

Ionenbindung an die Na,K-ATPase

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Konstanz, Fachbereich Biologie

vorgelegt von

Anne Schneeberger

aus München

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 2000; Referenten: Prof. Dr. H-J. Apell, Prof. Dr. W. Welte

Konstanz 2000

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Publikationsliste	6
Einleitung	7
1. Struktur und Funktion der Zellmembran und ihrer Komponenten	7
2. Aufbau der Na,K-ATPase	8
3. Reaktionszyklus der Na,K-ATPase	15
4. Zielsetzung der Arbeit	18
Material und Methoden	20
1. Präparation und Reinigung von Na,K-ATPase-enthaltenden Membranfragmenten	20
2. Proteolytischer Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin	21
3. Fluoreszenzfarbstoffe und Meßaufbau	23
3.1 Kovalente Modifikation der Na,K-ATPase mit FITC	23
3.2 Fluoreszenzmessungen	23
3.3 Mechanismus des Fluoreszenzfarbstoffs RH 421	24
3.4 Mechanismus des kovalenten Markers FITC	26
4. Auswertungsverfahren	28
5. Fit- und Simulationsprogramme und Routinen	28
6. Chemikalien	29
Ergebnisse	30
1. Untersuchungen der proteolytisch verdauten Na,K-ATPase-Präparationen	30
1.1 Charakterisierung der Membranpräparationen und Bindung der Herz-	

glycoside Ouabain und Strophantidin	30
1.2 Na-Bindung und Na/Mg-Kompetition	32
2. Vergleich zwischen Messungen mit RH 421 und FITC	37
3. Kompetition zwischen Natrium und ein- bis dreiwertigen Ionen	43
3.1 Einfach positiv geladene Ionen	43
3.1.1 Alkalimetalle	43
3.1.2 Na/K-Kompetition	44
3.1.3 Cholinchlorid	46
3.2 Zweifach positiv geladene Ionen	46
3.2.1 Erdalkalimetalle	46
3.2.2 Mg-Effekt und Na/Mg-Kompetition	48
3.3 Wirkung von Nukleotiden auf Na-Bindung und Mg-Effekt	55
3.4 Dreifach positiv geladene Ionen: Br ² -TITU	56
4. Modelle und Simulationen	58
Diskussion	63
1. Untersuchungen der proteolytisch verdauten Na,K-ATPase-Präparationen	63
2. Vergleich zwischen Messungen mit RH 421 und FITC	69
3. Kompetition zwischen Na und ein- bis dreiwertigen Ionen	72
Anhang	79
Literaturverzeichnis	96
Danksagung	111

Zusammenfassung

Gegenstand der Untersuchungen dieser Doktorarbeit war die Ionenbindung an die Na,K-ATPase auf der dem Cytoplasma zugewandten Seite. Die Experimente wurden an planaren Membranscheibchen, die die Pumpenmoleküle in hoher Dichte enthalten, durchgeführt.

I) Durch den Verdau mit dem proteolytischen Enzym Trypsin wurden die cytoplasmatischen (katalytischen) Anteile der Pumpe abgeschnitten, wobei etwa die Hälfte der Enzymmasse verlorengeht. An dieser Präparation (genannt 19kD-Membranen) wurden fluorimetrische Messungen mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff RH 421 durchgeführt.

Die Untersuchungen an den 19kD-Membranen ergaben, daß die Affinität der Ionenpumpe für K^+ (Rb^+) durch den Verdau nicht verändert wurde, und die Affinität für Na^+ nur moderat abgenommen hatte. Damit stellen die 19kD-Membranen ein gutes Modellsystem dar, um die Ionenbindung an die cytoplasmatischen Bindungsstellen unbeeinflußt von Vorgängen an der enzymatisch aktiven Domäne zu untersuchen.

Durch den Verdau deutlich verändert war jedoch die Konkurrenz von Na^+ mit Mg^{2+} : Statt der komplexen Charakteristik der Konkurrenz von Na^+ mit Mg^{2+} beim nativen Enzym zeigten die 19kD-Membranen nur eine lineare Charakteristik mit geringer Steigung. Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Die Na,K-ATPase verfügt (im nativen Zustand) über mindestens zwei Bindungsstellen für Mg^{2+} : Mg^{2+} kann an den Ionenbindungsstellen kompetieren und an eine allosterische Bindungsstelle binden; beide Vorgänge führten zu einer Abnahme der apparenten Affinität für Na^+ . Bei den 19kD-Membranen ist die allosterische Bindungsstelle nicht mehr vorhanden; möglicherweise handelt es sich dabei um die ATP-Bindungsregion auf dem cytoplasmatischen Part des Proteins.

Mg-Ionen hatten nur noch eine sehr geringe Affinität zu den Ionenbindungsstellen der 19kD-Membranen (im Gegensatz zum nativen Enzym). Dies ist ein Hinweis darauf, daß hier eine Aufweitung des Bindungskäfigs stattgefunden hat. Außerdem spricht dieser Befund dafür, daß die Ionenbindung keinesfalls nur durch die negativen Ladungen beispielsweise von Aspartylseitenketten vermittelt wird, sondern auch ungeladene, Dipole enthaltende Gruppen beteiligt sein müssen.

II) Die 19kD-Membranen können mit Hilfe von Chymotrypsin weiter verdaut werden, wobei nur wenige Aminosäuren auf der cytoplasmatischen Seite der α - und β -Untereinheit abgeschnitten werden. Dennoch hatte diese Proteolyse gravierende Folgen für die Ionenbindung:

Während die Affinität für K^+ (Rb^+) weiterhin unverändert war, hatte die Affinität für Na^+ und Na-Analoga deutlich abgenommen. Dies bedeutet, daß der durch den Verdau abgetrennte cytoplasmatische N-Terminus der β -Untereinheit eine wichtige Rolle bei der Na-Bindung spielt, höchstwahrscheinlich interagiert er mit der α -Untereinheit, und beide zusammen bilden möglicherweise einen Zugangskanal zu den Ionenbindungsstellen.

III) Übergänge zwischen den Hauptkonformationen E_1 und E_2 der Na,K-ATPase können mit konformationssensitiven Farbstoffen, z. B. mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) beobachtet werden. Ausgehend von der Konformation $E_2(K_2)$ kann man die cytoplasmatische Na-Bindung mit diesem Farbstoff messen, da der Übergang $E_2(K_2) \rightarrow Na_3E_1$ einen Konformationswechsel enthält.

Aufgrund sehr rauscharmer Messungen und eines verfeinerten Auswertungsverfahrens konnte beim Übergang $E_1 \rightarrow Na_3E_1$ ebenfalls eine Fluoreszenzänderung nachgewiesen werden, obwohl das Enzym dabei seine Hauptkonformation nicht wechselt.

Auf identische Weise durchgeführte Messungen mit RH 421 zeigten, daß die mit den verschiedenen Fluoreszenzmarkern ermittelten Affinitäten für Na^+ gleich waren. Auch die Konkurrenz zwischen Na^+ und Mg^{2+} führte bei der Verwendung beider Meßsonden zu identischen (erhöhten) Werten für die apparente Na-Affinität.

Da man annimmt, daß RH 421 die Bindung des dritten Na-Ions anzeigt, wurde die Na-induzierte Fluoreszenzänderung von FITC dem Übergang $Na_2E_1 \rightarrow Na_3E_1$ zugeordnet. Die damit verbundene strukturelle Umlagerung im Protein spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Kopplung von enzymatischer und Transportfunktion der Pumpe: Der Vergleich zwischen den FITC- und RH 421-Messungen führt zu dem Schluß, daß die Bindung des dritten Na-Ions zu einem Rearrangement eines oder mehrerer Segmente des transmembranären Parts der Pumpe führt, und daß diese strukturelle Veränderung zum cytoplasmatischen Teil mit der ATP-Bindestelle weitergeleitet wird. Diese konformationelle Änderung könnte dann als Trigger für die Phosphorylierung durch ATP wirken. Durch diesen Mechanismus wäre die Na,K-ATPase in der Lage, unter physiologischen Bedingungen immer die Stöchiometrie $3 Na^+ / 2 K^+ / 1 ATP$ einzuhalten.

IV) Am nativen Enzym wurde die Konkurrenz zwischen Na^+ und einer Reihe ein- bis dreifach geladener Kationen und Na-Analoga untersucht.

Alle eingesetzten Ionen waren in der Lage, mit Na^+ zu konkurrieren, aber keines konnte elektrogen an die neutrale Bindestelle binden. Daher binden diese Ionen wohl an die beiden geladenen Bindungsstellen.

Vergleiche zwischen den Affinitäten der Pumpe für verschiedene einfach positiv geladene Ionen lassen den Schluß zu, daß die Bindungstasche für das die Affinität bestimmende Ion einen Durchmesser von weniger als 3,6 Å hat, und so einem 3 Å großen Ion optimale Bedingungen zur Bindung bietet.

Experimente zur Na-Bindung bei verschiedenen Cholinchloridkonzentrationen zeigten, daß die Pumpe für das Einnehmen ihrer optimalen nativen Konformation auf eine Ionenstärke von mindestens 100 mM angewiesen ist.

V) Es wurden mathematische Modelle zur Beschreibung der Konkurrenz zwischen den Ionen entwickelt und Programme zur numerischen Bestimmung der Na-Affinitäten durch Anpassen der Simulationskurven an die Meßdaten geschrieben.

Der Vergleich zwischen Simulation und Daten zeigte, daß das aufgestellte Modell die Konkurrenz zwischen Na^+ und Mg^{2+} sehr gut beschreibt. Die durch Simulation ermittelten Werte für die Affinitäten der drei Na-Bindungsstellen hatten folgende Eigenschaften: K_1 sehr klein, K_2 moderat, die apparente Affinität bestimmend, und $K_3 < K_2$. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die dritte Na-Bindungsstelle erst erscheint, wenn die ersten zwei mit Na^+ besetzt sind.

Experimente mit anderen zweifach positiven Erdalkalimetallionen sowie mit dem dreifach geladenen Na-Analogon $\text{Br}_2\text{-TITU}$ legten nahe, daß man gemischte Bindungszustände fordern muß, um die Na-Titrationskurven bei Anwesenheit dieser Ionen im Puffer gut beschreiben zu können.

Daher wurde ein verfeinertes Modell formuliert, das gemischte Bindungszustände zuläßt und die obigen Eigenschaften der Na-Bindungsstellen berücksichtigt. Man geht davon aus, daß die antagonistischen Ionen nur mit der äußeren Ionenbindungsstelle wechselwirken können. Es wird die Existenz eines quasi-okkludierten Zustands postuliert, der auf die Bindung der zwei Na-Ionen folgt. Nach der Bildung dieses Zustands wird die hochselektive elektrogene Na-Bindungsstelle zugänglich. Durch diesen zweistufigen Mechanismus wird die Selektivität der Pumpe für Na^+ erreicht.

Publikationsliste

Wesentliche Teile dieser Dissertation sind in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

1. W. DOMASZEWICZ, A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL: Properties of the cytoplasmic ion binding sites. *Ann NY Acad Sci* **834** (1997) 420-423
2. H.-J. APELL, A. SCHNEEBERGER, V. S. SOKOLOV: Partial reactions of the Na,K-ATPase: kinetic analysis and transport properties. *Acta Physiol Scand* **163**, Suppl **643** (1998) 235-245
3. A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL: Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: **I.** Sodium binding is associated with a conformational rearrangement. *J Membrane Biol* **168** (1999) 221-228
4. A. SHAINSKAYA, A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL, S. D. J. KARLISH: Entrance port for Na and K ions on Na,K-ATPase in the cytoplasmic loop between trans-membrane segments M6 and M7 of the β subunit. Proximity of the cytoplasmic segment of the β subunit. *J Biol Chem* **275** (2000) 2019-2028
5. A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL: Properties of the sodium-pump ion binding sites in state E₁. *Proceedings of the 9th. International Conference on Na/K Pump and Related Pumps*, Elsevier Science BV, Amsterdam (2000) (im Druck)
6. A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL: Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: **II.** Competition of various cations. *J Membrane Biol* (2000) (submitted)

Einleitung

1 Struktur und Funktion der Zellmembran und ihrer Komponenten

Alle Lebewesen sind aus Zellen zusammengesetzt - kleinen Kompartimenten (im Mikrometerbereich), in deren Inneren sowohl die Information für ihre Struktur und Funktion vorhanden ist, als auch der gesamte Apparat um sie zu bilden, zu erhalten, und gegebenenfalls zu vermehren. Umgeben sind diese Kompartimente von der Zell- oder Cytoplasmamembran, einer Doppelschicht aus Phospholipiden, denen Proteine auf- bzw. in die Proteine eingelagert sind. Diese Membran hat primär die Aufgabe, eine Barriere zwischen Zellinnerem und Außenmedium zu bilden und die hohen Konzentrationsgradienten gelöster Stoffe zwischen den genannten Phasen aufrechtzuerhalten. Die Phospholipidmatrix der Cytoplasmamembran ist nur für kleine hydrophobe Moleküle (O_2 , CO_2 , N_2 , Benzol) und kleine polare, aber ungeladene Moleküle (H_2O , Harnstoff, Glycerin) permeabel. Zur Aufnahme von Ionen und großen, ungeladenen Molekülen (z. B. Zucker, Aminosäuren) benötigt die Zelle daher spezielle Transportsysteme, die von den eingelagerten Proteinen gebildet werden. Man unterscheidet dabei verschiedene Arten: Passive Transportsysteme (Kanäle, Carrier) erleichtern die Diffusion eines Stoffes entlang seines elektrochemischen Gradienten (bergab), aktive Systeme transportieren das Substrat *gegen* seinen elektrochemischen Gradienten (bergauf).

Es gibt primär und sekundär aktive Transportsysteme: Unter die sekundär aktiven Transportsysteme fällt beispielsweise der Na,Ca-Tauscher der Säugetierzellen, der durch den Bergabtransport der Ionensorte A (hier: Na^+) den damit gekoppelten Bergauftransport der Ionensorte B ermöglicht. Primär aktive Transportsysteme hingegen nutzen direkt eine Energiequelle wie z. B. Licht (Bacterio-/ Halorhodopsin der Halobakterien), Redoxenergie (NADH-Dehydrogenase, Cytochromreduktase, Cytochromoxidase in Mitochondrien und Bakterien (Stry95)), oder chemische Energie (Succinat- bzw. Methylmalonat-Decarboxylierung bei *Propionigenium modestum*, Pyrophosphat-Hydrolyse in Pflanzenvakuolen, ATP-Spaltung bei verschiedenen anderen Ionenpumpen, die meist H-, Na-, K- oder Ca-Ionen transportieren (Läug91b)). Die licht- und redoxenergiegetriebenen Pumpen haben die Aufgabe, einen elektrochemischen Gradienten (meist für H-Ionen) über der Mitochondrien- bzw. Bakterienmembran aufzubauen bzw. zu erhalten. Dieser wird dann von der F_0/F_1 -Protonenpumpe zur Synthese von ATP genutzt. Im Gegensatz dazu nehmen die anderen, durch chemische Energie getriebenen Pumpen die eigentlichen Transportaufgaben in der Zelle wahr, nämlich die Aufnahme benötigter bzw. die Abgabe unerwünschter Ionen, wozu sie das gebildete ATP zum Teil wieder verbrauchen. Diese Ionenpumpen lassen sich in drei Gruppen einteilen:

In F_0/F_1 - oder F-Typ-Pumpen, multimere Proteine mit den Untereinheiten $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_9-12$, die in Abwesenheit divalenter Kationen in einen löslichen Kopf und einen membrandurchspannenden Fuß zerfallen; sie kommen in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten vor; V-Typ-ATPasen, ebenfalls komplex aufgebaute Protonenpumpen, die in einigen zellulären Organellen und Pflanzenvakuolen gefunden werden; und P-Typ-ATPasen, die im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen im Laufe ihres Zyklus an einer Aspartatseitenkette phosphoryliert werden. Der wohl prominenteste Vertreter dieser Untergruppe von Ionenpumpen ist die Na,K-ATPase, die in praktisch allen Eukaryontenzellen vorkommt. Sie erhält den Gradient für Na- und K-Ionen über der Zellmembran aufrecht, indem sie unter Verbrauch eines Moleküls ATP pro Zyklus drei Na-Ionen aus der Zelle hinaus transportiert und im Gegenzug zwei K-Ionen ins Cytoplasma abgibt. Damit ist sie für Osmoregulation, Zellvolumenkontrolle und Wasserhaushalt verantwortlich, indirekt aber auch für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials zur Energiespeicherung oder als Voraussetzung für die elektrische Erregbarkeit der Zelle.

Besonders wichtig ist die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten für Na^+ , der den sekundär aktiven Transport von Aminosäuren, Ionen und Zuckern in die Zelle ermöglicht. Die hohe intrazelluläre K-Konzentration ist für das ordnungsgemäße Funktionieren vieler Enzyme notwendig (Hans85, Lech88). Ein Drittel des Energieumsatzes einer Zelle dient dem Betrieb der Na,K-ATPase; bei Nervenzellen können es bis zu 70 % sein. Da die Na,K-Pumpe unter physiologischen Bedingungen weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt arbeitet, wird die nicht für den Transport benötigte Energie in Form von Wärme abgegeben und kann damit auch zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur verwendet werden. Etwa 20 % der gesamten metabolischen Aktivität eines Säugetiers entfällt allein auf die Na,K-ATPase (Glyn85).

2 Aufbau der Na,K-ATPase

1957 konnte Skou eine von Mg-, Na- und K-Ionen abhängige ATPase-Aktivität in einer Membranfraktion aus Krabbennerven nachweisen; drei Jahre später zeigte er, daß diese Hydrolyseaktivität durch das Herzglykosid Ouabain inhibierbar war (Skou89). Später gelang der Nachweis, daß es sich tatsächlich um die Na,K-Pumpe handelte, deren Existenz schon früher postuliert worden war (Dean41, Over02), um die Aufrechterhaltung der Na-, K- und Cl-Gradienten in Muskelzellen zu erklären. (Seit gezeigt wurde, daß diese Na- und K-abhängige ATPase mit der postulierten Na,K-Pumpe identisch ist (Corn84, Skou89), werden die Begriffe Na,K-Pumpe und Na,K-ATPase synonym verwendet.) Nachdem das Enzym in der Form offener Membranfragmente aus Säugern isoliert werden konnte (Jørg74, Jørg88), lag eine hochreine Präparation für strukturelle und funktionelle in-vitro-Experimente vor (Abbildung 1).

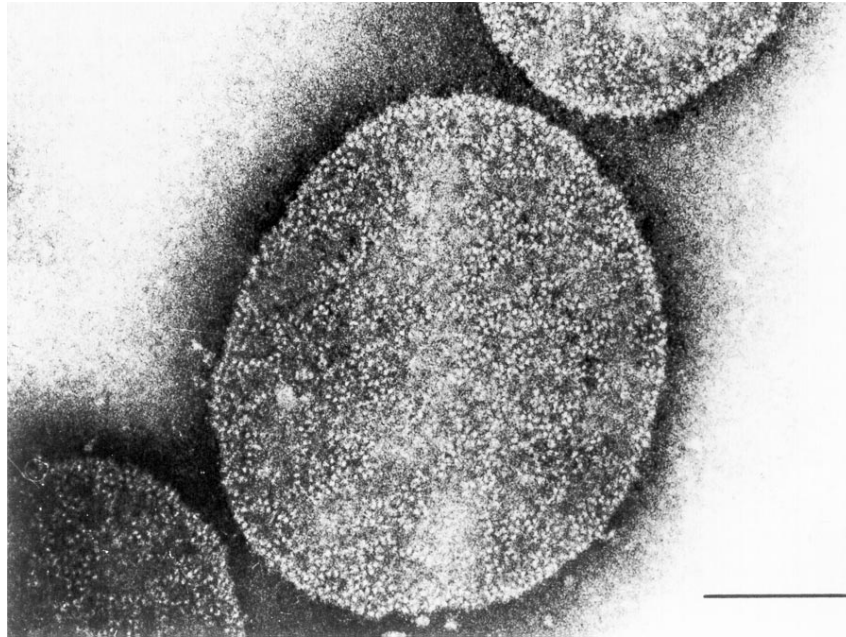


Abbildung 1: **Elektronenmikroskopische Aufnahme von Na,K-ATPase-haltigen Membranfragmenten** (Degu77). Die in Clustern angeordneten Partikel haben einen apparenten Durchmesser von 30 Å und stellen vermutlich jeweils ein $\alpha\beta$ -Protomer dar. Balken: 100 nm.

Die Aufklärung der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) der α - und β -Untereinheit der Na,K-ATPase aus ihrer cDNA-Sequenz ebnete in der Mitte der achtziger Jahre den Weg für die heutigen Experimente an Aminosäure-Austauschmutanten (Ovch86, Shul85). Diese sollen funktionelle Fragestellungen klären, z. B. welche Aminosäuren an der Ionenbindung beteiligt sind. Die Na,K-ATPase ist ein Komplex aus zwei verschiedenen Polypeptiden, der katalytischen α - und einer glycosylierten β -Untereinheit, die im Verhältnis von 1:1 zueinander vorliegen, und einem Ring aus assoziierten Lipidmolekülen (Møll96). Mittlerweile ist geklärt, daß die oligomere Struktur der Makromoleküle *in vivo* kein $\alpha\beta$ -Protomer, sondern ein $(\alpha, \beta)_2$ -Diprotomer ist (Linz98). Das Monoprotomer scheint jedoch für die enzymatische Funktion ausreichend zu sein (Skou92).

Die α -Untereinheit des Schafnierenenzym besteht aus 1012 Aminosäuren (Ratte: 1018, Ovch86), die β -Untereinheit aus etwa 300 Aminosäuren. Dies ergibt Molmassen von 112 kD bzw. 35 kD (im unglycosylierten Zustand). In Säugetieren gibt es drei Isoformen der α - und zwei Isoformen der β -Untereinheit: α_1 wird in praktisch allen Geweben gefunden und ist die vorherrschende Form in der Niere und anderen Na-transportierenden Epithelien; α_2 kommt hauptsächlich in Muskel- und Herzzellen, Neuronen und Adipocyten (Fettzellen) vor; und α_3 wird überwiegend in Neuronen, aber auch in glatten Muskelzellen exprimiert (Møll96, Jewe92). Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in ihrer Affinität für Na^+ und ihrer Regulierbarkeit durch Hormone bzw. Hemmbarkeit durch Herzglycoside (Møll96, Übersichtsartikel siehe Blan98, Jewe92, Leve94,

Swea89). Die β_1 -Untereinheit ist die dominante Form in der Niere und wird auch in fast allen anderen Geweben gefunden; β_2 kann aus Hirngewebe isoliert werden und scheint eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen zu spielen (Skou92). Obwohl alle enzymatischen und Transportfunktionen auf der α -Untereinheit lokalisiert sind, ist diese ohne die β -Untereinheit nicht als Ionenpumpe aktiv. Daher wird vermutet, daß β eine strukturerhaltende Funktion wahrnimmt und die α -Untereinheit stabilisiert. Außerdem spielt sie eine Rolle bei der Synthese und Reifung der α -Untereinheit und ihrem Export zur Plasmamembran (Geer90, Geer91, Tamk86). Die differentielle Expression der verschiedenen α -Untereinheiten und ihre Kombination mit der β_1 - oder β_2 -Untereinheit führt möglicherweise zu funktionell verschiedenen Pumpen je nach den Erfordernissen des entsprechenden Gewebes.

Die Feinregulation der Na,K-ATPase erfolgt überdies mittels Phosphorylierung durch Proteinkinase A und C (Pede97, Vasi90, Begi96, Vasi92) und eventuell durch Phospholipase A₂ (Okaf97). Die regulatorischen Phosphorylierungsstellen sind Ser 371, Ser 938 und Thr 347 (Schwr96). Unter dem Einfluß von Hormonen erhöht sich unter anderem die Transkription der messenger RNA für die Na,K-ATPase und führt so zu einer Hochregulation des Expressionslevels (der Anzahl an Pumpen in der Membran). In der Medulla von Säugernieren konnte außerdem eine γ -Untereinheit nachgewiesen werden, die mit der α - und β -Untereinheit in der gereinigten Präparation assoziiert ist, und der man eine regulatorische Funktion zuschreibt (Ther98). Die γ -Untereinheit scheint auf die Niere begrenzt zu sein (Ther98, Merc93). Mit der oligomeren Struktur $\alpha\beta(\gamma)$ bzw. $(\alpha\beta)_2$ ist die Na,K-ATPase sehr viel einfacher aufgebaut als F- oder V-Typ-ATPasen. Dennoch liegt im Gegensatz zur F₀/F₁-ATPase, deren Kopfstruktur bis zu einer Auflösung von 2,8 Å geklärt ist (Abra94), noch keine Röntgenstrukturanalyse einer P-Typ-ATPase vor. In Ermangelung solcher "harten" Strukturdaten wird mit anderen theoretischen oder experimentellen Ansätzen versucht, die Tertiär- bzw. Quartärstruktur dieses Makromoleküls genauer einzugrenzen (Übersichtsartikel siehe Møll96).

Durch die theoretische Analyse seiner Aminosäuresequenz kann man ein Modell der Pumpe mit einer bestimmten Anzahl an α -Helices aufstellen. Aufschlüsse über die intra- oder extrazelluläre Lokalisation bestimmter Bereiche der Polypeptidkette(n) erhält man unter anderem mit Hilfe von Antikörpern (Anto91). Durch die kovalente Verknüpfung reaktiver Substanzen an bestimmte Aminosäuren des Proteins erhält man Informationen darüber, in welchem Bereich des Enzyms bestimmte Liganden wie z. B. ATP oder Ouabain gebunden werden. Überdies kann man durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) die topologische Entfernung zweier fluoreszierender Sonden und damit die Distanz zwischen ihren Bindungsstellen abschätzen (siehe Mat & Met 3.4). So ließ sich der Abstand zwischen ATP- und Ouabain-Bindestelle auf etwa 70 Å bestimmen (Fort88, Linz98).

Proteolytischer Verdau des Enzyms und nachfolgendes Ansequenzieren der Bruchstücke führte in Kombination mit anderen Methoden zu einem Modell der Na,K-ATPase mit zehn membran-durchspannenden Segmenten (M) und einem labilen C-Terminus (M₇ - M₁₀) (Gold95, Arys95).

Bild 2 zeigt das aktuelle Modell anhand der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) der α_1 -Untereinheit der Na,K-ATPase (Ratte) im Ein-Buchstaben-Code. Die Numerierung beginnt mit dem N-Terminus. Vermutete bzw. numerisch simulierte Elemente der Sekundärstruktur sind ebenfalls dargestellt: α -Helices als diagonal aufsteigende, aufeinandergestapelte lineare Bereiche, β -Faltblätter als parallel angeordnete auf- und absteigende Sequenzen. Die übrigen Bereiche liegen wohl in Loop- (Schleifen-) oder Turn- (Kehrtwende-) Formation vor. N- und C-Terminus der α -Untereinheit sind cytoplasmatisch. Die mutmaßlichen Eintrittsstellen der Polypeptidkette in die Membran konnten durch Verdau mit unspezifischen Proteasen bestimmt werden. Die membranären α -Helices sind von M₁ bis M₁₀ durchnummeriert und haben jede eine Länge von 22 bis 25 Aminosäuren. Da die Hydrophobizitätsplots der katalytischen Untereinheiten von P-Typ-Pumpen sich ähneln und auch Teile ihrer Aminosäuresequenzen eine große Homologie aufweisen, nimmt man an, daß auch ihre topologische Organisation ähnlich ist (Jørg88). Damit sind Analogieschlüsse von anderen P-Typ-Pumpen wie der sarcoplasmatischen Ca-ATPase oder der H,K-ATPase, über die schon umfangreichere strukturelle Daten vorliegen, auf die Na,K-ATPase möglich.

In Analogie zur sarcoplasmatischen Ca-ATPase wird angenommen, daß der Bereich M₁-M₅ auch außerhalb der Membran noch in α -helicaler Struktur vorliegt und eine Art Stiel bildet (S), der aus der Membran herausragt. Die große cytoplasmatische Schleife zwischen M₄ und M₅ bildet die Domäne C. Sekundärstrukturanalysen sagen für diese Region eine abwechselnd α -helicale und β -Faltblattstruktur voraus (Bran86, Tayl89). Hier liegt die Phosphorylierungsstelle Asp (D) 371 (Ratte), die auch die Affinität für ATP mitbestimmt und Einfluß auf das Gleichgewicht zwischen den zwei Hauptkonformationen E₁ und E₂ hat (Pedr96). Durch die spezifische kovalente Kopplung reaktiver ATP-Analoga an die Pumpe konnte man zeigen, daß an der ATP-Bindung außerdem die Aminosäuren D₃₇₂, K₄₈₃, K₅₀₃ (FITC-Bindestelle), Gly (G) 504 und D₇₁₂, D₇₁₆ und D₇₂₁ beteiligt sind bzw. sich in direkter Nähe des gebundenen ATPs befinden (Schwr96, Farl97, Tran94). Da eine FITC-modifizierte Pumpe nicht mehr durch ATP, aber immer noch durch Acetyl- oder Kreatinphosphat phosphoryliert werden kann, scheint es sinnvoll anzunehmen, daß die ATP-Bindestelle in zwei Bereiche geteilt ist und aus einer Adenin/osin- und einer Phosphatbindestelle besteht. Lys (K) 503 und G₅₀₄ liegen dabei wohl in der Adenin/osin-Koordinierungsstelle (Tran94, Pede90). Durch Aminosäureaustauschmutationen konnte auch Arg (R) 546 als möglicherweise an der ATP-Bindung beteiligt identifiziert werden (Jørg98).

Domäne C scheint ein Stück weit funktionell autonom zu sein, da dieses Polypeptid bei Expression in Bakterien immer noch in der Lage ist, ATP zu spalten oder ATP-PNP, ein nicht spaltbares

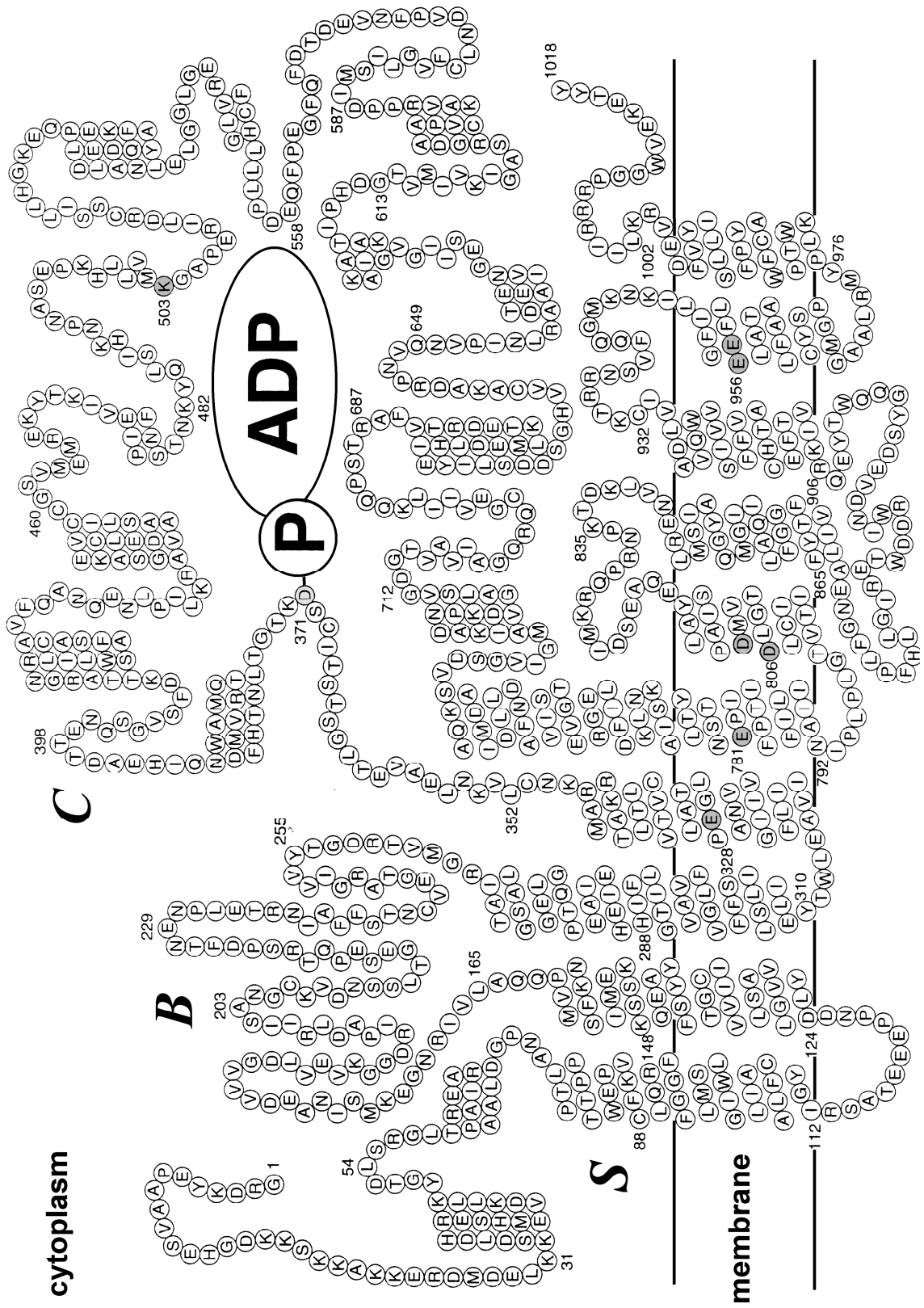


Abbildung 2: Schema des aktuellen Modells der Na,K-ATPase anhand der Aminosäuresequenz. Vermutete Elemente der Sekundärstruktur dargestellt als diagonale, aufeinander gestapelte Bereiche (α -Helices) bzw. parallel verlaufende Sequenzen (β -Faltblätter). Nach Vils97b, verändert.

ATP-Analogon, zu binden. Konstruiert man Chimären, indem man die Domäne *C* der sarcoplasmatischen Ca-ATPase durch die der Na,K-ATPase ersetzt, erhält man funktionelle Pumpen mit unveränderter apparenter Affinität für Ca-Ionen. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß auch die Ionenbindung teilautonom verläuft: Durch enzymatischen Verdau mit Trypsin war es möglich, den allergrößten Teil der cytoplasmatischen Domänen zu entfernen und die α -Untereinheit in die membranständigen Peptide M_1/M_2 , M_3/M_4 , M_5/M_6 und M_7-M_{10} mit kurzen cytoplasmatischen Schwänzen zu zerlegen (Capa92, Karl90). Dieser Rumpf der Pumpe (genannt 19kD-Membranen nach dem größten Peptid M_7-M_{10} von ungefähr 19 kD Molmasse) ist immer noch in der Lage, Ionen zu binden bzw. zu okkludieren (einzuschließen) und Ouabain zu binden. Dies zeigt, daß die Ionenbindungsstellen innerhalb der Membran liegen.

Durch Mutationsanalysen konnte man Asp 806 und 810 auf der transmembranären Helix M_6 als zentrale Aminosäuren für die Bindung und den Transport von K^+ (und möglicherweise auch Na^+) bestimmen (Ade95, Pedr97, Kunz96, Blos97, Ling98, Jørg98). Da Mutationen dieser Aminosäuren auch eine verminderte Na-Affinität zur Folge haben, spielen sie wohl auch bei der Na-Bindung eine Rolle (Pedr97). Auch Mutationen von Glu 329, Ser 777 und Glu 781 scheinen zumindest für die Bindung, Okklusion, und/oder Translokation von K^+ wichtig zu sein (Argu94, 95, 96, Ling98, Kost96, Vasi98). Für D_{586} aus der konservierten DPPR-Sequenz wird eine mögliche Beteiligung an der Mg-Bindung diskutiert (Farl97).

Das Herzglycosid Ouabain wird durch die Schleife zwischen M_1 und M_2 und Aminosäuren auf M_1 , M_4 , M_5 , M_6 und M_7 gebunden (Ling98). Die cytoplasmatische Schleife zwischen M_2 und M_3 wird Region *B* genannt und liegt vermutlich in antiparallelen β -Strängen vor. Schneidet man hier mit Trypsin oder Chymotrypsin, so kann das Enzym noch Ionen binden und okkludieren und auch durch ATP phosphoryliert werden, aber es findet kein Ionentransport mehr statt. Daher nimmt man für diese Region eine Rolle bei der Ionentranslokation bzw. dem Übergang zwischen den Konformationen E_1 und E_2 an (Jørg92, Blos98). Der N-Terminus der α -Untereinheit scheint eine Rolle bei der K-Deokklusion und der Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Membranpotential zu spielen (Wier93, Vasi93a, Jørg94, Hori94, Vasi93b). Man diskutiert einen indirekten Einfluß auf die Ionenbindung durch eine membranpotentialabhängige Regulierung des E_1/E_2 -Gleichgewichts (Vasi93b) oder einen direkten Einfluß durch die Beteiligung am Ionenzugangskanal.

Die β -Untereinheit der Na,K-ATPase (nicht dargestellt) durchspannt mit nur einer α -Helix die Membran, ihr N-Terminus ist cytosolisch und der überwiegende Teil des Polypeptids extrazellulär (Mody91, Anto91, Jørg92). Sekundärstrukturanalysen sagen für ihre extracytoplasmatischen Bereiche teilweise eine β -Faltblattstruktur voraus (Rost94). Die β -Untereinheit enthält drei bis neun Asparaginkonsensussequenzen zur Anheftung von Zuckern (Schm94, Säuger Asp 158, 193 und 265) und hat wegen ihrer starken Glycosylierung eine apparente Molmasse von 50 - 65 kD

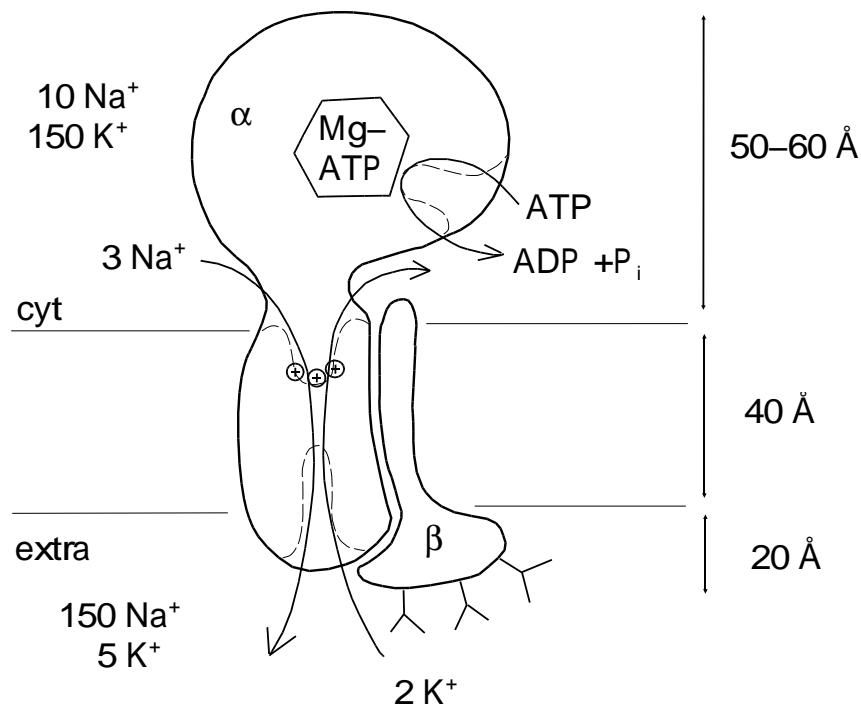


Abbildung 3: **Massenverteilung und ungefähre Abmessungen der Na,K-ATPase.** Nach Stok94, 98, Pede90, verändert.

(Mill88). Sechs konservierte Cysteinreste sind zu drei Disulfidbrücken verbunden. Diese sind wichtig für die korrekte Faltung der β -Untereinheit, die eine Voraussetzung für den Zusammenbau mit der α -Untereinheit und deren Reifung zur katalytisch aktiven und transportfähigen Pumpe ist (Begg97, Geer96). Die Reduktion einer oder mehrerer dieser Disulfidbrücken führt schrittweise zum Verlust der Transportfunktionen des Dimers (Luts93, Kiril90, Nogu94). Das α -Monomer alleine ist zwar zur Hydrolyse von ATP in der Lage, aber dieser Prozeß ist weder von der Na- oder K-Konzentration abhängig noch durch Ouabain hemmbar (Blan94). Aus diesen Gründen scheint ein Beitrag der β -Untereinheit zur Kopplung der enzymatischen mit den Transportfunktionen möglich, aber auch eine rein strukturelle Funktion, nämlich die α -Untereinheit zu stabilisieren und eine bestimmte topologische Organisation aufrecht zu erhalten, ist denkbar.

Allerdings gibt es mittlerweile einige starke Hinweise darauf, daß die β -Untereinheit eine Rolle bei der K-Aktivierung der Pumpe spielt (Luts93, Jais94, Geer96, Shai96): Dabei interagiert ihr N-Terminus möglicherweise mit der α -Untereinheit: Der Verlust von zehn Aminosäuren des N-Terminus der β -Untereinheit führt zu einer veränderten Kinetik der Rb-Deokklusion und einer drastisch erniedrigten Affinität für Rb⁺ bei 19kD-Membranen (Shai96). Überdies führt der Zusammenbau einer α -Untereinheit mit verschiedenen β -Untereinheiten zu Pumpen mit unterschiedlicher Affinität für K-Ionen (Jais92, Pont97). Die β -Untereinheit interagiert zudem auch

noch mit der Sequenz zwischen den ersten zwei zu einer Disulfidbrücke verbundenen Cysteinen der M₇-M₈-Schleife der α -Untereinheit (Lema94, siehe auch Gold95). Weitere Kontaktstellen sind die transmembranäre Helix inclusive eines anschließenden C-terminalen Stücks (Jaun93, Colo97, Sarv97) und der C-Terminus (Begg93).

Die γ -Untereinheit der Na,K-ATPase wurde von Forbush entdeckt (Forb78). Ihre Aminosäuresequenz wurde 1993 aufgeklärt (Merc93). Sie durchspannt wahrscheinlich mit einer α -Helix die Membran, wobei ihr N-Terminus extracytoplasmatisch ist (Merc93, Begi97). Sie kopräzipitiert mit funktionellen $\alpha\beta$ -Komplexen und liegt im Verhältnis von 1:1 mit diesen vor (Reev80, Hard81). Es wird diskutiert, daß die γ -Untereinheit ebenfalls die K⁺-Aktivierung der Pumpe modulieren könnte (Ther98, Begi97).

3 Reaktionszyklus der Na,K-ATPase

Pro Pumpzyklus bewegt die Na,K-ATPase drei Na-Ionen aus der Zelle heraus und gibt zwei K-Ionen ins Cytoplasma ab, was einem Nettotransport von einer positiven Elementarladung aus der Zelle heraus entspricht (Glyn94). Dieser Pumpstrom trägt zum Membranpotential bei und wird daher elektrogen genannt (Läug91b). Umgekehrt ist der Ladungstransport seinerseits auch vom Membranpotential abhängig. Teilschritte dieses Transports, in denen Ladungen nur über Abschnitte des Membrandielektrikums verschoben werden, können ebenfalls als Strom gemessen werden und werden ebenso als elektrogen bezeichnet. Aus mechanistischer Sicht muß eine einfache P-Typ-Pumpe, die ein Ion von der einen Seite der Membran auf die andere translozieren soll, zu folgenden Prozessen in der Lage sein: Das Ion zu binden, durch ATP phosphoryliert zu werden (Energieeintrag, der den Ablauf vorwärts treibt), einen Konformationsübergang durchzumachen ($E_1 \rightarrow E_2$), das Ion auf der anderen Seite freizusetzen, und durch Phosphatabspeicherung und einen erneuten Konformationsübergang wieder zum Ausgangspunkt des Zyklus zurückzukehren. Dieses einfache Modell führt zu acht verschiedenen Zuständen E_1 , XE_1 , $E_1 \sim P$, $XE_1 \sim P$, $P-E_2X$, $P-E_2$, E_2X , und E_2 mit 12 möglichen Übergängen (X: transportiertes Ion).

Faßt man eine Ionenpumpe als stochastische Maschine auf, sind von jedem Zustand ausgehend prinzipiell alle drei Reaktionstypen Ionenbindung/-freisetzung, Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung und Konformationsübergang $E_1 \rightarrow E_2$ bzw. $E_2 \rightarrow E_1$ möglich. Daher muß durch einen geeigneten strukturellen Aufbau des Enzyms gewährleistet werden, daß in der überwiegenden Mehrheit der Fälle nur einer der drei möglichen Übergänge eingeschlagen wird. Würden die Zustände in zufälliger Reihenfolge durchlaufen, hätte dies eine Verschwendung von ATP mit nur gelegentlichem Ionentransport zur Folge. Durch dieses aus acht Zuständen bestehende Modell ließ sich die Funktion einer H⁺-ATPase aus *Enterococcus hirae* beschreiben (Apel90).

Auch der Reaktionszyklus der Na,K-ATPase besteht aus einer Abfolge von Konformationsübergängen, Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsschritten und Ionenbindungs-, Okklusions- und Freisetzungsreaktionen (Glyn85, Forb88, Jørg88). Er ist in einer modifizierten Form des sogenannten Post-Albers-Schemas in Abbildung 4 dargestellt.

Nicht alle Zustände sind biochemisch faßbar; die Existenz mancher Zustände mußte zur erfolgreichen Beschreibung bestimmter kinetischer Experimente gefordert werden. Man geht von zwei Hauptkonformationen E_1 und E_2 aus (Glyn84, 85, Albe67, Post72), die durch verschiedene Spaltmuster nach Behandlung mit Proteasen unterschieden werden können. In der Konformation E_1 weisen die Ionenbindungsstellen zum Cytoplasma und im dynamischen Gleichgewicht wird Na^+ bevorzugt vor K^+ gebunden; in der Konformation E_2 sind die Ionenbindungsstellen zum Extrazellulärraum gerichtet, und die Affinität für K-Ionen ist weit höher als für Na-Ionen. Zudem unterscheiden sich die Konformationen in ihrer Affinität für ATP, die im Zustand E_1 deutlich höher ist als in E_2 (Raten der Übergänge und Affinitäten siehe Heys94).

In der Konformation E_1 kann das Enzym drei Na- oder zwei K-Ionen binden. Da die K-Bindung elektroneutral verläuft (Bühl91, Heys94), und man annimmt, daß Na- und K-Ionen durch dieselben Aminosäuren koordiniert werden (Glyn90, Or96a, Gold87, Läg91b), geht man von der Existenz einer weiteren, ungeladenen Na-Bindestelle aus, die vermutlich als letzte besetzt wird (Schu96, Heys94). Als Kandidaten für die Bindung der zwei Na- oder K-Ionen werden unter anderem die Carboxylgruppen von Asp 806 und 810 diskutiert (siehe 2 Aufbau der Na,K-ATPase). Man nimmt an, daß diese Bindungsstellen in einem weiten, wassergefüllten Vestibül lokalisiert sind, so daß ihre Besetzung nicht vom Membranpotential abhängig ist (Heys94, Läg91b). Da die Bindung von Na^+ elektrogen abläuft (Doma99, Or96a, Gold87, Karl85, Bühl91, Heys94), muß sich daher die dritte Bindestelle innerhalb der Membran befinden, so daß ein Teil des Membranpotentials über der Strecke dielektrische Oberfläche des Proteins - Bindestelle abfällt.

Das Konzept, daß die Ionenbindungsstellen abwechselnd auf der nach innen bzw. nach außen gerichteten Seite präsentiert werden, nennt man *alternating-access mechanism* (abwechselnde Zugänglichkeit, Läg79, Tanf83). Nach heutiger Vorstellung ist es unwahrscheinlich, daß Ionen mit ihren Bindungsstellen über große Teile der Membran verschoben werden; vielmehr geht man davon aus, daß Energiebarrieren als Tore (gates) um die gebundenen Ionen herum aufgerichtet werden, so daß eine Ionenpumpe als *gated channel* (Ionenkanal mit sich öffnenden und schließenden Toren, Läg84) aufgefaßt werden kann. Durch den Energie bereitstellenden Schritt würden dann Lage und Höhe der Energiebarrieren vorübergehend verändert. Auf einer oder beiden Seiten könnten die Ionen ihre Bindungsstellen durch Zutrittskanäle (*access channels*) erreichen (Läg91a).

Auf die Ionenbindung folgt bei der Na,K-ATPase die Phosphorylierung durch ATP, die zur Okklusion der Na-Ionen führt. In diesem Zustand wären beide Tore geschlossen, so daß die ge-

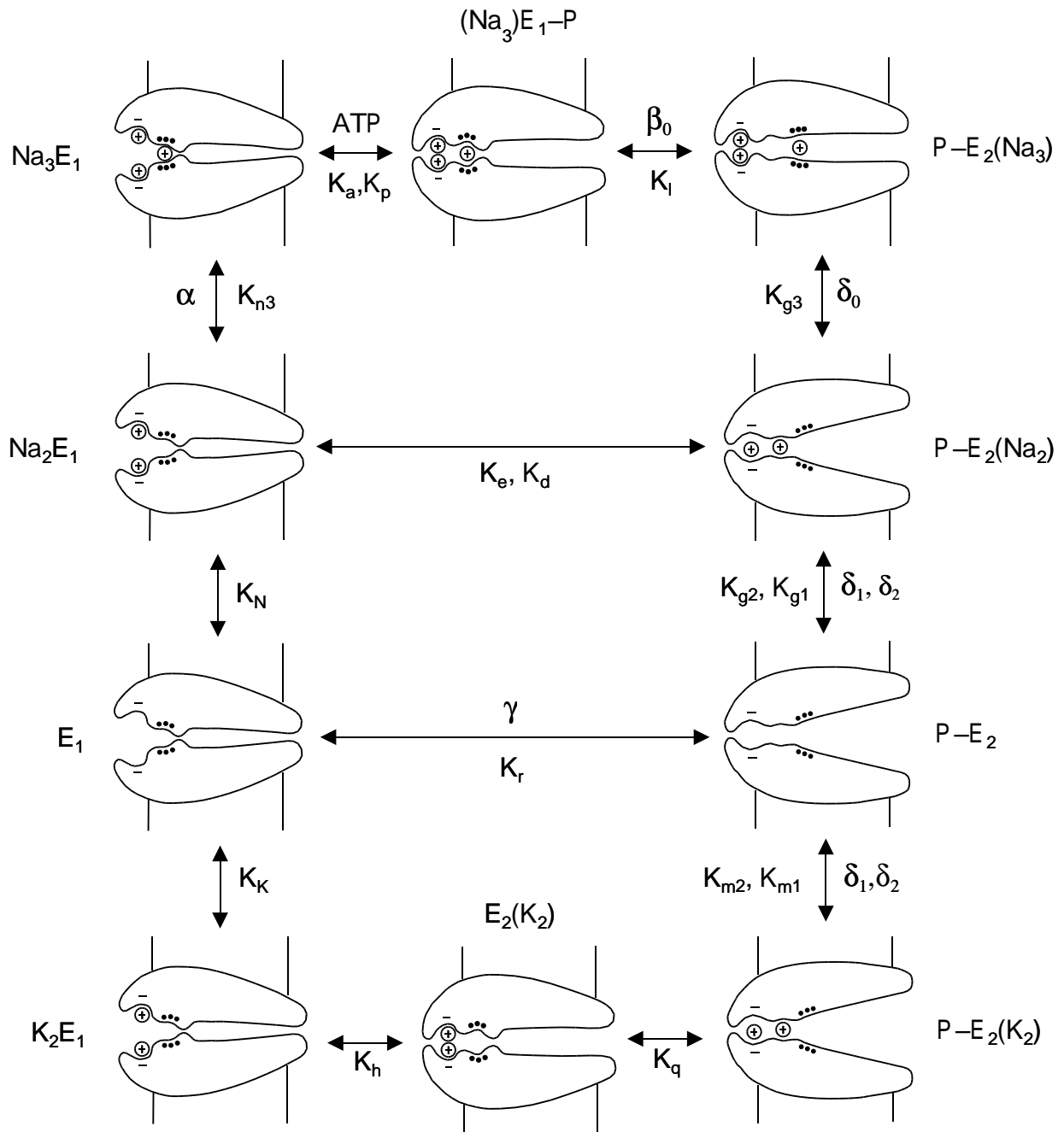


Abbildung 4: **Mechanistisches Modell für den Ionentransport der Na,K-ATPase** (Wudd95). Elektrogene Teilreaktionen sind durch die dielektrischen Koeffizienten α , β_0 , γ , und $\delta_0 - \delta_2$ beschrieben, K_x : Gleichgewichtskonstanten. Cytoplasma links, Extrazellulärraum rechts der Membran. Dargestellt sind auch die geladenen Ionenbindestellen, die neutrale Bindungsstelle für Na^+ , und der enge Zugangskanal auf der extrazellulären Seite, der die Freisetzung des ersten Na-Ions zum bedeutendsten elektrogenen Teilschritt macht.

bundenen Ionen nicht mit dem umgebenden wäßrigen Medium austauschen können. Der nachfolgende Konformationsübergang läuft spontan ab und scheint nur schwach elektrogen zu sein (Wudd95). Die Deokklusion des ersten Na-Ions ist der größte ladungsverschiebende Prozeß des Zyklus (Wudd95, Heys94, Stür91, Hilg94, dielektrischer Koeffizient $\delta_0 = 0,65$). Dies wird durch die Existenz eines tiefen Ionenschachts (high field access channel / ion well (Läug91a,b)) erklärt, über den ein Großteil des Membranpotentials abfällt. Auch die Spannungsabhängigkeit des steady-state Na/Na-Austauschs in Tintenfischaxonen ist ein sehr klarer Hinweis auf die Existenz eines engen externen Zutrittskanals (Gads93).

Hat das erste Na-Ion den Ionenschacht verlassen, führt möglicherweise eine Relaxation in der Proteinstruktur zur Verringerung der dielektrischen Distanz zwischen extrazellulärer Phase und Bindungsstellen, so daß die Freisetzung der beiden übrigen Na-Ionen durch einen niedrigen Dielektrizitätskoeffizienten charakterisiert ist ($0,1 \leq \delta_1 = \delta_2 < 0,2$). Diese geringere dielektrische Distanz könnte durch eine Aufweitung des Zugangskanals erklärt werden. Die nachfolgende K-Bindung erfolgt mit gleicher oder ähnlicher Elektrogenität (Wudd95). Phosphatabspaltung führt zur K-Okklusion; die Bindung von ATP an eine niederaffine Bindungsstelle erleichtert dann die Deokklusion der K-Ionen auf der cytoplasmatischen Seite. Auch in Anwesenheit von physiologischen ATP-Konzentrationen hat der K-okkludierte Zustand die niedrigste freie Energie μ_0 und ist damit der stabilste. Das Post-Albers-Schema repräsentiert einen konsekutiven (oder Ping-Pong-) Mechanismus, d. h. ein Substrat (z. B. Na^+) wird in einem Abschnitt des Zyklus transportiert, das andere (K^+) im darauffolgenden Abschnitt. Direkte Hinweise auf eine konsekutive Arbeitsweise der Na,K-ATPase stammen aus Experimenten, die zeigen, daß die Pumpe auch in völliger Abwesenheit von K-Ionen zu einem transienten Na-Transport in der Lage ist (Rako89, DeWe88).

Elektrogene Prozesse werden z. B. mit Patch-Clamp-Methoden, Bilayer- und Ladungspulstechniken, elektrophysiologischen Methoden, mit in Vesikeln rekonstituierten ATPase-Präparationen oder mit feldsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen untersucht (Wudd95, Heys94, Stür89, 92, Bühl95, Hilg94, Vasi93a, Gads93 ... Übersichtsartikel zu elektrogenen Teilreaktionen des Pumpzyklus der Na,K-ATPase siehe Rako97).

4 Zielsetzung der Arbeit

Hauptgegenstand der Untersuchungen dieser Doktorarbeit war der Na-Ast des erweiterten Post-Albers-Zyklus:

Die Bindung der Na-Ionen auf der cytoplasmatischen Seite hängt unter anderem von der Mg-Konzentration ab (Heys94). Für eine genauere Eingrenzung der Eigenschaften der cytoplasmatischen Ionenbindungsstellen sollte der Einfluß einer Reihe mono-, di- und trivalenter anorganischer

und organischer Kationen auf die Na-Bindung untersucht werden. In diesem Zusammenhang von besonderem Interesse schienen dabei durch Mg-Ionen hervorgerufene Effekte, da die Existenz von mehreren Mg-Bindungsstellen postuliert worden war (Kash97, Smir93a).

Die membrangebundene Na,K-ATPase kann durch spezifische Behandlung mit Trypsin in vier unterschiedlich große, membranständige Teilstücke, die sogenannten 19kD-Membranen, zerlegt werden, die noch Ionen- und Ouabainbindungsaktivität zeigen, aber alle ATP-abhängigen Funktionen verloren haben (Capa92, Schwp94, Or96b, siehe Abschnitt 2). Diese Präparation, ebenso wie eine mit Chymotrypsin noch weiter verdaute Membranfraktion, sollte näher untersucht werden im Hinblick auf ihre Na-Bindungseigenschaften, auf eine eventuell beibehaltene Kompetition von Na^+ mit anderen ein- bis dreifach geladenen Kationen, und auf ihre Bindung von Hemmstoffen.

Die cytoplasmatische Na-Bindung ist elektrogen und kann daher mit feldsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen wie RH 421 untersucht werden. Von bestimmten Zuständen des modifizierten Post-Albers-Zyklus ausgehend ist die Besetzung der cytoplasmatischen Ionenbindungsstellen auch mittels konformationssensitiver Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. FITC (Fluoresceinisothiocyanat) möglich. Diese zwei Farbstoffe ändern ihre Fluoreszenzintensität durch die Bindung von Ionen an die Pumpe aus völlig verschiedenen Gründen und mit völlig verschiedenen Mechanismen (siehe Mat & Met Punkt 3.3 und 3.4). Es sollten Messungen mit beiden Farbstoffen durchgeführt werden, deren Vergleich Aufschluß über kinetische Eigenschaften der Ionenbindung geben sollte.

Material und Methoden

1 Präparation und Reinigung von Na,K-ATPase enthaltenden Membranfragmenten

In der Cytoplasmamembran der Tubulizellen in der Säugerniere ist die Na,K-Pumpe aus Gründen der Salzurückgewinnung in sehr hoher Dichte vorhanden, weshalb sich dieses Gewebe zur Isolierung der Na,K-ATPase besonders gut eignet. Dazu werden mehreren frisch getöteten Zuchtkaninchen (hier: Exbreeder) die Nieren entnommen und diese quer in dünne Scheiben geschnitten. Auf Eis wird die dunkelrote äußere Medulla herauspräpariert, in eiskaltem Saccharose-Histidin-Puffer (30 mM Histidin, 250 mM Saccharose, 5 mM Imidazol, 1 mM EDTA, pH 7,2) homogenisiert und bei 6000 x g 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellett wird in Saccharose-Histidin-Puffer resuspendiert und erneut homogenisiert und zentrifugiert. Die Überstände der beiden Zentrifugationen werden vereinigt und nochmals 30 Minuten bei 48 000 x g abzentrifugiert. Das Pellett dieses Trennungsschrittes enthält die Na,K-ATPase-haltigen Membranfragmente, die als Mikrosomenfraktion bezeichnet werden. Sie werden in Saccharose-Histidin-Puffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

Zur weiteren Reinigung wird die Mikrosomenfraktion aufgetaut und auf eine Proteinkonzentration von 1,1 bis 1,3 mg/ml verdünnt. Durch eine 20-minütige Inkubation mit dem Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) werden andere Proteine aus der Membran herausgelöst, die Na,K-ATPase verbleibt jedoch aufgrund ihrer starken Assoziation mit den Lipiden in der Membran (siehe auch Einleitung 2 Aufbau der Na,K-ATPase). Dabei wird eine 5,2 %ige SDS-Lösung tropfenweise unter kontinuierlichem Rühren zum Enzym gegeben, das durch die ATP-Konzentration von 3 mM in einer gegen SDS stabilen Konformation gehalten wird. Die Trennung der solubilisierten Proteine von den Fragmenten erfolgt bei 200 000 x g durch eine 17-stündige Zonenzentrifugation über einen dreistufigen Saccharosegradienten (10 %, 15 % und 29,4 %ige Lösung). Das resultierende Pellett mit den gereinigten, Na,K-ATPase enthaltenden Membranfragmenten wird in Imidazolpuffer (25 mM Imidazol, 1 mM EDTA, pH 7,5) mit 1 % Saccharose resuspendiert und kann bei -70 °C über Monate gelagert werden, ohne daß die Aktivität der Na,K-ATPase nennenswert sinkt (> 90 % Aktivität nach einem Jahr). Die Präparation wird in Anlehnung an Jørgensen (Jørg74) ausgeführt.

Die gereinigten Fragmente sind fast planar, haben einen Durchmesser von 0,2 - 10 µm und enthalten bis zu 10000 Pumpmoleküle pro Quadratmikrometer (Degu77, Skri81, Herb82, Zamp86, siehe Abbildung 1). Sie enthalten circa 0,8 mg Phospholipid und 0,2 mg Cholesterin pro Milligramm Protein. Die Proteinkonzentration wird nach Lowry (Lowr51) mit BSA als Standard

bestimmt. Die spezifische ATPase-Aktivität ermittelt man durch den Pyruvatkinase-Lactatdehydrogenase-Test (Schwt71): Durch die ATPase-Aktivität gebildetes ADP wird durch die Pyruvatkinase unter Verbrauch von Phosphoenolpyruvat rephosphoryliert, das entstehende Pyruvat durch die Lactatdehydrogenase zu Lactat reduziert. Dabei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert; dieser Abbau von NADH kann bei $\lambda = 340$ nm spektralphotometrisch verfolgt werden. Die Aktivität der verwendeten Membranpräparationen lag bei 37 °C bei 1600 - 2400 $\mu\text{mol P}_i / (\text{h}\cdot\text{mg})$ (entsprechend einer Turnoverrate von 70 - 100 /sec bei einer Molmasse von 150 kD), die Proteinkonzentration zwischen 2 und 3 mg/ml.

2 **Proteolytischer Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin**

Die Präparation von 19kD-Fragment enthaltenden Membranen (den sogenannten 19kD-Membranen) wurde in Anlehnung an Capasso (Capa92) durchgeführt. Vor dem Verdau wurden 0,5 - 1,5 mg des Enzyms über Nacht bei 4 °C gegen 1000 Volumina Histidinpuffer (25 mM Histidin, 1 mM EDTA, pH 7,0) dialysiert, wobei eine high-speed Biotech-Membran (Spectra/Por R 2.1, 1500 MWCO) verwendet wurde.

Am nächsten Tag wurde das Dialysat in einer Beckmann-Airfuge bei 30 Psi (140 000 x g) abzentrifugiert und zu einer Konzentration von ca. 3 mg/ml in Histidinpuffer resuspendiert. TPCK-behandeltes Trypsin wurde zu einer Konzentration von 1 mg/ml in Imidazolpuffer (25 mM Imidazol, 1 mM EDTA, pH 7,5) suspendiert. Die Zugabe von 10 mM RbCl (Endkonzentration) aus einer 100 mM Stammlösung, 0,15 mg/ml Trypsin und einem entsprechenden Volumen aqua dest. zu den Membranen führte zu einer Endproteinkonzentration der ATPase von 1,5 mg/ml und einer Konzentration von 12 mM Histidin (pH 7,0). Das Massenverhältnis ATPase zu Trypsin betrug 10:1. Dieser Ansatz wurde nach vorsichtigem Vortexen 1 h bei 37 °C inkubiert. Trypsininhibitor aus Sojabohnen wurde zu 9 mg/ml in Imidazolpuffer mit 2 mM RbCl suspendiert und im Verhältnis 5:1 (w/w) in Bezug auf Trypsin dem Ansatz zugegeben. 10 Minuten Inkubation bei 37 °C sollten den Verdau stoppen und überdies dazu beitragen, daß Spuren von an die Membran adsorbiertem Trypsin abgelöst werden.

Die Suspension wurde anschließend mit kalter 0,2 mg/ml Trypsininhibitor-Suspension (in Imidazolpuffer mit RbCl) 2:5 bis 1:3-fach verdünnt und 1 h im vorgekühlten TLA 100.2-Rotor bei 4 °C in einer Beckmann-Tischzentrifuge bei 68 000 rpm (163 000 x g) abzentrifugiert. Das Pellett wurde in kalter 1,5 mg/ml Trypsininhibitor-Suspension resuspendiert und verdünnt, und 10' bei 37 °C inkubiert. Dann wurden größere Proteinaggregationen durch 30'' Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge bei maximaler Drehzahl (12 - 13 000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde mit 0,2 mg/ml Trypsininhibitor-Suspension verdünnt und wieder in der Beckmann-Tischzentrifuge

1 h bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellett wurde in Imidazolpuffer mit 2 mM RbCl resuspendiert und verdünnt und erneut der Inkubation bei 37 °C und Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge unterworfen. Der Überstand wurde nochmals 1 h bei 4 °C und 163 000 x g abzentrifugiert und schließlich in Imidazolpuffer mit oder ohne RbCl (zum Einfrieren oder zum sofortigen Verbrauch) zu einer Proteinkonzentration von 1 bis 2 mg/ml aufgenommen. Die Lagerung während der 2 bis 3 Tage dauernden Meßzeit erfolgte im Kühlschrank auf Eis.

Der Verdau mit Chymotrypsin erfolgte in Anlehnung an Shainskaya & Karlish (Shai96): α -Chymotrypsin wurde zu einer Konzentration von 1,5 mg/ml in Imidazolpuffer (25 mM Imidazol, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst. Eine Suspension 19kD-Membranen wurde durch Zugabe von 10 mM (Endkonzentration) RbCl und einem entsprechenden Volumen von fünffach konzentriertem Imidazolstamm-puffer auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml verdünnt und der Puffer mit 200 mM Tris (Base, Endkonzentration ca. 7,2 mM) auf pH 8,0 eingestellt. Die Imidazolendkonzentration betrug 12 mM.

Dieser Ansatz wurde auf 37 °C vorgewärmt und mit α -Chymotrypsin im Verhältnis 1:40 (w/w) zum Membranprotein versetzt. Nach vorsichtigem Vortexen wurde die Suspension 1 h 20' bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden nacheinander 2 mM (Endkonzentration) frisch angesetztes PMSF aus einer 100 mM Stammlösung, 0,2 mM TPCK aus einer 30 mM Stammlösung und 20 mM RbCl hinzugegeben und der Ansatz nach jeder Zugabe jeweils 10' bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen 15-fach mit eiskaltem Imidazolpuffer, der zusätzlich 20 mM RbCl, 1 mM PMSF und 0,1 mM TPCK enthielt, verdünnt und 1 h bei 4 °C und 50 000 rpm (226 000 x g) im TI 50-Rotor (Beckmann) abzentrifugiert.

Das Pellett wurde in Imidazolpuffer mit 20 mM RbCl resuspendiert und 10' bei Raumtemperatur mit 1 mM PMSF und 0,1 mM TPCK inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen erneut mit Imidazolpuffer mit 20 mM RbCl, 0,5 mM PMSF und 0,1 mM TPCK verdünnt und 1 h bei 4 °C abzentrifugiert. Dieses Vorgehen führt zu einer völligen Inaktivierung des Chymotrypsins und zur Ablösung von an die Membranen adsorbierten Proteasemolekülen. Schließlich wurde das Pellett in Imidazolpuffer mit 20 mM RbCl oder ohne RbCl (zum Einfrieren oder zum sofortigen Verbrauch) resuspendiert und im Kühlschrank auf Eis aufbewahrt. Der Ertrag wurde nach Markwell (Mark78) bestimmt und betrug 50 - 60 %.

3 Fluoreszenzfarbstoffe und Meßaufbau

3.1 Kovalente Modifikation der Na,K-ATPase mit FITC

Die Markierung mit FITC erfolgte in Anlehnung an Karlsh (Karl80): Eine Membranpräparation wurde aufgetaut und in einer Beckmann-Airfuge bei 30 Psi (140 000 x g) 15 Minuten abzentrifugiert, gewaschen, und in Tris-Puffer (100 mM TRIS, 2 mM EDTA, pH 9,2) resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde auf 1 (-2) mg/ml eingestellt. Dann wurde FITC aus einer 500 μ M Stammlösung in DMFA hinzupipettiert, so daß die Endkonzentration 10 (-20) μ M betrug. Dies entspricht einem etwa 40 %igen Überschuß an FITC (Molmasse der Na,K-ATPase \approx 150 kD). Nach vier Stunden Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur (25 °C) wurde die Markierung durch 4 bis 5-fache Verdünnung mit eiskaltem Imidazolpuffer (25 mM Imidazol, 1 mM EDTA, pH 7,5) gestoppt; die weitere einstündige Inkubation erlaubte die Dissoziation fluoreszierender Nebenprodukte.

Um überschüssiges FITC zu entfernen, wurde die Suspension über Nacht bei 4 °C gegen Imidazolpuffer mit 1 mg/ml BSA dialysiert, wobei eine high-speed Biotech-Membran (Spectra/Por R 2.1, 1500 MWCO) verwendet wurde. Nach einer weiteren 15-minütigen Zentrifugation in der Air-Fuge (30 Psi) und Resuspendierung in Histidinpuffer (25 mM His, 0,5 mM EDTA, pH 7.2) erhält man quantitativ gekoppelte Na,K-ATPasemoleküle mit einer Restaktivität von unter 1 %.

3.2 Fluoreszenzmessungen

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Perkin-Elmer LS 50B-Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Der Küvettenhalter ist thermostatisiert und mit einem Magnetrührer ausgestattet. In eine Küvette aus optischem Spezialglas (für $\lambda < 400$ nm Quarzglas) wurden nacheinander 1000 μ l Puffer, 200 pmol RH 421 (im Fall eines RH-Experiments) und 9 bis 10 μ g Protein in Form von Membranfragmenten pipettiert und das Erreichen eines stabilen Fluoreszenzniveaus abgewartet. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge bei RH-Experimenten betrug 580 nm (Spaltbreite $\pm 7,5$ nm) bzw. 650 (± 10 nm), bei FITC-Experimenten 490 nm ($\pm 2,5$ oder 5 nm) bzw. 520 nm (± 5 nm).

Titrationen wurden ausgeführt, indem Aliquots hochkonzentrierter Salzlösungen schrittweise zugegeben wurden, bis sich die Fluoreszenz durch weitere Zugabe nicht mehr änderte. Um verschiedene Titrationsexperimente vergleichen zu können, wurden relative Fluoreszenzänderungen $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$ (in %) berechnet, wobei als F_0 die Ausgangsfluoreszenz vor Zugabe der Ionen bezeichnet wird. (Im Fall von RH-Experimenten wurde von dieser Ausgangsfluoreszenz die geringe Eigenfluoreszenz des Farbstoffs vor Zugabe der Membranen abgezogen.) Den verschie-

denen Zuständen der ATPase innerhalb ihres Pumpzyklus konnten spezifische Fluoreszenzniveaus zugeordnet werden (siehe Heys94). Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Experimente bei $16 \pm 0,5$ °C durchgeführt.

3.3 Mechanismus des Fluoreszenzfarbstoffs RH 421

Die Synthese von Styrylfarbstoffen wie RH 421 wurde 1979 erstmalig beschrieben (Loew79); damals wurden sie als elektrochrome Membransonden eingesetzt, um schnelle Änderungen des Membranpotentials von Nervenzellen zu beobachten (Loew79, Grin82). 1988 wurden Signaländerungen des Styrylfarbstoffs RH 160 in (elektrisch kurzgeschlossenen) Na,K-ATPase-enthaltenden Membranfragmenten beobachtet (Klod88).

Wenig später gelang der Nachweis, daß sich RH 421 mit einem Verteilungskoeffizient von $2,5 \times 10^4$ in Lipidmembranen einlagert und dort auf Veränderungen der lokalen elektrischen Feldstärke reagiert (Bühl91, Stür91). Aufgrund seiner großen relativen Fluoreszenzänderungen bei verschiedenen Ladungszuständen in der Membran eignet sich RH 421 besonders gut zur Untersuchung elektrogener Teilreaktionen der Na,K-ATPase. RH 421 ist ein amphiphiles, langgestrecktes Molekül, das sich fast orthogonal in die Membran einlagert (Abbildung 5 a, b), wobei die negativ geladene Sulfonylgruppe in die wäßrige Phase ragt (Loew82). Das Übergangsmoment der Absorption liegt in Richtung der langen Achse des Moleküls. Durch Absorption eines Lichtquants geeigneter Wellenlänge geht der Farbstoff in einen angeregten Zustand über, bei dem die delokalisierte positive Ladung (eingezeichnet am Heterozyklus) sich im Mittel von der negativen Ladung weg zum anderen Ring verschoben hat (siehe Abbildung 5 b).

Sind im Membrandielektrikum Ionen vorhanden, sei es durch Zugabe hydrophober Ionen zu den Membranfragmenten oder durch die Aktivität der Na,K-ATPase, die während ihres Pumpzyklus Ionen aufnimmt und abgibt, so haben diese Ionen eine Änderung des elektrischen Feldes zur Folge. Im Fall positiv geladener Ionen in der Membran bedeutet dies, daß die positive Ladung von RH 421 bei der Absorption *gegen* dieses elektrische Feld in der Membran verschoben werden muß, wozu das absorbierte Lichtquant eine höhere Energie im Vergleich zum Zustand ohne Feld in der Membran besitzen muß. Damit verschiebt sich in diesem Fall das Absorptionsspektrum von RH 421 in Richtung kürzerer Wellenlängen. Im Falle negativer Ladungen in der Membran ist die Verschiebung der positiven Ladung von RH 421 weiter in die Membran hinein erleichtert; es können also auch Lichtquanten niedrigerer Energie absorbiert werden; das Absorptionsspektrum ist rotverschoben.

Dieses Verhalten eines Farbstoffs wird Elektrochromie genannt. Bei reiner Elektrochromie gilt, daß die relative Änderung der Fluoreszenz gleich der relativen Änderung der Absorption ist;

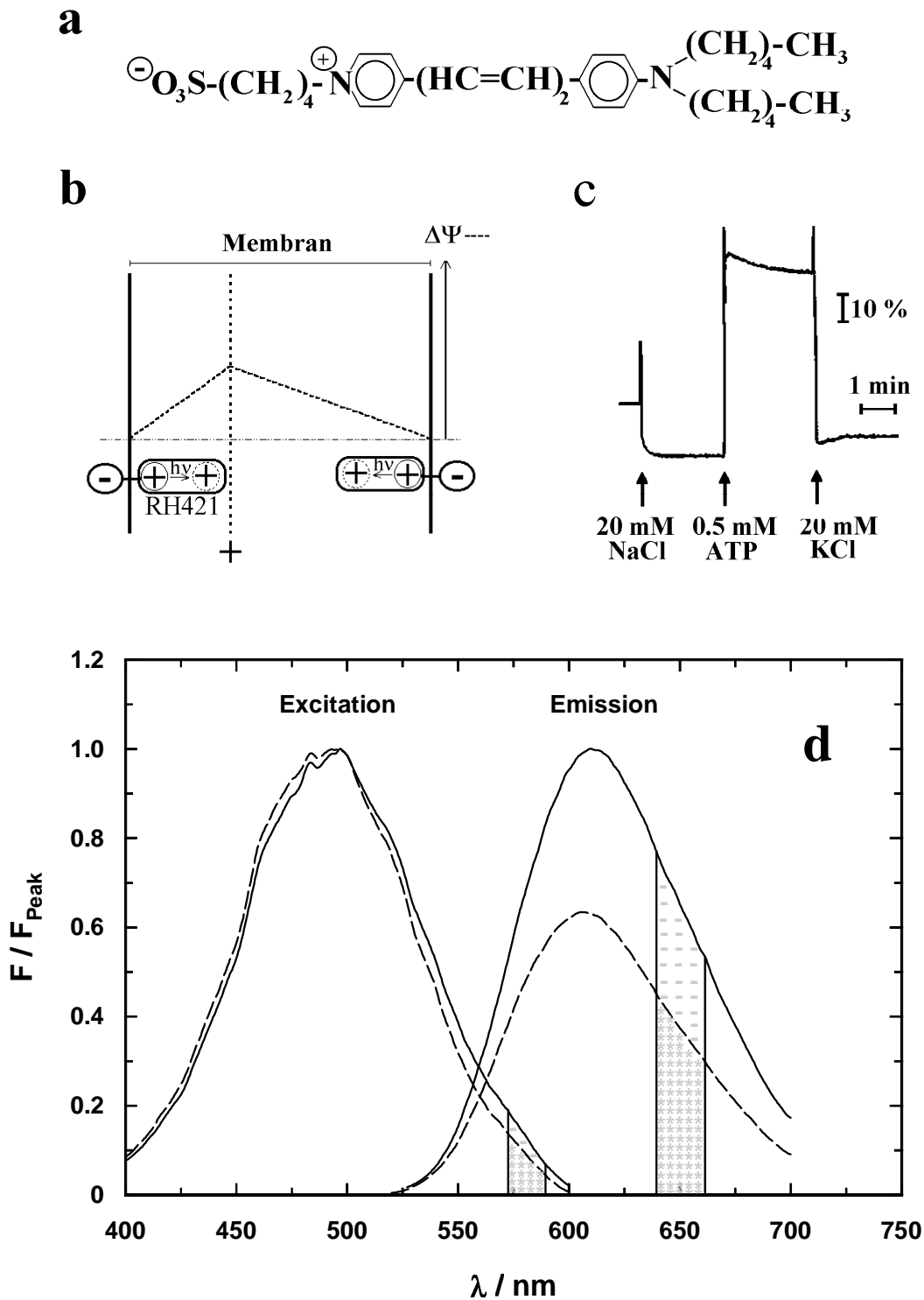


Abbildung 5: **Mechanismus des Fluoreszenzfarbstoffs RH 421.** a) Strukturformel von RH 421; b) vereinfachte Darstellung des Potentialverlaufs in der Membran bei Einlagerung einer positiven Ladung; c) Änderungen der RH 421-Fluoreszenz durch Zugabe verschiedener Substrate (für diese Doktorarbeit ist insbesondere der Fluoreszenzabfall nach Na-Zugabe von Belang, da dieser Na-Effekt in der Mehrzahl der Experimente titriert wird); d) Änderungen der RH 421-Excitationsspektren durch die Substratzugaben in c) und Wirkung auf das Emissionsspektrum; Pufferbedingungen: Standardpuffer (25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, pH 7,2) mit 5 mM MgCl₂ (c) : MgSO₄), T = 16 °C (c) : 20 °C).

der Farbstoff reagiert auf lokale Änderungen des elektrischen Feldes in der Membran nur durch eine Verschiebung des Maximums seiner Absorption, das Absorptionsspektrum ändert sich aber nicht in seiner Form (Abbildung 5 d). In Abbildung 5 b wurde vereinfachend angenommen, daß das Membrandielektrikum homogen ist und damit durch *eine* Dielektrizitätskonstante beschrieben werden kann. Die (diskreten) Ladungen in der Membran wurden in erster Näherung als Ladungsebene behandelt. Unter diesen Annahmen hat das Potential in der Membran den dargestellten Verlauf.

3.4 Mechanismus des kovalenten Markers FITC

FITC wurde 1980 zum ersten Mal von Karlsh eingesetzt, um Konformationsübergänge der Na,K-ATPase zu charakterisieren (Karl80). Der Farbstoff bindet überwiegend an Lysin 501 in der ATP-Bindungstasche (Farl84, Abbo91, Xu89, Linz99), die auf der großen cytoplasmatischen Schleife des Proteins liegt. Damit kann das Enzym nicht mehr durch ATP phosphoryliert werden, wohl aber durch Acetylphosphat oder durch anorganisches Phosphat (backdoor phosphorylation in Anwesenheit von K^+).

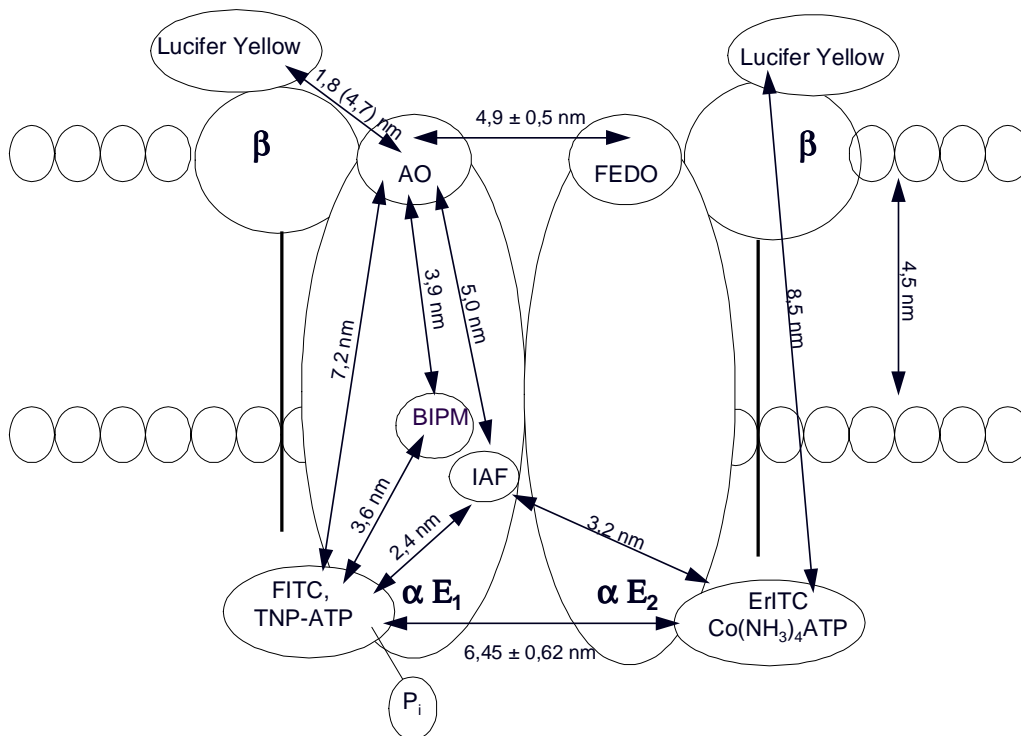


Abbildung 6: **Distanzen zwischen verschiedenen Fluoreszenzmarkern**, die an ein Dimer der Na,K-ATPase gekoppelt werden können, gemessen mit FRET (aus Linz98). Mit freundlicher Genehmigung von Holger Linnertz.

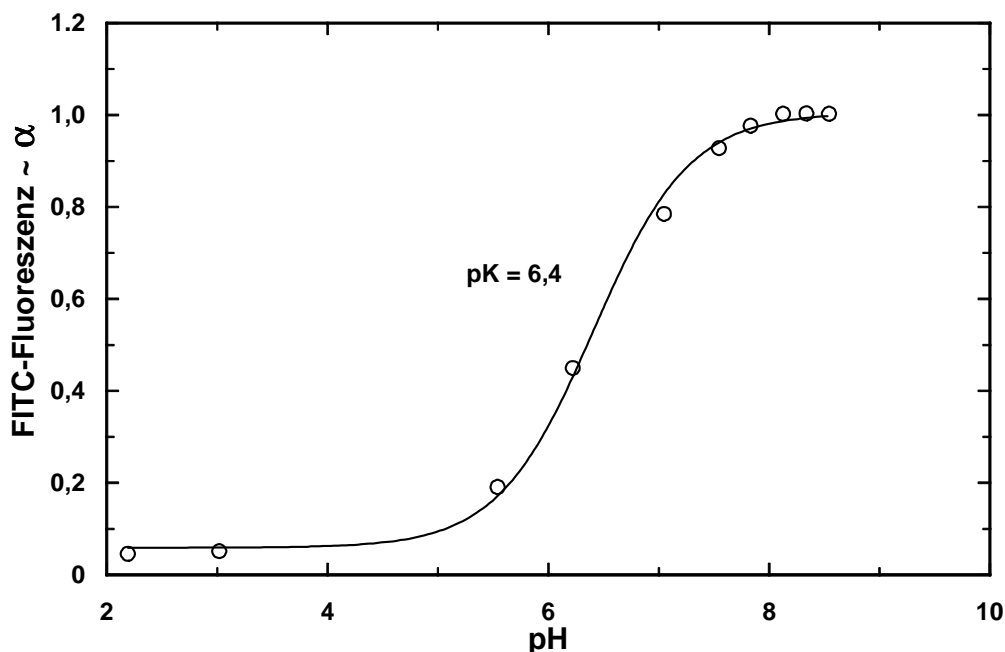


Abbildung 7: **pH-Abhängigkeit der FITC-Fluoreszenz**, gemessen an markierter Na,K-ATPase. Die Fluoreszenz ist direkt proportional zum Dissoziationsgrad α des zweiten Protons von FITC. Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 20 °C. Daten aus Paul92.

Kontrollmessungen mit RH 421 zeigten, daß die Ionenbindung an FITC-gekoppelte Pumpen unverändert ist. FITC reagiert auf Änderungen des pH in seiner Umgebung: Der Chromophor ist eine zweiwertige Brönstedt-Säure und nur die vollständig deprotonierte Form trägt zur Fluoreszenz bei (Abbildung 7).

Bei pH-Änderungen bleiben sein Absorptionsspektrum und Fluoreszenzmaximum unverändert. Anhand der Fluoreszenzamplitude läßt sich jedoch das Dissoziationsgleichgewicht des zweiten Protons verfolgen, das in Lösung einen pK von 6,7 hätte (Molecular Probes). Schon Bewegungen polarer Seitenketten der Pumpe um wenige Ångström können Änderungen der lokalen Protonenkonzentration hervorrufen, die dann den Dissoziationsgrad von FITC beeinflußt. Dies führt bei höherer lokaler Protonenkonzentration zu einer geringeren Fluoreszenz, bei geringerer Protonenkonzentration in einem bestimmten Bereich zu einer erhöhten Fluoreszenz. Mittlerweile ist eine Fülle verschiedener konformationssensitiver Farbstoffe bekannt (siehe Abbildung 6), die unter anderem dazu verwendet wurden, um Distanzen zwischen den Bindungsstellen verschiedener Liganden zu bestimmen (Amle92, Fort88, Lin96, Linz98).

4 Auswertungsverfahren

Das Ergebnis einer Titration ist zunächst eine Tabelle von Fluoreszenzwerten gegen die Zeit. Die relativen Fluoreszenzänderungen ΔF bezogen auf die Ausgangsfluoreszenz F_o nach Erreichen eines stabilen Fluoreszenzniveaus bzw. vor Zugabe von Salzen (siehe Punkt 3.2) ist leicht zu berechnen:

$$\frac{\Delta F}{F_o} = \frac{F - F_o}{F_o}$$

Bei längeren Messungen und vielen Zugaben machten sich jedoch sowohl die Verdünnung der Ausgangssuspension und damit eine fortschreitende Abnahme der Fluoreszenz als auch die häufig auftretende, leicht negative Drift bei RH-Experimenten bemerkbar. Die gemessenen Fluoreszenzkurven wurden daher mit dem Programm Mower (für OS/2) bezüglich beider Effekte korrigiert: Die negative Drift kann durch Einfügen einer Regressionsgeraden ermittelt und herausgerechnet werden; die durch die Volumenzunahme bedingte Fluoreszenzabnahme wird durch die Eingabe der zupipettierten Aliquot-Volumina mit folgender Funktion korrigiert:

$$\frac{\Delta F_{kor}}{F_o} = - \frac{\Delta V \cdot a}{\Delta V + b}$$

Die Parameter a und b können experimentell bestimmt und dann von Hand eingegeben werden. Resultiert die Fluoreszenzabnahme ausschließlich aus der Volumenzunahme, müßte unter bestimmten Bedingungen (keine Umlagerung von Farbstoffmolekülen aus der Wasser- in die Lipidphase, kein Quenching) $b = V_o = 1000 - 1010 \mu\text{l}$ (Anfangsvolumen in der Küvette) und $a = 100 \%$ gelten, d. h. bei einer (hypothetischen) Zugabe von $1000 \mu\text{l}$ Puffer müßte sich die Fluoreszenz aufgrund der Verdünnung halbieren. Durch Zugabe von Puffer ermittelte Eichgeraden für a und b ergaben eine gute Übereinstimmung mit diesen Werten.

Messungen wurden 3 - 10 mal in identischer Weise ausgeführt und die resultierenden Fluoreszenzniveaus gemittelt. An die gemittelten Daten wurde dann eine hyperbole Bindungskurve oder eine Hillfunktion gefittet und die apparenten Affinitäten und Hillkoeffizienten der Bindung bestimmt. Als Standardabweichung wurde die Standardabweichung des Mittelwerts aller von jeder Messung separat bestimmten Parameter angegeben. Die Meßgenauigkeit lag meist bei 5 - 10 %.

5 Fit- und Simulationsprogramme und Routinen

Zur Auswertung der Fluoreszenzkurven wurde das Programm Mower (unter C++ für OS/2) verwendet, das im Rahmen einer Diplomarbeit von E. Ströbele 1996 in diesem Labor entwickelt wor-

den war. Empirische Fits an die ermittelten Kurven Fluoreszenz gegen Ionenkonzentration wurden mit Fig. P (für Windows, Fig. P Software Corporation, Durham, USA) erstellt, Simulationen und Fits mit Modellen wurden mit in FORTRAN 77 selbst programmierten Programmen vorgenommen (je nach Modell MaMgCom1-8 bzw. MaMgfi20). Dazu wurde zur Lösung der Gleichungssysteme bzw. Minimieren der Fehlerfunktion auf Standardroutinen zugegriffen (Listing von MaMgCom6 siehe Anhang). Zur Ermittlung freier Mg-Konzentrationen in Anwesenheit von Chelatoren wurde das Programm EQCAL (Biosoft, Cambridge) verwendet.

6 Chemikalien

Bei Fluka, Neu-Ulm, gekauft waren BSA (zur Dialyse), CsCl, L-Histidin, MgCl₂ und RbCl.

Von Merck, Darmstadt, waren BaCl₂, CaCl₂, α -Chymotrypsin (aus Rinderpankreas), CuSO₄, Dimethylformamid (DMFA, für die Spektroskopie), EDTA, Ethanol (für die Spektroskopie), Imidazol, KCl (Suprapur), NaCl (Suprapur), Natriumtartrat, Trypsin (TPCK-behandelt, aus Rinderpankreas) und SrCl₂.

Bei Riedel-de Haen, Seelze, gekauft waren LiCl, Na₂CO₃ und NaOH.

Von Sigma, Deisenhofen, bezogen wurden Cholinchlorid (ChCl, dreimal kristallisiert), Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC, Isomer I), Ouabain, Phosphoenolpyruvat (PEP), Strophanthin, TPCK (N-tosyl-L-phenylalanin chloromethylketon) und Trypsininhibitor (aus Sojabohnen), Laktatdehydrogenase (LDH, aus Kaninchenmuskel), Na₂-ATP, NADH (Grad II), und Pyruvatkinase (PK, aus Kaninchenmuskel) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).

BSA (Standard II für Proteinbestimmungen) war von BIORAD, der Styrylfarbstoff RH 421 von Molecular Probes, Eugene, OR, USA, D(+)-Saccharose von Roth, Karlsruhe, SDS von Pierce, Rockford, IL, USA, und TRIS (reinst) von Serva, Heidelberg.

Der Dialyseschlauch (high speed Spectra/Por R 2.1, 1500 MWCO) stammte von der Firma Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA.

Alle Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in pro-analysi-Qualität verwendet.

Ergebnisse

1 Untersuchungen an proteolytisch verdauten Na,K-ATPase-Präparationen

Alla Shainskaya und Steven Karlish zeigten 1990, daß Na,K-ATPase-Moleküle aus Schweineinier unter bestimmten Bedingungen durch Trypsin in vier unterschiedlich große, membranständige Teilstücke zerlegt werden können (Karl90, Capa92). Die so erzeugte Präparation nennt man 19kD-Membranen. Das fragmentierte Protein in dieser Präparation kann drei Na-Ionen bzw. zwei Rb(K)-Ionen pro Molekül okkludieren; alle ATP-abhängigen Funktionen sind durch die Abspaltung der cytoplasmatischen Schleifen verlorengegangen. Während die Rb-Okklusion der 19kD-Membranen nicht zu unterscheiden war von der der nativen Präparation, war die Na-Okklusion trotz gleicher Bindungskapazität (3 Na / Molekül) verändert: Die hyperbole Aktivierung durch Na^+ wird kooperativ ($n_H = 1,9$) und die apparente Affinität sinkt um 72 % (i. e. $K_{1/2}$ steigt auf etwa 7/4 des Ursprungswerts). Beim Versuch, dieses Ergebnis mit fluorimetrischer Methodik zu bestätigen, konnten durch Na-Titrations (mit RH 421 als Fluoreszenzfarbstoff) mit Kaninchenenzym zwar unterschiedliche apparente Na-Affinitäten der 19kD-Membranen bzw. des nativen Enzyms ermittelt werden, es war aber wegen der Ungenauigkeit der Messungen schwierig zu entscheiden, ob diese Unterschiede auch signifikant waren (Schwp94). Überdies könnte theoretisch auch das Schweineenzym ein anderes Bindungsverhalten als das Kaninchenenzym aufweisen. Daher sollten 19kD-Membranen sowohl vom Kaninchen als auch vom Schwein mit verbesserter Meß- und Auswertetechnik auf ihre Na-Affinität und Na/Mg-Kompetition untersucht werden, und dieser Ansatz durch die Charakterisierung der neuen, chymotryptisch verdauten Membranfraktion (Shai96) mit dem Farbstoff RH 421 erweitert werden.

1.1 Charakterisierung der Membranpräparationen und Bindung der Herzglycoside Ouabain und Strophantidin

Zur Charakterisierung der Membranpräparationen wurden jeweils Standardexperimente durchgeführt, d. h. zu mit dem Farbstoff RH 421 äquilibrierten Membranfragmenten wurden nacheinander 5 mM Mg^{2+} , 40 mM Na^+ , 0,5 mM ATP, und 20 mM K^+ zugegeben und die resultierenden Fluoreszenzamplituden ausgewertet.

Die Bindung der Herzglycoside an die verdauten Na,K-ATPase-Präparationen wurde nicht als fortlaufende Titration gemessen, indem man nach und nach Aliquots einer bestimmten Konzen-

tration zugibt (siehe Mat & Met 2 und 3.2), da sie sehr langsam verläuft und die Messungen zu lange gedauert hätten, als daß man eine Inaktivierung der thermolabilen 19kD- bzw. chymotryptischen Membranpräparationen hätte völlig ausschließen können. Statt dessen wurde, nachdem sich der Farbstoff RH 421 in die Fragmente eingelagert hatte und ein stabiles Fluoreszenzniveau erreicht war, nur ein bis zweimal ein Aliquot des entsprechenden Herzglycosids zugegeben und jeweils abgewartet, bis sich das Bindungsgleichgewicht eingestellt hatte, i. e. die Fluoreszenz stabil geworden war. Die Messungen mit der chymotryptisch zweitverdauten Membranpräparation wurden bei 8 °C durchgeführt, um thermischer Destabilisierung vorzubeugen. Die resultierenden Ein- oder Zweipunktmessungen wurden schließlich zu einer einzigen Titrationskurve zusammengefaßt; an diese Daten wurde eine hyperbole Bindungskurve gefittet (Michaelis-Menten-Verhalten):

$$\frac{\Delta F}{F_o} = \Delta F_{max} \cdot \frac{c(\text{Stroph})}{K_{\frac{1}{2}} + c(\text{Stroph})}$$

Beim nativen Enzym sind solche Vorsichtsmaßnahmen unnötig; dennoch wurden auch hier nur maximal sieben bis acht Aliquots während einer Titration zugegeben, da als Lösungsmittel für Strophanthidin Ethanol verwendet wurde, das in höheren Mengen zu Artefakten führen kann.

Im Fall von Ouabain wurde nur in Form einer Ja/Nein-Entscheidung geprüft, ob eine (hochaffine) Bindung bei einer Konzentration von 50 µM stattfand, und wie groß die resultierende Fluoreszenzamplitude war.

Die vorhandene oder verlorengangene Bindung von Herzglycosiden läßt Schlüsse über die Intaktheit der topologischen Organisation des Enzymrumpfes zu, da zur hochaffinen Bindung nicht nur die Schleife M₁-M₂, sondern auch Bereiche auf den Helices M₄, M₅, M₆ und M₇ benötigt werden (Ling98). Da in 19kD- und chymotryptischen Präparationen die cytoplasmatischen Verbindungen zwischen M₂-M₃, M₄-M₅ und M₆-M₇ fehlen, können die verschiedenen Fragmente M₁/M₂, M₃/M₄, M₅/M₆, M₇-M₁₀ und M_β durch thermische Bewegungen auseinanderdriften (Thermolabilität). In diesem Fall ist keine Ionenbindung mehr möglich und die Ouabainbindung findet nur noch mit sehr niedriger Affinität statt. Daher spricht eine vorhandene hochaffine Herzglycosidbindung für eine überwiegend intakte topologische Organisation des Proteinrumpfes.

Da K-Bindung und die (auf der extrazellulären Seite stattfindende) Bindung von Herzglycosiden antagonistisch verlaufen, wurde auch geprüft, ob die Zugabe von 20 mM KCl den durch Glycosidbindung hervorgerufenen Fluoreszenzanstieg revertieren kann.

Alle Versuche mit Herzglycosiden wurde in 5 mM Histidinpuffer, 0,5 mM EDTA, pH 7,2, durchgeführt, zu dem 5 mM Mg²⁺ pipettiert wurde. Tabelle 1 faßt die Ergebnisse der Charakterisierung der Membranpräparationen aus Kaninchen- und Schweineniere durch Standardexperimente und die Resultate der Herzglycosidbindung zusammen:

	$\frac{Na-Eff}{\%}$	$\frac{ATP-Eff}{\%}$	$\frac{K-Eff}{\%}$	$\frac{Ouab-Eff}{\%}$	$\frac{KiR}{(+/-)}$	$\frac{Stroph-Eff}{\%}$	$\frac{KiR}{(+/-)}$	$\frac{Stroph-Aff^{-1}}{\mu M}$
Kanin.								
nat. Enz.	- 35	+ 32	- 24	+ 16	n. d.	+ 20 - 25	+	0,35 ± 0,02
19kD	- 15	(Δ - 3)	Δ + 5	+ 4	n. d. ?	+ 9 - 13	+	2,4 ± 0,5
Chtr. I	- 11	n. d.	Δ + 3	+(2-) 4	+ ?	+ 9 (-13)	+	1,5 ± 0,4
Schwein								
nat. Enz.	- 11	+ 15	-9	+ 4	+ ?	+ 10 - 14	-	/
19kD	- 9	(Δ - 3)	Δ + 2	+ 3	n. d.	+ 3 - 5	-	/
Chtr. I	- 3		Δ + 1	+ 1	n. d. ?	+ 1 - 2	-	/

Tabelle 1: Charakterisierung der Membranpräparationen aus Kaninchen- und Schweineniere durch Standardexperimente; Herzglycosidbindung und deren Revertierung durch K-Zugabe.

STANDARDEXPERIMENTE: Pufferbedingungen: 25 mM Histidin und 0,5 mM EDTA, pH 7,2. Die Zugabe von 5 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, 0,5 mM Na₂-ATP und 20 mM KCl führt zu Änderungen der RH 421-Fluoreszenz, angegeben als Na-, K- usw. -Effekt in % der Ausgangsfluoreszenz (Vorgehen siehe Mat & Met 3.2 und 4), T = 16 °C. VERSUCHE MIT HERZGLYCOSIDEN: Pufferbedingungen: 5 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, pH 7,2, 5 mM MgCl₂. Zugabe des Herzglycosids führt zu einer Änderung der RH 421-Fluoreszenz, angegeben in % der Ausgangsfluoreszenz. Eventuelle Revertierung dieses Fluoreszenzanstiegs durch Zugabe von KCl (KiR) angegeben durch + (Revertierung vorhanden), - (nicht vorhanden), n. d. (nicht nachweisbar, meist aufgrund zu geringer Amplituden des Herzglycosideffektes oder Revertierung zu langsam und damit schwer unterscheidbar von Drift). Angabe der Affinität⁻¹ des Enzyms zum Herzglycosid Strophantidin in μM, / nicht bestimmt. T = 16 °C, außer beim chymotryptischen Intermediat (8 °C).

Die geringere Dichte an Na,K-ATPasemolekülen in den Membranpräparationen aus Schweineniere machte die Bestimmung der Strophantidinaffinität der 19kD- und chymotryptischen Membranen unmöglich, da die Meßgrenze für RH-Titrations bei 4 - 5 % Gesamteffekt liegt. Daher wurde auch auf die Bestimmung der Strophantidinaffinität des nativen Schweineenzym verzichtet, da der Vergleich mit den verdauten Fraktionen somit nicht möglich war.

1.2 Na-Bindung und Na/Mg- Konkurrenz

In Histidinpuffer mit hoher Ionenstärke (25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, 300 mM ChCl, pH 7,2) wurden für alle drei Präparationen Na-Titrations bei 0 und 10 mM Mg²⁺ durch sukzessive Zugabe kleiner Aliquots durchgeführt (Auswertungsverfahren siehe Mat & Met 4). Die Halbsättigungskonstanten für die Na-Bindung wurden durch Fit der Hill-Gleichung an die gemittelten Daten bestimmt:

$$\frac{\Delta F}{F_o} = \frac{\Delta F_{max} \cdot c(Na^+)^n}{K_{1/2}^n + c(Na^+)^n}$$

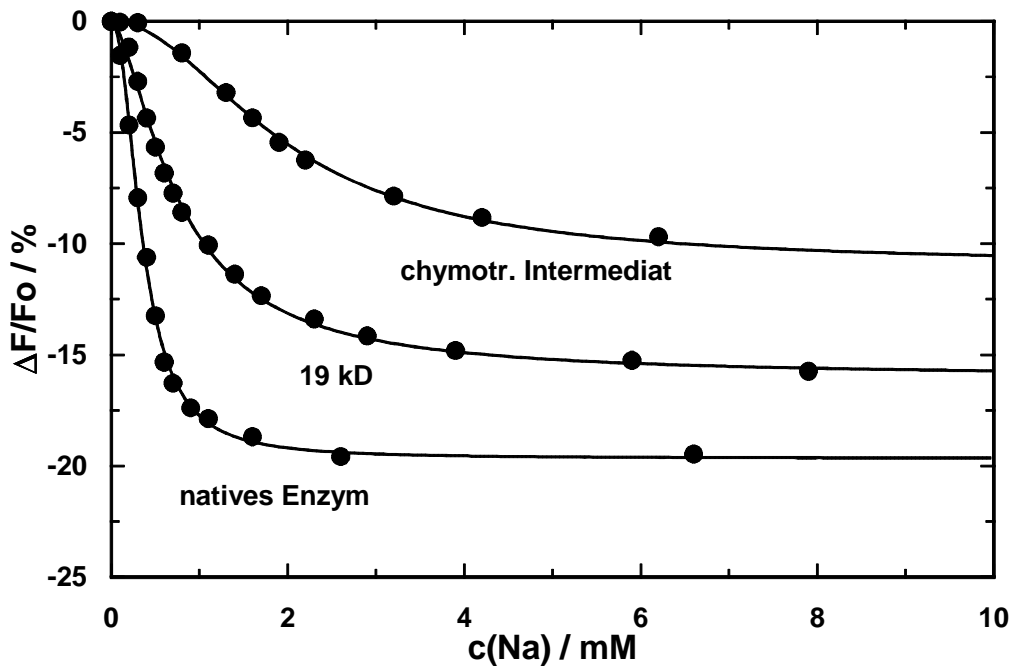


Abbildung 8: Na-Bindung an verschiedene Präparationen der Na,K-ATPase aus Kaninchen: Titrationskurven. Titration des Na-induzierten Abfalls der RH 421-Fluoreszenz durch schrittweise Zugabe von NaCl, Vorgehensweise beschrieben im Material- & Methodenteil. Natives Enzym in der Standardkonzentration 9-10 $\mu\text{g/ml}$, 19kD und chymotryptisches Intermediat 20-22 $\mu\text{g/ml}$. Pufferbedingungen: Standardpuffer (25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, pH 7,2) mit hoher Ionenstärke (300 mM Cholinchlorid), $T = 8^\circ\text{C}$.

Abbildung 8 zeigt die Na-Bindungskurven für Kaninchenenzym ohne Mg^{2+} im Puffer. Durch den Verdau des Enzyms sinkt die apparente Affinität $^{-1}$ für Na^+ von $0,35 \pm 0,01$ mM (natives Enzym) über $0,76 \pm 0,02$ mM (19kD-Fragmente) auf $2,0 \pm 0,1$ mM (chymotryptisch zweitverdaute Membranfraktion). Die Hillkoeffizienten der Na-Bindung bleiben dabei weitgehend unverändert ($n_H(\text{nativ}) = 2,0 \pm 0,1$; $n_H(19\text{kD}) = 1,6 \pm 0,1$; $n_H(\text{Chtr. E.}) = 2,0 \pm 0,1$). Die Gesamtfluoreszenzamplitude des Na-Signals sinkt dabei von -20 % beim nativen Enzym über -16 % bei den 19kD-Membranen auf -11 % bei der chymotryptischen Präparation.

Die Abnahme der Fluoreszenzamplitude vom nativen Enzym zur 19kD-Membranfraktion wird auf die Veränderung der Dielektrizitätskonstante in der Umgebung der Farbstoffmoleküle durch die Abspaltung des cytoplasmatischen Teils der Pumpe zurückgeführt (Schwep94): Styrylfarbstoffe reagieren sensitiv auf Änderungen der dielektrischen Konstante in ihrer Umgebung. Nach Verdau von ca. 50 % der Proteinmasse der Na,K-ATPase wird der cytoplasmatische Teil des Moleküls ($\epsilon \approx 3$) durch Elektrolyt ($\epsilon \approx 80$) ersetzt. Dies sollte zu einer Reduktion der Fluoreszenzantwort führen, was auch beobachtet wird. Die weitere Abnahme der Gesamtamplitude von den 19kD-Membranen zur chymotryptisch verdauten Fraktion läßt sich nur durch eine Inaktivierung eines

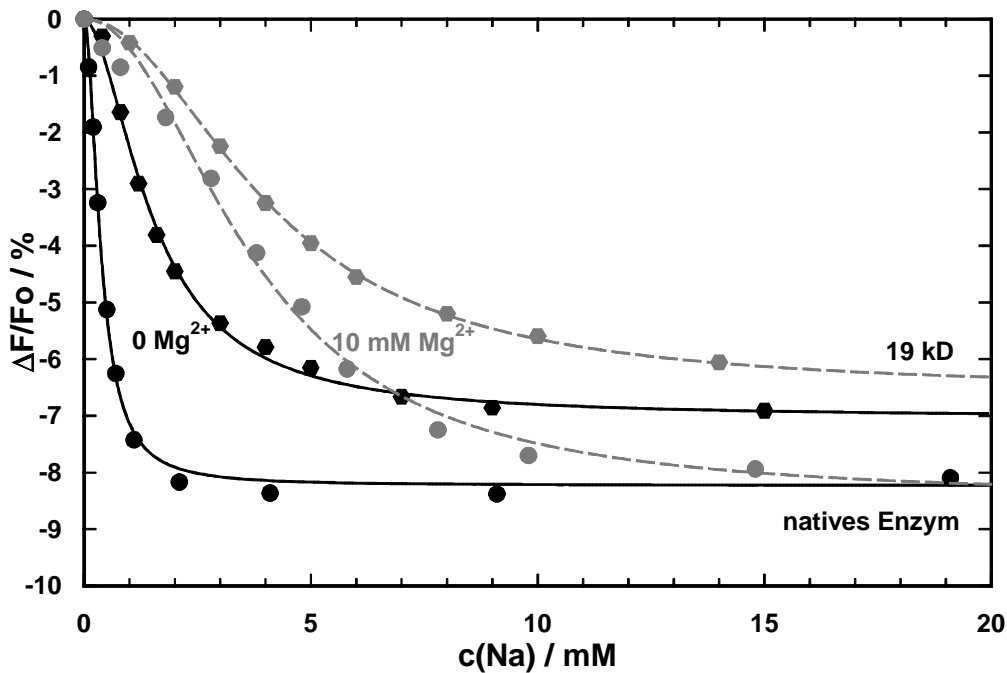


Abbildung 9: Na-Bindung an verschiedene Präparationen der Na,K-ATPase aus Schwein: Titrationskurven (RH 421). Standardpuffer mit 300 mM ChCl und 0 oder 10 mM MgCl_2 , natives Enzym 10 $\mu\text{g/ml}$, 19kD bzw. Chtr. Enzym 20-22 $\mu\text{g/ml}$, 8 °C.

Teils der Pumpmoleküle (ca. 30 %) erklären, da die Abspaltung von 10 Aminosäuren vom 16 kD-Fragment der β -Untereinheit und vier bis sechs Aminosäuren vom N-Terminus der α -Untereinheit zu keiner nennenswerten Veränderung der Abmessungen des Proteinrumpfes führen dürften. Die Inaktivität eines Teils der Präparation ist ein Hinweis darauf, daß der weitere Verdau mit Chymotrypsin die Stabilität des Proteinrumpfes negativ beeinflußt hat.

Der Trend, daß die apparente Affinität für Na^+ vom nativen Enzym zu den verdauten Präparationen abnimmt, läßt sich auch beim Schweineenzym beobachten (siehe Abbildung 9): $K_{1/2}^{\text{Na}}$ (nat. E.) = $0,37 \pm 0,02$ mM, $K_{1/2}^{\text{Na}}$ (19kD) = $1,5 \pm 0,1$ mM, $K_{1/2}^{\text{Na}}$ (Chtr. E.) $\approx 3,5$ mM (letzteres nicht gezeigt). Der Effekt ist damit noch ausgeprägter als beim Kaninchenenzym. Bei dem Wert für die chymotryptische Präparation handelt es sich mehr um eine Schätzung, da die Gesamtamplitude des Na-Effekts hier bei unter 4 % liegt und damit unterhalb der Meßgrenze für RH 421-Titrationsen (siehe auch Tabelle 1). Die Hillkoeffizienten der Na-Bindung bleiben dabei, wie auch beim Kaninchenenzym, weitgehend unverändert (n_H (nativ) = $1,9 \pm 0,1$; n_H (19kD) = $1,8 \pm 0,1$; n_H (Chtr. E.) $\approx 1,5$). Alle Messungen wurden bei 8 °C durchgeführt.

Komplexer gestalten sich die Beobachtungen bei der Kompetition zwischen Mg^{2+} und Na^+ : Beim nativen Kaninchenenzym kann Mg^{2+} mit Na^+ gut kompetieren und den Halbsättigungswert für Na^+ bei 9,5 bzw. 10 mM freier Mg-Konzentration von 0,35 mM auf $6,2 \pm 0,1$ mM steigen

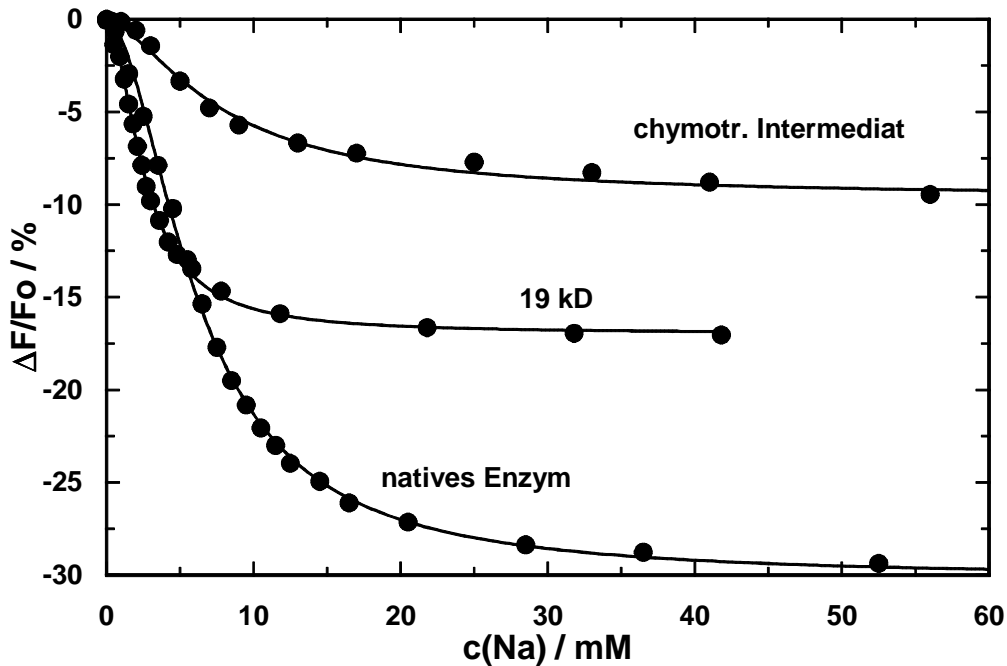


Abbildung 10: Na-Bindung an verschiedene Präparationen der Na,K-ATPase aus Kaninchen: Titrationskurven (RH 421) in Anwesenheit von 10 mM Mg²⁺. Standardpuffer mit 300 mM ChCl, natives Enzym 10 μg/ml, 19kD 20-22 μg/ml, 8 °C.

lassen. Bei der 19kD-Präparation tritt dies nur noch in abgeschwächter Form auf: $K_{1/2}^{Na}$ steigt nur auf einen Wert von $2,6 \pm 0,05$ mM (ausgehend von 0,76 mM), nach chymotryptischem Verdau (von 2,0 mM bei 0 Mg²⁺) auf $7,8 \pm 0,6$ mM (Abbildung 10).

Dieses Ergebnis zeigt, daß in den 19kD-Membranen Mg-Ionen deutlich schlechter mit Na-Ionen kompetieren können als im nativen Enzym. Dieser Effekt wurde näher untersucht: Abbildung 11 zeigt Na-Titrations an 19kD-Membranen bei verschiedenen Mg-Konzentrationen; in Abbildung 12 sind die Halbsättigungskonzentrationen für die Na-Bindung gegen die Konzentration an freiem Mg²⁺ aufgetragen. Deutlich zu sehen ist, daß die komplexe Kompetition zwischen Mg²⁺ und Na⁺ beim nativen Enzym (siehe auch Abschnitt 3.2.2) übergeht in eine einfache Kompetition um eine Bindungsstelle, also eine lineare Charakteristik zeigt:

$$K_{1/2}^{Inh.} = K_{1/2}^0 \cdot \left(1 + \frac{c_{Inh.}}{K_{Inh.}} \right)$$

Aus der linearen Regression läßt sich $K_{Inh.}$ bestimmen: Die Steigung $m = 0,19 \pm 0,02 = \frac{K_{1/2}^0}{K_{Inh.}}$, der Achsenabschnitt $a = K_{1/2}^0 = 0,83 \pm 0,09$ mM, damit ist $K_{Inh.} = 4,37$ mM.

Auch beim Schweineenzym ist die Kompetition von Mg²⁺ mit Na⁺ bei den verdauten Membranfraktionen weniger effektiv (Abbildung 9): Die Halbsättigungskonstanten für die Na-Bindung des nativen Enzyms von $3,7 \pm 0,2$ mM steigt lediglich moderat auf $4,1 \pm 0,2$ mM bei den 19kD-

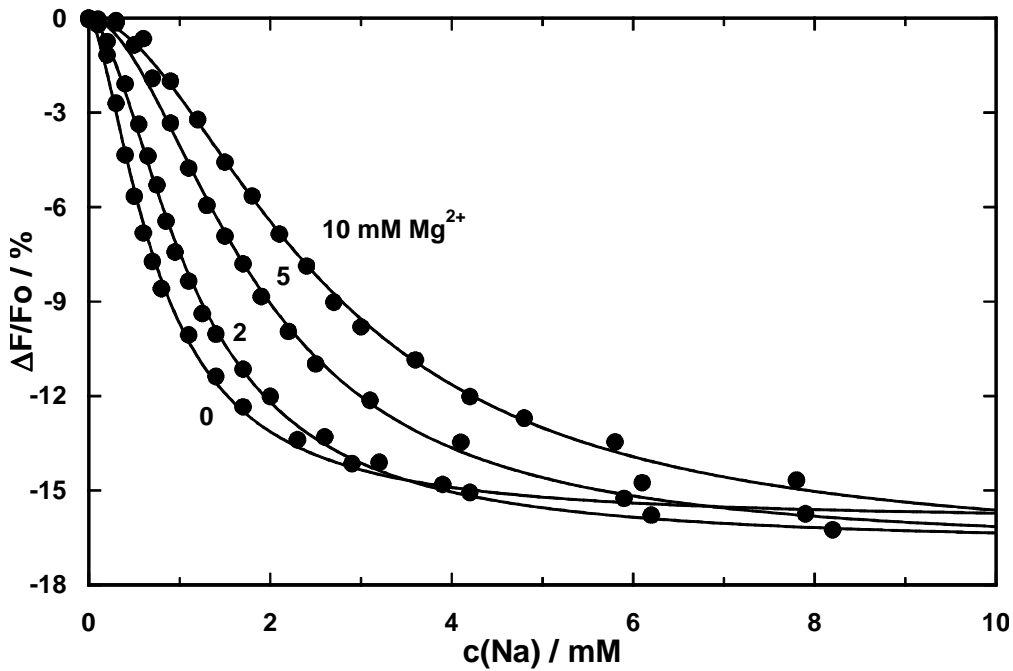


Abbildung 11: Na-Bindung an die 19kD-Präparation der Na,K-ATPase aus Kaninchen: Titrationskurven (RH 421) bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen. Standardpuffer mit 300 mM ChCl und 0 bis 10 mM $MgCl_2$, Proteinkonzentration 19kD 20-22 $\mu g/ml$, 8 °C.

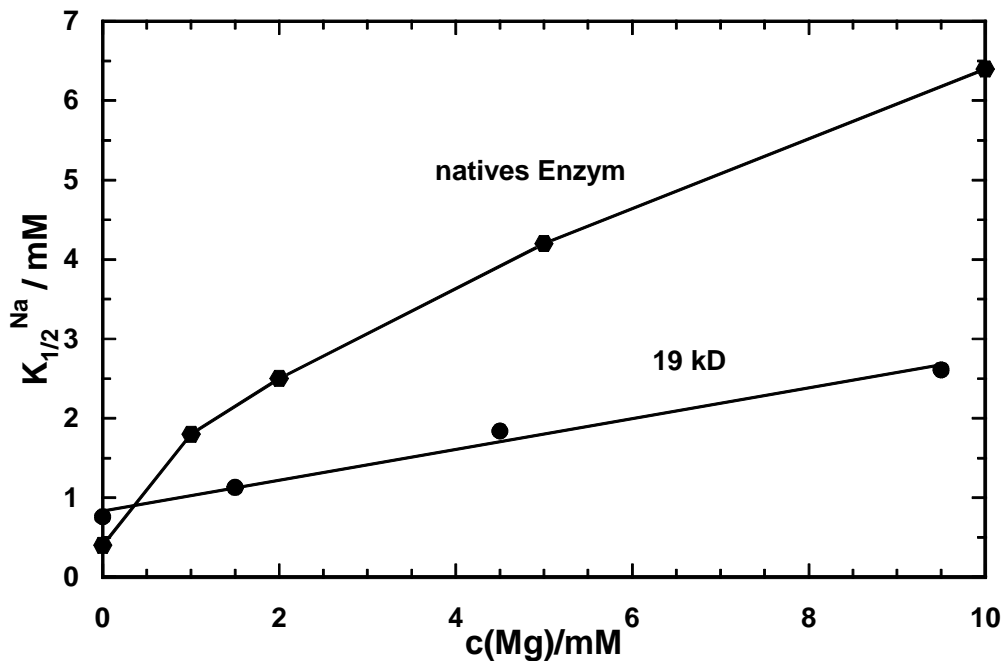


Abbildung 12: Na-Bindung an die 19kD-Präparation der Na,K-ATPase aus Kaninchen: Halbsättigungskonstanten der RH 421-Titrationskurven bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen. Standardpuffer mit 300 mM ChCl und 0 bis 10 mM $MgCl_2$, natives Enzym 9 $\mu g/ml$, 19kD 20-22 $\mu g/ml$, 8 °C.

	$\frac{K_{1/2}^{Na}(0Mg)}{mM}$	n_{Hill}	$\frac{\Delta F_{max}}{\%}$	$\frac{K_{1/2}^{Na}(10Mg)}{mM}$	n_{Hill}	$\frac{\Delta F_{max}}{\%}$	$\frac{K_{1/2}^{Na}(+Mg)}{K_{1/2}^{Na}(-Mg)}$
Kaninchen							
nat. Enzym	0,35 ± 0,01	2,0 ± 0,1	- 20	6,2 ± 0,1	1,8 ± 0,05	- 30	17,7 : 1
19kD	0,76 ± 0,02	1,6 ± 0,1	- 16	2,6 ± 0,05	1,8 ± 0,05	- 17	3,4 : 1
Chtr. E.	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	- 11	7,8 ± 0,6	1,6 ± 0,2	- 10	3,9 : 1
Schwein							
nat. Enzym	0,37 ± 0,02	1,9 ± 0,1	- 8	3,7 ± 0,2	2,1 ± 0,2	-8	10 : 1
19kD	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	- 7	4,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1	-7	2,9 : 1
Chtr. E.	≈3,5	≈1,5	< 4	≈5	≈ 1,9	< 3	1,4 : 1

Tabelle 2: **Ergebnisse der Na-Titrations an verschiedenen Na,K-ATPase-Präparationen (RH 421).** Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, 300 mM ChCl, pH 7,2. Angabe der Halbsättigungskonzentration des Na-Effekts in mM ohne und in Anwesenheit von 10 mM Mg²⁺, Hillkoeffizient n_H und maximale Fluoreszenzänderung in % der Ausgangsfluoreszenz. Inhibitorischer Effekt von Mg²⁺ auf die Na-Bindung als Verhältnis der Halbsättigungskonzentrationen in An- bzw. Abwesenheit von Mg²⁺. T = 8 °C.

Fragmenten bzw. auf etwa 5 mM beim chymotryptischen Zweitverdau. Insgesamt ließ sich das Schweineenzym erheblich schlechter untersuchen als die Präparationen aus Kaninchen, da die Pumpen in dieser in deutlich höherer Dichte vorliegen und damit die maximalen Fluoreszenzantworten (siehe Tabelle 1) deutlich größer ausfallen. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Na-Affinität bzw. Na/Mg-Kompetition.

2 Vergleich zwischen Messungen mit RH 421 und FITC

Zunächst wurde eine FITC-gekoppelte Na,K-ATPase-Fraktion hergestellt, indem man nach der Methode von Karlsh (Karl80) vorging (siehe Mat & Met 3.1, Schn99). Zur Charakterisierung der Präparation wurde ihre K-Affinität bestimmt: FITC-gekoppelte Na,K-ATPase zeigt laut Literatur (Reph86, Karl80, Smir93b, Smir95) zwei verschiedene Fluoreszenzniveaus, ein höheres, das allen E₁-Zuständen zugeordnet wird, und ein niedrigeres, das die E₂-Konformation anzeigen soll. FITC ändert seine Fluoreszenzeigenschaften auch abhängig von der Ionenstärke (Lin93), daher wurden alle Messungen bei 300 mM ChCl durchgeführt, um deren relative Änderungen möglichst klein zu halten. Kontrollexperimente bestätigten, daß eine weitere Erhöhung der Ionenstärke (durch die Erhöhung der ChCl-Konzentration um 150 mM auf 450 mM) zu keinen relevanten Fluoreszenzänderungen mehr führte (< 2 %). Abbildung 13 zeigt eine K-Titration durch sukzessive Zugabe kleiner Mengen KCl.

Die relative Fluoreszenzänderung vom Zustand E₁ zum Zustand E₂(K₂) betrug etwa (-) 35 %.

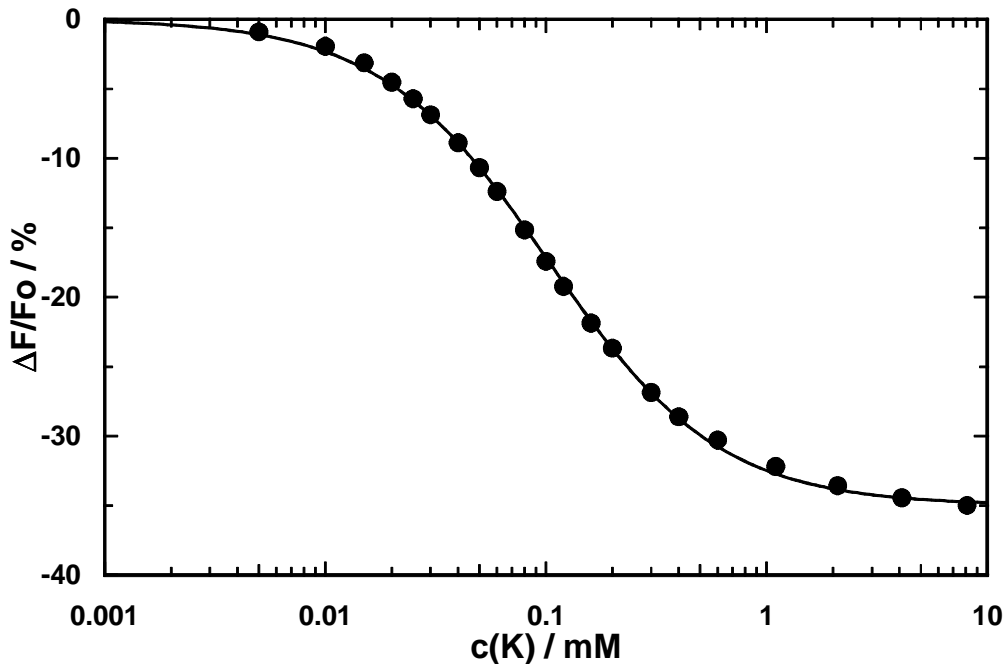


Abbildung 13: **K-Bindung an FITC-markierte Na,K-ATPase (Kaninchen): Titrationskurven.** Titration des K-induzierten Abfalls der FITC-Fluoreszenz durch schrittweise Zugabe kleiner Mengen KCl, Vorgehensweise beschrieben im Material & Methodenteil. Enzym in der Standardkonzentration 9-10 $\mu\text{g/ml}$, Pufferbedingungen: Standardpuffer (25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, pH 7,2) mit hoher Ionenstärke (300 mM Cholinchlorid), $T = 16^\circ\text{C}$

Dieser hohe Wert ist nur mit einer hoch gereinigten und in dichter Packung vorliegenden Na,K-ATPase-Präparation zu erreichen. Der ermittelte Wert für die K-Halbsättigungskonstante lag bei $K_{1/2}^K = 0,10 \pm 0,003$ mM und stand damit in sehr guter Übereinstimmung mit früheren Messungen (Hegy81, Karl80). Der Hillkoeffizient war $n_H = 1,13 \pm 0,003$. Der durch die Bindung von K^+ induzierte Abfall der Fluoreszenz kann durch Zugabe von Na^+ revertiert werden, da Na^+ das Enzym wieder in einen E_1 -Zustand überführt ($\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1\text{Na}_3$). Abbildung 14 zeigt Revertierungsexperimente bei verschiedenen vorgelegten K-Konzentrationen.

Die aus diesen Titrations ermittelten Halbsättigungskonzentrationen für die Na-Bindung sind in der Legende zu Abbildung 14 angegeben. Die Hillkoeffizienten lagen durchgehend bei $1,83 \pm 0,02$, unabhängig von der eingesetzten K-Konzentration. Diese Ergebnisse können nun mit Resultaten aus in gleicher Weise durchgeführten RH-Experimenten verglichen werden: Abbildung 15 zeigt die Halbsättigungskonstanten der Na-Bindung gemessen mit FITC und RH 421 in Abhängigkeit von der K-Konzentration (die zugehörigen RH-Titrations sind in Abschnitt 3.1.2 Na/K-Kompetition Abbildung 20 dargestellt). Offensichtlich sind die mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermittelten Werte einander sehr ähnlich. Dies gilt auch für die Hillkoeffizienten (n_H (RH 421) = $1,91 \pm 0,07$). Die Messungen mit FITC und RH 421 führen damit zu konsistenten

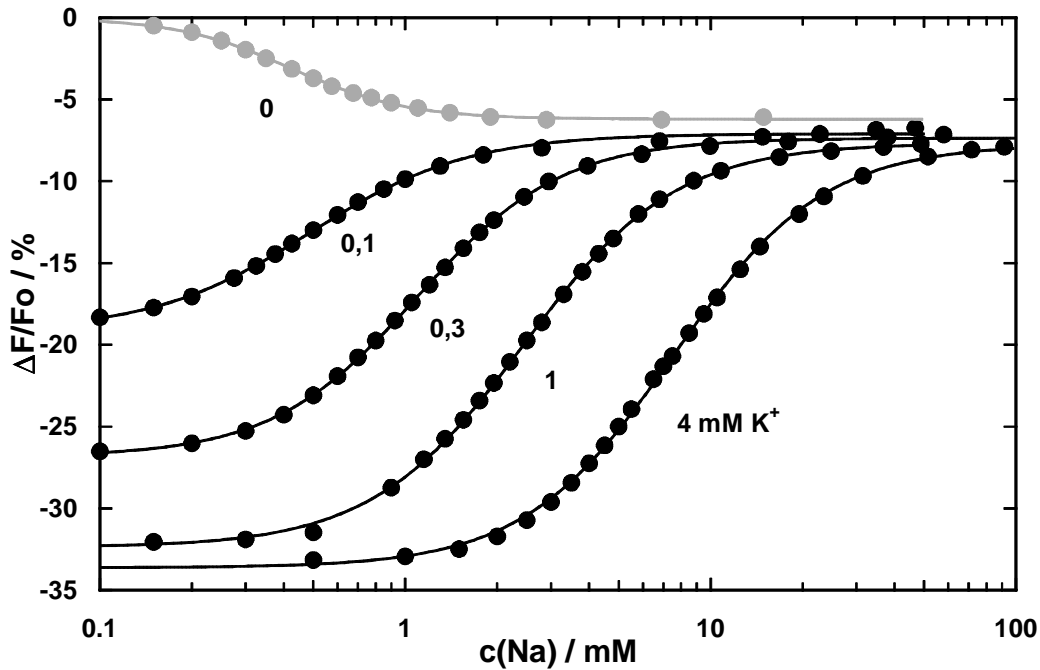


Abbildung 14: Na-Bindung an FITC-markierte Na,K-ATPase (Kaninchen): Titrationskurven: Revertierung des K-Signals durch Na-Zugabe. 9 $\mu\text{g/ml}$ Enzym, Standardpuffer mit hoher Ionenstärke, 16 $^{\circ}\text{C}$. Halbsättigungskonstanten: $K_{1/2}^{\text{Na}} = 0,42 \pm 0,03 \text{ mM}$ (0 K), $0,49 \pm 0,02 \text{ mM}$ (0,1 mM K), $1,09 \pm 0,01 \text{ mM}$ (0,3 mM K), $1,86 \pm 0,05 \text{ mM}$ (0,66 mM K), $2,43 \pm 0,24 \text{ mM}$ (1 mM K), $4,72 \pm 0,05 \text{ mM}$ (2 mM K) und $7,53 \pm 0,18 \text{ mM}$ (4 mM K).

Ergebnissen.

Bisher wurde die apparente Na-Affinität von FITC-markierter Na,K-ATPase bestimmt, indem man Na-(Rück-)Titrations bei verschiedenen K-Konzentrationen durchführte und dann aus den bestimmten Halbsättigungskonstanten die Affinität im Falle *ohne* vorgelegte K-Konzentration extrapolierte. Wie in Abbildung 14 zu sehen, hat aber auch die Na-Zugabe allein eine signifikante Fluoreszenzänderung zur Folge, obwohl das Enzym durch Na-Gabe nicht seine Konformation wechselt ($\text{E}_1 \rightarrow \text{Na}_3\text{E}_1$). Konsistent mit dieser Beobachtung sättigen die Rücktitrationskurven *mit* K^+ im Puffer auch nicht bei der Ausgangsfluoreszenz, sondern bei einem niedrigeren Wert, nämlich auf demselben Fluoreszenzlevel, das durch die Na-Zugabe erreicht wird ($-7,1 \pm 0,2 \%$). Wie schon oben erwähnt stellt der Na-induzierte Abfall der Fluoreszenz keine Reaktion des Farbstoffs auf die Änderung der Ionenstärke dar, daher war es interessant festzustellen, ob er tatsächlich die Bindung von Na^+ ans Enzym reflektiert. Diese Interpretation lag nahe, da schon die Halbsättigungskonstanten der FITC- und RH 421-Messungen ohne vorgelegtes K^+ recht gut übereinstimmten (siehe Abbildung 15). Um diese These zu untermauern wurden Na-Titrations mit RH 421 und FITC ohne vorherige K-Gabe, dafür bei verschiedenen Mg-Konzentrationen durchgeführt und

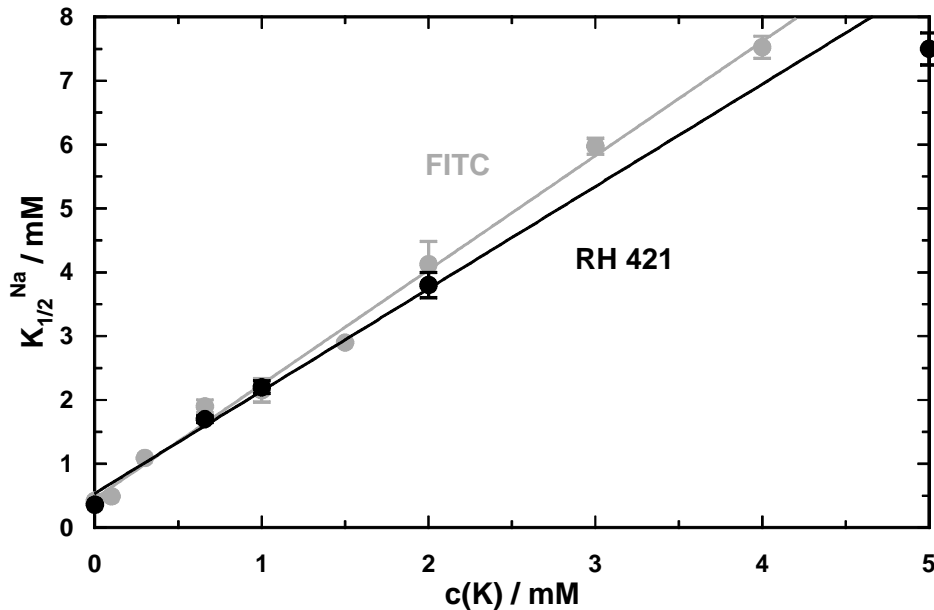


Abbildung 15: Na-Bindung an FITC-markierte Na,K-ATPase (Kaninchen): Halbsättigungskonzentrationen der Rücktitrationskurven (FITC) bzw. der RH 421-Na-Titrationskurven (aus Abbildung 20). 9 $\mu\text{g/ml}$ Enzym, Standardpuffer mit hoher Ionenstärke, 16 °C

miteinander verglichen. Die Zugabe von Mg^{2+} führt bei Verwendung von FITC nicht zu signifikanten Fluoreszenzänderungen ($< 1,5\%$), daher wurde das Fluoreszenzniveau vor Na-Zugabe auf null gesetzt (bei RH 421 führt Mg-Gabe zu einer Zunahme der Fluoreszenz, siehe 3.2.2 Mg-Effekt und Na/Mg-Kompetition). Wenn der beim FITC-markierten Enzym beobachtete Abfall der Fluoreszenz durch Na-Zugabe tatsächlich die Bindung von Na^+ ans Enzym anzeigt, so sollte diese auch eine Abhängigkeit von Mg-Ionen zeigen, die ja mit Na^+ kompetieren (siehe Abschnitt 3.2.2). Abbildung 16 und 17 zeigen Na-Titrationskurven mit FITC und RH 421 bei verschiedenen vorgelegten Mg-Konzentrationen.

Die ermittelten Werte für die Halbsättigungskonstanten sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Hillkoeffizienten lauteten folgendermaßen: n_H (RH 421) = $2,02 \pm 0,04$, n_H (FITC) = $2,49 \pm 0,04$, und waren in beiden Fällen unabhängig von der Mg-Konzentration. In Abbildung 18 sind die aus diesen Titrationskurven ermittelten Halbsättigungskonstanten gegen die Mg-Konzentration aufgetragen. Sowohl aus Tabelle 3 als auch aus Abbildung 18 lässt sich entnehmen, daß mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen praktisch identische $K_{1/2}$ -Werte ermittelt worden sind. Dies demonstriert, daß die durch Na-Zugabe hervorgerufene Abnahme der Fluoreszenz die Bindung von Na^+ an das Enzym anzeigt. Beide Fluoreszenzänderungen konnten auch durch die Zugabe sättigender K-Konzentrationen revertiert werden.

FITC ist als kovalent an das Protein gekoppelter Marker ein konformationssensitiver Fluores-

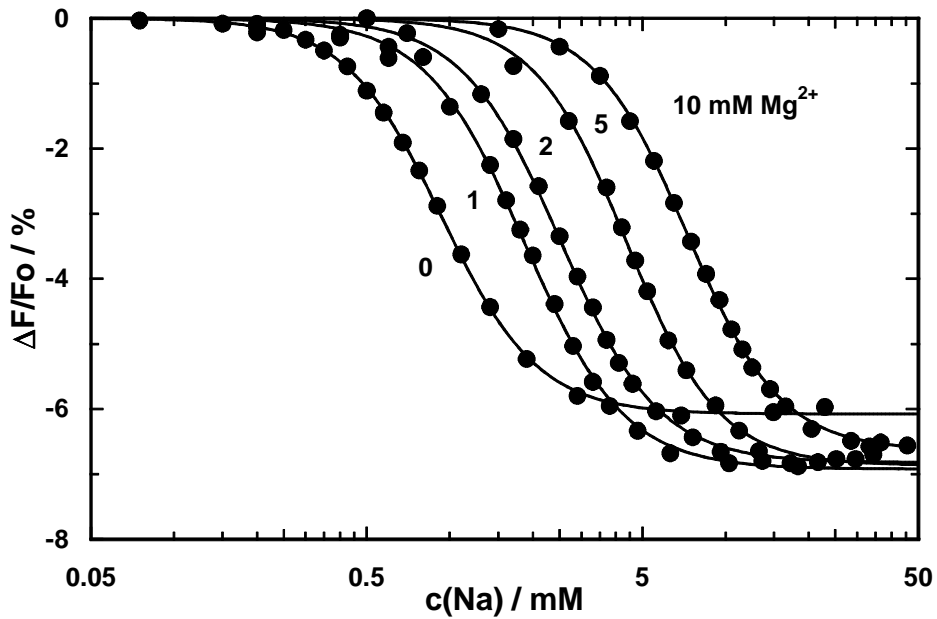


Abbildung 16: Na-Bindung an FITC-markierte Na,K-ATPase bei verschiedenen Mg-Konzentrationen: Titrationskurven. Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 0,02 mM EGTA, 300 mM ChCl, pH 7,2 und 0 bis 10 mM MgCl₂. Enzymkonzentration 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 16 °C.

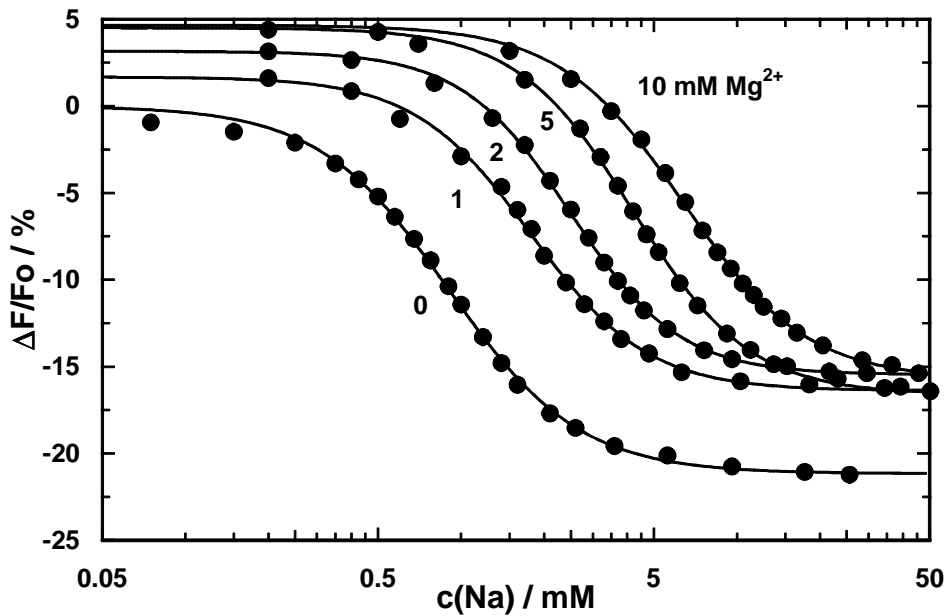


Abbildung 17: Na-Bindung an native Na,K-ATPase bei verschiedenen Mg-Konzentrationen: RH 421-Titrationskurven. Pufferbedingungen wie in Abbildung 16.

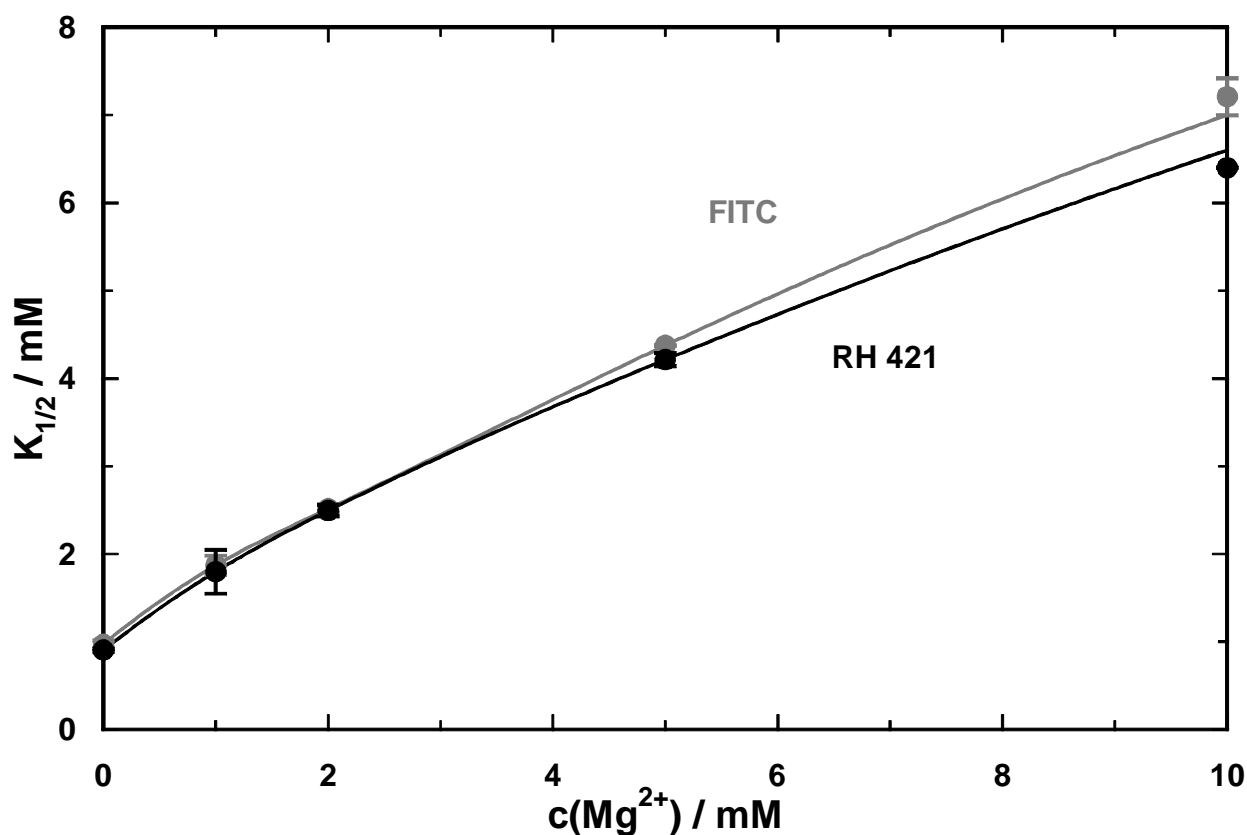


Abbildung 18: Na-Bindung an FITC-markierte bzw. native Na,K-ATPase bei verschiedenen Mg-Konzentrationen: Halbsättigungskonzentrationen der Titrationskurven. Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 0,02 mM EGTA, 300 mM ChCl, pH 7,2 und 0 bis 10 mM MgCl₂. Enzymkonzentration 9 µg/ml, 16 °C.

c(Mg ²⁺)	$K_{1/2}^{Na}$ (RH 421) / mM	$K_{1/2}^{Na}$ (FITC) / mM
0	0,90 ± 0,02	0,97 ± 0,04
1	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,1
2	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1
5	4,2 ± 0,1	4,4 ± 0,1
10	6,4 ± 0,1	7,2 ± 0,2

Tabelle 3: Na-Bindung an FITC-markierte bzw. native Na,K-ATPase bei verschiedenen Mg-Konzentrationen: Halbsättigungskonzentrationen der Titrationskurven. Bedingungen wie in Abbildung 18.

zenzfarbstoff (siehe Mat & Met 3.4). Dennoch läßt sich mit FITC die Na-Bindung an das Enzym verfolgen, obwohl sich dabei seine (Haupt-) Konformation nicht ändert. Daraus muß man schließen, daß die Na-Bindung mit einer Änderung der Konformation einhergeht, die durch den Farbstoff angezeigt wird. Diese Umlagerung in der Konformation wird hervorgerufen von der Bindung von Na^+ an die Ionenbindungsstellen, die sich im membranständigen Part abspielt, weit entfernt vom cytoplasmatischen Teil, in dem die FITC-Bindestelle liegt. Daraus läßt sich schließen, daß die Ionenbindung durch diese Konformationsänderung Auswirkungen auf den Zustand der Nukleotidbindestelle (die in der Nähe der FITC-Bindestelle liegt) hat, und damit diese voneinander entfernt liegenden funktionellen Teile der Pumpe in der Lage sind, miteinander zu "kommunizieren" (siehe auch 3.3 Wirkung von Nukleotiden auf Na-Bindung und Mg-Effekt). Da der durch Na-Bindung hervorgerufene Abfall der Fluoreszenz nur 7 % beträgt, der Übergang von E_1 zu E_2 jedoch zu einer 35 %igen Abnahme der Fluoreszenz führt, ist die Konformationsänderung von E_1 nach Na_3E_1 wohl nicht von globaler Natur wie der Übergang zwischen den (Haupt-) Konformationen E_1 und E_2 .

3 **Kompetition zwischen Na^+ und ein- bis dreifach geladenen Kationen**

3.1 **Einfach positiv geladene Ionen**

3.1.1 **Alkalimetallionen**

Generell bestehen mehrere Möglichkeiten, den Einfluß von Metallionen auf die Na-Bindung zu testen: 1.) Man kann verschiedene Konzentrationen an (kompetierenden) Kationen vorlegen und dann durch eine Na-Titration ermitteln, wie sich die Na-Bindung dadurch verändert hat (es zeigt sich meist eine reduzierte apparente Affinität), oder man legt 2.) eine sättigende bzw. nahezu sättigende Na-Konzentration vor und macht den dadurch hervorgerufenen Fluoreszenzabfall durch sukzessive Zugabe kleiner Konzentrationen des kompetierenden Ions rückgängig. Zur Untersuchung der Wirkung der Alkalimetallionen wurde zunächst die zweite Vorgehensweise gewählt. Die Zugabe dieser Ionen allein hat keine signifikante Fluoreszenzänderung zur Folge (< 5 %), konsistent damit sättigen die Rücktitrationskurven beim Ausgangswert der Fluoreszenz, der auf Null gesetzt worden war. Abbildung 19 zeigt die Revertierung des Na-Signals durch die Alkalimetallionen Li^+ , K^+ , Rb^+ , und Cs^+ .

Die ermittelten Halbsättigungskonstanten bzw. Hillkoeffizienten sind in der Legende zu Abbildung 19 angegeben. Damit staffeln sich die Affinitäten der Pumpe für Alkalimetallionen fol-

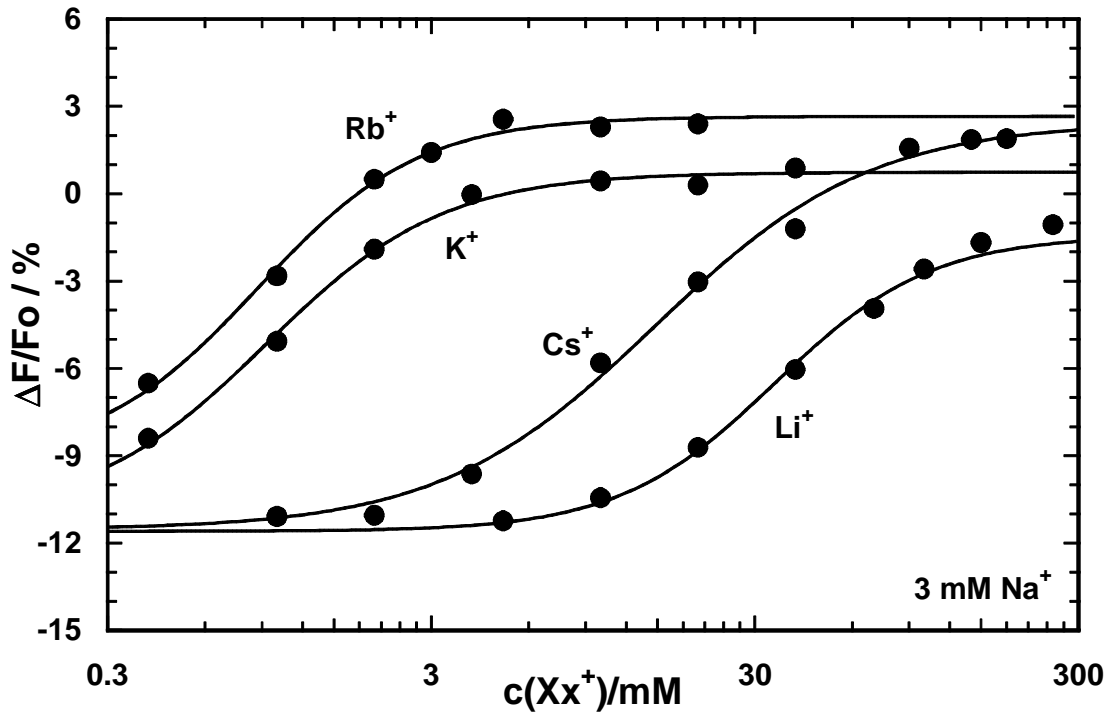


Abbildung 19: **Bindung von Alkalimetallionen an die Na,K-ATPase: Revertierung des Na-Effekts (RH 421).** Pufferbedingungen: Standardpuffer (25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, pH 7,2) mit hoher Ionenstärke (300 mM ChCl) und 3 mM NaCl, ohne Mg^{2+} . Enzymkonzentration 9 $\mu\text{g/ml}$, $T = 16^\circ\text{C}$. Die ermittelten Halbsättigungskonstanten bzw. Hillkoeffizienten lauten wie folgt: $K_{1/2}(\text{Rb}) = 0,8 \pm 0,05 \text{ mM}$, $K_{1/2}(\text{K}) = 0,9 \pm 0,1 \text{ mM}$, $K_{1/2}(\text{Cs}) = 12,4 \pm 1,7 \text{ mM}$, $K_{1/2}(\text{Li}) = 33 \pm 3 \text{ mM}$; $n_H(\text{Rb}) = 1,74 \pm 0,02$, $n_H(\text{K}) = 1,40 \pm 0,09$, $n_H(\text{Cs}) = 1,50 \pm 0,16$, $n_H(\text{Li}) = 1,85 \pm 0,16$.

gendermaßen: $\text{Aff}(\text{Rb}^+) \geq \text{Aff}(\text{K}^+) \gg \text{Aff}(\text{Cs}^+) > \text{Aff}(\text{Li}^+)$. Diese Staffelung stimmt nicht mit der Staffelung der Radien der hydratisierten bzw. dehydratisierten Ionen überein. Die Messungen wurden bei hoher Ionenstärke (300 mM ChCl) und in Gegenwart von 3 mM Na^+ (ohne Mg^{2+}) durchgeführt.

3.1.2 Na/K-Kompetition

Exemplarisch für die Alkalimetalle wurde die Kompetition von Na^+ und K^+ auch mit der ersten Vorgehensweise untersucht. Abbildung 20 zeigt Na-Titrationsen bei verschiedenen vorgelegten K-Konzentrationen.

Deutlich zu sehen ist, daß die apparente Affinität für Na^+ bei zunehmender K-Konzentration abnimmt. Die Werte für die Halbsättigungskonstanten sind in der Legende zu Abbildung 20 angegeben. Der Hillkoeffizient lag durchgehend bei $1,91 \pm 0,07$. In Abbildung 21 sind die Halb-

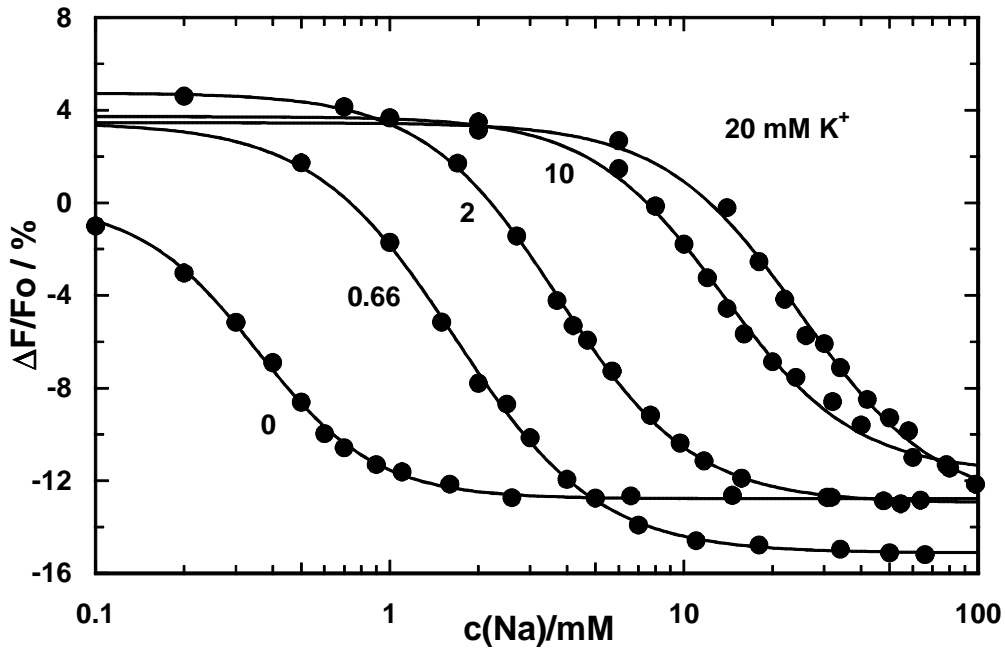


Abbildung 20: Na-Bindung bei verschiedenen K-Konzentrationen: RH 421-Titrationskurven. Standardpuffer mit hoher Ionenstärke und den entsprechenden Konzentrationen an KCl, T = 16 °C. Halbsättigungskonstanten: $K_{1/2}^{Na} = 0,35 \pm 0,01$ mM (0 K), $1,67 \pm 0,03$ mM (0,66 mM K), $2,16 \pm 0,08$ mM (1 mM K), $3,75 \pm 0,17$ mM (2 mM K), $7,8 \pm 0,25$ mM (5 mM K), $13,5 \pm 0,6$ mM (10 mM K) und $25,0 \pm 1,8$ mM (20 mM K). $n_H = 1,91 \pm 0,07$ (durchgehend).

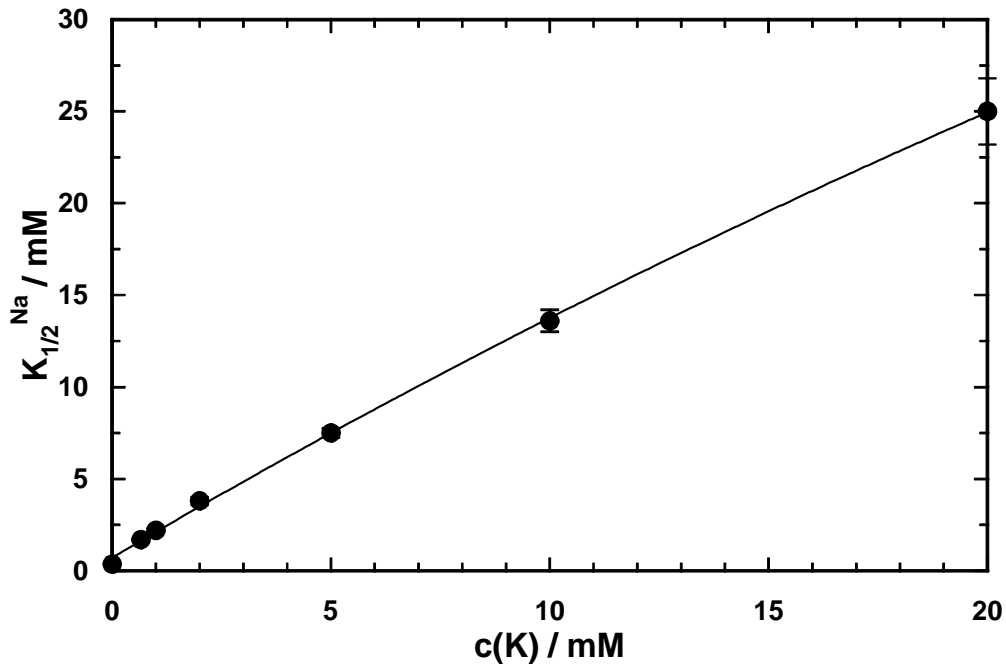


Abbildung 21: Na-Bindung bei verschiedenen K-Konzentrationen: Halbsättigungskonstanten der RH 421-Titrationskurven. Bedingungen wie in Abbildung 20.

sättigungskonstanten für die Na-Bindung gegen die eingesetzte K-Konzentration aufgetragen: Im Bereich zwischen 0 und 5 mM ergibt sich ein linearer Verlauf, der bei höheren Konzentrationen jedoch leicht abflacht.

3.1.3 Cholinchlorid

Bei niedriger Ionenstärke liegt die Na,K-ATPase teils in E_1 , teils in E_2 -Konformation vor, bei hoher Ionenstärke überwiegend in der E_1 -Konformation (Grel91). Will man eine Titration aus dem E_1 -Zustand beginnen, erhöht man daher die Ionenstärke mit Cholinchlorid (ChCl). Als einfach positiv geladenes Ion könnte Cholin jedoch mit Na-Ionen kompetieren. Um dies zu testen, wurde in Abwesenheit von Mg^{2+} bzw. in Gegenwart von 10 mM Mg^{2+} der Effekt von ChCl auf die Na-Bindung ermittelt. Tatsächlich schien ChCl die apparente Affinität der Pumpe für Na^+ jedoch zu erhöhen: Die Halbsättigungskonstante für die Na-Bindung fiel von $0,55 \pm 0,12$ mM in Abwesenheit von ChCl auf $0,33 \pm 0,02$ mM bei 10 bzw. $0,30 \pm 0,03$ mM bei 100 mM ChCl und stieg leicht auf $0,46 \pm 0,01$ mM bei 300 mM ChCl an. Dabei blieben der Hillkoeffizient ($1,4 \pm 0,05$) wie auch die maximale Fluoreszenzamplitude (etwa -18 %) unverändert. Das gleiche Verhalten zeigte sich bei einer Konzentration von 10 mM Mg^{2+} im Puffer: Die Ausgangshalbsättigungskonstante von $9,8 \pm 0,2$ mM fiel auf $8,6 \pm 0,7$ mM bei 10 mM ChCl bzw. auf $7,3 \pm 0,2$ mM bei 100 mM ChCl, um dann auf $8,0 \pm 0,7$ mM bei 300 mM ChCl zu steigen. Dabei blieb der Hillkoeffizient konstant bei $1,75 \pm 0,04$. Die maximale Fluoreszenzamplitude der Na-Bindung sank jedoch von -34% bei 0 bzw. 10 mM ChCl auf -28% bei 100 mM und auf -25% bei 300 mM ChCl. Dies ist jedoch auf den Mg-Effekt zurückzuführen, der bei zunehmender Ionenstärke geringer wird (siehe 3.2.2 Mg-Effekt und Na/Mg-Kompetition).

3.2 Zweifach positiv geladene Ionen

3.2.1 Erdalkalimetalle

Bei der Zugabe steigender Konzentrationen zweiwertiger Kationen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} oder Ba^{2+} zeigte sich in allen Fällen eine Zunahme der Fluoreszenz, gefolgt von einer stärkeren Abnahme. Teile dieser Fluoreszenzantwort stellten sich jedoch als (vermutlich Farbstoff-) Artefakte heraus: Bildet man die Differenz aus Messungen mit nativem Enzym und mit durch einstündiges Erhitzen auf 58 °C denaturiertem Enzym, so zeigt sich eine signifikante Fluoreszenzzunahme nur noch bei Mg-Ionen (Abbildung 22). Während Sr^{2+} und Ba^{2+} zu einem leichten Abfall der Fluoreszenz führen, scheinen sich der ansteigende und abfallende Prozeß bei Ca^{2+} gerade gegenseitig aufzuheben.

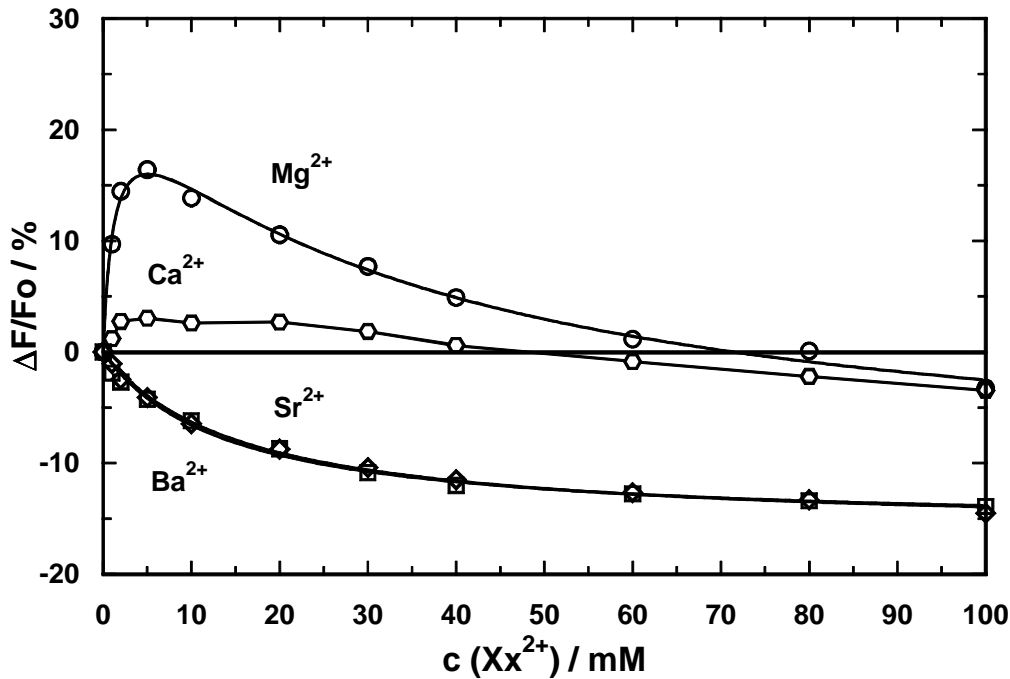


Abbildung 22: Effekte von Erdalkalimetallionen auf die RH 421-Fluoreszenz, korrigiert. Standardpuffer (25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, pH 7,2), Zugabe entsprechender Aliquots der Ionen als Chloride. T = 16 °C.

Die Wirkung von Co-Ionen konnte nicht untersucht werden, da CoCl_2 (rosa) in Histidinpuffer gelbe Komplexe bildet, die sowohl bei der Anregungswellenlänge für RH-Messungen (580/590 nm) als auch in geringerem Maße bei der Emissionswellenlänge (650 nm) absorbieren und damit die Fluoreszenzmessung stören. BeSO_4 verhinderte schon in geringer Konzentration (1 mM) Na-Bindung und Phosphorylierung durch ATP, und wurde daher nicht weiter untersucht.

Damit hatten die untersuchten zweiwertigen Kationen mit Ausnahme von Mg^{2+} , das eine Sonderstellung einnimmt, im relevanten Konzentrationsbereich (0-15 mM) keine bedeutenden Fluoreszenzänderungen zur Folge (< 10 %).

Untersucht man die Na-Bindung bei einer vorgelegten Konzentration von Erdalkaliionen (10 mM), so fällt auf, daß diese unterschiedlich stark mit Na-Ionen kompetieren: Während Ba^{2+} und Sr^{2+} ähnlich gut mit Na^+ kompetieren wie Mg^{2+} , ist der Effekt von Ca^{2+} auf die Halbsättigungskonzentration von Na^+ deutlich stärker ($K_{1/2}^{\text{Na}}(\text{Mg}^{2+}) = 10,1 \pm 0,3$, $K_{1/2}^{\text{Na}}(\text{Sr}^{2+}) = 10,5 \pm 0,6$, $K_{1/2}^{\text{Na}}(\text{Ba}^{2+}) = 4,5 \pm 0,6$, $K_{1/2}^{\text{Na}}(\text{Ca}^{2+}) \approx 50$ mM). Damit ist Ca^{2+} stärkster Kompetitor der Na-Bindung, gefolgt von Sr^{2+} , Mg^{2+} und Ba^{2+} . Dies könnte damit zusammenhängen, daß das dehydratisierte Ca-Ion zwar eine Ladung mehr als das Na-Ion trägt, aber fast exakt gleich groß ist (Ionenradius $R_{\text{Ca}} = 99$ pm, $R_{\text{Na}} = 95$ pm, Mort96). Die Anwesenheit von Erdalkaliionen verändert auch die Sigmoidizität der Na-Bindungskurven: Bei Mg- bzw. Ca-Zugabe verstärkt sie sich von

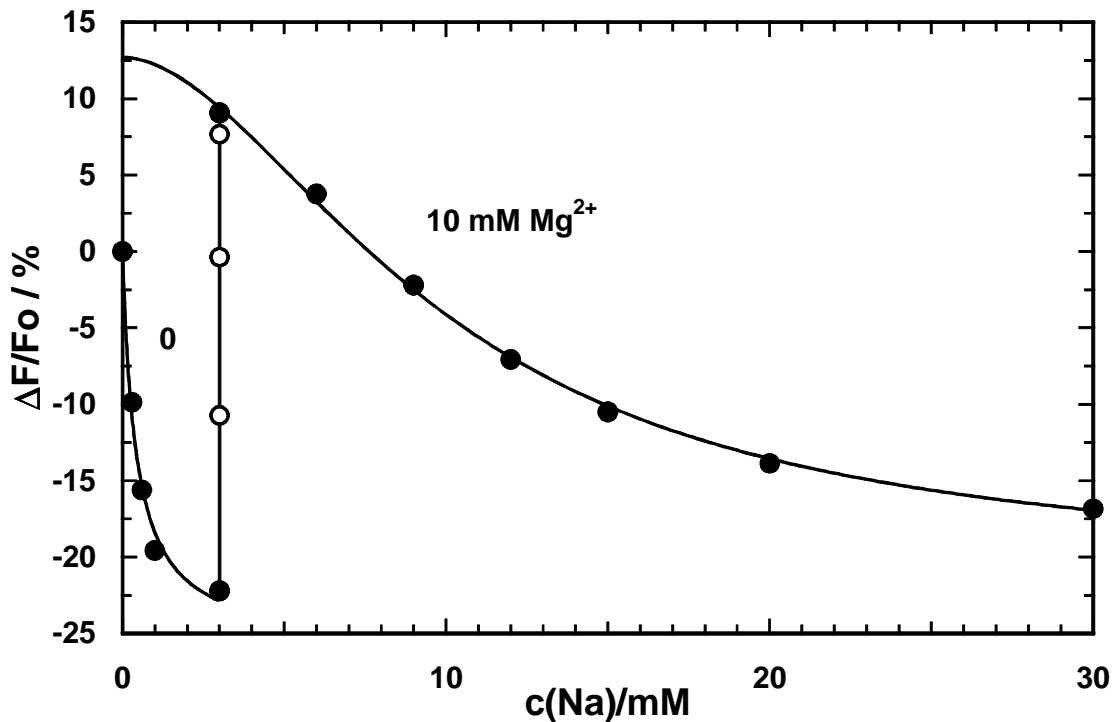


Abbildung 23: Na-Titration bei 0→10 mM MgCl_2 (RH 421). Standardpuffer (siehe oben), 16 °C. $K_{1/2}^{\text{Na}}(10 \text{ mM Mg}^{2+}) = 10,2 \pm 0,3 \text{ mM}$, $n_H = 1,85 \pm 0,1$.

$n_H = 1,4 \pm 0,04$ ohne zweiwertige Kationen auf $1,85 \pm 0,1$, wohingegen die Anwesenheit von Sr- bzw. Ba-Ionen zu deutlich verringerter Sigmoidizität führen ($n_H = 0,8 \pm 0,15$).

Um zu klären, ob die Reihenfolge der Zugabe der Ionen Einfluß auf die Competition zwischen den Ionen hat, wurde zunächst eine fast sättigende Konzentration (3 mM) NaCl zur äquilibrierten Fragmentsuspension zugegeben, dann die Erdalkaliionenkonzentration auf 10 mM eingestellt, und danach die Na-Titration vollendet. Abbildung 23 zeigt beispielhaft den Verlauf der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Na-Konzentration für Mg^{2+} . Man sieht, daß die zweiwertigen Kationen (hier: Mg^{2+}) das Na-Signal revertieren können. Die darauffolgende Na-Bindung erfolgt mit (im Rahmen der Meßgenauigkeit) gleicher Affinität und Sigmoidizität wie im Fall ohne vorgelegte Na-Ionen; damit ist die Reihenfolge der Zugaben nicht von Belang.

3.2.2 Mg-Effekt und Na/Mg- Competition

Wie im Abschnitt 3.2.1 gezeigt, ist Mg^{2+} das einzige Erdalkalimetallion, dessen Zugabe auch im Bereich niedriger Konzentrationen (0-5 mM) zu einer signifikanten Fluoreszenzänderung führt. Diese Zunahme der Fluoreszenz ist insofern interessant, als sie nach dem Verständnis des Mecha-

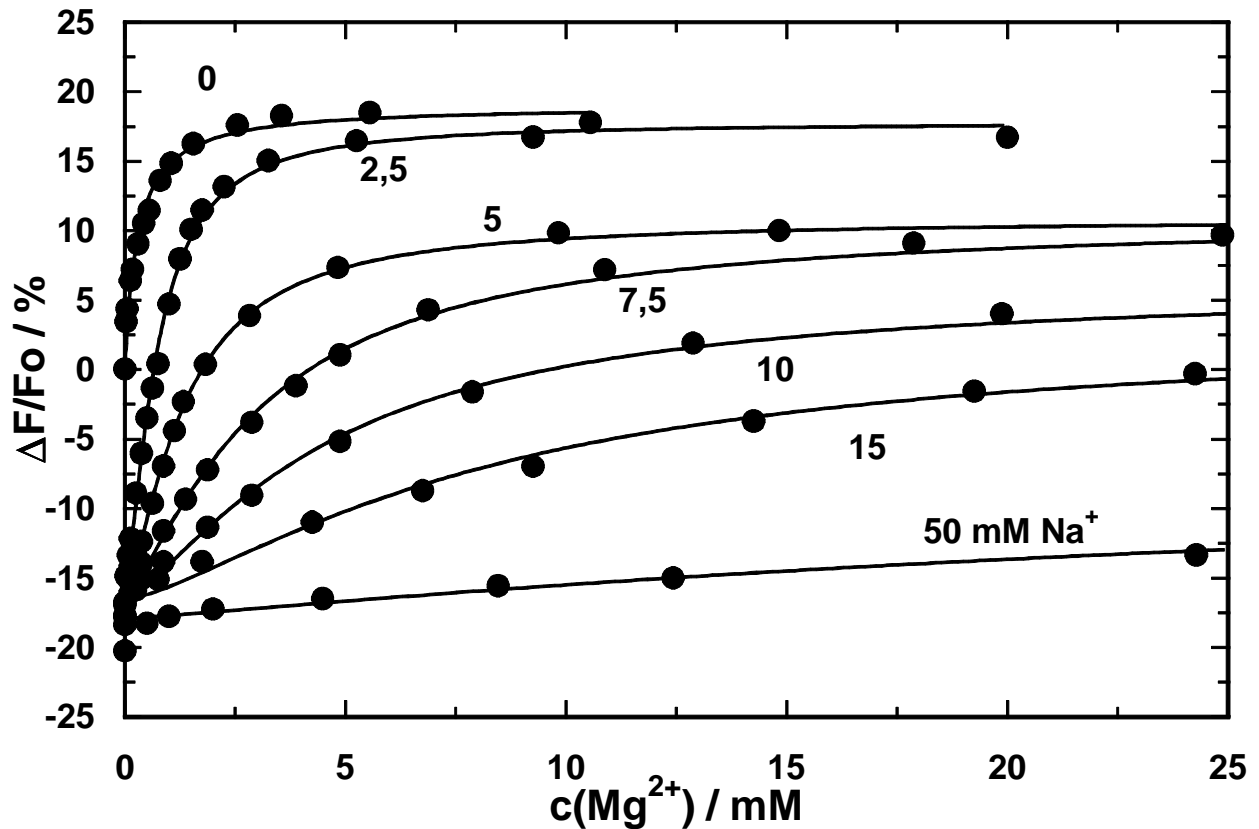


Abbildung 24: **Hemmung der Mg-Bindung durch NaCl: RH 421-Titrationskurven.** Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 0,02 mM EGTA, pH 7,2. $T = 16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Halbsättigungskonstanten: $K_{1/2}^{\text{Na}} = 0,29 \pm 0,02$ mM (0 Na), $0,73 \pm 0,03$ mM (2,5 Na), $1,29 \pm 0,05$ mM (5 mM Na), $3,1 \pm 0,1$ mM (7,5 mM Na), $4,6 \pm 0,1$ mM (10 mM Na), $8,3 \pm 0,3$ mM (15 mM Na) ≈ 33 mM (50 mM NaCl). Hillkoeffizient: $n_H \approx 1$ (0 bzw. 50 mM Na), $n_H = 1,45 \pm 0,03$ (2,5 - 15 mM Na).

nismus von RH 421 (siehe Mat & Met 3.3) eine Einlagerung negativer Ladung in die Membran anzeigt, was sich nur schlecht mit der Bindung des positiv geladenen Ions in Einklang bringen läßt. Zwar ist ein Teil dieser positiven Fluoreszenzänderung (1/3-2/5) auf eine Reaktion des Systems Farbstoff-Membran zurückzuführen (siehe 3.1.3), doch auch bei hoher Ionenstärke bleibt ein Effekt von +8-15 % zurück. Aus den Differenzmessungen mit nativem und denaturiertem Enzym (siehe 3.2.1) kann man schließen, daß es sich hierbei um einen echten Proteineffekt handelt, der eine Ladungsverschiebung in der Pumpe bei der Bindung von Mg-Ionen widerspiegelt. (Dafür spricht auch, daß sich der Anstieg der Fluoreszenz nicht mit RH-versetzten Lipidvesikeln erzeugen läßt.) Dies bedeutet, daß man bei Na/Mg-Kompetitionsexperimenten eine Überlagerung zweier Effekte beobachtet: Einerseits die Revertierung des Na-Signals, andererseits den Übergang in den veränderten, Mg-gebundenen Zustand. Abbildung 24 zeigt Mg-Titrations bei verschiedenen vorgelegten Na-Konzentrationen.

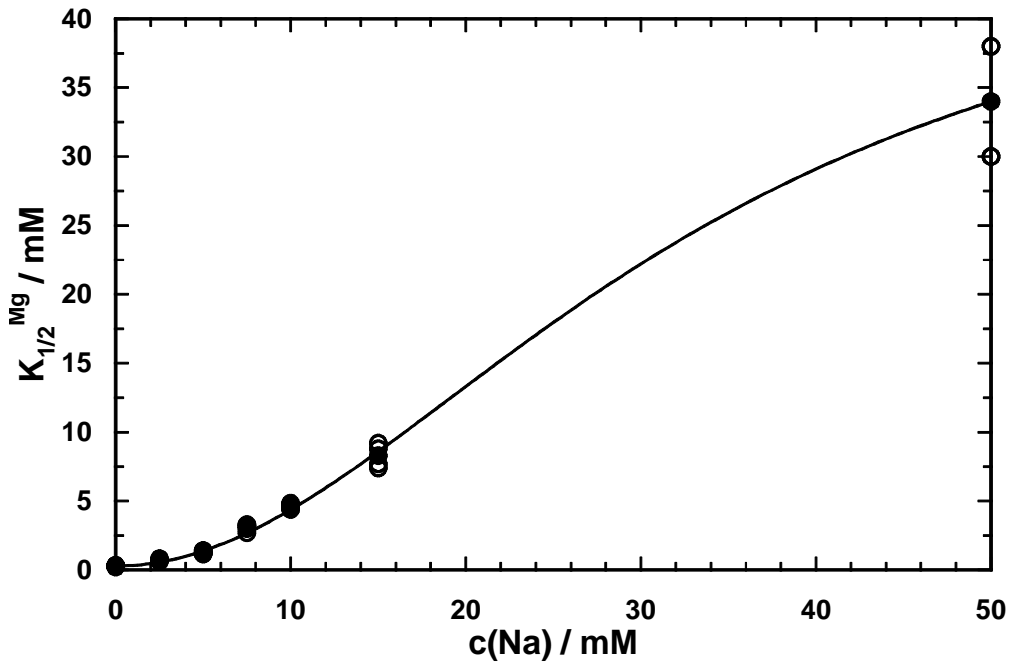


Abbildung 25: **Hemmung der Mg-Bindung durch NaCl: Halbsättigungskonstanten der RH 421-Titrationskurven.** Bedingungen wie in Abbildung 24. $K_{Max}^{Mg} = 48 \pm 1$ mM, $K_{1/2}^{Na} = 33 \pm 1$ mM.

Die Halbsättigungskonstanten steigen von $0,29 \pm 0,02$ mM in Abwesenheit von Na^+ auf ca. 33 mM bei 50 mM Na^+ . Vollständig sind sie in der Legende zu Abbildung 24 angegeben. Der Hillkoeffizient liegt bei etwa 1 ohne Na^+ bzw. bei 50 mM Na^+ , und bei $1,45 \pm 0,03$ in Anwesenheit von 2,5 bis 15 mM Na^+ .

Trägt man die Halbsättigungskonstanten der Mg-Bindung aus Abbildung 24 gegen die eingesetzte Na-Konzentration auf, so zeigt sich ein sigmoider Verlauf (Abbildung 25): Diese Kurve läßt sich gut mit einer Hillfunktion fiten und liefert bei $n_H = 2$ (festgesetzt) die maximale Halbsättigungskonstante für Mg^{2+} $K_{Max}^{Mg} = 48 \pm 1$ mM. Die Hälfte dieses Wertes ist bei einer Na-Konzentration von $K_{1/2}^{Na} = 33 \pm 1$ mM erreicht.

Abbildung 24 zeigt neben der Kompetition noch einen weiteren Effekt: bei Na-Ausgangskonzentrationen von über 2,5 mM wird durch Mg-Zugabe nicht mehr das Endniveau der Fluoreszenz (wie im Fall ohne Na) erreicht; je höher die vorgelegte Na-Konzentration, desto deutlicher bleibt die Sättigungsfluoreszenz unter diesem Endwert der Mg-Fluoreszenz. Dies steht in Übereinstimmung mit dem reinen Mg-Effekt auf die RH-Fluoreszenz, der oberhalb von 5-10 mM wieder abfällt (siehe Abbildung 22), so daß der Maximalwert des Effekts (bei ≤ 5 mM Mg^{2+}) gar nicht mehr erreicht werden kann. Das bestätigt, daß auch hier die Reihenfolge der Zugabe keinen Einfluß auf das sich einstellende Fluoreszenzniveau hat.

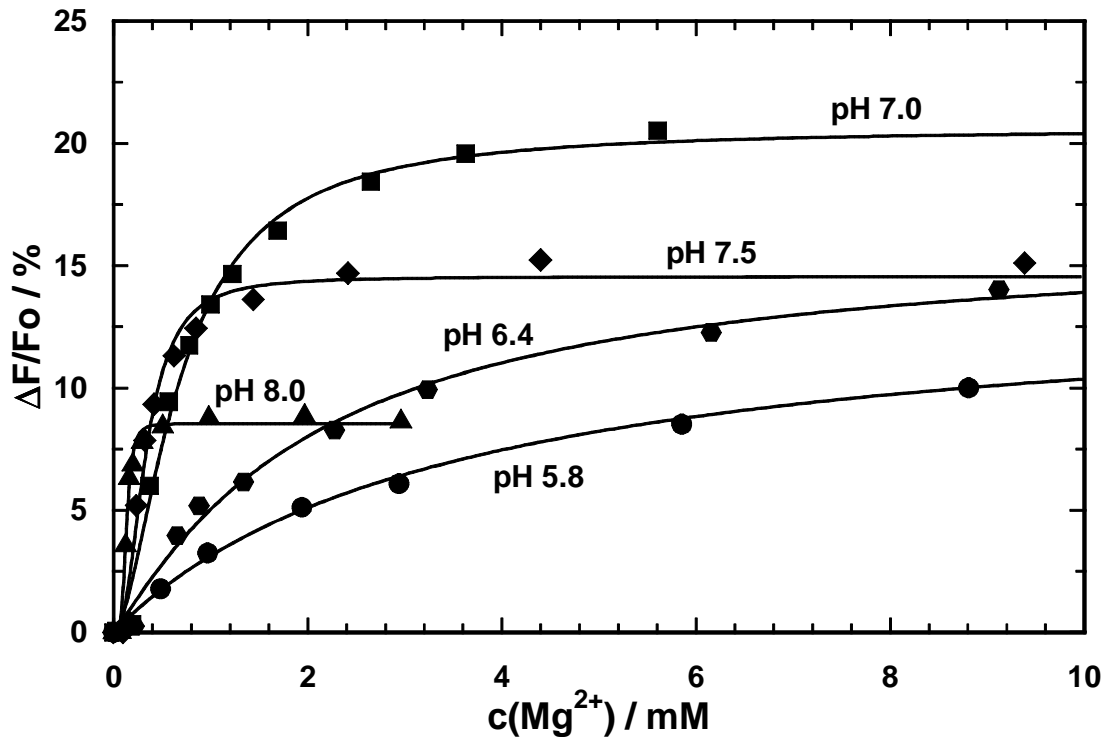


Abbildung 26: **Einfluß des pH-Werts auf den Mg-Effekt: RH 421-Titrationskurven.** Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, 20 mM TRIS, pH 7,2. T = 16 °C. Halbsättigungskonstanten: $K_{1/2}^{Mg}$ (pH 5,8) = $3,55 \pm 0,20$ mM, $K_{1/2}^{Mg}$ (pH 6,4) = $2,06 \pm 0,14$ mM, $K_{1/2}^{Mg}$ (pH 7,0) = $0,68 \pm 0,05$ mM, $K_{1/2}^{Mg}$ (pH 7,5) = $0,33 \pm 0,01$ mM und $K_{1/2}^{Mg}$ (pH 8,0) = $0,13 \pm 0,01$ mM. Hillkoeffizienten: $n_H = 1,0 \pm 0,03$ (pH 5,8), $1,1 \pm 0,05$ (pH 6,4), $1,7 \pm 0,1$ (pH 7,0), $2,4 \pm 0,1$ (pH 7,5), $4,4 \pm 0,8$ (pH 8,0).

Der Mg-Effekt zeigt überdies eine pH-Abhängigkeit (siehe Abbildung 26): Seine maximale Amplitude hat einen Höchstwert von ca 20 % bei pH 7 und fällt sowohl zu höheren als auch zu niedrigeren pH-Werten hin ab.

Die ermittelten Werte für die Halbsättigungskonstanten des Mg-Effekts sind in der Legende zu Abbildung 26 angegeben. Der Hillfaktor des Mg-Effekts steigt mit zunehmendem pH von $n_H = 1,0 \pm 0,03$ bei pH 5,8 auf $4,4 \pm 0,8$ bei pH 8,0 (vollständige Angaben siehe Legende). Allerdings ist dies vermutlich ein Artefakt, da die hohen Werte von n_H bei höherem pH wahrscheinlich dadurch entstehen, daß am Anfang der Titrationsen die sehr niedrigen zugegebenen Mg-Konzentrationen durch Adsorption z. B. an negativ geladene Lipide der Membranoberfläche "verschwinden", nicht als freie Mg-Konzentration zu Buche schlagen und daher ein scheinbar sigmoides Verhalten der Titrationskurven nach sich ziehen. Dies ist bei hohen pH-Werten deshalb auffälliger, weil hier die Gesamtfluoreszenzänderung geringer ist. Dieser Effekt läßt sich allerdings sehr schwer quantifizieren und damit korrigieren. Abbildung 27 zeigt die Halbsättigungskonstanten des Mg-Effekts

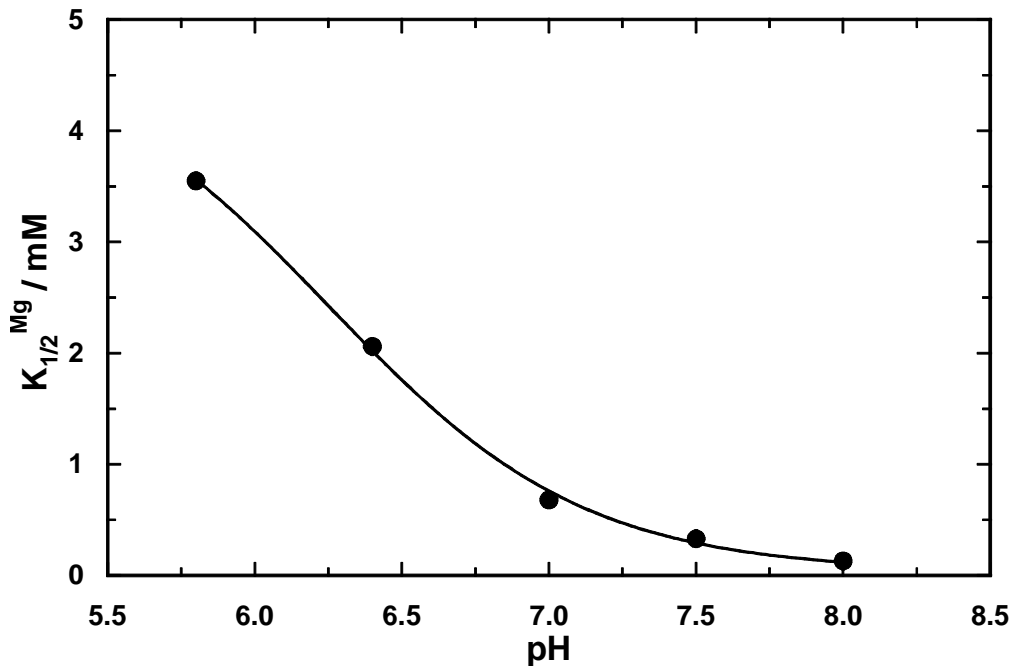


Abbildung 27: Einfluß des pH-Werts auf den Mg-Effekt: Halbsättigungskonstanten der Mg-Titrationsen (RH 421). Bedingungen wie in Abbildung 26. Die durchgezogene Linie in der Graphik stellt einen Fit mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung dar: $\text{pK}^{Mg} = 6,27 \pm 0,06 \text{ mM}$.

aufgetragen gegen den pH.

Diese Daten wurde mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung gefittet; daraus läßt sich ein pK für den Mg-Effekt von $\text{pK}^{Mg} = 6,27 \pm 0,06 \text{ mM}$ ermitteln. Diesen Wert kann man als Hinweis darauf interpretieren, daß ein Histidinrest an dieser Bindung von Mg^{2+} (indirekt?) beteiligt sein könnte ($\text{pK}(\text{His}) = 6,5$, Römp95). Tatsächlich befinden sich in der Nähe der Aminosäure D 586 der konservierten DPPR-Sequenz, die in die Mg-Bindung involviert sein soll (siehe Einleitung 2), die Histidine H_{614} und H_{551} , die als mögliche Kandidaten dafür in Frage kämen.

Zusätzlich wurde auch die Wirkung von Mg^{2+} auf die Affinität für Na^+ untersucht. Dazu wurden Na-Titrationsen bei verschiedenen vorgelegten Mg-Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 28). Die ermittelten Werte für die Halbsättigungskonstanten und Hillkoeffizienten der Na-Bindung sind in der Legende zu Abbildung 28 dargestellt. Durch die Zugabe von 10 mM Mg^{2+} stieg der Halbsättigungswert der Na-Bindung von $K_{1/2}^{Na} = 0,67 \pm 0,02 \text{ mM}$ auf $K_{1/2}^{Na} (10 \text{ mM Mg}^{2+}) = 8,7 \pm 0,4 \text{ mM}$, der Hillkoeffizient stieg von $n_H = 1,36 \pm 0,03$ auf $n_H = 2,05 \pm 0,06$ bei 10 mM Mg^{2+} . Abbildung 29 zeigt die $K_{1/2}$ -Werte der Na-Bindung in Abhängigkeit der eingesetzten Mg-Konzentration für eine Erweiterung der oben gezeigten Messung, wobei zusätzlich der Chelator H-EDTA verwendet wurde. Die angegebenen (freien) Mg-Konzentrationen wurden mit dem Programm EQCAL aus der Gesamt-Mg-Konzentration und der Konzentration des Chelators errech-

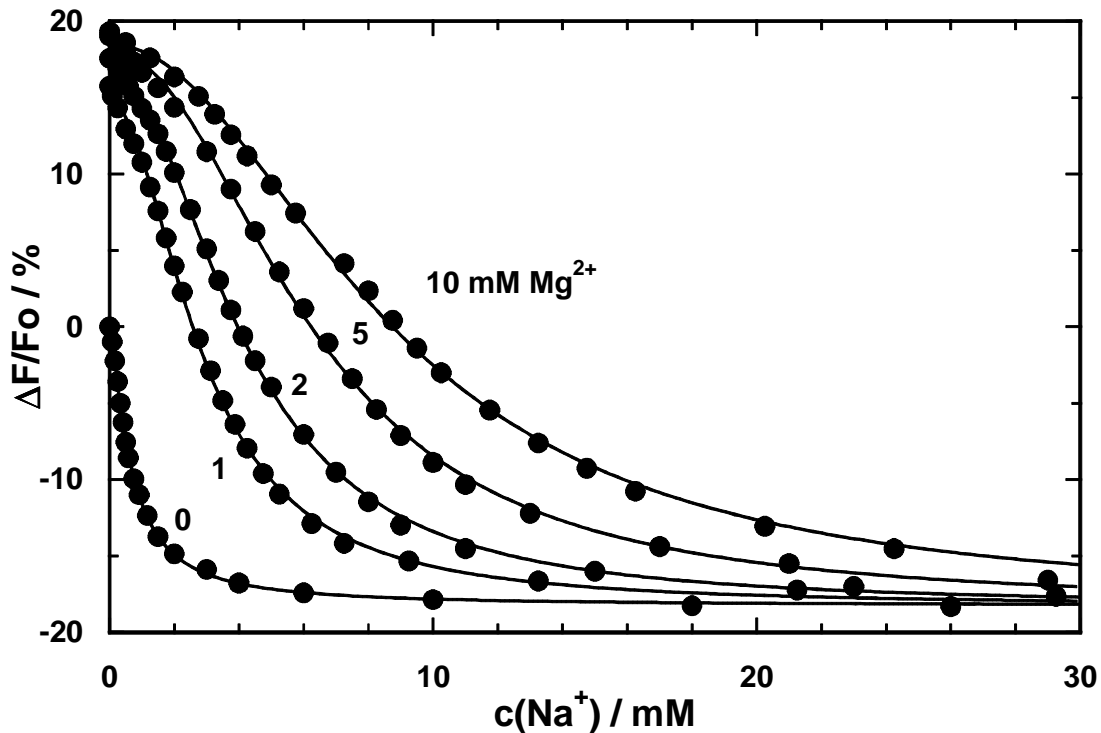


Abbildung 28: **Hemmung der Na-Bindung durch Mg^{2+} : RH 421-Titrationskurven.** Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 0,02 mM EGTA, pH 7,2. $T = 16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Daten sind zweimal driftkorrigiert und auf einen einheitlichen Endwert hin normiert. Halbsättigungswerte: $K_{1/2}^{Na}$ (0 Mg^{2+}) = $0,67 \pm 0,02$ mM, $K_{1/2}^{Na}$ (1 mM Mg^{2+}) = $2,86 \pm 0,04$ mM, $K_{1/2}^{Na}$ (2 mM Mg^{2+}) = $4,15 \pm 0,05$ mM, $K_{1/2}^{Na}$ (5 mM Mg^{2+}) = $6,3 \pm 0,2$ mM, $K_{1/2}^{Na}$ (10 mM Mg^{2+}) = $8,7 \pm 0,4$ mM. Hillkoeffizienten $n_H = 1,36 \pm 0,03$ (0 $MgCl_2$), $1,98 \pm 0,04$ (1 mM Mg^{2+}), $2,07 \pm 0,02$ (2 mM Mg^{2+}), $2,13 \pm 0,03$ (5 mM Mg^{2+}), und $2,05 \pm 0,06$ (10 mM $MgCl_2$).

net. Durch die Verwendung von H-EDTA konnten die niedrigen Mg-Konzentrationen genau und stabil eingestellt werden. Die Abhängigkeit der Halbsättigungswerte der Na-Bindung von der Mg-Konzentration zeigt einen komplizierten Verlauf, den man sich aus einer linearen Funktion und einem sättigenden Prozeß (beschrieben durch ein Michaelis-Menten-Verhalten) zusammengesetzt denken kann. Dies läßt sich als Hinweis darauf interpretieren, daß Mg^{2+} an (mindestens) zwei Bindungsstellen binden kann.

Die Na-Bindung wurde auch in Anwesenheit von Mg^{2+} und K^+ untersucht, um zu testen, ob sich die Effekte der beiden Ionen addieren. Dazu wurden Messungen bei 10 mM Mg^{2+} und K-Konzentrationen zwischen 0 und 20 mM durchgeführt. Die ermittelten Werte für die Halbsättigungskonstanten der Na-Bindung (jeweils bei 10 mM Mg^{2+}) sind in der Legende zu Abbildung 30 aufgeführt. Der Hillkoeffizient der Titrationskurven lag durchgehend bei $n_H = 2,2 \pm 0,1$. Die Messungen wurden bei hoher Ionenstärke (300 mM ChCl durchgeführt). Abbildung 30 zeigt die Halbsättigungskonstanten für die Na-Bindung in Abhängigkeit von der eingesetzten K-Konzentration.

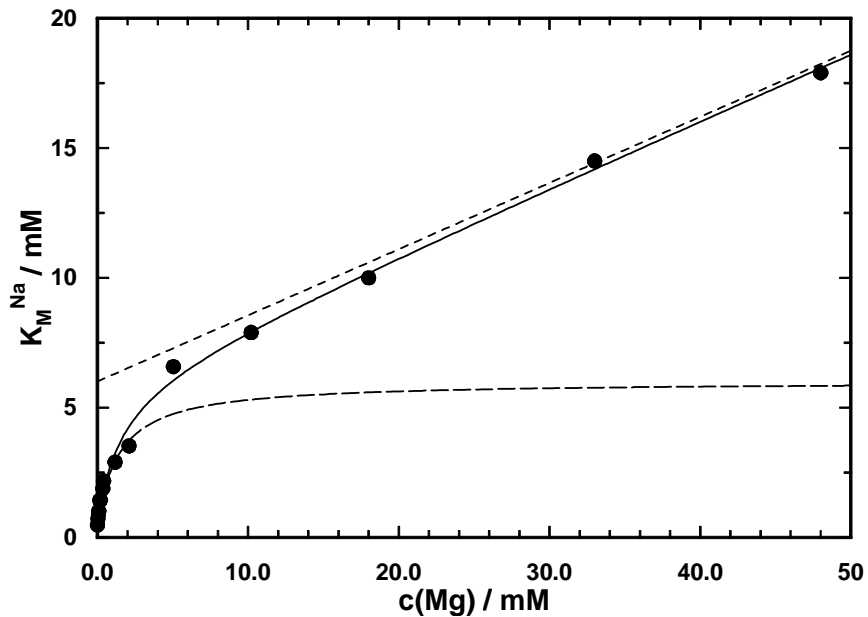


Abbildung 29: Hemmung der Na-Bindung durch Mg^{2+} : Halbsättigungskonstanten der Na-Bindung. Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 0,02 mM EGTA, 24 mM TRIS, 20 mM H-EDTA, pH 7,2. T = 16 °C. MICHAELIS-MENTEN-FIT (untere gestrichelte Kurve): Ausgangspunkt $K_M^0 = 0,5$ mM, Sättigungswert $K_M^{Max} = 5,5$ mM, Halbsättigung bei $K_M^{1/2} = 1,5$ mM. GERADE: Achsenabschnitt = K_M^{Max} , Steigung = 0,25.

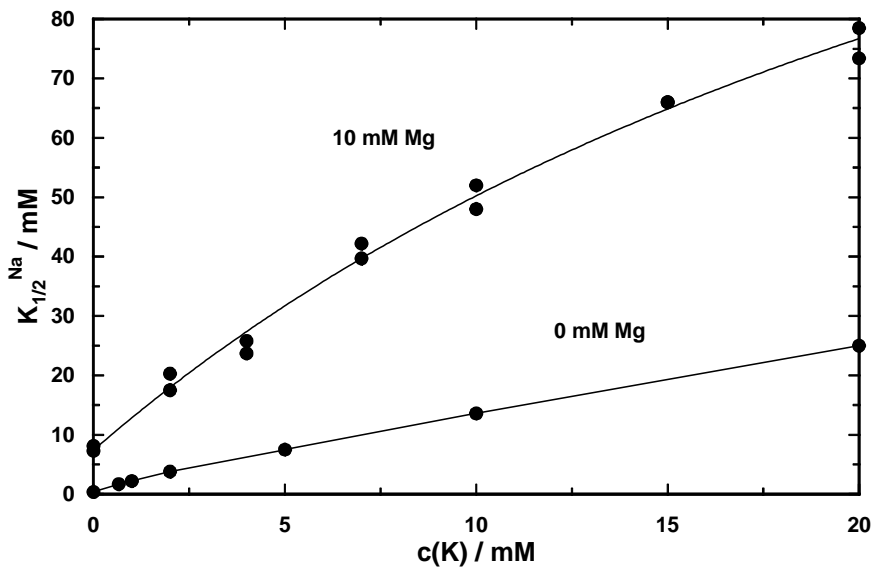


Abbildung 30: K-Bindung in Anwesenheit von 10 mM Mg^{2+} : Halbsättigungskonstanten. Pufferbedingungen: Standardpuffer (25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, pH 7,2) mit hoher Ionenstärke (300 mM ChCl). T = 16 °C. Zum Vergleich ist das Verhalten ohne Mg^{2+} im Puffer (siehe Abbildung 21) ebenfalls dargestellt. Halbsättigungskonstanten (10 mM Mg^{2+}): $K_{1/2}^{Na}$ (0 K^+) = $7,6 \pm 0,4$ mM, $K_{1/2}^{Na}$ (2 mM K^+) = 17 ± 1 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (4 mM K^+) = 25 ± 1 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (7 mM K^+) = 41 ± 1 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (10 mM K^+) = 50 ± 2 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (15 mM K^+) = 66 ± 0 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (20 mM K^+) = 76 ± 3 mM. Hillkoeffizient: $n_H = 2,2 \pm 0,1$.

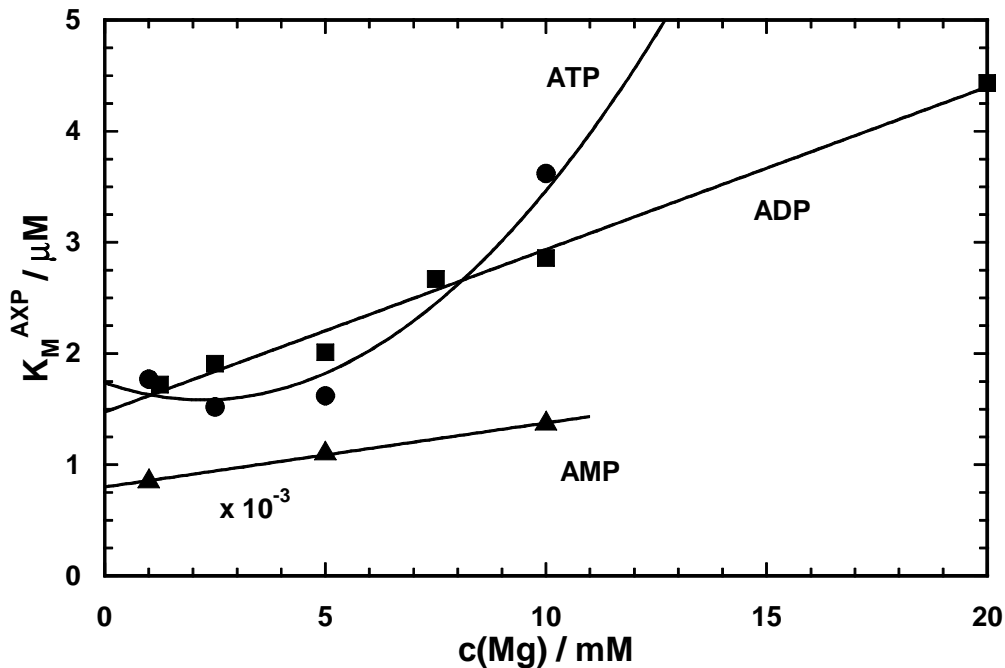


Abbildung 31: Revertierung des Mg-Effekts auf die RH 421-Fluoreszenz durch Nukleotide: Halbsättigungskonstanten der AXP-Titrations. Pufferbedingungen: 25 mM Histidin, 0,02 mM EGTA, 25,2 mM TRIS, pH 7,2. Nach MgCl₂-Gabe Zugabe der Nukleotide als TRIS-Salze. T = 16 °C.

Unterhalb von 10 mM K⁺ ist der Verlauf annähernd linear, flacht bei höheren Konzentrationen aber ab. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Verhalten der K-abhängigen Na-Bindung ohne Mg²⁺, die im unteren Konzentrationsbereich ebenfalls linear verläuft (siehe 3.1.1).

3.3 Wirkung von Nukleotiden auf Na-Bindung und Mg-Effekt

In dem erweiterten Post-Albers-Zyklus der letzten Jahre war man davon ausgegangen, daß die Affinitäten für die Na-Bindung nicht davon abhängen, ob ATP schon an das Enzym gebunden hat oder nicht (Apel98, Heys94, Stür89). Da die Vergleichsmessungen mit FITC und RH 421 zeigten, daß Ionen- und Nukleotidbindestellen miteinander kommunizieren (siehe Abschnitt 2), wurde diese Annahme überprüft. Dafür wurde als Nukleotid AMP ausgewählt, da die Na-Bindung bei Verwendung von ATP nicht gut untersucht werden kann, da unmittelbar darauf der Übergang in den Zustand P-E₂ erfolgt (in Anwesenheit von Mg²⁺ im Puffer). Auch ADP erwies sich als schlecht geeignet, da es durch Transphosphorylierung immer auch Spuren von ATP (und AMP) enthält. Ähnliches gilt für ATP-γ-S, das sich ebenfalls als nicht völlig inert herausstellte und einen Teil der Pumpmoleküle phosphorylieren konnte.

Die Na-Titrations ergaben, daß die Affinität⁻¹ des Enzyms für Na⁺ bei 10,2 mM Mg²⁺ und

ohne ATP im Puffer bei $8,0 \pm 0,4$ mM lag, und in Anwesenheit von 15 mM AMP (die Affinität für AMP ist relativ gering, siehe unten) auf $6,2 \pm 0,1$ mM fiel ($n_H(-AMP) = 2,0 \pm 0,1$, $n_H(+AMP) = 1,8 \pm 0,1$). Damit sind die Ionenbindungsstellen eindeutig beeinflusst von der Besetzung der Nukleotidbindestelle. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß trotz ihrer deutlichen Distanz die im membranständigen Teil der Pumpe gelegenen Ionenbindungsstellen mit der Nukleotidbindestelle im cytoplasmatischen Part "kommunizieren", so daß der jeweilige Besetzungszustand, vermutlich über Konformationsänderungen, auf den anderen Teil des Proteins hinüberspricht.

Nukleotide wie AMP oder ATP haben bei ihrer Zugabe zu farbstoffmarkierten Membranfragmenten keine nennenswerte Änderung der RH-Fluoreszenz zur Folge ($< 2\%$). Jedoch sind sie in der Lage, den Mg-Effekt zu revertieren. Abbildung 31 zeigt die Halbsättigungskonzentrationen dieser Revertierung für AMP, ADP und ATP bei verschiedenen vorgelegten Mg-Konzentrationen (in Abwesenheit von Na). Deutlich zu sehen ist, daß der ADP- bzw. ATP-Effekt (Revertierung) sehr hochaffin erfolgt ($K_M^0 = 1,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ bzw. ca. $2 \mu\text{M}$), wohingegen der AMP-Effekt (Revertierung) bedeutend weniger affin ist ($K_M^0 = 0,8 \pm 0,02 \text{ mM}$). AMP- und ADP-Effekt zeigen eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Mg-Konzentration, der ATP-Effekt eine eher komplexe. Auch K^+ oder Li^+ wurden getestet, und konnten ebenfalls den Mg-Effekt revertieren. Allerdings geht das Enzym bei der Bindung von K^+ in den $\text{E}_2(\text{K}_2)$ -Zustand über, so daß es sich hierbei nicht um eine reine Revertierung des Mg-Effekts ($\text{E}_1\text{Mg} \rightarrow \text{E}_1$) handelt. Dies zeigt daher, daß der Mg-Effekt nur in der E_1 -Konformation des Enzyms beobachtet werden kann. Überdies liefern diese Ergebnisse klare Indizien dafür, daß der Mg-Effekt durch die Bindung von Mg^{2+} an die katalytische (Nukleotid- und Mg-Bindestelle) hervorgerufen werden könnte.

3.4 Dreifach positiv geladene Ionen: Br_2 -TITU

Br_2 -TITU ist ein Isothiuroniumderivat, das in der Gruppe von Karlsh als Na-Antagonist beschrieben wurde (Hovi95). Bei der Zugabe von Br_2 -TITU zeigt sich, ebenso wie bei Mg^{2+} , eine positive Fluoreszenzänderung von etwa 18 %. Sie schrumpft jedoch auf lediglich 5 % zusammen, wenn man mit hoher Ionenstärke im Puffer arbeitet (300 mM ChCl). Br_2 -TITU kann sowohl das Na-Signal vollständig revertieren als auch die apparente Affinität für Na^+ herabsetzen, wenn es vor der Titration zugegeben wird. Abbildung 32 A zeigt Na-Titrationskurven bei verschiedenen vorgelegten Br_2 -TITU-Konzentrationen. Die Werte der Halbsättigungskonstanten und Hillkoeffizienten der Na-Bindung sind in der Legende zu Abbildung 32 A angegeben. Abbildung 32 B zeigt die Halbsättigungskonstanten aufgetragen gegen die Br_2 -TITU-Konzentration.

Der Fit einer Michaelis-Menten-Gleichung an diese Daten ergab eine Affinität⁻¹ der Na,K-ATPase zu Br_2 -TITU von $2,35 \pm 0,49 \mu\text{M}$. Dieser Wert liegt etwas über der publizierten Affinität

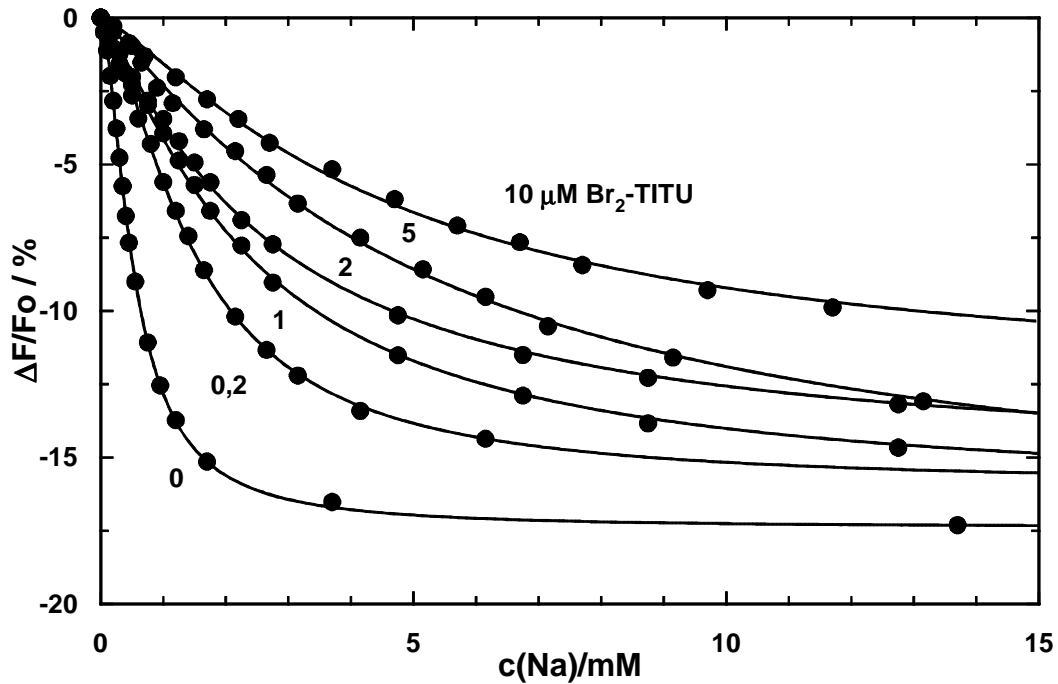
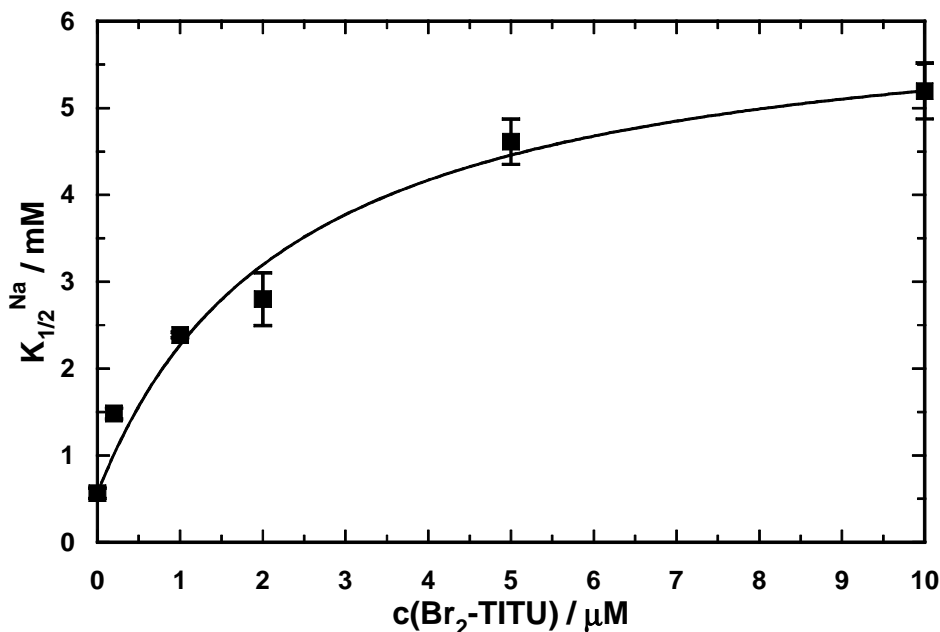


Abbildung 32: A) **Hemmung der Na-Bindung durch Br₂-TITU: Titrationskurven.** Standardpuffer (25 mM Histidin, 0,5 mM EDTA, pH 7,2) mit hoher Ionenstärke (300 mM ChCl). T = 16 °C. Halbsättigungswerte: $K_{1/2}^{Na}$ (0 Br₂-TITU) = 0,53 ± 0,06 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (0,2 μM Br₂-TITU) = 1,48 ± 0,07 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (1 μM Br₂-TITU) = 2,38 ± 0,03 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (2 μM Br₂-TITU) = 2,71 ± 0,16 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (5 μM Br₂-TITU) = 4,6 ± 0,4 mM, $K_{1/2}^{Na}$ (10 μM Br₂-TITU) = 5,2 ± 0,3 mM. Hillkoeffizienten: n_H = 1,64 ± 0,07 (0 Br₂-TITU), 1,54 ± 0,07 (0,2 μM), 1,25 ± 0,03 (1 μM), 1,16 ± 0,02 (2 μM), 1,28 ± 0,05 (5 μM), 1,15 ± 0,05 (10 μM Br₂-TITU).



B) **Hemmung der Na-Bindung durch Br₂-TITU: Halbsättigungskonstanten.** Bedingungen wie oben.

(Hovi95). Der Hillkoeffizient der Na-Bindungskurven war interessanterweise durchgehend niedriger als im Fall ohne Br₂-TITU im Puffer, ein Effekt, der auch (in noch ausgeprägterer Form) bei Sr²⁺ und Ba²⁺ auftrat. Daher erwies es sich auch als unmöglich, diese Daten mit dem Modell D (Abbildung 33) anzupassen: Mit diesem Modell lassen sich keine hyperbolen Bindungskurven erzeugen, es ergeben sich in jedem Fall leicht sigmoide Kurven.

4 Modell und Simulationen

Zur Beschreibung der Competition zwischen Na⁺ und Mg²⁺ wurde ein Modell entwickelt, in das folgende Annahmen einfließen:

1) Es existieren drei Na-Bindungsstellen, wobei zwei davon negativ geladen sind und in Kontakt mit dem Puffer stehen, eine jedoch ungeladen ist und im Inneren des Proteins liegt, und damit die Bindung von Na⁺ an diese Bindungsstelle elektrogen erfolgt.

2) Erst wenn die beiden geladenen Bindungsstellen mit Na⁺ besetzt sind, kann auch die ungeladene Bindungsstelle besetzt werden, und zwar ausschließlich mit Na⁺. Damit rufen lediglich die Zustände mit drei gebundenen Na-Ionen eine (negative) Fluoreszenzänderung hervor.

3) An die negativ geladenen Bindungsstellen können auch andere Ionen binden. Allerdings werden gemischte Bindungszustände ausgeschlossen.

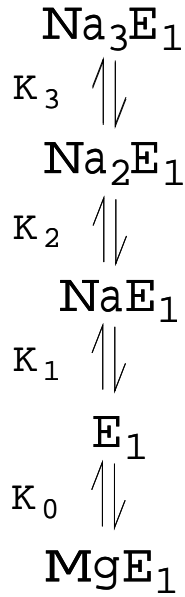
4) Mg²⁺ kann an zwei verschiedenen Stellen am Enzym binden, zum einen an den negativ geladenen Ionenbindungsstellen, zum anderen an einer (allosterischen) Bindungsstelle, die mit der Nukleotidbindestelle identisch sein könnte.

5) Bindet Mg²⁺ an die allosterische Bindestelle, hat dies einen deutlichen Einfluß auf die Ionenbindungsstellen und führt zur Abnahme der Affinitäten für Na⁺.

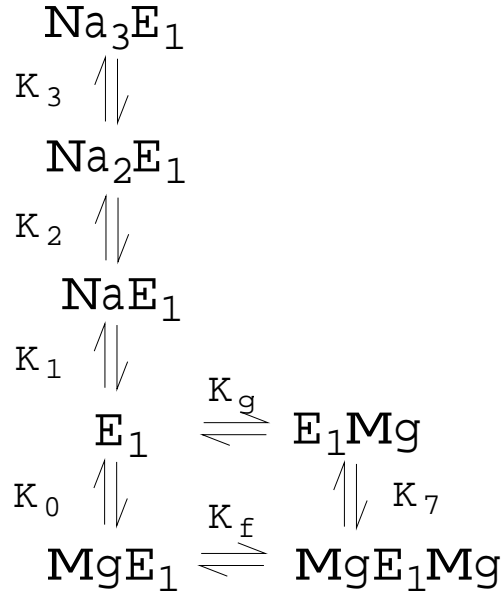
Diese Annahmen fußen auf folgenden Beobachtungen:

Zu 1) Okklusionsexperimente haben gezeigt, daß entweder zwei K-Ionen oder drei Na-Ionen okkludiert werden (dazu muß man den kurzlebigen Na-okkludierten Zustand mit Hilfe von Oligomycin stabilisieren). RH-Experimente zeigen, daß die Bindung von K⁺ an E₁ elektroneutral verläuft (siehe Einleitung 3). Zwei Aspartatreste werden als mögliche Kandidaten für diese Bindungsstellen diskutiert (siehe Einleitung 2). Die Annahme scheint plausibel, daß Na⁺ und K⁺ an dieselben Bindungsstellen binden, und damit muß auch die Bindung der Na-Ionen an die negativen, mit dem Puffer in Kontakt stehenden Bindungsstellen elektroneutral verlaufen. Da die Na-Bindung insgesamt elektrogen ist, muß die Bindung *eines* Na-Ions an eine neutrale Bindungsstelle innerhalb des Proteins erfolgen.

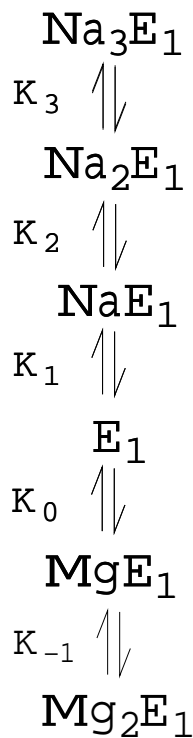
A



C



B



D

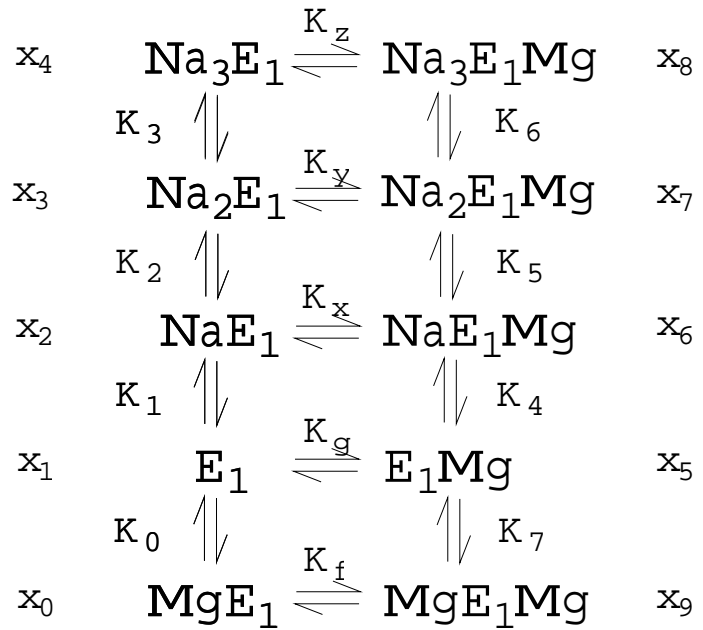


Abbildung 33: Modelle für die Na/Mg-Kompetition

Zu 3) Simulationen mit nur einem kompetitiv bindenden Mg-Ion (Abbildung 33 A), mit zwei kompetitiv bindenden Mg-Ionen (Abbildung 33 B) oder mit einem kompetitiv bindenden und einem nicht kompetitiv bindenden Mg-Ion (Abbildung 33 C) waren nicht in der Lage, das komplexe Verhalten der Na-Affinität bei zunehmender Mg-Konzentration widerzuspiegeln. Erst das oben beschriebene Modell (Punkt 1-5) war geeignet, die Titrationskurven hinreichend gut zu beschreiben. Abbildung 33 D zeigt dieses zur Simulation verwendete Modell.

In formaler Schreibweise läßt sich dieses Modell folgendermaßen notieren:

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_1 &= (k_1 c(Na) + k_g c(Mg)) + k_0 c(Mg))(-x_1) + k_{-1} x_2 + k_{-g} x_5 + k_{-0} x_0 \\
 \dot{x}_2 &= k_1 c(Na) x_1 - (k_{-1} + k_x c(Mg) + k_2 c(Na)) x_2 + k_{-2} x_3 + k_{-x} x_6 \\
 \dot{x}_3 &= k_2 c(Na) x_2 - (k_3 c(Na) + k_y c(Mg) + k_{-2}) x_3 + k_{-3} x_4 + k_{-y} x_7 \\
 \dot{x}_4 &= k_3 c(Na) x_3 - (k_z c(Mg) + k_{-3}) x_4 \\
 \dot{x}_5 &= k_g c(Mg) x_1 - (k_4 c(Na) + k_{-g} + k_7 c(Mg)) x_5 + k_{-4} x_6 + k_{-7} x_9 \\
 \dot{x}_6 &= k_x c(Mg) x_2 + k_4 c(Na) x_5 - (k_5 c(Na) + k_{-4} + k_{-x}) x_6 + k_{-5} x_7 \\
 \dot{x}_7 &= k_y c(Mg) x_3 + k_5 c(Na) x_6 - (k_6 c(Na) + k_{-y} + k_{-5}) x_7 + k_{-6} x_8 \\
 \dot{x}_8 &= k_z c(Mg) x_4 + k_6 c(Na) x_7 - (k_{-z} + k_{-6}) x_8 \\
 \dot{x}_0 &= k_0 c(Mg) x_1 - (k_{-0} + k_f c(Mg)) x_0 + k_{-f} x_9 \\
 \dot{x}_9 &= k_7 c(Mg) x_5 + k_f c(Mg) x_0 - (k_{-7} + k_{-f}) x_9
 \end{aligned}$$

mit

$$\begin{aligned}
 K_f &= K_0^{-1} K_7 K_g \\
 K_x &= K_1^{-1} K_4 K_g \\
 K_y &= K_2^{-1} K_5 K_x \\
 K_z &= K_3^{-1} K_6 K_y, \quad \text{und} \quad K_i = \frac{k_{-i}}{k_i}
 \end{aligned}$$

und dem Erhaltungssatz

$$\sum_{i=0}^9 x_i = X_T .$$

Dabei bedeutet X_T die Gesamtzymkonzentration, x_i die Konzentration der entsprechenden

Enzymspezies (siehe Modell Abbildung 33 D), k_i die Geschwindigkeitskonstante der jeweiligen Hinreaktion (dies ist immer eine Assoziation, auch im Fall von Mg-Ionen), k_{-1} die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion (Dissoziation des Ions), und K_i die Gleichgewichtskonstante der Reaktion, definiert als Dissoziationskonstante (in mM). Auch die Konzentrationen der Na-Ionen $c(\text{Na})$ bzw. der Mg-Ionen $c(\text{Mg})$ wurden in mM eingegeben. Bei genauerer Hinsicht lassen sich noch zwei weitere Erhaltungssätze, nämlich für Na^+ und alle Na-gebundenen Enzymspezies und für Mg^{2+} und alle Mg-gebundenen Enzymspezies finden. Da das System jedoch nur im Gleichgewichtszustand untersucht wurde, war es aus technischen Gründen nicht nötig, diese Erhaltungssätze entsprechend auszuwerten. Die horizontalen Gleichgewichtskonstanten stellen außer der Assoziationskonstante für Mg^{2+} K_g keine Variablen dar, sondern lassen sich aufgrund des Prinzips der mikroskopischen Reversibilität aus K_g und den entsprechenden vertikalen Gleichgewichtskonstanten der jeweiligen Masche errechnen (Adam88).

In Abbildung 34 sind sowohl die Daten (●) als auch eine Simulation dargestellt (Parameter siehe Legende, Daten aus Abbildung 28). Für diese Simulation wurde der (positive) Mg-Effekt ignoriert und damit alle Kurven auf eine Gesamtamplitude von (-) 18,3 % normiert (Programm MaMgcom6 bzw. 8). Deutlich zu sehen ist, daß die Simulationskurven das Ansteigen der Halbsättigungskonstanten der Na-Bindung, $K_{1/2}^{\text{Na}}$, sehr gut beschreiben (die durch Fit einer Hillfunktion an die simulierten Titrationskurven zum direkten Vergleich bestimmte $K_{1/2}^{\text{Na}}$ -Werte sind in der Legende zu Abbildung 34 notiert, $K_{1/2}^{\text{Na}}$ -Werte der gemessenen Titrationskurven siehe Legende zu Abbildung 28). Der genaue Kurvenverlauf der Titrationskurven weicht jedoch, besonders bezüglich der Sigmoidizität, von den Meßdaten ab: Die Simulationskurven sind deutlich sigmoider (Hillkoeffizienten: $n_H = 1,50$ (0 Mg^{2+}), 2,12 (1 mM Mg^{2+}), 2,27 (2 mM Mg^{2+}), 2,40 (5 mM Mg^{2+}) und 2,48 (10 mM Mg^{2+}) gegenüber den Meßdaten: $n_H = 1,4$ bei 0 Mg^{2+} , 2,05 sonst).

Die überschätzte Sigmoidizität ist ein inhärentes Problem des Modells, das sich nicht leicht durch die Veränderung der Parameter (Affinitäten) aus der Welt schaffen läßt: Obwohl der Übergang vom Mg-gebundenen Zustand MgE_1Mg zum Na-gebundenen Zustand $\text{Na}_3\text{E}_1\text{Mg}$ laut Modell in vier Stufen erfolgt, soll dieser Prozeß laut Daten nur einen Hillkoeffizienten von etwa 2 aufweisen. Ebenso soll der Übergang vom ungebundenen Enzym E_1 zur Na-gebundenen Form Na_3E_1 ein dreistufiger Vorgang sein; dennoch liegt der Hillfaktor der gemessenen Titrationskurve bei 1,4! Um diesen Wert zu erreichen, mußte die Bindung des ersten Na-Ions als sehr hochaffin angenommen werden, wodurch sie praktisch "unsichtbar" verläuft ($K_1 = 0,01$ mM), und die Bindung des dritten Na-Ions ebenfalls, so daß auf den Zustand mit zwei gebundenen Na-Ionen unmittelbar der mit drei Ionen folgt ($K_3 < K_2$). Diese Eigenschaften wurden auch für den rechten Ast angenommen, wo Mg^{2+} an seine allosterische Bindungsstelle gebunden hat. Erwartungsgemäß erhöht sich der Hillfaktor der Simulationskurven mit Mg^{2+} gegenüber denen ohne Mg^{2+} , und zwar um 1 von $\approx 1,5$ auf $\approx 2,5$. Den Daten hingegen läßt sich nur ein Anstieg von 1,4 auf 2,0 entnehmen. Daraus

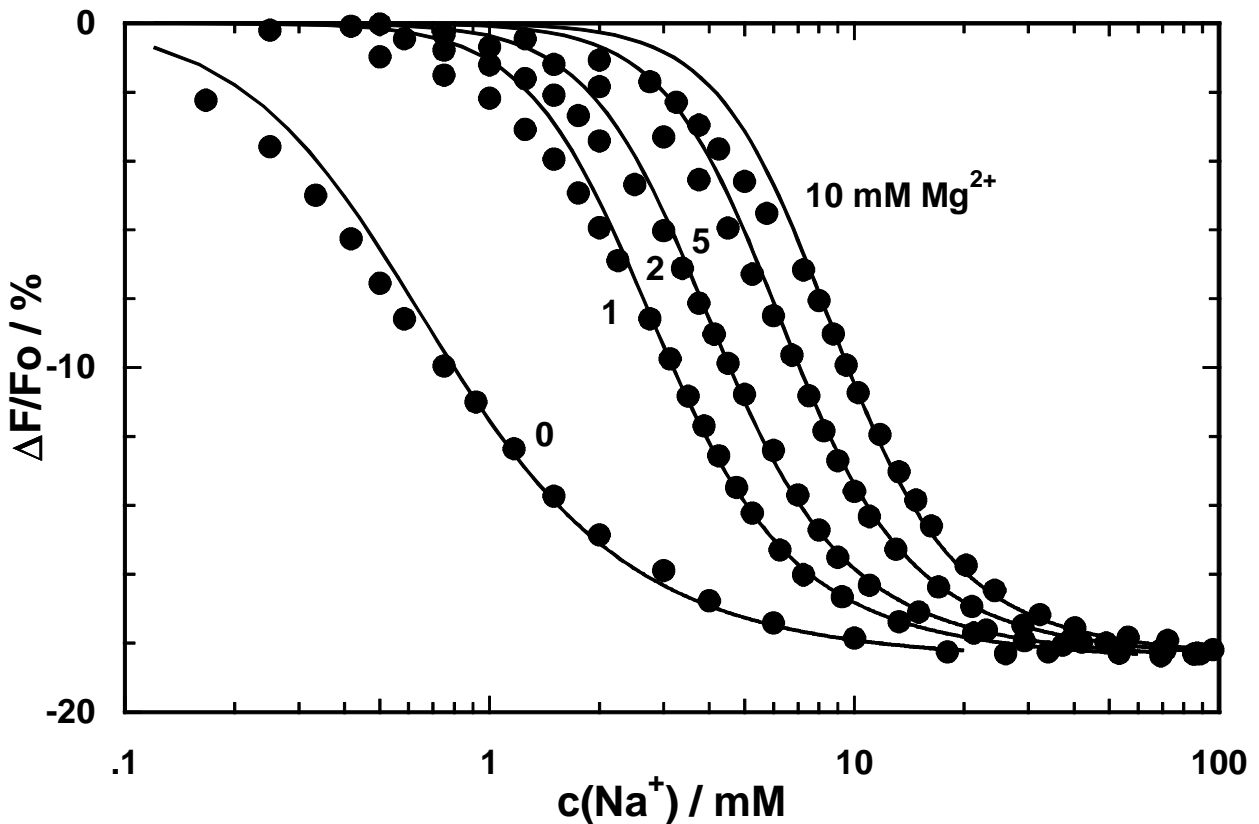


Abbildung 34: Hemmung der Na-Bindung durch Mg-Ionen: Simulation und Meßpunkte der Titration. Daten (●) aus Abbildung 28. Zur Simulation (durchgezogene Linien) verwendete Parameter: $K_1 = 0,01$ mM, $K_2 = 1$ mM, $K_3 = 0,3$ mM, $K_4 = 0,1$ mM, $K_5 = 7$ mM, $K_6 = 2$ mM, $K_7 = 0,01$ mM, $K_7 = 0,02$ mM, $K_0 \gg 1$, damit wird der Zustand x_0 praktisch nicht populierte; $fl_4 = fl_8 = -18,3$ %; K_0 bis K_7 bzw. K_y aus Modell D, Abbildung 33. Halbsättigungskonstanten der Simulationskurven (durch Hill-Fit an die Simulationskurven bestimmt): $K_{1/2}^{Na} = 0,71$ mM (0 mM Mg^{2+}), 2,73 mM (1 mM Mg^{2+}), 4,13 mM (2 mM Mg^{2+}), 6,60 mM (5 mM Mg^{2+}), und 8,84 mM (10 mM Mg^{2+})

muß man fast zwangsläufig schließen, daß sich die Na-Bindung und/oder die Na/Mg-Kompetition realiter in weniger Stufen abspielen.

Diskussion

1 Untersuchungen an proteolytisch verdauten Na,K-ATPase-Präparationen

Proteolytische Spaltung mit nachfolgender Funktionsbestimmung des Proteinrumpfes ist eine etablierte Methode, um Beziehungen zwischen Struktur und Funktion eines Proteins zu klären. Durch den selektiven Verdau der Na,K-ATPase mit Trypsin konnte gezeigt werden, daß die membranständigen Teile der auf diese Weise hergestellten 19kD-Präparation für die Ionenbindung bzw. -okklusion ausreichend sind, wohingegen die ATP-abhängigen Funktionen durch die Abspaltung der cytoplasmatischen Schleifen verloren gehen. Mit den 19kD-Membranen steht eine Präparation zur Verfügung, mit der man die Ionenbindung unbeeinflusst von Vorgängen in der cytoplasmatischen Domäne untersuchen kann.

Um ein brauchbares Modell darzustellen, muß allerdings geklärt werden, ob die Ionenbindung durch den massiven strukturellen Eingriff, das Abtrennen etwa der halben Enzymmasse, nicht übermäßig in Mitleidenschaft gezogen worden ist. 19kD-Membranen zeigen jedoch eine unveränderte Rb(K)-Okklusion, sowohl in ihrer Affinität, als auch in der Stöchiometrie 2 Rb⁺ (K⁺) / Proteinmolekül (die spezifische Okklusion (in nmol/mg) hat sich wegen des Verlusts von ungefähr der halben Proteinmasse etwa verdoppelt) (Karl90, Capa92). Allerdings ist die Veränderung der Rb(K)-Deokklusion von monophasischem zu biphasischem Verlauf ein erster Hinweis darauf, daß sich die Ionenbindungsstellen durch den tryptischen Verdau doch funktionell verändert haben könnten.

Zur Na-Bindung gibt es bisher noch widersprüchliche Befunde (Schwp94, Karl90). Die Affinität des chymotryptischen Intermediats (stabiles Zwischenprodukt beim Verdau der 19kD-Membranen mit Chymotrypsin) für Rb⁺ (K⁺) ist unverändert geblieben (bei einer Meßtemperatur von 20 °C, Shai96, 00); Na-Bindung und -okklusion dieser Präparation sind Gegenstand neuester Untersuchungen (Shai00). Gegen thermische Inaktivierung soll die chymotryptisch verdaute Präparation jedoch durch sättigende Konzentrationen an Rb⁺ (K⁺) ebenso geschützt sein wie die 19kD-Membranen, was auf eine unveränderte Stabilität des noch weiter verkürzten Proteinrumpfes schließen läßt. Diese Ergebnisse aus biochemischen Experimenten konnte durch die vorgestellten Messungen zum größten Teil bestätigt und um folgende Ergebnisse erweitert werden:

Sowohl beim Schweine- als auch beim Kaninchenenzym wurde bei den Experimenten zur Charakterisierung festgestellt, daß die beobachteten maximalen Fluoreszenzamplituden des Na- und K-Effekts beim chymotryptischen Intermediat niedriger ausfielen als bei den 19kD-Membranen

(siehe Tabelle 1). Die Abnahme der Fluoreszenzamplituden vom nativen Enzym zu den 19kD-Membranen ließ sich durch die Änderung der Dielektrizitätskonstanten in der Umgebung des elektrochromen Farbstoffs erklären: Rund die Hälfte der Proteinmasse ($\epsilon \approx 3$) wird abgeschnitten und durch Wasser ($\epsilon \approx 80$) ersetzt. Dies sollte zu einer Abnahme der maximalen Fluoreszenzantwort führen, was auch beobachtet wurde. Dieses Argument läßt sich jedoch nicht zur Erklärung der weiteren Abnahme der maximalen Fluoreszenzamplituden von den 19kD-Membranen zum chymotryptischen Intermediat heranziehen (siehe Tabelle 1), da sich beide Präparationen in ihrer Größe nur um wenige Aminosäuren unterscheiden und die Abmessungen beider Proteinrumpfe damit sehr ähnlich sein dürften. Daher muß man annehmen, daß durch den chymotryptischen Verdau entweder ein Teil ($\approx 30\%$) der Proteinrumpfe inaktiviert worden ist, oder daß das mit Chymotrypsin behandelte Enzym doch thermisch weniger stabil ist, und so innerhalb von 30 Minuten Meßzeit bei 8°C ohne Rb^+ im Puffer doch ein beträchtlicher Anteil der Moleküle durch Desaggregation der fünf Aminosäureketten inaktiviert. Im Licht neuester Ergebnisse scheint die letzte Möglichkeit wahrscheinlicher (Shai96, 00).

Bei allen drei Präparationen sowohl beim Schweineenzym als auch beim Kaninchenenzym konnte die Bindung von Ouabain und Strophantidin nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1). Die Affinität des Kaninchenenzym für Strophantidin war bei den 19kD-Membranen und der chymotryptischen Präparation sehr ähnlich und gegenüber dem nativen Enzym nur moderat (von $0.35\ \mu\text{M}$ auf 1.5 bzw. $2.4\ \mu\text{M}$) erniedrigt. Da für die Herzglycosidbindung Bereiche auf der Schleife $\text{H}_1 - \text{H}_2$ und auf den Helices H_4 , H_5 , H_6 und H_7 benötigt werden, sprechen die vorhandene Bindungsaktivität und nur moderat veränderte Affinität für die Herzglycoside für die Intaktheit der topologischen Organisation des Proteinrumpfes in beiden verdauten Präparationen.

Das Schweineenzym scheint sich insofern vom Kaninchenenzym zu unterscheiden, als hier die Strophantidinbindung fester erfolgt und daher nicht durch die Zugabe von $20\ \text{mM}$ KCl zu revertieren war (siehe Tabelle 1). Dies kann die Folge einer deutlich geringeren Rate für die Dissoziation des Strophantidins sein, oder aus einer höheren Assoziationsrate für das Herzglycosid resultieren. Alle Herzglycoside enthalten einen Geninkörper; Glycone zusätzlich dazu, verknüpft durch eine glycosidische Bindung, einen Zucker. Man geht davon aus, daß für den Zuckerrest bzw. den Geninkörper zwei verschiedene Bindestellen auf der Na,K-ATPase vorhanden sind. Da die Bindung des Glycons Ouabain wie auch die Bindung des Aglycons Strophantidin sowohl bei den 19kD-Membranen als auch beim chymotryptischen Intermediat nachgewiesen werden konnte (Tabelle 1), kann man davon ausgehen, daß bei beiden Präparationen sowohl die Zucker- als auch die Geninbindestelle intakt ist.

Na-Titrations an den drei verschiedenen Enzympräparationen ergaben, daß die Affinitäten für Na^+ mit zunehmendem Verdau abnahmen (Tabelle 2 und Abbildungen 8-10). Beim Schweine-

enzym ist dieser Effekt etwas stärker ausgeprägt als beim Kaninchenenzym; bei letzterem steigt der $K_{1/2}$ -Wert für die Na-Bindung beim ersten Proteolyseschnitt auf den zweifachen, beim zweiten Schritt auf den sechsfachen Wert (im Vergleich zum nativen Enzym). Beim Schweineenzym steigt der $K_{1/2}$ -Wert zunächst auf das vierfache, durch den zweiten Verdau sogar fast auf das zehnfache (siehe Tabelle 2). Das qualitative Verhalten der Pumpe beider Spezies ist jedoch identisch: Die Na-Affinität nimmt, besonders durch den Verdau mit Chymotrypsin, deutlich ab. Die geringe Affinitätseinbuße bei den 19kD-Membranen ist leicht verständlich; es wäre sehr ungewöhnlich gewesen, wenn das Enzym durch den Verlust seiner halben Masse in seiner Ionenbindung völlig unverändert geblieben wäre. Dennoch können die 19kD-Membranen in jedem Fall als gutes Modellsystem angesehen werden, um die Na-Bindung unbeeinflusst von Vorgängen im cytoplasmatischen, enzymatisch aktiven Part des Enzyms zu untersuchen.

Gravierender ist offenbar der chymotryptische Verdau, obwohl durch ihn lediglich 10 Aminosäuren des (cytoplasmatischen) N-Terminus der β -Untereinheit sowie einige Aminosäuren des N-Terminus der α -Untereinheit und des Loops H₄-H₅ abgespalten werden, wobei nur der erstgenannte Schnitt für die Rb-Okklusion von Bedeutung ist. Während die Affinität für Rb⁺ durch diesen Verdau ebenfalls unverändert geblieben ist (bei 20 °C, Shai00), hat die Affinität für Na⁺ (gemessen mit RH 421) deutlich abgenommen, auf ein Sechstel bis ein Zehntel des ursprünglichen Werts des nativen Enzyms (siehe Abbildungen 8, 10). Diese Beobachtung wird auch durch Okklusionsexperimente mit radioaktivem Na⁺ in Gegenwart von Oligomycin bestätigt (Shai00).

Überdies konnte nachgewiesen werden, daß nicht nur die Abtrennung des N-Terminus der β -Untereinheit zu einem deutlichen Absinken der Affinität für Na⁺ führt, sondern umgekehrt die Bindung von Na⁺ an 19kD-Membranen auch den N-Terminus der β -Untereinheit, ebenso wie das Fragment M₁-M₂ der α -Untereinheit, gegen den Verdau mit Chymotrypsin schützt (Shai00). Dieser Befund spricht überdies für eine Interaktion zwischen α - und β -Untereinheit. Die Affinität für das Na-Analogon Br₂-TITU hat durch den chymotryptischen Verdau noch drastischer abgenommen, nämlich auf ein Dreißigstel des ursprünglichen Wertes beim nativen Enzym. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, daß durch den chymotryptischen Verdau Bereiche der Pumpe abgetrennt wurden, die für die Na-Bindung bzw. die Bindung kompetierender Ionen sehr wichtig sind. Die Analyse der putativen Sekundärstruktur der ersten 40 Aminosäuren des N-Terminus der β -Untereinheit zeigt zwei ungeordnete Bereiche im Wechsel mit zwei helicalen Segmenten (Shai00).

Danach zeigen im ersten helicalen Abschnitt und der ersten Schleife die negativ geladenen Seitenketten der Aminosäuren in eine Richtung, während die positiv geladenen Seitenketten überwiegend in die Gegenrichtung orientiert sind (Abbildung 35). Es wird angenommen, daß diese durch die Bildung von Salzbrücken zur Interaktion mit der α -Untereinheit beitragen können, wäh-

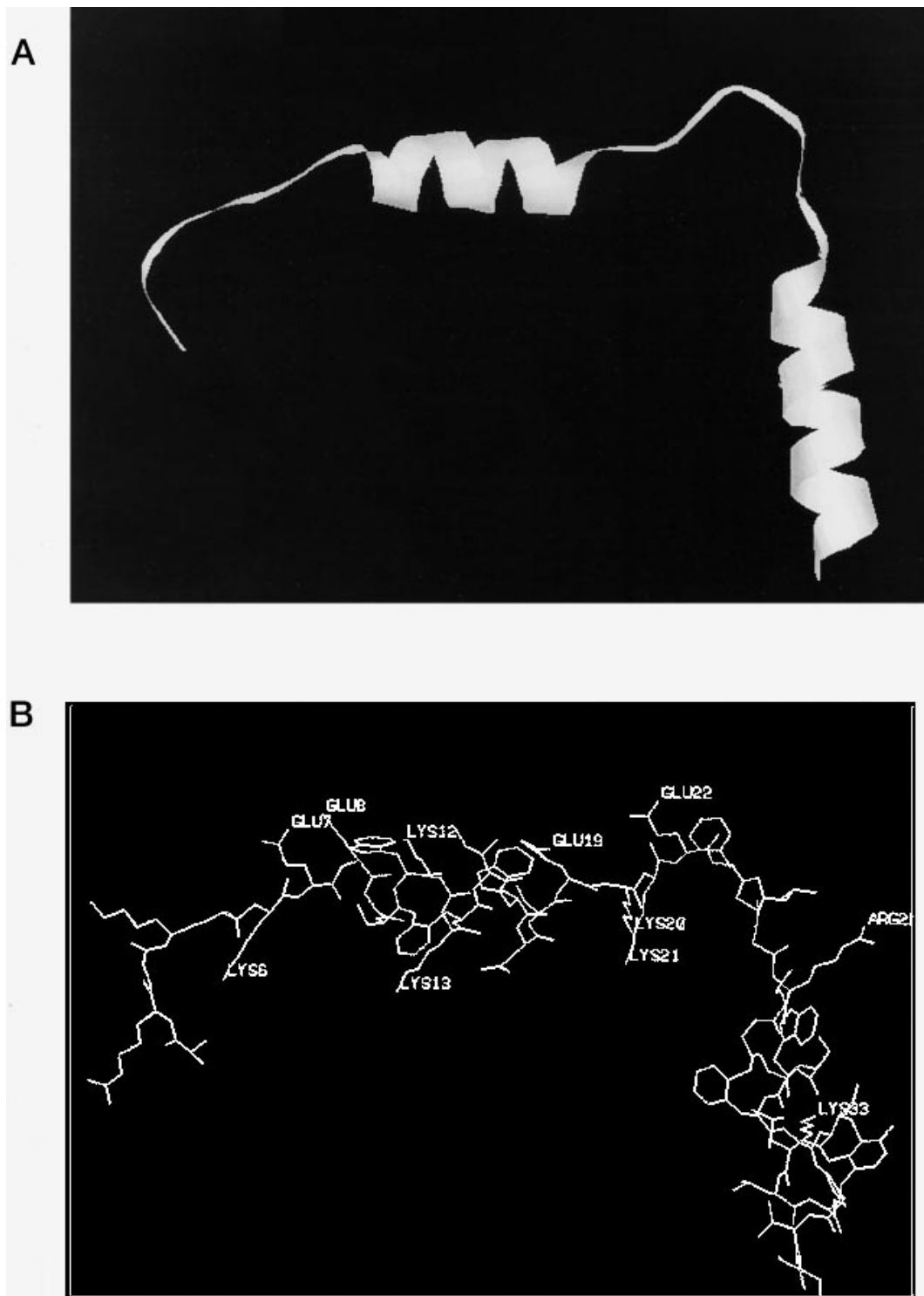


Abbildung 35: Sekundärstrukturvorhersage für den cytoplasmatischen Part der β -Untereinheit. Veranschaulichung als Band (ribbon, A), bzw. als "Drahtmodell" (wire, B) (aus Shai00).

rend die Glutamatseitenketten die Bindung von Na^+ bzw. Na-Analoga vermitteln könnten. Auch bei der Na,K-ATPase von *Xenopus* konnte gezeigt werden, daß das Abtrennen des N-Terminus der β -Untereinheit die Affinität für die cytoplasmatische Na-Bindung erniedrigt (Jaun93, Hasl98).

Diese Beobachtungen führen klar zu dem Schluß, daß der N-Terminus der β -Untereinheit eine wichtige Rolle bei der Na-Bindung auf der cytoplasmatischen Seite der Na,K-ATPase spielt. Da bekanntermaßen Aminosäuren in den transmembranären Helices M_4 , M_5 und M_6 eine zentrale Rolle bei der Ionenbindung spielen (siehe Einleitung 2 und Abbildung 2), und die Bindung von Na^+ an die 19kD-Membranen nicht nur den N-Terminus der β -Untereinheit, sondern auch cytoplasmatische Bereiche der α -Untereinheit schützen (siehe oben), liegt der Schluß nahe, daß α - und β -Untereinheit miteinander interagieren und zusammen die Ionenbindende Struktur bilden.

Shainskaya et al. (Shai00) schlugen vor, daß der N-Terminus der β -Untereinheit zusammen mit dem Loop M_6 - M_7 einen Eingangskanal bildet, an den Na- und K-Ionen und auch Kompetitoren binden können, und daß in einem zweiten Schritt Na^+ und K^+ an ihre weiter im Protein liegenden Bindungsstellen binden und dort okkludiert werden können. Dies bedeutet, daß es sich bei den ersten um recht unspezifische Bindungsstellen handelt, da die im Eingangskanal gebundenen Ionen ihre zunächst eingenommenen Plätze wieder verlassen müssen. Mit fluorimetrischen Methoden und dem Farbstoff RH 421 kann diese Hypothese leider nicht getestet werden, da die elektroneutrale Bindung an diese Bindungsstellen nicht direkt verfolgt werden kann. Der Hillkoeffizient der Na-Bindung von 1,4 in Abwesenheit von Mg^{2+} ist jedoch recht niedrig und gibt keinerlei Hinweise auf eine noch weitere Staffelung der Na-Bindung.

Denkbar wäre auch, daß der Loop M_6 - M_7 bzw. der N-Terminus der β -Untereinheit die Auskleidung der Wand eines Vestibüls zur Ionenbindung darstellt, analog zu den Gegebenheiten bei spannungssensitiven Ionenkanälen. Diese Hypothese hätte mehrere Vorteile: Zum einen müßte man keinen zweistufigen Mechanismus der Ionenbindung fordern, für den es kinetisch keine Evidenz gibt. Und zweitens müßte man nicht fordern, daß mehr als die notwendige Anzahl an Ionenbindungsstellen auf der Na,K-ATPase vorhanden sind, und die Ionen nach der Bindung an unspezifische Bindungsstellen schließlich zu ihren spezifischen Bindungsstellen wechseln. Die Okklusion würde in diesem Fall gleich an den (membranständigen) Bindungsstellen erfolgen, z. B. durch das Schließen eines Tores oder enges Zusammenfallen des Vestibüls.

Schließlich wäre auch noch vorstellbar, daß der Loop M_6 - M_7 eventuell zusammen mit dem N-Terminus der β -Untereinheit einen Teil des Tores bildet, das für die Okklusion der Na- oder K-Ionen zuständig ist. Da die apparente Affinität für Na^+ nicht nur im Okklusionstest, sondern auch in Experimenten mit RH 421 erniedrigt war, wäre dies ein Hinweis auf eine teilweise Okklusion bei der Na-Bindung, z. B. wie in (Schn00) vorgeschlagen: Hier wurde ein Modell entworfen, das in Analogie zu den Gegebenheiten bei der Ca-ATPase die Bindungsstelle für das dritte Na-Ion erst

erscheinen läßt, wenn die ersten zwei Na-Ionen gebunden und quasi eingeschlossen sind.

Experimente zur Na/Mg-Kompetition ergaben, daß die komplexe Abhängigkeit der apparenten Na-Affinität von der Mg-Konzentration beim nativen Enzym durch die Abspaltung des cytoplasmatischen Teils der Pumpe in eine einfache Kompetition um eine Bindestelle übergeht, also nun eine lineare Charakteristik, zudem mit sehr geringer Steigung, zeigt (Abbildung 12). Mg^{2+} ist also kaum noch in der Lage, mit Na^+ zu kompetieren: Verringerte die Anwesenheit von 10 mM Mg^{2+} im Puffer beim nativen Kaninchenenzym die apparente Na-Affinität noch auf $\frac{1}{18}$ (Schwein: $\frac{1}{10}$), so führen 10 mM Mg^{2+} bei den 19kD-Membranen bzw. dem chymotryptischen Enzym (Kaninchen) nur noch zu einer Verringerung der Affinität auf $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ (im Vergleich zu Messungen ohne Mg^{2+} im Puffer), beim Schwein auf $\frac{1}{3}$ bis $\frac{2}{3}$ (siehe Tabelle 2). Dies hat wohl zwei Gründe:

Zum einen hat Mg^{2+} (mindestens) zwei verschiedene Effekte auf die Na-Bindung, eine direkte Kompetition an den Bindungsstellen und eine allosterische Wirkung durch die Bindung an eine weitere Mg-Bindungsstelle (möglicherweise die ATP-Bindestelle, siehe Ergebnisse 3.2.2, 3.3). Die Besetzung beider Bindestellen führt zu einer Erniedrigung der apparenten Na-Affinität (siehe Abbildungen 28, 29). Bei den proteolytisch verdauten Präparationen ist der cytoplasmatische Part des Enzyms abgespalten, so daß nur noch die direkte Kompetition an den Ionenbindungsstellen einen Beitrag leistet. Damit sollte die Hemmung der Na-Bindung durch Mg-Ionen bei diesen Präparationen geringer ausfallen als beim nativen Enzym, was auch beobachtet wird.

Allerdings fiel die Steigung der ermittelten linearen Abhängigkeit der Na-Affinität der 19kD-Membranen von der Mg-Konzentration deutlich geringer aus als die des nativen Enzyms (siehe Abbildung 12), Mg-Ionen waren also weniger effektiv dazu in der Lage, Na-Ionen aus ihren Bindungsstellen zu vertreiben. Dies bedeutet, daß die Mg-Bindestellen in ihrer Affinität deutlicher verändert sind als die Na-Bindestellen. Das Mg-Ion ist (im dehydratisierten Zustand) etwas kleiner als das Na-Ion und trägt die doppelte Ladung. Daher weist dieser Befund auf eine Aufweitung des Ionenbindungskäfigs hin, so daß die größeren Na-Ionen *etwas* schlechter, die kleineren Mg-Ionen deutlich schlechter gebunden werden. Dies ist auch in klares Indiz dafür, daß diese Bindungsstellen nicht einfach nur durch negative Ladungen von Aspartylresten gebildet werden, da in diesem Fall die Mg-Affinität (ebenso wie die Affinitäten für die zwei Na-Ionen, die aber nicht direkt zugänglich sind) durch den Verdau unverändert hätten bleiben müssen.

Möglicherweise erleichtern die negativen Ladungen durch ihre weitreichende elektrostatische Anziehungskraft lediglich die Annäherung der positiv geladenen Ionen an die Bindungsstellen (Gouy-Chapman-Effekt), während die eigentliche koordinative Bindung dann überwiegend durch ungeladene, Sauerstoff enthaltende Dipole vermittelt wird. Die negativen Ladungen spielen jedoch bei der Okklusion als Gegenionen sicher eine wichtige Rolle. Mit dieser Interpretation wären auch die Beobachtungen vereinbar, daß die Affinität der 19kD-Membranen bzw. des chymotryptischen

Intermediats für Rb^+ (K^+) gleichgeblieben zu sein scheint (Rb/K -Ionen sind größer als Na -Ionen), die Deokklusion von Rb^+ (K^+) jedoch anders als im nativen Enzym verläuft.

2 Vergleich zwischen Messungen mit RH 421 und FITC

Trotz intensiver Studien zur Aufklärung der Beziehung zwischen Struktur und Funktion der Na,K-ATPase sind essentielle Aspekte ihres funktionellen Mechanismus nach wie vor ungelöst. Zwei Fragestellungen sind dabei besonders interessant: Zum einen, wie sich der exakte Mechanismus der Iontentranslokation über der Membran darstellt, und zum anderen, welche Interaktionen zwischen Ionenbindungsstellen und katalytischer (Phosphorylierungs- und ATP-) Bindestelle stattfinden, um schließlich einen Transport gegen den elektrochemischen Gradienten zu ermöglichen (energy transduction). Zu dieser Frage nach der Art der Kopplung dieser beiden teilautonomen funktionellen Bereiche liefert der Vergleich zwischen FITC- und RH 421-Messungen interessante Aspekte:

FITC bindet an Lys 501, das neben anderen Aminosäuren an der ATP-Bindung beteiligt sein soll (siehe Einleitung Punkt 2 und Mat & Met 3.4). Dadurch ist das Enzym nicht mehr durch ATP phosphorylierbar, da die Bindung von ATP sterisch verhindert wird. Vergleichsmessungen zwischen mit FITC gekoppeltem und unbehandeltem Enzym zeigen jedoch, daß die Ionenbindung, gemessen mit RH 421, durch die Anheftung des Chromophors nicht verändert bzw. beeinträchtigt ist. Da die Ionenbindung im membranständigen Part des Enzyms, die Kopplung mit FITC jedoch im cytoplasmatischen Teil der Pumpe stattfindet, ist diese Beobachtung nicht überraschend. In früheren Untersuchungen zur Ionenbindung, die mit FITC durchgeführt worden waren, konnten je nach zugegebenem Substrat zwei verschiedene Fluoreszenzniveaus nachgewiesen werden (Reph86, Karl80, Smir93b, 95). Lediglich Hegyvary and Jørgensen gingen in einer der ganz frühen Arbeiten von der Existenz von mehr als zwei unterscheidbaren Fluoreszenzniveaus aus (Hegy81). Durch die Rauschmut der hier vorgestellten Messungen und ein verbessertes Auswertungsverfahren (siehe Mat & Met 4) konnte ein zusätzliches Fluoreszenzniveau gefunden und durch sukzessive Zugabe von Na -Ionen auch titriert werden (Abbildung 14). Der Vergleich dieser Titrations mit auf identische Weise durchgeführten RH 421-Messungen zeigte, daß die mit beiden Methoden ermittelten Halbsättigungskonzentrationen für die Na -Bindung praktisch identisch waren. Da man annimmt, daß RH 421 die Bindung des dritten Na -Ions ans Enzym anzeigt (Heys94, Schu95), wurde das neue Fluoreszenzlevel dem Zustand Na_3E_1 zugeordnet.

Der Übergang $\text{E}_1 \rightarrow \text{E}_2(\text{K}_2)$ verursacht eine Fluoreszenzabnahme von etwa 35 %, der Übergang $\text{E}_1 \rightarrow \text{Na}_3\text{E}_1$ jedoch nur eine Änderung um 7 %. Daraus kann man schließen, daß diese Konformationsänderung nicht von so globaler Natur ist wie der Wechsel der Hauptkonformationen $\text{E}_1 \rightarrow \text{E}_2$.

Dennoch ist diese kleine Konformationsänderung höchst interessant: FITC ändert seine Fluoreszenzeigenschaften aufgrund von Änderungen des lokalen pH in seiner Umgebung (siehe Mat & Met 3.4). Schon kleine Veränderungen der strukturellen Anordnung der Polypeptidkette in der Nähe des Farbstoffs wie Bewegungen von polaren Seitenketten um wenige Angström können den lokalen pH verändern und damit zu einer Fluoreszenz-"Antwort" führen. Offensichtlich hat die Bindung der Na-Ionen an ihre Bindungsstellen, die durch die membranständigen Teile der Pumpe gebildet werden, einen Einfluß auf die Fluoreszenz von FITC, das an der ATP-Bindestelle im cytoplasmatischen Part des Enzyms sitzt.

Konformationsabhängige räumliche Umlagerungen der cytoplasmatischen Polypeptidkette, die den enzymatischen Apparat des Proteins enthält, konnten schon mit verschiedenen Techniken nachgewiesen werden: Die Hauptkonformationen E_1 und E_2 können anhand unterschiedlicher tryptischer Spaltungsmuster unterschieden werden. Dies zeigt, daß jeweils verschiedene Teile der Pumpe nach außen gekehrt und damit proteolytisch angreifbar sind. Eine detailliertere Analyse von konformationsabhängigen Interaktionen zwischen verschiedenen cytoplasmatischen Teil-domänen des Enzyms veröffentlichten Goldshleger und Karlish (Gold97): Sie konnten mittels Fe-abhängiger Spaltung der Polypeptidkette zeigen, daß die größere und die kleinere cytoplasmatische Schleife in der E_2 -Konformation eng zusammenliegen, beim Übergang in die E_1 -Konformation jedoch auseinanderfallen. Man kann sich leicht vorstellen, daß dieses Rearrangement der Schleifen die Topologie in der Nähe des Fluorophors wesentlich beeinflußt und so zu einem Fluoreszenzabfall von ca. 35 % beim Übergang von $E_1 \rightarrow E_2$ führt. Auch strukturelle Änderungen innerhalb der ATP-Bindungstasche selbst konnten nachgewiesen werden: Gatto et al. (Gatt97) zeigten durch Experimente mit dem bifunktionellen Agens H_2 -DIDS, daß die beiden Aminosäuren Lys 501 und Lys 480 in Anwesenheit von Na^+ nahe genug beieinander sind, um einen Crosslink zu ermöglichen, dieser aber durch die Bindung von mindestens einem K-Ion ans Enzym verhindert wird (Abbildung 36).

Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Distanz zwischen beiden Lysinen im Na-gebundenen Zustand um einige Ångström geringer ist als im K-gebundenen Zustand. Aus diesen Beobachtungen läßt sich der Schluß ziehen, daß die Bindung des (vermutlich) dritten Na-Ions an die Ionenpumpe (im Zustand Na_2E_1) zu einem Rearrangement eines oder mehrerer Segmente des transmembranären Parts führt, und daß diese strukturelle Veränderung zu der großen cytoplasmatischen Schleife mit der ATP-Bindestelle weitergeleitet wird. Ein möglicher Mediator dieser Signalübermittlung zwischen katalytischer und Ionenbindestelle könnte das Segment zwischen Asp 371 und dem PEGM-Motiv am cytoplasmatischen Ende der vierten Transmembranhelix sein: Diese Aminosäuresequenz ist hoch konserviert innerhalb der Familie der P-Typ-ATPasen (Referenzen in Vils97a). Weitere mögliche Kandidaten für die Signalweiterleitung könnten die ebenfalls hoch konservierte Verbindungs-(junctional) region J, die Scharnierregion (hinge) und die Haarnadel zwischen M_5

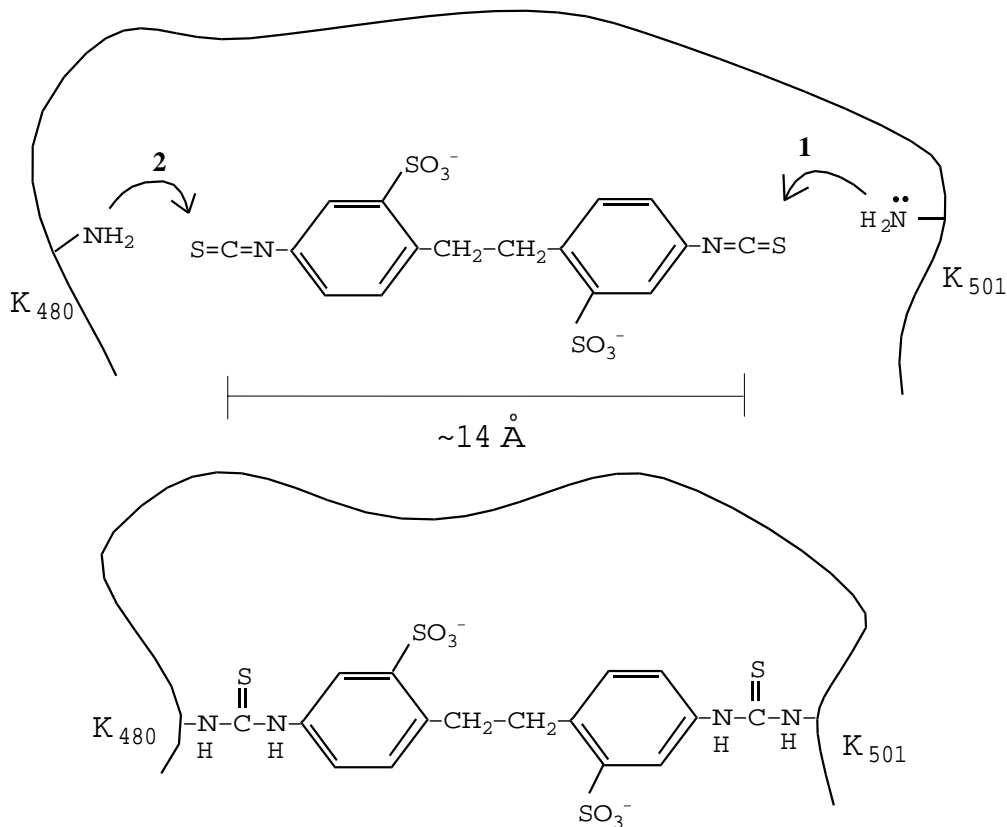


Abbildung 36: **Schema des Crosslinks zwischen Lys 480 und Lys 501 durch H₂-DIDS** (nach Gatt97, verändert). Schritt 1: Nukleophile Addition des reaktiven H₂N-K₅₀₁ an eine der Isothiocyanatgruppen von H₂-DIDS. Schritt 2: Nun ist die zweite Isothiocyanatgruppe in der Nähe von K₄₈₀ "fixiert"; dies vereinfacht die Reaktion mit dem weniger reaktiven H₂N-K₄₈₀.

und M₆ sein (Luts93, Møll96).

Die Na,K-ATPase hält ihre Stöchiometrie von 3 Na⁺ / 2 K⁺ / 1 ATP unter nahezu allen Bedingungen aufrecht. Daher ist der Vergleich zwischen den gezeigten Na-Titrations mit FITC und RH 421 ein starker Hinweis darauf, daß die elektrogene Bindung des dritten Na-Ions an seine hochspezifische Bindungsstelle zu einer Änderung der Konformation des Enzyms führt, die als Trigger für die Phosphorylierung durch ATP wirkt. Durch die Konformationsänderung gelangt die Phosphorylierungsstelle Asp 371 in die richtige Position, so daß nun das energiereiche γ -Phosphat des gebundenen ATP auf das Protein übertragen werden kann. Auf diese Weise wird die Stöchiometrie 3 Na⁺ / 1 ATP aufrechterhalten. Die Existenz eines solchen Triggermechanismus mußte aufgrund prinzipieller Überlegungen gefordert werden, da die Pumpe sicherstellen muß, daß der energieverbrauchende Schritt des Pumpzyklus, die Nutzung der freien Enthalpie des gebundenen ATP, nur stattfindet, wenn die physiologisch erforderliche Anzahl an Na-Ionen ans Enzym gebunden hat.

Unter physiologischen Bedingungen stellt die Hydrolyse von ATP eine freie Enthalpie von 55

kJ/mol zur Verfügung. Die elektrochemische Arbeit, um Na-Ionen vom Cytoplasma in den Extrazellulärraum zu transportieren, liegt bei 12,5 kJ/mol (Läug91b). Das bedeutet, daß etwa 23 % der verfügbaren Enthalpie für die Translokation jedes Na-Ions verbraucht wird. Um möglichst wenig Energie zu verschwenden, ist es von entscheidender Wichtigkeit für den Energiehaushalt einer Zelle, daß die Na,K-ATPase unter physiologischen Bedingungen eine feste Stöchiometrie einhält. Hinweise auf eine mögliche Abweichung von der Kopplungsrate $3 \text{ Na}^+ / 2 \text{ K}^+ / 1 \text{ ATP}$ stammen ausschließlich aus Experimenten mit extrem niedrigen cytoplasmatischen Na-Konzentrationen. Diese Ergebnisse der Untersuchungen an Vesikeln aus inside-out Erythrocyten lassen allerdings auch andere, durch das experimentelle Verfahren bedingte Erklärungen für die scheinbare Abweichung von der normalen Kopplungsrate zu (Blos83, 92).

Daher bietet die vorgestellte Interpretation der erstaunlich gut übereinstimmenden Daten der FITC- und RH 421-Messungen eine sehr einfache Antwort auf die Frage, mit welchen Mechanismen die Ionenpumpe sicherstellt, daß die Phosphorylierung durch ATP nur stattfindet, wenn auch drei Na-Ionen ans Enzym gebunden haben.

3 **Kompetition zwischen ein- bis dreiwertigen Ionen**

Abbildung 37 zeigt, daß einfach positiv geladene Ionen nur mit den Ionenbindungsstellen wechselwirken können, wenn sie einen Radius zwischen 0,5 und 1,5 Å besitzen. Der optimale Radius eines Ions mit der Folge höchster Affinität zu den Bindungsstellen scheint bei etwa 1,5 Å zu liegen. Darüber nimmt die Affinität drastisch ab, das Ion "paßt" nicht in die Bindungstasche; unterhalb von 1,5 Å nimmt die Affinität nur langsam ab, konsistent mit der Vorstellung, daß das Ion, je kleiner es ist, desto schlechter mit den z. B. von O-Gruppen zur Verfügung gestellten Orbitalen wechselwirken kann, da dies oberhalb bestimmter Abstände nur noch schlecht möglich ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Bindungstasche selbst wohl einen Radius von weniger als 1,8 Å haben muß, um einem Ion von 1,5 Å Radius optimale Bedingungen zur Bindung bieten zu können.

Da man annimmt, daß Na- und K-Ionen an die gleichen Bindungsstellen binden, folgt daraus zwangsläufig, daß die Affinität des Enzyms in E_1 für Na-Ionen geringer sein muß als die für K^+ , ebenso wie es auch auf der extrazellulären Seite der Fall ist. Diese Schlußfolgerung mag kontraintuitiv erscheinen, da damit das Enzym in Konformation E_1 bei einer intrazellulären K-Konzentration von 150 mM und einer Na-Konzentration von 10 mM zum bei weitem überwiegenden Teil im K-gebundenen Zustand vorliegt; da jedoch nur die wenigen Enzymmoleküle mit gebundenen Na-Ionen im Zyklus fortschreiten, resultiert dies unter turn-over-Bedingungen dennoch in einer höheren apparenten cytoplasmatischen Affinität der Pumpe für Na^+ als für K^+ (Glyn85).

Konsistent damit ist auch die Beobachtung, daß das deutlich größere Cholin-Ion (circa $4 \times 6 \text{ Å}$)

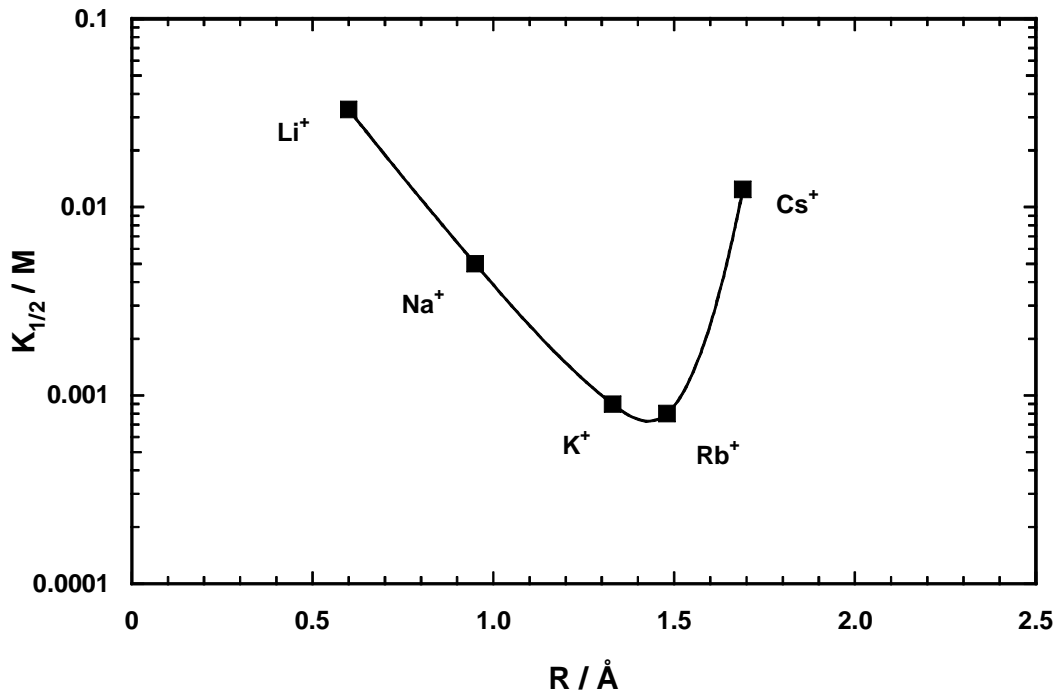


Abbildung 37: **Kompetition zwischen Alkalimetallionen:** Halbsättigungskonstanten der Rücktitrationen aus Abbildung 19, aufgetragen gegen den Ionenradius. Standardpuffer mit 3 mM NaCl (Na: 3 mM KCl), 16 °C.

kaum mit Na-Ionen kompetiert; hier sind meßbare Effekte erst bei 150 bis 200 mM (!) Konzentration zu sehen. Interessanterweise zeigte sich, daß die Affinität der Pumpen für Na^+ deutlich stieg, wenn neben den 25 mM Histidin und 0,5 mM EDTA auch 100 mM Cholinchlorid im Puffer anwesend war. Dies ist ein Hinweis darauf, daß im Puffer mit niedriger Ionenstärke die Pumpe keine optimalen Bedingungen vorfindet, und für das Einnehmen der besten nativen Konformation eine Ionenstärke von mindestens 100 bis 150 mM unerlässlich ist. In der Zelle wird diese Ionenstärke durch K-Ionen (150 mM) erzeugt.

Ebenso wie Alkalimetallionen kompetieren auch Erdalkalimetallionen mit Na^+ . Die Zugabe von Alkalimetallionen hatte keine signifikante Änderung der RH 421-Fluoreszenz zur Folge; dies ist bei den Erdalkalimetallionen anders: Mg-Ionen bewirken eine deutliche positive Fluoreszenzänderung, Sr- und Ba-Zugabe führte zu einem leichten Abfall der Fluoreszenz (siehe Abbildung 22). Die Bindung von Mg-Ionen führt anscheinend zu Veränderungen am Protein, so daß trotz der positiven Ladung von Mg^{2+} netto negative Ladungen in die Membran hineinverschoben werden, was zu einem Anstieg der RH 421-Fluoreszenz führte. Dafür könnten Carboxylgruppen von Aminosäureseitenketten oder Dipole aus O-enthaltenden Gruppen verantwortlich sein. Sr^{2+} und Ba^{2+} sind die einzigen aller bisher getesteten Ionen, die einen zumindest Na-ähnlichen Effekt auf die

RH 421-Fluoreszenz haben, also zu einem Abfall der Fluoreszenz führten.

Da Sr^{2+} wie auch Ba^{2+} inhibitorisch auf die Pumpe wirkt, und da es kaum vorstellbar ist, daß die beiden Ionen, die deutlich größer als das Na-Ion und zudem zweifach positiv geladen sind, an die "elektrogene" Na-Bindungsstelle binden können, handelt es sich hier wohl um einen unspezifischen Effekt auf das Protein. Dieser Effekt ist zudem erst bei hohen Konzentrationen (≥ 40 mM) signifikant. In diesem Konzentrationsbereich kann man jedoch davon ausgehen, daß die Pumpe schon (wahrscheinlich irreversibel) geschädigt ist. Dasselbe gilt auch für Mg-Konzentrationen oberhalb von 15 bis 20 mM. (Überdies komplexieren die zweifach positiv geladenen Ionen die Lipide der Membran, was sich auf die Aktivität von Proteinen wie Ionenpumpen ebenfalls hemmend auswirkt (Düzg83) und überdies den Farbstoff beeinflusst.)

Unter Verwendung des beschriebenen Modells für die Kompetition zwischen Na- und Mg-Ionen (siehe Ergebnisse 4) ist es gelungen, den Anstieg der Halbsättigungskonstanten für die Na-Bindung in Abhängigkeit der Mg-Konzentration durch Simulationen mit geeigneten Parametern sehr gut zu reproduzieren (siehe Abbildung 34). Dies gelang jedoch nur, wenn die Affinitäten für die Na-Bindung so gewählt wurden, daß das erste Na-Ion sehr hochaffin gebunden wird (K_1 klein), das zweite mit einer moderaten Affinität, und das dritte mit einer im Vergleich zur zweiten erhöhten Affinität ($K_3 < K_2$).

Es ist nicht verwunderlich, daß das erste Na-Ion deutlich leichter an die Pumpe bindet als das zweite: Aller Wahrscheinlichkeit nach sind an der Bindung der Na-Ionen zwei negative Ladungen von Aspartat-Seitenketten beteiligt. Das elektrische Feld dieser Ladungen reicht weiter in den Puffer hinein und kann daher auf größere Entfernungen Ionen einfangen (Gouy-Chapman-Effekt), wenn nicht eine von ihnen schon durch ein gebundenes Na-Ion abgeschirmt wird. Die Beobachtung $K_3 < K_2$ kann als Hinweis darauf interpretiert werden, daß die dritte Bindungsstelle erst erscheint, wenn die ersten zwei mit Na-Ionen besetzt und durch die Bildung eines quasi-okkludierten Zustands unzugänglich geworden sind. So könnte die dritte, "elektrogene" Bindungsstelle trotz höherer Affinität als die zweite als letzte gefüllt werden. Abbildung 38 illustriert, wie man sich diese funktionelle Einschränkung strukturell verwirklicht denken kann.

Danach erfolgt die Bindung von zwei Na- oder K-Ionen zunächst an den zwei benachbarten Bindungsstellen. Im Fall von K^+ folgt darauf der Konformationsübergang in den Zustand $E_2(\text{K}_2)$, im Fall von Na^+ werden die beiden Ionen durch einen quasi-okkludierten Zustand im Protein eingeschlossen, und die dritte, elektrogene Bindungsstelle wird zugänglich. Diese wird dann trotz höherer Affinität als die zweite Bindungsstelle als letzte gefüllt. Abbildung 38 verwendet auch die strukturelle Information, daß Aminosäuren auf den Helices H_5 , H_6 und H_8 äußerst wichtig für die Ionenbindung sind (siehe Einleitung 2). Die Anordnung der Aminosäuren ist angelehnt an einen Modellvorschlag von B. Vilsen (Vils97b).

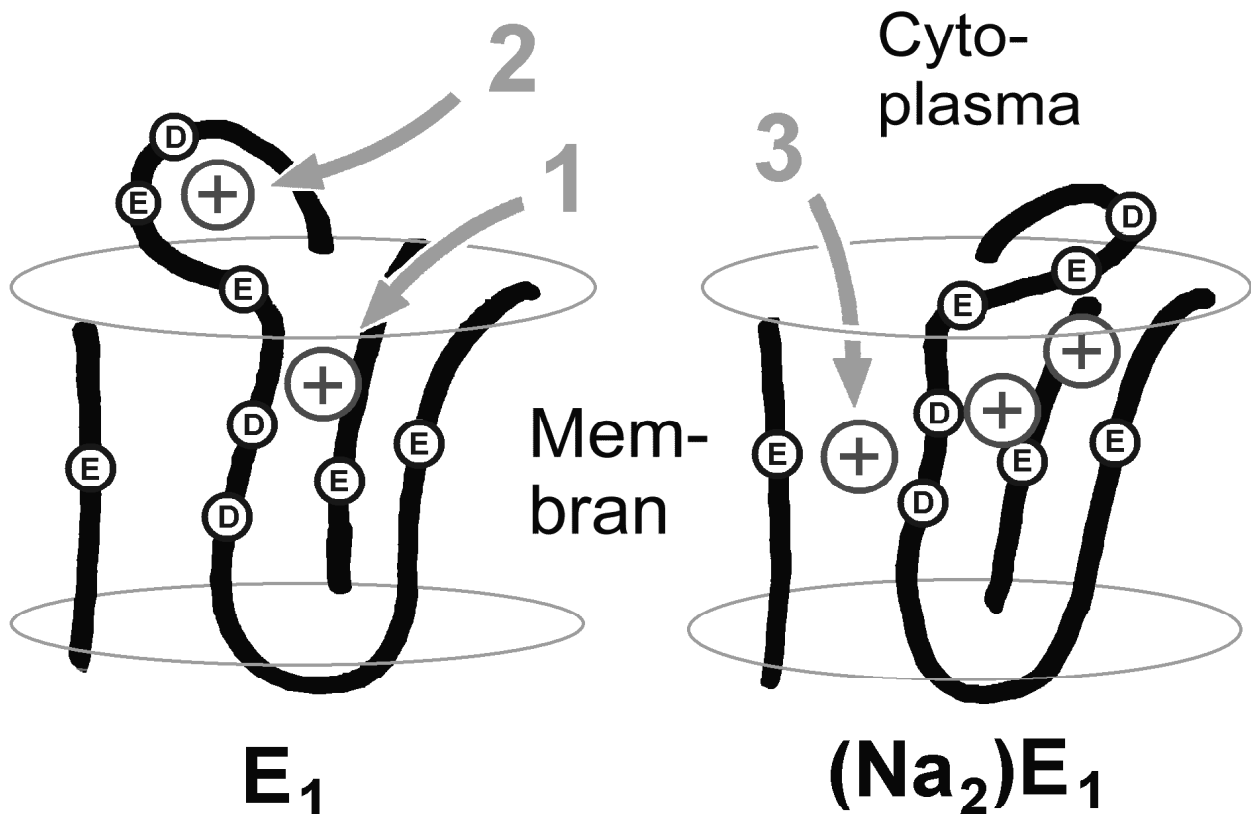


Abbildung 38: **Modellvorschlag für die cytoplasmatischen Ionenbindungsstellen der Na,K-ATPase** in Analogie zum Modell für die Ca-ATPase (Meng98). Anordnung der negativ geladenen Aminosäuren D (Aspartat) bzw. E (Glutamat) nach Vils97b. Aus Schn00.

Das Modell in Abbildung 38 trägt auch neuesten Ergebnissen über die Struktur der Na,K-ATPase und der nah verwandten Ca-ATPase Rechnung: Menguy et al. veröffentlichten 1998 ein Modell zur Ca-Bindung, das im Gegensatz zu vorherigen Modellen nicht von einer Bindung nach einem "single-file"-Mechanismus ausgeht, sondern die zweite Bindungsstelle für Ca^{2+} ebenfalls erst erscheinen läßt, wenn die erste bereits gefüllt ist (Meng98). Dabei wurde dem Loop zwischen M_6 und M_7 eine zentrale Rolle bei der Ca-Bindung zugewiesen. Shainskaya et al. (Shai00) fanden durch Spaltung der Na,K-ATPase mit verschiedenen Proteasen, daß der Loop M_6 - M_7 auch bei dieser Pumpe eine wichtige Rolle bei der Ionenbindung zu spielen scheint, Ca-Ionen binden kann und die Affinität des Enzyms für Na^+ und Na-Antagonisten entscheidend beeinflusst. Auch diese Gruppe geht von einer zweistufigen Ionenbindung aus (Shai00, Or93).

Die Übereinstimmung der Daten und Simulationskurven in Abbildung 34 zeigen, daß die Annahme von einem allosterischen und einem an den Ionenbindungsstellen kompetierenden Mg-Ion sinnvoll ist, und sich damit die Konkurrenz zwischen Na^+ und Mg^{2+} sehr gut beschreiben läßt.

Auch die anderen Annahmen des Modells haben sich überwiegend als sinnvoll herausgestellt (siehe Ergebnisse 4 und unten): Die Zahl der Ionenbindungsstellen der Na,K-ATPase kann als gesichert angesehen werden. RH 421-Experimente (Stür91, Heys94, Doma97) sowie elektrische Messungen (Stür89, Doma99) zeigen übereinstimmend, daß die Na-Bindung elektrogen erfolgt. Die Beobachtung, daß die Simulationskurven (Abbildung 34) eine höhere Affinität für die Bindung des dritten als des zweiten Na-Ions erforderten, führte zur Entwicklung eines Modells, das in Einklang steht mit der Annahme, daß die elektrogene Bindungsstelle als letzte besetzt wird (siehe Abbildung 38).

Unter der Vielzahl an denkbaren Modellen war das Modell D (Abbildung 33) so entwickelt worden, daß es die verfügbare Vorinformation über die Beschaffenheit der Ionenbindungsstellen berücksichtigte, aber möglichst einfach blieb. Mit diesem Modell ließ sich die Konkurrenz zwischen Na^+ und Mg^{2+} dennoch sehr gut beschreiben. (Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es andere Modelle gibt, mit denen die Simulation der Daten ebenso möglich wäre.) Lediglich die Na-Bindung selbst zeigt eine systematische Abweichung: Die Simulationskurven weisen durchgehend eine höhere Sigmoidizität auf als die Meßkurven. Zwar steigt bei den Meßkurven bei zunehmenden Mg-Konzentrationen im Puffer der Hillkoeffizient an, jedoch nicht so stark wie vom Modell vorhergesagt. Noch gravierendere Beobachtungen sind, daß bei Zugabe von Sr^{2+} , Ba^{2+} oder dem dreifach positiv geladenen Ion $\text{Br}_2\text{-TITU}$ der Hillkoeffizient der Na-Bindung sogar fällt (Ergebnisse 3.2.1 und 3.4). Dies sind klare Hinweise darauf, daß die Annahme, es gäbe keine gemischten Bindungszustände, wohl nicht zutreffend war.

Läßt man diese zu, so kann man für die Na-Bindung an das Enzym mit gebundenem Erdalkali- oder sonstigem Ion eine veränderte Affinität fordern. Außerdem könnte Na^+ nach einem solchen Modell sofort an das Enzym binden, ohne daß das entsprechende Ion zuerst dissoziieren müßte (siehe Modell D Abbildung 33). Überdies könnte man sich vorstellen, daß die Na-Bindung den Komplex aus Na,K-ATPase und dem inhibierenden Ion destabilisiert und damit dessen Dissoziation erleichtert. Alle drei Prozesse sollten bei geeigneter Wahl der Parameter zu einer Verringerung des Hillkoeffizienten der Simulationskurven führen. Abbildung 39 zeigt ein Modell, das diese Überlegungen beinhaltet und überdies die oben beschriebenen funktionellen Einschränkungen berücksichtigt.

Nach diesem Modell besetzen Na^+ bzw. K^+ die innere Bindestelle als erste, da sie eine deutlich höhere Affinität besitzt. Die Erdalkalimetallionen bzw. $\text{Br}_2\text{-TITU}$ können mit der äußeren der beiden Bindungsstellen, an deren Bildung der Loop $\text{M}_6\text{-M}_7$ beteiligt ist, wechselwirken (siehe auch Abbildung 38), und zwar auch dann, wenn die innere Bindungsstelle bereits mit Na^+ oder K^+ besetzt ist. Werden in einem Experiment zuerst Erdalkalimetallionen zugegeben, so behindern diese nicht die Besetzung der inneren Bindestelle mit Na^+ bzw. K^+ . Dissoziiert das inhibierende

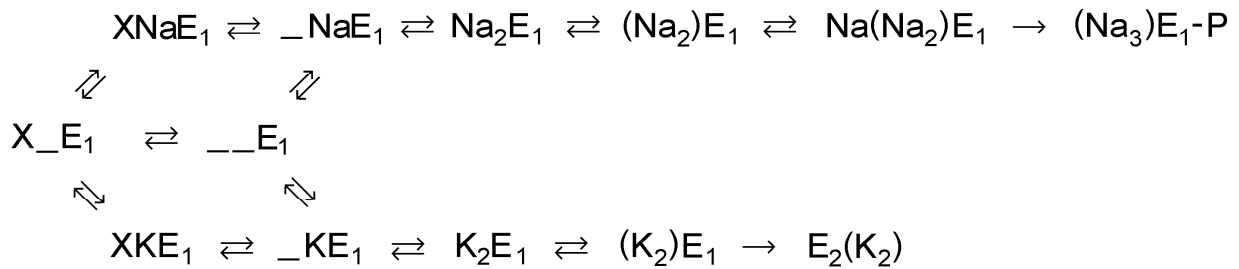


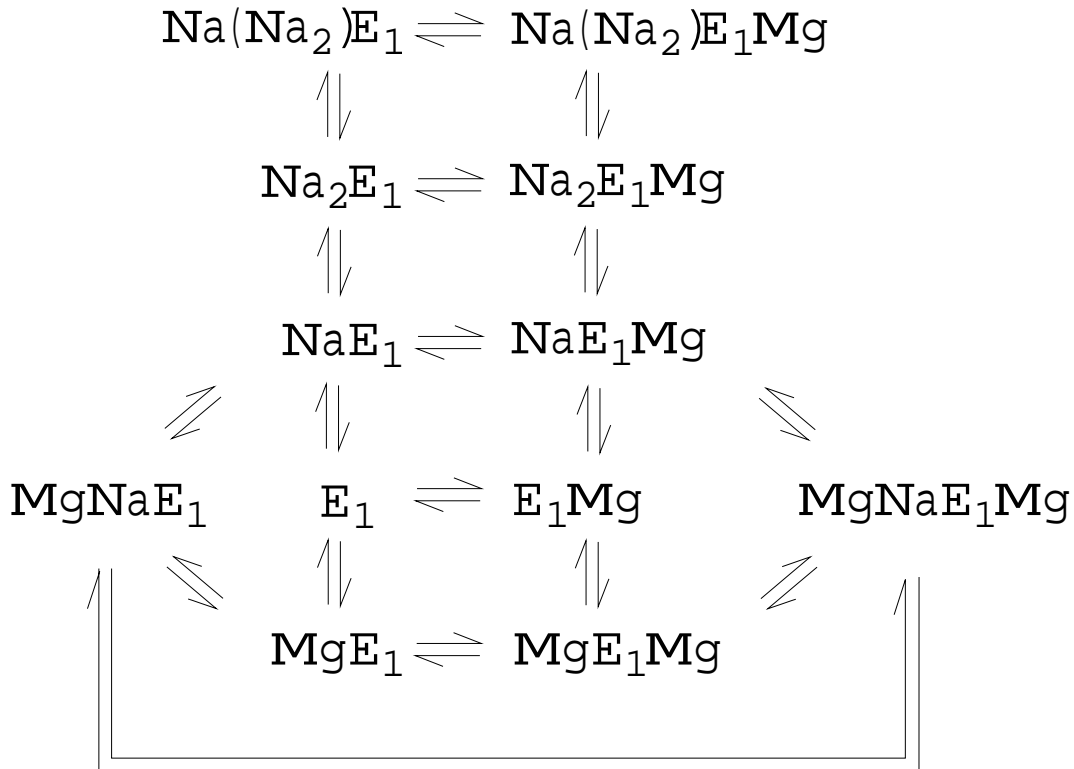
Abbildung 39: **Modell (E) zur cytoplasmatischen Ionenbindung und Kompetition zwischen Na^+ bzw. K^+ und anderen Ionen.** X: beliebiges Ion. Aus Schn00.

Ion ab, ist der Weg frei für die Bindung eines weiteren Na- oder K-Ions. Da eine Okklusion mit verschiedenen Ionen nicht gefunden werden konnte, kann der okkludierte Zustand offenbar nur nach der Bindung von zwei gleichen Ionen gebildet werden. Möglich wäre auch, daß er bei der Bindung von Na- und K-Ionen zwar gebildet wird, aber sehr instabil und damit zu kurzlebig ist, um einen nachfolgenden Konformationsübergang (im Fall von K^+) bzw. das Erscheinen der dritten Na-Bindestelle (bei Na^+) zu erlauben. Eine Okklusion im gemischten Zustand mit einem di- oder trivalenten Ion ist nicht möglich. Die Besetzung der dritten Na-Bindestelle ist ein elektrogener Vorgang, daher muß sich diese Bindungstasche innerhalb des Membrandielektrikums befinden. Nur Na-Ionen sind in der Lage, diese hochspezifische Bindungsstelle zu füllen.

Nach diesem Modell wird die Selektivität der Pumpe für Na^+ durch einen zweistufigen Mechanismus erreicht: Ein erster okkludierter Zustand ist nur stabil, wenn zwei gleiche Ionen gebunden haben; im Fall von K^+ folgt darauf spontan der Übergang nach $E_2(K_2)$, im Fall von Na^+ wird eine hochselektive Bindestelle zugänglich, die nur von Na-Ionen besetzt werden kann.

Das neue Modell E (Abbildung 39) beschreibt die Ionenbindungs- und Freisetzungsschritte in Anwesenheit di- oder trivalenter Na-Antagonisten. Es muß für den Fall von Mg-Ionen, die außer an den Ionenbindungsstellen noch an eine allosterische Bindungsstelle binden, analog zu Modell D erweitert werden (bzw. Modell D um die gemischten Zustände). Alle in Modell F aufgeführten Zustände sind dann sowohl mit als auch ohne allosterisch gebundenes Mg-Ion möglich. Diese Erweiterung ist in Abbildung 40 dargestellt (Modell F).

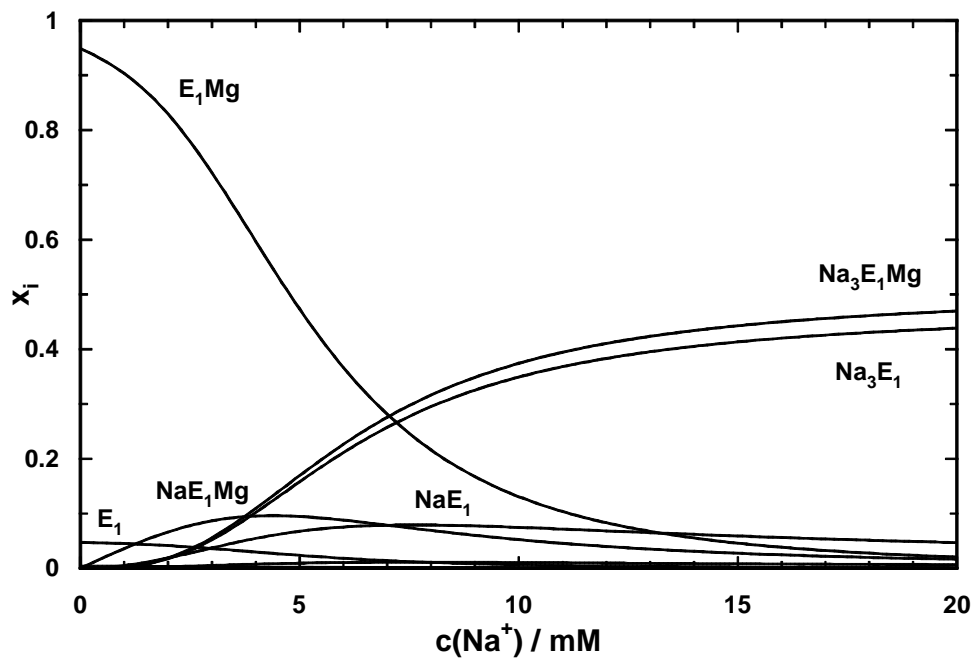
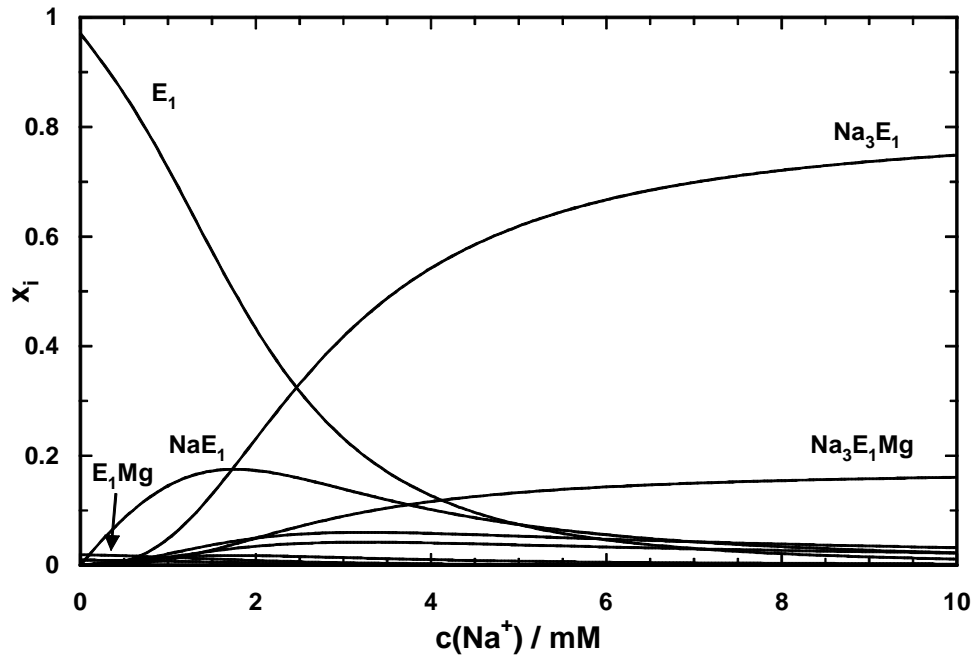
Man sieht, daß man gegenüber Modell D nur zwei neue, gemischt-gebundene Zustände einführen muß, so daß das Modell nicht wesentlich komplizierter geworden ist. Der Einfachheit halber wurde die Bildung des quasi-okkludierten Zustands und die Bindung des dritten Na-Ions zu einem Schritt zusammengefaßt. Mit diesem Modell müßten sich auch die Fluoreszenzkurven der Rücktitration des Na-Signals durch Zugabe von Mg-Ionen deutlich besser beschreiben lassen als mit Modell D. Eine Simulation mit den Parametern, die in Abbildung 34 verwendet wurden, hatte nämlich gezeigt, daß die am Rechner erzeugten Fluoreszenzkurven eine deutlich geringere appa-

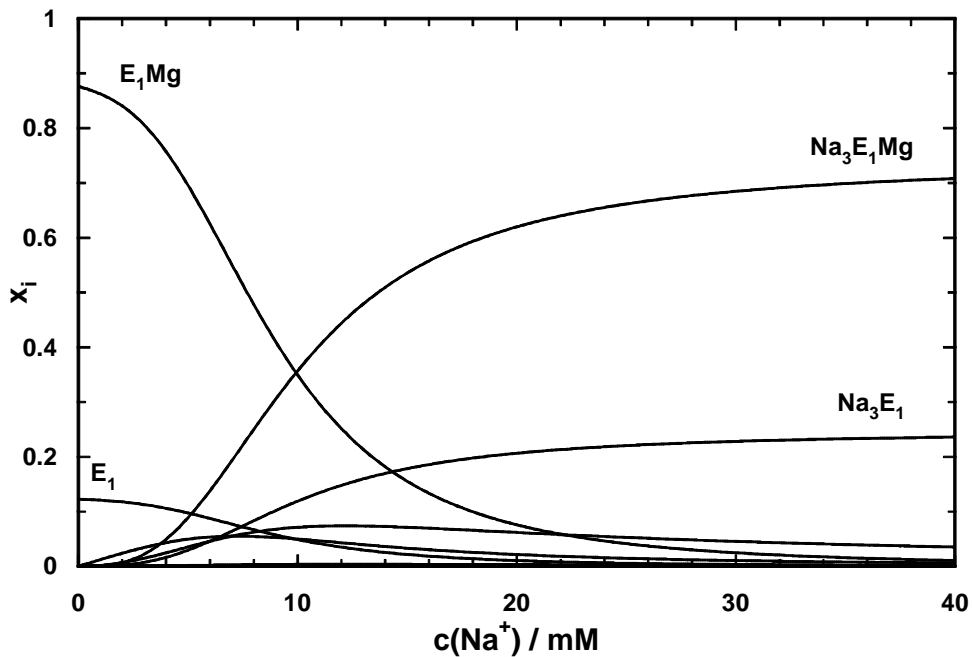
Abbildung 40: **Erweitertes Modell (F) zur Na/Mg-Kompetition.**

rente Affinität (höherer $K_{1/2}$ -Wert) der Pumpe für Mg^{2+} erwarten ließen, als die Meßdaten ergeben hatten. Dies liegt zum Teil daran, daß in Modell D Mg^{2+} erst an das Enzym binden kann, wenn alle Na-Ionen abdissoziiert sind. Nach dem erweiterten Modell F kann nun Mg^{2+} schon mit der Pumpe wechselwirken, wenn nur zwei Na-Ionen abdissoziiert sind. Dies sollte, zusammen mit der veränderten Affinität des Mg-gebundenen Enzyms für Na^+ , die mit gutem Grund als deutlich niedriger angenommen werden darf, zu einem drastischen Anstieg der apparenten Affinität des Enzyms für Mg^{2+} in den Simulationskurven führen. Mit diesem Modell sollte sich daher nicht nur die Mg-abhängige Na-Bindung (mit verbesserter Sigmoidizität), sondern auch die Na-abhängige Mg-Bindung befriedigend beschreiben lassen.

Anhang

Die folgenden Abbildungen zeigen Simulationen der Na-Bindung bei verschiedenen Mg-Konzentrationen (Modell D siehe Ergebnisse 4):





Die Mg-Konzentrationen waren 1 mM, 5 mM und 14 mM. Die dominanten Enzymspezies sind namentlich bezeichnet. Verwendete Parameter wie in Abbildung 34: $K_1 = 0,01$ mM, $K_2 = 1$ mM, $K_3 = 0,3$ mM, $K_4 = 0,1$ mM, $K_5 = 7$ mM, $K_6 = 2$ mM, $K_7 = 0,02$ mM, $K_0 = 10000$ mM, $K_g = 0,01$ mM. Diese Simulationen wurden ebenso wie die im Ergebnisteil beschriebenen mit dem Programm MaMgcom6 erstellt, das im folgenden abgedruckt ist.

```

program mamgcom 6
c
c last update: 5-juli-99
c Programm zur Simulation, 12 versch. Zustände,
c 0-3 Na geb., 0-3 Mg geb (2 kompetitiv)
c Möglichkeit zur Mg-Variation
c
dimension t(501),a(501),y(20,21),x(20),xx(12,501)
character fname*20,q*1
real*4 Na,Mg,Na0,Nam,Mg0,Mgm

common /disp1/ iarr(25),rarr(16)
common /hpl/ xypar(16),normfl

c Anfangsparameter *****

```

c

r1=1
r2=1
r3=1
r4=1
r5=1
r6=1
r0=1
r9=1
rg=1
rh=1
ri=1
rj=1
rf=1
rd=1
r8=1
re=1

c

rk1=.3
rk2=.3
rk3=.3
rk4=0.1
rk5=3
rk6=4.5
rk0=0.002
rk9=0.1
rkd=10
rk8=1
rkm=100000
na0=0
nam=50
mg=0
na=0
f14=-0.2
f18=-0.38
f19=.2
f15=.2
f110=.2

```

fl=1
c
1  call inp(rk1,'K1 =')
   call inp(rk2,'K2 =')
   call inp(rk3,'K3 =')
   call inp(rk4,'K4 =')
   call inp(rk5,'K5 =')
   call inp(rk6,'K6 =')
   call inp(rk0,'K0 =')
   call inp(rk9,'K9 =')
   call inp(rkm,'KMg =')
   call inp(rkd,'Kd =')
   call inp(rk8,'K8 =')
   call inp(fl4,'fl4 =')
   call inp(fl8,'fl8 =')
   call inp(fl5,'fl5 =')
   call inp(fl9,'fl9 =')
   call inp(fl10,'fl10 =')
   write(*,*)'Na-(1) oder Mg-(0)-Variation'
   read(*,*) naflag
c
113 if(naflag.eq.1.) then
      call inp(Na0,'[Na]min/mM =')
      call inp(Nam,'[Na]max/mM =')
      call inp(Mg,'[Mg] =')
      rarr(2)=Nam
      dna=(nam-na0)/500
    else
      call inp(Mg0,'[Mg]min/mM =')
      call inp(Mgm,'[Mg]max/mM =')
      call inp(Na,'[Na]/mM =')
      dmG=(mgm-mg0)/500
      rarr(2)=mgm
    endif
c
c      Konstanten sind Dissoziationskonstanten !!!!!
10  rm1=rk1*r1
    rm2=rk2*r2

```

```

rm3=rk3*r3
rm4=rk4*r4
rm5=rk5*r5
rm6=rk6*r6
rm0=rk0*r0
rm9=rk9*r9
rmg=rkm*rg
c          Berechnung der horizontalen Konstanten nach der Maschenregel
c
rmd=rkd*rd
rm8=rk8*r8
c
rmh=(1/rk1)*rkm*rk4*rh
if(rmh.gt.10000) then
  rmh=10000
endif
rmi=(1/rk2)*(1/rk1)*rkm*rk4*rk5*ri
if(rmi.gt.10000.) then
  rmi=10000
endif
rmj=(1/rk3)*(1/rk2)*(1/rk1)*rkm*rk4*rk5*rk6*rj
rmf=rk9*rkm*(1/rk0)*rf
if(rmf.gt.10000) then
  rmf=10000
endif
rme=rk8*rk9*rkm*(1/rk0)*(1/rkd)*re
if(rme.gt.10000) then
  rme=10000
endif
c
c Matrix *****
c
ndp=500
k=0
c ***** Na-Variation *****
if (naflag.eq. 1) then
do 2 na=na0,nam,dna
c

```

$$y(1,1)=-(\text{rg}*\text{Mg}+\text{r1}*\text{Na}+\text{r0}*\text{Mg})$$

$$y(1,2)=\text{rm1}$$

$$y(1,3)=0$$

$$y(1,4)=0$$

$$y(1,5)=\text{rmg}$$

$$y(1,6)=0$$

$$y(1,7)=0$$

$$y(1,8)=\text{rm0}$$

$$y(1,9)=0$$

$$y(1,10)=0$$

$$y(1,11)=0$$

$$y(1,12)=0$$

c

$$y(2,1)=\text{r1}*\text{Na}$$

$$y(2,2)=-(\text{rm1}+\text{rh}*\text{Mg}+\text{r2}*\text{Na})$$

$$y(2,3)=\text{rm2}$$

$$y(2,4)=0$$

$$y(2,5)=0$$

$$y(2,6)=\text{rmh}$$

$$y(2,7)=0$$

$$y(2,8)=0$$

$$y(2,9)=0$$

$$y(2,10)=0$$

$$y(2,11)=0$$

$$y(2,12)=0$$

c

$$y(3,1)=0$$

$$y(3,2)=\text{r2}*\text{Na}$$

$$y(3,3)=-(\text{rm2}+\text{ri}*\text{Mg}+\text{r3}*\text{Na})$$

$$y(3,4)=\text{rm3}$$

$$y(3,5)=0$$

$$y(3,6)=0$$

$$y(3,7)=\text{rmi}$$

$$y(3,8)=0$$

$$y(3,9)=0$$

$$y(3,10)=0$$

$$y(3,11)=0$$

$$y(3,12)=0$$

c

$$y(4,1)=rmj$$

$$y(4,2)=rmj$$

$$y(4,3)=-r3*Na+rmj$$

$$y(4,4)=rm3+rj*Mg+rmj$$

$$y(4,5)=rmj$$

$$y(4,6)=rmj$$

$$y(4,7)=rmj$$

$$y(4,8)=rmj$$

$$y(4,9)=rmj$$

$$y(4,10)=rmj$$

$$y(4,11)=rmj$$

$$y(4,12)=rmj$$

c

$$y(5,1)=rg*Mg$$

$$y(5,2)=0$$

$$y(5,3)=0$$

$$y(5,4)=0$$

$$y(5,5)=-rmg-r4*Na-r9*Mg$$

$$y(5,6)=rm4$$

$$y(5,7)=0$$

$$y(5,8)=0$$

$$y(5,9)=rm9$$

$$y(5,10)=0$$

$$y(5,11)=0$$

$$y(5,12)=0$$

c

$$y(6,1)=0$$

$$y(6,2)=rh*Mg$$

$$y(6,3)=0$$

$$y(6,4)=0$$

$$y(6,5)=r4*Na$$

$$y(6,6)=-rm4+rmh+r5*Na$$

$$y(6,7)=rm5$$

$$y(6,8)=0$$

$$y(6,9)=0$$

$$y(6,10)=0$$

$$y(6,11)=0$$

$$y(6,12)=0$$

c

$$y(7,1)=rm6$$

$$y(7,2)=rm6$$

$$y(7,3)=-ri*Mg+rm6$$

$$y(7,4)=rm6$$

$$y(7,5)=rm6$$

$$y(7,6)=-r5*Na+rm6$$

$$y(7,7)=rm5+rmi+r6*Na+rm6$$

$$y(7,8)=rm6$$

$$y(7,9)=rm6$$

$$y(7,10)=rm6$$

$$y(7,11)=rm6$$

$$y(7,12)=rm6$$

c

c ***** x0 heißt 8 !!!!

$$y(8,1)=r0*Mg$$

$$y(8,2)=0$$

$$y(8,3)=0$$

$$y(8,4)=0$$

$$y(8,5)=0$$

$$y(8,6)=0$$

$$y(8,7)=0$$

$$y(8,8)=-rf*Mg-rm0-rd*mg$$

$$y(8,9)=rmf$$

$$y(8,10)=rmd$$

$$y(8,11)=0$$

$$y(8,12)=0$$

c

$$y(9,1)=0$$

$$y(9,2)=0$$

$$y(9,3)=0$$

$$y(9,4)=0$$

$$y(9,5)=r9*Mg$$

$$y(9,6)=0$$

$$y(9,7)=0$$

$$y(9,8)=rf*Mg$$

$$y(9,9)=-rmf-rm9-r8*mg$$

```

y(9,10)=0
y(9,11)=rm8
y(9,12)=0

```

c

```

y(10,1)=0
y(10,2)=0
y(10,3)=0
y(10,4)=0
y(10,5)=0
y(10,6)=0
y(10,7)=0
y(10,8)=rd*mg
y(10,9)=0
y(10,10)=-re*mg-rmd
y(10,11)=rme
y(10,12)=0

```

c

```

y(11,1)=0
y(11,2)=0
y(11,3)=0
y(11,4)=0
y(11,5)=0
y(11,6)=0
y(11,7)=0
y(11,8)=0
y(11,9)=r8*mg
y(11,10)=re*mg
y(11,11)=-rm8-rme
y(11,12)=0

```

c

c Lin. Gleichung lösen *****

c

```

nrang=11
flag=1
do 55 i=1,11
55 x(i)=0
call linsys1(nrang,y,x,flag)
k=k+1

```

```

    if (k.gt.500) goto 3
    t(k)=na
c   ACHTUNG: Na3E1 (x4) ist in xx(4,i), Na3E1Mg (x8) in xx(10,i)
c       x(8)=x0 ! x0 ist in xx(2,i), x9 in xx(11,i) x(10) = x11 !!!
c       x(11)=x10 !!!
    xx(1,k)=x(1)
    xx(6,k)=x(2)
    xx(5,k)=x(3)
    xx(4,k)=x(4)
    xx(7,k)=x(5)
    xx(8,k)=x(6)
    xx(9,k)=x(7)
    xx(10,k)=1-(x(1)+x(2)+x(3)+x(4)+x(5)+x(6)+x(7)+x(9)+
&   x(8)+x(10)+x(11))
    xx(11,k)=x(9)
    xx(2,k)=x(8)
    xx(3,k)=x(10)
    xx(12,k)=x(11)
2  continue
    ndp=k
c   ***** Mg-Variation *****
c
    elseif (naflag.eq. 0) then
    do 4 mg=mg0,mgm,dmg
c
    y(1,1)=- (rg*Mg+r1*Na+r0*Mg)
    y(1,2)=rm1
    y(1,3)=0
    y(1,4)=0
    y(1,5)=rmg
    y(1,6)=0
    y(1,7)=0
    y(1,8)=rm0
    y(1,9)=0
    y(1,10)=0
    y(1,11)=0
    y(1,12)=0
c

```

$$\begin{aligned}
 y(2,1) &= r1 * Na \\
 y(2,2) &= -(r1 + rh * Mg + r2 * Na) \\
 y(2,3) &= rm2 \\
 y(2,4) &= 0 \\
 y(2,5) &= 0 \\
 y(2,6) &= rmh \\
 y(2,7) &= 0 \\
 y(2,8) &= 0 \\
 y(2,9) &= 0 \\
 y(2,10) &= 0 \\
 y(2,11) &= 0 \\
 y(2,12) &= 0
 \end{aligned}$$

c

$$\begin{aligned}
 y(3,1) &= 0 \\
 y(3,2) &= r2 * Na \\
 y(3,3) &= -(r2 + ri * Mg + r3 * Na) \\
 y(3,4) &= rm3 \\
 y(3,5) &= 0 \\
 y(3,6) &= 0 \\
 y(3,7) &= rmi \\
 y(3,8) &= 0 \\
 y(3,9) &= 0 \\
 y(3,10) &= 0 \\
 y(3,11) &= 0 \\
 y(3,12) &= 0
 \end{aligned}$$

c

$$\begin{aligned}
 y(4,1) &= rmj \\
 y(4,2) &= rmj \\
 y(4,3) &= -r3 * Na + rmj \\
 y(4,4) &= rm3 + rj * Mg + rmj \\
 y(4,5) &= rmj \\
 y(4,6) &= rmj \\
 y(4,7) &= rmj \\
 y(4,8) &= rmj \\
 y(4,9) &= rmj \\
 y(4,10) &= rmj \\
 y(4,11) &= rmj \\
 y(4,12) &= rmj
 \end{aligned}$$

c

$$y(5,1)=rg*Mg$$

$$y(5,2)=0$$

$$y(5,3)=0$$

$$y(5,4)=0$$

$$y(5,5)=-rmg-r4*Na-r9*Mg$$

$$y(5,6)=rm4$$

$$y(5,7)=0$$

$$y(5,8)=0$$

$$y(5,9)=rm9$$

$$y(5,10)=0$$

$$y(5,11)=0$$

$$y(5,12)=0$$

c

$$y(6,1)=0$$

$$y(6,2)=rh*Mg$$

$$y(6,3)=0$$

$$y(6,4)=0$$

$$y(6,5)=r4*Na$$

$$y(6,6)=- (rm4+rmh+r5*Na)$$

$$y(6,7)=rm5$$

$$y(6,8)=0$$

$$y(6,9)=0$$

$$y(6,10)=0$$

$$y(6,11)=0$$

$$y(6,12)=0$$

c

$$y(7,1)=rm6$$

$$y(7,2)=rm6$$

$$y(7,3)=-ri*Mg+rm6$$

$$y(7,4)=rm6$$

$$y(7,5)=rm6$$

$$y(7,6)=-r5*Na+rm6$$

$$y(7,7)=rm5+rmi+r6*Na+rm6$$

$$y(7,8)=rm6$$

$$y(7,9)=rm6$$

$$y(7,10)=rm6$$

$$y(7,11)=rm6$$

$$y(7,12)=rm6$$

c

c ***** x0 heißt 8 !!!!

$$y(8,1)=r0*Mg$$

$$y(8,2)=0$$

$$y(8,3)=0$$

$$y(8,4)=0$$

$$y(8,5)=0$$

$$y(8,6)=0$$

$$y(8,7)=0$$

$$y(8,8)=-rf*Mg-rm0-rd*mg$$

$$y(8,9)=rmf$$

$$y(8,10)=rmd$$

$$y(8,11)=0$$

$$y(8,12)=0$$

c

$$y(9,1)=0$$

$$y(9,2)=0$$

$$y(9,3)=0$$

$$y(9,4)=0$$

$$y(9,5)=r9*Mg$$

$$y(9,6)=0$$

$$y(9,7)=0$$

$$y(9,8)=rf*Mg$$

$$y(9,9)=-rmf-rm9-r8*mg$$

$$y(9,10)=0$$

$$y(9,11)=rm8$$

$$y(9,12)=0$$

c

$$y(10,1)=0$$

$$y(10,2)=0$$

$$y(10,3)=0$$

$$y(10,4)=0$$

$$y(10,5)=0$$

$$y(10,6)=0$$

$$y(10,7)=0$$

$$y(10,8)=rd*mg$$

$$y(10,9)=0$$

```

y(10,10)=-re*mg-rmd
y(10,11)=rme
y(10,12)=0
c
y(11,1)=0
y(11,2)=0
y(11,3)=0
y(11,4)=0
y(11,5)=0
y(11,6)=0
y(11,7)=0
y(11,8)=0
y(11,9)=r8*mg
y(11,10)=re*mg
y(11,11)=-rm8-rme
y(11,12)=0
c
c Lin. Gleichung lösen *****
c
nrang=11
flag=1
do 56 i=1,11
56 x(i)=0
call linsys1(nrang,y,x,flag)
k=k+1
if (k.gt.500) goto 3
t(k)=mg
c ACHTUNG: Na3E1 (x4) ist in xx(4,i), Na3E1Mg (x8) in xx(10,i)
c x(8)=x0 ! x0 ist in xx(2,i), x9 in xx(11,i)
c x(11)=x10 (Mg2E1Mg) x(10)=x11(mg2E1) !!!!
xx(1,k)=x(1)
xx(6,k)=x(2)
xx(5,k)=x(3)
xx(4,k)=x(4)
xx(7,k)=x(5)
xx(8,k)=x(6)
xx(9,k)=x(7)
xx(10,k)=1-(x(1)+x(2)+x(3)+x(4)+x(5)+x(6)+x(7)+x(9)+

```

```

& x(8)+x(10)+x(11))
xx(11,k)=x(9)
xx(2,k)=x(8)
xx(3,k)=x(10)
xx(12,k)=x(11)
4 continue
ndp=k
endif

c Zeichnen *****

3 continue
call defaxe(0.,t(ndp),0.,1.)
do 35 k=1,12
do 31 i=1,ndp
31 a(i)=xx(k,i)
c
35 call disp(t,a,ndp,k-1)
c
call clearm
write(*,'(a)') 'Speichern ? '
read(*,'(a)') q
if (q.ne.'j') goto 7
61 write(*,'(a)') ' Name of file : '
read(*,'(a)') fname
open (unit=1,file=fname,status='unknown',err=61)
write(1, 2101) rk1,rk2,rk3,rk4,rk5,rk6,rk0,rk9,rkm,mg,fl
2001 format(11f10.4)
write(1, 2000) (t(i),(xx(k,i),k=1,12),i=1,ndp)
2000 format(13f10.4)
close(1)
c
7 continue
call defaxe(0.,t(ndp),-.3,.2)
do 62 i=1,ndp
62 a(i)=fl4*xx(4,i)
call disp(t,a,ndp,0)
do 63 i=1,ndp

```

```
63 a(i)=fl8*xx(10,i)
    call disp(t,a,ndp,1)
    do 64 i=1,ndp
64 a(i)=fl4*xx(4,i)+fl8*xx(10,i)
c
    call disp(t,a,ndp,3)
    write(*,'(a)') 'weiter ? '
    read(*,'(a)') q
    if (q.ne.'j') goto 11
c
11 continue
    call clearme
    call defaxe(0.,t(ndp),-.3,.2)
    do 65 i=1,ndp
65 a(i)=fl5*xx(7,i)
    call disp(t,a,ndp,0)
    do 66 i=1,ndp
66 a(i)=fl9*xx(11,i)
    call disp(t,a,ndp,1)
    do 67 i=1,ndp
67 a(i)=fl10*xx(12,i)
    call disp(t,a,ndp,2)
    do 68 i=1,ndp
68 a(i)=fl5*xx(7,i)+fl9*xx(11,i)+fl10*xx(12,i)
    call disp(t,a,ndp,3)
c
    write(*,'(a)') 'weiter ? '
    read(*,'(a)') q
    if (q.ne.'j') goto 12
c
12 continue
    call clearme
    call defaxe(0.,t(ndp),-.3,.2)
    do 69 i=1,ndp
69 a(i)=fl8*xx(10,i)+fl4*xx(4,i)
    call disp(t,a,ndp,0)
    do 70 i=1,ndp
70 a(i)=fl5*xx(7,i)+fl9*xx(11,i)+fl10*xx(12,i)
```

```
    call disp(t,a,ndp,1)
    do 71 i=1,ndp
71  a(i)=fl8*xx(10,i)+fl4*xx(4,i)+fl5*xx(7,i)
    + fl9*xx(11,i)+fl10*xx(12,i)
    call disp(t,a,ndp,2)
c
    call clearm
    if (naflag.eq. 1) then
    amaxh=(-a(ndp)+a(1))*0.5
    do 80 i=1,ndp
80  if(a(i).ge.a(1)-amaxh) rkh=t(i)
    write(*,'(a,f10.2)') ' K1/2 / mM = ',rkh
    elseif (naflag.eq. 0) then
    amaxh=(a(ndp)-a(1))*0.5
    do 81 i=1,ndp
81  if (a(i).le.a(1)+amaxh) rkh=t(i)
    write(*,'(a,f10.2)') ' K1/2 / mM = ',rkh
    endif
    write(*,'(a)') ' Speichern ? '
    read(*,'(a)') q
    if (q.ne.'j') goto 8
90  write(*,'(a)') ' Name of file : '
    read(*,'(a)') fname
    open (unit=1,file=fname,status='UNKNOWN',err=90)
    write(1, 2101) rk1,rk2,rk3,rk4,rk5,rk6,rk0,rk9,rkm,mg,fl
2101 format(11f10.4)
    write(1, 2100) (t(i),(100.*a(i)),i=1,ndp)
2100 format(2f10.4)
    close(1)
c
    8  write(*,'(a)') ' Weiter ? '
    read(*,'(a)') q
    if (q.ne.'n') goto 1
c
    9  stop
    end
```

Literaturverzeichnis

- Abbo91 A. J. ABBOTT, E. AMLER, W. J. BALL, JR.: Immunochemical and spectroscopic characterization of two fluorescein 5'-isothiocyanate labeling sites on Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* **30** (1991) 1692-1701
- Abra94 J. P. ABRAHAMS, A. G. W. LESLIE, R. LUTTER, J. E. WALKER: Structure at 2,8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370** (1994) 621-628
- Adam88 G. ADAM, P. LÄUGER, G. STARK: *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, NY, 2. Auflage (1988)
- Albe67 R. W. ALBERS: Biochemical aspects of active transport. *Annu Rev Biochem* **36** (1967) 727-756
- Amle92 E. AMLER, A. ABBOTT, W. J. BALL, JR.: Structural dynamics and oligomeric interactions of Na⁺,K⁺-ATPase as monitored using fluorescence energy transfer. *Biophys J* **61** (1992) 553-568
- Ande95 J. P. ANDERSEN, B. VILSEN: Structure-function relationships of cation translocation by Ca²⁺- and Na⁺,K⁺-ATPases studied by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* **359** (1995) 101-106
- Anto91 R. ANTOLOVIC, H. J. BRULLER, S. BUNK, D. LINDER, W. SCHONER: Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the α subunit of Na⁺/K⁺-ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane. *Eur J Biochem* **199** (1991) 195-202
- Apel90 H.-J. APELL, M. SOLIOZ: Electrogenic transport by the *Enterococcus hirae* ATPase. *Biochim Biophys Acta* **1017** (1990) 221-228
- Apel98 H.-J. APELL, A. SCHNEEBERGER, V. S. SOKOLOV: Partial reactions of the Na,K-ATPase: kinetic analysis and transport properties. *Acta Physiol Scand* **163, Suppl 643** (1998) 235-245
- Argu94 J. M. ARGÜELLO, J. H. KAPLAN: Glutamate 779, an intramembrane carboxyl, is essential for monovalent cation binding by the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **269** (1994) 6892-6899

- Argu95 J. M. ARGÜELLO, J. B. LINGREL: Substitutions of serine 775 in the α subunit of the Na,K-ATPase selectively disrupt K^+ high affinity activation without affecting Na^+ interaction. *J Biol Chem* **270** (1995) 22764-22771
- Argu96 J. M. ARGÜELLO, R. D. PELUFFO, J. FENG, J. B. LINGREL, J. R. BERLIN: Substitution of glutamic 779 with alanine in the Na,K-ATPase α subunit removes voltage dependence of ion transport. *J Biol Chem* **271** (1996) 24610-24616
- Arys95 E. ARYSTARKHOVA, D. L. GIBBONS, K. J. SWEADNER: Topology of the Na,K-ATPase. Evidence for externalization of a labile transmembrane structure during heating. *J Biol Chem* **270** (1995) 8785-8796
- Begg93 A. T. BEGGAH, P. BEGUIN, P. JAUNIN, M. C. PEITSCH, K. GEERING: Hydrophobic C-terminal amino acids in the β -subunit are involved in assembly with the α -subunit of Na,K-ATPase. *Biochemistry* **32** (1993) 14117-14124
- Begg97 A. T. BEGGAH, P. JAUNIN, K. GEERING: Role of glycosylation and disulfide bond formation in the β subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **272** (1997) 10318-10326
- Begi96 P. BEGUIN, A. BEGGAH, S. COTECCHIA, K. GEERING: Adrenergic, dopaminergic, and muscarinic receptor stimulation leads to PKA phosphorylation of Na-K-ATPase. *Am J Physiol* **270** (*Cell Physiol* **39**) (1996) C131-C137
- Begi97 P. BEGUIN, X. WANG, D. FIRSOV, A. PUOTI, D. CLAEYS, J.-D. HORISBERGER, K. GEERING: The γ subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J* **16** (1997) 4250-4260
- Blan94 G. BLANCO, A. W. DETOMASO, J. KOSTER, Z. J. XIE, R. W. MERCER: The alpha subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the beta subunit. *J Biol Chem* **269** (1994) 23420-23425
- Blan98 G. BLANCO, R. W. MERCER: Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* **275** *Renal Physiol* **44** (1998) F633-F650
- Blos83 R. BLOSTEIN: The influence of cytoplasmic sodium concentration on the stoichiometry of the sodium pump. *J Biol Chem* **258** (1983) 12228-12232
- Blos92 R. BLOSTEIN, C. POVANI: Altered stoichiometry of the Na,K-ATPase. *Acta Physiol Scand* **146** (1992) 105-110

- Blos97 R. BLOSTEIN, A. WILCZYNSKA, S. J. D. KARLISH, J. M. ARGÜELLO, J. B. LINGREL: Evidence that Ser⁷⁷⁵ in the α subunit of the Na,K-ATPase is a residue in the cation binding pocket. *J Biol Chem* **272** (1997) 24987-24993
- Blos98 R. BLOSTEIN, S. E. DALY, N. BOXENBAUM, L. K. LANE, J. M. ARGUELLO, J. B. LINGREL, S. J. D. KARLISH, M. J. KAPLAN, L. DUNBAR: Conformational alterations resulting from mutations in cytoplasmic domains of the alpha subunit of the Na,K-ATPase. *Acta Physiol Scand* **163 Suppl 643** (1998) 275-281
- Bühl91 R. BÜHLER, W. STÜRMER, H.-J. APELL, P. LÄUGER: Charge translocation by the Na,K-pump: **I** Kinetics of local field changes studied by time-resolved fluorescence measurements. *J Membrane Biol* **121** (1991) 141-161
- Bühl95 R. BÜHLER, H.-J. APELL: Sequential potassium binding at the extracellular side of the Na,K-pump. *J Membrane Biol* **145** (1995) 165-173
- Bran86 C. J. BRANDL, N. M. GREEN, B. KORCZAK, D. H. MACLENNAN: Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* **44** (1986) 597-607
- Capa92 J. M. CAPASSO, S. HOVING, D. M. TAL, R. GOLDSHLEGER, S. J. D. KARLISH: Extensive digestion of Na⁺,K⁺-ATPase by specific and nonspecific proteases with preservation of cation occlusion sites. *J Biol Chem* **267** (1992) 1150-1158
- Colo97 T. E. COLONNA, L. HUYNH, D. M. FAMBROUGH: Subunit interactions in the Na,K-ATPase explored with the yeast two hybrid system. *J Biol Chem* **272** (1997) 12366-12372
- Corn84 F. CORNELIUS, J. C. SKOU: Reconstitution of (Na⁺ + K⁺)-ATPase into phospholipid vesicles with full recovery of its specific activity. *Biochim Biophys Acta* **772** (1984) 357-373
- Dean41 R. B. DEAN: Theories of electrolyte equilibrium in muscle. *Biol Symp* **3** (1941) 331-348
- Degu77 N. DEGUCHI, P. L. JØRGENSEN, A. B. MAUNSBACH: Ultrastructure of the sodium pump. Comparison of thin sectioning, negative staining and freeze-fracture of purified membrane-bound (Na⁺,K⁺)-ATPase. *J Cell Biol* **75** (1977) 619-634
- DeWe88 P. DE WEER, D. C. GADSBY R. F. RAKOWSKI: Voltage dependence of the Na-K pump. *Annu Rev Physiol* **50** (1988) 225-241

- Doma97 W. DOMASZEWICZ, A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL: Properties of the cytoplasmic ion binding sites. *Annals NY Acad Sci* **834** (1997) 420-423
- Doma99 W. DOMASZEWICZ, H.-J. APELL: Binding of the third Na⁺ ion to the cytoplasmic side of the Na,K-ATPase is electrogenic. *FEBS Lett* **458** (1999) 241-246
- Düzg83 N. DÜZGÜNES, D. PAPAHAJDOPOULOS: Ionotropic effects on phospholipid membranes: calcium magnesium specificity in binding, fluidity and fusion. **In: *Membrane Fluidity in Biology***, R. C. Aloia, ed, Academic Press Inc. NY (1983) 187-216
- Farl84 R. A. FARLEY, C. M. TRAN, C. T. CARILLI, D. HAWKE, J. E. SHIVELY: The amino acid sequence of a fluorescein-labeled peptide from the active site of (Na,K)-ATPase. *J Biol Chem* **259** (1984) 9532-9535
- Farl97 R. A. FARLEY, E. HEART, M. KABALIN, D. PUTNAM, K. WANG, V. N. KASHO, L. D. FALLER: Site-directed mutagenesis of the sodium pump: Analysis of mutations to amino acids in the proposed nucleotide binding site by stable oxygen isotope exchange. *Biochemistry* **36** (1997) 941-951
- Forb78 B. FORBUSH III, J. H. KAPLAN, J. F. HOFFMAN: Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* **17** (1978) 3667-3676
- Forb88 B. Forbush III: Okkluded ions and Na,K-ATPase. **In: *The Na⁺,K⁺-Pump, Part A: Molecular Aspects***, J. C. Skou, J. G. Nørby, A. B. Maunsbach, M. Esmann, eds., A. R. Liss Inc. NY (1988)
- Fort88 P. A. FORTES, R. AGUILAR: Distances between 5-iodoacetamidofluorescein and the ATP and ouabain sites of (Na,K)-ATPase determined by fluorescence energy transfer. *Prog Clin Biol Res* **268A** (1988) 197-204
- Gads93 D. C. GADSBY, R. F. RAKOWSKI, P. DE WEER: Extracellular access to the Na,K-pump: pathway similar to ion channel. *Science* **260** (1993) 100-103
- Gatt97 C. GATTO, S. LUTSENKO, J. H. KAPLAN: Chemical modification with dihydro-4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate reveals the distance between K₄₈₀ and K₅₀₁ in the ATP-binding domain of the Na,K-ATPase. *Arch Biochem Biophys* **340** (1997) 90-100
- Geer90 K. GEERING: Subunit assembly and functional maturation of Na,K-ATPase. *J Membr Biol* **115** (1990) 109-121

- Geer91 K. GEERING: The functional role of the beta subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase. *FEBS Lett* **285** (1991) 189-193
- Geer96 K. GEERING, A. BEGGAH, P. GOOD, S. GIRARDET, S. ROY, D. SCHAER, P. JAUNIN: Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH₂ terminus of the β subunit with the α subunit. *J Cell Biol* **133** (1996) 1193-1204
- Glyn84 I. M. GLYNN: The electrogenic sodium pump. **In:** *Electrogenic Transport: Fundamental Principles and Physiological Implications*. M. P. Blaustein, M. Lieberman, eds, Raven Press, NY (1984) 33-48
- Glyn85 I. M. GLYNN: The Na⁺,K⁺-transporting adenosine triphosphatase. **In:** *The Enzymes of Biological Membranes*, A. N. Martonosi, ed., Vol. 3: Membrane Transport. Plenum Press New York (1985) 35-114
- Glyn90 I. M. GLYNN, S. J. D. KARLISH: Occluded cations in active transport. *Annu Rev Biochem* **59** (1990) 171-205
- Gold87 R. GOLDSHLEGGER, S. J. D. KARLISH, A. REPHAELI, W. D. STEIN: The effect of membrane potential on the mammalian sodium-potassium pump reconstituted into phospholipid vesicles. *J Physiol* **387** (1987) 331-355
- Gold95 R. GOLDSHLEGER, D. M. TAL, S. J. D. KARLISH: Topology of the α subunit of Na,K-ATPase based on proteolysis. Lability of the topological organization. *Biochemistry* **34** (1995) 8668-8679
- Gold97 R. GOLDSHLEGER, S. J. D. KARLISH: Fe-catalyzed cleavage of the α subunit of Na/K-ATPase: evidence for conformation-sensitive interactions between cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (1997) 9596-9601
- Grel91 E. GRELL, R. WARMUTH, E. LEWITZKI, H. RUF: Precision titrations to determine affinity and stoichiometry of alkali, alkaline earth, and buffer cation binding to Na,K-ATPase. **In:** *The Sodium Pump: Recent Developments*, Rockefeller University Press (1991) 441-445
- Grin82 A. GRINVALD, R. HILDESHEIM, I. C. FARBER, L. ANGLISTER: Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential. *Biophys J* **39** (1982) 301-308

- Hans85 A. J. HANSEN: Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* **65** (1985) 101-148
- Hard81 P. M. HARDWICKE, J. W. FREYTAG: A proteolipid associated with Na,K-ATPase is not essential for ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **102** (1981) 250-257
- Hasl98 U. HASLER, X. WANG, G. CRAMBERT, P. BEGUIN, P. JAISSE, J. D. HORISBERGER, K. GEERING: Role of beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **273** (1998) 30826-30835
- Hegy81 C. HEGYVARY, P. L. JØRGENSEN: Conformational changes of renal sodium plus potassium ion-transport adenosine triphosphatase labeled with fluorescein. *J Biol Chem* **256** (1981) 6296-6303
- Herb82 HERBERT, P. L. JØRGENSEN, E. SKRIVER, A. B. MAUNSBACH: Crystallisation patterns of membrane-bound (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **689** (1982) 571-574
- Heys94 S. HEYSE, I. WUDDER, H.-J. APELL, W. STÜRMER: Partial reactions of the Na,K-ATPase: Determination of rate constants. *J Gen Physiol* **104** (1994) 197-240
- Hilg94 D. W. HILGEMANN: Channel-like function of the Na,K pump probed at microsecond resolution in giant membrane patches. *Science* **263** (1994) 1429-1432
- Hori94 J. D. HORISBERGER, F. JAISSE, C. CANESSA, B. C. ROSSIER: Na⁺,K⁺-pump mutant with a slow charge-translocating step. **In:** *The Sodium Pump*, E. Bamberg, W. Schoner, eds, Steinkopff Darmstadt, Springer NY (1994) 549-552
- Hovi95 S. HOVING, M. BAR-SHIMON, J. J. TIJMES, R. GOLDSHLEGER, D. M. TAL, S. J. D. KARLISH: Novel aromatic isothiuronium derivatives which act as high affinity competitive antagonists of alkali metal cations on Na/K-ATPase. *J Biol Chem* **270** (1995) 29788-29793
- Jais92 F. JAISSE, C. M. CANESSA, J.-D. HORISBERGER, B. C. ROSSIER: Primary sequence and functional expression of a novel ouabain-resistant Na,K-ATPase. The β subunit modulates potassium activation of the Na,K-pump. *J Biol Chem* **267** (1992) 16895-16903

- Jais94 F. JAISSE, P. JAUNIN, K. GEERING, B. C. ROSSIER, J. D. HORISBERGER: Modulation of the Na,K-pump function by β subunit isoforms. *J Gen Physiol* **103** (1994) 605-623
- Jaun93 P. JAUNIN, F. JAISSE, A. BEGGAH, K. TAKEYASU, P. MANGEAT, B. ROSSIER, J.-D. HORISBERGER, K. GEERING: Role of the transmembrane and extracytoplasmic domain of β subunits in subunit assembly, intracellular transport, and functional expression of Na,K-pump. *J Cell Biol* **123** (1993) 1751-1759
- Jewe92 E. A. JEWELL, O. I. SHAMRAJ, J. B. LINGREL: Isoforms of the α subunit of Na,K-ATPase and their significance. *Acta Physiol Scand* **146** (1992) 161-169
- Jørg74 P. L. JØRGENSEN: Purification and characterization of (Na⁺+K⁺)-ATPase. **III** Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecylsulfate. *Biochim Biophys Acta* **356** (1974) 36-52
- Jørg88 P. L. JØRGENSEN, J. P. ANDERSEN: Structural basis for E₁-E₂ conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. *J Membr Biol* **103** (1988) 95-120
- Jørg92 P. L. JØRGENSEN: Na,K-ATPase, structure and transport mechanism. **In: Molecular Aspects of Transport Proteins**, De Pont, Elsevier Science Publishers B. V. (1992) 1-26
- Jørg94 P. L. JØRGENSEN: Purified renal Na⁺/K⁺-ATPase; subunit structure and structure-function relationships of the N-terminus of the α 1 subunit. **In: The Sodium Pump, Structure, mechanism, hormonal control and its role in disease**, E. Bamberg, W. Schonner, eds, Steinkopff Darmstadt, Springer NY (1994) 297-308
- Jørg98 P. L. JØRGENSEN, J. M. NIELSEN, J. H. RASMUSSEN, P. A. PEDERSEN: Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in Na, K-ATPase. *Acta Physiol Scand* **163**, Suppl **643** (1998) 79-87
- Karl80 S. J. D. KARLISH: Characterization of conformational changes in (Na,K) ATPase labeled with fluorescein at the active site. *J Bioenerget Biomembr* **12** (1980) 111-136
- Karl85 S. J. D. KARLISH, A. REPHAELI, W. D. STEIN: Transmembrane modulation of cation transport by the Na,K-pump. **In: The Sodium Pump**, I. M. Glynn, C. Ellory, eds, The Company of Biologists, Cambridge, U. K. (1985) 487-499
- Karl90 S. J. D. KARLISH, R. GOLDSHLEGER, W. D. STEIN: A 19kDa C-terminal tryptic fragment of the α chain of Na/K-ATPase is essential for occlusion and transport of cations. *Proc Natl Acad Sci USA* **87** (1990) 4566-4570

- Kash97 V. N. KASHO, M. STENGELIN, I. N. SMIRNOVA, L. D. FALLER: A proposal for the Mg^{2+} binding site of P-type ion motive ATPases and the mechanism of phosphoryl group transfer. *Biochemistry* **36** (1997) 8045- 8052
- Kir190 T. L. KIRLEY: Inactivation of (Na^+,K^+) -ATPase by beta-mercaptoethanol - differential sensitivity to reduction of the 3 beta-subunit disulfide bonds. *J Biol Chem* **265** (1990) 4227-4232
- Klod88 I. KLODOS, B. FORBUSH III: Rapid conformational changes of the Na/K pump revealed by a fluorescent dye, RH-160. *J Gen Physiol* **92** (1988) 207-217
- Kost96 J. C. KOSTER, G. BLANCO, P. B. MILLS, R. W. MERCER: Substitutions of glutamate 781 in the Na,K-ATPase α subunit demonstrate reduced cation selectivity and an increased affinity for ATP. *J Biol Chem* **271** (1996) 2413-2421
- Kunz96 T. A. KUNTZWEILER, J. M. ARGUELLO, J. B. LINGREL: Asp⁸⁰⁴ and Asp⁸⁰⁸ in the transmembrane domain of the Na,K-ATPase α subunit are cation coordinating residues. *J Biol Chem* **271** (1996) 29682-29687
- Läug79 P. LÄUGER: A channel mechanism for electrogenic ion pumps. *Biochim Biophys Acta* **552** (1979) 143-161
- Läug84 P. LÄUGER: Thermodynamic and kinetic properties of electrogenic ion pumps. *Biochim Biophys Acta* **779** (1984) 307-341
- Läug91a P. LÄUGER: Kinetic basis of voltage dependence of the Na,K-pump. **In:** *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*, J. H. Kaplan and P. DeWeer eds, The Rockefeller University Press NY (1991) 303-315
- Läug91b P. LÄUGER: *Electrogenic Ion Pumps*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA (1991)
- Lech88 C. LECHENE: Physiological role of the Na,K-pump. **In:** *The Na^+,K^+ -Pump, Part A: Molecular Aspects*, J. C. Skou, J. G. Nørby, A. B. Maunsbach, M. Esmann, eds., A. R. Liss Inc. NY (1988) 197-204
- Lema94 M. V. LEMAS, M. HAMRICK, K. TAKEYASU, D. M. FAMBROUGH: 26 amino acids of an extracellular domain of the Na,K-ATPase alpha subunit are sufficient for assembly with the Na,K-ATPase beta subunit. *J Biol Chem* **269** (1994) 8255-8259
- Leve94 R. LEVENSON: Isoforms of the Na,K-ATPase: Family members in search of function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **123** (1994) 1-45

- Lin93 S.-H. LIN, L. D. FALLER: Time resolution of fluorescence changes observed in titrations of fluorescein 5'-isothiocyanate-modified Na,K-ATPase with monovalent cations. *Biochemistry* **32** (1993) 13917-13924
- Lin96 S.-H. LIN, L. D. FALLER: Estimation of the distance change between cystein-457 and the nucleotide binding site when sodium pump changes conformation from E₁ to E₂ by fluorescence energy transfer measurements. *Biochemistry* **35** (1996) 8419-8428
- Ling98 J. B. LINGREL, M. L. CROYLE, A. L. WOO, J. M. ARGÜELLO: Ligand binding sites of Na,K-ATPase. *Acta Physiol Scand* **163, Suppl 643** (1998) 69-77
- Linz98 H. LINNERTZ, P. URBANOVA, T. OBSIL, P. HERMAN, E. AMLER, W. SCHONER: Molecular distance measurements reveal an ($\alpha\beta$)₂ dimeric structure of Na⁺/K⁺-ATPase. High affinity ATP binding site and K⁺-activated phosphatase reside on different α subunits. *J Biol Chem* **273** (1998) 28813-28821
- Linz99 H. LINNERTZ, E. LANZ, M. GREGOR, R. ANTOLOVIC, R. KRUMSCHEID, T. OBSIL, J. SLAVIC, Z. KOVARIK, W. SCHONER, E. AMLER: Microenvironment of the high affinity ATP-binding site of Na⁺/K⁺-ATPase is slightly acidic. *Biochem Biophys Res Comm* **254** (1999) 215-221
- Loew79 L. M. LOEW, S. SCULLY, L. SIMPSON, A. S. WAGGONER: Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential. *Nature* **281** (1979) 497-499
- Loew82 L. M. LOEW: Design and characterization of electrochromic membrane probes. *J Biochem Biophys methods* **6** (1982) 243-260
- Lowr51 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J Biol Chem* **193** (1951) 265-275
- Luts93 S. LUTSENKO, J. H. KAPLAN: An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta subunit in cation occlusion. *Biochemistry* **32** (1993) 6737-6743
- Mark78 M. A. MARKWELL, S. M. HAAS, L. L. BIEBER, N. E. TOLBERT: A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87** (1978) 206-210
- Meng98 T. MENGUY, F. CORRE, L. BOUNEAU, S. DECHAMPS, J. V. MØLLER, M. LE MAIRE, P. FALSON: The cytoplasmic loop located between transmembrane segments

- 6 and 7 controls activation by Ca^{2+} of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* **273** (1998) 20134-20143
- Merc93 R. W. MERCER, D. BIEMESDERFER, D. P. BLISS, J. H. COLLINS, B. FORBUSH: Molecular cloning and immunological characterization of the γ -polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. *J Cell Biol* **121** (1993) 579-586
- Mill88 R. P. MILLER, R. A. FARLEY: All 3 potential N-glycosylation sites of the dog kidney (Na^+ - K^+)-ATPase beta subunit contain oligosaccharide. *Biochim Biophys Acta* **954** (1988) 50-57
- Mody91 N. MODYANOV, S. LUTSENKO, E. CHERTOVA, R. EFREMOV: Architecture of the sodium pump molecule: probing the folding of the hydrophobic domain. **In:** *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*, J. H. Kaplan and P. DeWeer eds, The Rockefeller University Press NY (1991) 99-115
- Mort96 C. E. MORTIMER: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie. Mit Übungsaufgaben.* Thieme Verlag Stuttgart, NY, (1996)
- Møll96 J. -V. MØLLER, B. JUUL, M. LE MAIRE: Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1286** (1996) 1-51
- Nogu94 S. NOGUCHI, Y. MUTOH, M. KAWAMURA: The functional roles of disulfide bonds in the beta subunit of (Na,K) ATPase as studied by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* **341** (1994) 233-238
- Okaf97 M. C. OKAFOR, R. J. SCHIEBINGER, D. R. YINGST: Evidence for a calmodulin-dependent phospholipase A_2 that inhibits Na-K-ATPase. *Am J Physiol* **272** (*Cell Physiol* **41**) (1997) C1365-C1372
- Or93 E. OR, P. DAVID, A. SHAINSKAYA, D. M. TAL, S. J. D. KARLISH: Effects of competitive sodium-like antagonists on Na,K-ATPase suggest that cation occlusion from the cytoplasmic surface occurs in two steps. *J Biol Chem* **268** (93) 16929-16937
- Or96a E. OR, R. GOLDSHLEGER, S. J. D. KARLISH: An effect of voltage on binding of Na^+ at the cytoplasmic surface of the Na^+ - K^+ pump. *J Biol Chem* **271** (1996) 2470-2477
- Or96b E. OR, R. GOLDSHLEGER, D. M. TAL, S. J. D. KARLISH: Solubilization of a complex of tryptic fragments of Na,K-ATPase containing occluded Rb ions and bound ouabain. *Biochemistry* **35** (1996) 6853-6864

- Ovch86 Y. A. OVCHINNIKOV, N. N. MODYANOV, N. E. BROUDE, K. E. PETRUKHIN, A. V. GRISHIN, N. M. ARZAMAZOVA, N. A. ALDANOVA, G. S. MONASTYRSKAYA, E. D. SVERDLOV: Pig kidney Na⁺,K⁺-ATPase, primary structure and spatial organization. *FEBS Lett* **201** (1986) 237-245
- Over02 E. OVERTON: Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. **II** Mitteilung über die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels. *Pflügers Arch Ges Physiol* **92** (1902) 346-386
- Paul92 M. PAULY: Fluoreszenzuntersuchungen zur Kinetik der Na⁺,K⁺-ATPase, durchgeführt in ATR-Technik an oberflächenadsorbierten Membranfragmenten. Diplomarbeit, Universität Konstanz (1992)
- Pede90 C. H. PEDEMONTE, J. H. KAPLAN: Chemical modification as an approach to elucidation of sodium pump structure-function relations. *Am J Physiol* **258** (*Cell Physiol* **27**) (1990) C1-C23
- Pede97 C. H. PEDEMONTE, T. A. PRESSLEY, M. F. LOKHANDWALA, A. R. CINELLI: Regulation of Na,K-ATPase transport activity by protein kinase C. *J Memb Biol* **155** (1997) 219-227
- Pedr96 P. A. PEDERSEN, J. H. RASMUSSEN, P. L. JØRGENSEN: Consequences of mutations to the phosphorylation site of the α -subunit of Na,K-ATPase binding and E₁-E₂ conformational equilibrium. *Biochemistry* **35** (1996) 16085-16093
- Pedr97 P. A. PEDERSEN, J. H. RASMUSSEN, J. M. NIELSEN, P. L. JØRGENSEN: Identification of Asp⁸⁰⁴ and Asp⁸⁰⁸ as Na⁺ and K⁺ coordinating residues in α subunit of renal Na,K-ATPase. *FEBS Lett* **400** (1997) 206-210
- Pont97 L. PONTIGGIA, S. M. GLOR: The extracellular domain of the sodium pump β isoforms determines complex stability with $\alpha 1$. *Biochem Biophys Res Comm* **231** (1997) 755-759
- Post72 R. L. POST, C. HEGYVARY, S. KUME: Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosin triphosphatase. *J Biol Chem* **247** (1972) 6530-6540
- Rako89 R. F. RAKOWSKI, D. C. GADSBY, P. DE WEER: Stoichiometry and voltage dependence of the sodium pump in voltage-clamped, internally dialyzed squid giant axon. *J Gen Physiol* **93** (1989) 903-941

- Rako97 R. F. RAKOWSKI, D. C. GADSBY, P. DE WEER: Voltage dependence of the Na/K-pump. *J Membrane Biol* **155** (1997) 105-112
- Reph86 A. REPHAELI, D. RICHARDS, S. J. D. KARLISH: Conformational transitions in fluorescein labeled (Na,K)ATPase reconstituted into phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **261** (1986) 6248-6254
- Reev80 A. S. REEVES, J. H. COLLINS, A. SCHWARTZ: Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid. *Biochem Biophys Res Commun* **95** (1980) 1591-1598
- Rost94 B. ROST, C. SANDER: Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* **19** (1994) 55-72
- Römp95 RÖMPP *Chemie Lexikon*, J. Falbe, M. Regitz, eds, Georg Thieme Verlag Stuttgart, NY, 9. Auflage (1995)
- Sarv97 N. A. SARVAZIAN, A. IVANOV, N. N. MODYANOV, A. ASKARI: Ligand-sensitive interactions among the transmembrane helices of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem* **272** (1997) 7855-7858
- Schm94 G. SCHMALZING, S. GLOOR: Na⁺/K⁺-pump beta subunits: structure and functions. *Cell Physiol Biochem* **4** (1994) 96-114
- Schn99 A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL: Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: I Sodium binding is associated with a conformational rearrangement. *J Membrane Biol* **168** (1999) 221-228
- Schn00 A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL: Properties of the sodium-pump ion binding sites in state E₁. *Proceedings of the 9th. International Conference on Na/K Pump and Related Pumps*, Elsevier Science BV, Amsterdam (2000) (im Druck)
- Schu95 S. SCHULZ, H.-J. APELL: Investigation of ion binding to the cytoplasmic binding sites of the Na,K-pump. *Eur Biophys J* **23** (1995) 413-421
- Schw94 B. SCHWAPPACH, W. STÜRMER, H.-J. APELL, S. J. KARLISH: Binding of sodium ions and cardiotonic steroids to native and selectively trypsinized Na,K-pump, detected by charge movements. *J Biol Chem* **269** (1994) 21620-21626
- Schw71 A. SCHWARTZ, K. NAGANO, M. NAKAO, G. E. LINDENMAYER, J. C. ALLEN: The sodium- and potassium-activated adenosinetriphosphatase system. *Meth Pharmacol* **1** (1971) 361-388

- Schw96 W. SCHWARZ, L. A. VASILETS: Structure-function relationships of Na⁺/K⁺-pumps expressed in *Xenopus* oocytes. *Cell Biol Int* **20** (1996) 67-72
- Shai96 A. SHAINSKAYA, S. D. J. KARLISH: Chymotryptic digestion of the cytoplasmic domain of the β subunit of Na/K-ATPase alters kinetics of okklusion of Rb⁺ ions. *J Biol Chem* **271** (1996) 10309-10316
- Shai00 A. SHAINSKAYA, A. SCHNEEBERGER, H.-J. APELL, S. D. J. KARLISH: Entrance port for Na and K ions on Na,K-ATPase in the cytoplasmic loop between transmembrane segments M6 and M7 of the β subunit. Proximity of the cytoplasmic segment of the β subunit. *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 2019-2028
- Shul85 G. E. SHULL, A. SCHWARTZ, J. B. LINGREL: Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺+K⁺) ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature* **316** (1985) 691-695
- Skou89 J. C. SKOU: The identification of the sodium-pump as the membrane-bound Na⁺/K⁺-ATPase: a commentary by Jens Chr. Skou on 'The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves'. *Biochim Biophys Acta* **23** (1957) 394-401
- Skou92 J. C. SKOU, M. ESMANN: The Na,K-ATPase. *J Bioenerget Biomembr* **24** (1992) 249-261
- Skri81 E. SKRIVER, A. B. MAUNSBACH, P. L. JØRGENSEN: Crystallisation and structure of membrane-bound Na⁺,K⁺-ATPase. *FEBS Lett* **131** (1981) 219-222
- Smir93a I. N. SMIRNOVA, L. D. FALLER: Role of Mg²⁺ ions in the conformational change reported by fluorescein 5'-isothiocyanate modification of Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochemistry* **32** (1993) 5967-5977
- Smir93b I. N. SMIRNOVA, L. D. FALLER: Mechanism of K⁺ interaction with fluorescein 5'-isothiocyanate-modified Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* **268** (1993) 16120-16123
- Smir95 I. N. SMIRNOVA, S.-H. LIN, L. D. FALLER: An equivalent site mechanism for Na⁺ and K⁺ binding to sodium pump and control of the conformational change reported by fluorescein 5'-isothiocyanate modification. *Biochemistry* **34** (1995) 8657-8667
- Stok94 D. L. STOKES, W. R. TAYLOR, N. M. GREEN: Structure, transmembrane topology and helix packing of P-type pumps. *FEBS Lett* **346** (1994) 32-38

- Stok98 D. L. STOKES, P. ZHANG, C. TOYOSHIMA, K. YONEKURY, H. OGAWA, M. R. LEWIS, D. SHI: Cryoelectron microscopy of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum: two crystal forms reveal two different conformations. *Acta Physiol Scand* **163, Suppl 643** (1998) 35-43
- Stry95 L. STRYER: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 4. Auflage (1995)
- Stür89 W. STÜRMER, H.-J. APELL, I. WUDEL, P. LÄUGER: Conformational transitions and charge translocation by the Na,K-pump: comparison of optical and electrical transients elicited by ATP-concentration jumps. *J Membrane Biol* **110** (1989) 67-86
- Stür91 W. STÜRMER, R. BÜHLER, H.-J. APELL, P. LÄUGER: Charge translocation by the Na,K-pump: **II** Ion binding and release at the extracellular face. *J Membrane Biol* **121** (1991) 163-176
- Stür92 W. STÜRMER, H.-J. APELL: Fluorescence study on cardiac glycoside binding to the Na,K-pump. Ouabain binding is associated with movement of electrical charge. *FEBS Lett* **300** (1992) 1-4
- Swea89 K. J. SWEADNER: Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **988** (1989) 185-220
- Tamk86 M. M. TAMKUN, D. M. FAMBROUGH: The (Na⁺-K⁺)-ATPase of chick sensory neurons - studies on biosynthesis and intracellular transport. *J Biol Chem* **261** (1986) 1009-1019
- Tanf83 C. TANFORD: Translocation pathway in the catalysis of active transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **80** (1983) 3701-3705
- Tayl89 W. R. TAYLOR, N. M. GREEN: The predicted secondary structures of the nucleotide-binding sites of six cation-transporting ATPases lead to a probable tertiary fold. *Eur J Biochem* **179** (1989) 241-248
- Ther98 A. G. THERIEN, R. GOLDSHLEGER, S. J. D. KARLISH, R. BLOSTEIN: Evidence that the γ subunit is a tissue-specific regulator of the Na,K-ATPase. *Acta Physiol Scand* **163, Suppl 643** (1998) 341
- Tran94 C. M. TRAN, E. E. HUSTON, R. A. FARLEY: Photochemical labeling and inhibition of Na,K-ATPase by 2-azido-ATP - identification of an amino acid located within the ATP binding site. *J Biol Chem* **269** (1994) 6558-6565

- Vasi90 L. A. VASILETS, G. SCHMALZING, K. MÄDEFESSEL, W. HAASE, W. SCHWARZ: Activation of protein kinase C by phorbol ester induces downregulation of the Na⁺/K⁺-ATPase in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Membr Biol* **118** (1990) 131-142
- Vasi92 L. A. VASILETS, W. SCHWARZ: Regulation of endogenous and expressed Na⁺/K⁺ pumps in *Xenopus* oocytes by membrane potential and stimulation of protein kinases. *J Membr Biol* **125** (1992) 119-132
- Vasi93a L. A. VASILETS, T. OHTA, S. NOGUCHI, M. KAWAMURA, W. SCHWARZ: Voltage-dependent inhibition of the sodium pump by external sodium: species differences and possible role of the N-terminus of the α subunit. *Eur Biophys J* **21** (1993) 433-443
- Vasi93b L. A. VASILETS, W. SCHWARZ: Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **1154** (1993) 201-222
- Vasi98 L. A. VASILETS, K. TAKEDA, M. KAWAMURA, W. SCHWARZ: Significance of the glutamic acid residues Glu₃₃₄, Glu₉₅₉, and Glu₉₆₀ of the α subunits of *Torpedo* Na⁺,K⁺ pump for transport activity and ouabain binding. *Biochim Biophys Acta* **1368** (1998) 137-149
- Vils97a B. VILSEN: Leucine 332 at the boundary between the fourth transmembrane segment and the cytoplasmic domain of Na⁺,K⁺-ATPase plays a pivotal role in the ion translocating conformational changes. *Biochemistry* **36** (1997) 13312-13324
- Vils97b B. VILSEN, D. RAMLOV, J. P. ANDERSEN: Functional consequences of mutations in the transmembrane core region for cation translocation and energy transduction in the Na⁺,K⁺-ATPase and the SR Ca⁺-ATPase. *Ann NY Acad Sci* **834** (1997) 297-309
- Wier93 W. WIERZBICKI, R. BLOSTEIN: The amino-terminal segment of the catalytic subunit of kidney Na,K-ATPase regulates the potassium deocclusion pathway of the reaction cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** (1993) 70-74
- Wudd95 I. WUDDDEL, H.-J. APELL: Electrogenicity of the sodium transport pathway in the Na,K-ATPase probed by charge-pulse experiments. *Biophys J* **69** (1995) 909-921
- Xu89 K.-Y. XU: Any of several lysines can react with 5'-isothiocyanatofluorescein to inactivate sodium and potassium ion activated adenosinotriphosphatase. *Biochemistry* **28** (1989) 5764-5772
- Zamp86 G. ZAMPIGHI, S. A. SIMON, J. KYTE, M. KRESMAN: One-dimensional crystals of (Na⁺+K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **854** (1986) 45-57

Danksagung

Ich danke Hans-Jürgen Apell für seine Betreuung und die Überlassung des Themas und Achim Linder für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Ferner gilt mein Dank Eran Or für die Betreuung während meines Arbeitsaufenthalts am Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel), und Alla Shainskaya und Steven Karlsh (Rehovot, Israel) für die gute Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch Holger Linnertz (Gießen), Bente Vilsen (Århus, Dänemark) und Eckard Hofmann für die Überlassung von Abbildungen und Martin Pauli für die zur Verfügung gestellten Meßdaten.