cisplatin je 300 Da, tento výsledok naznačuje, že dochádza k reakcii kľučky C45 s rôznymi formami cisplatin (Pt, Pt(NH₃), Pt(NH₃)₂, Pt(NH₃)₂(H₂O), Pt(NH₃)₂Cl).

Za účelom zistenia podrobnejších informácií boli vykonané experimenty MALDI-TOF peptide mass fingerprinting. Ku proteínu bola pridaná cisplatina v molárnom pomere 1:20 a vzorky boli inkubované 24 hodín pri izbovej teplote. Po štiepení trypsínom, molekulové hmotnosti výsledných peptidov boli zmerané a porovnané (obrázok 28). Na základe týchto experimentov bol určený segment GSHMASLEAVETLGSTSTICSDK, u ktorého pravdepodobne dochádza k interakcii s cisplatinou. Tento segment obsahuje jeden cysteín a bolo navrhnuté, že toto rezídium je zodpovedné za túto interakciu.

Na základne tohto predpokladu sme pripravili mutanta kľučky C45, kde cysteín na pozícii 367 bol nahradený serínom (C367S), o ktorom je známe, že má menšiu reaktivitu. Merania pomocou MALDI-TOF ukázali, že po inkubácii s cisplatinou mala výsledná molekulárna hmotnosť hodnotu 50168 ± 23 Da (obrázok 27C), čo je v zhode s hodnotou pre nemutovaný proteín v rámci chýb merania. Z týchto výsledkov možno usudzovať, že tento cysteín pravdepodobne nie je zodpovedný za väzbu cisplatinu.



Obrázok 27. MALDI-TOF spektrum kľučky C45 samotnej (A), po inkubácii s cisplatinou (B) a mutanta C367S po inkubácii s cisplatinou (C).

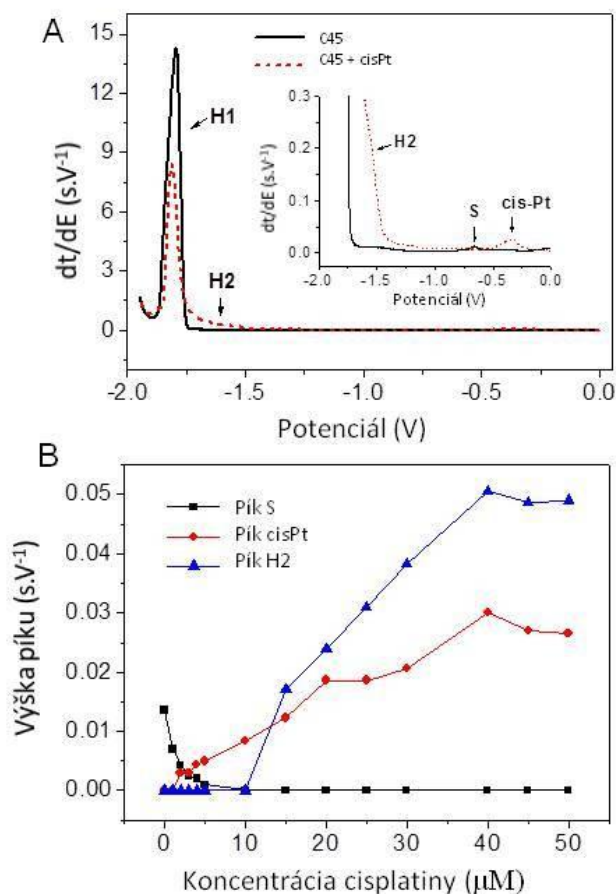


Obrázok 28. Peptide mass fingerprinting kľučky C45. Hlavný panel ukazuje segmenty z MALDI-TOF spektra po štiepení trypsinom zo samotnej kľučky C45 . Pík s m/z 2397,10 patrí segmentu GSHMASLEAVETLGSTSTICSDK. Vnútorňý panel ukazuje štyri píky, ktoré patria segmentom z kľučky C45, ktorá bola inkubovaná cisplatinou. Ich molekulové hmotnosti pravdepodobne odpovedajú rôznym formám cisplatinu naviazanej na segment GSHMASLEAVETLGSTSTICSDK.

3.3.3 Elektrochemické štúdie interakcie cisplatinu s kľučkou C45

Interakcie medzi cisplatinou a kľučkou C45 boli študované pomocou metódy AdT CPSA s elektródou HMDE. V našich experimentoch kľučka C45 (5 μM) bola inkubovaná so vzrastajúcou koncentráciou aktivovanej alebo neaktivovanej cisplatinu (1 - 50 μM). Kapilárna elektroforéza odhalila, že aktivovaná cisplatina obsahuje len pozitívne nabité molekuly, zatiaľ čo neaktivovaná cisplatina je zmes pozitívne nabitých a neutrálnych molekúl v pomere 1:1. Najskôr sme študovali interakcie aktivovanej cisplatinu, vo forme v akej sa vyskytuje vo vnútri bunky. Monitorovali sme pík S, ktorý odpovedá redukcii Hg – S väzbe [49], ktorá nastáva medzi cysteínmi na kľučke C45 a povrchom HMDE. Ďalej sme monitorovali dva píky H1 a H2 (obrázok 29), ktoré odpovedajú katalytickému vývoju kyslíka na povrchu elektródy v prítomnosti proteínu. Navyše, pík odrážajúci redukciiu cisplatinového komplexu bol registrovaný so vzrastajúcou koncentráciou cisplatinu.

Pozorovali sme významný pokles píku S so vzrastajúcou koncentráciou cisplatinu. Tento pokles je pravdepodobne spôsobený väzbou cisplatinu na cysteíny lokalizované na povrchu kľučky C45. Po naviazaní cisplatinu, thiolová skupina cysteínu nemôže vytvoriť redukovanú väzbu Hg – S. Kompletne zmiznutie píku S nastáva pri 10 μM koncentrácii cisplatinu, čo indukuje, že na proteín sa viažu dve molekuly cisplatinu. Interakcia medzi cisplatinou a C45 kľučkou je tiež zjavná z katalytických píkov. Pík H1 pozvoľne klesal so vzrastajúcou koncentráciou cisplatinu. Pri 40 μM cisplatinu sme pozorovali pokles výšky píku asi 40% oproti samotnej kľučke C45. Naproti tomu pík H2, ktorý nebol pozorovaný pre samotný proteín sa objavil len po zmiznutí píku S. Pri nízkych koncentráciách cisplatinu bola pozorovaná len H2 vlna. Nárast H2 a voľného cisplatinového píku bol pozorovaný až v prítomnosti 40 μM cisplatinu v reakčnom roztoku. Pri vyšších koncentráciách sa výška píkov nemenila, čo je pravdepodobne spojené so saturáciou povrchu HMDE.

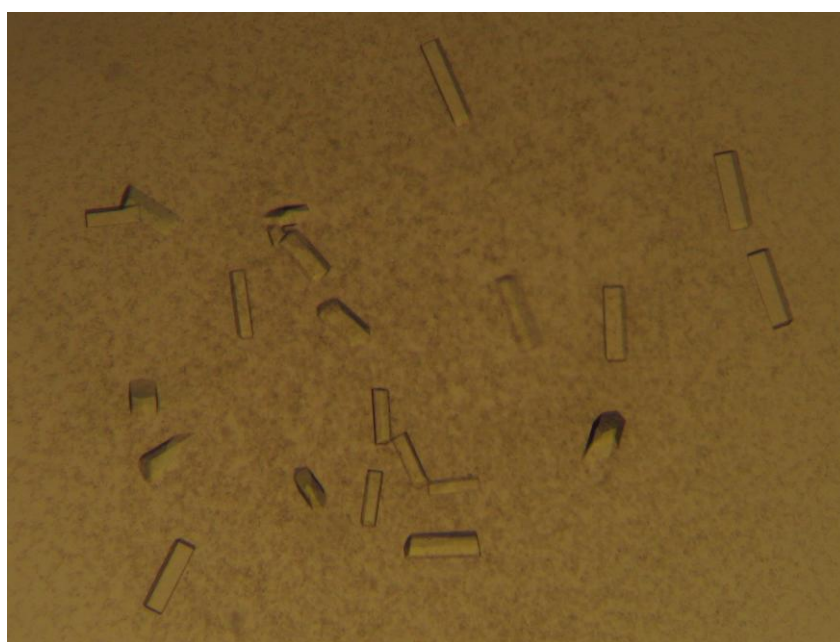


Obrázok 29. (A) CPS merania 5 μM kľučky C45 pred (celá čiara) a po (prerušovaná čiara) inkubácii s cisplatinou. (B) Závislosť výšky píkov (S, H2, cisPt) na koncentrácii cisplatinu.

3.3.4 Kryštály Na^+/K^+ -ATPázy s naviazanou cisplatinou

Na^+/K^+ -ATPáza bola kryštalizovaná podľa podmienok, aké boli publikované v článku Laursen a kol. 2013 [17]. Po troch týždňoch od nasadenia sme získali jednotlivé kryštály použiteľné na difrakčné štúdie (obrázok 30). Ku kryštálom bola následne pridaná cisplatina a pomocou röntgenovej difrakcie bola určená štruktúra proteínu s väzobnými miestami pre cisplatinu.

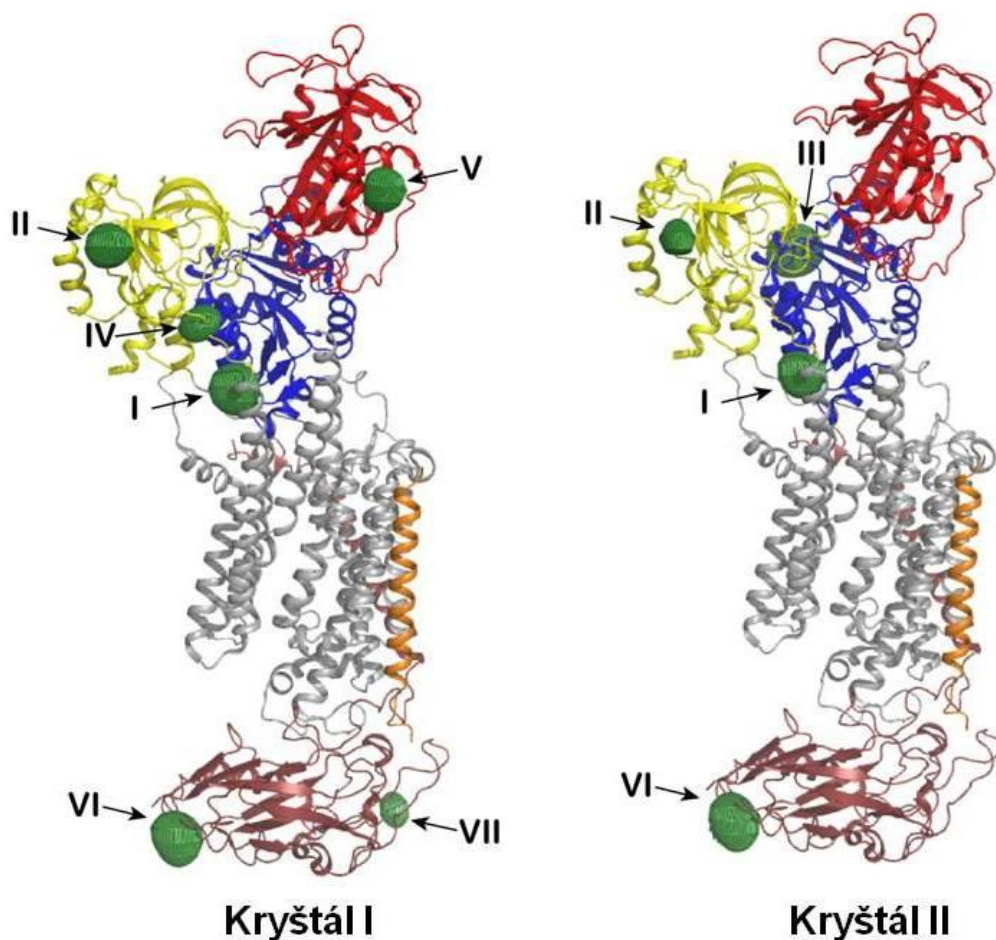
Podarilo sa nám získať dve štruktúry Na^+/K^+ -ATPázy s naviazanou cisplatinou, avšak s nižším rozlíšením (7,4 a 7,9 Å), ktoré nedovoľuje presné určenie reziduí zodpovedných za väzbu cisplatinu.



Obrázok 30. Kryštály Na^+/K^+ -ATPázy.

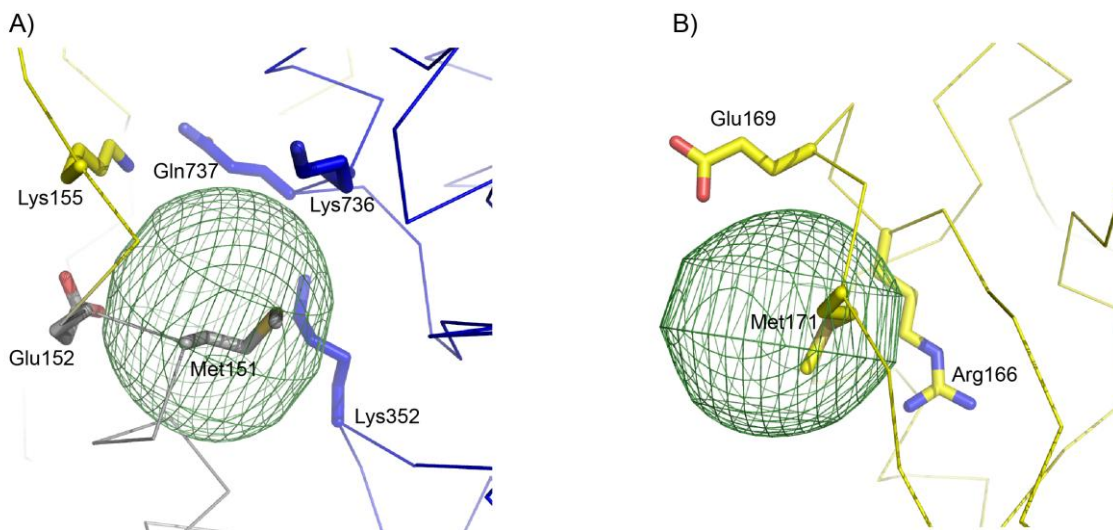
Pretože cisplatina bola ku kryštálom pridávaná vo forme prášku, nemohla byť dobre kontrolovaná jej koncentrácia, čo malo za následok, že väzobné miesta nie sú na oboch kryštáloch rovnaké. Na prvom kryštáli bolo objavených šesť väzobných miest pre cisplatinu, na druhom štyri, pričom tri z týchto miest boli nájdené na oboch kryštáloch (obrázok 31). Tieto miesta sú lokalizovaná hlavne v cytoplazmickej doméne.

Je známe, že cisplatina má veľkú reaktivitu ku aminokyselinám obsahujúcim síru. Naše výsledky ukazujú, že väzobné miesta pre cisplatinu sa nachádzajú v blízkosti Met alebo Cys reziduí. Takisto sme pozorovali, že nabité aminokyseliny ako Asp, Glu, Lys alebo Arg môžu stabilizovať väzbu cisplatinu, čo je v zhode s predchádzajúcimi štruktúrami proteínov s naviazanou cisplatinou [71-73].



Obrázok 31. Väzobné miesta pre cisplatinu na kryštáli I (vľavo) a kryštáli II (vpravo) sú prezentované ako zelené sféry. Jednotlivé časti proteínu sú sfarbené nasledovne: A doména je žltá, P doména modrá, N doména červená, transmembránová časť je šedá. Podjednotky β a γ sú sfarbené hnedou a oranžovou farbou.

V oboch kryštáloch sú dominantné dve väzobné miesta a sú lokalizované pri Met151 (miesto I) a pri Met171 (miesto II) (obrázok 32). Tieto miesta sú obklopené nabitými aminokyselinami, ktoré môžu stabilizovať väzbu. To isté platí aj pre miesta III, ktoré bolo nájdené len na druhom kryštáli a miesta IV a V nájdených zase len na prvom kryštáli. Miesta VI a VII, ktoré sú lokalizované na podjednotke β , sa takisto nachádzajú v blízkosti metionínových a aspartátových reziduí.



Obrázok 32. Aminokyseliny obklopujúce väzobné miesta pre cisplatinu na mieste I (A) a na mieste II (B)

3.3.5 Diskusia o cisplatine

Poškodenie obličiek je limitujúci faktor pre mnohých pacientov s rakovinou pri ich liečbe cisplatinou. Podľa našich výsledkov, toto poškodenie môže byť spôsobené interakciou cisplatinu s Na^+/K^+ -ATPázou. Tento proteín má nezastupiteľnú úlohu v metabolizme všetkých živočíšnych buniek a zmeny v jeho fungovaní môže negatívne ovplyvniť celý organizmus.

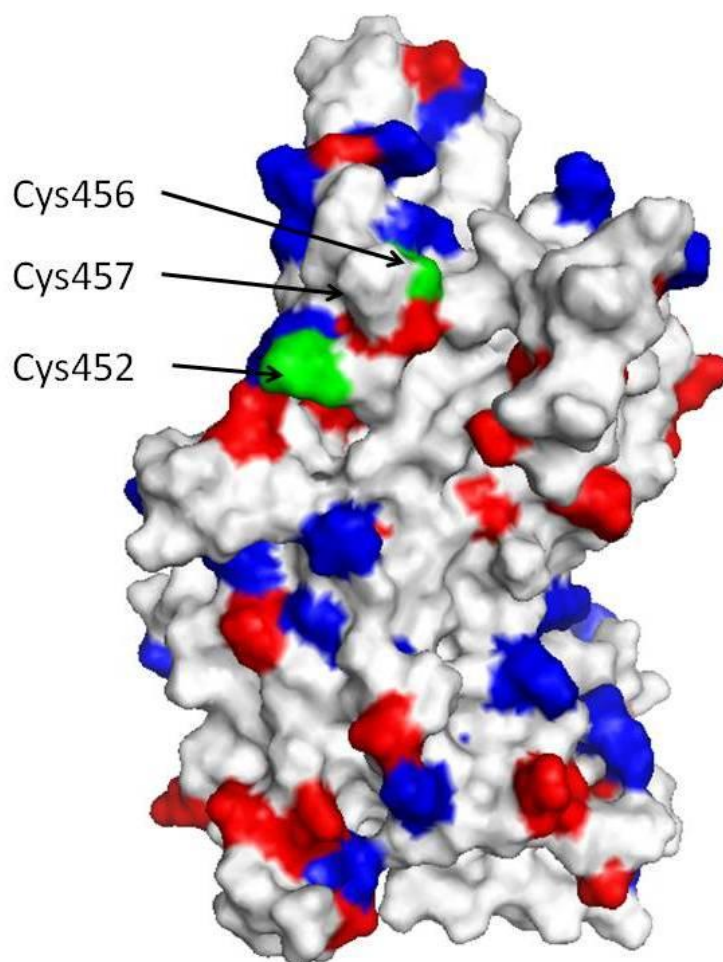
Meraním aktivity Na^+/K^+ -ATPázy sme zistili, že dochádza k inhibícii tohto proteínu cisplatinou, zatiaľ čo ostatné platinové lieky ako oxaliplatina alebo karboplatina nemali na jeho funkciu vplyv, pričom tieto látky nepoškodzujú obličky. Tento fakt potvrdzuje hypotézu, že k tomuto poškodeniu dochádza práve interakciou Na^+/K^+ -ATPázy s cisplatinou.

Ďalej sme zistili, že proteínová aktivita môže byť ochránená pre cisplatinou inhibíciou pridaním DTT alebo redukovaného glutatiónu. Avšak tieto látky môžu ovplyvňovať aj niektoré ďalšie bunkové procesy, preto ich použitie ako ochrany pred účinkami cisplatinu bude vyžadovať ďalšie testy.

V našich experimentoch sme používali cytoplazmickú kľučku C45, pretože predpokladáme, že k interakcii Na^+/K^+ -ATPázy s cisplatinou dochádza v cytoplazmickej časti proteínu. V cytoplazme je nižšia koncentrácia iónov chlóru, čo spôsobuje, že cisplatinu je reaktívnejšia ako v extracelulárnom médiu.

Výsledky z hmotnostnej spektroskopie ukázali, že rozdiel v molekulových hmotnostiach medzi proteínom pred a po inkubácii cisplatinou je približne 1730 Da, čo naznačuje, že na proteín sa viaže niekoľko molekúl cisplatinu. Pomocou peptidmass fingerprintingu bol určený segment GSHMASLEAVETLGGSTSTICSDK na ktorom sa nachádza väzobná miesto pre cisplatinu. Podľa predchádzajúcich výsledkov, kde cysteíny boli identifikované ako reziduá zodpovedné za väzbu cisplatinu na iných proteínoch [74], Cys367 z tohto segmentu bol určený ako reziduum zodpovedné za väzbu cisplatinu. Mutačné štúdie, v ktorých cysteín bol nahradený serínom však nepotvrdili túto teóriu, preto za väzbu cisplatinu sú pravdepodobne zodpovedné iné aminokyseliny. Podľa výsledkov z niektorých ďalších publikácií [75, 76] by týmito aminokyselinami mohli byť Met a His.

Elektrochemické experimenty takisto potvrdili väzbu cisplatinu na cytoplazmickú kľučku C45. Nevýhodou tejto metódy je, že detekuje signál iba z časti proteínu, ktorá je priamo v kontakte s elektródou a ďalšia časť proteínu tak zostáva neviditeľná. To je možno hlavný dôvod, prečo sme detekovali väzbu iba dvoch molekúl cisplatinu na kľučku C45. V predchádzajúcej práci bola ukázaná časť N-domény, na ktorej sa nachádza veľká, negatívne nabitá oblasť [77] (obrázok 33), o ktorej predpokladáme, že sa viaže na elektródu pri elektrochemických experimentoch. Táto oblasť obsahuje cysteíny Cys452, Cys456, Cys457 a interakcia cisplatinu s týmito reziduami môže byť zodpovedná za pokles píku S. Dôležitosť tejto časti bola nedávno ukázaná v článku Petrushanko a kol. 2012 [78].



Obrázok 33. Model kľučky C45. Pozitívne nabité aminokyseliny (Arg, Lys) sú zobrazené modrou farbou, negatívne nabité aminokyseliny (Asp, Glu) červenou. Cys452, Cys456 a Cys457, ktoré sa nachádzajú na vrchu N-domény sú zobrazené zelenou farbou.

Analýza kryštálových štruktúr Na^+/K^+ -ATPázy s naviazanou cisplatinou odhalila ďalšie väzobné miesta pre cisplatinu. Detailnejší pohľad na tieto miesta dovoľuje navrhnúť niekoľko mechanizmov zodpovedných za inhibíciu Na^+/K^+ -ATPázy cisplatinou.

Prvá možnosť je, že väzba cisplatiny priamo blokuje transport iónov cez membránu. Nedávno boli objavené dve možné cesty, ktorými sú transportované sodné a draselné katióny [79]. Väzba cisplatiny do miest I alebo IV (obrázok 31 a 32A) by mohla čiastočne blokovat' tieto cesty, ktoré sú tvorené transmembránovými helixami. Reziduum Met157 v mieste IV je homológne s Tyr122 v SERCA. Bolo ukázané, že mutácia tohto rezidua spôsobuje necitlivosť enzýmu k ADP a spomaľuje katalytický cyklus [80].

Väzba cisplatiny do miesta II je pravdepodobne spojená s inhibíciou celého cyklu Na^+/K^+ -ATPázy. Je známe, že počas katalytického cyklu dochádza k pohybom jednotlivých domén proteínu ako odhalili posledné kryštálové štruktúry v rôznych stavoch [16, 17, 81]. Met171, ktorý sa nachádza v mieste II (obrázok 32B) leží na rozhraní domén A a P a preto väzba cisplatiny do tohto miesta môže brániť pohybu týchto domén. Navyše, aminokyseliny Arg166 a Glu169, ktoré prispievajú k väzbe cisplatiny v mieste II (obrázok 32B) majú svoje analógne reziduá na príbuznej Ca^{2+} -ATPáze (Arg131 Arg134) a mutačné štúdie týchto reziduí ukázali, že ovplyvňujú proteín a sú známe ako Darierova choroba [82-84].

Väzba cisplatiny na časť proteínu obsahujúcu Cys457 a Met463 (miesto V) je v zhode s našimi predchádzajúcimi výsledkami s kľučkou C45 [47].

Je otázkou, či väzba cisplatiny do miest III, VI a VII môže mať vplyv na funkciu Na^+/K^+ -ATPázy, pretože sa nenachádzajú v blízkosti významných reziduí.

4. Záver

Na^+/K^+ -ATPáza je jedným z najdôležitejších proteínov v živočíšnej ríši. Vytvára gradienty pre sodné a draselné ióny, ktoré sú potom použité pri niektorých dôležitých procesoch. Zmeny v správnom fungovaní tohto proteínu dokážu ovplyvniť tieto procesy, čo v konečnom dôsledku môže vyústiť do rozličných porúch a chorôb. Látky, ktoré dokážu ovplyvniť aktivitu tohto životne dôležitého enzýmu sú veľmi významné a preto sa ich skúmaniu venujú v laboratóriách po celom svete. Počas svojho doktorského štúdia som sa zaoberal interakciami Na^+/K^+ -ATPázy s fluoronovými farbivami, fluorescenčnou sondou RH421 a cisplatinou. Za použitia rôznych metód sa nám podarilo dokázať, že všetky tieto látky interagujú s Na^+/K^+ -ATPázou.

Ako bolo spomínané vyššie, fluoronové farbivá sa bežne používajú v potravinárskom priemysle a v medicíne. Ľudia s týmito farbivami prichádzajú do bežného styku, čo podľa našich výsledkov môže predstavovať určité zdravotné riziko. Preto použitie týchto farbív by malo byť obmedzené, dokiaľ sa presne nedokáže ich celkový vplyv na zdravie ľudí.

Fluorescenčná sonda RH421 sa používa v laboratóriách po celom svete na sledovanie kinetiky Na^+/K^+ -ATPázy. Táto látka bola pôvodne vyvinutá na sledovanie membránového potenciálu. Oproti predpokladu že sa sonda viaže do plazmatickej membrány, kde reaguje na prenos náboja cez membránu sme zistili, že dochádza takisto k väzbe RH421 na proteín. Veľa starších prác tento fakt nepredpokladá, čo mohlo spôsobiť chyby v interpretácii výsledkov. Preto pri budúcich meraniach tento efekt treba uvažovať pri interpretácii výsledkov a ďalej treba určiť, aký príspevok má signál z naviazanej sondy na celkovú fluorescenciu farbiva.

Cisplatina je jedným z najpoužívanejších liekov proti rakovine, avšak jeho použitie je limitované mnohými nežiaducimi účinkami. Jeden z týchto efektov, poškodenie obličiek sa dá podľa našich zistení vysvetliť pomocou interakcie cisplatiny s Na^+/K^+ -ATPázou. Výsledky z našich experimentov poskytli detailné informácie o tejto interakcii a spolu s ďalšími plánovanými experimentami s mutantami kľučky C45 môžu byť veľmi nápomocné pri hľadaní spôsobu, ako minimalizovať nežiaduce efekty pri liečbe rakoviny cisplatinou.

5. Referencie

- [1] Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1957;23:394-401.
- [2] Pedersen PL, Carafoli E. Ion motive ATPases .1. Ubiquity, properties, and significance to cell-function. *Trends BiochemSci* 1987;12:146-50.
- [3] Thever MD, Saier MH. Bioinformatic Characterization of P-Type ATPases Encoded Within the Fully Sequenced Genomes of 26 Eukaryotes. *J Membr Biol* 2009;229:115-30.
- [4] Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Evolution* 1998;46:84-101.
- [5] Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJD. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology* 2003;65:817-49.
- [6] Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na⁺,K⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:19659-62.
- [7] Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry* 2002;71:511-35.
- [8] Sweadner KJ. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase *Biochimica Et Biophysica Acta* 1989;988:185-220.
- [9] Shamraj OI, Lingrel JB. A putative 4th Na⁺/K⁺-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:12952-6.
- [10] Woo AL, James PF, Lingrel JB. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:20693-9.
- [11] Jewell EA, Lingrel JB. Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha-1, alpha-2, and alpha-3 isoforms expressed in Hela-cells. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:16925-30.
- [12] Shyjan AW, Gottardi C, Levenson R. The Na,K-ATPase beta-2 subunit is expressed in rat-brain and copurifies with Na,K-ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:5166-9.
- [13] Malik N, Canfield VA, Beckers MC, Gros P, Levenson R. Identification of the mammalian Na,K-ATPase beta 3 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:22754-8.
- [14] Therien AG, Pu HX, Karlsh SJD, Blostein R. Molecular and functional studies of the gamma subunit of the sodium pump. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*

2001;33:407-14.

- [15] Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 angstrom resolution. *Nature* 2009;459:446-U167.
- [16] Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sorensen TLM, Petersen J, Andersen JP, et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 2007;450:1043-U6.
- [17] Laursen M, Yatime L, Nissen P, Fedosova NU. Crystal structure of the high-affinity Na⁺,K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:10958-63.
- [18] Ogawa H, Shinoda T, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺, K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:13742-7.
- [19] Grycova L, Sklenovsk P, Lansky Z, Janovska M, Otyepka M, Amler E, et al. ATP and magnesium drive conformational changes of the Na⁺/K⁺-ATPase cytoplasmic headpiece. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2009;1788:1081-91.
- [20] Gatto C, Wang AX, Kaplan JH. The M4M5 cytoplasmic loop of the Na,K-ATPase, overexpressed in *Escherichia coli*, binds nucleoside triphosphates with the same selectivity as the intact native protein. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:10578-85.
- [21] Tran CM, Farley RA. Catalytic activity of an isolated domain of Na,K-ATPase expressed in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal* 1999;77:258-66.
- [22] Kubala M, Obsil T, Obsilova V, Lansky Z, Amler E. Protein modeling combined with spectroscopic techniques: An attractive quick alternative to obtain structural information. *Physiol Res* 2004;53:S187-S97.
- [23] Kubala M, Grycova L, Lansky Z, Sklenovsky P, Janovska M, Otyepka M, et al. Changes in Electrostatic Surface Potential of Na⁺/K⁺-ATPase Cytoplasmic Headpiece Induced by Cytoplasmic Ligand(s) Binding. *Biophysical Journal* 2009;97:1756-64.
- [24] Kubala M, Hofbauerova K, Ettrich R, Kopecky V, Krumscheid R, Plasek J, et al. Phe(475) and Glu(446) but not Ser(445) participate in ATP-binding to the alpha-subunit of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:154-9.
- [25] Kubala M, Plasek J, Amler E. Limitations in linearized analyses of binding equilibria: binding of TNP-ATP to the H-4-H-5 loop of Na/K-ATPase. *Eur Biophys J Biophys Lett* 2003;32:363-9.
- [26] Kubala M, Teisinger J, Ettrich R, Hofbauerova K, Kopecky V, Baumruk V, et al. Eight amino acids form the ATP recognition site of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochemistry* 2003;42:6446-52.
- [27] Shi JM, Zhang XP, Neckers DC. Xanthenes - fluorone derivates II. *Tetrahedron Lett*

1993;34:6013-6.

- [28] Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy: Springer, 2006.
- [29] Giulivi C, Sarcansky M, Rosenfeld E, Boveris A. The photodynamic effect of rose bengal on proteins of the mitochondrial inner membrane. *Photochemistry and Photobiology* 1990;52:745-51.
- [30] Ganesan L, Margolles-Clark E, Song Y, Buchwald P. The food colorant erythrosine is a promiscuous protein-protein interaction inhibitor. *Biochemical Pharmacology* 2011;81:810-8.
- [31] Skou JC, Esmann M. Effect of magnesium ions on the high-affinity binding of eosin to the Na^+K^+ -ATPase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1983;727:101-7.
- [32] Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary and Comparative Oncology* 2008;6:1-18.
- [33] Safaei R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Letters* 2006;234:34-9.
- [34] Yonezawa A, Inui K. Organic cation transporter OCT/SLC22A and H(+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochemical Pharmacology* 2011;81:563-8.
- [35] Rosenberg B. Anti-cancer activity of cis-dichloroammineplatinum(II) and some relevant chemistry. *Cancer Treatment Reports* 1979;63:1433-8.
- [36] Dzagnidze A, Katsarava Z, Makhalova J, Liedert B, Yoon MS, Kaube H, et al. Repair capacity for Platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *Journal of Neuroscience* 2007;27:9451-7.
- [37] Miller R.P., Tadagavadi R.K., Ramesh G, W.B. R. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins* 2010;2:2490-518.
- [38] Ries F, Klastersky J. Nephrotoxicity induced by cancer-chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *American Journal of Kidney Diseases* 1986;8:368-79.
- [39] Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International* 2008;73:994-1007.
- [40] Vinciguerra M, Mordasini D, Vandewalle A, Feraille E. Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the Na,K-pump in collecting duct principal cells. *Seminars in Nephrology* 2005;25:312-21.
- [41] Klodos I, Esmann M, Post RL. Large-scale preparation of sodium-potassium ATPase from kidney outer medulla. *Kidney International* 2002;62:2097-100.
- [42] Domaszewicz W, Apell HJ. Binding of the third Na^+ ion to the cytoplasmic side of the Na,K-ATPase is electrogenic. *Febs Letters* 1999;458:241-6.

- [43] Clarke RJ, Kane DJ, Apell HJ, Roudna M, Bamberg E. Kinetics of Na⁺-dependent conformational changes of rabbit kidney Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophysical Journal* 1998;75:1340-53.
- [44] Clarke RJ, Apell HJ, Kong BY. Allosteric effect of ATP on Na⁺,K⁺-ATPase conformational kinetics. *Biochemistry* 2007;46:7034-44.
- [45] Pilotelle-Bunner A, Cornelius F, Sebban P, Kuchel PW, Clarke RJ. Mechanism of Mg²⁺ Binding in the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophysical Journal* 2009;96:3753-61.
- [46] Khalid M, Fouassier G, Apell HJ, Cornelius F, Clarke RJ. Interaction of ATP with the Phosphoenzyme of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* 2010;49:1248-58.
- [47] Huliciak M, Vacek J, Sebela M, Orolinova E, Znaleziona J, Havlikova M, et al. Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na⁺/K⁺-ATPase by binding to its cytoplasmic part. *Biochemical Pharmacology* 2012;83:1507-13.
- [48] Havlikova M, Huliciak M, Bazgier V, Berka K, Kubala M. Fluorone dyes have binding sites on both cytoplasmic and extracellular domains of Na,K-ATPase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2013;1828:568-76.
- [49] Kubala M, Geletičová J, Huličiak M, Zatloukalová M, Vacek J, Šebela M. Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by cisplatin and consequence for cisplatin nephrotoxicity. *Biomedical Paper - Olomouc* 2014;akceptované na publikáciu.
- [50] Huličiak M, Reinhard L, Laursen M, Fedosova NU, Nissen P, Kubala M. Crystals of Na⁺/K⁺-ATPase with bound cisplatin. 2014;v recenznom konaní.
- [51] Huličiak M, Bazgier V, Berka K, Kubala M. RH421 binds into the ATP-binding site on the Na⁺/K⁺-ATPase. 2014;v príprave.
- [52] Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
- [53] Banik U, Roy S. A continuous fluorimetric assay for ATPase activity. *Biochemical Journal* 1990;266:611-4.
- [54] Rupp B. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology* Garland Science 2009.
- [55] Demchenko AP. *Ultraviolet spectroscopy of proteins*. New York: Springer-Verlag, 1981.
- [56] Dale RE, Eisinger J, Blumberg WE. Orientational freedom of molecular probes - orientation factor in intra-molecular energy-transfer. *Biophysical Journal* 1979;26:161-93.
- [57] Lakowicz JR, Gryczynski I, Wiczak W, Laczko G, Prendergast FC, Johnson ML. Conformational distributions of melittin in water-methanol mixtures from frequency-domain measurements of nonradiative energy-transfer *Biophys Chem* 1990;36:99-115.
- [58] Visser NV, Vanhoek A, Visser A, Clarke RJ, Holzwarth JF. Time-resolved polarized

- fluorescence of the potential-sensitive dye RH421 in organic-solvents and micelles. *Chem Phys Lett* 1994;231:551-60.
- [59] Ogan JT, Reifenberger MS, Milanick MA, Gatto C. Kinetic characterization of Na,K-ATPase inhibition by Eosin. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38:229-37.
- [60] Skou JC, Esmann M. Effect of magnesium ions on the high-affinity binding of eosin to the (Na⁺⁺K⁺)-ATPase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1983;727:101-7.
- [61] Gatto C, Milanick MA. Inhibition of the red-blood.cell calcium-pump by eosin and other fluorescein analogs. *Am J Physiol* 1993;264:C1577-C86.
- [62] Slinchenko NN, Bratkova NF, Kosterin SA, Zimina VP, Chernysh IG. Effects of eosin Y on the catalytic and functional activities of Mg²⁺, ATP-dependent calcium pump of smooth muscle cell plasma membrane. *Biochem-Moscow* 1998;63:685-90.
- [63] Esmann M, Fedosova NU. Anion interactions with Na,K-ATPase: simultaneous binding of nitrate and eosin. *Eur Biophys J Biophys Lett* 2004;33:683-90.
- [64] Esmann M. Conformational transitions of detergent-solubilized Na,K-ATPase are conveniently monitored by the fluorescent -probe 6-carboxy-eosin. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:63-9.
- [65] Jorgensen PL. Isolation and characterisation of components of sodium-pump. *Q Rev Biophys* 1974;7:239-&.
- [66] Frank J, Zouni A, vanHoek A, Visser A, Clarke RJ. 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* 1996;1280:51-64.
- [67] Schwappach B, Sturmer W, Apell HJ, Karlsh SJD. Binding of sodium-ions and cardiotonic steroids to native and selectively trypsinized Na,K pump, detected by charge movements. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:21620-6.
- [68] Kane DJ, Fendler K, Grell E, Bamberg E, Taniguchi K, Froehlich JP, et al. Stopped-flow kinetic investigations of conformational changes of pig kidney Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* 1997;36:13406-20.
- [69] Nagel G, Bashi E, Slayman CL. Spectral tagging of reaction substates in a sodium pump analogue: the plasma membrane H⁺-ATPase of *Neurospora*. *The sodium pump: recent development*. New York: Rockefeller University Press, 1991. p. 493-8.
- [70] Schwappach B, Gassman W, Fortes PAG. Interaction of the voltage-sensitive dye RH421 with (Na,K)-ATPase. *Biophysical Journal* 1991;59.
- [71] Tanley SWM, Schreurs AMM, Helliwell JR, Kroon-Batenburg LMJ. Experience with exchange and archiving of raw data: comparison of data from two diffractometers and four software packages on a series of lysozyme crystals. *J Appl Crystallogr* 2013;46:108-19.

- [72] Helliwell JR, Tanley SWM. The crystal structure analysis of the relative binding of cisplatin and carboplatin in a mixture with histidine in a protein studied at 100 and 300 K with repeated X-ray irradiation. *Acta Crystallogr Sect D-Biol Crystallogr* 2013;69:121-5.
- [73] Banci L, Bertini I, Blazevits O, Calderone V, Cantini F, Mao JF, et al. Interaction of Cisplatin with Human Superoxide Dismutase. *J Am Chem Soc* 2012;134:7009-14.
- [74] Boal AK, Rosenzweig AC. Crystal Structures of Cisplatin Bound to a Human Copper Chaperone. *Journal of the American Chemical Society* 2009;131:14196-+.
- [75] Dabrowiak DC. *Metals in medicine*: Wiley, 2009.
- [76] Hartinger CG, Tsybin YO, Fuchser J, Dyson PJ. Characterization of platinum anticancer drug protein-binding sites using a top-down mass spectrometric approach. *Inorganic Chemistry* 2008;47:17-9.
- [77] Kubala M, Grycova L, Lansky Z, Sklenovsky P, Janovska M, Otyepka M, et al. Changes in Electrostatic Surface Potential of Na(+)/K(+)-ATPase Cytoplasmic Headpiece Induced by Cytoplasmic Ligand(s) Binding. *Biophysical Journal* 2009;97:1756-64.
- [78] Petrushanko IY, Yakushev S, Mitkevich VA, Kamanina YV, Ziganshin RH, Meng XY, et al. S-Glutathionylation of the Na,K-ATPase Catalytic alpha Subunit Is a Determinant of the Enzyme Redox Sensitivity. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:32195-205.
- [79] Takeuchi A, Reyes N, Artigas P, Gadsby DC. The ion pathway through the opened Na(+),K(+)-ATPase pump. *Nature* 2008;456:413-6.
- [80] Yamasaki K, Daiho T, Danko S, Suzuki H. Multiple and distinct effects of mutations of Tyr(122), Glu(123), Arg(324), and Arg(334) involved in interactions between the top part of second and fourth transmembrane helices in sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase - Changes in cytoplasmic domain organization during isometric transition of phosphoenzyme intermediate and subsequent Ca(2+) release. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:2202-10.
- [81] Nyblom M, Poulsen H, Gourdon P, Reinhard L, Andersson M, Lindahl E, et al. Crystal Structure of Na+, K+-ATPase in the Na+-Bound State. *Science* 2013;342:123-7.
- [82] Ikeda S, Mayuzumi N, Shigihara T, Epstein EH, Goldsmith LA, Ogawa H. Mutations in ATP2A2 in patients with Darier's disease. *J Invest Dermatol* 2003;121:475-7.
- [83] Miyauchi Y, Daiho T, Yamasaki K, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Danko S, et al. Comprehensive analysis of expression and function of 51 sarco(endo) plasmic reticulum Ca2+-ATPase mutants associated with Darier disease. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:22882-95.
- [84] Ma HL, Lewis D, Xu C, Inesi G, Toyoshima C. Functional and structural roles of critical amino acids within the "N", "T", and "A" domains of the Ca2+ ATPase (SERCA) headpiece.

Biochemistry 2005;44:8090-100.

6. Publikácie