

*На правах рукописи*

**Ташкин Всеволод Юрьевич**

**КОНКУРЕНТНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ В ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ КАНАЛЕ  
ДОСТУПА  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФАЗЫ**

**03.01.02 – биофизика**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва - 2014**

Работа выполнена в лаборатории биоэлектрохимии Института физической химии и электрохимии им. Фрумкина РАН

Научный руководитель:

**Чизмаджев Юрий Александрович**

доктор химических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

**Каламкаров Григорий Рафаэлевич**, доктор биологических наук, профессор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля Российской академии наук, г. Москва.

**Петрушанко Ирина Юрьевна**, кандидат физико-математических наук, ст. н. с. Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва.

Ведущая организация:

Научно-исследовательский Институт экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения России.

Защита диссертации состоится «    » \_\_\_\_\_ 2015 года в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при биологическом факультете Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, аудитория «Новая»

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова и на сайте <http://www.bio.msu.ru>

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2014 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

М. Г. Страховская

### **Актуальность темы исследования.**

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза поддерживает градиенты концентрации ионов натрия и калия в мембране клетки, что играет ключевую роль во множестве процессов, таких, как поддержание потенциала покоя, восстановление концентраций ионов натрия и калия после прохождения потенциала действия в возбудимых тканях, симпорт и антипорт различных веществ через плазматическую мембрану и поддержание осмотического потенциала клетки. Нарушения функционирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы вызывают различные заболевания. Так, мутации  $\alpha$ -субъединицы белка вызывают дистонию-паркинсонизм с острым началом, гемиплегическую мигрень 2 типа, детскую гемиплегию и синдром Конна - тяжелые заболевания, проявляющиеся, в основном, в комплексе неврологических симптомов, и, в случае болезни Конна, серьезными нарушениями обмена веществ. Согласно последним данным, одним из эффектов этих мутаций является значительное снижение сродства к ионам натрия и калия.

Несмотря на интенсивные исследования, проводившиеся в течение нескольких десятков лет, все еще существует множество вопросов, связанных с механизмом функционирования этого белка. Наименее изучен канал, связывающий трансмембранные центры связывания ионов с цитоплазмой. Константы равновесия связывания ионов с цитоплазматической стороны белка, полученные различными экспериментальными методами, сильно различаются, а соответствующие этим процессам константы скорости до последнего времени определить не удавалось. Выяснению этих вопросов в значительной степени способствуют измерения электрических токов, вызванных перемещением ионов в  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазе. Они позволяют определить и равновесные, и кинетические константы переноса и связывания ионов, а также скорости сопряженных с ним конформационных переходов. Однако таких измерений для цитоплазматического канала доступа практически не проводилось. В последние 10 лет получила распространение гипотеза, согласно которой электрический ток, вызванный транспортом первого и второго ионов натрия (и 2-х ионов калия) «скрыт» противотоком протонов. В этом случае должна наблюдаться конкуренция между ионами натрия, калия и протонами за эти сайты связывания белка. Это может указывать на общность эволюционного пути  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и других близких АТФаз этого семейства (например,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы

или  $H^+, K^+$ -АТФазы), которые осуществляют обменный транспорт ионов металлов на протоны.

В ходе выполнения данной диссертационной работы разработана методика измерения адмиттанса мембран, содержащих  $Na^+, K^+$ -АТФазу, с помощью фотолиза соединений, приводящего к быстрому закислению среды, проведен большой объем исследований с использованием современных биофизических методов. Полученные данные свидетельствуют о применимости данного метода для выяснения транспорта различных ионов в цитоплазматическом канале доступа  $Na^+, K^+$ -АТФазы.

### **Цели и задачи исследования**

Целью работы было изучение возможности протонного транспорта  $Na^+, K^+$ -АТФазой, а также изучение переноса различных ионов в цитоплазматическом канале доступа. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- Выяснить, происходит ли протонный транспорт в  $Na^+, K^+$ -АТФазе.
- Выяснить, имеет ли место конкуренция между ионами натрия, калия и протонами за цитоплазматические сайты связывания.
- Определить параметры транспорта  $Na^+, K^+$  и  $H^+$  в цитоплазматическом канале доступа, а также влияние на них ионов магния.

### **Научная новизна**

В работе впервые прямыми электрическими методами была исследована конкуренция между различными ионами в цитоплазматическом канале доступа  $Na^+, K^+$ -АТФазы и получены константы связывания ионов натрия, калия и протонов в нем, а также влияние на них ионов магния. Использование метода измерения малых приращений адмиттанса, вызванных фотолизом Caged-соединений, позволяет определить равновесные константы связывания вышеназванных ионов и кинетические константы вызванных этим связыванием процессов (перенос ионов между раствором и центрами связывания в белке, конформационные переходы) в диапазоне 1-1000 Гц. Ранее цитоплазматическое связывание ионов изучалось только косвенными методами – измерениями потоков и окклюзии меченых ионов, скорости гидролиза АТФ белком и с использованием флуоресцентных зондов.

### **Практическая значимость**

Практическая значимость исследования состоит в разработке методики измерений адмиттанса мембран с помощью Caged- $H^+$ , которая может использоваться для изучения функционирования других мембранных белков. Она является развитием применявшейся ранее методики измерений приращения адмиттанса мембран с использованием Caged-АТФ – соединений, высвобождающих АТФ при вспышке света. Кроме того, детальное выяснение механизма связывания ионов  $Na^+, K^+$ -АТФазой может оказаться полезным при разработке методов лечения заболеваний, связанных с ее дисфункцией.

### **Апробация работы.**

Основные результаты работы были представлены и обсуждены на IX Международном Фрумкинском симпозиуме (Москва - 2010), IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород – 2012), 14 Международной конференции по  $Na^+, K^+$ -АТФазе и другим АТФазам Р-типа (Lunteren, Netherlands - 2014), VI и VII Конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов ИФХЭ РАН (Москва – 2011, 2012).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 2 печатные работы в изданиях, входящих в перечень ВАК и 3 тезиса международных конференций. Диссертация соответствует специальности 03.01.02 – биофизика.

### **Личный вклад автора**

Основная экспериментальная работа (проведение калибровочных и контрольных опытов, все опыты с  $Na^+, K^+$ -АТФазой), обработка полученных данных и формулирование выводов выполнены автором самостоятельно. Планирование исследований и обсуждение полученных результатов осуществлялись совместно с руководителем д.х.н., проф. Ю. А. Чизмаджевым и в.н.с., д.ф.-м.н. В. С. Соколовым, адаптировавшим метод измерения приращений адмиттанса для измерения ионного транспорта  $Na^+, K^+$ -АТФазой на модельной системе.

## **Структура и объем работы**

Диссертационная работа изложена на 97 страницах, содержит 36 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, который включает 96 цитированных источника.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **Введении** приведена краткая история изучения  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, сформулированы основные цели и задачи исследования, обоснована его актуальность и практическая значимость.

**Обзор литературы.** В данном разделе рассмотрены биохимические механизмы функционирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, в том числе в условиях, не встречающихся в организме (т. н. неканонические режимы работы белка). Подробно описаны имеющиеся на настоящее время данные по структуре  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и, в частности, структуре трансмембранных ион-связывающих сайтов. На основе результатов исследования структуры приведена гипотетическая модель связывания трех ионов натрия. Большое внимание уделено истории изучения связывания ионов натрия и калия в  $E_1$ -конформации, способности других одновалентных ионов связываться и переноситься белком, а также влияния на его функционирование многовалентных ионов. Подробно описаны электрические методы изучения функционирования  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, в частности, используемый в диссертационной работе метод измерения малых приращений адмиттанса на модельной системе с очищенным белком. Рассмотрены работы, посвященные различным механизмам гипотетического транспорта протонов белком.

## **Материалы и методы.**

БЛМ формировали по методу Мюллера–Рудина в тефлоновой ячейке на отверстии диаметром 1 мм из дифитаноиллецитина (Avanti Polar Lipids, США), растворенного в *n*-декане. Раствор, применявшийся для исследования  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, содержал NaCl, концентрация которого варьировалась (см. подписи к рисункам), 0.1 mM EDTA (acid) и 12 mM хлорида N-метил-D-глюкамина (NMG) (Sigma, США). Хлорид NMG был необходим для функционирования хлорсеребряных электродов в отсутствие хлоридов металлов. Для приготовления растворов использовали следующие реактивы: NaCl (Реахим, Россия),  $\text{MgCl}_2$ , EPPS, дитиотреитол (Sigma,

США). Все растворы готовили на дистиллированной воде, дополнительно очищенной с помощью MILLI-Q50 с фильтром Pure PACK-1 (Thermo Scientific). В экспериментах с Caged- $H^+$  было использовано соединение 2-метокси-5-нитрофенил сульфат натрия (MNPS-Na), синтезированное в Институте органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН. Молекулы этого соединения при поглощении кванта УФ-света выбрасывают в раствор гидросульфат, который диссоциирует до сульфата, закисляя среду в растворе (Fibich et al, 2007).

Фрагменты мембран, содержащие очищенную  $Na^+,K^+$ -АТФ-азу в концентрации около 2 мг/мл были выделены из почек кролика по процедуре (Jorgenson, 1974) в лаборатории Н.-J.Аpell Биологического факультета университета г. Констанц (Германия). Активность  $Na^+,K^+$ -АТФ-азы при 37°C составляла 1300-1700 мкМ неорганического фосфата в час на 1 мг белка. Суспензия фрагментов с  $Na^+,K^+$ -АТФ-азой хранилась при -60°C в течение нескольких месяцев без существенной потери активности. При проведении измерений суспензию размораживали и хранили при +4°C не более 2 недель

Освещение БЛМ производилось с помощью ксеноновой лампы-вспышки с сапфировым окном FJ-249 (EG&G, США). Во всех опытах суспензию фрагментов мембран с  $Na^+,K^+$ -АТФ-азой (в концентрации 20 мкг/мл) и Caged- $H^+$  (300 мкМ) добавляли в дальний (по отношению к свету) отсек. Адсорбция фрагментов мембран с  $Na^+,K^+$ -АТФ-азой происходила около часа и контролировалась по уменьшению суммарной емкости БЛМ. Электрические сигналы записывались после вспышки УФ света, вызывающей фотолиз Caged АТФ или Caged- $H^+$ . После вспышки света происходило восстановление системы в течение нескольких минут. Это позволяло проводить несколько измерений на одной мембране. Относительные приращения емкости усреднялись по экспериментам на нескольких БЛМ (не менее чем трех).

Электрические измерения приращений емкости БЛМ с адсорбированными на ней мембранными фрагментами с  $Na^+,K^+$ -АТФ-азой проводили, прикладывая напряжение синусоидальной формы с амплитудой 50 мВ и частотой 64 Гц с выхода ЦАП платы L-780 Lcard (Россия). Это напряжение подключали к одному из электродов ячейки с БЛМ. Ко второму электроду подключали усилитель Keithley-427 (США), выход которого был связан с входом АЦП той же платы. Регистрация электрического тока и

напряжения проводилась на БЛМ, и дальнейшие вычисления приращений емкости проводились с помощью программы, разработанной авторами.

Освобождение АТФ приводило к появлению переходного тока, связанного с переносом ионов натрия  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой из раствора в область контакта БЛМ с фрагментом (Borlinghaus et al., 1987). Интеграл этого переходного тока использовался в дальнейшем для калибровки измерений приращений емкости (Sokolov et al, 2008), что было необходимо для их усреднения. Перенос ионов натрия в отсутствие ионов калия завершается установлением долгоживущего состояния "равновесия"; и для того, чтобы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза успевала вернуться в исходное состояние, следующую вспышку давали не ранее чем через 10 минут.

Измерения приращений емкости и проводимости БЛМ с адсорбированными на ней фрагментами мембран с  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азой, вызванных фотолизом Caged- $\text{H}^+$ , проводили в отсутствие АТФ с помощью методики, аналогичной описанной выше. Основные отличия этих измерений состояли в том, что в этом случае отсутствовал переходный ток, и поэтому процедура калибровки была изменена (см. раздел «Результаты»).

## **Результаты и их обсуждение.**

### **3.1.Опыты с Caged-АТФ**

Для того чтобы установить возможность протонного транспорта  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой, была проведена серия опытов с Caged-АТФ в среде, не содержащей ионов натрия и калия. Изучалось влияние рН на частотные зависимости приращения емкости и проводимости в ответ на освобождение АТФ в безнатриевой среде и после добавления в ячейку 4 мМ  $\text{Na}^+$ . Эта концентрация ионов натрия, при которой, согласно полученным ранее в нашей лаборатории данным, основной вклад в изменения емкости мембраны вносит транспорт ионов натрия в цитоплазматическом канале доступа, выбрана для сравнения и нормировки. Для усреднения результатов разных опытов частотные зависимости нормировались на величину заряда, перенесенного через мембрану  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой, который определяли как максимальное значение интеграла тока короткого замыкания, измеренного в присутствии ионов натрия после вспышки света. В разных опытах значения перенесенного заряда лежали в пределах от 0.5 до 3 пКл.



В безнатриевой среде были получены зависимости, мало отличающиеся от аналогичных в среде с 4 мМ Na<sup>+</sup> (рис. 1). Разница состояла в том, что в присутствии Na<sup>+</sup> на низких частотах приращения емкости были меньше, чем в среде без Na<sup>+</sup>. Частотная зависимость изменения емкости в присутствии ионов натрия была близка к измеренной ранее в (Sokolov et al, 2008)

На приращения емкости в среде, не содержащей ионы натрия, влиял рН. Повышение рН от 6 до 8 вызывало монотонное понижение низкочастотных участков зависимостей (рис. 2).

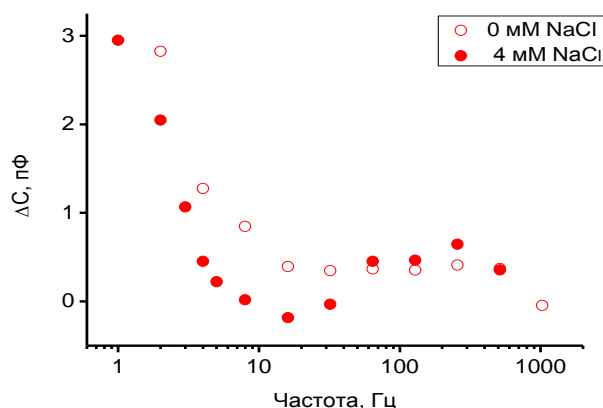


Рис. 1. Сравнение приращения емкости, вызванных фотолизом Caged-АТР, на БЛМ с адсорбированными мембранными фрагментами с белком, в среде без натрия и при концентрации натрия 4 мМ. Состав раствора: 150 мМ NMG, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 30 мМ имидазола, рН=7.5.

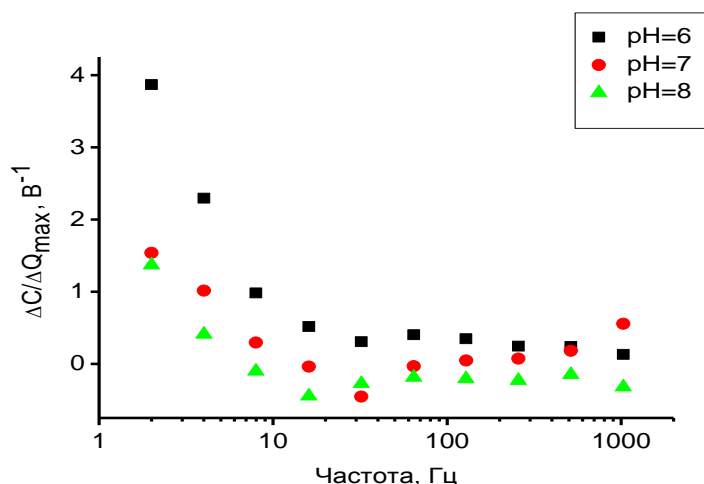


Рис. 2. Зависимость приращения емкости, вызванной фотолизом Caged-АТР, от частоты на БЛМ с адсорбированными МФ с белком в среде без натрия. Состав раствора: 150 мМ NMG, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, растворы с рН=7 - 30 мМ имидазола, раствор с рН=6 - 30 мМ MES, с рН=8 - 30 мМ EPPS.

Чтобы доказать, что эти изменения емкости действительно вызваны функционированием  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы (а не эффектами фотолиза Caged-АТФ на мембрану), мы провели контрольные эксперименты на той же экспериментальной системе (БЛМ с адсорбированными МФ), но с ингибированным белком. Для проведения опытов были выбраны условия, в которых наблюдался наибольший эффект приращений ёмкости (150 мМ NMG, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 30 мМ MES, 1 мМ EDTA, pH=6) в безнатриевой среде. Использовались 2 различных ингибитора - ортованадат ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) и оуабаин.

При добавке обоих ингибиторов приращения емкости в ответ на вспышку исчезали. Поскольку 2 совершенно разных по природе и механизму действия ингибитора практически полностью подавляли приращения емкости в ответ на вспышку, можно сделать вывод, что наблюдаемые изменения емкости в безнатриевой среде действительно вызваны работой  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы.

Электрические сигналы, возникающие в отсутствие ионов натрия, и ионов калия, можно объяснить, если предположить, что в транспорте ионов  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой участвуют протоны. В принципе, протоны могут давать вклад в изменение емкости за счет переноса между местами связывания и водными растворами в каналах доступа ионов либо с цитоплазматической, либо с внеклеточной сторон белка. В соответствии с представлениями, развитыми ранее при изучении транспорта ионов натрия, предполагается, что АТФ должен вызывать закрытие канала с цитоплазматической стороны и открытие – с внеклеточной, поэтому цитоплазматический канал должен давать отрицательный вклад в изменение емкости, а внеклеточный – положительный. Нами было получено положительное изменение емкости в отсутствие ионов натрия, поэтому, в соответствии с данными представлениями, этот результат должен свидетельствовать о том, что транспорт протонов происходит в канале с внеклеточной стороны. Весьма низкая (около 10 Гц) характерная частота спада емкости близка к аналогичной при небольшой концентрации  $\text{Na}^+$ . В присутствии натрия это объясняли тем, что кинетика перемещения ионов в канале определяется предшествующей медленной неэлектрогенной стадией – конформационным переходом  $E_1 - E_2$ . Совпадение этих частот также служит свидетельством в пользу предположения, что в безнатриевых условиях при появлении АТФ белок переходит в  $E_2$ -конформацию.

Полученные результаты указывают, что в описанных условиях  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза переносит протоны, однако метод измерения с использованием Caged-АТФ не позволяет выяснить детали отдельных стадий переноса протонов и ионов натрия. Транспорт ионов, вызванный скачком концентрации АТФ в среде, состоит из многих стадий (это могут быть связывание каждого из протонов и ионов натрия с цитоплазматической и внеклеточной сторон и конформационные переходы). Для подробного изучения связывания  $\text{H}^+$  и  $\text{Na}^+$  в цитоплазматическом или внеклеточном каналах доступа необходим другой метод.

### 3.2. Опыты с Caged- $\text{H}^+$

#### **3.2.1. Опыты на БЛМ без адсорбированных мембранных фрагментов**

Для изучения протонного и натриевого транспорта в  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазе на той же экспериментальной системе был использован принципиально иной подход, чем быстрое фотоактивируемое высвобождение АТФ – быстрое фотоактивируемое высвобождение протонов (осуществляется с помощью т. н. Caged- $\text{H}^+$ ). Закисление среды не должно вызывать переход между конформациями  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы – в отсутствие АТФ белок находится в  $E_1$ -конформации; в присутствии - в  $E_2$ . Это позволяет регистрировать электрические сигналы, связанные либо только внутриклеточным транспортом (при отсутствии в среде АТФ), либо только с внеклеточным (когда АТФ есть).

Во всех опытах Caged- $\text{H}^+$  добавляли только в дальний (по отношению к свету) отсек.

Прежде чем исследовать влияние скачков рН на функционирование  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, мы провели калибровочные измерения величины скачка рН при фотолизе Caged- $\text{H}^+$ , а также контрольные опыты, в которых определяли изменения емкости и проводимости БЛМ в отсутствие  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Чтобы определить изменение рН около БЛМ, измеряли мембранный потенциал на БЛМ, проницаемой для протонов, для чего в растворы добавляли протонофор РСР. Результаты этих опытов приведены на рис. 3. Вспышка света приводила к изменению мембранного потенциала, величина которого восстанавливалась до исходного значения примерно за 2 мин. Вычисленное по уравнению Нернста изменение рН, соответствующее данному изменению мембранного потенциала, составляло около 0.1 единицы рН.

Восстановление потенциала и проводимости после вспышки света связано с тем, что вспышка освещает только малый объем раствора вблизи мембраны, где и происходит уменьшение рН. После окончания освещения рН этого малого объема раствора восстанавливается вследствие его смешивания с оставшимся большим объемом раствора, который не освещался и рН которого не изменился.

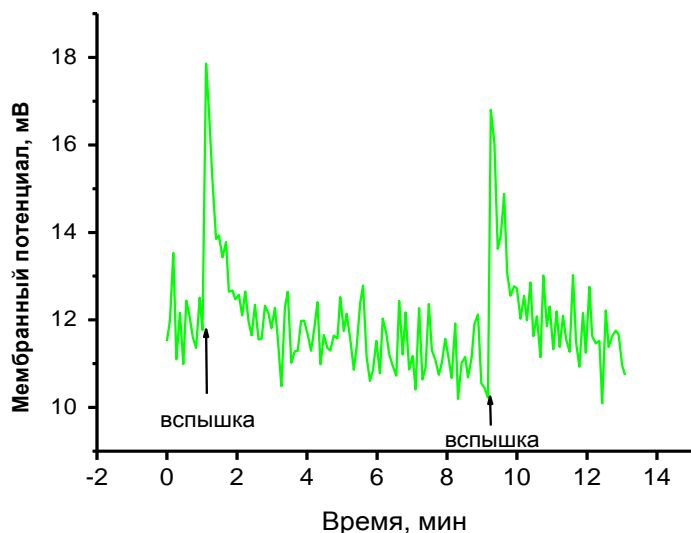


Рис. 3. Изменения мембранного потенциала БЛМ без адсорбированных мембранных фрагментов, вызванные фотолизом MNPS. Состав раствора (мМ): 12 NMG, 10  $MgCl_2$ , 10 РСР, рН 7.4. Моменты вспышки света отмечены стрелкой.

Если контрольные опыты проводили на чистой БЛМ в отсутствие протонофоров и без адсорбированных мембранных фрагментов с  $Na^+, K^+$ -АТФазой, то после вспышки света происходили изменения емкости мембраны (рис. 4), которые не зависели от частоты.

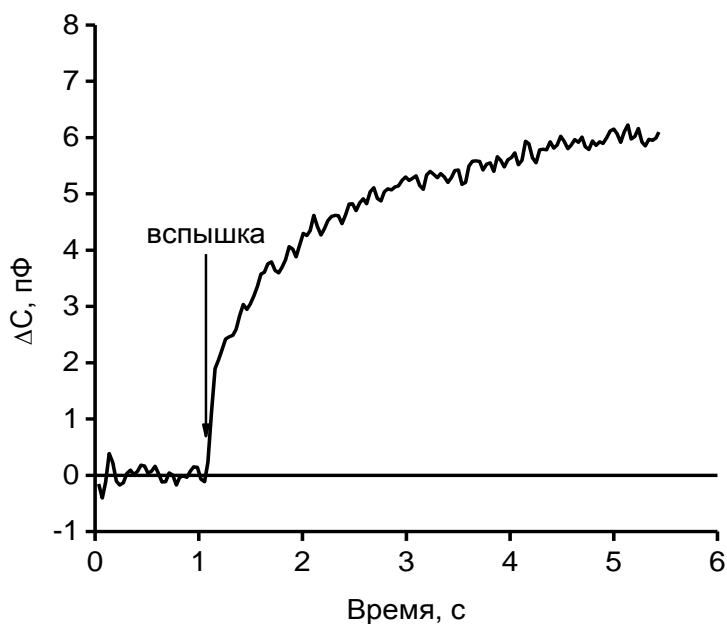


Рис. 4. Изменения емкости БЛМ без адсорбированных МФ вследствие фотолиза MNPS. Мембрана сформирована из дифитаноилфосфатидилхолина. Состав раствора – 0.05 мМ EPPS, 100 мМ NaCl.

Эти изменения емкости могли быть вызваны как изменением pH, так и изменением электростатического потенциала липидной мембраны, если предположить, что молекулы Caged- $H^+$  могут адсорбироваться на поверхности БЛМ. Изменение электростатического потенциала после вспышки света может происходить из-за изменения заряда мембраны либо вследствие диссоциации сульфогрупп, освобождающихся при фотолизе Caged- $H^+$ , либо из-за десорбции продуктов фотолиза, либо из-за протонирования фосфолипидов при изменении pH. Изменение электростатического потенциала может приводить к изменению емкости мембраны из-за того, что это приводит к изменению электрического поля внутри мембраны, из-за которого может произойти сжатие мембраны («электрострикция»).

Медленные изменения граничного потенциала при адсорбции и фотолизе Caged- $H^+$  изучались методом компенсации внутримембранного поля (КВП) с помощью второй гармоники емкостного тока. Как видно из рис. 5, добавка MNPS в один из отсеков ячейки приводила к изменению граничного потенциала мембраны примерно на -5 мВ. Знак этого изменения потенциала соответствует появлению на поверхности мембраны отрицательного поверхностного заряда, что можно объяснить адсорбцией на БЛМ отрицательно заряженных молекул MNPS. При освещении мембраны

постоянным светом разность граничных потенциалов изменялась, и, проходя через ноль, достигала положительных значений (примерно 5 мВ). Эти изменения нельзя объяснить только разрушением адсорбированного на поверхности БЛМ MNPS, поскольку в этом случае освещение приводило бы только к исчезновению скачка потенциала, вызванного адсорбцией MNPS, а в эксперименте изменения потенциала были больше по величине. Поэтому изменение потенциала, по-видимому, вызвано не только разрушением MNPS на поверхности мембраны, но и другим процессом, связанным с изменением pH. Наиболее вероятным процессом, который может дать увеличение граничного потенциала до положительных значений, является протонирование фосфолипидов мембраны. Для того, чтобы проверить роль изменения pH, в том же опыте в раствор добавили буфер. Увеличение буферной емкости раствора почти на порядок (1.6 против 0.2 мМ TRIS) вызывало уменьшение изменения потенциала при освещении - теперь он возвращался к значению, установившемуся до адсорбции MNPS, и перезарядки потенциала не происходило. И в этом случае изменение граничного потенциала было обратимым (рис. 5). Столь сильное увеличение буферной емкости раствора должно сильно уменьшать скачок pH, вызванный фотолизом Caged-H<sup>+</sup>. Поскольку после добавки дополнительного буфера освещение лишь возвращало потенциал к нулю (то есть к значению, измеренному до добавки MNPS), весьма вероятно, что в этих условиях изменение потенциала вызвано только разрушением молекул MNPS на мембране. Увеличение ионной силы раствора с помощью добавления в оба отсека ячейки KCl не приводило к заметному влиянию на изменение потенциала при освещении. Это может свидетельствовать о том, что изменение граничного потенциала при адсорбции MNPS происходит не из-за изменения поверхностного заряда мембраны. Возможно, при этом происходит изменение дипольного потенциала, или заряженные молекулы расположены не на поверхности мембраны, а погружены внутрь нее (Sokolov and Mirsky, 2004).

Таким образом, изменение потенциала при освещении в общем случае вызвано обеими причинами: и разрушением молекул MNPS на поверхности мембраны, и протонированием липидов из-за изменения pH. Протонирование вызывает появление положительного изменения потенциала, которое подавляется при увеличении буферной емкости раствора.

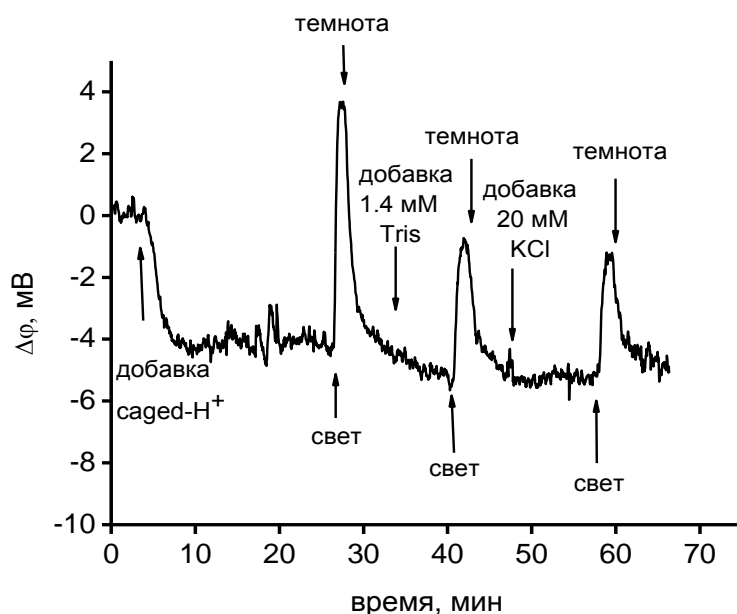


Рис. 5. Изменение разности граничных потенциалов БЛМ при добавлении в один из отсеков 300 мкМ MNPSNa и освещении постоянным светом 375 нм от ультрафиолетового светодиода LED-003W (Тайвань). Моменты добавления веществ в ячейку и освещения отмечены стрелками. Состав раствора – 0.2 мМ TRIS, 10 мМ KCl, pH=8.

Таким образом, на БЛМ в отсутствие  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы обнаружены значительные изменения емкости при фотолизе Caged- $\text{H}^+$ . Это осложняет использование Caged- $\text{H}^+$  для изучения  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Вообще говоря, в литературе отмечались похожие проблемы в электрофизиологических исследованиях, когда приходилось выделять электрический сигнал, вызванный ионным транспортом в  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазе, на фоне сигналов, создаваемых другими белками. Стандартный способ выделения электрических сигналов, вызванных функционированием  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, состоял в использовании процедуры вычитания сигналов, полученных с работающим белком и после его ингибирования (Nakao et al., 1986). В нашем случае использовался другой подход, в котором предполагалась конкуренция ионов натрия и протонов за места связывания в белке. Если такая конкуренция имеется, добавка ионов натрия должна подавлять приращения емкости, вызванные протонным транспортом в  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазе, поскольку часть сайтов связывания будет при этом занята натрием. Наибольший эффект следует ожидать при концентрации ионов натрия, превышающей концентрацию полунасыщения мест связывания в  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазе. Полунасыщение цитоплазматических сайтов связывания ионов натрия происходит при их

концентрации в растворе около 4 мМ (Schneeberger et al.,1999; Schneeberger et al.,2001). Поэтому мы полагали, что в присутствии 10 мМ  $\text{Na}^+$  в растворе большинство мест связывания ионов должно быть занято, и приращения емкости и проводимости, вызванные перемещением протонов в цитоплазматическом канале доступа, должны значительно подавляться.

Контрольный эксперимент, проведенный без  $\text{Na}^+$  и после добавки  $\text{Na}^+$  на БЛМ без адсорбированных МФ, не выявил заметной разницы между изменением емкости с натрием и без натрия в интересующем нас диапазоне концентраций 0-10 мМ на всех частотах переменного напряжения. Зато в присутствии  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы эффект ионов натрия был значительно сильнее (данные не приведены).

### 3.2.2.Опыты с $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой

Опыты были проведены при  $\text{pH}=7.4$  в области частот от 2 до 1024 Гц. После записи частотной зависимости в каждом эксперименте добавлялся  $\text{NaCl}$  в концентрации 4 мМ, после чего записывалась еще одна частотная зависимость (с  $\text{Na}^+$ ). Полученные частотные зависимости приведены на рисунке 6.

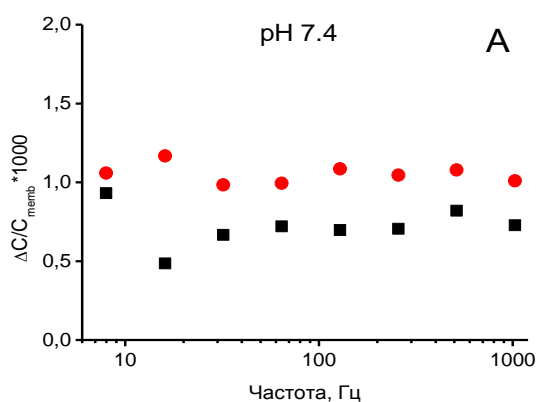


Рис. 6. Зависимости от частоты приращений емкости, вызванных закислением среды при фотолизе  $\text{MNPSNa}$  на мембране с адсорбированными МФ с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой в среде без  $\text{NaCl}$  (квадраты) и после добавления 4 мМ  $\text{NaCl}$  (кружки) при  $\text{pH}=7.4$ . Состав раствора – 12 мМ  $\text{NMG}$ , 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.14 мМ ЭДТА.

Приращения емкости были положительны и не зависели от частоты. При наличии  $\text{Na}^+$  приращения емкости на всех частотах были несколько выше, чем в безнатриевой среде (на самом деле, в отсутствие  $\text{NaCl}$  концентрация ионов натрия не равнялась нулю, а составляла около 0.3 мМ из-за того, что использовалась натриевая соль  $\text{Caged-H}^+$ ).



Отсутствие частотной зависимости в диапазоне до 1000 Гц говорит о том, что характерная частота, при которой может происходить спад емкости, достаточно высока (выше 1000 Гц). Этим данные частотные зависимости существенно отличаются от зависимостей, полученных при измерениях приращений емкости, вызванных освобождением АТФ (Sokolov et al, 2008, а также рис. 1-2). В случае транспорта третьего иона натрия во внеклеточном канале доступа низкую скорость процесса связывали с тем, что этот транспорт сопряжен с конформационным переходом  $E_1$ - $E_2$ . Мы показали, что в случае протонного транспорта эта скорость значительно выше, откуда можно сделать вывод, что конформационного перехода  $E_1$ - $E_2$ , связанного с таким транспортом, нет. Перемещение третьего иона натрия в цитоплазматическом канале доступа, согласно Sokolov, 2008, приводит к изменению емкости, зависящему от частоты, причем характерная частота, при которой происходит уменьшение приращения емкости в 2 раза, составляла примерно 600 Гц. Поскольку транспорт осуществляется в конформации  $E_1$ , авторы связывали не очень высокую скорость переноса третьего натрия с существованием потенциального барьера для него в канале доступа. Возможная более высокая скорость транспорта протона может быть объяснена либо его малыми размерами, позволяющими ему переноситься из цитоплазмы к сайтам связывания несколько иным путем с меньшими потенциальными барьерами в канале доступа, либо принципиально иным механизмом переноса, например, механизмом Гротхуса.

В дальнейших экспериментах, для более подробного исследования влияния ионов натрия на приращение емкости, вызванное скачком рН, были проведены эксперименты, в которых измерения проводились на одной частоте (64 Гц) при постепенном повышении концентрации ионов натрия (рис. 7).

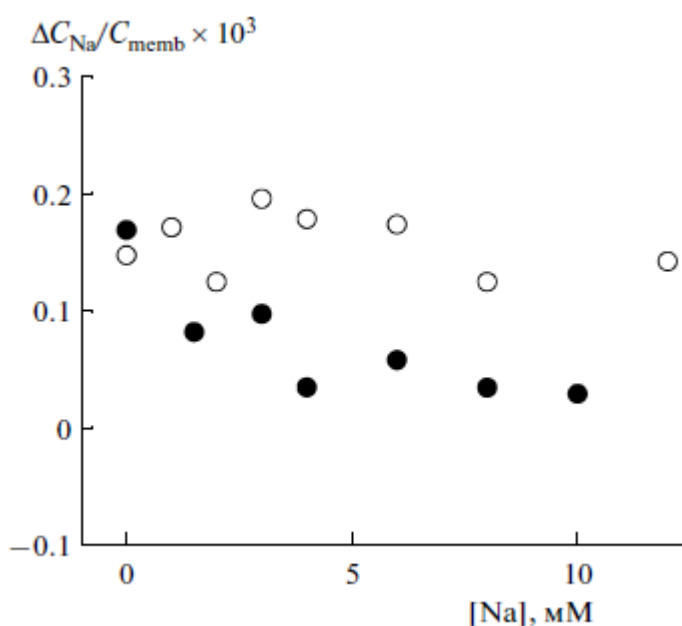


Рис. 7. Приращения емкости, вызванные фотолизом MNPS, на частоте 64 Гц при разных концентрациях ионов натрия в присутствии (светлые точки) и в отсутствие (темные точки) 10 мкМ ванадата. Состав раствора – 12 мМ NMG, 0.14 мМ EDTA, pH 8.

Этот эффект ионов натрия определяется функционированием  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, что подтверждают контрольные опыты по ингибированию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы ванадатом. Известно, что ванадат ингибирует электрогенный транспорт натрия в цитоплазматическом канале  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы (Pintschovius et al., 1999). В присутствии этого ингибитора влияние ионов натрия на приращения емкости при фотолизе Caged- $\text{H}^+$  было незначительным, и в пределах точности измерений им можно пренебречь (рис. 7).

Эксперименты по влиянию ионов натрия на изменение емкости на мембране с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой при скачке pH были проведены при нескольких значениях начального pH (от 7 до 8). При всех значениях pH приращения емкости выходили на плато при концентрации  $\text{Na}^+$  3-4 мМ. Количественный эффект ионов натрия на изменение емкости при частоте 64 Гц и всех значениях pH определяли как разность между значениями на плато и при 0 мМ  $\text{Na}^+$ . На рис. 8 приведена зависимость этой разности от pH, нормированной на начальное значение емкости мембраны (поскольку емкость пропорциональна площади бислоя, это аналогично нормировке на площадь). Как видно из рис. 8, зависимость эффекта ионов натрия от pH имеет немонотонный вид. При низких значениях pH эффект ионов натрия был положительным (при введении NaCl приращения емкости, вызванные фотолизом Caged- $\text{H}^+$ ,

увеличиваются), а при высоких рН эффект становится отрицательным (т.е. приращения емкости в присутствии NaCl уменьшаются).

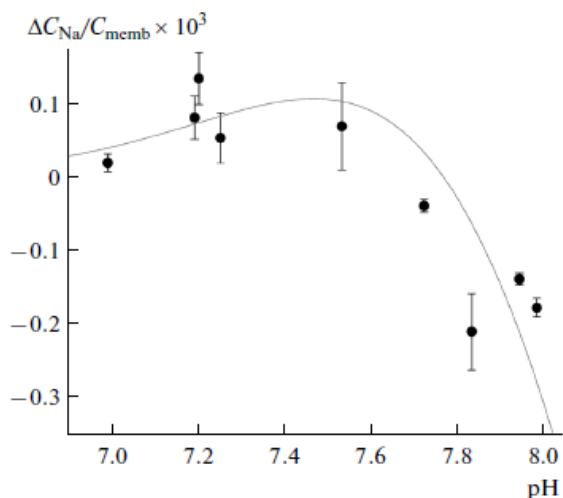


Рис. 8. Зависимость от рН разницы приращений емкости БЛМ с адсорбированными МФ вследствие фотолиза MNPS Na при наличии NaCl (4–10 мМ) и в его отсутствии. Состав раствора – 12 мМ NMG, 0.14 мМ EDTA. Сплошная линия – теоретическая зависимость, построенная по уравнению (12) со значениями параметров, указанными в тексте.

Объяснить полученные результаты можно с помощью модели конкурентного транспорта ионов натрия и протонов в цитоплазматическом канале  $Na^+, K^+$ -АТФазы. Эта модель представляет собой расширение модели, предложенной в (Sokolov et al, 2008) для описания электрогенного транспорта ионов натрия, в которой рассматривался транспорт только того иона натрия, который связывается в III, специфичном для него, сайте. Согласно опубликованным данным, I и II сайты связывания  $Na^+$  отрицательно заряжены и способны связывать не только ионы натрия, но и протоны. Для простоты будем считать их одинаковыми. В любом из них находится или ион натрия, или протон. При этом не важно, связываются ли протоны и конкурирующие ионы действительно в одних и тех же местах, достаточно условия, что они связываются на дне одного и того же канала доступа, и одновременно там могут находиться либо протоны, либо конкурирующие с ними ионы. Приведенные ниже уравнения получены для предельного случая низкой частоты приложенного переменного напряжения, в котором предполагается равновесие ионов между раствором и центрами связывания.

Суммарный заряд сайта связывания будет равен нулю. Тогда электрические токи, вызванные перемещением ионов в канале, можно связать с изменением плотности

свободных, т.е. отрицательно заряженных сайтов связывания. Из уравнения баланса 3-х альтернативных состояний сайтов («пустых», занятых  $\text{Na}^+$  и занятых  $\text{H}^+$ ), а также того, что концентрация ионов на дне канала соответствует распределению Больцмана по падающему в нем напряжению, можно получить выражение для заряда сайтов связывания:

$$Q = \frac{Ne}{1 + \bar{Na} \exp(-\alpha\beta\varphi) + \bar{H} \exp(-\alpha\beta\varphi)} \quad (1),$$

где  $\text{Na} = [\text{Na}^+]/K_{\text{Na}}$ ,  $\text{H} = [\text{H}^+]/K_{\text{H}}$  (отношение концентраций ионов натрия и протонов в растворе к соответствующим константам полунасыщения сайтов связывания),  $\varphi$  - приложенное к мембране напряжение,  $\alpha\varphi$  - та его часть, которая падает в канале,  $\beta = e/kT$ ,  $N$  - общее число  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаз.

Зависимость емкости от приложенного напряжения согласно определению емкости в дифференциальной форме будет равна производной (1) по потенциалу. Кроме того, напряжение, прикладываемое к мембране во время эксперимента, невелико, поэтому член  $\exp(-\alpha\beta\varphi)$  в уравнении можно принять равным 1. С учетом этого получим следующее выражение для емкости:

$$C = \frac{N\alpha^2 e^2 [\bar{Na} + \bar{H}]}{kT[1 + \bar{Na} + \bar{H}]^2}. \quad (2)$$

В опытах с Caged- $\text{H}^+$  мы регистрируем приращения емкости, вызванные быстрым закислением среды, которые пропорциональны производной по  $[\text{H}^+]$  уравнения 2.

$$\frac{dC}{d\bar{H}} = \frac{N\alpha^2 e^2 [1 - \bar{Na} - \bar{H}]}{kT[1 + \bar{Na} + \bar{H}]^3}. \quad (3)$$

Кроме того, как говорилось выше, значительные приращения емкости наблюдались и в контрольных опытах без  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы. То, что эти приращения не зависели от концентрации  $\text{Na}^+$ , позволило избавиться от них путем вычитания зависимостей при данной и нулевой концентрациях  $\text{Na}^+$ :

$$\frac{dC}{d\bar{H}} = \frac{N\alpha^2 e^2 [1 - \bar{Na} - \bar{H}]}{kT[1 + \bar{Na} + \bar{H}]^3} - \frac{N\alpha^2 e^2 [1 - \bar{H}]}{kT[1 + \bar{H}]^3} \quad (4)$$

Из рисунка 8 видно, что добавка ионов натрия, в зависимости от исходных концентраций ионов натрия и рН, может давать эффект разного знака. Для приближения теоретической кривой к экспериментальным данным проведено фитирование параметров методом наименьшего среднеквадратичного отклонения. В

результате построена теоретическая кривая на рис. 8 по уравнению (17) со следующими значениями параметров:  $pK = 7.6$ ,  $[Na]/K_{Na} = 10$ . Тот факт, что она удовлетворительно описывает экспериментальные данные, означает, что по крайней мере для одного сайта связывания протона, величина  $pK$  составляет около 7.6. Более точное определение  $K_{Na}$  будет проведено в следующем разделе.

### 3.2.2.1. Определение констант связывания $Na^+$ и $K^+$ в цитоплазматических сайтах $Na^+, K^+$ -АТФазы

С помощью приведенной выше методики можно также определить константу связывания ионов, конкурирующих с протонами за сайты связывания в белке. Для этого проведены количественные исследования зависимости изменений емкости, вызванных фотолизом Caged- $H^+$ , от концентрации ионов натрия. Для определения констант диссоциаций использовалась рассмотренная выше модель конкурентного связывания ионов натрия и протонов. Поскольку цитоплазматические сайты связывания ионов калия почти совпадают с аналогичными сайтами связывания I и II ионов калия, можно предполагать, что протоны конкурируют за связывание и с ними. Та же модель была применена и для описания транспорта ионов калия в цитоплазматическом канале доступа.

На рисунке 9 показаны приращения емкости, вызванные фотолизом Caged- $H^+$ , нормированные на приращения емкости, измеренные при нулевой концентрации ионов натрия и калия соответственно.

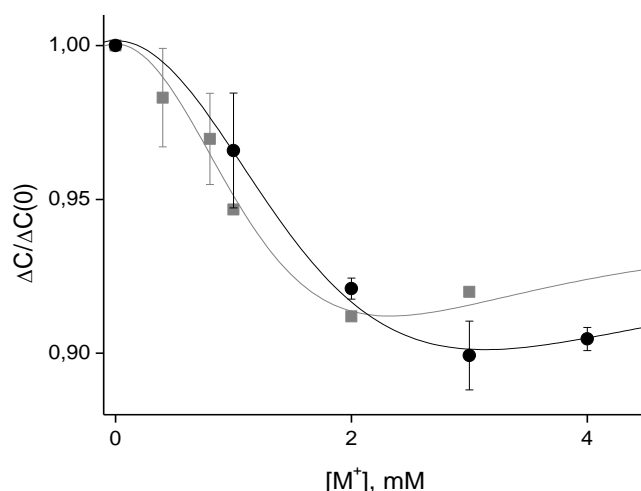


Рис. 9. Натриевый (черные кружки) и калиевый (серые квадраты) эффекты на приращения емкости. Состав раствора – 12 mM NMG, 0.14 mM ЭДТА, pH=7.2, pK=7.

Если аппроксимировать полученные зависимости с помощью уравнения (3), то наблюдается систематическое отклонение экспериментальных точек и теоретических кривых. Существенно приблизить кривые к экспериментальным зависимостям удалось, предположив, что связывание ионов в сайтах  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы происходит кооперативно. В этом случае уравнение (3), с учетом нормировки на приращения емкости при нулевой концентрации  $\text{Na}^+$ , модифицируется к виду:

$$\frac{\frac{dC}{dH}(Na)}{\frac{dC}{dH}(0)} = \frac{\left( \frac{1 - \overline{Na}^n - \overline{H}}{1 + \overline{Na}^n + \overline{H}} \right)^3 + C_0}{\left( \frac{1 - \overline{H}}{1 + \overline{H}} \right)^3 + C_0} \quad (5),$$

где  $n$  – коэффициент кооперативности,  $C_0$  – постоянная составляющая (т. е. приращения емкости, не связанные с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой). Эта функция аппроксимировала экспериментальные данные гораздо лучше, чем уравнение (3). В результате были получены следующие значения параметров: коэффициент кооперативности для  $\text{Na}^+$ :  $n_{\text{Na}}=2$ , равновесная константа полунасыщения (константа диссоциации)  $\text{Na}^+$   $K_{\text{Na}}=2.6$  мМ. Аналогичные предположения о кооперативности связывания ионов натрия в  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазе было сделано при анализе связывания ионов натрия с цитоплазматической стороны белка с помощью флуоресцентных зондов (Schneeberger et al, 1999; Schneeberger et al, 2001). Для  $\text{K}^+$  же были получены параметры  $n_{\text{K}}=2$ , равновесная константа полунасыщения  $\text{K}^+$   $K_{\text{K}}=1.9$  мМ.  $n$ , равная 2, говорит о кооперативном связывании 2 ионов калия.

Обращает на себя внимание то, что амплитуда натриевого и калиевого (разница приращений емкости в точке минимума и при нулевой концентрации) эффектов на приращения емкости, нормированные на приращения емкости при нулевой концентрации соответствующего иона, почти одинаковы. Таким образом, занятость сайтов связывания ионами калия дает тот же эффект, что и ионами натрия. Это свидетельствует о том, что диэлектрические коэффициенты при электрогенном связывании ионов натрия и калия близки друг к другу, а значит, и положения мест связывания ионов натрия и калия близки. Из рентгеноструктурных данных известно, что I и II сайты связывания ионов  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  примерно совпадают. Тогда полученные нами данные указывают, что протоны, конкурирующие с  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , связываются

только в I и II сайтах  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Альтернативами являются: разрушение III сайта  $\text{Na}^+$  при связывании в I и II сайтах  $\text{K}^+$ , либо возможность иона натрия находиться в III сайте, когда в нем есть протон.

### 3.2.2.2. Зависимость связывания $\text{Na}^+$ в цитоплазматических сайтах от концентрации $\text{Mg}^{2+}$ .

Из литературы известно, что константа связывания  $\text{Na}^+$  в цитоплазматических сайтах сильно зависит от концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  (Glynn, 1985; Schwappach, 1994; Schneeberger, 1999; Schneeberger, 2001).

Представляло интерес проверить эффект ионов магния на конкурентное связывание ионов с помощью нашего метода. В этой связи были проведены 3 серии опытов, в которых приращения адмиттанса измерялись при постепенно повышающейся концентрации  $\text{Na}^+$  на низкой частоте (64 Гц) сначала в отсутствие ионов магния, а затем в присутствии 5 и 10 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  (рис. 10).

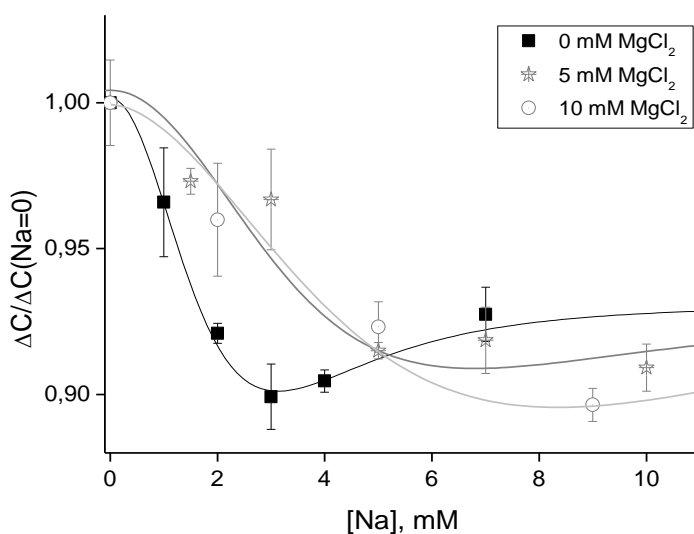


Рис. 10. Зависимости от концентрации ионов натрия приращений емкости, вызванных фотолизом Caged- $\text{H}^+$ , при разных концентрациях ионов магния. Состав раствора – 12 мМ NMG, 0.14 мМ ЭДТА, pH=7.2. Теоретические кривые построена по уравнению (18) с параметрами  $K_{\text{Na}}=2.6$  мМ,  $n=2$ ,  $pK=7$  (черная кривая),  $K_{\text{Na}}=5.6$  мМ,  $n=2$ ,  $pK=7$  (серая кривая),  $K_{\text{Na}}=7.4$  мМ,  $n=1.8$ ,  $pK=7$  (светло-серая кривая).

Во всех опытах приращения емкости при повышении концентрации  $\text{Na}^+$  уменьшались, причем в присутствии 5-10 мМ ионов магния спад происходил

медленнее. Амплитуда натриевого эффекта на приращения емкости (т. е. разница приращений на плато и при нулевой концентрации ионов натрия) при рассмотренных концентрациях ионов магния практически не отличалась. Этот факт говорит, по-видимому, об отсутствии конкуренции между  $\text{Na}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$  за трансмембранные сайты связывания, что находится в согласии с работой (Apell and Karlsh, 2001), в которой предполагается, что  $\text{Mg}^{2+}$  связывается на цитоплазматической петле L6/7.

Зависимости на рис. 10 удалось аппроксимировать функциями, аналогичными (5):

$$\frac{\frac{dC}{dH}(Na)}{\frac{dC}{dH}(0)} = \frac{\frac{(1 - \overline{Na}^n - \overline{H})}{(1 + \overline{Na}^n + \overline{H})^3} + C_0}{\frac{(1 - \overline{H})}{(1 + \overline{H})^3} + C_0} \quad (6),$$

но с другими параметрами  $K_{\text{Na}}$  и  $n$ .

Согласно полученным данным,  $K_{\text{Na}}$  растет при повышении концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и составляет 2.6, 5.6 и 7.4 мМ при концентрациях ионов магния 0, 5 и 10 мМ соответственно. Полученные значения  $K_{\text{Na}}$  находятся в хорошем соответствии с работой Schneeberger, 1999: 0.4 мМ в отсутствие  $\text{Mg}^{2+}$ , 4.5 мМ при 5 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  и 7 мМ при 10 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ . Коэффициент кооперативности существенно не менялся и составляет 2, 2 и 1.8 для 0, 5 и 10 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  соответственно, что также хорошо согласуется с данными, полученными в работе Schneeberger, 1999 – 1.9 независимо от концентрации ионов магния.

## **Выводы**

1. Зарегистрированы приращения емкости мембраны с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой, вызванные освобождением АТФ в среде, не содержащей ионов натрия и калия Их знак и зависимость от частоты переменного напряжения, а также тот факт, что эти приращения подавляются ингибиторами  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, указывает на то, что в этих условиях происходит транспорт протонов и конформационный переход белка  $E_1/E_2$ .

2. Обнаружены значительные приращения емкости БЛМ как с адсорбированными мембранными фрагментами, так и в отсутствие мембранных фрагментов, вызванные быстрым закислением среды при фотолизе Caged- $\text{H}^+$ . В последнем случае вероятными причинами приращений емкости, могут быть



изменение поверхностного заряда мембраны из-за диссоциации сульфата или разрушения адсорбированных молекул Caged- $H^+$ , либо изменение диэлектрической постоянной мембраны из-за протонирования фосфолипидов.

3. На изменение емкости мембраны с  $Na^+,K^+$ -АТФазой, вызванные закислением среды при фотолизе Caged- $H^+$ , влияют ионы натрия и калия, что объясняется их конкуренцией с протонами в ион-связывающих сайтах  $Na^+,K^+$ -АТФазы в  $E_1$ -конформации. Зависимость натриевого эффекта от исходного рН раствора позволила оценить значение рК центра связывания, которое составило около 7.6.

4. Амплитуды натриевого и калиевого эффектов на приращение емкости, вызванные фотолизом Caged- $H^+$ , оказались практически одинаковыми, что говорит о том, что конкуренция между  $Na^+$ ,  $K^+$  и  $H^+$  происходит за одни и те же (I и II) сайты связывания  $Na^+/K^+$ .

5. Зависимости изменений приращений емкости, вызванных фотолизом Caged- $H^+$ , от концентрации ионов натрия и калия позволили определить константы их связывания (2.6 и 1.9 мМ, соответственно) и коэффициенты кооперативности (около 2 в обоих случаях) с цитоплазматической стороны белка.

6. На связывание ионов натрия в сайтах связывания с цитоплазматической стороны оказывают влияние ионы магния. В присутствии ионов магния увеличивается константа диссоциации ионов натрия (до 7.4 мМ при 10 мМ  $Mg^{2+}$ ), но практически не изменяются ни амплитуда натриевого эффекта на приращение емкости (что говорит об отсутствии конкуренции между ионами натрия и магния за цитоплазматические сайты связывания), ни коэффициент кооперативности связывания ионов натрия.

7. Характерная частота частотной зависимости приращения емкости при фотолизе Caged- $H^+$  (1000 Гц) значительно превышает характерные частоты АТФ-зависимых приращений емкости, (20-100 Гц), что говорит о том, что при связывании ионов в цитоплазматических сайтах  $Na^+,K^+$ -АТФазы не происходит конформационного перехода  $E_1-E_2$ .

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Гришанин, К.О., В.Ю.Ташкин, А.А.Ленц, Х.-Ю.Апель, В.С.Соколов. О возможном участии протонов в функционировании  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. // Биологические мембраны. 2010. Т. 27. С. 512-518.
2. Ташкин, В.Ю., А.А.Щербаков, Х.-Ю.Апель, В.С.Соколов. Конкурентный транспорт ионов натрия и протонов в цитоплазматическом канале  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. // Биологические мембраны 2013. Т. 30. С. 1-9.

### Тезисы докладов

1. Grishanin, K. O., Tashkin, V., Sokolov, V. S., Apell, H.-J. Involvement of protons into ion transport cycle of  $\text{Na}, \text{K}$ -ATP-ase. // 9th International Frumkin Symposium "Electrochemical Technologies and Materials for 21st Century". Moscow. 2010. Сборник тезисов. С. 265.
2. Ташкин, В. Ю. и Соколов, В. С. Конкурентный транспорт ионов натрия и протонов  $\text{Na}, \text{K}$ -АТФазой. // IV Съезд Биофизиков России, Нижний Новгород, Нижегородский государственный университет им. НИ. Лобачевского, 20-26 августа 2012 г. Материалы докладов. Т. 1. С. 288.
3. Tashkin, V., Shcherbakov, A. A., Apell, H.-J., Sokolov, V. S. The Competitive Electrogenic Binding of Sodium Ions and Protons at the Cytoplasmic Side of  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase. //  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase and Related Transport ATPases: Structure, Mechanism, Cell Biology, Health and Disease. Lunteren, Netherlands. 2014. Сборник тезисов. С. 125.