



УДК: 616.8:577.3:577.1

Фатима УМАРОВА,

*Центр Передовых Технологий, мнс Национальный Университет Узбекистана, независимый
исследователь кафедры биофизики*

Александр КУЛИКОВ,

Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, СИС

Улугбек МИРХОДЖАЕВ,

*Профессор Национальный университет Узбекистана, кафедры биофизики Автор для переписки Умарова Фатима
Таджибаевна*

E-mail: umarovafatima876@gmail.com,

Рецензент: к.б.н. Г.Б. Умарова Доцент Национального университета Узбекистана

THE USE OF SPIN LABELS IN STUDYING THE MECHANISM OF FUNCTION OF THE TRANSPORT ENZYME NA,K-ATPASE

Annotation

The mechanism of Na,K-ATPase function was studied using nitroxyl radicals and a paramagnetic ion incorporated into various regions of the enzyme. The nitroxyl radical PHMB-R and a spin benzocarboline (BC) probe were used as spin labels, while paramagnetic Mn²⁺ ions were localized in the active site of Na,K-ATPase. The introduction of spin labels into the protein molecule outside the active site allows for the study of long-range effects and the determination of their location in the membrane. In this study, the distance between Mn²⁺ ions in the enzyme's substrate site and the nitroxyl PCMB-R radical, as well as between Mn²⁺ ions and the spin BC probe in spin-labeled Na,K-ATPase was determined. EPR spectra were recorded in frozen spin-labeled Na,K-ATPase samples using the continuous saturation method at 77 K.

Keywords: transport enzyme, spin labels, nitroxyl radicals, paramagnetic ion.

NA, K-ATFAZA TRANSPORT FERMENTING FUNKTSIYASI MEXANIZMINI O'RGANISHDA SPIN BELGILARIDAN FOYDALANISH

Annotatsiya

Na,K-ATFazaning ishlash mexanizmi nitroksil radikallari va fermentning turli qismlariga kiritilgan paramagnit ion yordamida o'rganildi. Nitroksil radikali PHMB-R va spin benzokarbolin (BK) probi aylanish belgisi sifatida ishlatilgan; paramagnit Mn²⁺ ionlari Na, K-ATFaza faol markazida lokalizatsiya qilingan.

Spin belgilarining faol markazdan tashqaridagi oqsil molekulasiga kiritilishi uzoq masofali ta'sirlarni o'rganish va ularning membranada joylashishini aniqlash imkonini beradi. Ishda fermentning substrat joyidagi Mn²⁺ ionlari va nitroksil PCMB-R radikali orasidagi masofa, shuningdek, spin-yorliqli Na, K-ATFazadagi Mn²⁺ ionlari va spin BK probi orasidagi masofa aniqlandi. EPR spektrlari 77 K haroratda doimiy to'yinganlik usuli yordamida muzlatilgan spin-yorliqli Na, K-ATFaza namunalarida qayd etilgan.

Kalit so'zlar: transport fermenti, spin belgilari, nitroksil radikali, paramagnit ion.

ПРИМЕНЕНИЕ СПИНОВЫХ МЕТОК ПРИ ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТРАНСПОРТНОГО ФЕРМЕНТА NA,K-ATФазы

Аннотация

Исследование механизма функционирования Na,K-ATФазы проводилось нитроксильными радикалами и парамагнитным ионом, встроенных в различные участки фермента. В качестве спиновой метки использовались нитроксильный радикал ПХМБ-Р и спиновый бензокарболиновый (БК) зонд, парамагнитные ионы Mn²⁺ локализовались в активном центре Na,K-ATФазы. Введение спиновых меток в белковую молекулу вне активного центра позволяет изучать дальнедействующие эффекты и устанавливать место их локализации в мембране. В работе определялось расстояние между ионами Mn²⁺ в субстратном участке фермента и нитроксильным ПХМБ-Р радикалом, также между ионами Mn²⁺ и спиновым БК зондом в спин-меченой Na,K-ATФазе. Регистрация спектров ЭПР проводилась в замороженных спин-меченых образцах Na,K-ATФазы методом непрерывного насыщения при температуре 77 К.

Ключевые слова: транспортный фермент, спиновые метки, нитроксильный радикал, парамагнитный ион.

Введение Na,K-ATФаза является компонентом плазматических мембран клеток животных и относится к ферментной системе, осуществляющей перенос ионов натрия и калия против градиентов их электрохимических потенциалов для поддержания ионного гомеостаза клеточных процессов за счет энергии гидролиза АТФ [1,2]. Специфическим ингибитором фермента являются сердечные гликозиды, обладающие кардиотоническим эффектом [3]. При изучении структуры и динамических свойств мембранных белков необходимо знать расстояния между функциональными группами ферментов, между активным центром и местом аллостерического воздействия и использование в этих целях метода спиновых меток способствует изучению достаточно удаленных либо глубоко погруженных в мембранную матрицу белковых участков [4]. ЭПР-спектроскопия позволяет изучать белковые молекулы в их естественном состоянии, а релаксационные параметры спектров существенно расширяют возможности исследования

слабых взаимодействий пространственно удаленных центров, вследствие диполь-дипольного взаимодействия между парамагнетиками [5].

Целью нашей работы было по методу количественного анализа и расчета времени спин-решеточной релаксации T_1 определить расстояния как между активным центром и нитроксильным радикалом ПХМБ-Р, а так и между активным центром и бензокарболиновым зондом в спин-меченых образцах Na,K-АТФаы. Полученные данные в дальнейшем будут использованы при изучении влияния сердечных гликозидов на подвижность спиновых меток для исследования внутримолекулярной динамики Na,K-АТФаы.

Методы ЭПР все время расширяются и в последние годы перспективным стало использование в качестве спиновой метки высокочувствительных фотовозбужденных молекул - фуллереновой метки [6].

Материалы и методы. В работе были использованы нитроксильный радикал парахлормеркурибензоат (ПХМБ-Р), спиновый БК зонд, АТФ, трис-НСI и др. реактивы квалификации х.ч. Препарат Na,K-АТФаы (90% чистоты) был выделен из плазматических мембран почек свиньи в градиенте плотности сахарозы. Мечение белка ПХМБ-Р проводили в среде, содержащей ионы натрия, калия, АТФ, трис-НСI в течение 30 мин. при 4°C при равном соотношении белок:метка. БКзонд встраивался при введении в белковый препарат. Содержание белка в образце составляло 6 мг в мл. Спиновые метки вносились с конечной концентрацией $4 \cdot 10^{-5}$ М радикала и $7 \cdot 10^{-5}$ М зонда в растворе этанола, где его концентрация не превышала 1-2%. Исследования проводились в замороженных растворах при температуре 77 К. В спин-меченые образцы последовательно добавляли $MnCl_2$ для сохранения относительных амплитуд, смесь помещали в узкий стеклянный капилляр, замораживали в жидком гелии и устанавливали в резонатор. Спектры измеряли на радиоспектрометре ЭПР -3 с частотой модуляции 20 кГц, мощностью клистрона около 600 мвт. При расчетах значения децибел переводились в эрстеды.

Результаты и их обсуждение. Эффективность метода спиновых меток зависит от возможностей специфической модификации определенных белковых групп биомакромолекулы. Модификацию проводят с помощью стабильных нитроксильных бирадикалов, избирательно присоединяя к определенным участкам белка либо нитроксильные радикалы разной структуры, либо монорадикал и парамагнитный ион металла. В методе непрерывного насыщения при определении времени спин-решеточной релаксации T_1 радикалов исследования проводятся в замороженных растворах (77 К), когда молекулярное движение спинов практически остановлено, чтобы исключить усредняющее действие парамагнетиков. В работе нам предстояло определить локализацию и расположение относительно активного центра Na,K-АТФаы нитроксильного радикала ПХМБ-Р, ковалентно связывающегося в соотношении 1:1 со свободными SH-группами фермента, а также бензокарболинового зонда, встраивающегося в прибелковые и гидрофобные участки мембраны. Na,K-АТФаа является Mg зависимым белком, где роль субстрата принадлежит комплексу Mg-АТФ. В транспортных АТФазах ионы Mn^{2+} могут успешно заменить ионы Mg^{2+} в субстратном комплексе Mg-АТФ. Заменив диамагнитные ионы магния на парамагнитные ионы марганца, и используя эффективность диполь-дипольного взаимодействия между Mn^{2+} и нитроксильными радикалами, введенными в различные участки фермента, можно определить их расположение относительно субстратного центра.

Экспериментально кривые насыщения получают, регистрируя зависимость амплитуды A центрального пика сигнала ЭПР нитроксильного радикала от напряженности СВЧ поля H_1 . Определение расстояний от нитроксильных ПХМБ-Р радикала и БК зонда до ионов Mn^{2+} в активном центре Na,K-АТФаы проводилось нами по параметру кривой насыщения H_1^* , соответствующего напряженности СВЧ поля, при которой амплитуда сигнала ЭПР равна половине максимальной (рис.1). Изменение скорости спин-решеточной релаксации нитроксила $\Delta \cdot 1/T_1$ за счет диполь-дипольного взаимодействия с ионом Mn^{2+} рассчитывается по параметру H_1^* по формуле:

$$\left(\frac{H_1^*}{H_1^{*0}} \right)^2 - 1 = \frac{\Delta}{T_1} \cdot T_1^0 \quad (1)$$

где индекс "0" относится к случаю, когда парамагнитный ион отсутствует.

На рис.1 и 2 представлены кривые насыщения спектров ЭПР нитроксильного БК зонда и ПХМБ-Р радикала в Na,K-АТФае и влияние на них ионов марганца, взятых при различных соотношениях $[Mn^{2+}]/[белок]$ (моль/моль) в образце: 1:1; 2:1; 3:1; 6:1; 15:1; 18:1; 30:1. Магнитное диполь-дипольное взаимодействие между спинами Mn^{2+} и нитроксила должно сдвигать кривые насыщения спектров ЭПР БК зонда и ПХМБ-Р радикала в сторону меньших значений децибел, изменяя параметр H_1^* .

Величина H_1^* является довольно чувствительным параметром и в ходе эксперимента наблюдался сдвиг кривых насыщения спектров ЭПР БК зонда (рис.1) и ПХМБ-Р радикала (рис.2) под влиянием ионов Mn^{2+} в сторону оси ординат. Из рис.1 видно, что для БК зонда величина H_1^* уменьшается от 37 дВ в отсутствие Mn^{2+} до значений ~ 33 дВ при 2-30-ти кратном избытке Mn^{2+} в образце соответственно. Для ПХМБ-Р радикала подобное снижение H_1^* составляет $\sim 36,5-27$ дВ при 1-18-ти кратном избытке Mn^{2+} в образце соответственно. Зарегистрированные нами изменения параметра H_1^* в спин-меченой Na,K-АТФае свидетельствуют о магнитном диполь-дипольном взаимодействии между спинами Mn^{2+} и нитроксильными радикалами. Диполь-дипольное взаимодействие между спиновыми метками и парамагнитным ионом увеличивает скорость спин-решеточной релаксации нитроксильных радикалов на величину:

$$\Delta \frac{1}{T_1} = \frac{2}{15} \frac{\mu^2 \gamma^2}{r^6} \left[\frac{\tau}{1 + (\omega - \omega_0)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_0^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega + \omega_0)^2 \tau^2} \right] \quad (2)$$

где μ , τ , ω - магнитный момент, время спин решеточной релаксации и резонансная частота иона соответственно, ω_0 - резонансная частота радикала, r - расстояние между нитроксильным радикалом и парамагнитным ионом, γ - электронное гиромагнитное отношение.

Расстояние r между спиновыми метками и парамагнитным ионом вычисляется по формуле (2) и для расчетов необходимо привести ряд параметров. Величина ω_0 равна частоте клистрона $5,9 \cdot 10^{10}$ рад/с, $\mu = 5,9 \mu_B$, где μ_B - магнетон Бора, $\omega - \omega_0 = 8,5 \cdot 10^{10}$ рад/с, $\gamma = 1,77 \cdot 10^7$ рад/с, $\tau = 2 \cdot 10^{-9}$ сек.

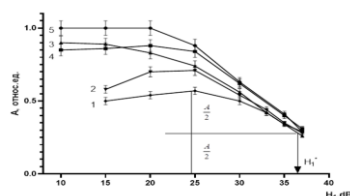


Рис1. Кривые насыщения спектров ЭПР нитроксильного зонда БКЗ в Na,K-АТФазе при различных соотношениях концентрации марганца и белка.

1 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 0$; 2 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 2$; 3 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 6$; 4 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 15$; 5 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 30$. А-амплитуда центрального пика спектра ЭПР при 77 К, H_1 – напряженность СВЧ поля в образце. Концентрация зонда 7×10^{-5} М. На рисунке сохранены относительные амплитуды образцов; указана величина H_1^* для кривой 1.

Кривые насыщения спектров ЭПР ПХМБ-Р радикала и БК зонда в Na,K-АТФазе при отсутствии Mn^{2+} в среде оказались близки кривым насыщения спектра ЭПР нитроксильного радикала R-ОН в этаноле при 77 К, что позволило за время спин-решеточной релаксации метки T_1^0 принять соответствующее значение $T_1^0 = 2 \cdot 10^{-4}$ с радикала R-ОН. Для БК зонда, встроенного в Na,K-АТФазу из рис.1 было определено, что сдвиг кривых насыщения составляет ~ 4 dB и по формуле (1) было рассчитано изменение скорости спин-решеточной релаксации спинового зонда, равное $\Delta \cdot 1/T_1 \cong 8 \cdot 10^3$ с^{-1} . Для определения расстояния r между радикалом и парамагнитным ионом использовалась формула (2). Вычисления, проведенные для бензокарболинового зонда показали, что расстояние между зондом и спинами Mn^{2+} в активном центре Na,K-АТФазы составляет $r \cong 50$ Å.

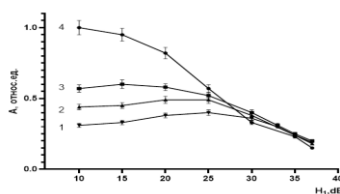


Рис 4. Кривые насыщения спектров ЭПР нитроксильной метки ПХМБ-Р в Na,K-АТФазе при различных соотношениях концентрации марганца и белка.

1 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 0$; 2 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 1$; 3 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 3$; 4 $-\text{[Mn]}/[\text{белок}] = 18$; А-амплитуда центрального пика спектра ЭПР при 77 К, H_1 – напряженность СВЧ поля в образце. Концентрация радикала 4×10^{-5} М. На рисунке сохранены относительные амплитуды образцов.

Для нитроксильного радикала ПХМБ-Р из рис.2 было определено, что сдвиг кривых насыщения составляет ~ 10 dB и рассчитана величина $\Delta \cdot 1/T_1 = 4,5 \cdot 10^4$ с^{-1} , а также по формуле (2) установлено, что расстояние между ПХМБ-Р радикалом и ионами Mn^{2+} в активном центре Na,K-АТФазы соответствует $r \cong 38$ Å.

Заключение. Результаты исследований показывают, что в Na,K-АТФазе как ПХМБ-Р радикал, так и бензокарболиновый зонд находятся на сравнительно большом расстоянии (~ 38 Å, ~ 50 Å соответственно) от активного центра фермента. При взаимодействии спиновой метки с быстро релаксирующим парамагнитным ионом металла параметром намного более чувствительным к взаимодействию, чем ширина и форма линии спектра оказывается время спин-решеточной релаксации нитроксильных T_1 . Физические параметры спиновых меток отражают микровязкость и жесткость мембраны в месте посадки радикала, что позволяет изучать динамическую структуру активного центра фермента и дальнедействующих эффектов и выявлять степень изменения этих структур при тех или иных воздействиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cassiano Felipe Gonçalves-de-Albuquerque et.al. (2017) Na/K Pump and Beyond: Na/K-ATPase as a Modulator of Apoptosis and Autophagy. *Molecules* 22(4), P. 578 -599; doi:10.3390/molecules22040578
2. Contreras RG, Toress-Carillo A. et.al. (2024) Na^+K^+ -ATPase: More than an Elektrogenic Pump. *Int J Mol Sci* 1;25(11):6122. Doi 10.3390/ijms25116122.
3. Chirag N. Patel et.al. (2019) Cardiotoxic steroids as potential Na^+K^+ -ATPase inhibitors – a computational study. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. P.1-10. DOI:10.1080/10799893.2019.1660893
4. Ivanov M. Yu., Fedin M. V. (2018) Nanoscale heterogeneities in ionic liquids: insights from EPR of spin probes. *Mendeleev Commun.* V. 28. P. 565–573.
5. Лихтенштейн Г.И., Куликов А.В., Котельников А.И. Использование релаксационных процессов с участием нитроксильных радикалов в молекулярной биологии. - В кн. "Метод спиновых меток и зондов: Проблемы и перспективы". - М.: Наука, 1986,с.41-61.
6. Krumkacheva O. A. et al. (2019) Triplet Fullerenes as Prospective Spin Labels for Nanoscale Distance Measurements by Pulsed Dipolar EPR. *Angew. Chem. Int.Ed.*V.58.P.13271-13275. Вклад авторов в работу. Умарова Ф.Т. осуществляла выделение препарата Na,K-АТФазы (90% чистоты) из плазматических мембран почек свиньи в градиенте плотности сахарозы.
7. Куликов А.В. проводил эксперименты со спиновыми метками и снимал спектры ЭПР спин-меченой Na,K-АТФазы в замороженных образцах.
8. Мирходжаев У.З. осуществлял концептуализацию проведенных исследований и интерпретацию полученных данных в свете последних достижений ЭПР по изучению молекулярной динамики и механизмов функционирования Na,K-АТФазы под влиянием специфических ингибиторов.