

# **Struktur-Funktionsbeziehungen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase anhand elektrophysiologischer Untersuchungen C-terminaler und Migräne-assoziiierter Mutationen**

vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin  
Susan Spiller (geb. Meier)  
aus Berlin

von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. Ulrike Woggon

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Friedrich

Gutachter: Prof. Dr. Jan Koenderink

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 27.03.2013

Berlin 2013

D 83



## Publikationen

Teile dieser Arbeit sind bereits in folgender Publikation veröffentlicht worden:

**MEIER S**, TAVRAZ NN, DÜRR KL & FRIEDRICH T. 2010. Hyperpolarization-activated inward leakage currents caused by deletion or mutation of carboxy-terminal tyrosines of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  subunit. — *J Gen Physiol* 135, 115-34.

Noch unveröffentlichte Manuskripte, die Teile dieser Arbeit enthalten:

PIZANO T, **SPILLER S**, MEI D, GUERRINI R, CIANCHETTI C, FRIEDRICH T & PRUNA D. 2013. Functional characterization of a novel C-terminal ATP1A2 mutation causing hemiplegic migraine and epilepsy. (*Manuskript akzeptiert bei Cephalalgia*)

**SPILLER S**, TAVRAZ NN & FRIEDRICH T. 2013. Mutations of Arg-937 determine rectification of a passive,  $\text{H}^+$ -selective transport mode of the human  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_2$ -subunit. (*Manuskript in Vorbereitung*)

weitere Publikationen:

DÜRR KL, TAVRAZ NN, **SPILLER S** & FRIEDRICH T. 2013. Measuring Cation Transport By Na,K And H,K-ATPase In *Xenopus* Oocytes By Atomic Absorption Spectrophotometry: An Alternative To Radioisotope Assays. — *J. Vis. Exp.* 72. doi: 10.3791/50201.

## Vorträge

„Strukturelle Grundlagen der vektoriellen Katalyse durch P-Typ-ATPasen“  
Tag der Chemie, Universität Potsdam 04. Juni 2009

## Posterbeiträge

DÜRR KL, TAVRAZ NN, **MEIER S** & FRIEDRICH T: „From Active to Passive Vectoriel Catalysis in P-type ATPases“  
Tag der Chemie, Universität Potsdam (04. Juni 2009)

**SPILLER S**, TAVRAZ NN & FRIEDRICH T: „Mutations of Arg-937 determine rectification of a passive  $\text{H}^+$ -selective transport mode of the human  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_2$ -subunit“  
Annual Meeting of the German Biophysical Society, Göttingen (23. - 26. September 2012)



## Abstract

The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is a transmembrane protein that exports three Na<sup>+</sup> ions out of the cell in exchange for two K<sup>+</sup> ions per hydrolyzed ATP molecule to maintain the respective concentration gradients that are essential for the survival of animal cells. Impaired function of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase because of mutations in the catalytic ( $\alpha$ -)subunit can cause severe neurological diseases like the familiar hemiplegic migraine type 2 (FHM2). Patients with FHM2 have mutations in the  $\alpha_2$  isoform of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase which is predominantly expressed in muscle cells and astrocytes. The crystal structure of the protein revealed that some FHM mutations are located in regions whose functional role has not been identified yet.

In this work, several FHM mutations on possible interaction sites between the catalytic  $\alpha$  subunit and the regulatory  $\beta$  subunit were investigated. Moreover, this thesis was focused on the C-terminal region of the  $\alpha$  subunit not only by investigation of FHM mutations but also by analyzing mutated amino acid residues that may play a key role in ion transport. Between the C-terminal residues (Tyr1019 and Tyr1020) and the putative third Na<sup>+</sup> binding site is an intracellular cavity that is lined by several polar and charged residues. Recent studies suggest that this cavity could form an intracellular pathway for Na<sup>+</sup> ions, or more likely for H<sup>+</sup> ions which could play a functional role in the reaction cycle of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

Because of its electrogenic transport cycle, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase constructs can be analyzed by electrophysiological methods. In this work, the two-electrode voltage-clamp technique (TEVC) was used on oocytes of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, to gain information about structural and mechanistic details in the reaction cycle of the human Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_2$  subunit with regard to the question how the C-Terminus controls the intracellular access for protons to the putative third Na<sup>+</sup> binding site. Furthermore, the objective was to characterize the interactions between the  $\beta$  and  $\alpha$  subunit, and to clarify functional mechanisms that trigger the development of hemiplegic migraine (HM).

HM mutants that could not be characterized electrophysiologically were shown to be impaired in their targeting to the plasmamembrane (Y009X, L994del und G855R). Further HM mutants (G900R, E902K und K1003E) showed no changes in function compared to the wildtype enzyme under the experimental conditions. The R1007W mutation that was identified in patients with FHM2 and epilepsy caused a reduced apparent K<sup>+</sup> affinity, which could be physiologically relevant for the development of migraine. For mutations regarding the putative interaction sites between the  $\beta$  and  $\alpha$  subunit, no definite informations could be obtained about the questions if and how the interactions are disturbed by the mutations.

In the absence of extracellular Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase shows ouabain-sensitive, inwardly rectified leak currents at negative potentials, which depend on extracellular pH. The mechanism of these proton carried currents has not been understood so far. The C-terminal mutated constructs analyzed in this work  $\Delta$ YY, R937L, R937S, D999H and R1002Q showed large pH-dependent ouabain-sensitive leak currents even in Na<sup>+</sup> buffers, which were inhibited by K<sup>+</sup>. These mutated residues are suggested to be part of a C-terminal pathway for protons to the third Na<sup>+</sup> binding site. Therefore, the leak currents were investigated under different ionic conditions. R937S and R937L mediated these currents in both directions with pH dependent reversal potentials. The analysis of leak currents indicate a passive, proton selective transport mechanism which involves a conformational change of the enzyme.

In addition to electrogenic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump current during the transport cycle, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mediates an electrogenic Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-exchange under K<sup>+</sup>-free conditions. The examination of the resulting transient currents gives informations about the mechanism of the Na<sup>+</sup> transport. For the constructs  $\Delta$ YY, R937S, D999H and R1002Q, the voltage-dependent kinetics of the Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-exchange were significantly changed. These results led to the conclusion that the Na<sup>+</sup>-occluded state and the access of Na<sup>+</sup> to this state could be destabilized. In addition, the results support the hypothesis that the third Na<sup>+</sup> binding site is accessible for protons and that the intracellular entry is controlled by the C-Terminus. Furthermore, it could be concluded that Arg937 controls the accessibility for protons from both sides of the membrane by interacting with the C-terminal tyrosines Tyr1019, Tyr1020 and Arg1002. The possible mechanisms of the intracellular access and of the proton transport are discussed by means of other mutational studies and molecular dynamic simulation studies.

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis und Glossar .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>1 Einleitung .....</b>   | <b>11</b> |
| 1.1 Klassifizierung und Struktur der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.....                         | 12        |
| 1.1.1 Klassifizierung .....   | 12        |
| 1.1.2 Die Struktur.....   | 13        |
| 1.1.3 Die Kationenbindungsstellen und der C-Terminus der α-Untereinheit.....                              | 16        |
| 1.2 Die Funktionsweise .....  | 19        |
| 1.2.1 Der Reaktionszyklus der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.....                                | 19        |
| 1.2.2 Elektrogenizität der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.....                                   | 20        |
| 1.2.3 Kinetik der Na <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> -Austauschreaktion .....                               | 23        |
| 1.2.4 Die Rolle von H <sup>+</sup> -Ionen im Pumpzyklus.....  | 24        |
| 1.2.5 Die Inhibition der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.....                                     | 27        |
| 1.3 Erkrankungen durch Mutationen der α-Untereinheit .....  | 28        |
| 1.3.1 Die Nervenreizleitung .....   | 28        |
| 1.3.2 Familiäre hemiplegische Migräne und andere mit der α-Untereinheit assoziierte<br>Erkrankungen ..... | 30        |
| 1.3.3 Physiologische Konsequenzen der Funktionsstörungen.....   | 32        |
| 1.4 Ziel der Arbeit .....   | 35        |
| <b>2 Material und Methoden .....</b>  | <b>37</b> |
| 2.1 Verwendete Medien und Chemikalien .....   | 37        |
| 2.2 Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden.....  | 39        |
| 2.2.1 Herstellung mutierter cDNA und cRNA.....  | 39        |
| 2.2.2 Plasmamembran- und Totalmembranpräparation .....  | 40        |
| 2.2.3 Western Blot.....   | 40        |
| 2.3 <i>Xenopus laevis</i> .....   | 41        |
| 2.3.1 Einleitung .....  | 41        |
| 2.3.2 Oozytenpräparation .....  | 41        |
| 2.4 Elektrophysiologie .....  | 42        |
| 2.4.1 Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik .....   | 42        |
| 2.4.2 Messverfahren .....   | 43        |
| 2.4.3 Auswertung stationärer Ströme .....   | 45        |
| 2.4.4 Auswertung transientser Ströme .....  | 48        |
| 2.4.5 Koexpression mit dem epithelialen Natriumkanal .....  | 50        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>52</b>  |
| 3.1      | Elektrophysiologische Messungen am Wildtyp-Protein .....                                       | 52         |
| 3.1.1    | Spannungs- und $[K^+]_{ext}$ -Abhängigkeit stationärer Pumpströme .....                        | 52         |
| 3.1.2    | Spannungsabhängigkeit und Kinetik transienter Ströme.....                                      | 55         |
| 3.2      | C-terminale und Wechselwirkungen mit der $\beta$ -Untereinheit betreffende HM-Mutationen ..... | 57         |
| 3.2.1    | Spannungs- und $[K^+]_{ext}$ -Abhängigkeit stationärer Pumpströme.....                         | 57         |
| 3.2.2    | Spannungsabhängigkeit und Kinetik transienter Ströme.....                                      | 60         |
| 3.2.3    | Expression der elektrophysiologisch nicht charakterisierbaren Konstrukte.....                  | 62         |
| 3.3      | Strukturelevante Aminosäurepositionen im Bereich der dritten Natrium-Bindungsstelle.....       | 63         |
| 3.3.1    | Spannungs- und $[K^+]_{ext}$ -Abhängigkeit stationärer Ströme .....                            | 64         |
| 3.3.2    | Vergleich der ouabainsensitiven Leckströme von R937S und R937L.....                            | 72         |
| 3.3.3    | pH-Abhängigkeit stationärer Leckströme in $K^+$ -freien Lösungen.....                          | 73         |
| 3.3.4    | Temperaturabhängigkeit stationärer Ströme in $K^+$ -freien Lösungen.....                       | 79         |
| 3.3.5    | $[Na^+]_{int}$ -Abhängigkeit stationärer Leckströme von $\Delta YY$ .....                      | 81         |
| 3.3.6    | Spannungsabhängigkeit und Kinetik transienter Ströme.....                                      | 82         |
| 3.3.7    | $[Na^+]_{ext}$ -Abhängigkeit der Leckströme bei Hyperpolarisation .....                        | 87         |
| 3.3.8    | Messungen in $Li^+$ -Puffern an $\Delta YY$ .....  | 88         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>91</b>  |
| 4.1      | Strukturelle und funktionelle Bedeutung des C-Terminus‘ .....                                  | 91         |
| 4.1.1    | C-terminales Arginin-Cluster.....  | 91         |
| 4.1.2    | Stabilisierung der dritten $Na^+$ -Bindungsstelle .....  | 94         |
| 4.1.3    | Charakterisierung der Leckströme: $H^+$ - oder $Na^+$ -Ströme.....                             | 97         |
| 4.1.4    | Eigenschaften des Protonentransports.....  | 100        |
| 4.1.5    | Beschaffenheit des C-terminalen Zugangskanals.....   | 105        |
| 4.1.6    | Einfluss der C-terminalen Mutationen auf die Kinetik des $Na^+/Na^+$ -Austauschs .....         | 109        |
| 4.1.7    | Beteiligung des C-Terminus‘ an gemeinsamen $K^+$ -Bindungsstellen .....                        | 114        |
| 4.2      | Wechselwirkungen mit der $\beta$ -Untereinheit .....   | 116        |
| 4.2.1    | Wechselwirkungen mit der $\beta$ -Ektodomäne .....   | 116        |
| 4.2.2    | Intrazelluläre $\alpha/\beta$ -Interaktionen.....  | 117        |
| 4.3      | Physiologischer Einfluss der HM-Mutationen .....   | 120        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>123</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>127</b> |
|          | <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>139</b> |
|          | <b>Anhang .....</b>  | <b>143</b> |
|          | <b>Danksagung.....</b>   | <b>151</b> |

## Abkürzungsverzeichnis und Glossar

|                       |  |
|-----------------------|--|
| A <sub>1</sub>        | Spannungsfolger  |
| A <sub>2</sub>        | Rückkopplungsverstärker  |
| Abb.                  | Abbildung  |
| <i>access channel</i> | hochohmischer Zugangsweg für die Kationen zu den Bindungsstellen, auf dem ein Ion einen gewissen Anteil des Transmembranpotentials überwinden muss |
| ADP                   | <u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat  |
| AHC                   | Alternierende Hemiplegie des Kindesalters ( <i>alternating hemiplegia of the childhood</i> )   |
| AMPA                  | $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure   |
| APS                   | <u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat   |
| ATP                   | <u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat   |
| BFIC                  | Benigne familiäre infantile Krampfanfälle ( <i>benign familial infantile convulsions</i> )   |
| cDNA                  | kodierende DNA (engl. <i>coding DNA</i> )  |
| cRNA                  | kodierende RNA (engl. <i>coding RNA</i> )  |
| CSD                   | kortikale Streudepolarisation ( <i>cortical spreading depression</i> )   |
| $\delta$              | Dielektrische Konstante  |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )  |
| dNTP                  | <u>D</u> esoxynukleosid <u>t</u> riphosphat  |
| EAAT                  | Glutamattransporter ( <i>excitatory amino acid transporter</i> )   |
| <i>E. coli</i>        | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA                  | <u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etraacetat  |
| E <sub>c</sub>        | Stromelektrode   |
| E <sub>p</sub>        | Potentialelektrode   |
| E <sub>ref</sub>      | Referenzelektrode  |
| E <sub>e</sub>        | Erdungselektrode   |
| ENaC                  | Epithelialer Natriumkanal ( <i>epithelial Na<sup>+</sup> channel</i> )   |
| et. al.               | und andere ( <i>et alii</i> )  |
| ER                    | endoplasmatisches <u>R</u> etikulum  |
| F                     | Faraday-Konstante  |
| FHM                   | <u>F</u> amiliäre <u>h</u> emiplegische <u>M</u> igräne  |
| <i>gate</i>           | eine Art Energiebarriere, die den Ionenfluss verhindert  |
| Gl.                   | Gleichung  |
| GHK-Gl.               | <u>G</u> oldman- <u>H</u> odgekin- <u>K</u> atz-Gleichung  |
| HbA                   | Homogenisationspuffer A ( <i>homogenisation buffer A</i> )   |
| HBC                   | Wasserstoffbrückenbindungskette ( <i>hydrogen-bonded chain</i> )   |
| HEPES                 | N-2-Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure  |
| HRP                   | Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )  |
| I                     | Strom  |
| I <sub>max</sub>      | maximaler Strom,   |
| I <sub>xK</sub>       | K <sup>+</sup> -induzierter Strom  |
| I <sub>xK,ouab</sub>  | K <sup>+</sup> -abhängiger ouabainsensitiver Strom   |
| IC <sub>50</sub>      | mittlere inhibitorische Konzentration ( <i>inhibitory concentration</i> )  |
| IHS                   | Internationale Kopfschmerzgesellschaft („ <i>International Headache Society</i> “)   |
| <i>ion well</i>       | energetischer Ionenschacht an den Bindungsstellen; hochohmiger <i>access channel</i>   |
| k                     | Geschwindigkeitskonstante  |
| k <sub>f</sub>        | Geschwindigkeitskonstante der Vorwärtsreaktion   |
| k <sub>b</sub>        | Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion   |
| K <sub>0,5</sub>      | Konzentration, bei der der Strom halbmaximal ist   |
| kDa                   | Kilodalton   |
| LB                    | <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani   |
| Leckstrom             | ouabainsensitive Differenzströme der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase in Abwesenheit von extrazellulärem K <sup>+</sup>                     |
| M                     | Transmembrandomäne der $\alpha$ -Untereinheit  |
| $\beta$ M             | Transmembrandomäne der $\beta$ -Untereinheit   |
| MA                    | Migräne mit Aura   |
| MBSS                  | MES-gepufferte Salzlösung ( <i>MES buffered salt solution</i> )  |
| MBS                   | modifizierte Barth-Lösung ( <i>modified Barth solution</i> )   |
| MES                   | 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure  |

|                    |   |
|--------------------|---|
| MOPS               | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure  |
| MO                 | Migräne ohne Aura   |
| mRNA               | messenger RNA   |
| N                  | Anzahl der gemessen Zellen  |
| $n_H$              | Hill-Koeffizient  |
| NCX                | $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher   |
| NMDA               | N-Methyl-D-aspartat   |
| NMDG <sup>+</sup>  | N-Methyl-D-glucamin   |
| Ouab               | Ouabain   |
| ouabainsensitiv    | durch mikromolare Ouabainkonzentrationen inhibierbar  |
| ORI                | Oozyten-Ringer-Lösung   |
| PAGE               | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| PBST               | Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween 20   |
| PCR                | Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )   |
| PDB                | Protein Data Bank (Datenbank für 3-dimensionale Strukturdaten)  |
| PKA                | Proteinkinase A   |
| PKD                | Paroxysmale Kinesiogene Dyskinesie  |
| PM                 | Plasmamembranfraktion   |
| PRRT2              | prolinreiches Transmembranprotein 2   |
| Q                  | Ladung  |
| $Q_{\max}$         | maximale Ladung   |
| $Q_{\min}$         | minimale Ladung   |
| R                  | universelle Gaskonstante  |
| $R_m$              | Membranwiderstand   |
| RD                 | Q120R/N131D-Konstrukt der $\alpha_1$ -Untereinheit von <i>Xenopus</i>   |
| RDP                | Dystonie-Parkinsonismus-Syndrom ( <i>Rapid-Onset Dystonia-Parkinsonism</i> ),<br>neuere Bezeichnung: DYT12        |
| RNA                | Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )  |
| SDS                | Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )   |
| S.E.               | Standardfehler ( <i>standard error</i> )  |
| SERCA              | Kalzium-ATPase des sarkoendoplasmatischen Retikulums ( <i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i> ) |
| <i>shuttle</i>     | das Pumpmolekül pendelt zwischen mehreren Konformationen hin und her  |
| t                  | Zeit  |
| T                  | Temperatur  |
| $\tau$             | Zeitkonstante   |
| $\tau^{-1}$        | Relaxationskonstante, reziproke Zeitkonstante   |
| Tab.               | Tabelle   |
| TAE                | Tris-Acetat-EDTA-Puffer   |
| TEMED              | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin  |
| TEVC               | Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ( <i>two electrode voltage clamp</i> )  |
| TM                 | Totalmembranfraktion  |
| Tris               | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| Tween              | Handelsname von Polyäthylenglycolsorbitanmonolaurat   |
| UE                 | Untereinheit  |
| V                  | Spannung  |
| $V_{0,5}$          | halbmaximales Potential   |
| $V_{\text{cmd}}$   | Haltepotential  |
| $V_m$              | Membranpotential  |
| $V_{\text{rev}}$   | Umkehrpotential   |
| WT                 | Wildtyp   |
| $Z_q$              | apparente Valenz, effektive Wertigkeit  |
| ZBF                | zerebraler Blutfluss  |
| $[X]_{\text{ext}}$ | extrazelluläre Konzentration des Ions/Stoffes X   |
| $[X]_{\text{int}}$ | intrazelluläre Konzentration des Ions/Stoffes X   |

Die Aminosäuren-Kodierung erfolgt nach der IUPAC-Nomenklatur (Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code).



# 1 Einleitung

Die Zellmembran ist hauptsächlich aus amphiphilen Phospholipiden aufgebaut. Die Lipide bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Fettsäurerest und ordnen sich in einer Lipiddoppelschicht an. Die Membran ist somit kaum permeabel für Wasser, große ungeladene und die meisten polaren Moleküle sowie für Ionen. Diese Teilchen können die Membran nur durch eingelagerte Transmembranproteine passieren, die als spezifische Kanäle, Pumpen oder Transporter wirken. Durch diese Proteine werden u. a. die Ionenzusammensetzung und der pH-Wert des intrazellulären Milieus reguliert. Außerdem sind einige daran beteiligt, Ionengradienten auf- bzw. abzubauen. Eine große Gruppe von Transmembranproteinen, die den Ionentransport ermöglichen, sind die ATPasen. Diese Ionenpumpen können durch ATP-Spaltung aktiv einen Konzentrationsgradienten aufbauen.

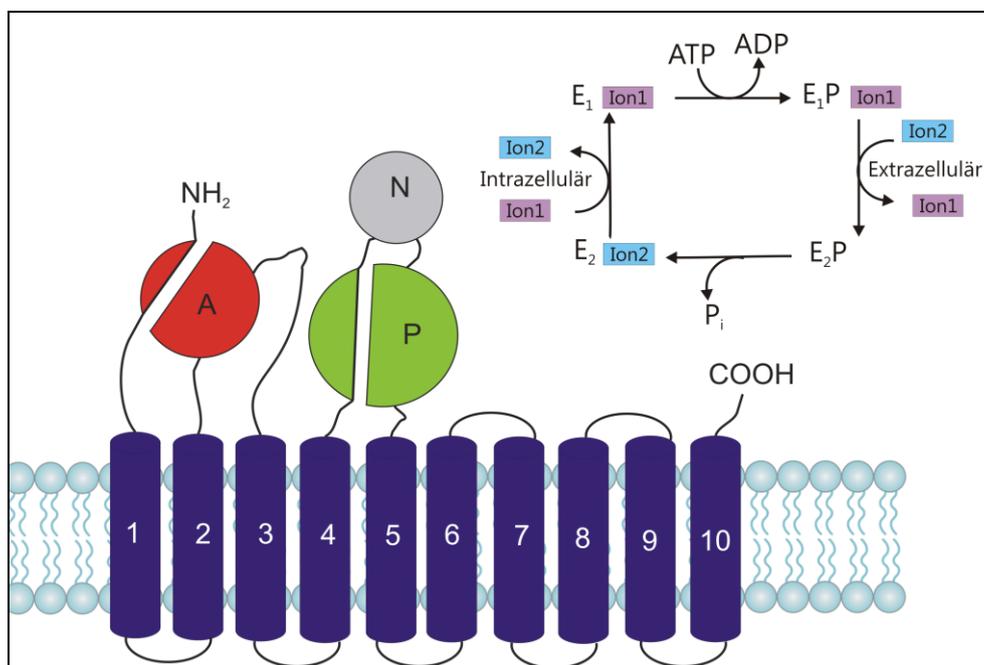
Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, auch Natrium-Kalium-Pumpe, ist ein Transmembranprotein, das die Gradienten für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen über der Zellmembran aufrecht erhält, indem sie  $\text{Na}^+$  ins extrazelluläre und  $\text{K}^+$  ins intrazelluläre Medium unter ATP-Verbrauch transportiert. Sie ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, das u. a. die Voraussetzung für die elektrische Erregbarkeit von Neuronen ist. Auch ermöglicht der elektrochemische Gradient für  $\text{Na}^+$  den Transport von Aminosäuren, Zuckern oder Ionen durch andere sekundär aktive Transporter. Neuronen, Epithel- oder Muskelzellen verbrauchen bis zu 30-70 % ihrer Energie allein für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Daran wird deutlich, wie wichtig die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase für viele Funktionen der Zelle ist.

Da diese Arbeit dazu dient, die Funktion wichtiger struktureller Elemente der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufzuklären, wird im Folgenden die Klassifizierung, die Struktur, der Transportmechanismus und die Funktion der Natrium-Kalium-Pumpe erläutert. Es wird darauf hingewiesen, dass sämtliche Untersuchungen dieser Arbeit an der humanen  $\alpha_2$ -Untereinheit (UE) durchgeführt wurden und dass, soweit nicht anders vermerkt, sämtliche Aminosäurereste zur besseren Übersichtlichkeit in der entsprechenden Nomenklatur angegeben sind (Länge der humanen  $\alpha_2$ -UE: 1020 Aminosäurereste; s. Anhang A3).

## 1.1 Klassifizierung und Struktur der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

### 1.1.1 Klassifizierung

Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gehört zu der Familie der P-Typ-ATPasen, transmembranäre Ionenpumpen, denen gemein ist, dass sie unter Hydrolyse von ATP ein phosphoryliertes Zwischenprodukt bilden. Die P-Typ-ATPasen werden in fünf Gruppen -  $\text{P}_I$  bis  $\text{P}_V$  - eingeteilt (Axelsen & Palmgren, 1998): Typ I (Schwermetall-ATPasen), Typ II ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPasen), Typ III ( $\text{H}^+$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Pumpen), Typ IV (Phospholipid-Flippasen) und Typ V (keine zugewiesene Substratspezifität). P-Typ-ATPasen haben eine katalytische ( $\alpha$ -)Untereinheit, die aus 6-12 für den Transport zuständige Transmembrandomänen (M1-M12) und zusätzlich drei zytosolischen Domänen besteht: die drei Domänen A (Aktuator), P (Phosphorylierung) und N (Nukleotidbindung) organisieren die ATP-Hydrolyse. Die N-Domäne erkennt das  $\gamma$ -Phosphat eines ATP-Moleküls und bringt es in Position für einen nukleophilen Angriff. Dabei wird ein Asparaginsäure-Rest in einem hochkonservierten DKTG-Motiv in der P-Domäne phosphoryliert. Ein Glutaminsäure-Rest in der A-Domäne (TGE-Motiv) positioniert ein Wassermolekül für die Hydrolyse, was zur Dissoziation von ADP führt (Kühlbrandt, 2004; Bublitz et al., 2010; Palmgren & Nissen, 2011). Diese konservierten Strukturen führen dazu, dass die P-Typ-ATPasen einen ähnlichen Reaktionszyklus durchlaufen, der den Wechsel zwischen zwei Hauptkonformationen beinhaltet: die  $\text{E}_1$ -Konformation, in der die Ionenbindungsstellen ins Zytoplasma gerichtet sind, und die  $\text{E}_2$ -Konformation mit Bindungsstellen zur extrazellulären Membranseite. Eine allgemeine Struktur mit einem vereinfachten Reaktionsschema ist in Abb. 1.1-1 gezeigt.



**Abb. 1.1-1: Schematische Struktur von P-Typ-ATPasen und deren allgemeiner Reaktionsmechanismus.**

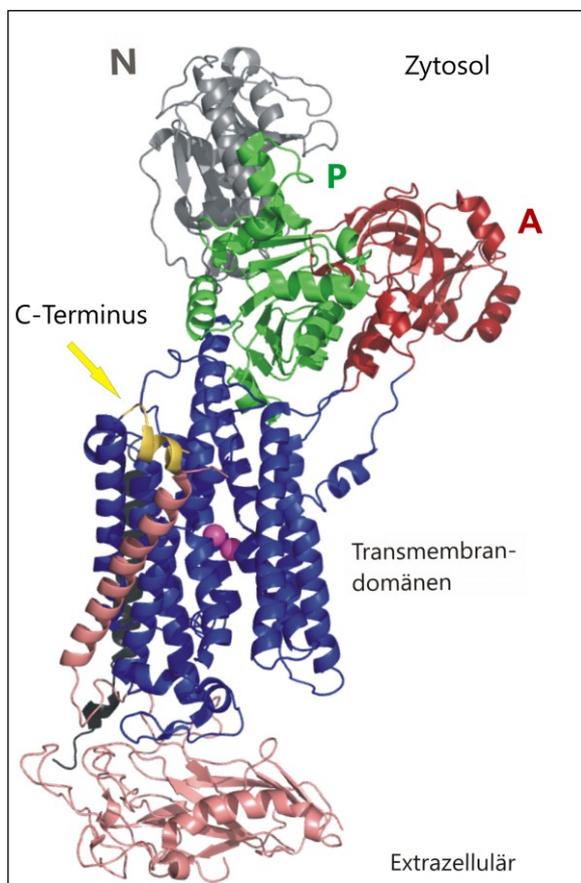
Gezeigt ist die allgemeine Struktur von P-Typ-ATPasen (Palmgren & Nissen, 2011). P-Typ-ATPasen bestehen aus mehreren Transmembrandomänen und einer zytosolischen N-, P- und A-Domäne. P-Typ-ATPasen durchlaufen im Allgemeinen einen Reaktionsmechanismus mit zwei Hauptkonformationen  $\text{E}_1$  und  $\text{E}_2$  und deren phosphorylierten Intermediaten  $\text{E}_1\text{P}$  und  $\text{E}_2\text{P}$ , wobei ein ATP-Molekül hydrolysiert wird (Kühlbrandt, 2004).

Das erste identifizierte Enzym aus der Gruppe der P-Typ-ATPasen ist die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, die eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der elektrochemischen Gradienten von K<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> in tierischen Zellen spielt. Bereits 1957 konnte Skou ein Enzym aus der Membran von Krebsnervenzellen isolieren, das eine von Mg<sup>2+</sup>-, Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen abhängige ATPase-Aktivität aufwies (Skou, 1957). Drei Jahre später konnte er zeigen, dass diese ATP-Hydrolyseaktivität durch Ouabain, einem Herzglykosid, inhibiert wird (Skou, 1960). Seitdem wurde die Funktionsweise und Struktur dieser Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase intensiv mit unterschiedlichen Methoden untersucht und sie ist heute neben der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPase) des sarkoendoplasmatischen Retikulums (SERCA), die bestbekannte ATPase dieser Gruppe. Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gehört zu den TypII-ATPasen (Typ IIc), zusammen mit SERCA (Typ IIa), den Calmodulin-bindenden Ca<sup>2+</sup>-ATPasen (Typ IIb) und der gastrischen H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Typ IIc), mit der sie eng verwandt ist.

### 1.1.2 Die Struktur

Nachdem die cDNA der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zum ersten Mal sequenziert wurde (Shull et al., 1985; Noguchi et al., 1986), gab es einen großen Fortschritt in der Strukturaufklärung, als die 3-dimensionale hochaufgelöste Struktur der SERCA, die Ca<sup>2+</sup>-ATPase des sarkoendoplasmatischen Retikulums, veröffentlicht wurde (Toyoshima et al., 2000; Toyoshima & Nomura, 2002). SERCA, die nur aus einer katalytischen Untereinheit (UE) besteht, weist eine hohe strukturelle Homologie zur  $\alpha$ -Untereinheit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase auf (Jørgensen & Andersen, 1988). Inzwischen wurden die Kristallstrukturen der wichtigsten Intermediärkonformationen des Reaktionszyklus von SERCA veröffentlicht (Toyoshima & Nomura, 2002; Olesen et al., 2004; Sørensen et al., 2004; Toyoshima & Mizutani, 2004; Jensen et al., 2006; Olesen et al., 2007; Toyoshima, 2009). Zur detaillierten Übersicht über die Struktur und Struktur-Funktionsbeziehungen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase anhand der Kristallstruktur von SERCA sei auf einen Übersichtsartikel von Jørgensen verwiesen (Jørgensen et al., 2003). Der größte Unterschied zwischen SERCA und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ist allerdings, dass SERCA intrazellulär nur zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden kann, welche sie im Austausch gegen H<sup>+</sup>-Ionen transportiert, während die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase drei Na<sup>+</sup>-Ionen gegen zwei K<sup>+</sup>-Ionen austauscht. Ein großer Durchbruch in der Strukturaufklärung gelang 2007 mit der Röntgenkristallstruktur der oligomeren Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase im E<sub>2</sub>-Zustand isoliert aus der Schweineniere (Morth et al., 2007). Inzwischen gibt es noch zwei weitere höher aufgelöste Kristallstrukturen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase im E<sub>2</sub>-Zustand (Ogawa et al., 2009; Shinoda et al., 2009). In Abb. 1.1-2 ist die Gesamtstruktur der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gezeigt.

Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase besteht aus mindestens zwei Untereinheiten: einer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit (~110 kDa) und einer regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit (~55 kDa), die in einer heteromeren Struktur vorliegen. Die  $\alpha$ -Untereinheit umfasst zehn Transmembransegmente, M1-M10. Es gibt zwischen den Transmembransegmenten extrazellulär fünf und intrazellulär vier Aminosäureschleifen. Die A-Domäne besteht aus dem N-terminalen Segment und der Schleife zwischen M2 und M3 und die P-Domäne aus dem Anfangs- und Endsegment der Schleife zwischen M4 und M5. Das Hauptsegment der Schleife zwischen M4 und M5 bildet die ATP-Bindungsstelle (N-Domäne) und damit das katalytische Zentrum aus.



**Abb. 1.1-2: Röntgenkristallstruktur der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der  $\text{E}_2$ -Konformation.**

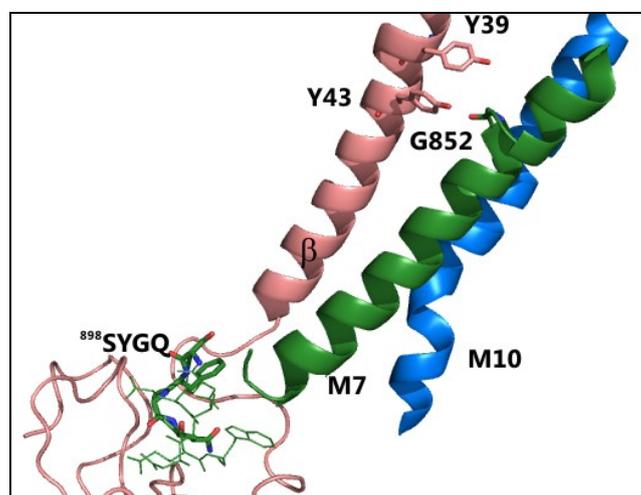
Gezeigt ist die Röntgenstruktur der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der Auflösung 2,4 Å (PDB 3A3Y von Shinoda et al., 2009). Die  $\alpha$ -Untereinheit besteht intrazellulär aus der A- (rot), P- (grün) und N-Domäne (grau). Sie hat zehn Transmembrandomänen (blau), in denen zwei  $\text{K}^+(\text{Rb}^+)$ -Ionen gebunden sind (magentafarben). Der C-Terminus (gelb) befindet sich zwischen M7, M10 und der  $\beta$ -Untereinheit (lachsfarben), die aus einem Transmembransegment und einer extrazellulären Ektodomäne besteht. Die  $\gamma$ -Untereinheit ist in Schwarz dargestellt.

Von der  $\alpha$ -Untereinheit der humanen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gibt es vier Isoformen, die gewebespezifisch exprimiert werden: die Hauptform ist die  $\alpha_1$ -Isoform, welche in den meisten Geweben exprimiert wird. Sie ist die einzige Form in der Niere und der Lunge und vorherrschend in den meisten Epithelien (Lingrel, 1992). Die  $\alpha_2$ -Isoform liegt hauptsächlich in den Skelettmuskeln vor, konnte aber auch in Hirn- und Herzzellen identifiziert werden (Urayama et al., 1989; Shamraj et al., 1993). In erregbaren Zellen befindet sich vor allem die  $\alpha_3$ -Form, und eine  $\alpha_4$ -Isoform wurde in Spermien identifiziert (Shamraj & Lingrel, 1994). Die  $\alpha$ -Isoformen unterscheiden sich in ihrer apparenten Affinität für intrazelluläres  $\text{Na}^+$  ( $\alpha_1 > \alpha_2 > \alpha_3$ ) und in ihrer Spannungsabhängigkeit des Vorwärtspumpzyklus (Abb. 1.2-1) in der abnehmenden Reihenfolge  $\alpha_2 > \alpha_1 > \alpha_3$ . Von der  $\beta$ -Untereinheit existieren drei Isoformen. Die jeweiligen Isozyme haben unterschiedliche Funktionen in den Geweben und unterscheiden sich vor allem in ihrer  $\text{K}^+$ -Affinität und abhängig von der  $\alpha$ -Isoform in ihrer Turnover-Rate (Blanco & Mercer, 1998; Crambert et al., 2000).

Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus nur einem Transmembransegment ( $\beta\text{M}$ ) mit intrazellulärem N-Terminus und einer extrazellulären Ektodomäne, die mehrere Glykosylierungsstellen aufweist. Sie interagiert an mehreren Stellen mit der  $\alpha$ -Untereinheit. Die  $\beta\text{M}$  ist zusammen mit M7 der  $\alpha$ -Untereinheit, zu der sie mehrere Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, in der Membran verankert und nähert sich in extrazellulärer Richtung M10 an, wo sie mit Tyr998 interagieren kann (Shinoda et al., 2009). Die beiden hochkonservierten Tyrosine in der  $\beta\text{M}$  Tyr39 und Tyr43 befinden sich in Interaktionsnähe zu Gly852 in M7 (Abb. 1.1-3). Eine Mutationsstudie an diesen beiden Tyrosinen gab Hinweise darauf, dass diese Interaktionen wichtig sind, um die  $\text{K}^+$ -Bindung zu

stabilisieren (Dürr et al., 2009) und es wird insgesamt angenommen, dass die  $\beta$ -Untereinheit eine wichtige Rolle bei der K<sup>+</sup>-Bindung spielt. Dies ist auch durch die Kristallstruktur belegbar, da die Domänen M5/M6 und M7/M8 extrazellulär komplett von der  $\beta$ -UE bedeckt sind (Lutsenko & Kaplan, 1993; Morth et al., 2007). Der zytosolische N-Terminus der  $\beta$ -UE konnte hingegen bisher nicht in einer Röntgenkristallstruktur aufgelöst werden. Extrazellulär gibt es eine weitere Interaktionsstelle zwischen der  $\beta$ -Ektodomäne und dem Loop zwischen M7 und M8 der  $\alpha$ -UE (insbesondere die Positionen 894-908). In diesem Loop befindet sich das SYGQ-Motiv<sup>1</sup>, dem eine wichtige Rolle für die  $\alpha/\beta$ -Assemblierung zugeschrieben wird (Colonna et al., 1997).

Die genaue Funktionsweise der  $\beta$ -Untereinheit auf molekularer Ebene ist noch nicht abschließend geklärt. Sie spielt keine Rolle bei der ATP-Spaltung, ist aber notwendig für die Expression, die Faltung des Proteins, den Transport zur Plasmamembran und beeinflusst den Ionen-transport (Geering, 2001).



**Abb. 1.1-3: Interaktionsmöglichkeiten zwischen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit.**

Die  $\beta$ -Untereinheit (lachsfarben) kann über mehrere Wasserstoffbrückenbindungen mit M7 wechselwirken. Eine wichtige Interaktion findet zwischen den Tyrosinen 39 und 43 der  $\beta$ M und Gly852 in M7 statt. Extrazelluläre Wechselwirkungen ergeben sich auch zwischen der  $\beta$ -Ektodomäne und dem Loop zwischen M7 und M8, vor allem am SYGQ-Motiv.

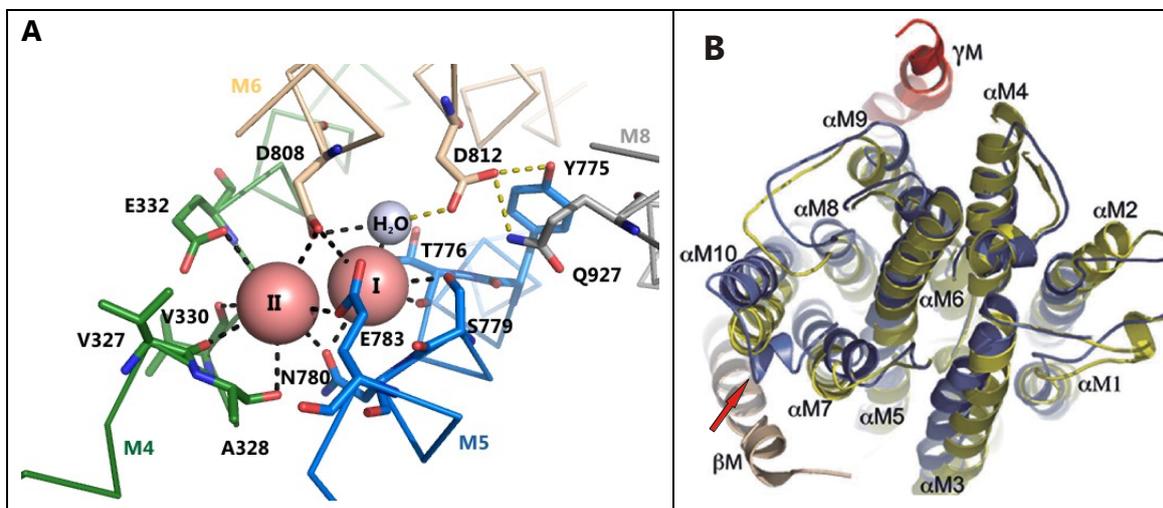
In Zellen der Niere konnte eine dritte, die  $\gamma$ -Untereinheit nachgewiesen werden (Beguin et al., 1997). Sie ist relativ klein (~7 kDa), besteht aus einem Transmembransegment und enthält ein für diese Klasse von Membranproteinen typisches FXYD-Motiv (Sweadner & Rael, 2000). Der  $\gamma$ -Untereinheit werden gewebespezifische regulatorische Funktionen bezüglich der Kationenaffinitäten und der zellulären Zielsteuerung des Proteins zugeschrieben (Therien et al., 1997; Meij et al., 2000).

<sup>1</sup> Bei Shinoda et al. (2009) ist es das SFGQ-Motiv in der  $\alpha$ -UE der Rektaldrüse des Hais.

<sup>2</sup> Diese Reste der humanen  $\alpha_2$ -UE sind respektive folgende Reste in der  $\alpha$ -UE der Rektaldrüse des Hais bei Shinoda et al. (2009): I: T779, S782, N783, D811; II: V329, A330, V332, E334, E786; indirekt: D815, Q930 und Y778

### 1.1.3 Die Kationenbindungsstellen und der C-Terminus der α-Untereinheit

Von großem Interesse ist die Lage und die Konfiguration der Kationenbindungsstellen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Da lange Zeit keine Kristallstruktur der α-Untereinheit existierte, wurden die beiden K<sup>+</sup>-Bindungsstellen mithilfe von Mutationsstudien und Modellierungen anhand der SERCA-Struktur eingegrenzt (Nielsen et al., 1998; Pedersen et al., 1998; Jørgensen & Pedersen, 2001; Ogawa & Toyoshima, 2002; Jørgensen et al., 2003; Koenderink et al., 2003). Auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase im E<sub>2</sub>P-Zustand mit gebundenen Rb<sup>+</sup>-Ionen (Rb<sup>+</sup>-Ionen binden mit einer nur leicht verringerten Affinität anstelle von K<sup>+</sup>) konnten die Bindungsstellen zwischen M4, M5 und M6 lokalisiert werden (Morth et al., 2007). Im Jahr 2009 erschien eine höher aufgelöste Kristallstruktur mit gebundenen K<sup>+</sup>-Ionen (eigentlich Rb<sup>+</sup>), in der die einzelnen Aminosäuren, die die Kationen koordinieren, gut zu identifizieren sind (Abb. 1.1-4A basierend auf der PDB-Datei 3A3Y (Shinoda et al., 2009)). Für die Bindungsstelle I werden Sauerstoff-Liganden von einem Wassermolekül und folgenden Aminosäuren zur Verfügung gestellt (zur besseren Übersicht wird die Nomenklatur der humanen α<sub>2</sub>-Untereinheit verwendet): Thr776, Ser779, Asn780 (TM5) und Asp808 (M6). Die beiden letztgenannten Reste koordinieren auch das K<sup>+</sup>-Ion der Bindungsstelle II zusammen mit: Val327, Ala328, Val330, Glu332 (M4) und Glu783 (M5)<sup>2</sup>. Asp812 (M6) spielt indirekt eine wichtige Rolle, indem es mit dem Wassermolekül von Bindungsstelle I interagiert, und es wird von Gln927 (M8) und Tyr775 (M5) stabilisiert.



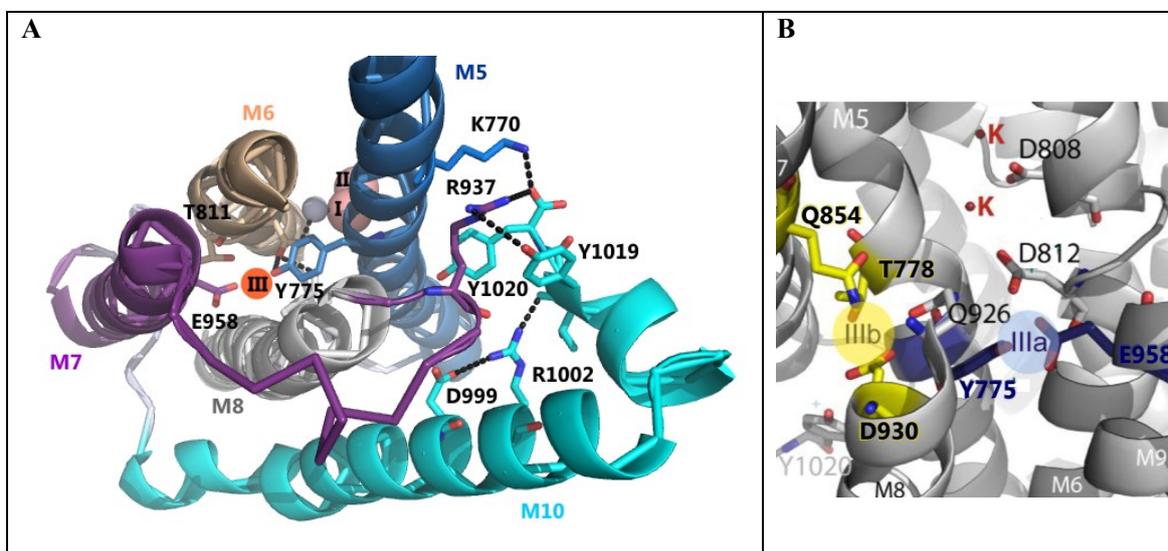
**Abb. 1.1-4: Koordinierung der K<sup>+</sup>-Bindungsstellen I und II und Strukturvergleich mit SERCA.**

A) Dargestellt sind die Reste der α-Untereinheit, die die beiden K<sup>+</sup>-Ionen (lachsfarbene Kugeln) an den Bindungsstellen I und II in der E<sub>2</sub>P-Konformation koordinieren (PDB 3A3Y von Shinoda et al., 2009). An Bindungsstelle I wird das K<sup>+</sup>-Ion zusätzlich von einem Wassermolekül (graue Kugel) koordiniert. Als gelb gestrichelte Linien sind Wechselwirkungen gezeigt, die die Bindungsstelle I indirekt zusätzlich stabilisieren. Diese Reste Tyr775 und Gln927 sind mutmaßlich an der Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle III in der E<sub>1</sub>P-Konformation beteiligt.

B) Gezeigt ist ein struktureller Vergleich der α-Untereinheit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (blau) mit SERCA (gelb) (aus: Morth et al., 2007). Als Fixpunkte dienen die sehr ähnlichen A- und P-Domänen (nicht gezeigt). Dargestellt ist die Ansicht aus Richtung des Zytoplasmas auf die Transmembrandomänen. Von besonderem Interesse ist der C-Terminus der α-UE (roter Pfeil), der sich zwischen der βM, M7 und M10 befindet.

<sup>2</sup> Diese Reste der humanen α<sub>2</sub>-UE sind respektive folgende Reste in der α-UE der Rektaldrüse des Hais bei Shinoda et al. (2009): I: T779, S782, N783, D811; II: V329, A330, V332, E334, E786; indirekt: D815, Q930 und Y778

Die Reste, die die zwei K<sup>+</sup>-Bindungsstellen bilden, sind vermutlich auch an der Bindung von zwei Na<sup>+</sup>-Ionen beteiligt. Dies wurde aus den Kristallstrukturen von SERCA im E<sub>1</sub>-Zustand geschlossen, in denen homologe Reste Sauerstoffliganden zur Ca<sup>2+</sup>-Koordination anbieten (Clarke et al., 1989; Andersen & Vilsen, 1994; Toyoshima et al., 2000). Da allerdings drei Na<sup>+</sup>-Ionen transportiert werden, gibt es noch eine dritte Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle, deren Lokalisation derzeit noch nicht eindeutig geklärt und daher Gegenstand intensiver Diskussion ist. Aus Mutations- und Modellierungsstudien anhand der SERCA-E<sub>1</sub>-Röntgenkristallstruktur und aus der Kristallstruktur der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase im E<sub>2</sub>P-Zustand wird die dritte Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle zwischen den Transmembransegmenten M5, M6, M8 und M9 vermutet. Es konnten folgende Reste identifiziert werden: Tyr775 (M5), Thr811 (M6) und Glu958 (M9), die in einem Cluster zusammen liegen (Vilsen, 1995; Vilsen et al., 1997; Ogawa & Toyoshima, 2002; Imagawa et al., 2005; Li et al., 2005). Später wurde die Beteiligung von Thr811 wieder in Frage gestellt (Poulsen et al., 2010). Dabei wurde zum einen auf ein älteres Struktur-Homologiemodell verwiesen (Ogawa & Toyoshima, 2002). Zum anderen wurde argumentiert, dass die verfügbaren Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Strukturen selbst keine offensichtliche Beteiligung dieser Aminosäureseitenkette an der Koordination von Na<sup>+</sup>-Ionen nahelegen. Zusätzlich schlugen Morth und Kollegen vor, dass Gln927 (M8), welches auch in dem Cluster liegt, an der Bindungsstelle III beteiligt sein könnte. Interessant ist auch, dass Asp812 (M6) eine Art Brücke bildet zwischen diesem Cluster und der Bindungsstelle I (Morth et al., 2007). Zum besseren Verständnis ist in Abb. 1.1-5A die ursprünglich vermutete Position der Bindungsstelle III gezeigt, allerdings nur ausgehend von der E<sub>2</sub>-Konformation - die Bindungsverhältnisse in der E<sub>1</sub>-Konformation sind nicht bekannt.



**Abb. 1.1-5: Die mutmaßliche Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle III und Stabilisierung durch den C-Terminus.**

A) Gezeigt ist die Kristallstruktur der α-Untereinheit in der E<sub>2</sub>-Konformation mit den beiden gebundenen K<sup>+</sup>-Ionen (lachsfarben). K770 in der M5 (blau) kann Wechselwirkungen mit dem C-terminalen Tyr1020 eingehen. Des Weiteren kann der C-Terminus mit Arg937 im Loop zwischen M7 und M8 interagieren, aber auch mit Arg1002 und Asp999. Durch diese Wechselwirkungen könnte der C-Terminus an der Stabilisierung der dritten Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle beteiligt sein, da in der E<sub>1</sub>-Konformation sowohl Reste in M7, M8 und M5 (hier Tyr775) mutmaßlich an der Bindungsstelle III (hier in Orange simuliert) beteiligt sein könnten.

B) Das Strukturmodell (PDB-Datei 2ZXE) zeigt zusätzlich zur ursprünglich vorgeschlagenen Bindungsstelle IIIa (blau), eine durch Poulsen und Kollegen vorgeschlagene alternative Bindungsstelle IIIb (gelb), die durch die Reste Thr778, Gln854 und Asp930 gebildet wird (aus: Poulsen et al. 2010). K<sup>+</sup>-Ionen sind durch rote Kugeln dargestellt.

In einer neueren Studie schlagen Poulsen und Kollegen eine alternative Koordination der Bindungsstelle III vor (Abb. 1.1-5B). Diese Bindungsstelle, von Poulsen und Kollegen IIIb genannt, liegt näher am intrazellulär gelegenen C-Terminus und wird mutmaßlich durch die Reste Thr778 (M5), Gln854 (M7) und Asp930 (M8) gebildet (Poulsen et al., 2010). Daher wurde mit elektrophysiologischen Methoden die Auswirkung von Mutationen an wichtigen Resten der Bindungsstellen IIIa und IIIb untersucht (Asp930, Thr778, Glu958, Tyr775). Die Ergebnisse ließen sich sämtlich im Sinne einer Verringerung der apparenten Affinität für extrazelluläres Na<sup>+</sup> interpretieren, wodurch die wichtige Rolle dieser Aminosäurepositionen für die Na<sup>+</sup>-Bindung unter Beweis gestellt wurde (Poulsen et al., 2010).

Seit 2007 richtet sich das wissenschaftliche Interesse auf den C-terminalen Bereich der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, da es gelungen war, die Röntgenkristallstruktur der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ( $\alpha_1$ -UE der Schweine-niere) im E<sub>2</sub>P-Zustand aufzuklären (Morth et al., 2007). In dieser Struktur endet die M10-Helix intrazellulär mit drei Argininen, gefolgt von ein konservierten PGG-Motiv und einem im Vergleich zu SERCA um acht Aminosäuren verlängerten C-Terminus. Der erste Teil dieser Verlängerung bildet eine kurze  $\alpha$ -Helix, die sich zwischen der  $\beta$ -Untereinheit, M7 und M10 befindet (Abb. 1.1-4B). Die zwei terminalen Tyrosine ragen in einen Hohlraum zwischen M7, M8 und M5 (Abb. 1.1-5). Da diese Tyrosine direkt mit M5 (humane  $\alpha_2$ -UE: Lys770) und dem Loop zwischen M8 und M9 (humane  $\alpha_2$ -UE: Arg937) interagieren können, in denen Reste enthalten sind, die vermutlich an der dritten Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle beteiligt sind, wurde vermutet, dass der C-Terminus für die Stabilisierung der Bindungsstelle III verantwortlich ist.

Morth und Kollegen zeigten auch, dass eine C-terminal um die letzten fünf Aminosäuren verkürzte  $\alpha$ -UE (Konstruktbezeichnung  $\Delta$ KETY<sub>Y</sub>), eine im Vergleich zum Wildtyp-Protein 26-fach verringerte Na<sup>+</sup>-Affinität aufwies (Morth et al., 2007). Diese Ergebnisse untermauerten die aus der Kristallstruktur gezogenen Schlüsse. Da die strukturelle Ausrichtung des C-Terminus‘ in der E<sub>1</sub>-Konformation unklar bleibt, stellt der C-terminale Bereich und seine Rolle in Struktur, Funktion und Dynamik des Enzyms das wesentliche Forschungsgebiet dieser vorgelegten Arbeit dar; insbesondere die terminalen Tyrosine Tyr1019 und Tyr1020, die mit Arg1002 und Arg937 wechselwirken.

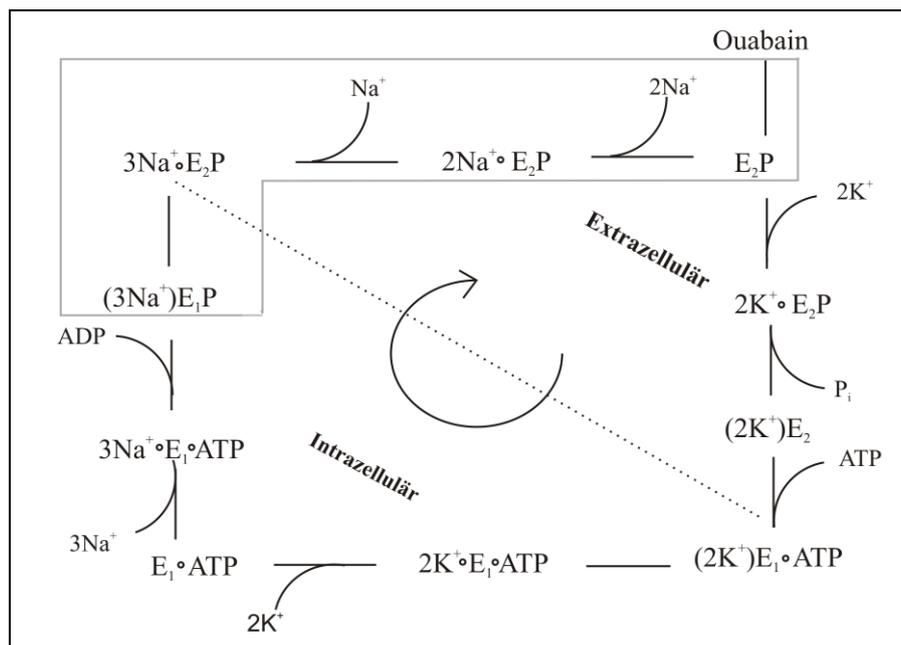
## 1.2 Die Funktionsweise

Etwa zehn Jahre nach Skous Entdeckung wurden Modelle zur Erklärung des Reaktionszyklus‘ der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase vorgeschlagen (Albers, 1967; Post et al., 1972). Beide Modelle gingen von zwei Schritten im Reaktionszyklus aus: 1. die Phosphorylierung verbunden mit einem  $\text{Na}^+$ -Ausstrom und 2. die Dephosphorylierung verbunden mit einem  $\text{K}^+$ -Einstrom. Etwas später konnten auch zwei strukturell unterschiedliche Konformationen identifiziert werden (Jørgensen, 1975). Der  $\text{E}_1$ -Zustand hat eine höhere Affinität für  $\text{Na}^+$  und der  $\text{E}_2$ -Zustand liegt in  $\text{K}^+$ -reichen Medien vor. Während eines Pumpzyklus‘ werden drei  $\text{Na}^+$ -Ionen nach außen abgegeben und zwei  $\text{K}^+$ -Ionen in die Zelle gepumpt. Dies entspricht einem auswärtsgerichteten Nettotransport von einer positiven Ladung (Post & Jolly, 1957; Thomas, 1969). Dabei wird pro Reaktionszyklus ein Molekül ATP hydrolysiert (Glynn, 1962). Im sogenannten Albers-Post-Schema werden diese Erkenntnisse zusammengefasst. Dieses als Basismodell geltende Schema wurde in den folgenden Jahren erweitert, da klar wurde, dass es noch weitere Zwischenschritte gibt. So existieren neben den zwei Hauptkonformationen noch die phosphorylierten Formen  $\text{E}_1\text{P}$  und  $\text{E}_2\text{P}$  (Jørgensen & Andersen, 1988; Glynn & Karlsh, 1990; Holmgren et al., 2000).

### 1.2.1 Der Reaktionszyklus der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

In Abb. 1.2-1 ist das modifizierte Albers-Post-Schema dargestellt, das im Folgenden erläutert wird (Glynn & Karlsh, 1990). Im  $\text{E}_1$ -Zustand liegen die Kationenbindungsstellen ins Intrazelluläre orientiert vor und das Enzym bindet drei  $\text{Na}^+$ -Ionen (Abb. 1.2-1 unten links). Das dritte  $\text{Na}^+$ -Ion wird mit einer höheren Affinität gebunden als die beiden ersten, was bedeutet, dass erst zwei  $\text{Na}^+$ -Ionen gebunden werden müssen, damit die dritte  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle zugänglich ist (Apell & Karlsh, 2001). Durch die Phosphorylierung mithilfe von ATP, wobei ADP freigesetzt wird, werden die  $\text{Na}^+$ -Ionen okkludiert (d. h. vom Protein eingeschlossen) und das Enzym wechselt seine Konformation in den  $\text{E}_2$ -Zustand. Dabei orientieren sich die Kationenbindungsstellen zur extrazellulären Seite. Die  $\text{Na}^+$ -Affinität wird reduziert und die  $\text{Na}^+$ -Ionen werden ins extrazelluläre Milieu abgegeben. Daraufhin erfolgt die hochaffine Bindung von zwei  $\text{K}^+$ -Ionen, die unter Dephosphorylierung okkludiert werden (mit einer bis zu 1000-fach höheren Affinität für  $\text{K}^+$  als für  $\text{Na}^+$  (Heyse et al., 1994)). Durch die niederaffine Bindung von ATP an  $\text{E}_2$  wird ein Konformationswechsel in den  $\text{E}_1$ -Zustand bewirkt. Da in diesem Konformationszustand die  $\text{K}^+$ -Bindungsaffinität wesentlich verringert ist, können die  $\text{K}^+$ -Ionen ins Zellinnere entlassen werden.

Dieser Mechanismus entspricht dem *alternating-access*-Modell (dt. abwechselnder Zugang). In diesem Modell gibt es zwei „Tore“ (*gates*), deren physikalische Identifikation noch aussteht und die im Rahmen des Reaktionsmodells in Form von Energiebarrieren darstellbar sind, jeweils eins auf der intra- und der extrazellulären Seite, die niemals zur gleichen Zeit geöffnet sind. Das intrazelluläre *gate* öffnet sich in der  $\text{E}_1$ -Konformation und das extrazelluläre in der  $\text{E}_2$ -Konformation. Nach Bindung der Kationen, schließen sich die *gates*; die Ionen sind okkludiert und können das Protein nicht verlassen (Jardetzky, 1966; Läuger, 1979). Der Mechanismus steht im Gegensatz zu dem Transportmechanismus von Ionenkanälen, bei denen die Kanalpore durch ein *gate*, dessen physikalische Identität schon weitaus besser bekannt ist, geöffnet und geschlossen wird (Bezanilla, 2005).



**Abb. 1.2-1: Schematische Darstellung des Albers-Post-Reaktionsschemas der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.** Der hauptsächlich elektrogene Schritt im  $\text{Na}^+$ -Reaktionszweig ist grau eingrahmt. Der okkludierte Zustand ist mit runden Klammern dargestellt. Der Inhibitor Ouabain bindet im  $\text{E}_2\text{P}$ -Zustand. Alle Schritte im Zyklus sind reversibel. Der Pfeil in der Mitte zeigt die Vorwärtsrichtung des Reaktionszyklus.

### 1.2.2 Elektrogenizität der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

Der Transportzyklus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist elektrogen, da die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine Nettoladung über die Membran ins extrazelluläre Medium transportiert (Thomas, 1969; Läuger, 1991). Diese Nettoladung ist als stationärer Strom messbar, daher kann dieses Protein sehr gut elektrophysiologisch untersucht werden. Alle Schritte des Reaktionszyklus (Abb. 1.2-1) sind reversibel und das Gleichgewicht eines jeden Teilschrittes kann je nach Bedingungen (Änderungen des Membranpotentials, Änderungen der intra- und extrazellulären ionischen Bedingungen) verschoben werden, entweder hin zur Vorwärts- oder zur Rückreaktion. Der stationäre  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpstrom, welcher als Ausstrom messbar ist, ist spannungsabhängig, da er mit zunehmender Hyperpolarisation (also mit zunehmend negativen Potentialen) sinkt. Das erklärt sich dadurch, dass bei negativen Potentialen die  $\text{Na}^+$ -Rückbindung stimuliert wird, sodass es zu einer Konkurrenz von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  an den extrazellulären Bindungsstellen kommt. Bei positiven Potentialen liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf dem Vorwärtspumpzyklus.

Um Informationen über den komplexen, aus vielen Teilschritten bestehenden Reaktionszyklus zu erhalten, wurden in zahlreichen elektrophysiologischen Studien einzelne Reaktionsschritte untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass auch einige Teilschritte elektrogen sind, da eine Ladungsverschiebung spannungsabhängig messbar war. Der Reaktionszyklus kann dabei in einen  $\text{K}^+$ - und einen  $\text{Na}^+$ -Reaktionszweig (eingrahmt in Abb. 1.2-1) unterteilt werden.

Der  $\text{K}^+$ -Reaktionszweig kann unter  $\text{Na}^+$ -freien Pufferbedingungen gemessen werden. Insgesamt verläuft der  $\text{K}^+$ -Transport elektroneutral, da keine Nettoladung zwischen den Zuständen  $\text{E}_2\text{P}(2\text{K}^+)$  und  $\text{E}_1$  transportiert wird. Allerdings ist die extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Bindung leicht elektrogen (Bahinski et al., 1988; Rakowski et al., 1991; Domaszewicz & Apell, 1999). Diese Elektrogenizität wurde mit einem extrazellulären hochohmigen Zugangskanal für  $\text{K}^+$  (engl. *ion well* oder *access channel*; zum

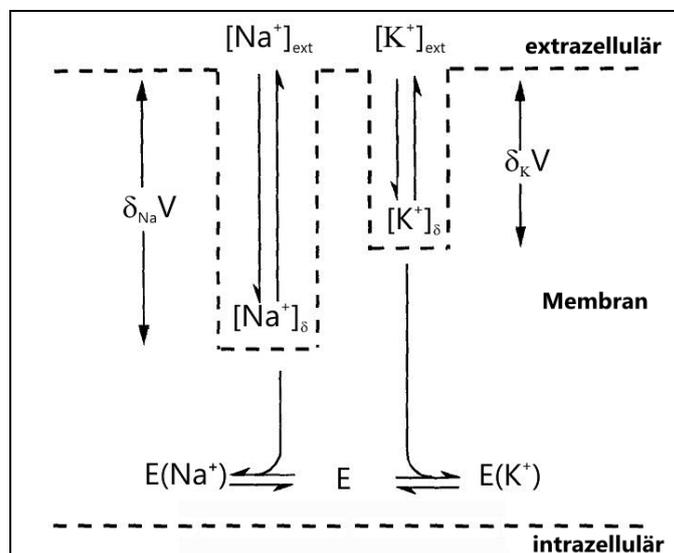
*access-channel*-Modell: s. unten) begründet, d. h. das Ion muss einen Teil des Membranpotentials überwinden, um an seine Bindungsstelle zu gelangen (Rakowski et al., 1991; Sagar & Rakowski, 1994; Buhler & Apell, 1995).

Erstmals wurde 1985 gezeigt, dass auch der  $\text{Na}^+$ -Reaktionszweig zusätzlich zu dem eigentlichen Pumpzyklus eine elektrogene Komponente enthält, da eine Ladungstranslokation unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen nachgewiesen werden konnte (Fendler et al., 1985). Wenig später untersuchten Nakao und Gadsby den  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austausch in Abwesenheit von  $\text{K}^+$  mithilfe elektrophysiologischer Messungen (Nakao & Gadsby, 1986). Es wurden folgende  $\text{Na}^+$ -abhängigen Reaktionsschritte betrachtet (grauer Kasten in Abb. 1.2-1):  $(3\text{Na}^+)\text{E}_1\text{P} \leftrightarrow (3\text{Na}^+)\text{E}_2\text{P} \leftrightarrow \text{E}_2\text{P} + 3\text{Na}^+$ . Dabei konnten sogenannte transiente *pre-steady-state*-Ströme gemessen werden, welche exponentiell mit der Zeit relaxieren. In nachfolgenden Spannungspuls-Experimenten wurde die Elektrogenizität der  $\text{Na}^+$ -Freisetzung (Vorwärtstransport), die durch positive Potentiale stimuliert wird, und der  $\text{Na}^+$ -Rückbindung, die durch negative Spannungen ausgelöst wird, untersucht (Rakowski, 1993; Holmgren & Rakowski, 1994; Friedrich & Nagel, 1997; Holmgren et al., 2000).

Holmgren und Kollegen haben herausgefunden, dass es bei der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Freisetzung drei aufeinanderfolgende geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritte der Ladungsverschiebung gibt (Holmgren et al., 2000). Jeder Schritt ist vermutlich notwendig, um die Freisetzung eines  $\text{Na}^+$ -Ions zu ermöglichen. Der langsamste Reaktionsschritt ist stark elektrogen mit einer Äquivalentladung von 0,7-1,0 ( $z_q$ ): das erste  $\text{Na}^+$ -Ion wird aus der Bindungstasche entlassen und bewegt sich dabei durch ca. 70 % des elektrischen Felds der Membran. Es wurde gefolgert, dass die Ladungsverschiebung kinetisch durch den  $(3\text{Na}^+)\text{E}_1\text{P}/(3\text{Na}^+)\text{E}_2\text{P}$ -Konformationswechsel limitiert ist, d. h., dass entweder der Konformationswechsel selbst oder die  $\text{Na}^+$ -Freisetzung das elektrogene Ereignis darstellen, wobei dann der Konformationswechsel geschwindigkeitsbestimmend wäre (Rakowski et al., 1997). Nach der Freisetzung des ersten  $\text{Na}^+$ -Ions gibt es wahrscheinlich eine kleine Konformationsänderung, die die sequentielle aber auch schnellere Freisetzung der anderen  $\text{Na}^+$ -Ionen ermöglicht. Diese Reaktionsschritte sind weniger stark elektrogen, da die beiden  $\text{Na}^+$ -Ionen nur noch 10-20 % des elektrischen Feldes der Membran passieren (Wuddel & Apell, 1995; Holmgren et al., 2000; Apell & Karlsh, 2001). Bei der  $\text{Na}^+$ -Rückbindung hingegen werden zuerst die beiden für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  gemeinsamen Bindungsstellen besetzt. Anschließend erfolgt die Bindung des dritten  $\text{Na}^+$ -Ions, welche am stärksten elektrogen ist und die langsamste Komponente der Ladungstranslokation darstellt.

Aus dem Zeitverlauf der transienten Ströme dieser langsamen Ladungstranslokation können Rückschlüsse auf die Kinetik der  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschreaktion gezogen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Relaxationskonstante dieser Ströme die Summe aus einer spannungsunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten der Vorwärtsreaktion ( $\text{Na}^+$ -Freisetzung) und einer spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten der Rückbindung von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  ist (De Weer et al., 1992; Rakowski, 1993). Aus diesen Ergebnissen wurde das *access-channel*-Modell (dt. Zugangskanal) entwickelt (Läuger, 1991; Gadsby et al., 1993; Sagar & Rakowski, 1994). Demnach wird angenommen, dass es einen hochohmigen extrazellulären Zugangsweg für  $\text{Na}^+$ -Ionen an die Bindungsstellen gibt (vor allem für das  $\text{Na}^+$ -Ion, das die dritte  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle besetzt). In der Literatur auch „*ion well*“ genannt, hat dieser eine dielektrische Konstante von  $\delta = 0,7$  - dieser Wert entspricht der Tiefe des *ion well* bezogen auf die Gesamtdicke der Membran bzw. dem Anteil des Membranpotentials,

der über den Zugangskanal abfällt (Holmgren & Rakowski, 2006). In Abb. 1.2-2 ist ein vereinfachtes Schema des *access-channel*-Modells, in dem von drei Zuständen ausgegangen wird, dargestellt (Sagar & Rakowski, 1994).



**Abb. 1.2-2: Schematische Darstellung des *access-channel*-Modells für  $K^+$  und  $Na^+$ .**

Das *access-channel*-Modell kann anhand eines Drei-Zustands-Modells veranschaulicht werden (Sagar & Rakowski, 1994). Dabei wird von einem  $Na^+$ -gebundenen Zustand, einem nach extrazellulär gerichteten ungebundenen und einem  $K^+$ -gebundenen Zustand ausgegangen. Der *access channel* oder auch *ion well* ist durch den Dielektrizitätskoeffizienten für das jeweilige Ion  $\delta$  und das Potential bestimmt.  $[Na^+]_{ext}$  bzw.  $[K^+]_{ext}$  sind die extrazellulären Ionenkonzentrationen und  $[Na^+]_{\delta}$  bzw.  $[K^+]_{\delta}$  sind die Ionenkonzentrationen an den jeweiligen Bindungsstellen am Ende des *ion well*, der für extrazelluläres  $Na^+$  tiefer ist als für  $K^+$ .

Da die Ladungsverschiebung während der  $Na^+$ -Rückbindung elektrogen und spannungsabhängig ist, kann aus den transienten Strömen neben der Kinetik auch auf die apparente  $Na^+$ -Affinität des Enzyms geschlossen werden. Die Spannungsabhängigkeit der während des  $Na^+/Na^+$ -Austauschs verschobenen Ladung  $Q$  folgt einer Boltzmann-Verteilung, welche die Verteilung der Pumpmoleküle auf die beiden Konformationszustände  $E_1P$  und  $E_2P$  widerspiegelt. Aus den Parametern der Boltzmann-Verteilung lassen sich Rückschlüsse auf die apparente  $Na^+$ -Affinität, insbesondere an der dritten  $Na^+$ -Bindungsstelle, und auf die Elektrogenizität der Reaktion ziehen. Dazu gehören der  $V_{0,5}$ -Wert, welcher dem Potential entspricht, bei dem eine Gleichverteilung auf beide Zustände herrscht, und die apparente Wertigkeit  $z_q$  des dritten  $Na^+$ -Ions.  $z_q$  ist dabei durch die dielektrische Konstante des *access channels* bestimmt. Ist die Affinität für extrazelluläres  $Na^+$  verringert, so muss die Membran stärker negativ aufgeladen werden, damit genug extrazelluläres  $Na^+$  an den Bindungsstellen angereichert wird, um die  $Na^+$ -Rückbindung und Okklusion zu stimulieren. Dies würde sich in einer Verschiebung der  $Q(V)$ -Kurve (bzw. des  $V_{0,5}$ -Werts) zu negativen Potentialen ausdrücken.

### 1.2.3 Kinetik der $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschreaktion

Im Jahr 2006 wurden die kinetischen Überlegungen zum *access-channel*-Modell erweitert. Das Vier-Zustands-Modell von Holmgren und Rakowski beschreibt, welchen Einfluss die Bindung und Okklusion von  $\text{Na}^+$  auf die transiente Ladungsverschiebung, die aus der stark elektrogenen Deokklusion und Freisetzung des ersten  $\text{Na}^+$ -Ions in den Extrazellularraum resultiert, hat (Peluffo, 2004; Holmgren & Rakowski, 2006). Betrachtet wurden folgende Teilreaktionen im Reaktionszyklus:

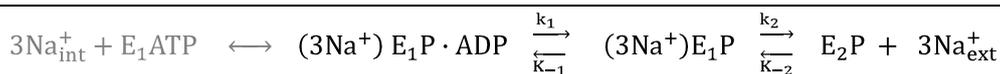


Abb. 1.2-3: Reaktionsschritte des Vier-Zustandsmodells von Holmgren & Rakowski (2006).

In einem ersten Schritt erfolgt die elektrogene Bindung von  $\text{Na}^+$  in einem flachen intrazellulären *ion well*, der eine dielektrischen Konstante von ca. 0,25 hat, gefolgt von einer langsamen Okklusion von drei  $\text{Na}^+$ -Ionen. Die Bindung und Okklusion stehen abhängig vom Haltepotential miteinander im Gleichgewicht. Diese  $\text{Na}_{\text{int}}^+$ -Bindungsschritte (grau in Abb. 1.2-3) sind jedoch im Vergleich zu den  $\text{Na}^+$ -Freisetzungsschritten (schwarz in Abb. 1.2-3) langsam. Für die Betrachtung der Geschwindigkeitskonstanten der Gesamtreaktion des  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschs sind die im Folgenden erläuterten Reaktionsschritte wichtig.

Die Freisetzung von ADP ( $k_1$ ) aus dem okkludierten  $\text{E}_1$ -Zustand sowie die Rückbindung von ADP ( $K_{-1}$ ) sind spannungsunabhängig und erfolgen vor der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Freisetzung. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  wiederum fasst zwei Reaktionsschritte zusammen: einmal den Konformationswechsel von  $\text{E}_1\text{P}$  zu  $\text{E}_2\text{P}$  und die  $\text{Na}^+$ -Freisetzung ins Extrazelluläre. Die Freisetzung ist spannungsabhängig, kann aber vernachlässigt werden, da der Konformationswechsel wesentlich langsamer und damit geschwindigkeitsbestimmend ist. Die  $\text{Na}^+$ -Rückbindung und Reokklusion ( $K_{-2}$ ) hingegen ist sehr spannungsabhängig und auch abhängig von der lokalen  $\text{Na}^+$ -Konzentration im extrazellulären *ion well* ( $[\text{Na}^+]_{\delta(\text{ext})}$ , Abb. 1.2-2). Diese steht im Gleichgewicht mit der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration über eine exponentielle Funktion:

$$[\text{Na}^+]_{\delta(\text{ext})} = [\text{Na}^+]_{\text{ext}} \cdot \exp\left(-\frac{\delta_{(\text{ext})} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \quad \text{Gl. 1.2-1}$$

$F$  ist die Faraday-Konstante,  $R$  die universelle Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur und die dielektrische Konstante  $\delta_{(\text{ext})}$  ist die Tiefe des extrazellulären *access channels*. Nach diesen Überlegungen ergibt sich für die Geschwindigkeitskonstante  $K_{-2}$ :

$$K_{-2} = k_{-2} [\text{Na}^+]_{\text{ext}} \cdot \exp\left(-\frac{\delta_{(\text{ext})} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \quad \text{Gl. 1.2-2}$$

Hierbei ist  $k_{-2}$  die spannungsunabhängige Geschwindigkeitskonstante, die die extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Rückbindung/Okklusion und den  $\text{E}_2\text{P}$ - $\text{E}_1\text{P}$ -Konformationswechsel kombiniert. Da die Bindung der  $\text{Na}^+$ -Ionen im intrazellulären *ion well* verhältnismäßig schnell ist im Vergleich zur intrazellulären Okklusion, isoliert die langsame Okklusionsreaktion die intrazellulären Bindungsschritte kinetisch von der schnelleren  $\text{Na}^+$ -Freisetzung<sup>3</sup>. Der okkludierte Zustand stellt also eine energetische Barriere, quasi als *gate*, für die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Freisetzung dar. Das heißt im Endeffekt, dass die intrazellu-

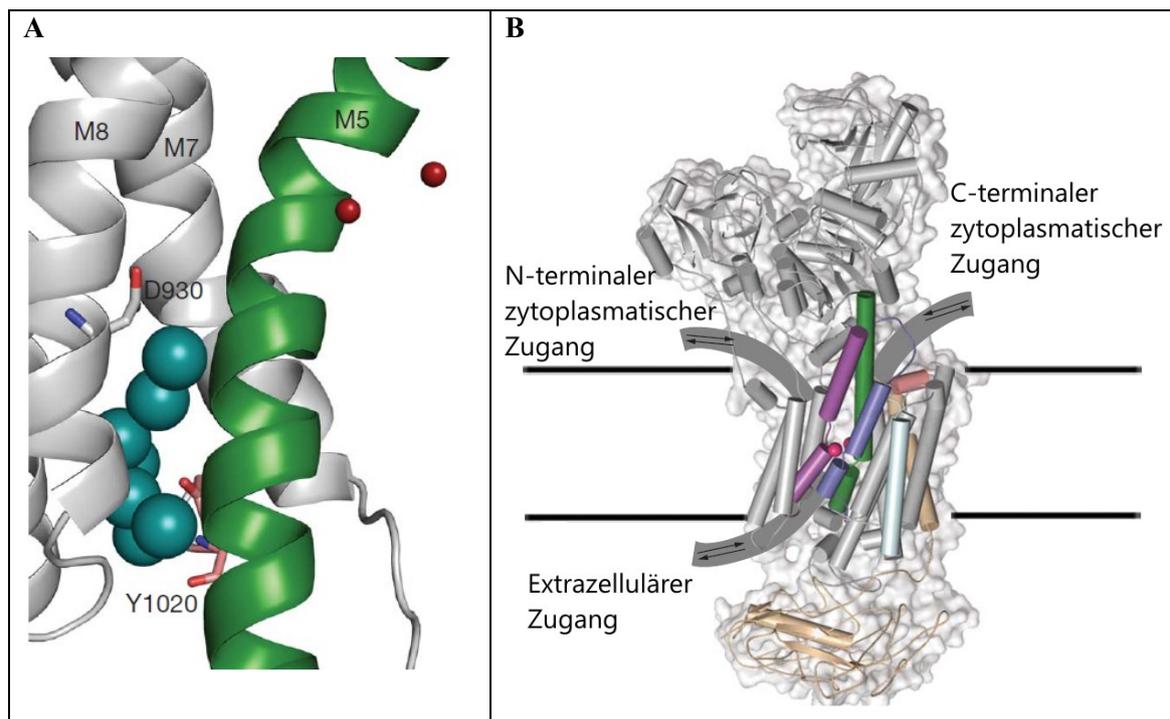
<sup>3</sup> Eine detaillierte mathematische Erläuterung befindet sich im Anhang A1.

läre  $\text{Na}^+$ -Bindung kinetisch keinen Einfluss auf die Gesamtgeschwindigkeitskonstante hat, welche, wie von Holmgren und Rakowski erläutert, vielmehr von  $\text{K}_2$  dominiert wird. Die Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstante der transienten Ströme ist also durch die Elektrogenizität der  $\text{Na}^+$ -Rückbindung/Reokklusion bedingt und die Pumpmoleküle pendeln bei der  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschreaktion zwischen dem okkludierten  $\text{E}_1\text{P}$ -Zustand und dem deokkludierten  $\text{E}_2\text{P}$ -Zustand hin und her (schwarz in Abb. 1.2-3).

#### 1.2.4 Die Rolle von $\text{H}^+$ -Ionen im Pumpzyklus

Protonen spielen für den Reaktionsmechanismus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine wichtige, wenn auch noch nicht ganz aufgeklärte Rolle. Da es sich bei dem Reaktionszyklus um eine Hydrolysereaktion handelt, hängt die ATPase-Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase vom intrazellulären pH ab und hat ihr Maximum bei pH 7,5 (Skou & Esmann, 1980; Breitwieser et al., 1987). Anhand von Fluoreszenzmessungen zeigten Skou und Esmann, dass ein niedriger intrazellulärer pH-Wert die apparente Affinität für  $\text{K}^+$  erhöht bzw. dass das Gleichgewicht der Reaktion zum  $\text{E}_2$ -Zustand verschoben wird. Es wurde vermutet, dass es vom Zytoplasma aus zugängliche Reste gibt, die während des Zyklus protoniert werden. Diese Protonierung könnte für die Neutralisation der dritten Kationenbindungsstelle während der  $\text{K}^+$ -Bindung erforderlich sein, um die ungleiche Stöchiometrie des elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Transports zu ermöglichen. Skou schlug vor, dass das  $\text{K}^+$ -gebundene Enzym in einer  $\text{H}_2\text{EK}_2$ -Form vorliegt, während die  $\text{Na}^+$ -gebundene Konformation  $\text{HENa}_3$  ein Proton weniger gebunden hat. Dieses Modell, welches von Poulsen und Kollegen weiter entwickelt wurde, basiert also auf der Annahme, dass es für den Transportzyklus vier zu besetzende Stellen für Kationen gibt, wobei sich ein protonierbarer Rest vermutlich in direkter Nähe zur dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle befindet (Poulsen et al., 2010). Poulsen und Kollegen schlugen dafür Asp930 und Glu958 vor, die beide nahe der dritten Bindungsstelle positioniert sind. Von der intrazellulären Seite aus gesehen befindet sich Asp930 am Ende einer C-terminalen Kavität, die an die Bindungsstelle IIIb grenzt (Abb. 1.1-5B).

In molekulardynamischen Simulationen des Wildtyp-Enzyms und der C-terminal mutierten Konstrukte YYAA und R937P zeigte sich, dass sich diese Kavität durch einen C-terminalen Zugang mit Wassermolekülen füllt (Abb. 1.2-4A, Poulsen et al., 2010). Poulsen und Kollegen entwickelten aus diesen Ergebnissen in Kombination mit eigenen elektrophysiologischen Untersuchungen, aber auch Bezug nehmend auf Ergebnisse, die in dieser Arbeit präsentiert werden, ein Modell, das versucht die Rolle von Protonen in den Reaktionszyklus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase einzubeziehen und die Funktion des C-Terminus aufzuklären (Abb. 1.2-5). Dieses Modell wird im Folgenden kurz erläutert, um die Analysen, die in der vorliegenden Arbeit getätigt wurden, besser zu verstehen.

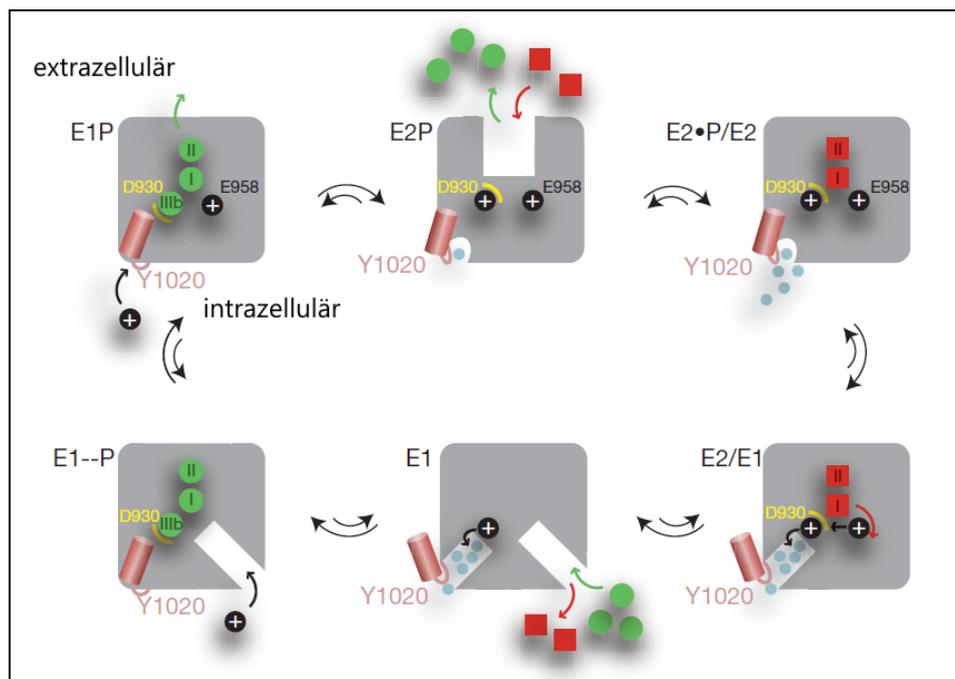


**Abb. 1.2-4: Darstellung des C-terminalen Zugangskanals für Protonen (aus: Poulsen et al., 2010).**

A) Gezeigt ist eine repräsentative Momentaufnahme nach 64,8 ns in der molekulardynamischen Simulation des R937P-Konstrukts. Die Wassermoleküle (cyanfarben) gelangen in einen intrazellulären C-terminalen Kanal zwischen M5, M7 und M8. Die  $K^+$ -Ionen sind als rote Kugeln dargestellt.

B) Dargestellt ist die Struktur der  $Na^+/K^+$ -ATPase mit zwei gebundenen  $K^+$ -Ionen (magentafarbene Kugeln). Der ursprünglich vorgeschlagene N-terminale Ionenzugangskanal geht durch M4 (lila), M5 (grün) und M6 (blau) (Takeuchi et al., 2008). Der von Poulsen und Kollegen vorgeschlagene alternative Zugang durch den C-Terminus ist in Rosa dargestellt. Beide Abbildungen wurden von Poulsen et al., 2010 veröffentlicht.

Es wird vermutet, dass die Protonierung des  $Na^+$ -okkludierten Zustands (am Rest Glu958) das extrazelluläre *gate* öffnet, damit  $Na^+$  freigesetzt werden kann (Poulsen et al., 2010). Während der  $Na^+$ -Freisetzung wird Asp930 von der intrazellulären Seite her protoniert, und zwar durch den C-terminalen Zugangskanal (Abb. 1.2-4B). Somit wird die dritte Kationenbindungsstelle durch ein Proton besetzt, damit extrazellulär nur zwei  $K^+$ -Ionen binden können. Nach dem  $E_2$ - $E_1$ -Konformationswechsel verlassen die Protonen das Enzym durch den C-terminalen Zugangskanal, damit intrazellulär  $K^+$  freigesetzt und  $Na^+$  gebunden werden kann, dies allerdings durch einen N-terminalen Zugangsweg (Abb. 1.2-4B). In der Kristallstruktur sind vor allem die Reste Arg937, Asp999, Arg1002 und die C-terminalen Tyrosine Tyr1019 und Tyr1020, die untereinander Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen ausbilden können (Abb. 1.1-5), an diesem mutmaßlichen Zugangskanal beteiligt. Dieses Modell stimmt mit den verfügbaren funktionellen Daten überein; ein formaler Beweis steht bislang jedoch noch aus.



**Abb. 1.2-5: Die Rolle von  $H^+$ -Ionen im Albers-Post-Schema der  $Na^+/K^+$ -ATPase (aus: Poulsen et al., 2010).**

Dargestellt ist das von Poulsen und Kollegen vorgeschlagene Albers-Post-Schema, in dem die mutmaßliche Rolle von zwei  $H^+$ -Ionen erläutert wird. Im Zustand  $E_1P$  (oben links) sind drei  $Na^+$ -Ionen (grüne Kreise) okkludiert. Mit dem Konformationswechsel zum  $E_2P$ -Zustand nähert sich vom Zytoplasma ein Proton (schwarzer Kreis) der von Poulsen und Kollegen vorgeschlagenen Bindungsstelle IIIb (Abb. 1.1-5B). Dadurch wird das extrazelluläre *gate* geöffnet und  $Na^+$ -Ionen freigesetzt. Durch die anschließende Protonierung von Asp930 können zwei  $K^+$ -Ionen binden (rote Quadrate) und in den Intrazellularraum transportiert werden. Dafür öffnet sich ein C-terminaler Zugangskanal, durch den die Protonen das Enzym verlassen (unten rechts), um so die intrazelluläre  $K^+$ -Freisetzung durch einen N-terminalen Zugangsweg zu ermöglichen. Anschließend können  $Na^+$ -Ionen gebunden werden und ein  $H^+$ -Ion nähert sich durch den N-terminalen Zugangskanal, um mutmaßlich Glu958 zu protonieren und die Voraussetzung für die Deokklusion von  $Na^+$  zu schaffen.

Des Weiteren spielen nicht nur intrazelluläre Protonen eine Rolle für die Funktionsweise, sondern unter bestimmten Bedingungen auch extrazelluläre  $H^+$ -Ionen. Erstmals wurde im Jahr 1991 mit elektrophysiologischen Methoden ein ouabainsensitiver stationärer Einstrom bei negativen Potentialen unter  $Na^+$ - und  $K^+$ -freien Bedingungen nachgewiesen (Rakowski et al., 1991). Diese Leckströme (engl. *leak currents*) sind abhängig vom extrazellulären pH und gehen mit einer intrazellulären Ansäuerung einher (Wang & Horisberger, 1995). Die  $Na^+/K^+$ -ATPase kann also einen elektrogenen Protonentransport vermitteln, der sich nicht mit dem Albers-Post-Schema erklären lässt. Es gibt mehrere Theorien über den Mechanismus des Protonen-Einstroms. Rettinger schlug vor, dass die Ströme eine Konsequenz aus einem ATP-abhängigen Reaktionszyklus sind, der von der  $H^+/K^+$ -ATPase abgeleitet werden kann (Rettinger, 1996). Andere Gruppen gingen davon aus, dass das WT-Protein eine  $E_2$ -ähnliche Konformation annehmen kann, die für Protonen permeabel ist, allerdings nur unter  $Na^+$ - und  $K^+$ -freien Bedingungen (Efthymiadis et al., 1993; Wang & Horisberger, 1995). Dabei stellte sich die Frage, ob  $H^+$ -Ionen in der  $E_2$ -Konformation den gleichen extrazellulären kanalartigen Zugangsweg benutzen (der bisher nicht bekannt ist) wie der, der für  $Na^+$ -Ionen während der spannungsabhängigen Ladungstranslokation vermutet wird (Gadsby et al., 1993; Hilgemann, 1994). Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Effekt von extrazellulären pH-Wert-Änderungen auch im  $Na^+/Na^+$ -Austauschmodus getestet (Vasilyev et al., 2004). Diese Studie und auch andere Studien lassen vermuten, dass niedrige extrazelluläre pH-Werte einen sowohl  $Na^+$ - als auch

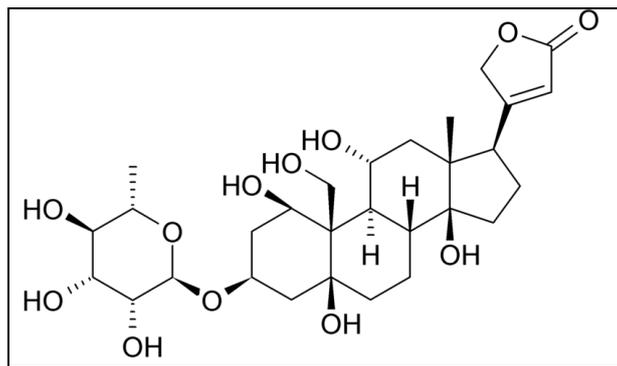
H<sup>+</sup>-leitenden Zugangsweg in der E<sub>2</sub>-Konformation aktivieren (Vasilyev et al., 2004; Li et al., 2006). Vasilyev und Kollegen zeigten auch, dass die Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstante der transienten Ströme im Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austauschmodus bei extrazellulärer Ansäuerung verändert war. Auf der Grundlage dieser Befunde wurde ein mathematisches Modell entwickelt, das den Effekt des extrazellulären pH-Werts auf die Kinetik der Reaktion beschreibt. Demnach senkt ein niedriger extrazellulärer pH-Wert die Energiebarriere zwischen den Na<sup>+</sup><sub>int</sub>-Bindungsschritten und dem Na<sup>+</sup>-okkludierten Zustand, sodass der okkludierte Zustand für Na<sup>+</sup> von beiden Seiten der Membran leichter zugänglich ist (anders als bei neutralem pH wie von Holmgren und Rakowski (2006) beschrieben, s. oben). Die Relaxation der transienten Ströme wird in diesem Fall sowohl bei negativen als auch bei positiven Potentialen schneller, da sie durch die Na<sup>+</sup>-Bindung über einen intrazellulären *access channel* und durch die Na<sup>+</sup>-Rückbindung über den extrazellulären *access channel*<sup>4</sup> bestimmt wird. Es ist also wichtig festzuhalten, dass die extrazelluläre Protonenkonzentration einen Einfluss auf die Kinetik hat. Trotz aller auf diesem Gebiet vorliegenden Studien ist der Einfluss von Protonen auf die Funktionsweise der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase jedoch noch nicht verstanden.

### 1.2.5 Die Inhibition der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wird u. a. durch kardiotonische Steroide (sog. Herzglykoside) selektiv inhibiert (Schatzmann, 1953; Skou, 1960). Zu den Herzglykosiden zählen u. a. Digoxin und Ouabain (g-Strophanthin-8-hydrat). Derartige Substanzen werden in der Medizin zur Behandlung von Herzinsuffizienz oder Tachykardien (Herzrasen) eingesetzt. Ein solcher Zusammenhang kann wie folgt erklärt werden: Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase hat einen indirekten Einfluss auf die Wirkungsweise bzw. Aktivität des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporters (Baker et al., 1969). Dieser Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher nutzt den Na<sup>+</sup>-Gradienten zum Auswärtstransport von Ca<sup>2+</sup>. Wird die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch Ouabain (Abb. 1.2-6) inhibiert, steigt die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration und die Na<sup>+</sup>-Konzentrationsdifferenz bricht zusammen. Dadurch kann Ca<sup>2+</sup> vom Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher weniger effizient aus der Zelle hinaus transportiert werden. Ca<sup>2+</sup>-ATPasen dagegen pumpen Ca<sup>2+</sup>-Ionen ins sarkoplasmatische Retikulum, einem intrazellulären Speicher, aus dem Ca<sup>2+</sup>-Ionen bei Muskeleerregung vermehrt freigesetzt werden, was zu einer verstärkten Muskelkontraktion führt (Blaustein et al., 2000).

Die  $\alpha$ -Isoformen der humanen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Ouabainaffinität (Wang et al., 2001). Allerdings weist die  $\alpha_1$ -Isoform der Ratte eine Besonderheit auf: sie hat im Vergleich zur  $\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Isoform eine 1000fach verringerte Affinität für Ouabain, was auf zwei geladene Aminosäuren ( $\alpha_1$  der Ratte: Arg113 und Asp124) in der extrazellulären Schleife zwischen M1 und M2 zurückzuführen ist (Price et al., 1990). Diese sind in anderen Spezies und Isoformen ungeladene Reste (Glutamin anstelle von Arginin und Asparagin anstelle von Asparaginsäure). Werden die entsprechenden Mutationen in die humane  $\alpha_2$ -Isoform eingeführt (Q116R und N127D), so hat die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase einen 1000-fach erhöhten IC<sub>50</sub>-Wert für Ouabain als die Wildtyp-Form (Price & Lingrel, 1988). Ouabain wird somit bei elektrophysiologischen Messungen verwendet, um die spezifisch durch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität vermittelten Ströme von Strömen anderer, endogener Pumpen oder Kanälen der Oozytenmembran zu unterscheiden.

<sup>4</sup> Mathematische Details befinden sich im Anhang A1.



**Abb. 1.2-6: Die chemische Struktur von Ouabain.**

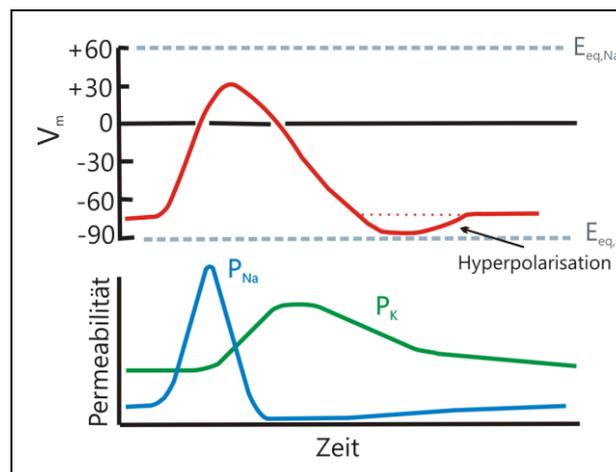
Ouabain, auch g-Strophanthin, ist ein Herzglykosid, das in Samen der afrikanischen Pflanzengattung *Strophanthus* vorkommt. Ouabain besteht aus einem Steroidgerüst, einem  $\gamma$ -Lacton und einem Monosaccharid. Ouabain bindet auf der extrazellulären Seite an die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der  $\text{E}_2\text{P}$ -Konformation (Abb. 1.2-1), dadurch wird das Enzym im  $\text{E}_2$ -Zustand blockiert (Kaplan, 2002; Ogawa et al., 2009).

### 1.3 Erkrankungen durch Mutationen der $\alpha$ -Untereinheit

Bislang konnten bereits diverse Mutationen in  $\alpha$ -Isoformen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase als Ursache bestimmter Krankheitsbilder identifiziert werden, darunter vor allem neurologische Erkrankungen. Dies ist vor allem dadurch zu verstehen, dass die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der transmembranären  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -Gradienten spielt und diese gerade für Nervenzellen und für die Erregungsleitung von grundlegender Bedeutung sind.

#### 1.3.1 Die Nervenreizleitung

Die Erregungsleitung ist ein hochkomplexer Vorgang, der auf dem exakten Zusammenspiel verschiedener Proteine, Moleküle und Komponenten der Membran beruht (Jan & Stevens, 2000). Am Anfang einer solchen Kette von Reaktionen steht ein chemischer oder physikalischer Reiz, der einen Nervenpuls auslöst. Dieser Puls beruht auf Spannungsänderungen in der Membran als Folge von zeitlich synchronisierten Leitfähigkeitsänderungen für verschiedene Ionen, hauptsächlich  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  (Hodgkin et al., 1952). Um ein Aktionspotential auszulösen, bedarf es einer Stimulation, durch die das Membranpotential eines Neurons über einen Schwellenwert angehoben wird. Dies kann z. B. durch Neurotransmitter geschehen, die neurotransmittergesteuerte  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle öffnen, sodass das Membranpotential nicht mehr, wie im Ruhezustand, in der Nähe des  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotentials liegt, sondern in Richtung des  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewichtspotentials in depolarisierender Richtung verschoben wird. Beim Überschreiten eines bestimmten Potentialwerts (die sogenannte Schwellenspannung, die um ca. 20 mV größer ist als das Ruhepotential) wird das Aktionspotential ausgelöst (Abb. 1.3-1).



**Abb. 1.3-1: Zeitlicher Verlauf eines Aktionspotentials.**

Schematisch dargestellt ist der zeitliche Verlauf eines Aktionspotentials (obere Grafik). Das Gleichgewichtspotential für  $K^+$ ,  $E_{eq,K}$ , liegt bei ca.  $-90$  mV, das für  $Na^+$ ,  $E_{eq,Na}$ , liegt bei ca.  $+60$  mV. Ist das Potential nach der Repolarisation unterhalb vom Ruhemembranpotential, das in Nervenzellen bei ca.  $-70$  mV liegt, so ist die Zelle hyperpolarisiert. Die untere Grafik zeigt den zeitlichen Verlauf der Permeabilitäten für Kalium (grün) und für Natrium (blau), während eines Aktionspotentials.

Bei diesem Aktionspotential werden die spannungsabhängigen  $Na^+$ -Kanäle geöffnet und  $Na^+$  strömt in die Zelle. Während dieser Depolarisationsphase steigt die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $K^+$ -Kanäle, wodurch mit etwas zeitlicher Verzögerung  $K^+$ -Ionen nach außen zu strömen beginnen. Bei einem Membranpotential von etwa  $+30$  mV kommt es zum Stillstand des  $Na^+$ -Einstroms, da einerseits der Konzentrations- und Ladungsgradient abgebaut ist und andererseits die  $Na^+$ -Kanäle spannungsabhängig wieder anfangen zu schließen. Der anschließende Abfall des Potentials, die Repolarisation, entsteht durch den verzögert einsetzenden Ausstrom von  $K^+$ -Ionen. Sinkt das Potential unter das Niveau des ursprünglichen Ruhepotentials der Zelle, da die  $K^+$ -Kanäle noch nicht geschlossen sind und das Gleichgewichtspotential von  $K^+$  niedriger ist als das Ruhepotential, spricht man von einer Hyperpolarisationsphase. Um die Konzentrationsgradienten von  $Na^+$  und  $K^+$  nach Ablauf eines Aktionspotentials wieder aufzubauen und das Ruhepotential wieder herzustellen, pumpt die  $Na^+/K^+$ -ATPase pro ATP-Molekül drei  $Na^+$ -Ionen nach außen und zwei  $K^+$ -Ionen nach innen. Das Aktionspotential wird von einer Zelle zur anderen weitergeleitet. Diese Übertragung findet an den Synapsen (Kontaktstellen zwischen Nerven-, Muskel- oder Sinneszellen) statt. Die prä- und postsynaptischen Zellen sind durch den synaptischen Spalt getrennt, der etwa  $20$ - $30$  nm breit ist (s. auch Abb. 1.3-2 im Detail). Bei den gut untersuchten chemischen Synapsen werden durch einen elektrischen Impuls sogenannte Neurotransmitter (Überträgermoleküle wie z. B. Acetylcholin oder Glutamat) freigesetzt. Dies geschieht, indem sich durch ein Aktionspotential ausgelöst  $Ca^{2+}$ -Kanäle in der Membran öffnen. Das in die Zelle einströmende  $Ca^{2+}$  bewirkt eine Wanderung von Vesikeln, die die Neurotransmitter enthalten, an die präsynaptische Membran und eine anschließende Ausschüttung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt (Betz & Angleson, 1998; Catterall, 2000). Die Neurotransmitter wandern an unterschiedliche Rezeptoren in der Membran der Zielzelle, wodurch spezifische Ionenkanäle geöffnet werden, die eine Änderung des Membranpotentials bewirken, und somit das Aktionspotential in der postsynaptischen Zelle ausgelöst werden kann.

### **1.3.2 Familiäre hemiplegische Migräne und andere mit der $\alpha$ -Untereinheit assoziierte Erkrankungen**

Da die Stoffwechselprozesse bei der synaptischen Signalübertragung genau aufeinander abgestimmt sind, haben Störungen z. B. durch Mutationen in den beteiligten Transportproteinen teilweise dramatische Auswirkungen für die Zellen des zentralen Nervensystems und damit auch für den Organismus. Wenn die Erregungsleitung betroffen ist, kann dies u. a. zu neurologischen Erkrankungen führen wie Migräne, Epilepsie oder der Parkinsonschen Krankheit.

Migräne ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen weltweit, die zwischen 10-15 % der Bevölkerung betrifft, und ist mit großem Leid für die Betroffenen und hohen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden (Neubauer & Ujlaky, 2002). Die Migräne wird durch die Kriterien der Internationalen Kopfschmergesellschaft (IHS) in unterschiedliche Subformen unterteilt (IHS, 2004). Vor allem wird zwischen Migräne mit Aura (MA) oder ohne Aura (MO) unterschieden. Etwa 30 % der Migränepatienten erleiden eine Auraphase. Darunter versteht man eine ganze Reihe verschiedener motorischer Störungen oder Sinnesstörungen. Ein Migräne-Anfall kann aus vier unterschiedlichen Phasen bestehen (Silberstein, 2004). Bei 20-60 % der Patienten kündigt sich der Anfall bereits Stunden oder auch Tage vorher an (Vorbotenphase) durch Symptome wie Müdigkeit, Konzentrationsmangel, Störungen des Magen-Darm-Trakts, Heißhunger oder einem steifen Nacken. Die Auraphase geht dem eigentlichen Kopfschmerz voraus und kann z. B. aus visuellen Störungen, Lähmungserscheinungen oder Kribbeln einzelner Gliedmaßen, Schwindel bis hin zu Lichtempfindlichkeit oder Sprachstörungen bestehen. In der folgenden Kopfschmerzphase leidet der Patient unter einem meist halbseitigen, pulsierenden Kopfschmerz, der anfallartig periodisch wiederkehrt. Dies kann mit Übelkeit und Erbrechen einhergehen. Jede einzelne dieser drei Phasen kann, muss aber nicht bei allen Patienten auftreten. In der Rückbildungsphase regeneriert sich der Körper.

Die meisten Migräne-Formen können zwar familiär gehäuft vorkommen, da die Anlage zur Ausbildung einer Migräne (genetische Disposition) vererbt wird, der Ausbruch einer Migräne hängt aber von vielen weiteren Faktoren ab (Russell et al., 1995; Gervil et al., 1999; Ulrich et al., 1999). Daher gilt die Migräne nicht als direkte Erbkrankheit im engeren Sinne. Es gibt aber inzwischen Hinweise auf Gene, die eine Rolle bei der MA spielen könnten (Lafrenière et al., 2010). Eine seltene, häufig schwer verlaufende Sonderform der MA ist die familiäre hemiplegische Migräne (FHM), die als einzige Migräne-Form als Erbkrankheit klassifiziert ist, da diese Erkrankung durch Mutationen in jeweils einem einzigen Gen verursacht wird. Sie wird autosomal-dominant vererbt, was bedeutet, dass Nachkommen mit 50%iger Wahrscheinlichkeit von der Krankheit betroffen sind. Diese Migräne-Form ist geschlechtsunabhängig, was für die klassische Migräne nicht gilt, da Frauen dreimal häufiger erkranken als Männer. Für die Diagnose einer FHM müssen drei Kriterien erfüllt sein: es muss mindestens einen weiteren betroffenen Verwandten 1. oder 2. Grades geben und in der Auraphase muss es zu einer halbseitigen Lähmung („Hemiplegie“) sowie zu einem weiteren Aurasymptom kommen. Die Auraphase verläuft teilweise schwer mit Komplikationen wie Fieber, Bewusstseinsstörungen (bis hin zum Koma) oder epileptischen Anfällen.

Neben der familiären HM sind auch Fälle von sporadischer hemiplegischer Migräne (SHM) bekannt, die sich in ihrer Symptomatik nicht von der FHM unterscheidet, allerdings mit dem Unterschied, dass es sich um eine spontan auftretende Mutation handelt und somit weitere Verwandte nicht zwangsläufig betroffen sein müssen.

Es gibt mehrere Gene, durch deren Mutation eine FHM ausgelöst wird. Bisher sind drei Gene eindeutig identifiziert, die für einen Großteil, aber noch nicht alle FHM-Fälle verantwortlich sind. Bei 50 % aller von FHM betroffenen Familien befinden sich Mutationen im CACNA1A-Gen, das für die  $\alpha_1$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten neuronalen  $\text{Ca}_v2.1$  Kalziumkanals kodiert. CACNA1A wird in den für Migräne relevanten prä- und postsynaptischen Nervenzellen exprimiert (Abb. 1.3-2). Bei Mutation dieses Gens handelt es sich um eine FHM des Typs 1 (Ophoff et al., 1996; Ducros et al., 2001). Ca. 10-20 % der Familien leiden an einer FHM des Typs 2, bei der das ATP1A2-Gen mutiert ist, welches für die  $\alpha_2$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase kodiert, die vor allem in Gliazellen wie z. B. Astrozyten<sup>5</sup> exprimiert wird (in Neuronen wird häufig die  $\alpha_3$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase exprimiert). In diesem Gen wurden bereits weit über 50 FHM- oder auch SHM-relevante Mutationen nachgewiesen (De Fusco et al., 2003; Jurkat-Rott et al., 2004; Morth et al., 2009; Riant et al., 2010). Bei der FHM des Typs 3 treten Mutationen in dem für den spannungsgesteuerten neuronalen Natriumkanal ( $\text{Na}_v1.1$ ) kodierenden SCN1A-Gen auf, welches auch bei bestimmten Epilepsieformen involviert ist (Claes et al., 2001; Dichgans et al., 2005).  $\text{Na}_v1.1$ -Kanäle werden vor allem in den inhibitorischen Interneuronen exprimiert, die Aktionspotentiale initiieren und weiterleiten. SHM-Erkrankungen korrelieren weniger häufig mit den bisher bekannten drei Genen. 2010 wurden Ergebnisse zu einem Jungen mit hemiplegischer Migräne präsentiert, bei dem eine Mutation im SLC1A3-Gen identifiziert wurde (2nd European Headache and Migraine Trust International Congress (Freilinger et al., 2010; Russell & Ducros, 2011)). Dieses Gen kodiert für den glialen Glutamat-Transporter EAAT1, und als Folge der Mutation ergab sich in einem Zell-Assay eine verringerte Glutamataufnahme. Die genetische Heterogenität ist bei FHM noch größer, denn bei einer relevanten Anzahl von FHM-Erkrankten konnte bisher keines der bekannten Gene als ursächlich identifiziert werden (Ducros et al., 1997; Thomsen et al., 2007). Es gibt inzwischen aber verdichtete Hinweise auf das PRRT2-Gen (Prolinreiches Transmembranprotein 2), das auch bei bestimmten Epilepsie-Formen (Benigne familiäre infantile Krampfanfälle, BFIC) oder einer Form der bewegungsinduzierten Bewegungsstörung PKD (Paroxysmale Kinesiogene Dyskinesie) involviert ist (de Vries et al., 2012; Riant et al., 2012). Die FHM korreliert mitunter auch mit BFIC, aber auch mit anderen Epilepsie-Formen, die im direkten Zusammenhang mit dem ATP1A2-Gen stehen (Cevoli et al., 2002; Vanmolkot et al., 2003).

Die SHM und die FHM2 mit Mutationen im ATP1A2-Gen sind nicht die einzigen Erkrankungen, die mit die  $\alpha$ -Untereinheit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase assoziiert sind. Auch das ATP1A3-Gen ( $\alpha_3$ -UE) wird im Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen genannt. Bei Patienten, bei denen die Alternierende Hemiplegie des Kindesalters (AHC) diagnostiziert wurde, einer seltenen neurologischen Störung mit ungünstiger Prognose (irreversibler Entwicklungsrückstand und kognitive Einschränkungen), konnten Mutationen in der  $\alpha_3$ -UE festgestellt werden (Aminkeng, 2012; Heinzen et al., 2012).

<sup>5</sup> Astrozyten: Gliazellen im Gehirn, die stern- bzw. spinnenförmig sind. Ihre Zellfortsätze bedecken die Oberfläche von benachbarten Neuronen. Sie sind strukturell und funktionell wichtig für den Gehirnstoffwechsel.

Interessanterweise kann auch diese Erkrankung mit der FHM oder SHM korrelieren, allerdings nicht in der Mehrzahl der Fälle. So wurden auch Mutationen im ATP1A2- und im CACNA1A-Gen als Hinweis auf eine gemeinsame Pathogenese gefunden (Bassi et al., 2004; Swoboda et al., 2004; de Vries et al., 2008). Eine weitere in diesem Zusammenhang zu erwähnende Krankheit ist das Dystonie-Parkinson-Syndrom (*Rapid-Onset Dystonia-Parkinsonism*, RDP, neuere Bezeichnung DYT12), das durch Symptome wie Spasmen der Extremitäten, Muskelstarre, Haltungsinstabilität, Schluck- und Sprechbeschwerden und verlangsamte Bewegungen gekennzeichnet ist. Auch bei diesen Patienten wurden Mutationen im ATP1A3-Gen identifiziert (Blanco-Arias et al., 2009; Brashear et al., 2012).

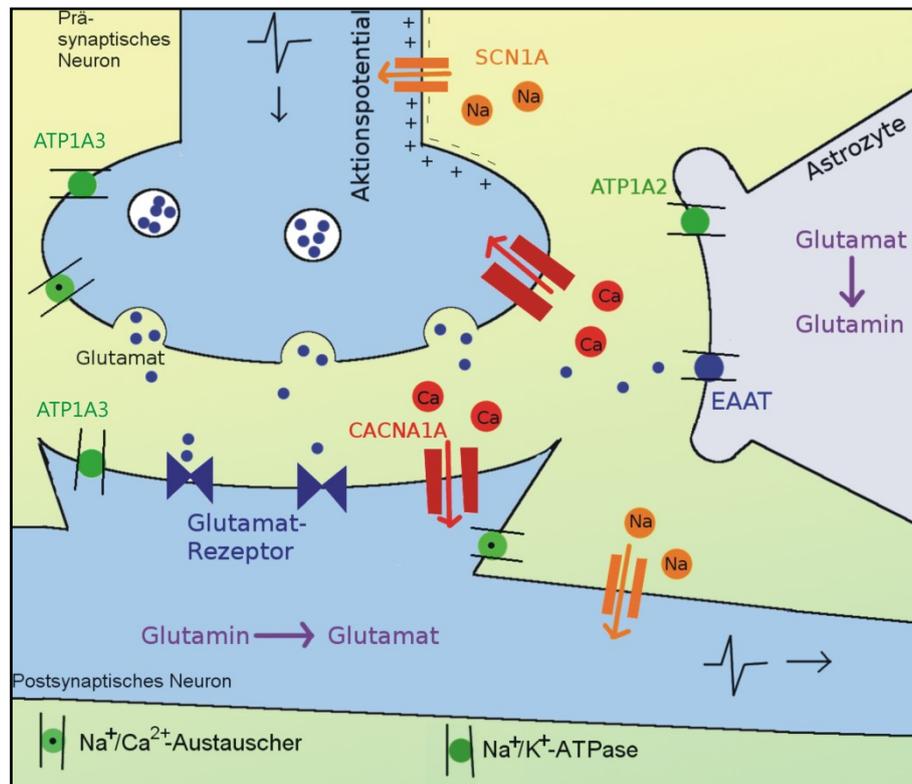
### 1.3.3 Physiologische Konsequenzen der Funktionsstörungen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Erforschung von Struktur-Funktionsbeziehungen der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, und es wurden ausschließlich Mutationen des ATP1A2-Gens untersucht (vor allem FHM2- oder SHM-Mutationen). Wenn die Funktion der glialen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Mutation verändert ist, kann das weitreichende Konsequenzen für die Erregbarkeit von Nervenzellen haben, was wie zuvor beschrieben zu teilweise schweren neurologischen Erkrankungen führen kann. Vor diesem Hintergrund wird im Folgenden im Detail auf die chemischen Abläufe am neuronalen synaptischen Spalt eingegangen (Abb. 1.3-2).

Ein wichtiger Neurotransmitter ist Glutamat, für den es mehrere Rezeptoren gibt. Unterschieden werden ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Metabotrope Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche durch Bindung von Glutamat ein nachgeschaltetes G-Protein (GTP-bindendes Protein) aktivieren und somit auf die Signaltransduktion durch Konzentrationsänderungen von Sekundärbotenstoffen einwirken (McCudden et al., 2005). Ionotrope Rezeptoren sind nicht-selektive Ionenkanäle, die durch Bindung von Glutamat geöffnet werden, was eine Veränderung der Membranleitfähigkeit und durch Ströme verschiedener Ionensorten somit auch eine Veränderung des Membranpotentials bewirkt. Dazu gehören AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren. Diese Glutamatrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung (Dingledine et al., 1999; Danbolt, 2001).

Der  $\text{Na}^+$ -Gradient, der durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrecht erhalten wird, wird von Glutamattransportern EAAT („excitatory amino acid transporter“) in Astrozytenzellen benötigt, um Glutamat, das während der Erregung von Nervenzellen aus präsynaptischen Vesikeln freigesetzt wird, aus dem synaptischen Spalt abzutransportieren (Moskowitz et al., 2004). Die effiziente Aufnahme von extrazellulärem Glutamat ist eine der Hauptaufgaben von Astrozyten. Um ein Glutamat zu transportieren, werden drei  $\text{Na}^+$ -Ionen und ein Proton in die Zelle sowie ein  $\text{K}^+$ -Ion aus der Zelle geschleust (Kanner & Schuldiner, 1987; Anderson & Swanson, 2000). Der daraus resultierende Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration wird durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (aber auch durch den Natrium-Bikarbonat-Kotransporter) reguliert (Deitmer & Schneider, 2000). In Astrozyten wird Glutamat durch eine Glutamin-Synthetase in Glutamin umgewandelt und extrazellulär aus der Zelle entlassen (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979; Magistretti & Ransom, 2002). Die Neuronen nehmen das Glutamin auf, welches in einer durch die phosphatabhängige Glutaminase katalysierten Reaktion in Glutamat umgewandelt wird (Hassel et al., 2003). Ist dieser Abtransport von Glutamat

gestört, z. B. indirekt, wenn die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in ihrer Funktion eingeschränkt ist, so reichert sich Glutamat in den Synapsen an, was neurotoxisch ist (Olney, 1969; Choi, 1992). Vermittelt wird diese Exzitotoxizität hauptsächlich durch NMDA-Rezeptoren (Hazell, 2007). Allerdings sind die Abläufe, die zum Zelltod führen, unterschiedlich und komplex (Schubert & Piasecki, 2001; O'Shea, 2002).



**Abb. 1.3-2: Schematische Darstellung eines neuronalen synaptischen Spalts.**

Gezeigt sind die chemischen Abläufe in einem synaptischen Spalt während der Übertragung der Depolarisation von der präsynaptischen Nervenzelle auf die postsynaptische Nervenzelle (s. detaillierte Beschreibung im Text). Bei Ankunft eines Aktionspotentials öffnen sich  $\text{Na}^+$ - (orange) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (rot). Neurotransmitter wie Glutamat (blau) werden aus den präsynaptischen Vesikeln freigesetzt und von Rezeptoren in der postsynaptischen Zellmembran gebunden. Der Glutamattransporter EAAT nimmt Glutamat aus dem synaptischen Spalt in die Astrozyten auf. Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sorgen extra- und intrazellulär für die Regulierung der Ionenkonzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ . Nicht dargestellt sind die für die Erregungsleitung wichtigen  $\text{K}^+$ -Kanäle. Die Gene, in denen FHM-Mutationen (SCN1A, ATP1A2 und CACNA1A) und RDP- bzw. AHC-Mutationen (ATP1A3) nachgewiesen sind, wurden extra gekennzeichnet.

Wie oben beschrieben nutzt auch der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), der bidirektional drei  $\text{Na}^+$ -Ionen gegen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion transportiert, den  $\text{Na}^+$ -Gradienten (Török, 2007). Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wirkt unter anderem regulatorisch auf die Ausschüttung von exzitatorischem Glutamat aus den Vesikeln. Wenn sich  $\text{Ca}^{2+}$  vermehrt im Zellinneren anreichert, kann das zur vermehrten Ausschüttung von Glutamat führen. Kommt es dann zu einem Überschuss an Glutamat im synaptischen Spalt, führt dies zu einer erhöhten Erregbarkeit der Nervenzelle bis hin zum Zelltod (wie oben erläutert). Eine Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase durch einen Funktionsverlust der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase kann Auslöser vieler Erkrankungen sein, nicht nur in Neuronen, sondern auch in Muskelzellen (Missiaen et al., 2000). So zeigte eine Studie, dass durch die Inhibition der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit Ouabain die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in pulmonalen Muskelzellen anstieg, was zu einer Lungen-Hypertonie führte (Ghosh et al., 2009).

Als Konsequenz einer Hyperexzitabilität kann die Entstehung der sogenannten kortikalen Streudepolarisation (CSD, engl.: *cortical spreading depression*) gefördert werden, welche als ursächlicher Mechanismus einer Migräne-Aura diskutiert wird (Lauritzen et al., 2010). Die CSD ist eine sich in der grauen Substanz des Hirns (an der kortikalen Oberfläche beginnend) mit einer Geschwindigkeit von ca. 2-5 mm/min ausbreitende Depolarisationswelle (Leão, 1944). Die Pathologie der CSD beruht auf einer erhöhten Erregbarkeit der kortikalen Neuronen, wie es bei Migräne-Patienten angenommen wird (Schoenen et al., 2003). Dabei spielen für die Depolarisation und ihrer Ausbreitung sowohl einwärtsgerichtete  $\text{Na}^+$ -Ströme als auch durch NMDA-Rezeptoren kontrollierte Ströme eine wichtige Rolle (Somjen, 2001).

Die neuronale Depolarisation verursacht und geht einher mit einem Abfall der kortikalen Aktivität, einer Störung der Ionen-Homöostase und einer erhöhten Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren durch Nervenzellen, sowie einem höherem Sauerstoff-, Glykogen- und Glukosebedarf und einem Anstieg des zerebralen Blutflusses (ZBF). Während der CSD erhöht sich die extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration, wohingegen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ ,  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  und  $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$  deutlich reduziert sind. Gleichzeitig sinkt der pH-Wert um 0,4 Einheiten und der Extrazellularraum verkleinert sich auf die Hälfte aufgrund von Wasserwanderung in die Neuronen, was zu deren Anschwellen führt.

Nach der CSD-Welle reduziert sich der ZBF um 20-30 %. Auch ist die neurovaskuläre Kopplung (also der Mechanismus zur Regulierung der zerebralen Blutversorgung) gestört und die zerebrale Sauerstoff-Extraktion für über zwei Stunden erhöht, da die Wiederherstellung der Ionengradienten sehr viel Energie erfordert. Nach der Attacke normalisiert sich aber die Funktion des Kortex'.

Wie genau eine CSD entsteht ist noch nicht bis Detail geklärt, aber eine erhöhte  $\text{K}^+$ - und Transmitter-Konzentration triggern die Ausbreitung der CSD. Zusätzlich führt eine Depolarisation der Nervenmembran zur Öffnung der NMDA-Rezeptoren, die sehr affin für geringe Glutamatkonzentrationen sind, was wiederum eine zusätzliche  $\text{K}^+$ - und Glutamatfreisetzung auslöst und zu weiterer Depolarisation der benachbarten Nervenzellen führt.

Diese komplexen, fein aufeinander abgestimmten Vorgänge in der Erregungsleitung zeigen deutlich, wie wichtig die korrekte Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist und welche teils dramatischen Konsequenzen Mutationen in diesem Protein haben können.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Obwohl die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine der meistuntersuchten P-Typ-ATPasen ist, sind viele Fragen in mechanistischer sowie struktureller Hinsicht noch nicht geklärt. Es ist aber von höchstem Interesse die Funktionsweise dieses für den Organismus wichtigen Enzyms auf der Grundlage der verfügbaren Molekülstrukturen aufzuklären, da es auch in der Entstehung von Krankheiten involviert ist. Ein neurologisches Krankheitsbild, das auf Gendefekte der  $\alpha_2$ -Isoform zurückzuführen ist, ist die familiäre (und auch sporadische) hemiplegische Migräne (Abschnitt 1.3.2). Einige dieser Mutationen befinden sich in strukturellen Bereichen, die für die Funktion mutmaßlich essentiell sind. Dazu gehören Interaktionsstellen mit der  $\beta$ -Untereinheit (Abb. 1.1-3), aber auch der C-terminale Bereich (Abb. 1.1-5 und Abb. 1.2-4).

Die Wechselwirkungen mit der  $\beta$ -UE finden am Transmembransegment M7 statt. In direktem Kontakt mit der  $\beta$ -UE befindet sich Gly855, an dem bereits mehrere FHM-Mutationen gefunden wurden, und zwar G855R und G855V (de Vries et al., 2009; Riant et al., 2010). Es ist zu erwarten, dass die FHM-Mutation G855R durch das Einfügen einer langen, positiv geladenen Seitenkette große funktionelle Störungen verursachen könnte, die sich möglicherweise in elektrophysiologischen Experimenten nachweisen ließen. Des Weiteren sind die FHM-Mutationen G900R und K902E bekannt, die sich im Bereich des hochkonservierten SYGQ-Motivs befinden, das mutmaßlich eine Interaktionsstelle mit der  $\beta$ -Ektodomäne ist (Jurkat-Rott et al., 2004; Deprez et al., 2007). Auch diese Mutationen sind dazu geeignet, die Funktionsweise des Enzyms erheblich zu stören, wobei sich eine Störung der  $\alpha/\beta$ -Wechselwirkung bereits auf der Ebene der Proteinfaltung oder -stabilität auswirken könnte. Es soll also in dieser Arbeit geklärt werden, inwieweit Mutationen der genannten Aminosäurereste die Wechselwirkung mit der  $\beta$ -UE stören.

Der größere Fokus dieser Arbeit liegt aber in der Aufklärung der strukturellen Funktion des C-Terminus<sup>4</sup>, über die bisher noch wenig bekannt ist (Abschnitt 1.1.3). Es ist zu vermuten, dass der hochkonservierte C-Terminus maßgeblich am Ionentransport beteiligt ist, da C-terminale Mutationen eine erhebliche Verringerung der  $\text{Na}^+$ -Affinität zur Folge hatten (Morth et al., 2007). Dabei ist vor allem die Frage von Interesse, wie der C-Terminus den intrazellulären Zugang zur dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle für Protonen reguliert, denn es ist bisher nicht bekannt, wie er sich beispielsweise in der  $E_1$ -Konformation ausrichtet. Die beiden C-terminalen Tyrosine befinden sich am Ende einer Kavität, die sich von der intrazellulären Seite bis zu Asp930 erstreckt, welches sich in der Nähe der dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle befindet (Abb. 1.1-5 und Abb. 1.2-4). Um die C-terminalen Wechselwirkungen aufzuklären, soll vor allem die Rolle der beiden Tyrosine Tyr1019 und Tyr1020 anhand der  $\Delta\text{YY}$ -Mutante, in der beide Reste deletiert sind, untersucht werden.

In dieser zuvor genannten Kavität liegen auch die Reste Arg937, Asp999 und Arg1002, die mit den C-terminalen Tyrosinen interagieren können, und zwar durch Wasserstoffbrückenbindungen oder auch Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen (Abb. 1.1-5). Bei diesen Resten wurde ebenso vermutet, dass sie zusammen mit den Resten an Position 1007-1009 Teil eines C-terminalen Arginin-Clusters sind, dem eine mögliche Funktion bei der Spannungssensitivität des Ionentransports zugesprochen wurde (Morth et al., 2007).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass der C-Terminus und auch die Reste in der C-terminalen Kavität sehr wichtig für die Funktion der  $\alpha$ -UE sein könnten, ist, dass genau an diesen Positionen FHM- oder SHM-Mutationen nachgewiesen wurden: R937P (FHM), D999H (FHM), R1002Q (FHM) und die um die letzten 12 Aminosäurereste verkürzte SHM-Mutation Y1009X, bei der der gesamte C-Terminus fehlt (Riant et al., 2005; Jen et al., 2007; Fernandez et al., 2008; Gallanti et al., 2008). Es stellt sich die Frage, ob all diese Mutationen die Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in gleicher Weise beeinträchtigen und ob es einen ähnlichen physiologischen Mechanismus gibt, der die Ausbildung einer hemiplegischen Migräne begünstigt. Das R937P-Konstrukt ist bereits elektrophysiologisch untersucht worden und zeigte dramatische Funktionseinschränkungen (Tavraz et al., 2008; Poulsen et al., 2010). Die Mutation dieses Arginins in ein Alanin bewirkte eine reduzierte Affinität des Enzyms für extrazelluläres und intrazelluläres  $\text{Na}^+$ , sodass vermutet wurde, dass Arg937 eine wichtige strukturelle Verbindung zwischen dem C-Terminus und der dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle herstellt (Toustrup-Jensen et al., 2009). Aufgrund dieser strategisch interessanten Position von Arg937 (Abb. 1.1-5) wird der Frage nachgegangen, wie sich der Austausch dieses Rests durch einen polaren (R937S) oder durch einen unpolaren Rest (R937L) auswirkt.

Des Weiteren identifizierte die Arbeitsgruppe von Dr. Dario Pruna (Universitätsklinik von Cagliari, Italien) und Dr. Tiziana Pisano (Meyer-Kinderkrankenhaus der Universität in Florenz, Italien) bei Patienten, die an FHM und Epilepsie leiden, im ATP1A2-Gen die Mutation R1007W (bislang unveröffentlichte Daten). Dieser Zusammenhang wirft die Frage auf, ob es einen ähnlichen pathogenen Mechanismus zwischen Migräne und Epilepsie gibt. Außerdem liegt Arg1007 in dem vermuteten C-terminalen Arginin-Cluster (s. oben), weswegen eine Untersuchung der Mutation R1007W von Interesse ist. Zusätzlich zu den genannten HM-Mutationen, gibt es weitere Mutationen im C-Terminus bzw. in M10, die in dieser Arbeit funktionell charakterisiert werden sollen, um weitere Erkenntnisse über eventuell strukturell wichtige Elemente in diesem Bereich zu erlangen: L994del (Deletion des Leu994) und K1003E (Riant et al., 2010).

Elektrophysiologische Methoden eignen sich gut, um strukturelle und mechanistische Details im Reaktionszyklus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufzuklären, vor allem im Hinblick auf den Kationentransport. Ziel dieser Arbeit ist es also mithilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik an Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs ein tieferes Verständnis für die Rolle, die der C-Terminus bei der  $\text{Na}^+$ -Bindung und auch bei der Bildung eines intrazellulären Zugangs für  $\text{Na}^+$  und Protonen spielt, zu entwickeln und bessere Kenntnisse über die Interaktionen zwischen der  $\beta$ - und der  $\alpha$ -Untereinheit zu erlangen. Auch gilt es, funktionelle Mechanismen, die zur Ausbildung einer hemiplegischen Migräne führen, besser zu charakterisieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Medien und Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden bis auf Ausnahmen von den Firmen Aldrich, Ambion, Fermentas, Fluka, Merck, Roth und Sigma bezogen.

#### Medien und Puffer

|                |                        |  |
|----------------|------------------------|--|
| Western Blot   | Blotting Puffer (1 L)  | 5,8 g Tris (48 mM)<br>2,9 g Glycin (39 mM)<br>3,75 ml SDS (10 %)<br>200 ml MeOH  |
|                | PBST (1 L)<br>(pH 7,4) | 8 g NaCl<br>0,2 g KCl<br>1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>0,1% Tween <sup>®</sup> 20   |
| SDS-PAGE       | Trenngel               | 6,7 ml Bis-/Acrylamid (30 %)<br>7,9 ml H <sub>2</sub> O<br>5,0 ml TRIS pH 8,8 (1,5 M)<br>0,2 ml SDS (10 %)<br>0,2 ml APS (10 %)<br>0,02 ml TEMED                                   |
|                | Sammelgel              | 1,7 ml Bis-/Acrylamid (30 %)<br>6,8 ml H <sub>2</sub> O<br>1,25 ml TRIS pH 6,8 (1 M)<br>0,1 ml SDS (10 %)<br>0,1 ml APS (10 %)<br>0,01 ml TEMED                                    |
|                | Laufpuffer (1 L)       | 3 g Tris<br>14,4 g Glycin<br>10 ml SDS (10 %)  |
| PM-Präparation | MBSS                   | 20 mM MES<br>80 mM NaCl<br>pH 6,0  |
|                | MBS                    | 0,33 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>0,41 mM CaCl <sub>2</sub><br>88 mM NaCl<br>1 mM KCl<br>2,4 mM NaHCO <sub>3</sub><br>10 mM HEPES (pH 7,5)<br>0,82 mM MgSO <sub>4</sub> |
|                | HbA                    | 20 mM Tris (pH 7,4)<br>5mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O<br>5mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O<br>1 mM EDTA<br>80 mM Sucrose                            |

## Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Medien und Chemikalien

|  |  |   |
|--|--|---|
| Lösungen für<br>elektrophysiologische<br>Messungen | ORI + Ca <sup>2+</sup><br>(pH 7,5-7,6) | 110 mM NaCl<br>5 mM KCl<br>1 mM MgCl <sub>2</sub><br>2 mM CaCl <sub>2</sub><br>5 mM HEPES<br>mit NaOH   |
|  | ORI - Ca <sup>2+</sup><br>(pH 7,5-7,6) | 110 mM NaCl<br>5 mM KCl<br>1 mM MgCl <sub>2</sub><br>5 mM HEPES   |
|  | Na <sup>+</sup> -Puffer<br>(pH 7,4)    | 100 mM NaCl<br>1 mM CaCl <sub>2</sub><br>5 mM BaCl <sub>2</sub><br>5 mM NiCl <sub>2</sub> ersatzweise 2mM MgCl <sub>2</sub><br>2,5 mM MOPS<br>2,5 mM Tris<br>10 µM Ouabain    |
|  | Na <sup>+</sup> -Ladelösung            | 110 mM NaCl<br>2,5 mM Na <sup>+</sup> -Citrat<br>2,5 mM MOPS<br>2,5 mM Tris<br>pH 7,4   |
|  | Na <sup>+</sup> -Puffer (pH 5,5)       | 100 mM NaCl<br>1 mM CaCl <sub>2</sub><br>5 mM BaCl <sub>2</sub><br>5 mM NiCl <sub>2</sub> ersatzweise 2mM MgCl <sub>2</sub><br>5 mM MES<br>10 µM Ouabain                      |
|  | NMDG <sup>+</sup> -Puffer<br>(pH 7,4)  | 100 mM NMDG-Cl<br>1 mM CaCl <sub>2</sub><br>5 mM BaCl <sub>2</sub><br>5 mM NiCl <sub>2</sub> ersatzweise 2mM MgCl <sub>2</sub><br>2,5 mM MOPS<br>2,5 mM Tris<br>10 µM Ouabain |
|  | NMDG <sup>+</sup> -Puffer<br>(pH 5,5)  | 100 mM NMDG-Cl<br>1 mM CaCl <sub>2</sub><br>5 mM BaCl <sub>2</sub><br>5 mM NiCl <sub>2</sub> ersatzweise 2mM MgCl <sub>2</sub><br>5 mM MES<br>10 µM Ouabain                   |
|  | Li <sup>+</sup> -Puffer<br>(pH 7,4)    | 100 mM LiCl<br>1 mM CaCl <sub>2</sub><br>5 mM BaCl <sub>2</sub><br>5 mM NiCl <sub>2</sub><br>2,5 mM MOPS<br>2,5 mM Tris<br>10 µM Ouabain                                      |

### 3-dimensionale Kristallstrukturdarstellungen

Strukturdarstellungen wurden mit der Software PyMOL (Schrödinger, Inc.) adaptiert. Die Strukturen basieren auf den PDB-Dateien 3B8E ( $\alpha_1$ -UE der Schweine-Niere) und 3A3Y bzw. 2ZXE ( $\alpha$ -UE der Rektaldrüse des Dornhais).

## 2.2 Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

### 2.2.1 Herstellung mutierter cDNA und cRNA

Die cDNA der  $\alpha_2$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit (UE) der humanen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wurde in den modifizierten Expressionsvektor pCDNA3.1 subkloniert (Koenderink et al., 2005). Um bei den Messungen die endogene *Xenopus*- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase von der heterolog exprimierten humanen  $\alpha_2$ -ATPase zu unterscheiden, wurden die Mutationen Q116R und N127D eingeführt (Price & Lingrel, 1988). Diese Sequenzvarianten existieren natürlicherweise in der  $\alpha_1$ -UE der Ratte, die damit im Vergleich zu anderen Spezies-Isoformen deutlich unempfindlicher gegenüber Ouabain ist. Auf diese Weise wird die Ouabainsensitivität des Proteins stark reduziert, sodass die mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) dann im mM-Bereich lag. Dieses Konstrukt wird im Folgenden als Wildtyp (WT) bezeichnet. Die Mutagenese wurde mit dem QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt, das eine einfache und präzise Einführung einer zielgerichteten Mutation in ein Plasmid ermöglicht. Bei der QuikChange®-Methode wird von zwei gegenläufigen mutagenen Oligonukleotid-Primern ausgehend mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) das gesamte Plasmid amplifiziert. Im Anschluss an die PCR wurde das Produkt mit der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut, die spezifisch methylierte DNA-Sequenzen erkennt und somit nur die ursprünglich als Matrize dienende Vektor-DNA schneidet, nicht jedoch die per PCR erzeugte.

Es wurden chemisch kompetente Zellen des Bakterienstammes *E. coli* (XL10-Gold®-ultrakompetente Zellen, Stratagene) mittels der mutierten DNA transformiert und anschließend in Gegenwart eines Antibiotikums als Selektionsmarker kultiviert. Die Isolierung der DNA erfolgte entweder mit dem peqGold Plasmid MiniPrep Kit II (PepLab) oder mit dem JETSTAR Plasmid Kit (GENOMED). Nach erfolgreicher Sequenzierung durch Eurofins MWG Operon (Deutschland) diente die mutierte Plasmid-DNA als Ausgangsmatrize für die cRNA-Synthese. Dazu wurde die Plasmid-DNA in 3'-Richtung hinter der cDNA-Sequenz mit der Restriktionsendonuklease XbaI linearisiert. Die Transkription zu RNA erfolgte mit der T7-RNA-Polymerase (T7 mMessage mMachine Kit, Ambion), da der verwendete pCDNA3.1-Vektor einen T7-Promoter enthält.

### 2.2.2 Plasmamembran- und Totalmembranpräparation

Eine Plasmamembranpräparation wurde durchgeführt, um die Proteine spezifisch aus der Plasmamembran der *Xenopus*-Oozyten zu isolieren (Abschnitt 2.3.2) und so z. B. die zelluläre Zielsteuerung eines Proteins zu untersuchen. Methodisch beruht die Plasmamembranisolation auf der im Allgemeinen negativen Oberflächenladung biologischer Membranen, sodass positiv geladene Silikakügelchen (engl. *beads*) an die Plasmamembran intakter Zellen gebunden werden können, um danach Plasmamembranfragmente durch einfache Zentrifugation von intrazellulären Membrananteilen und vom Zellysats trennen zu können (Kamsteeg & Deen, 2000).

Pro Konstrukt wurden 8-12 intakte Oozyten in MBSS-Puffer mit 1 % kolloidalen Silikakügelchen (Ludox®, Aldrich) für 30 min bei 4°C langsam rotiert (Rotator 34528E, Snijders) und anschließend zweimal mit MBSS gewaschen. Um die noch freien positiv geladenen Oberflächenabschnitte der membrangebundenen Silikakügelchen zu neutralisieren, wurden die Oozyten in 0,1%iger Polyacrylsäure in MBSS 30 min bei 4°C rotiert und anschließend zweimal mit einer modifizierten Barth-Lösung (MBS) gewaschen. Die Oozyten eines Konstrukts wurden in jeweils 1,5 ml HbA-Lösung, die einen Protease-Inhibitor (Complete®, Roche) enthielt, homogenisiert und bei 10 g und 4°C für 30 s zentrifugiert. 1300 µl wurden dem Überstand für die Totalmembranpräparation entnommen. Es wurden dann jeweils 1000 µl HbA den Plasmamembranproben dazugegeben, für 30 s zentrifugiert und 1000 µl des Überstandes verworfen. Dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt, wobei nacheinander bei 10 g, 20 g und 40 g zentrifugiert wurde. Die Proben für die Totalmembranpräparation (Überstand nach der ersten Zentrifugation) wurden 3 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Abschließend wurden die Proben der Plasma- und der Totalmembranpräparation für 30 min bei 4°C und 16000 g zentrifugiert und die Pellets in Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) resuspendiert (4 µl pro Oozyte).

### 2.2.3 Western Blot

Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden jeweils 8 µl (entsprechend zwei Oozyten) der Proben und zum Vergleich ein Gewichtsstandard (SeeBlue®Plus2, Invitrogen; Protein Marker V, AppliChem) aufgetragen - die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase hat eine Molmasse von ca. 110 kDa. Die Proteine wurden anschließend im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, welche in PBST mit 5 % Magermilchpulver mindestens 2 h bei 18°C gewaschen wurde. Anschließend ließ man die Proteine mit einem für die  $\alpha_2$ -UE der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase spezifischen Antikörper (Rabbit anti-sodium pump alpha 2 polyclonal antibody, AB9094, Chemicon), welcher 1:2000 in PBST mit 1 % Magermilchpulver gelöst war, für 12 h bei 18°C reagieren. Nach mehrmaligem Waschen mit PBST erfolgte die Behandlung (1 h bei 18°C) mit dem zweiten Antikörper (goat anti-rabbit, Dako), 1:10000 verdünnt in PBST mit 1 % Magermilchpulver, der an den ersten Antikörper bindet. An diesen Sekundär-Antikörper ist die Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die mit Lumineszenzreagentien (Roti®-Lumin, Roth) reagiert, und durch die Chemilumineszenzreaktion konnte das Antigen auf einem Röntgenfilm (Fuji, GE Healthcare, Japan) detektiert werden. Die Banden in den Western Blots wurden densitometrisch mit dem Programm ImageJ (Wayne Rasband, USA) quantifiziert.

## 2.3 *Xenopus laevis*

### 2.3.1 Einleitung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* verwendet, da sie als zelluläres Expressions- und Translationssystem für die Forschung im Bereich der Biophysik, Biochemie und Elektrophysiologie etabliert sind (Hilken et al., 1997). Bereits 1971 konnte gezeigt werden, dass Oozyten nach Mikroinjektion exogener mRNA Proteine exprimieren (Gurdon et al., 1971). Diese weitgehend undifferenzierten Zellen haben hohe Translationsraten, da sie über eine große Anzahl an Ribosomen verfügen. Aufgrund ihres Durchmessers von 1-1,3 mm eignen sie sich gut für elektrophysiologische Untersuchungen (Colman, 1984).



Abb. 2.3-1: Weibliches Tier des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* und Oozyten im Stadium V und VI (Dumont, 1972).

### 2.3.2 Oozytenpräparation

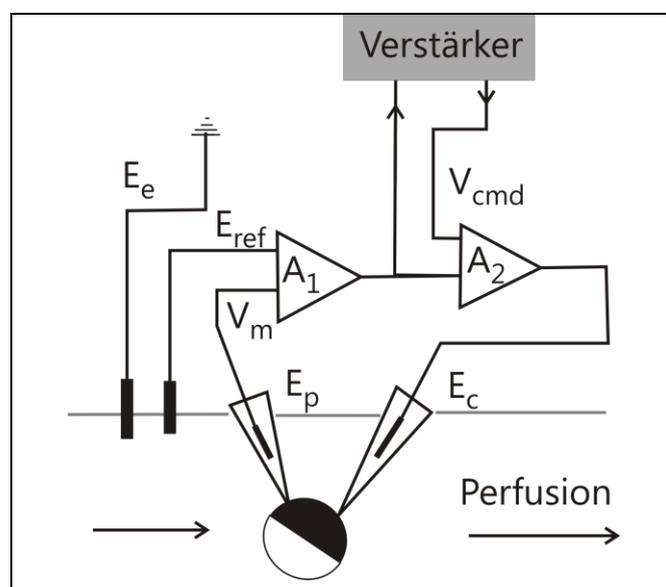
Die Oozyten des *Xenopus laevis* befinden sich in sackförmigen Gebilden, den sogenannten Mesovarien, im Bauchraum des Frosches. Für die Oozytenpräparation wurde ein Teil des Ovariengewebes unter Betäubung des Krallenfrosches mit 0,1%igem Tricain operativ entnommen. Um die Oozyten schonend zu isolieren, wurde das Ovar einem Kollagenase-Verdau in kalziumfreier ORI-Lösung mit 2 mg/ml Kollagenase und 10 mg/ml Trypsin-Inhibitor für 3-5 h bei 18°C unterzogen. Die Oozyten wurden anschließend mit ORI-Lösung gewaschen und in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen ORI-Lösung mit Zusatz von 50  $\mu\text{g/ml}$  Gentamycin bei 18 °C aufbewahrt.

In Oozyten der Stadien V und VI (Dumont, 1972) wurde ein Gemisch aus der cRNA der jeweiligen  $\alpha_2$ -Konstrukte (25 ng/Oozyte) und der humanen  $\beta_1$ -Untereinheit (2,5 ng/Oozyte) injiziert. Die Expressionszeit betrug drei Tage. Währenddessen wurden die Oozyten in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger ORI-Lösung mit Gentamycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) bei 18°C gelagert.

## 2.4 Elektrophysiologie

### 2.4.1 Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik

Zur Funktionsanalyse der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Mutanten wurde die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik (TEVC) angewendet. Das Prinzip wurde bereits von Hodgkin und Huxley zur Untersuchung der Erregbarkeit von Nervenzellen genutzt (Hodgkin et al., 1952). Durch diese Methode ist es möglich, die Messung des über eine Zellmembran fließenden Stroms und der Spannung voneinander zu entkoppeln und somit beide Parameter unabhängig voneinander kontrollieren und messen zu können. Mithilfe spezieller Spannungssprung-Protokolle können Informationen über die Kinetik oder über spannungsabhängige Schritte im Reaktionszyklus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erhalten werden. Die Messprinzip wurde von Finkel und Gage beschrieben (Finkel & Gage, 1985) und ist im Folgenden kurz erläutert (Abb. 2.4-1).



**Abb. 2.4-1: Schematische Darstellung der Messapparatur.**

mit der Potentialelektrode  $E_p$ , der Stromelektrode  $E_c$ , den Badelektroden  $E_{ref}$  und  $E_e$ , den Operationsverstärkern  $A_1$  und  $A_2$ , dem Membranpotential  $V_m$  und dem Haltepotential  $V_{cmd}$ .

Während der Messung befindet sich die Oozyte in einer Messkammer, die mit verschiedenen Lösungen perfundiert werden kann. Zwei Mikroelektroden, die Spannungselektrode  $E_p$  und die Stromelektrode  $E_c$  stehen mit dem Zellinnern in elektrischem Kontakt. Das Membranpotential  $V_m$  wird zunächst zwischen der Spannungselektrode  $E_p$  und einer Badelektrode, die Referenzelektrode  $E_{ref}$ , gemessen. Über die zweite Badelektrode ( $E_e$ ) ist das Bad geerdet.  $V_m$  wird von einem Operationsverstärker ( $A_1$ ), der an die Spannungselektrode gekoppelt ist, aufgezeichnet. Dieser Verstärker arbeitet als Spannungsfolger (das Ausgangssignal ist gleich dem negativen Eingangssignal). So kann das hochohmige Signal der Potentialelektrode von Geräten mit niederohmigen Eingang (z. B. Aufzeichnungsgeräte) entkoppelt werden. Außerdem kann der Eingangswiderstand der Potentialelektrode so erhöht werden, dass die über die Elektroden fließenden Ströme minimiert werden.  $V_m$  wird dann in einem negativen Rückkopplungsverstärker ( $A_2$ ) mit dem Halte- bzw. Klemmpotential  $V_{cmd}$  verglichen. Das Ausgangssignal von  $A_2$  ist proportional zur Differenz zwi-

schen  $V_m$  und  $V_{cmd}$ . Aus der Differenz dieser Signale ergibt sich der Strom  $I$ , der nötig ist, um das Haltepotential zu erreichen. Der Strom wird über die Stromelektrode  $E_c$  appliziert und fließt durch die Membran. Er entspricht dem Ionenstrom durch die Oozytenmembran mit dem Membranwiderstand  $R_m$  bei einem entsprechenden Haltepotential  $V_{cmd}$ . Ein negativer Strom entspricht der elektrophysiologischen Konvention einem Einstrom positiver Ionen in die Zelle.

### 2.4.2 Messverfahren

Für die Strommessungen in Abhängigkeit von der Spannung wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Dafür wurden aus Borsilikat-Glaskapillaren (GB150F-8P, Science Products) feine Pipetten mithilfe eines Pipettenziehgeräts (Puller, Model PC-10, Narishige) gezogen, mit 3 M KCl-Elektrolytlösung gefüllt und auf einem Elektrodenhalter fixiert, so dass die Ag/AgCl-Elektrode in die KCl-Elektrolytlösung tauchte. Diese Mikroelektroden wiesen Widerstände von 0,6-2,5 M $\Omega$  auf. Die extrazellulären Ag/AgCl-Badelektroden befanden sich in einer 3 M KCl-Lösung und waren über Agarbrücken mit der Messlösung verbunden. Die Messungen wurden unter Verwendung des Verstärkers Turbo TEC-10CX (NPI Electronics, Tamm) und des Computerprogramms pClamp9.2 (Axon Instruments/Molecular Devices, Union City, CA) durchgeführt. Die Signale wurden mit 1,0-1,3 kHz gefiltert und mit einer Abtastfrequenz von 10 kHz aufgezeichnet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm Clampfit 10.2 (Axon Instruments) und mit Origin 7.0 (OriginLab Corporation).

Bevor die Ströme der  $Na^+/K^+$ -ATPase elektrophysiologisch gemessen werden können, muss die intrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration der Oozyten erhöht werden (LaTona, 1990). Dazu wurden die Zellen für 45 min in eine  $Na^+$ -Ladelösung gegeben und anschließend in  $Na^+$ -Puffer (pH 7,4) für mindestens 30 min inkubiert. Für die Messung wurde die Oozyte in der Messkammer platziert, die mit  $Na^+$ -Puffer gefüllt war, und die Spannungs- und Stromelektrode eingestochen. Ausgehend von einem Haltepotential von -30 mV wurden verschiedene Spannungspulse (Dauer: 200 ms) zwischen +60 mV und -140 mV (in 20 mV-Schritten) angelegt, bevor wieder auf -30 mV geklemmt wurde (Abb. 2.4-2). Dieses Spannungssprung-Protokoll wurde in unterschiedlichen Lösungen angewendet. Es wurden nur Ströme an Oozyten gemessen, die beim Haltepotential von -30 mV dicht genug waren ( $0 \geq I > -100$  nA in  $Na^+$ -Puffer).

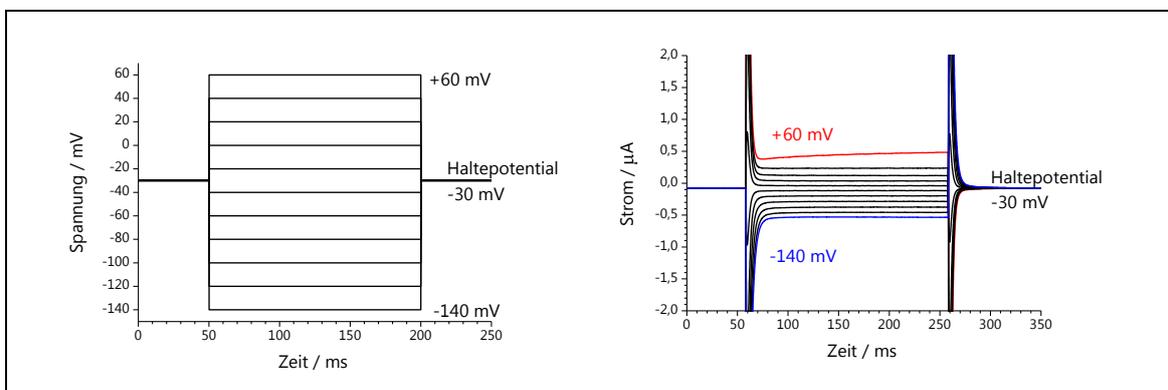


Abb. 2.4-2: Angewandtes Spannungssprung-Protokoll und exemplarisch die dazugehörige Stromantwort einer Oozyte.

### K<sup>+</sup>-induzierte stationäre Ströme

Unter K<sup>+</sup>-induzierten Strömen versteht man solche Ströme, die die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Abhängigkeit von der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration und dem angelegten Transmembranpotential vermittelt. Da diese bei einem genügend langen Potentialpuls eine stationäre Amplitude aufweisen, werden sie im Folgenden als „K<sup>+</sup>-induzierte stationäre Ströme“ bezeichnet. Diese stationären Stromamplituden der Oozyten wurden sowohl unter Na<sup>+</sup>-Einfluss, als auch unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen analysiert.

Die Ströme unter Na<sup>+</sup>-Einfluss wurden anhand der Differenz zweier Stromsignale bestimmt. Dabei wurde die Stromantwort, die die Oozyten in K<sup>+</sup>-freiem Na<sup>+</sup>-Puffer vermittelte von denen abgezogen, die in K<sup>+</sup>-haltigen Na<sup>+</sup>-Puffern gemessen wurde. Für diese Ströme wurde das Symbol <sup>Na</sup>I<sub>xK</sub> eingeführt, wobei der Index x die jeweils verwendete extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration angibt. Analog dazu erfolgten die Messungen unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen in NMDG<sup>+</sup>-Puffer, wobei auch hier die stationäre Stromamplitude der Oozyten, die in K<sup>+</sup>-freiem Puffer detektiert wurde, von denen in K<sup>+</sup>-haltigen Lösungen abgezogen wurde. Für diese Ströme gilt das Symbol <sup>0Na</sup>I<sub>xK</sub>.

### Ouabainsensitive Ströme

Abhängig von der extrazellulären Ouabainkonzentration kann entweder die Oozyten-endogene oder aber auch die heterolog exprimierte Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibiert werden. Zur Analyse der Pumpströme der heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mussten diese von den Strömen der endogenen Pumpe separiert werden. Durch die extrazelluläre Applikation von 10 μM Ouabain im jeweiligen Messpuffer wurde die endogene Pumpe inhibiert, ohne dass die heterolog exprimierte Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase funktionell eingeschränkt wurde. Daher enthielten alle Messlösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, eine Ouabainkonzentration von 10 μM.

Eine Inhibition der heterolog exprimierten Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wurde mit einer extrazellulären Ouabainkonzentration von 10 mM erreicht. Um störende Hintergrundleitfähigkeiten der Oozyten zu eliminieren, wurden die einzelnen Stromsignale bei unterschiedlichen Messbedingungen mit und ohne 10 mM extrazellulärem Ouabain aufgenommen. „Ouabainsensitive Ströme“ sind die Ströme, die aus der Differenz eines Stromsignals in An- oder Abwesenheit von 10 mM Ouabain gebildet wurden. Diese wurden in K<sup>+</sup>-haltigen oder K<sup>+</sup>-freien Lösungen aufgenommen.

Analog zu den K<sup>+</sup>-induzierten Strömen wurden auch die K<sup>+</sup>-abhängigen ouabainsensitiven Ströme sowohl unter Na<sup>+</sup>-haltigen als auch unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen gemessen. Der Na<sup>+</sup>-Einfluss auf die Pumpströme wurde dabei dadurch bestimmt, dass die Stromantwort in Na<sup>+</sup>-Puffer mit 10 mM Ouabain von der in K<sup>+</sup>-haltigen Na<sup>+</sup>-Puffer gemessenen abgezogen wurde. Dies erfolgte für verschiedene extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentrationen. Für diese Ströme wurde das Symbol <sup>Na</sup>I<sub>xK,ouab</sub> eingeführt. Ströme ohne Na<sup>+</sup>-Einfluss wurden im NMDG<sup>+</sup>-Puffer aufgenommen, wobei die Differenzströme analog zu den Na<sup>+</sup>-haltigen Bedingungen gebildet wurden. Für diese Ströme wird das Symbol Index <sup>0Na</sup>I<sub>xK,ouab</sub> verwendet.

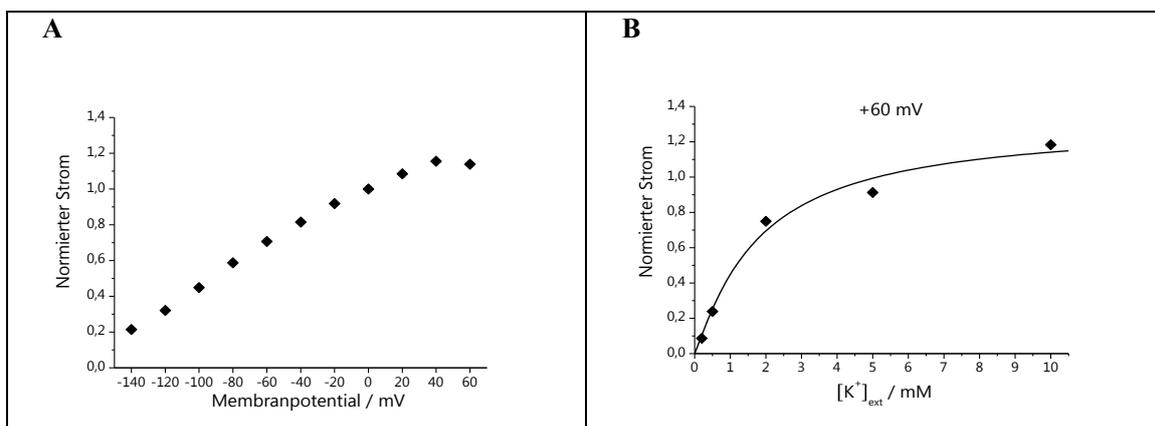
Für den Zusammenhang zwischen K<sup>+</sup>-induzierten Strömen und K<sup>+</sup>-abhängigen ouabainsensitiven Strömen gilt:  $I_{xK,ouab} = I_{xK} + I_{0K,ouab}$ .

### 2.4.3 Auswertung stationärer Ströme

#### Auswertung stationärer $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpströme

Mithilfe der TEVC-Methode wurden mittels eines Spannungssprung-Protokolls (Abb. 2.4-2) die stationären Pumpströme der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Abhängigkeit vom Transmembranpotential aufgenommen. Dies erfolgte in unterschiedlichen Messlösungen. Es wurden nur Ströme ausgewertet bei Oozyten, die hinreichend genug exprimiert hatten. Das heißt, der Differenzstrom in 10 mM  $\text{K}^+$  und bei +60 mV betrug mindestens 100 nA.

Um die Spannungsabhängigkeit der apparenten  $\text{K}^+$ -Affinität zu untersuchen, wurden die jeweiligen  $\text{K}^+$ -induzierten stationären Ströme in  $\text{Na}^+$ - und bzw. oder in NMDG<sup>+</sup>-Puffer ermittelt (s. oben). Die Stromantworten, die bei unterschiedlichen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen detektiert wurden, wurden anschließend auf die Stromamplitude, die für 10 mM  $\text{K}^+$  bei einem Membranpotential von 0 mV ermittelt wurde, normiert. Die normierten Stromwerte wurden schließlich gegen die Spannung aufgetragen (Abb. 2.4-3A).



**Abb. 2.4-3: Exemplarische Darstellung einer  $\text{K}^+$ -induzierten I(V)-Kurve und einer Stromkurve in Abhängigkeit von  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ .**

A) Die normierte  $\text{K}^+$ -induzierte I(V)-Kurve einer Oozyte bei 10 mM  $\text{K}^+$  ist als Beispiel dargestellt. Diese Kurve kann für unterschiedlich  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  aufgenommen werden.

B) Für jedes angelegte Membranpotential (hier +60 mV) wurden die Stromwerte gegen unterschiedliche  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  aufgetragen und konnten mittels einer Hill-Gleichung (Gl. 2.4-1) approximiert werden (schwarze Kurve).

Von den auf diese Weise erhaltenen Strom-Spannungs-Kurven wurden für ein gegebenes Membranpotential die stationären Stromamplituden gegen die  $\text{K}^+$ -Konzentration aufgetragen (Abb. 2.4-3B). Die dabei erhaltenen Kurven wurden durch die folgende Hill-Gleichung approximiert:

$$I = \frac{I_{\text{max}}}{1 + \left( \frac{K_{0,5}}{[\text{K}^+]_{\text{ext}}} \right)^{n_{\text{H}}}} \quad \text{Gl. 2.4-1}$$

(mit I: Strom;  $I_{\text{max}}$ : maximaler Strom;  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ : extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration;  $n_{\text{H}}$ : Hill-Koeffizient)

Der Hill-Koeffizient variierte zwischen 1 und 1,5. Auf diese Weise wurde pro Membranpotential der  $K_{0,5}$ -Wert ermittelt, der derjenigen  $\text{K}^+$ -Konzentration entspricht, bei der der Strom halbmaximal ist. Diese Werte wurden gegen das Membranpotential aufgetragen, um durch Vergleich mit den Werten des Wildtyp-Proteins ggf. Aussagen über Veränderungen der apparenten  $\text{K}^+$ -Affinität treffen zu können.

Auswertung stationärer Ströme unter  $K^+$ -freien Bedingungen

Für das WT-Enzym konnten unter  $Na^+$ - und  $K^+$ -freien Bedingungen bei negativen Potentialen ouabainsensitive stationäre Einströme (sogenannte Leckströme) gemessen werden, die für  $V \rightarrow -\infty$  eine asymptotisch lineare Abhängigkeit vom Membranpotential aufwiesen (Abschnitt 1.2.4). Beim WT-Protein sind diese Ströme aber ausschließlich einwärts gleichgerichtet. Einige der in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte ließen jedoch ouabainsensitive Leckströme in beide Richtungen zu. Aus diesen Leckströmen, die kein Gleichrichtungsverhalten aufwiesen, wurden Umkehrpotentiale bestimmt, um die Abhängigkeit dieser Ströme von  $Na^+$ - oder  $H^+$ -Ionen zu untersuchen.

Mit der Nernst-Gleichung kann das thermodynamische Gleichgewichtspotential in Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten einer Ionensorte berechnet werden. Ist die Membran selektiv permeabel für eine Ionensorte (z. B. weil Ionenkanäle für diese Ionensorten die Membranleitfähigkeit dominieren), so ist das Ruhepotential in guter Näherung durch das jeweilige Gleichgewichtspotential bestimmt. Mithilfe der Nernst-Gleichung können Umkehrpotentiale von Strömen errechnet werden, sofern die Membran für eine Ionensorte permeabel ist. Die Ströme, in denen Protonen der Ladungsträger sind, können abhängig vom extrazellulären pH-Wert gemessen werden und die Verschiebung des Umkehrpotentials beträgt im Idealfall 59 mV pro pH-Einheit. Eine solche Umkehrpotentialverschiebung kann z. B. annähernd bei Protonenkanälen gemessen werden (Decoursey, 2003).

Eine Erweiterung dieser Gleichung stellt die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung dar (GHK-Gl. 2.4-2). Hierbei kann das Membranpotential unter Berücksichtigung mehrerer permeierender Ionensorten berechnet werden unter den Annahmen, dass zwischen den Ionen keine Wechselwirkungen stattfinden, die Ionen zwischen wässriger Lösung und Membranphase einem Verteilungsgleichgewicht unterliegen, die Membran homogen und das elektrische Feld in der Membran konstant ist. Das sich einstellende „Ruhe“-Membranpotential stellt kein thermodynamisches Gleichgewicht dar, sondern definiert sich anhand eines Fließgleichgewichtes, innerhalb dessen die Summe aller über die Membran fließenden Ionenströme Null ergibt. Der GHK-Formalismus wird besonders bei der Untersuchung von Ionenkanälen angewandt, da die Permeabilität der Membran für eine Ionensorte von der Anzahl der Ionenkanäle abhängig ist, die dieses Ion transportieren. Zellmembranen sind durch die unterschiedlichen Ionenkanäle für mehrere Ionensorten durchlässig (in Abhängigkeit von der Aktivität der Kanäle). Die ouabainsensitiven Leckströme der  $Na^+/K^+$ -ATPase-Mutanten wiesen Eigenschaften auf, die der Goldman-Formalismus beschreibt. Um herauszufinden, welche Ionensorte der Ladungsträger der ouabainsensitiven Leckströme ist (unter den hier angewendeten Pufferbedingungen kommen nur  $Na^+$ - oder  $H^+$ -Ionen infrage), wurden für die Konstrukte R937L und R937S ouabainsensitive Ströme bei  $[K^+]_{ext} = 0$  und unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten unter Anwendung des Spannungssprung-Protokolls in Abb. 2.4-2 gemessen, und zwar bei 100 mM und 0 mM  $Na^+_{ext}$  (100 mM NMDG<sup>+</sup>).

Aus dem grafisch bestimmten Umkehrpotential dieser Ströme kann der Permeabilitätsquotient  $\frac{P_{Na}}{P_H}$  berechnet werden. Nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung kann das Umkehrpotential in diesem Fall wie folgt berechnet werden:

$$V_{rev,Na} = \frac{R \cdot T}{F} \ln \left( \frac{P_{Na} \cdot [Na^+]_{ext} + P_H \cdot [H^+]_{ext}}{P_{Na} \cdot [Na^+]_{int} + P_H \cdot [H^+]_{int}} \right) \quad \text{Gl. 2.4-2}$$

Wird extrazelluläres  $\text{Na}^+$  durch  $\text{NMDG}^+$  ersetzt, welches die Membran nicht passieren kann, ergibt sich für das Umkehrpotential:

$$V_{\text{rev,NMDG}} = \frac{R \cdot T}{F} \ln \left( \frac{P_{\text{H}} \cdot [\text{H}^+]_{\text{ext}}}{P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_{\text{int}} + P_{\text{H}} \cdot [\text{H}^+]_{\text{int}}} \right) \quad \text{Gl. 2.4-3}$$

Durch Differenzbildung der Umkehrpotentiale können die unbekanntnen intrazellulären Konzentrationen an  $\text{Na}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen eliminiert werden:

$$\Delta V_{\text{rev},(\pm\text{Na})} = V_{\text{rev,Na}} - V_{\text{rev,NMDG}} = \frac{R \cdot T}{F} \ln \left( 1 + \frac{P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_{\text{ext}}}{P_{\text{H}} \cdot [\text{H}^+]_{\text{ext}}} \right) \quad \text{Gl. 2.4-4}$$

Für den Permeabilitätsquotienten ergibt sich:

$$\frac{P_{\text{Na}}}{P_{\text{H}}} = \left[ \exp \left( \frac{F \cdot \Delta V_{\text{rev},(\pm\text{Na})}}{R \cdot T} \right) - 1 \right] \cdot \frac{[\text{H}^+]_{\text{ext}}}{[\text{Na}^+]_{\text{ext}}} \quad \text{Gl. 2.4-5}$$

und für das Verhältnis der Flussdichten:

$$\frac{\Phi_{\text{Na}}}{\Phi_{\text{H}}} = \frac{P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_{\text{ext}}}{P_{\text{H}} \cdot [\text{H}^+]_{\text{ext}}} = \exp \left( \frac{F \cdot \Delta V_{\text{rev},(\pm\text{Na})}}{R \cdot T} \right) - 1 \quad \text{Gl. 2.4-6}$$

Im Unterschied zum Permeabilitätsquotienten nimmt das Verhältnis der Flussdichten (Gl. 2.4-6) auf die tatsächlich durch die Membran tretenden Teilchenzahlen pro Zeiteinheit für jede Sorte Bezug. Aus der Analyse dieses Parameters können also Rückschlüsse darauf gezogen werden, welche Ionensorte den Gesamt-Ionenfluss dominiert, insbesondere dann, wenn eine Ionensorte in einer vielfach höheren Konzentration vorliegt als die andere Ionensorte, wie das hier bei  $\text{Na}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen der Fall ist.

Ist die Membran bzw. das Enzym vor allem für eine Ionensorte durchlässig, kann mithilfe der GHK-Gleichung der  $I(V)$ -Verlauf berechnet werden, wenn die Konzentration des permeierenden Ions auf beiden Seiten der Membran unterschiedlich ist. Unterscheiden sich die intra- und extrazellulären Konzentrationen einer einzelnen Ionensorte, so verhält sich die Strom-Spannungs-Kurve für diese Ionensorte intrinsisch nicht-linear. Wenn angenommen wird, dass das Protein für Protonen permeabel ist, kann die Rektifizierung der  $I(V)$ -Kurve durch die Goldman-Gleichung beschrieben werden:

$$I_{\text{H}^+} = \frac{F^2 \cdot V_m}{R \cdot T} \cdot P_{\text{H}^+} \cdot \frac{[\text{H}^+]_{\text{int}} \cdot \exp \left( \frac{F \cdot V_m}{R \cdot T} \right) - [\text{H}^+]_{\text{ext}}}{\exp \left( \frac{F \cdot V_m}{R \cdot T} \right) - 1} \quad \text{Gl. 2.4-7}$$

Die Leitfähigkeit, die sogenannte *slope conductance*  $G_{\text{H}^+}$ , kann aus der Steigung der  $I(V)$ -Kurve ( $\Delta I_{\text{H}^+} / \Delta V_m$ ) bestimmt werden. Sind die Protonenkonzentrationen intra- und extrazellulär verschieden, kann das asymptotische Verhalten  $I(V)$ -Kurve für  $|V_m| \rightarrow \infty$  wie folgt beschrieben werden:

$$\lim_{V_m \rightarrow +\infty} (I_{\text{H}^+}) = \frac{F^2 \cdot V_m}{R \cdot T} \cdot P_{\text{H}^+} \cdot \frac{[\text{H}^+]_{\text{int}} \cdot \exp \left( \frac{F \cdot V_m}{R \cdot T} \right)}{\exp \left( \frac{F \cdot V_m}{R \cdot T} \right)} = \frac{F^2 \cdot V_m}{R \cdot T} \cdot P_{\text{H}^+} \cdot [\text{H}^+]_{\text{int}} \quad \text{Gl. 2.4-8}$$

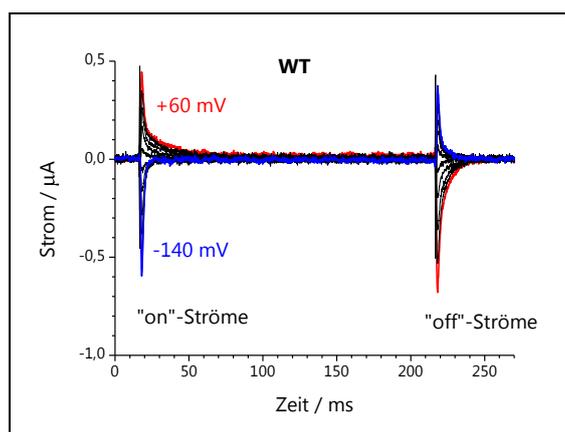
und

$$\lim_{V_m \rightarrow -\infty} (I_{\text{H}^+}) = \frac{F^2 \cdot V_m}{R \cdot T} \cdot P_{\text{H}^+} \cdot \frac{(-[\text{H}^+]_{\text{ext}})}{(-1)} = \frac{F^2 \cdot V_m}{R \cdot T} \cdot P_{\text{H}^+} \cdot [\text{H}^+]_{\text{ext}} \quad \text{Gl. 2.4-9}$$

Daraus ergibt sich, dass die Steigungsgrenzwerte bei positiven oder negativen Membranpotentialen respektive proportional zur intra- oder extrazellulären Protonenkonzentration sind (Thompson, 1986). Zeigt also die I(V)-Kurve diese Eigenschaften, so hat das Transportprotein eine Leitfähigkeit für Protonen wie durch Goldman beschrieben (Ferreira & Marshall, 1985). Für diese Analyse wurden die logarithmierten Steigungen, die graphisch aus den I(V)-Kurven für  $V \rightarrow -\infty$  und  $V \rightarrow +\infty$  bestimmt wurden, respektive gegen den  $\text{pH}_{\text{ext}}$ - und  $\text{pH}_{\text{int}}$ -Wert aufgetragen. Ergibt sich bei einer solchen Analyse ein linearer Zusammenhang, so ist das Protein für Protonen permeabel.

#### 2.4.4 Auswertung transientser Ströme

Um Informationen über die Kinetik und Spannungsabhängigkeit des elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschs der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Abb. 1.2-1) zu erhalten, wurde der Zeitverlauf der ouabainsensitiven Differenzströme ausgewertet. Hierzu wurde die Zelle unter  $\text{K}^+$ -freien und  $\text{Na}^+$ -reichen (100 mM) extrazellulären Bedingungen auf verschiedene Potentiale geklemmt (s. Spannungssprung-Protokoll Abb. 2.4-2). Die zeitaufgelösten transienten Ströme ( ${}^{\text{Na}}I_{0\text{K},\text{ouab}}$ ) wurden aus der Differenz der Ströme in  $\text{Na}^+$ -Puffer und der Ströme in  $\text{Na}^+$ -Puffer mit 10 mM Ouabain erhalten (Abb. 2.4-4).



**Abb. 2.4-4: Transiente Ströme der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.**

Strom-Zeit-Verlauf der ouabainsensitiven Ströme unter  $\text{K}^+$ -freien und  $\text{Na}^+$ -reichen (100 mM) Bedingungen am Beispiel einer Oozyte, die das WT-Enzym exprimierte. Das verwendete Spannungssprung-Protokoll ist in Abb. 2.4-2 dargestellt. Die Ströme, die ausgehend von einem konstanten Haltepotential beim Anspringen eines variablen Membranpotentials detektiert wurden, entsprechen den „on“-Ströme. Diejenigen, die beim Sprung von einem variablen Testpotential zurück zum Ausgangspotential gemessen wurden, werden als „off“-Ströme bezeichnet.

Die Daten wurden mit einer monoexponentiellen Funktion approximiert, wobei die ersten 2-5 ms nicht berücksichtigt wurden, um eventuell noch vorhandene kapazitive Artefakte auszuschließen.

$$I = I_{\text{max}} \cdot e^{-t/\tau} + C$$

Gl. 2.4-10

(mit I: Strom;  $I_{\text{max}}$ : maximaler Strom; t: Zeit;  $\tau$ : Zeitkonstante, C: Konstante)

### Untersuchung der Ladungstranslokation

Die während des transienten Stroms transportierte Ladung  $Q$  wurde anhand der mit Gl. 2.4-10 erhaltenen Parameter folgendermaßen bestimmt:

$$Q = I_{\max} \cdot \tau \quad \text{Gl. 2.4-11}$$

Diese  $Q$ -Werte wurden gegen die Spannung aufgetragen. Die resultierenden  $Q(V)$ -Kurven verlaufen sigmoidal, da die Anzahl der Ladungen, die durch einen Spannungssprung verschoben werden, durch die Anzahl der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Moleküle in der Zellmembran limitiert ist. Dieser sigmoidale Zusammenhang wurde mit der folgenden Boltzmann-Funktion approximiert:

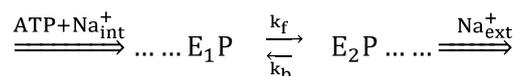
$$Q(V) = Q_{\min} + \frac{Q_{\max} - Q_{\min}}{1 + \exp\left(\frac{z_q \cdot F(V - V_{0,5})}{RT}\right)} \quad \text{Gl. 2.4-12}$$

In dieser Gleichung entsprechen  $Q_{\max}$  und  $Q_{\min}$  den Maximal- und Minimalwerten, die die Boltzmann-Funktion annimmt.  $V_{0,5}$  ist das charakteristische Potential, bei dem der Mittel- oder Symmetriepunkt der  $Q(V)$ -Verteilung erreicht ist. An diesem Spannungswert herrscht auch eine 50:50-Verteilung der Pumpmoleküle im  $E_1P$ - und  $E_2P$ -Konformationszustand.  $z_q$  entspricht dem Steigungsfaktor der Boltzmann-Verteilung und ist das Maß einer Äquivalentladung, die bei einem Spannungssprung maximal pro Elementarereignis (hier: dem  $E_1P$ - $E_2P$ -Konformationsübergang) transportiert werden kann.  $F$  ist die Faraday-Konstante,  $R$  die molare Gaskonstante,  $T$  die Temperatur und  $V$  das Membranpotential.

Um die  $Q(V)$ -Abhängigkeiten einzelner  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Konstrukte miteinander vergleichen zu können, war es nötig, die Werte zu normieren, damit die Vergleichbarkeit hergestellt werden konnte. Dafür wurde die  $Q(V)$ -Verteilung bezüglich der  $y$ -Achse verschoben, indem von den jeweiligen Werten der entsprechende  $Q_{\min}$ -Wert, der nach Gl. 2.4-12 erhalten wurde, abgezogen wurde. Die daraus resultierenden  $Q(V)$ -Werte wurden anschließend auf den nach Gl. 2.4-12 erhaltenen Differenzbetrag  $Q_{\max} - Q_{\min}$  normiert. Die auf diese Weise normierten  $Q(V)$ -Verteilungen wurden aufgetragen, wodurch die ggf. beobachtbaren Unterschiede des spannungsabhängigen Verlaufs der verschobenen Ladungsmenge zum Wildtyp-Protein aufgezeigt und interpretiert werden konnten.

### Die Kinetik der transienten Ströme

Die Kinetik wurde anhand der transienten „on“-Ströme untersucht, indem der Verlauf der Relaxationskonstanten  $\tau^{-1}$  (reziproke Zeitkonstante) in Abhängigkeit vom Membranpotential analysiert wurde. Bei einem definierten Haltpotential  $V$  (hier  $-30$  mV) wird das Stromsignal durch das Gleichgewicht der  $E_1P/E_2P$ -Verteilung bestimmt. Bei einem Potentialsprung relaxiert das System in einen neuen Gleichgewichtszustand mit der Zeitkonstante  $\tau$ . Es gibt unterschiedliche Modelle, um die Kinetik dieser Reaktion zu beschreiben. Das einfachste Modell ist ein Zwei-Zustands-Modell basierend auf dem reversiblen Übergang zwischen den Phosphointermediaten  $E_1P$  und  $E_2P$  (Geibel et al., 2003a; Geibel et al., 2003b; Dürr et al., 2012). Der  $E_1P$ -Zustand befindet sich in einem schnellen Gleichgewicht mit der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Bindungs- und der Phosphorylierungsreaktion. Der  $E_2P$ -Zustand steht im schnellen Gleichgewicht mit der  $\text{Na}^+$ -Freisetzung bzw. Rückbindung:



Die reziproke Zeitkonstante  $\tau^{-1}$  (Relaxationskonstante) ist die Summe aus einer Vorwärts- und Rückwärtsgeschwindigkeitskonstante. Es gilt:

$$\tau^{-1} = k_f(V) + k_b(V) \quad \text{Gl. 2.4-13}$$

Die Spannungsabhängigkeit der Vorwärts- und Rückwärts-Geschwindigkeitskonstante ( $k_f$  und  $k_b$ ) kann als monoexponentielle Funktion beschrieben werden:

$$k_f(V) = k_f(0) \cdot \exp\left(-\frac{z_{q,f} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \text{ und } k_b(V) = k_b(0) \cdot \exp\left(-\frac{z_{q,b} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \quad \text{Gl. 2.4-14}$$

$k_f(0)$  und  $k_b(0)$  sind die Geschwindigkeitskonstanten bei 0 mV.

Da die Ladungstranslokation während des  $\text{E}_1\text{P}$ - $\text{E}_2\text{P}$ -Konformationswechsels auftritt, kann aus der normierten Ladung  $Q$  der relative Anteil an Pumpmolekülen im  $\text{E}_2\text{P}$ -Zustand ( $[\text{E}_2\text{P}]$ ) für jedes angelegte Membranpotential bestimmt werden (mit  $[\text{E}_1\text{P}]+[\text{E}_2\text{P}]=1$ ). Dabei gilt:

$$Q(V) = [\text{E}_2\text{P}] = \frac{k_f(V)}{k_f(V) + k_b(V)} \quad \text{Gl. 2.4-15}$$

Die Spannungsabhängigkeit von  $k_f(V)$  und  $k_b(V)$  kann somit aus der Spannungsabhängigkeit von  $\tau^{-1}(V)$  und der Ladung  $Q(V)$  berechnet werden:

$$k_f(V) = Q(V) \cdot \tau^{-1}(V) \text{ und } k_b(V) = [1 - Q(V)] \cdot \tau^{-1}(V) \quad \text{Gl. 2.4-16}$$

Wenn bei bestimmten  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Mutanten die Spannungsabhängigkeit von  $\tau^{-1}$  im Vergleich zum WT-Enzym verändert ist, kann diese Analyse zusätzliche Informationen darüber geben, ob der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Vorwärts- oder Rückreaktion im  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschmodus verändert ist.

### 2.4.5 Koexpression mit dem epithelialen Natriumkanal

Um die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration der Oozyten zu kontrollieren und somit deren Einfluss auf die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase untersuchen zu können, wurde die Pumpe mit einem epithelialen Natriumkanal (ENaC) koexprimiert.

Bei ENaC handelt es sich um einen konstitutiv aktiven  $\text{Na}^+$ -Kanal, der sich durch die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Amilorid inhibieren lässt. Aufgrund dieser Funktionsweise konnten Oozyten, die ENaC exprimierten, unter definierten Pufferbedingungen mit  $\text{Na}^+$  beladen werden. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Amilorid konnte diese Beladung gezielt gestoppt werden.

Aufgrund der konstitutiven Aktivität des ENaC in Abwesenheit von Amilorid kann davon ausgegangen werden, dass die Permeabilität der Oozytenmembran überwiegend durch die  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit bestimmt wird. Daher kann die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration annähernd durch die Nernst-Gleichung für ideal semipermeable Membranen beschrieben werden:

$$[\text{Na}^+]_{\text{int}} = [\text{Na}^+]_{\text{ext}} \cdot \exp\left(\frac{V_{\text{rev}} \cdot F}{RT}\right) \quad \text{Gl. 2.4-17}$$

wobei  $V_{\text{rev}}$  dem Umkehrpotential der ENaC-exprimierenden Oozyte entspricht.

Auf diese Weise konnte die Funktionalität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration in Bezug gesetzt werden, wodurch der Einfluss von zytosolischem  $\text{Na}^+$  auf die enzymatische Aktivität analysiert werden konnte.

In sämtlichen hier durchgeführten ENaC-Messungen wurde der Kanal mit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase koexprimiert. Dafür wurden zusätzlich zur RNA der  $\alpha_2$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit der Pumpe jeweils 0,3 ng der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -UE der cRNA des ENaC-Kanals aus der Rattenniere koinjiziert (Hasler et al., 1998). Die Zellen wurden anschließend je nach Experimentbedingung für drei Tage bei definierten Pufferbedingungen gelagert. In den danach durchgeführten elektrophysiologischen Messungen wurden die Ni<sup>2+</sup>-Ionen (5 mM) im extrazellulären Messpuffer durch Mg<sup>2+</sup>-Ionen (2 mM) ersetzt, da Ni<sup>2+</sup> einen inhibitorischen Effekt auf den ENaC-Kanal hat (Cucu et al., 2005).

Zunächst wurde die intrazelluläre Natriumkonzentration der Oozyten nach der Beladungsprozedur bestimmt. Dafür wurden die Zellen nach der RNA-Injektion für drei Tage in ORI-Puffer mit 10  $\mu$ M Amilorid gelagert. Anschließend erfolgte die Na<sup>+</sup>-Beladung der Zellen wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, wobei sowohl der Na<sup>+</sup>-Ladelösung als auch dem Na<sup>+</sup>-Puffer 10  $\mu$ M Amilorid zugegeben war. Das Umkehrpotential der Oozyten, die unter diesen Bedingungen gelagert und beladen wurden, wurde anschließend mittels der TEVC bestimmt, wobei die Zelle in 10 mM Na<sup>+</sup>-Puffer gemessen wurde. Aus dem daraus erhaltenen Wert wurde die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration berechnet.

Des Weiteren wurde die Funktionalität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Abhängigkeit von der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration bestimmt. Dafür wurde die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration der Oozyten schrittweise erhöht und anschließend die stationären und transienten Ströme in Abhängigkeit von [Na<sup>+</sup>]<sub>int</sub> gemessen, wobei in allen Messlösungen 10  $\mu$ M Amilorid enthalten war. Hierfür wurden die Oozyten 2-3 Tage in Na<sup>+</sup>-reduzierter ORI-Lösung (in mM: 100 NMDG·Cl, 10 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2.5 TRIS, 2.5 MOPS, pH 7,4) aufbewahrt, da die ENaC-Expression am effektivsten bei 10-15 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> ist (Kusche-Vihrog et al., 2009). Außerdem entspricht dies der mittleren intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration der Oozyten, wodurch die Zellen während der Expressionsphase zusätzlich geschont wurden (Weber, 1999). 18-24 h vor der Messung wurden die Oozyten in Na<sup>+</sup>-freiem Puffer (in mM: 110 NMDG·Cl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2.5 TRIS, 2.5 MOPS, pH 7,4) inkubiert, um [Na<sup>+</sup>]<sub>int</sub> zu reduzieren. Die schrittweise intrazelluläre Beladung mit Na<sup>+</sup> erfolgte anschließend in Puffern mit zuerst 10 mM Na<sup>+</sup> und dann 100 mM Na<sup>+</sup>, indem die Zelle auf -30 mV oder -100 mV für mehrere Minuten geklemmt wurde, wobei für jeden Beladungsschritt [Na<sup>+</sup>]<sub>int</sub> aus V<sub>rev</sub> in 10 mM bzw. 100 mM Na<sup>+</sup>-Puffern nach Gl. 2.4-17 ermittelt wurde.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Elektrophysiologische Messungen am Wildtyp-Protein

Zu Beginn werden die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen des Wildtyp-Proteins (WT) dargestellt. Die Daten entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  S.E.) aus Messungen an 16-22 Oozyten aus mindestens drei unterschiedlichen Zellchargen. Es soll ein Überblick über die Auswertungs- und Interpretationsmethodik gegeben werden, um funktionelle Unterschiede von Mutationskonstrukten im Vergleich zum WT-Enzym verdeutlichen zu können.

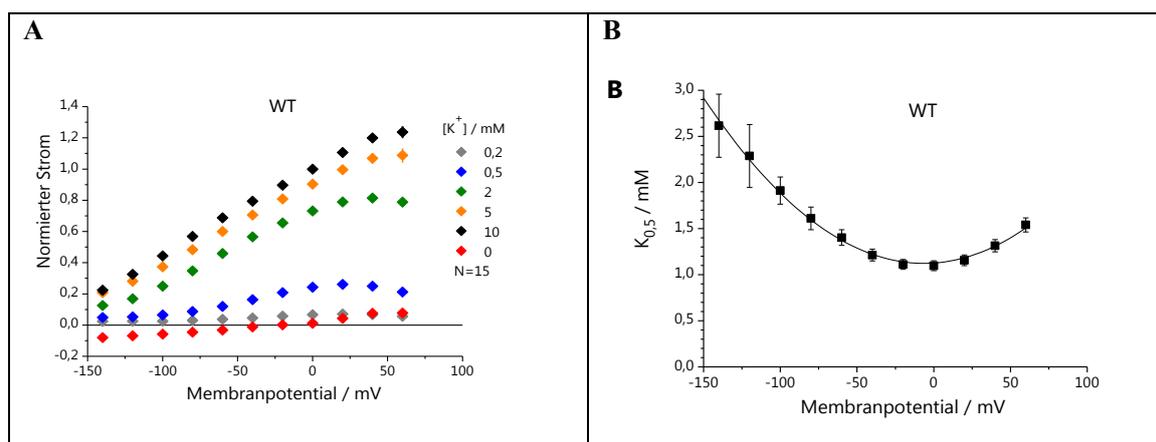
#### 3.1.1 Spannungs- und $[K^+]_{\text{ext}}$ -Abhängigkeit stationärer Pumpströme

##### Stationäre Ströme in $Na^+$ -haltigen Lösungen

Um die Spannungsabhängigkeit des  $Na^+/K^+$ -Austauschtransports der  $Na^+/K^+$ -ATPase zu untersuchen, wurden die  $K^+$ -stimulierten stationären Pumpströme bei verschiedenen Potentialen in  $Na^+$ -reichen Lösungen ermittelt. Dabei wurden die Oozyten in Puffern gemessen, die eine konstante  $Na^+$ -Konzentration von 100 mM und variable  $K^+$ -Konzentrationen enthielten. Dies kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen. Die  $K^+$ -induzierten Ströme ( $^{Na}I_{xK}$ ) wurden aus der Differenz der Ströme in Gegenwart einer bestimmten extrazellulären  $K^+$ -Konzentration  $[K^+]_{\text{ext}}$  und in Abwesenheit von extrazellulärem  $K^+$  bei 100 mM  $Na^+$  berechnet (Abschnitt 2.4.3). Ströme, die aus der Differenz von Strömen in  $K^+$ -haltiger Lösung und Strömen in Puffern mit 10 mM Ouabain gebildet wurden, werden als „ $K^+$ -abhängige ouabainsensitive Ströme“ ( $^{Na}I_{xK,ouab}$ ) bezeichnet.

Bei einer extrazellulären  $Na^+$ -Konzentration von 100 mM ist der Unterschied zwischen  $^{Na}I_{xK,ouab}$  und  $^{Na}I_{xK}$  im Falle des WT-Enzyms vernachlässigbar klein, da Oozyten, die das WT-Protein exprimieren, nur sehr kleine ouabainsensitive Ströme bei 0 mM  $K^+$  aufweisen ( $^{Na}I_{0K,ouab} \approx 0$ ; s. rote Kurve in Abb. 3.1-1A). Die  $K^+$ -induzierten Ströme entsprechen somit nahezu den tatsächlichen Pumpströmen, die auf den Austausch  $3Na^+/2K^+$  zurückzuführen sind.

In Abb. 3.1-1A sind die  $K^+$ -induzierten Strom-Spannungs-Kurven des WT-Enzyms bei verschiedenen  $[K^+]_{\text{ext}}$  dargestellt. Die I(V)-Kennlinien folgten typischerweise einem glockenförmigen Verlauf, wobei das Maximum bei steigender  $[K^+]_{\text{ext}}$  zu positiven Membranpotentialen hin verschoben wurde. Bei sättigender  $K^+$ -Konzentration von 10 mM war das Maximum bei +60 mV noch nicht erreicht. Die Verringerung der  $K^+$ -Pumpaktivität bei Hyperpolarisation ist durch die Konkurrenz von  $Na^+$  und  $K^+$  um die extrazellulären Bindungsstellen bedingt. Bei Hyperpolarisation erhöht sich die effektive Konzentration von extrazellulärem  $Na^+$  an den Bindungsstellen, dadurch wird das Reaktionsgleichgewicht des Enzyms zum  $E_1$ -Zustand ( $Na^+$ -Rückbindung) verschoben. Die Vorwärtsreaktion des Pumpzyklus wird gehemmt und zeigt sich experimentell in Form eines verminderten stationären Pumpstroms (Abb. 3.1-1A). Die mechanistischen Grundlagen dieser  $Na^+$ -Rückbindung werden anhand eines *access-channel*-Modells erklärt (Abschnitt 1.2.2).



**Abb. 3.1-1: Spannungs- und  $[K^+]_{ext}$ -Abhängigkeit stationärer Pumpströme des WT-Enzyms bei  $[Na^+]_{ext} = 100$  mM.**

A)  $K^+$ -induzierte Ströme des Wildtyp-Proteins in Abhängigkeit von der Spannung und der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration bei  $[Na^+]_{ext} = 100$  mM. Unterschiedliche  $[K^+]_{ext}$  sind durch verschiedene Farben dargestellt. In Rot gezeigt sind die ouabainsensitiven stationären Ströme bei 0 mM  $K^+$ .

B) Gezeigt ist die Spannungsabhängigkeit der  $K_{0.5}$ -Werte, die aus den Strom-Spannungs-Verläufen in (A) mittels einer Hill-Approximation ermittelt wurden (Abschnitt 2.4.3). Die Werte wurden mithilfe einer Polynomfunktion zweiten Grades approximiert.

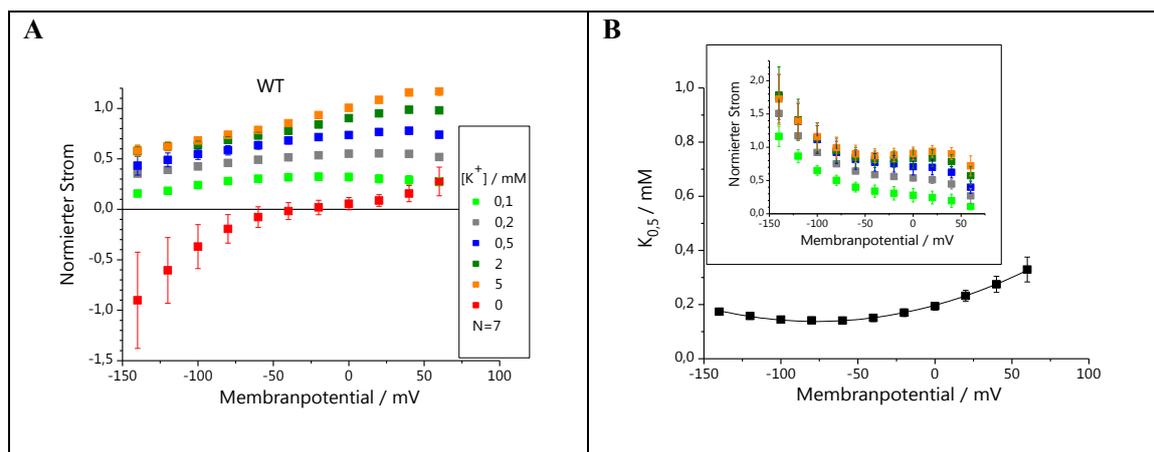
Für jedes angelegte Membranpotential wurde der  $K_{0.5}$ -Wert (Abschnitt 2.4.3) bestimmt.  $K_{0.5}$  entspricht der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration, bei der der stationäre Pumpstrom seinen halbmaximalen Wert erreicht hat. Die Spannungsabhängigkeit von  $K_{0.5}$  in 100 mM  $Na^+$ , kurz  $K_{0.5}(Na^+)$ , ist für das Wildtyp-Enzym in Abb. 3.1-1B dargestellt. Die Kurve folgte einem parabol-förmigen Verlauf, deren Minimum von 1,1 mM bei ca. -6 mV lag. Aus den  $K_{0.5}(Na^+)$ -Werten werden üblicherweise Rückschlüsse auf die apparente Affinität der  $Na^+/K^+$ -ATPase für extrazelluläres  $K^+$  gezogen, die durch die Konkurrenz mit  $Na^+$  um die extrazellulären Bindungsstellen beeinflusst wird. Anhand des spannungsabhängigen Kurvenverlaufs von  $K_{0.5}(Na^+)$  wurde deutlich, dass die apparente  $K^+$ -Affinität bei einer Hyperpolarisation von unter -6 mV sinkt. Dies beruht auf der Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts hin zur  $Na^+$ -Rückbindung.

#### Stationäre Ströme in $Na^+$ -freien Lösungen

Da der spannungsabhängige Verlauf der Pumpströme und auch die apparente  $K^+$ -Affinität von  $[Na^+]_{ext}$  abhängig sind, wurden  $I(V)$ -Kurven zusätzlich in 0 mM  $Na^+$  (100 mM NMDG $^+$ ) ermittelt. Auch hier wurde die extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration variiert, allerdings in einem niedrigeren Bereich (Abb. 3.1-2). Unter diesen Messbedingungen waren die  $K^+$ -induzierten ( $^{0Na^+}I_{xK}$ ) und die  $K^+$ -abhängigen ouabainsensitiven Ströme ( $^{0Na^+}I_{xK,ouab}$ ) nicht mehr identisch (Abb. 3.1-2A und Abb. 3.1-2B klein). So war die Spannungsabhängigkeit der  $K^+$ -abhängigen ouabainsensitiven Ströme geringer ausgeprägt (Abb. 3.1-2A), die Ströme wiesen aber bei hohen  $K^+$ -Konzentrationen einen leicht positiven Anstieg auf. Der maximale Pumpstrom bei 0 mV (5 mM  $K^+$ ) unterschied sich jedoch nicht vom Maximalstrom in 100 mM  $Na^+$  (Abb. 3.1-1A).

Die  $K^+$ -induzierten Strom-Spannungs-Kurven (Abb. 3.1-2B in klein) zeigten dagegen eine negative Steigung, was bereits von Rakowski und Kollegen gezeigt wurde (Rakowski et al., 1991). Diese Ströme wurden bestimmt, um die  $K_{0.5}(0Na^+)$ -Werte für jeden Spannungspuls zu ermitteln. Die Spannungsabhängigkeit der  $K_{0.5}(0Na^+)$ -Werte folgte dem Verlauf einer sehr flachen Parabel

(Abb. 3.1-2B). Die apparente  $K^+$ -Affinität war im Vergleich zu der in  $Na^+$ -haltigen Lösungen über den gesamten hier getesteten Potentialbereich um den Faktor 10 erhöht mit einem minimalen  $K_{0,5}(0Na^+)$ -Wert von ca. 0,14 mM. Bei Depolarisation erhöhten sich die  $K_{0,5}(0Na^+)$ -Werte. Aus diesem Verhalten wurde auf einen externen *access channel* auch für  $K^+$  geschlossen, wobei die dielektrische Konstante der  $K^+$ -Bindung wesentlich geringer ist als die der  $Na^+$ -Bindung (Abschnitt 1.2.2 und Sagar & Rakowski, 1994).



**Abb. 3.1-2: Spannungs- und  $[K^+]_{ext}$ -Abhängigkeit stationärer Pumpströme des WT-Enzyms bei  $[Na^+]_{ext} = 0$  mM.**

A)  $K^+$ -abhängige ouabainsensitive Ströme des Wildtyp-Proteins in Abhängigkeit von der Spannung und der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration bei  $[Na^+]_{ext} = 0$  mM. Die Ströme wurden innerhalb eines Experiments auf die Amplituden bei 5 mM  $[K^+]_{ext}$  und 0 mV normiert. Unterschiedliche  $[K^+]_{ext}$  sind durch verschiedene Farben dargestellt. In Rot gezeigt sind die ouabainsensitiven Leckströme bei 0 mM  $K^+$ .

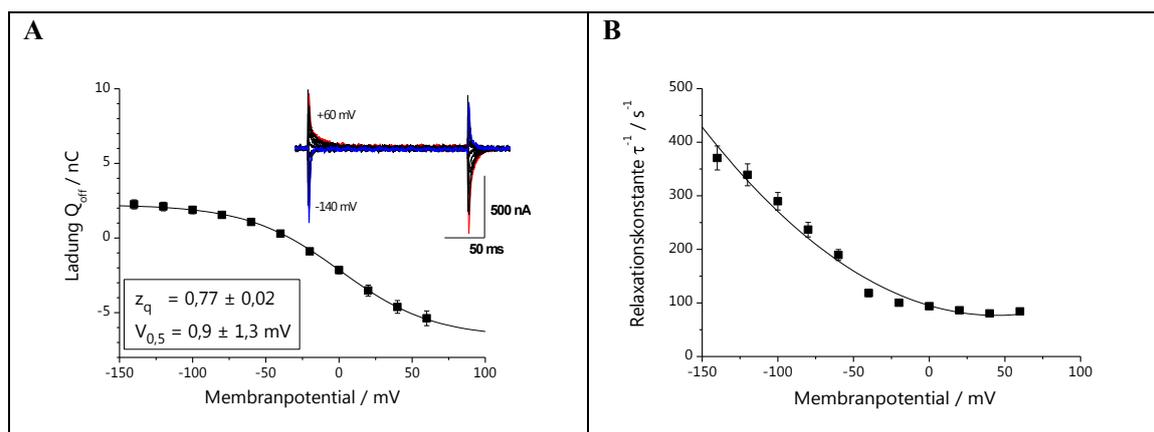
B) Gezeigt sind die  $K_{0,5}$ -Werte, die aus den  $K^+$ -induzierten Strom-Spannungs-Verläufen bei 0 mM  $Na^+$  in Abhängigkeit von der Spannung ermittelt wurden. Die Werte wurden mithilfe einer Polynomfunktion zweiten Grades approximiert. Die  $K^+$ -induzierten I(V)-Kurven sind in dem kleinen Einschubdiagramm dargestellt, für das die gleiche Legende wie für Abb. 3.1-2A gilt.

Die  $K^+$ -Affinitäten aus den hier ermittelten  $K_{0,5}$ -Werten sind allerdings überlagert von einem anderen mechanistischen Effekt, da unter  $Na^+$ - und  $K^+$ -freien Bedingungen bei einer Hyperpolarisation unter -20 mV einwärtsgerichtete ouabainsensitive Ströme gemessen werden konnten (s. rote Kurve in Abb. 3.1-2A). Bei diesen von Rakowski und Kollegen erstmals beschriebenen Strömen, handelt es sich vermutlich um Protonenströme, die pH-abhängig sind und durch  $K^+$ , aber auch durch extrazelluläres  $Na^+$  inhibiert werden. Hierfür wurden bereits verschiedene Modelle (Abschnitt 1.2.4) für die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen diskutiert (Rakowski et al., 1991; Wang & Horisberger, 1995; Rettinger, 1996; Vasilyev et al., 2004; Li et al., 2006). Auf diese wird in Abschnitt 4.1.3 (Diskussion) ausführlich eingegangen. Die Ströme werden im Folgenden in Anlehnung an die englischsprachige Literatur als ouabainsensitive Leckströme ( $I_{0K,ouab}$ ) bezeichnet.

### 3.1.2 Spannungsabhängigkeit und Kinetik transienter Ströme

Um den elektrogenen  $\text{Na}^+$ -Transport zu untersuchen, wurden ouabainsensitive transiente  $\text{Na}^+$ -Ströme ermittelt. Dazu wurden Spannungspulsexperimente unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen in  $\text{Na}^+$ -reichen Lösungen ( $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 100 \text{ mM}$ ) in An- und Abwesenheit von  $10 \text{ mM}$  Ouabain durchgeführt (Abschnitt 2.4.4). Aus diesen Daten wurden die Differenzströme ermittelt. In Abb. 3.1-3A (in klein) ist der charakteristische Zeitverlauf transienter Ströme bei unterschiedlichen Potentialen für das WT-Enzym dargestellt, die mithilfe des in Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Spannungssprung-Protokolls gemessen wurden. Die Kinetik der „on“- und „off“-Ströme kann durch eine Exponentialfunktion nach Gl. 2.4-10 beschrieben werden. Die „on“-Ströme fielen nahezu vollständig auf Null ab. Diese nicht-stationären (engl. *pre-steady-state*) Ströme werden durch die elektrogene Freisetzung oder Rückbindung von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  an der dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle ausgelöst.

Aus dem uneigentlichen Integral der Stromsignale konnte die verschobene Ladungsmenge berechnet (Abschnitt 2.4.4) werden. Dabei wurde zunächst überprüft, ob die Ladungsbeträge, die während der „on“- und „off“-Pulse verschoben wurden, innerhalb der Fehlergrenzen gleich waren, wie es bereits zuvor gezeigt wurde (Holmgren & Rakowski, 1993). In Abb. 3.1-3A ist der Mittelwert der aus den „off“-Strömen ermittelten Q-Werte aufgetragen. Der spannungsabhängige Verlauf war sigmoidal, mit den Sättigungswerten  $Q_{\text{min}}$  und  $Q_{\text{max}}$ . Daher wurde eine Approximation mit einer Boltzmann-Funktion (Gl. 2.4-12) durchgeführt. Mithilfe der durch die Boltzmann-Funktion bestimmten  $Q_{\text{min}}$  und  $Q_{\text{max}}$  wurden die Ladungswerte normiert, um so mögliche Expressionsunterschiede der verschiedenen Konstrukte, aber auch der verschiedenen Zellchargen auszugleichen. Der Steigungsfaktor  $z_q$ , der die während eines Elementarereignisses verschobene Ladung darstellt, betrug für das WT-Enzym ca. 0,8. Dieser Wert deckt sich mit bereits veröffentlichten Werten und könnte aufgrund der Translokation eines  $\text{Na}^+$ -Ions pro Pumpzyklus idealerweise bei 1 liegen (Holmgren & Rakowski, 1994; Tavrız et al., 2008).  $V_{0,5}$  ist das halbmaximale Potential der Ladungsverschiebung und lag für das WT-Protein bei  $(0,9 \pm 1,3) \text{ mV}$ . Das bedeutet, dass sich bei einem Potential von ca.  $1 \text{ mV}$  die Hälfte der Pumpmoleküle in der Membran entweder im  $E_1(\text{P})$ - oder im  $E_2(\text{P})$ -Zustand befindet (s. Reaktionsschema Abb. 1.2-1). Eine Verschiebung des  $V_{0,5}$ -Werts kann im Sinne einer veränderten apparenten  $\text{Na}^+$ -Affinität interpretiert werden. Ist der  $V_{0,5}$ -Wert zu negativen Potentialen hin verschoben, so wäre die apparente Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  niedriger, da es einer stärkeren Hyperpolarisation bedarf, um das Gleichgewicht der Reaktion hin zur  $\text{Na}^+$ -Rückbindung zu verschieben. Die Kompetitivität zwischen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  wäre also verändert, was sich auch in den  $\text{K}^+$ -induzierten Strömen und damit in den  $K_{0,5}(\text{Na}^+)$ -Werten zeigen würde: bei negativen Potentialen wäre die Hemmung des Vorwärts-Pumpstroms weniger effektiv, sodass die  $I(V)$ -Kurve insgesamt flacher und die  $K_{0,5}(\text{Na}^+)$ -Werte bei Hyperpolarisation niedriger sein würden als beim WT-Enzym.



**Abb. 3.1-3: Spannungsabhängigkeit und Kinetik transienter Ströme des WT-Proteins.**

A) Spannungsabhängige Ladungsverteilung aus den transienten „off“-Strömen des Wildtyp-Enzyms unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen ( $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 100 \text{ mM}$ ). Die Parameter der Boltzmann-Funktion, mit der die Kurve approximiert wurde, sind:  $Q_{\text{max}} = (2,3 \pm 0,3) \text{ nC}$ ;  $Q_{\text{min}} = (-6,7 \pm 0,7) \text{ nC}$ ;  $z_q = 0,77 \pm 0,02$ ;  $V_{0,5} = (0,9 \pm 1,3) \text{ mV}$ . Der Strom-Zeit-Verlauf unter  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschbedingungen (Abb. 2.4-4), aus dem für jedes angelegte Membranpotential die Zeitkonstante und die verschobene Ladung ermittelt wurden, ist in der kleinen Einschubfigur dargestellt.

B) Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstanten aus den „on“-Strömen des WT-Proteins unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen ( $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 100 \text{ mM}$ ). Die Kurve wurde mit einer Polynomfunktion approximiert.

Die Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstanten  $\tau^{-1}$  des WT-Proteins, die aus den „on“-Strömen bestimmt wurde, ist in Abb. 3.1-3B zu sehen. Bei negativen Potentialen wird die  $\text{Na}^+$ -Rückbindung stimuliert, d. h., dass das Gleichgewicht zwischen  $(3\text{Na}^+)\text{E}_1\text{P}$  und  $\text{E}_2\text{P}\cdot 3\text{Na}^+$  in Richtung des okkludierten  $\text{E}_1\text{P}$ -Zustands verschoben wird. Bei Hyperpolarisation unterhalb  $-140 \text{ mV}$  ist  $\tau^{-1}$  schnell und spannungsunabhängig, da in diesem Spannungsbereich die Okklusion von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  geschwindigkeitsbestimmend ist (hier nicht gezeigt (Holmgren et al., 2000)). Bei negativen Potentialen von  $-140$  bis  $-40 \text{ mV}$  sind die Relaxationskonstanten exponentiell spannungsabhängig, wie für einen elektrogenen Teilreaktionsschritt ( $\text{Na}^+$ -Rückbindung) zu erwarten (Abschnitt 1.2.3). Ab Potentialen  $> -30 \text{ mV}$  sind die Relaxationskonstanten spannungsunabhängig mit Werten von ca.  $100 \text{ s}^{-1}$ , hier ist die Deokklusion oder die vorgelagerte Konformationsänderung geschwindigkeitsbestimmend. Aus der Spannungsabhängigkeit von  $\tau^{-1}$  können somit Informationen über die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Ladungstranslokation gewonnen werden.

### 3.2 C-terminale und Wechselwirkungen mit der $\beta$ -Untereinheit betreffende HM-Mutationen

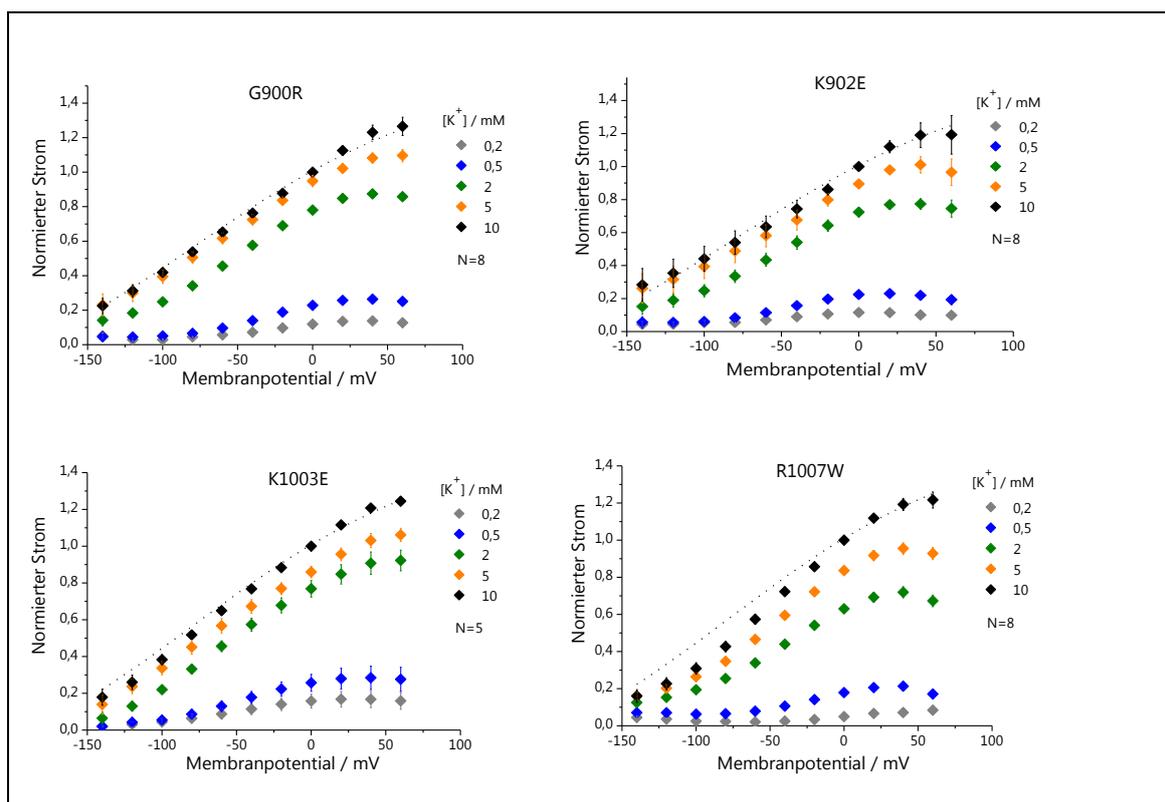
Elektrophysiologisch untersucht wurden die Auswirkungen humangenetisch nachgewiesener Mutationen in der  $\alpha_2$ -Untereinheit, die im Zusammenhang mit SHM oder FHM2 stehen (Abschnitt 1.3). Besonderes Augenmerk wurde dabei einerseits auf C-terminale Mutationen bzw. Mutationen in M10 (L994del, K1003E, R1007W, Y1009X) gelegt, da es über die Rolle des C-Terminus für die Funktionsweise der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase kaum Informationen gab, ihm aber anhand von Mutationsstudien ein wichtiger Einfluss auf die  $\text{Na}^+$ -Bindung zugeschrieben wurde (Morth et al., 2007; Tavraz et al., 2008). Dabei war vor allem Y1009X interessant, da der komplette C-Terminus fehlt, und R1007W, welches in einem Arginin-Cluster liegt, für das eine spannungssensorische Funktion vermutet wurde (Morth et al., 2007). Eine Untersuchung dieser Mutante könnte auch Hinweise auf einen gemeinsamen pathogenen Mechanismus von Migräne und Epilepsie geben, da ein Teil der Patienten mit der Mutation R1007W an FHM2 und Epilepsie litten (unveröffentlichte Daten von der Dr. Dario Pruna und Dr. Tiziana Pisano).

Andererseits waren Mutationen von Aminosäurepositionen von Interesse, die sich auf der Grundlage der Kristallstruktur in der Nähe von Interaktionsstellen mit der  $\beta$ -Untereinheit befinden: G855R in M7, welches drei Aminosäurepositionen von Gly852 entfernt ist, das Wasserstoffbrückenbindungen zu  $\beta\text{M}$  ausbilden kann; und G900R, sowie K902E, die sich beide im Bereich des hochkonservierten SYGQ-Motivs befinden (Abb. 1.1-3). Da die  $\beta$ -Untereinheit für den Transport des Proteins zur Membran und seine korrekte Faltung wichtig ist, war zu erwarten, dass diese Konstrukte, bei denen neutrale Reste gegen geladene (G855R, G900R) ausgetauscht waren oder sogar eine Ladungsumkehr erfolgte (K902E), erhebliche funktionelle Störungen bewirken könnten. Die Ergebnisse zu weiteren C-terminalen HM-Mutationen (D999H, R1002Q) werden im Abschnitt 3.3 gezeigt.

#### 3.2.1 Spannungs- und $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$ -Abhängigkeit stationärer Pumpströme

Es konnten nur für die Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W Pumpströme mit ausreichender Amplitude ( $> 10$  nA) gemessen werden. Die Konstrukte G855R, L994del und Y009X zeigten dagegen keine elektrophysiologisch messbare Pumpaktivität. In Abb. 3.2-1 ist die Spannungsabhängigkeit der  $\text{K}^+$ -induzierten Ströme in 100 mM extrazellulärem  $\text{Na}^+$  für die Konstrukte G900R, K902E, K1003E und R1007W dargestellt.

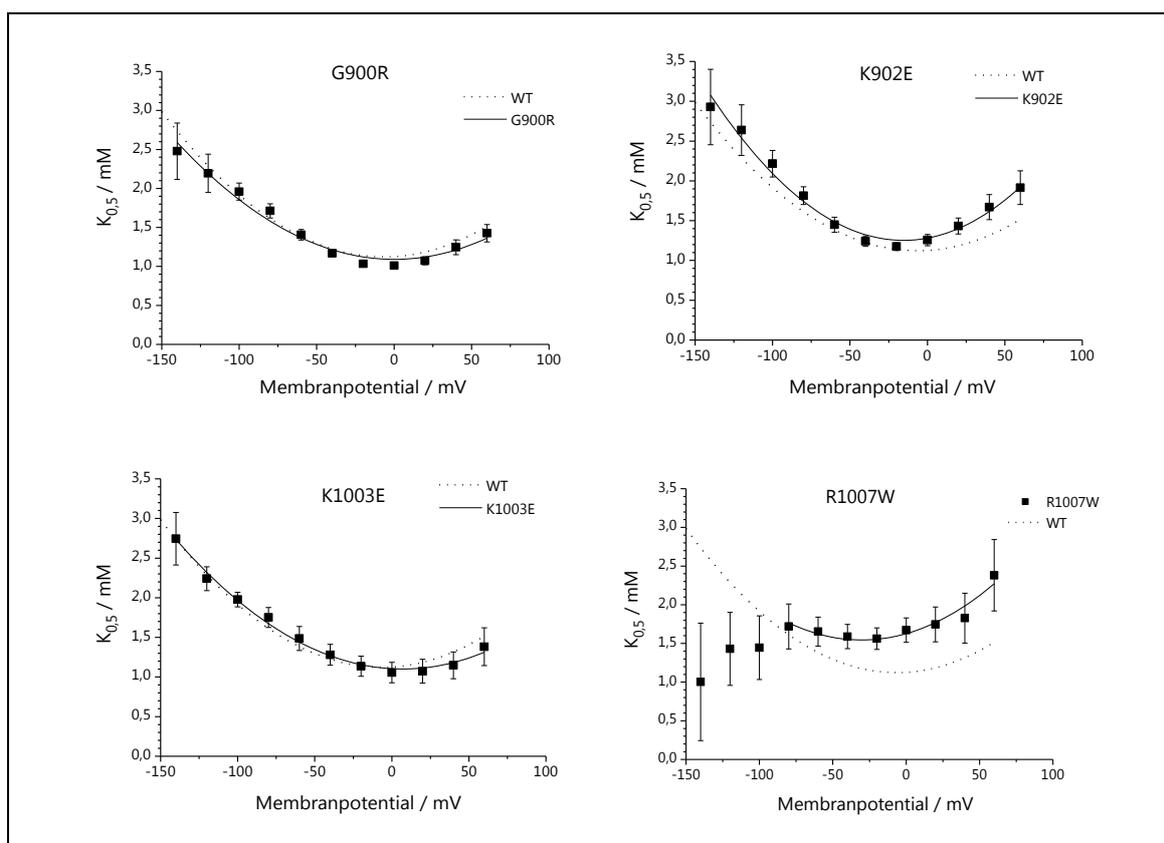
Der spannungsabhängige Verlauf der Pumpströme bei unterschiedlichen  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  unterschiedlich sich für die Konstrukte G900R, K902E und K1003E nicht signifikant von dem des Wildtyp-Enzyms. Bei R1007W hingegen stiegen die Pumpströme im Vergleich zum WT-Protein mit zunehmender Depolarisation weniger stark an, was auf eine verringerte apparente  $\text{K}^+$ -Affinität im negativen Potentialbereich hindeutet. Daher wurden die  $K_{0,5}(\text{Na}^+)$ -Werte aus den  $\text{K}^+$ -induzierten Strömen bei unterschiedlichen  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  für jedes angelegte Membranpotential bestimmt (Abb. 3.2-2).



**Abb. 3.2-1: Spannungs- und  $[K^+]_{ext}$ -Abhängigkeit stationärer Pumpströme der Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W bei  $[Na^+]_{ext} = 100$  mM.**

$K^+$ -induzierte Ströme der Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W in Abhängigkeit von der Spannung und der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration bei  $[Na^+]_{ext} = 100$  mM. Unterschiedliche  $[K^+]_{ext}$  sind durch verschiedene Farben dargestellt. Die I(V)-Kurve des Wildtyp-Enzyms bei 10 mM  $K^+$  ist jeweils gestrichelt dargestellt. Die Daten entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  S.E.) aus Messungen an N = 5-8 Oozyten aus mindestens drei unterschiedlichen Zellchargen.

Bei den Konstrukten G900R, K902E und K1003E folgten die  $K_{0,5}(Na^+)$ -Werte in Abhängigkeit vom Membranpotential einem parabelförmigen Verlauf. Auch die Absolutwerte der Minima (Tab. 3.2-1) unterschieden sich nicht von denen des WT-Enzyms. Im Vergleich dazu war die Spannungsabhängigkeit der  $K_{0,5}(Na^+)$ -Werte von R1007W deutlich verschieden. Im physiologischen Potentialbereich von  $V_m > -80$  mV ist die Kurve parabelförmig mit einem Minimum von 1,55 mM: die apparente  $K^+$ -Affinität ist also in diesem Bereich niedriger als beim WT-Protein. Wurde die Membran weiter hyperpolarisiert, sanken die  $K_{0,5}(Na^+)$ -Werte oder blieben zumindest im Bereich des experimentellen Fehlers konstant. Die relativ großen Fehlerspannen beruhen auf den überaus geringen Amplituden der  $K^+$ -induzierten Pumpströme in diesem Potentialbereich, so dass die Stromamplituden bei den verschiedenen  $[K^+]_{ext}$  dicht beieinander lagen. Dadurch lieferte die Hill-Approximation große Fehlerwerte und eine Aussage über eine tatsächliche Änderung der apparenten  $K^+$ -Affinität für  $V_m < -80$  mV ist nur mit Einschränkungen zu treffen. Mit dem WT-Enzym verglichen kann aus den Strömen bei Hyperpolarisation geschlossen werden, dass der Maximalstrom für ein bestimmtes Potential bei einer geringeren  $[K^+]_{ext}$  erreicht wurde, aber der Maximalstrom bei diesem Potential kleiner war als beim WT-Protein (Abb. 3.2-1). Wenn sich die apparente  $K^+$ -Affinität im negativen Potentialbereich nicht erhöht, ist das ein Hinweis auf verringerte Affinität für extrazelluläres  $Na^+$  (Abschnitt 3.1.1). Dies kann durch eine Auswertung der transienten Ströme unter  $K^+$ -freien Bedingungen weiter untersucht werden.

3.2 C-terminale und Wechselwirkungen mit der  $\beta$ -Untereinheit betreffende HM-Mutationen

**Abb. 3.2-2:  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Affinitäten der Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W.**

Gezeigt ist die Spannungsabhängigkeit der  $K_{0,5}(\text{Na}^+)$ -Werte aus den Strom-Spannungs-Verläufen in (Abb. 3.2-1) für die Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W (bei 100 mM  $\text{Na}^+$ ). Die Werte wurden mithilfe einer Polynomfunktion zweiten Grades approximiert. Der Kurvenverlauf des Wildtyp-Proteins ist zum Vergleich gestrichelt dargestellt. Um den minimalen  $K_{0,5}(\text{Na}^+)$ -Wert im physiologisch relevanten Bereich bestimmen zu können, wurde die Kurve für R1007W bei Potentialen  $> -80\text{mV}$  approximiert, da in diesem Potentialbereich der Verlauf vergleichbar der WT-Kurve parabelförmig ist.

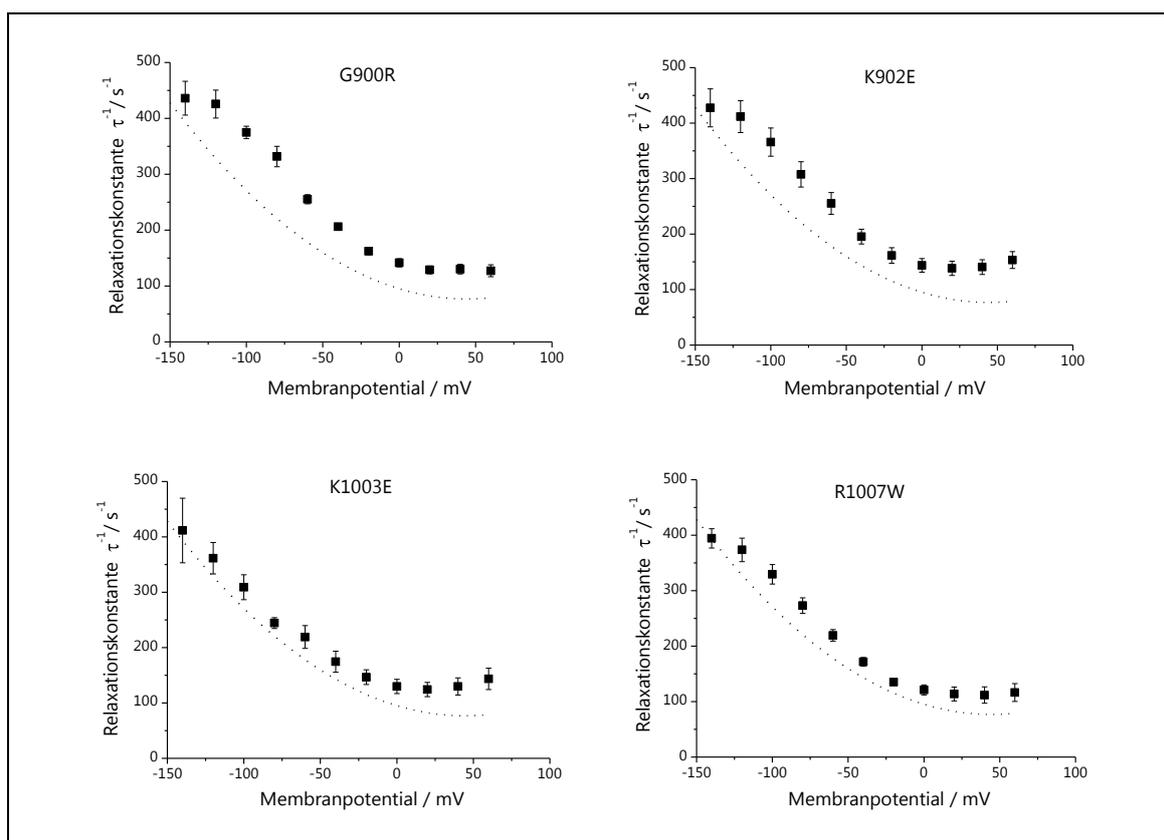
|        | minimaler $K_{0,5}$ -Wert / mM | Membranpotential bei minimalem $K_{0,5}$ -Wert / mV |
|--------|--------------------------------|---|
| WT     | $1,12 \pm 0,01$                | $-6,2 \pm 1,5$                                      |
| G900R  | $1,09 \pm 0,04$                | $0,2 \pm 4,7$                                       |
| K902E  | $1,25 \pm 0,03$                | $-15,2 \pm 2,3$                                     |
| K1003E | $1,10 \pm 0,03$                | $6,6 \pm 3,3$                                       |
| R1007W | $1,55 \pm 0,04$                | $-30,0 \pm 2,2$                                     |

**Tab. 3.2-1: Parameter der  $K_{0,5}(V)$ -Kurven für WT, G900R, K902E, K1003E und R1007W.**

Die minimalen  $K_{0,5}$ -Werte, die mithilfe einer Polynomfunktion zweiten Grades anhand der in Abb. 3.2-2 dargestellten Kurven ermittelt wurden, und das dazugehörige Membranpotential für das WT-Protein und die Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W. Da die Kurve von R1007W ab Potentialen unterhalb von  $-80\text{mV}$  nicht parabelförmig verlief, sondern sank, wurde diese Kurve nur im Potentialbereich von  $-80$  bis  $+60\text{mV}$  approximiert.

### 3.2.2 Spannungsabhängigkeit und Kinetik transienter Ströme

Um Veränderungen in der apparenten  $\text{Na}^+$ -Affinität zu untersuchen, wurden die transienten Ströme unter  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austausch-Bedingungen ermittelt. Die für die Konstrukte G900R, K902E, K1003E und R1007W ermittelten Relaxationskonstanten für die Ladungstranslokation sind in Abb. 3.2-3 dargestellt. Der spannungsabhängige Verlauf der Relaxationskonstanten für die Konstrukte G900R, K902E, K1003E und R1007W entsprach dem des Wildtyp-Proteins. Die Kinetik der Ladungstranslokation war für die vier mutierten Enzyme etwas schneller als beim WT-Enzym. Schwankungen von  $\tau^{-1}$  ergeben sich aus dem direkten Einfluss von Temperaturänderungen auf die Kinetik. Die Messungen wurden bei 20-23°C Raumtemperatur durchgeführt, allerdings können die Zeitkonstanten aufgrund der hohen Aktivierungsenergie (Abschnitt 3.3.4) bereits durch einen Temperaturunterschied von 1°C signifikant beeinflusst werden. Nichtsdestotrotz war insbesondere bei G900R und K902E der Anstieg von  $\tau^{-1}$  bei Potentialen unterhalb von 0 mV größer als bei der WT-Kurve. Bei diesen Mutanten könnte also die  $\text{Na}^+$ -Rückbindung schneller erfolgen als beim Wildtyp-Enzym. Zusätzlich erreichte  $\tau^{-1}$  bei G900R, K902E und R1007W bereits bei Potentialen unterhalb von -120 mV die Sättigung, während dies beim WT-Protein bei  $V < -140$  mV der Fall war.

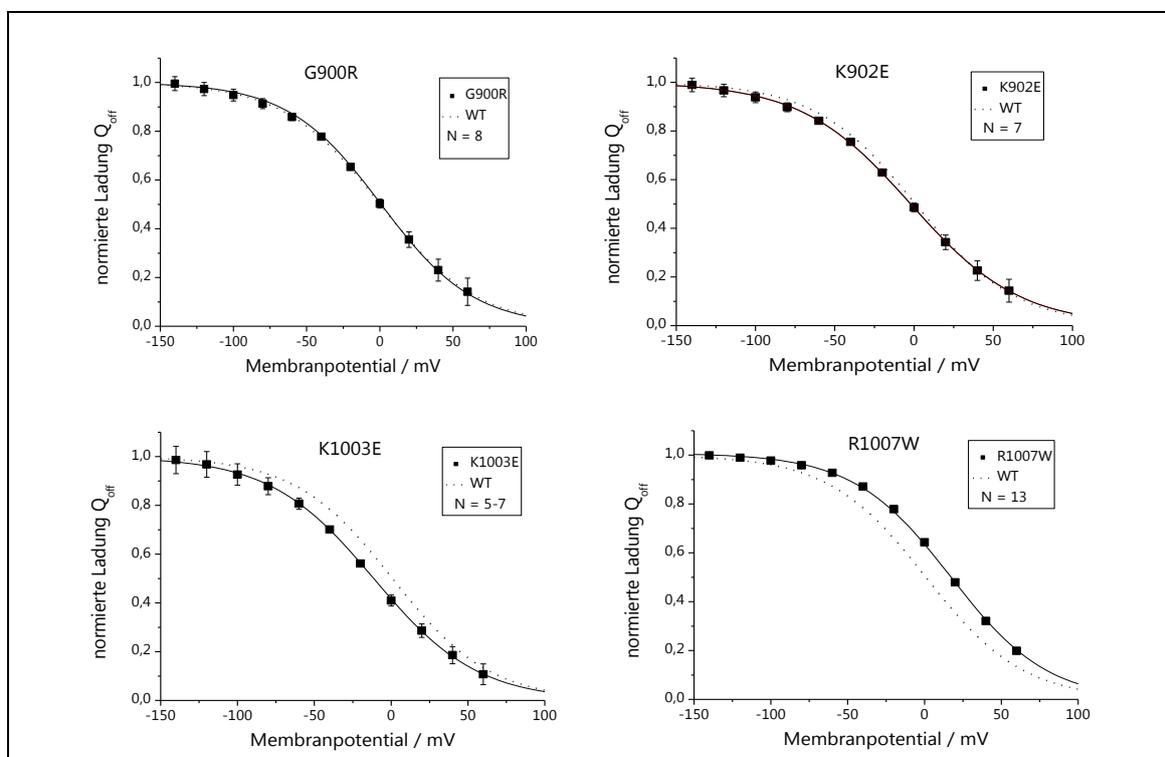


**Abb. 3.2-3: Spannungsabhängigkeit der reziproken Zeitkonstanten aus den transienten „on“-Strömen der Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen ( $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 100$  mM).** Die Kurve des Wildtyp-Proteins wurde mit einer Polynomfunktion approximiert und ist jeweils gestrichelt dargestellt.

3.2 C-terminale und Wechselwirkungen mit der  $\beta$ -Untereinheit betreffende HM-Mutationen

Allerdings ist zu bedenken, dass aufgrund der Verschlechterung des Stromsignals bei niedrigen Potentialen, die Zeitkonstanten stärker fehlerbehaftet sind, wodurch die Werte bei starker Hyperpolarisation mit denen des WT-Enzyms innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmen, sodass dieser Effekt schwer zu interpretieren ist.

Die Spannungsabhängigkeit der Ladungstranslokation und die Parameter der Boltzmann-Anpassung für die Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W sind der Abb. 3.2-4 und der Tab. 3.2-2 zu entnehmen. Für die Konstrukte G900R und K902E zeigte sich, dass es gegenüber dem WT-Enzym keine Abweichungen in der spannungsabhängigen Verteilung der Pumpmoleküle auf die  $E_1$ - und  $E_2$ -Zustände gab. Die  $Q(V)$ -Kurve von K1003E war um ca. 5-10 mV zu negativen Potentialen verschoben, was einer leicht verringerten apparenten Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  entsprechen könnte, die aber angesichts der gesamten, im Verhältnis zum WT-Protein unauffälligen elektrophysiologischen Charakterisierung als nicht schwerwiegend für die Aufrechterhaltung der Funktion eingestuft werden kann. Der  $V_{0,5}$ -Wert für R1007W hingegen war gemessen am WT-Protein um 17,5 mV ins Positive verschoben. Somit konnte die Annahme, die sich aus der spannungsabhängigen Bestimmung der  $K_{0,5}(\text{Na}^+)$ -Werte ergab, dass die apparente Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  verringert sein könnte, nicht bestätigt werden. Allerdings erklärt eine Erhöhung der apparenten  $\text{Na}^+$ -Affinität für R1007W den im Vergleich zum WT-Protein steileren Kurvenverlauf der  $\text{K}^+$ -induzierten Ströme insbesondere im negativen Potentialbereich (Abb. 3.2-1), da die Konkurrenz von  $\text{Na}^+$  mit  $\text{K}^+$  um die extrazellulären Bindungsstellen zugunsten von  $\text{Na}^+$  beeinflusst wird.



**Abb. 3.2-4:  $Q(V)$ -Kurven von G900R, K902E, K1003E und R1007W.**

Spannungsabhängige Ladungsverteilung aus den transienten „off“-Strömen der Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen ( $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 100 \text{ mM}$ ). Die Kurven wurden mithilfe einer Boltzmann-Funktion approximiert und anschließend normiert (Abschnitt 2.4.4). Der  $Q(V)$ -Verlauf des WT-Enzyms ist jeweils gestrichelt dargestellt. Die Daten entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  S.E.) aus Messungen an  $N = 5$ -13 Oozyten aus mindestens drei unterschiedlichen Zellchargen.

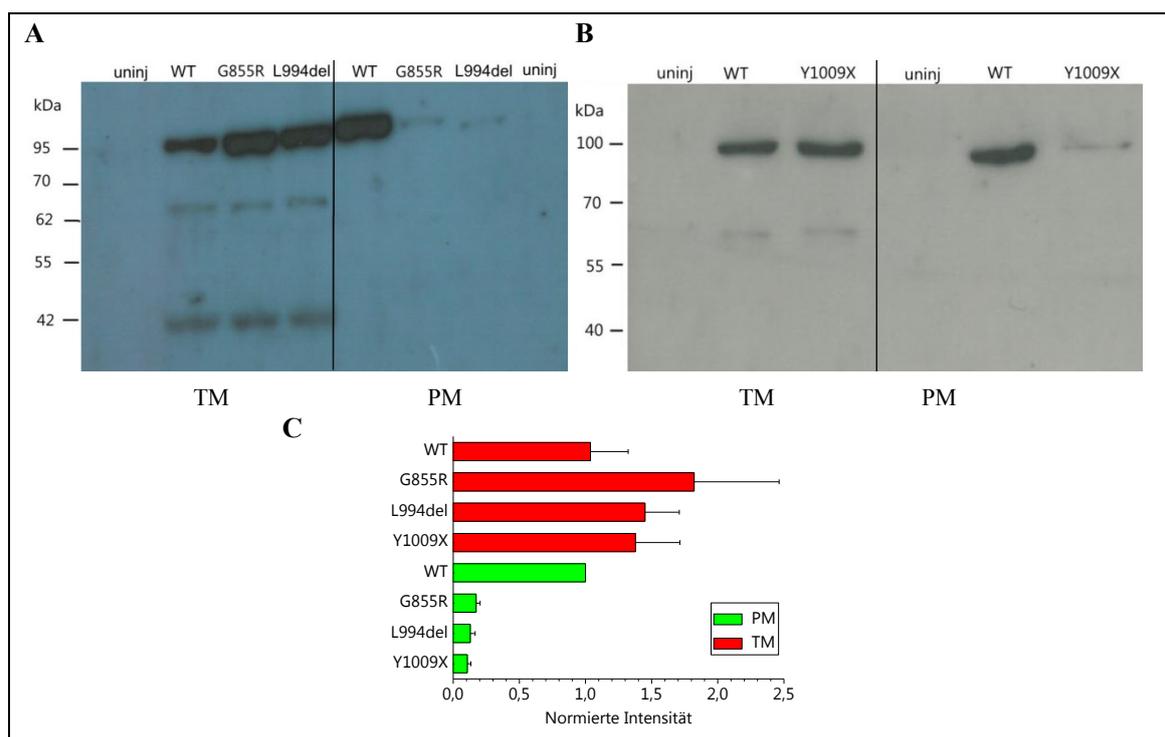
|        | $Q_{\min}$<br>(nC) | $Q_{\max}$<br>(nC) | $V_{0,5}$<br>(mV) | $z_q$           |
|--------|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------|
| WT     | $-6,7 \pm 0,7$     | $2,3 \pm 0,3$      | $0,9 \pm 1,3$     | $0,77 \pm 0,02$ |
| G900R  | $-2,14 \pm 0,01$   | $0,83 \pm 0,01$    | $0,3 \pm 3,1$     | $0,76 \pm 0,02$ |
| K902E  | $-2,08 \pm 0,01$   | $0,91 \pm 0,01$    | $-2,1 \pm 2,1$    | $0,81 \pm 0,02$ |
| K1003E | $-2,16 \pm 0,01$   | $1,25 \pm 0,01$    | $-11,3 \pm 4,3$   | $0,75 \pm 0,06$ |
| R1007W | $-5,3 \pm 0,1$     | $1,17 \pm 0,02$    | $17,5 \pm 0,8$    | $0,84 \pm 0,01$ |

Tab. 3.2-2: Parameter der Approximierung der Q(V)-Kurven durch eine Boltzmann-Funktion für das WT-Protein und die Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W.

### 3.2.3 Expression der elektrophysiologisch nicht charakterisierbaren Konstrukte

Da die Konstrukte G855R, L994del und Y1009X elektrophysiologisch nicht messbar waren, wurden Plasmamembran (PM)- und Totalmembranpräparationen (TM) von Oozyten, die mit cRNA dieser Konstrukte injiziert worden waren, hergestellt (Abschnitt 2.2.2). Damit sollte überprüft werden, ob die Proteine exprimiert werden und in die Plasmamembran gelangen. Diese Analyse empfiehlt sich, wenn durch die elektrophysiologischen Messungen keine eindeutige Expression festgestellt werden konnte. Wenn die Proteinexpression durch eine TM-Präparation nachgewiesen werden kann, sich das Protein aber nicht in der Plasmamembran befindet, ist das ein Hinweis darauf, dass der Transport vom Zytosol zur Plasmamembran gestört ist. Kann das Protein auch nicht oder in geringerer Menge in der TM-Fraktion nachgewiesen werden, so ist viel mehr die Expression bzw. der Transport des Proteins vom Endoplasmatischen Retikulum zur Membran gestört, was z. B. durch eine Fehlfaltung verursacht sein kann, da das Protein dann schon im ER abgebaut würde.

In Abb. 3.2-5 sind repräsentative Western Blots mit TM- und PM-Proben der Konstrukte G855R, L994del (Abb. 3.2-5A) und Y1009X (Abb. 3.2-5B) abgebildet. Die densitometrische Auswertung aus vier vergleichbaren Western Blots (also vier Zellchargen) pro Konstrukt ergab, dass die Expression der mutierten Konstrukte nicht gestört ist (Abb. 3.2-5C). In der TM-Fraktion konnten die Konstrukte sogar höher konzentriert nachgewiesen werden als das WT-Protein. Allerdings zeigte sich in der Analyse der Plasmamembranpräparation, dass alle drei mutierten Proteine nur minimal oder auch gar nicht in die Plasmamembran gelangten, während das WT-Enzym eindeutig nachweisbar war. Für G855R, L994del und Y1009X betragen die Bandenintensitäten der PM-Fraktion nur 10-20 % derer des WT-Enzyms. Somit scheinen sich die mutierten Konstrukte im Zytoplasma anzureichern und das Targeting zur Plasmamembran gestört zu sein.



**Abb. 3.2-5: Repräsentative Western Blots von L994del, G855R und Y1009X.**

Aufgetragen sind Proben aus der Totalmembranpräparation (rechts, TM) und den Plasmamembranpräparationen (links, PM) für die Konstrukte L994del, G855R (A) und Y1009X (B). Zum Vergleich wurden jeweils auch Proben von uninjizierten Oozyten und WT-Proben aufgetragen.

C) Aus der densitometrischen Analyse erhaltene Bandenintensitäten aus den Western Blots für das WT-Protein und die Konstrukte G855R, L994del und Y1009X. Für jedes Konstrukt wurden Western Blots aus vier unabhängigen Experimenten ausgewertet. In jedem Experiment wurde auf die Intensität des Wildtyp-Signals der PM-Probe normiert.

### 3.3 Strukturelevante Aminosäurepositionen im Bereich der dritten Natrium-Bindungsstelle

Es gibt eine Anzahl von Aminosäuren, von denen vermutet wird, dass sie strukturell relevant für einen intrazellulären Ionen-Zugangskanal hin zur dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle sind oder aber an der Stabilisierung dieser Bindungsstelle beteiligt sein könnten (Abschnitt 1.1.3 und 1.2.4). Die C-terminalen Tyrosine bilden durch Interaktionen mit den Aminosäuren Arg937, Asp999 und Arg1002 (bei denen insbesondere H-Brücken beteiligt sind) ein Netzwerk bis zum Rest Asp930, welcher nahe an der Bindungsstelle III liegt. Diese intrazelluläre Kavität könnte ein Zugangsweg für Protonen sein, da in einer molekulardynamischen Simulation gezeigt werden konnte, dass  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle in diesen Zugangskanal eindringen können, und zwar abhängig von der strukturellen Beschaffenheit des C-Terminus (Abb. 1.1-5 und Abb. 1.2-4 aus Poulsen et al., 2010). Des Weiteren können die C-terminalen Tyrosine mit Lys770 in M5 interagieren. Da ein weiterer Rest von M5 (mutmaßlich Tyr775 oder auch Thr778) das dritte  $\text{Na}^+$ -Ion direkt koordinieren kann (Abb. 1.1-5), sind Tyr1019 und Tyr1020 strukturell relevant für die Kationenbindung. Das Konstrukt  $\Delta\text{KETYY}$ , in dem die letzten fünf Aminosäuren deletiert waren, wurde bereits untersucht und zeigte eine deutliche Verringerung der  $\text{Na}^+$ -Affinität (Morth et al., 2007). Daher ist es von Interesse ausschließlich den Einfluss der beiden C-terminalen Tyrosine zu untersuchen, und zwar anhand des Konstrukts  $\Delta\text{YY}$ , in dem die Tyrosine deletiert sind.

Auch für die Aminosäure Arg937 wurde gezeigt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Na<sup>+</sup>-Bindung spielt, wobei vermutet wird, dass sie ein wichtiges strukturelles Bindeglied zwischen C-Terminus und der Bindungsstelle III ist (Toustrup-Jensen et al., 2009). Die FHM-Mutation R937P wurde bereits elektrophysiologisch charakterisiert und zeigte erhebliche Funktionseinschränkungen (Tavraz et al., 2008; Poulsen et al., 2010). Daher wurde überprüft, wie sich die Mutation dieser Aminosäure in einen polaren (R937S) und einen unpolaren Rest (R937L) auf die Funktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase auswirkt. Im Folgenden werden also die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen an den HM-Mutanten D999H und R1002Q, sowie an den Konstrukten R937S, R937L und ΔYY präsentiert. Diese Mutanten unterschieden sich in ihrer Funktionalität teilweise erheblich vom WT-Protein. Daher war es nötig, zusätzlich zu den standardisierten Messmethoden, wie sie in Abschnitt 3.1 für das WT-Enzym beschrieben wurden, weitere elektrophysiologische Untersuchungen vorzunehmen und die Auswertungsmethodik anzupassen.

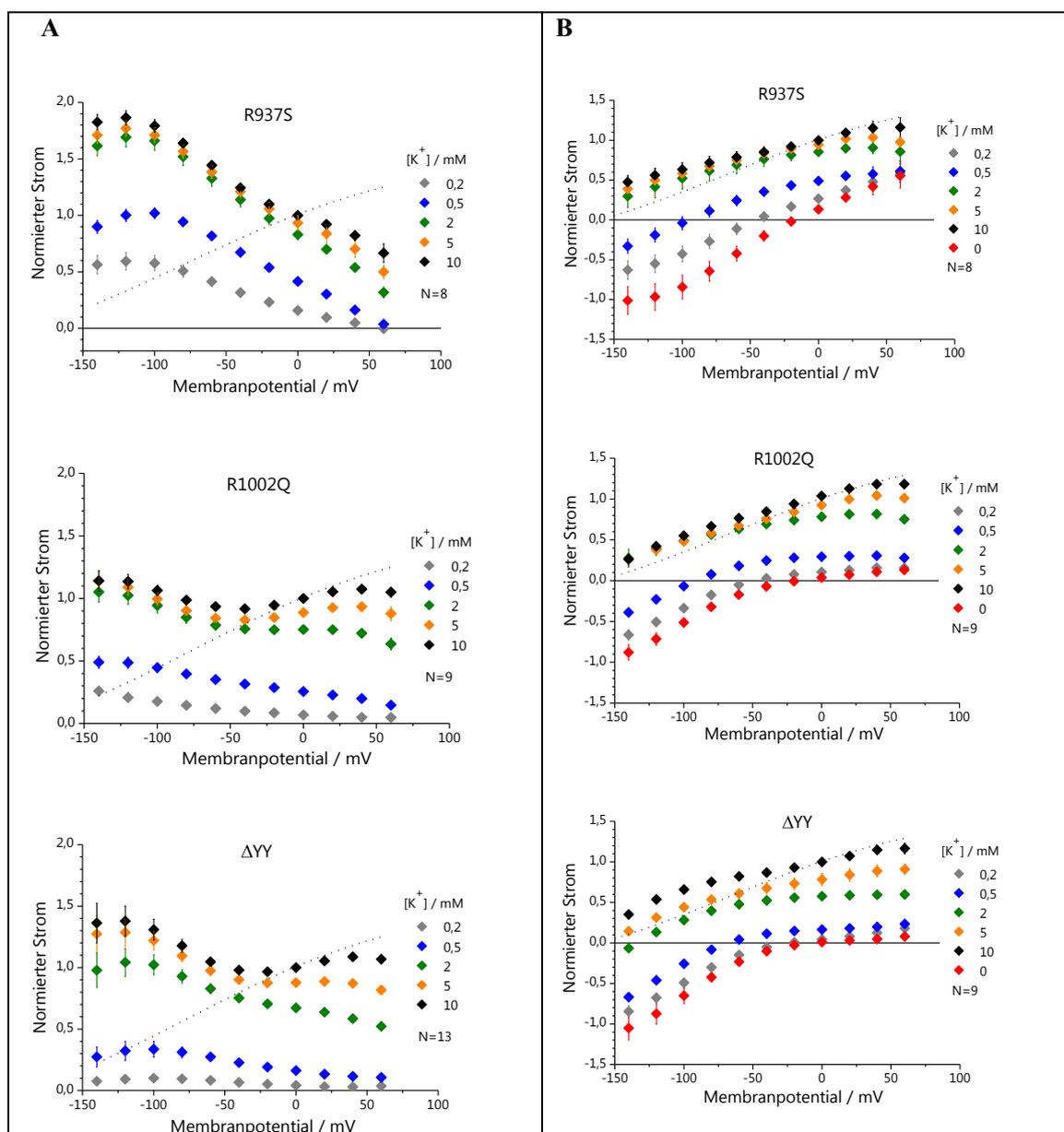
Zum besseren Verständnis der folgenden Ergebnisse sei dies kurz erläutert. Wie in Abschnitt 3.1.1 für das WT-Enzym beschrieben, entsprechen die K<sup>+</sup>-induzierten Ströme den K<sup>+</sup>-abhängigen ouabainsensitiven Strömen und somit den eigentlichen stationären Pumpströmen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Für die im Folgenden beschriebenen Konstrukte war dies jedoch nicht der Fall, da je nach eingefügter Mutation stationäre ouabainsensitive Leckströme sowohl in Na<sup>+</sup>-haltigen und Na<sup>+</sup>-freien Lösungen auftraten. Diese Art von Strömen wurden auch beim WT-Enzym beobachtet, aber nur unter K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen (Abb. 3.1-2B). Da sich die hier untersuchten Aminosäurepositionen in einem mutmaßlichen intrazellulären Zugangskanal für Na<sup>+</sup>- und H<sup>+</sup>-Ionen befinden, sei auf die besondere Bedeutung dieser Leckströme und auf die Differenzierung der Ionenselektivität hingewiesen.

### 3.3.1 Spannungs- und [K<sup>+</sup>]<sub>ext</sub>-Abhängigkeit stationärer Ströme

#### Stationäre Ströme in Na<sup>+</sup>-haltigen Lösungen

Zunächst wurden Spannungspulsexperimente bei verschiedenen extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentrationen in Na<sup>+</sup>-haltigen Lösungen durchgeführt. Die Konstrukte R937S, D999H, R1002Q und ΔYY wiesen deutliche Veränderungen bezüglich ihres spannungsabhängigen Pumpverhaltens im Vergleich zum WT-Protein auf (Abb. 3.3-1). Bei allen vier Konstrukten wurden unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen ouabainsensitive, einwärts gleichgerichtete Leckströme bei Hyperpolarisation gemessen, die eine stationäre Komponente aufwiesen und sich auch in ihrem Zeitverlauf deutlich von den „konventionellen“ ouabainsensitiven transienten Strömen des WT-Proteins deutlich unterschieden. Die Stromamplituden dieser Leckströme des Konstrukts D999H waren kleiner als die der anderen drei Konstrukte (Abb. 3.3-1B und Abb. 3.3-2B). Das WT-Enzym wies unter gleichen Bedingungen nur vernachlässigbar kleine Leckströme auf (Abb. 3.1-1A und Abb. 3.1-2A). R937S zeigte zusätzlich stationäre Ausströme bei positiven Potentialen (s. auch Abschnitt 3.3.2), während R937L unter bestimmten Bedingungen sogar auswärts gleichgerichtete Leckströme aufwies. Die Strom-Spannungskennlinien wurden daher auf zwei unterschiedliche Weisen ermittelt, um den Einfluss dieser Leckströme auf die K<sup>+</sup>-Affinität und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpströme zu untersuchen. Zum Vergleich zu den K<sup>+</sup>-induzierten Strömen <sup>Na</sup>I<sub>xK</sub> (Abb. 3.3-1A) wurden K<sup>+</sup>-abhängige ouabainsensitive Ströme <sup>Na</sup>I<sub>xK,ouab</sub> (Abb. 3.3-1B) bestimmt.

## 3.3 Strukturelevante Aminosäurepositionen im Bereich der dritten Natrium-Bindungsstelle



**Abb. 3.3-1: Spannungsabhängigkeit der K<sup>+</sup>-induzierten und ouabainsensitiven Ströme bei verschiedenen [K<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> und bei [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> = 100 mM der Mutanten R937S, R1002Q und ΔYY.**

Gezeigt sind die K<sup>+</sup>-induzierten Ströme (A) und die K<sup>+</sup>-abhängigen ouabainsensitiven Ströme (B). Die I(V)-Kurve des Wildtyp-Enzyms bei 10 mM K<sup>+</sup> ist gestrichelt dargestellt. Die Daten entsprechen Mittelwerten (± S.E.) aus Messungen an N = 8-13 Oozyten aus mindestens drei unterschiedlichen Zellchargen.

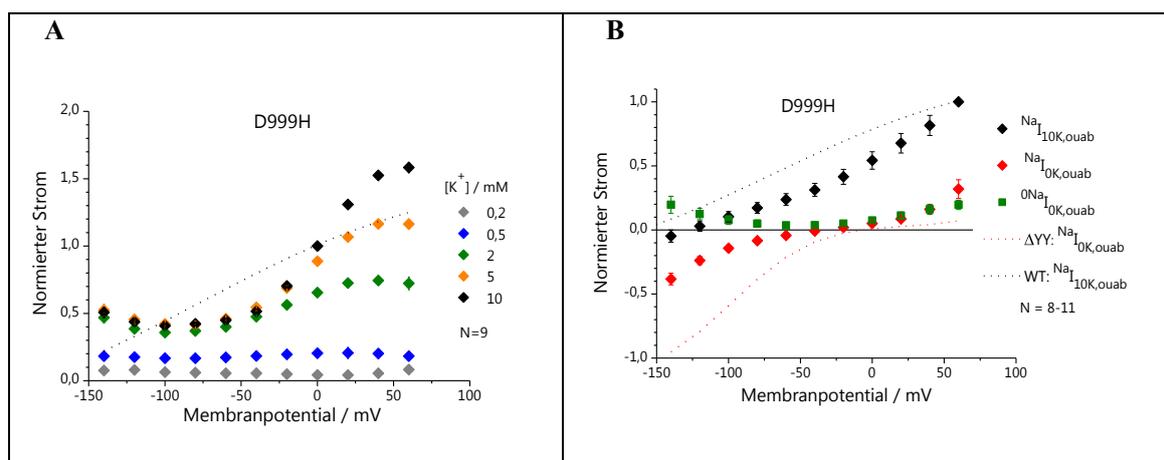
Bei einer K<sup>+</sup>-Konzentration von 10 mM wiesen die ouabainsensitiven I(V)-Kurven der Konstrukte R937S, ΔYY und R1002Q (wenn auch nicht so ausgeprägt) im negativen Potentialbereich unter 0 mV eine geringere Spannungsabhängigkeit im Vergleich zum WT-Protein auf (Abb. 3.3-1B). Das deutet auf eine veränderte Kompetitivität zwischen extrazellulärem Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> um ihre extrazellulär orientierten Bindungsstellen hin. Für niedrigere K<sup>+</sup>-Konzentrationen, insbesondere bei 0,2 und 0,5 mM wiesen die K<sup>+</sup>-abhängigen ouabainsensitiven Ströme negative Amplituden auf (Abb. 3.3-1B). Da in Abwesenheit von extrazellulärem K<sup>+</sup> bei einer Hyperpolarisation von unter -20 mV ausgeprägte einwärtsgerichtete Leckströme zu beobachten sind (Abb. 3.3.-1B, -2B), kann vermutet werden, dass es sich bei den Einwärtsströmen, die bei niedrigen K<sup>+</sup>-Konzentrationen detektiert wur-

den, um eine Überlagerung zweier verschiedener Effekte handeln könnte: zum einen dem einwärtsgerichteten Leckstrom und zum anderen dem auswärtsgerichteten  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpstrom. Dabei ist denkbar, dass der mit der  $\text{K}^+$ -Bindung einhergehende Pumpstrom gleichzeitig eine Hemmung des Leckstroms verursacht, da die Konformationsänderungen des Enzyms während des Reaktionszyklus‘ die Permeationswege, die für den Leckstrom benötigt werden, beeinträchtigen könnten.

Im unterschiedlichen Kurvenverlauf der  $\text{K}^+$ -abhängigen ouabainsensitiven (Abb. 3.3-1B) und der  $\text{K}^+$ -induzierten Ströme (Abb. 3.3-1A) zeigte sich bei den Mutanten der Einfluss der Leckströme. So wiesen die  $\text{K}^+$ -induzierten I(V)-Verläufe von R937S ausgehend von -140 mV über den gesamten hier getesteten Potentialbereich eine negative Steigung auf. Für die Konstrukte R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  wichen die  $\text{K}^+$ -induzierten Ströme vom WT-Verlauf insofern ab, als dass die Ströme bei einer Hyperpolarisation von unter -40 mV nicht mehr sanken, sondern – im Gegenteil – wieder anstiegen. Allein diese Unterschiede zu den  $\text{K}^+$ -abhängigen ouabainsensitiven Strömen dieser Konstrukte, die beim WT-Protein in dieser Art nicht gemessen wurden (Abschnitt 3.1.1), machen deutlich, dass der eigentliche  $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$ -Pumpstrom bei den Mutanten durch andere mechanistische Effekte überlagert ist.

Für D999H waren die  $\text{K}^+$ -induzierten Ströme im Vergleich zum WT-Enzym deutlich verändert (Abb. 3.3-2A). Generell waren die Ströme der Mutante im negativen Potentialbereich im Vergleich zu ihrer Maximalstromamplitude gering. Dennoch waren sie bei +60 mV in der gleichen Größenordnung wie beim WT-Enzym (100-200 nA), was zeigt, dass sie bei diesem Potential eine dem WT-Protein vergleichbare Aktivität aufweist. Die I(V)-Kennlinien bei 2, 5 und 10 mM  $\text{K}^+$  waren im Potentialbereich zwischen -120 und -40 mV im Wesentlichen konstant und stiegen bei Hyperpolarisation unter -100 mV sogar wieder an. Im depolarisierenden Spannungsbereich begannen die Ströme bei Potentialen ab -20 mV steil anzusteigen. Dies zeigt, dass das Membranpotential in diesem Spannungsbereich einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Vorwärtspumpaktivität von D999H hatte als beim WT-Enzym. Bei 0 mV war die Stromamplitude im Verhältnis zur maximalen Stromamplitude von D999H immer noch kleiner als beim WT-Protein (Abb. 3.3-2A). Da aber die ouabainsensitiven Leckströme ins Verhältnis zum  $\text{K}^+$ -abhängigen Vorwärtspumpstrom gesetzt werden sollten, erschien es zweckdienlicher, die ouabainsensitiven I(V)-Kennlinien neu zu normieren, und zwar auf die Amplituden bei 10 mM  $\text{K}^+$  und +60 mV, da erst dort das Strom-Maximum sowohl für das WT-Enzym und D999H gemessen wurde (Abb. 3.3-2B).

Für D999H lag die auf den Maximalstrom normierte ouabainsensitive I(V)-Kurve bei 10 mM  $\text{K}^+$  über den gesamten hier getesteten Potentialbereich unterhalb der WT-Kurve und wurde ab -140 mV sogar negativ (Abb. 3.3-2B). Außerdem wies auch D999H einen einwärts gleichgerichteten Leckstrom bei Hyperpolarisation unterhalb von -60 mV auf (rote Karos in Abb. 3.3-2B). Zum Vergleich wurde der ouabainsensitive Leckstrom von  $\Delta\text{YY}$  (der in der gleichen Größenordnung wie bei R937S und R1002Q war) auch auf die Stromamplitude bei 10 mM  $\text{K}^+$  und +60 mV normiert. Dadurch wird deutlich, dass der ouabainsensitive Leckstrom von D999H im Verhältnis zum Maximalstrom signifikant kleiner ist als bei  $\Delta\text{YY}$  (rot gestrichelte Linie in Abb. 3.3-2B).



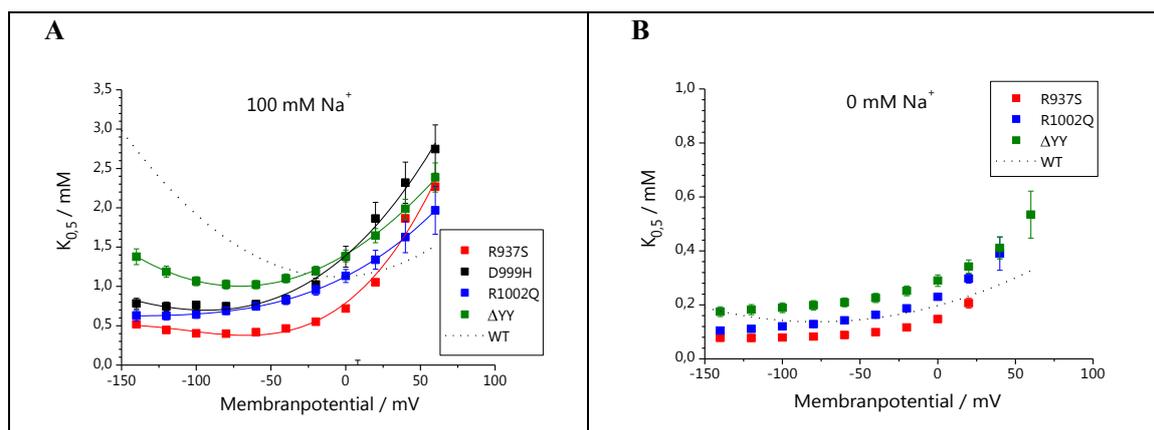
**Abb. 3.3-2: I(V)-Kennlinien der Mutanten D999H unter verschiedenen Bedingungen.**

A) Gezeigt sind die  $K^+$ -induzierten Ströme von D999H bei verschiedenen  $[K^+]_{ext}$ . Die Ströme wurden innerhalb eines Experiments auf die Amplituden bei 10 mM  $[K^+]_{ext}$  und 0 mV normiert. Die I(V)-Kurve des WT-Enzyms bei 10 mM  $K^+$  ist gestrichelt dargestellt.

B) Gezeigt sind ouabainsensitive Ströme, die auf die Amplituden bei 10 mM  $[K^+]_{ext}$  und +60 mV normiert wurden. Für D999H ist die I(V)-Kennlinie bei 10 mM  $K^+$  und 100 mM  $Na^+$  (schwarze Karos) und ouabainsensitiven Leckströme bei 0 mM  $Na^+$  (grüne Karos) und 100 mM  $Na^+$  (rote Karos) gezeigt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die I(V)-Kennlinie bei 10 mM  $K^+$  und 100 mM  $Na^+$  des WT-Enzyms (schwarz gestrichelt) und die Leckströme von  $\Delta YY$  bei 0 mM  $K^+$  und 100 mM  $Na^+$  (rot gestrichelt) auch jeweils auf die Amplituden bei 10 mM  $[K^+]_{ext}$  und +60 mV normiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  S.E.) aus Messungen an  $N = 8-11$  Oozyten aus mindestens drei unterschiedlichen Zellchargen.

Die aus den  $K^+$ -induzierten Strömen in Abb. 3.3-1A und Abb. 3.3-2A bestimmten  $K_{0,5}(Na^+)$ -Werte sind in Abb. 3.3-3A dargestellt. Die Spannungsabhängigkeit der apparenten  $K^+$ -Affinitäten aller vier Konstrukte unterschieden sich signifikant von der des WT-Enzyms. Für die Konstrukte R937S, D999H und R1002Q folgten die Kurven ab Potentialen unterhalb von -80 mV keiner Parabel mehr, sondern blieben annähernd konstant, während die Kurve von  $\Delta YY$  insgesamt parabelförmig verlief, allerdings mit einem stark nach hyperpolarisierenden Potentialen verschobenen Minimum.

Des Weiteren waren die minimalen  $K_{0,5}(Na^+)$ -Werte der Konstrukte R937S, D999H und R1002Q um ca. zwei Drittel (R937S) bzw. ein Drittel (D999H und R1002Q) kleiner als die von  $\Delta YY$  und WT und die Minima waren, soweit erkennbar, deutlich um ca. 70 mV in den negativen Potentialbereich verschoben (Tab. 3.3-1). Diese Erhöhung der apparenten  $K^+$ -Affinität kann als Destabilisierung des  $E_2P$ -Zustands interpretiert werden, da beim WT-Protein die  $Na^+$ -Rückbindung bei Hyperpolarisation stimuliert wird; andererseits könnten diese Effekte auch auf Änderungen einzelner Schritte im Pumpzyklus und insbesondere ihrer Kinetik zurückgeführt werden. Allein anhand der hier erhaltenen Ergebnisse können somit keine eindeutigen Rückschlüsse über veränderte  $K^+$ -Affinitäten der mutierten Pumpen getroffen werden, da die  $K^+$ -stimulierte Inhibition der Einwärtsleckströme einerseits und die  $Na^+/K^+$ -Pumpströme andererseits bei Hyperpolarisation nicht exakt voneinander getrennt werden konnten.



**Abb. 3.3-3: Spannungsabhängigkeit der aus  $K_{0,5}$ -Werte von D999H, R937S, R1002Q und  $\Delta YY$ .**

Die Werte wurden aus Abb. 3.3-1A und Abb. 3.3-2A in  $[Na^+]_{ext} = 100 \text{ mM}$  (A) und aus Abb. 3.3-5A in  $[Na^+]_{ext} = 0 \text{ mM}$  (B) bestimmt. Zum Vergleich wurde die durch eine Polynomfunktion approximierten WT-Kurve als gestrichelte Linie eingefügt.

|             | minimaler $K_{0,5}(Na^+)$ -Wert / mM | Membranpotential bei minimalem $K_{0,5}(Na^+)$ -Wert / mV |
|-------------|--------------------------------------|---|
| WT          | $1,12 \pm 0,01$                      | $-6,2 \pm 1,5$  |
| R937S       | $0,38 \pm 0,01$                      | $-65,9 \pm 1,6$   |
| D999H       | $0,67 \pm 0,08$                      | $-97,6 \pm 4,4$   |
| R1002Q      | $0,65 \pm 0,01$                      | $-100,3 \pm 2,8$  |
| $\Delta YY$ | $1,01 \pm 0,01$                      | $-70,7 \pm 0,4$   |

**Tab. 3.3-1: Parameter der spannungsabhängigen  $K_{0,5}(Na^+)$ -Kurven für WT, R937S, D999H, R1002Q und  $\Delta YY$ .**

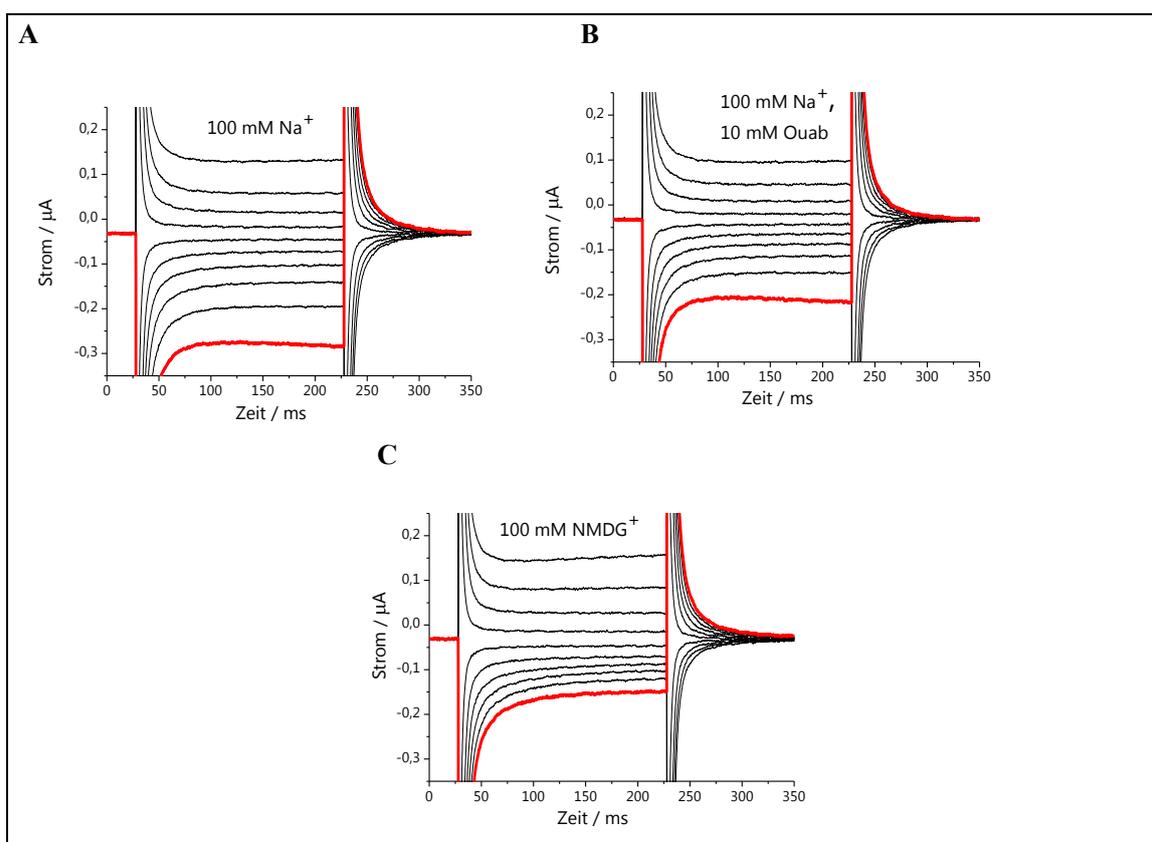
Die minimalen  $K_{0,5}(Na^+)$ -Werte wurden mithilfe einer Polynomfunktion zweiten Grades ( $\Delta YY$ , WT) bzw. dritten Grades (R937S, D999H, R1002Q) anhand der in Abb. 3.3-3A dargestellten Kurven ermittelt. Zusätzlich ist das dazugehörige Membranpotential angegeben, an dem die Polynomkurven ein Minimum aufwiesen.

#### Stationäre Ströme in $Na^+$ -freien Lösungen

Um weitere Informationen zur apparenten  $K^+$ -Affinität der Mutanten zu bekommen, also um die Frage zu klären, ob die beiden gemeinsamen  $Na^+$ - bzw.  $K^+$ -Bindungsstellen des Enzyms von den Mutationen betroffen sind, wurden Strom-Spannungs-Kennlinien für  $K^+$ -induzierte (Abb. 3.3-5A) und ouabainsensitive Ströme (Abb. 3.3-5B) in  $Na^+$ -freien Lösungen ( $100 \text{ mM NMDG}^+$ ) für die Konstrukte R937S, R1002Q und  $\Delta YY$  ermittelt. D999H zeigte kleine jedoch positive ouabainsensitive Leckströme, selbst bei negativen Potentialen (grüne Quadrate in Abb. 3.3-2B). Ein solches Verhalten lässt sich nach bisherigem Verständnis nicht erklären. Um ouabainsensitive Ströme bei D999H zu messen, wurden nur Puffer mit  $100 \text{ mM Na}^+$  und  $10 \text{ mM Ouabain}$  als „Hintergrundmessung“ zur Differenzbildung verwendet. Dieses Assayverfahren wurde gewählt, da es nur schwer möglich ist, eine Zelle in der begrenzt zur Verfügung stehenden Messzeit mehrmals einem Puffer mit  $10 \text{ mM Ouabain}$  auszusetzen. Bei allen anderen Konstrukten wurden die Leckströme vollständig durch  $10 \text{ mM Ouabain}$  gehemmt. Bei der D999H-Mutante ist dies möglicherweise nicht der Fall. In Abb. 3.3-4 sind Originalstromspuren an einer Zelle gezeigt, die die D999H-Mutante exprimiert. Gegenüber den Strömen in ouabainfreien (d. h. Konzentrationen von  $10 \mu\text{M}$ ) Puffern gingen die Ströme in  $Na^+$ -Puffer mit  $10 \text{ mM Ouabain}$  bei hyperpolarisierenden Potentialen nur leicht zurück,

## 3.3 Strukturelevante Aminosäurepositionen im Bereich der dritten Natrium-Bindungsstelle

während die Ströme in 100 mM NMDG<sup>+</sup> (bereits bei 10  $\mu$ M Ouabain) sehr viel stärker zurückgingen. Daher kommt es bei der Differenzbildung aus Strömen in NDMG<sup>+</sup>- und Strömen in Na<sup>+</sup>-Puffer inklusive 10 mM Ouabain zu einer positiven Amplitude, auch bei hyperpolarisierenden Potentialen (konsistente Beobachtung bei sechs Zellen aus drei Zellchargen). Daher ist anzunehmen, dass die Na<sup>+</sup>-abhängigen Leckströme bei D999H durch Ouabain nicht mehr hinreichend inhibiert werden konnten. In diesem Zusammenhang ist es auch schwierig, die ouabainsensitiven Leckströme in Na<sup>+</sup>-haltigen Puffern zu bewerten (rote Kurve in Abb. 3.3.-2B), da diese unter Umständen größer waren, was allerdings durch die Differenzbildung nicht deutlich wurde.



**Abb. 3.3-4: Strom-Zeit-Verläufe in K<sup>+</sup>-freien Puffern von D999H.**

Gezeigt sind die originalen Stromspuren einer Zelle, die für die Bildung von ouabainsensitiven Differenzströmen unter K<sup>+</sup>-freien Bedingungen verwendet wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit ist die Stromspur bei -140 mV rot eingefärbt.

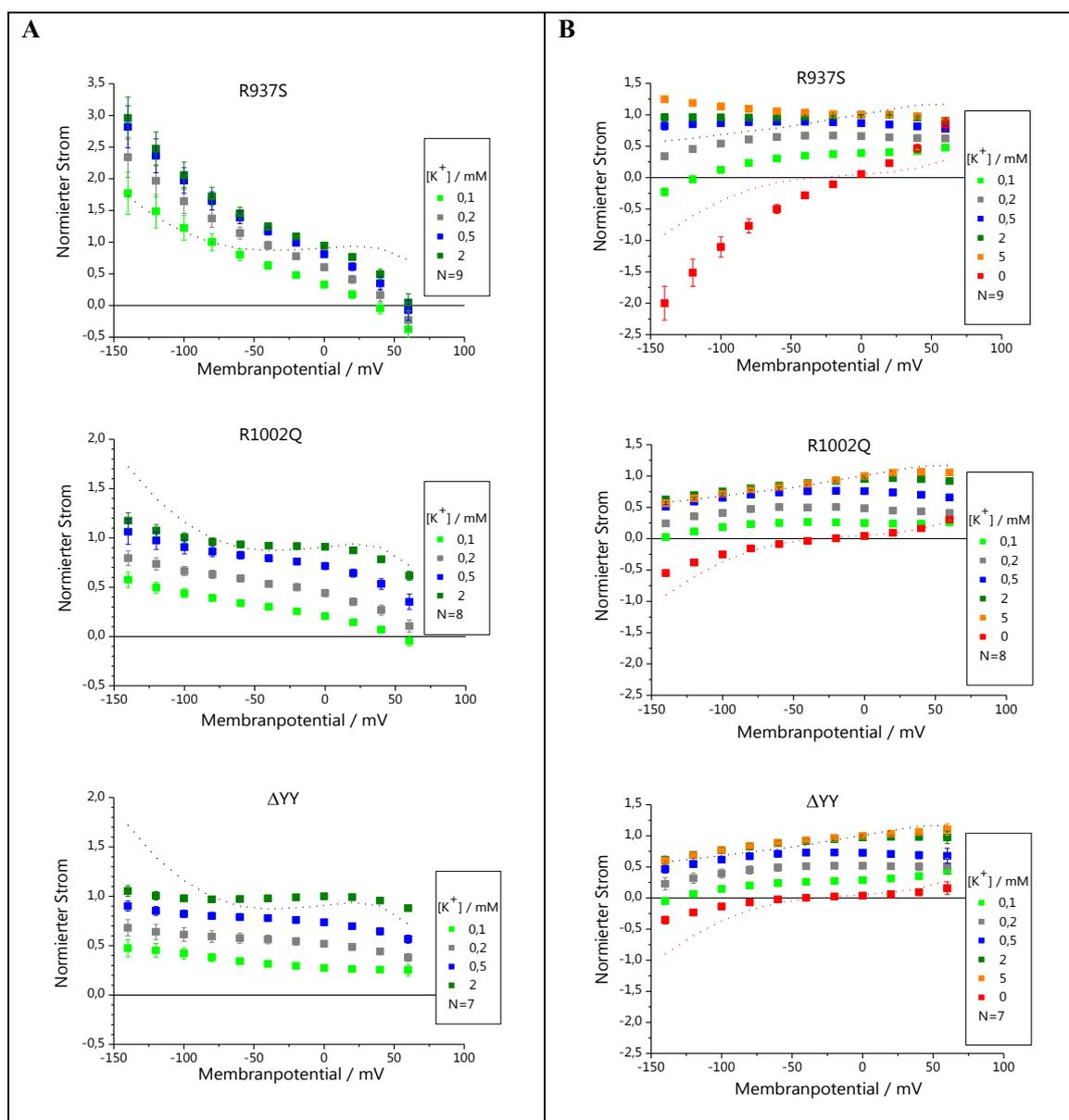
A) In 100 mM Na<sup>+</sup> gibt es stationäre Stromamplituden, die mit zunehmender Hyperpolarisation größer werden.

B) In Na<sup>+</sup>-Puffer inklusive 10 mM Ouabain gehen diese Stromamplituden leicht zurück.

C) In Na<sup>+</sup>-freiem Puffer (100 mM NMDG<sup>+</sup>) gehen die Stromamplituden bei negativen Potentialen stärker zurück als in (B), was darauf hindeutet, dass Ouabain die Na<sup>+</sup>-abhängigen „Leckströme“ der D999H-Mutanten nicht komplett inhibieren kann.

Für dieses Konstrukt müsste also ein neues Testverfahren, möglicherweise unter Einschluss noch höherer Ouabainkonzentrationen, angewendet werden, was allerdings aufgrund der begrenzten Löslichkeit nur eingeschränkt möglich ist. Alternativ könnten Messungen in Na<sup>+</sup>-freien Puffern inklusive 10 mM Ouabain als Referenzbedingungen zur Bestimmung der „Hintergrundleitfähigkeiten“ herangezogen werden. Vor diesem Hintergrund können auch keine eindeutigen Aussagen zu den K<sup>+</sup>-induzierten Strömen gemacht werden, da nicht klar ist, welches Ausmaß die Leckströme

haben. Eine verringerte Sensitivität für Ouabain wäre ein sehr interessanter Befund. Eine solche These verlangt aber nach weiteren intensiven Analysen. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde dieses Konstrukt in den nachfolgenden Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt, da ein Vergleich der  $K_{0,5}(0Na^+)$ -Werte mit denen des WT-Proteins (das einwärts gerichtete Leckströme in Abwesenheit von extrazellulärem  $Na^+$  und  $K^+$  aufwies) hinsichtlich einer Aussage zu einer veränderten  $K^+$ -Affinität schwierig zu interpretieren wäre.



**Abb. 3.3-5: Spannungsabhängigkeit der  $K^+$ -induzierten und ouabainsensitiven Ströme bei verschiedenen  $[K^+]_{ext}$  und bei  $[Na^+]_{ext} = 0$  mM der Mutanten R937S, R1002Q und  $\Delta YY$ .**

A) Gezeigt sind die  $K^+$ -induzierten Ströme für die Mutanten R937S, R1002Q und  $\Delta YY$ . Die I(V)-Kennlinie des WT-Proteins bei 5 mM  $K^+$  ist schwarz gestrichelt dargestellt.

B) Dargestellt sind die  $K^+$ -abhängigen ouabainsensitiven Ströme. In Rot gezeigt sind die Leckströme bei 0 mM  $K^+$ . Die Leckströme des WT-Enzyms bei 0 mM  $Na^+$  und 0 mM  $K^+$  sind rot gestrichelt und die I(V)-Kennlinie bei 5 mM  $K^+$  schwarz gestrichelt abgebildet.

Die Ströme wurden innerhalb eines Experiments auf die Amplituden bei 5 mM  $[K^+]_{ext}$  und 0 mV normiert. Unterschiedliche  $[K^+]_{ext}$  sind durch verschiedene Farben dargestellt. Die Daten entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  S.E.) aus Messungen an N = 7-9 Oozyten aus mindestens zwei unterschiedlichen Zellchargen.

Der Einfluss von Leckströmen zeigt sich auch hier in dem unterschiedlichen Kurvenverlauf von  $K^+$ -induzierten und ouabainsensitiven Strömen. Schon für das WT-Protein wurden Leckströme beobachtet, wenn im extrazellulären Puffer weder  $Na^+$  noch  $K^+$  enthalten war. Die Leckströme der Konstrukte R937S, R1002Q und  $\Delta YY$  sind in Abb. 3.3-5B in Rot gezeigt.

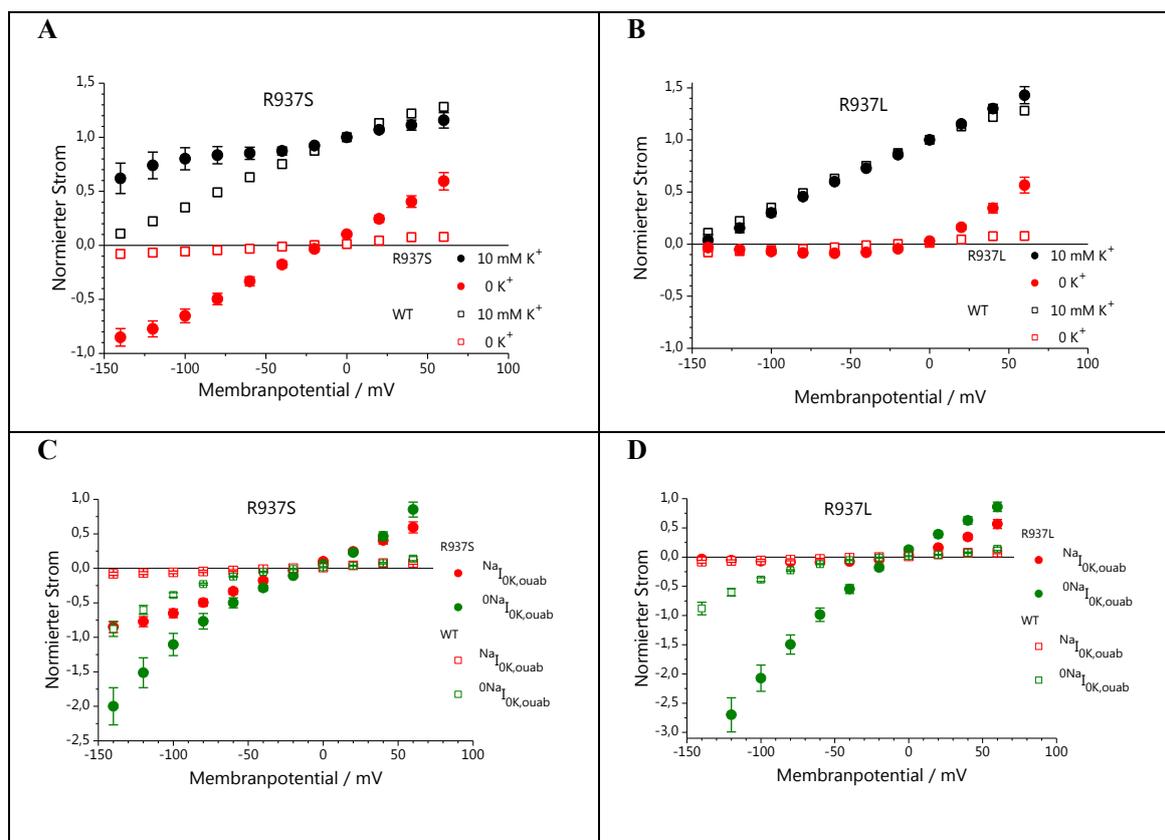
Die Mutante R937S wies einen einwärtsgerichteten Leckstrom auf mit einer im Vergleich zum Wildtyp-Protein verdoppelten Leckstromamplitude bei -140 mV. Des Weiteren wurden für diese Mutante bei 0 mM  $K^+$  auch stark vergrößerte auswärtsgerichtete Leckströme bei positiven Potentialen gemessen, die in dieser Form weder bei R1002Q und  $\Delta YY$  noch bei WT beobachtet wurden. Für R1002Q waren die Amplituden der Leckströme bei -140 mV um die Hälfte kleiner als beim WT-Enzym (Vgl. Abb. 3.1-2A). Für  $\Delta YY$  betrug sie sogar nur ca. ein Drittel der Leckstromamplitude des WT-Proteins. Außerdem waren für beide Mutanten die Stromamplituden unter den hier untersuchten  $Na^+$ -freien Bedingungen kleiner als die, die in  $Na^+$ -enthaltenden Puffern detektiert wurden (Abb. 3.3-1B). Im Gegensatz dazu waren die Leckströme der R937S-Mutante unter  $Na^+$ -freien Bedingungen um ein Vielfaches größer als die, die in  $Na^+$ -enthaltenden Puffern gemessen wurden. Bereits geringe  $K^+$ -Konzentrationen von 0,1 mM hatten bei allen Konstrukten, aber insbesondere bei R937S einen deutlich inhibierenden Effekt auf diese Leckströme, was in den I(V)-Kennlinien der ouabainsensitiven Ströme deutlich wird.

Die  $K^+$ -induzierten I(V)-Kurven waren vor allem bei der R937S-Mutante im Vergleich zum WT-Enzym deutlich verändert (Abb. 3.3-5A). So sanken die Ströme dieser Mutante mit zunehmender Depolarisation steil ab und wurden bei niedrigen  $K^+$ -Konzentrationen und positiven Potentialen über +40 mV sogar negativ. Offensichtlich sind in diesem Bereich die Amplituden der  $Na^+/K^+$ -Pumpströme kleiner als die der Leckströme in Abwesenheit von  $K^+$ . Diese Unterschiede zum WT-Enzym sind vermutlich durch das komplexe Wechselspiel zwischen Leckströmen und  $Na^+/K^+$ -Pumpstrom bedingt.

Die  $K_{0,5}(0Na^+)$ -Werte der Mutanten R937S, R1002Q und  $\Delta YY$  wurden auch hier aus den  $K^+$ -induzierten Strömen bestimmt, sofern die normierten Stromamplituden positiv waren, und sind in Abb. 3.3-3B dargestellt. Die spannungsabhängigen Verläufe der  $K_{0,5}(0Na^+)$ -Werte aller drei Mutanten unterschieden sich qualitativ indes nicht so deutlich vom WT-Verlauf, wie es zuvor in  $Na^+$ -haltigen Lösungen beobachtet wurde (Abb. 3.3-3A). Es zeigte sich, dass die  $K_{0,5}(0Na^+)$ -Werte umso kleiner wurden, je größer der einwärtsgerichtete Leckstrom bei negativen Potentialen war. Auch hier sind die  $K_{0,5}(0Na^+)$ -Werte nicht mit den zuvor bestimmten apparenten  $K^+$ -Affinitäten des WT-Proteins in Gegenwart von extrazellulärem  $Na^+$  vergleichbar, da angenommen werden kann, dass die Leckströme, die vor allem bei hyperpolarisierendem Potential in den ouabainsensitiven Ströme sichtbar wurden (Abb. 3.3-5B), den eigentlichen  $Na^+/K^+$ -Transport überlagerten. Diese Einschränkung gilt allerdings auch für das WT-Enzym, da dieses in Abwesenheit von extrazellulärem  $Na^+$  ebenfalls einen durch Hyperpolarisation induzierten Leckstrom bei  $[K^+]_{ext} = 0$  mM aufweist (Sagar & Rakowski, 1994). Es ist daher schwierig, anhand der hier ermittelten  $K_{0,5}(0Na^+)$ -Werte auf Effekte zu schließen, die die Mutationen möglicherweise auf die beiden  $K^+$ -Bindungsstellen ausübten, da die verschiedenen, sich überlagernden Vorgänge eine exklusiv auf die  $Na^+/K^+$ -Pumpströme bezogene Ermittlung von  $K_{0,5}(0Na^+)$  erschwerten.

### 3.3.2 Vergleich der ouabainsensitiven Leckströme von R937S und R937L

Die R937S-Mutante wies bei  $[K^+]_{ext} = 0$  mM sowohl in 100 mM  $Na^+$ , als auch in  $Na^+$ -freien Bedingungen bei positiven Potentialen auswärtsgerichtete Leckströme auf (Abb. 3.3-5B und Abb. 3.3-1B). Ein solcher Effekt wurde zuvor für noch keine Mutante der  $Na^+/K^+$ -ATPase explizit beschrieben. Aus diesem Grund wurde eine weitere Substitutionsmutation an Position 937 eingeführt, wobei das native Arginin gegen Leucin ausgetauscht wurde. Durch diese R937L-Mutation wurden die hydrophoben bzw. polaren Eigenschaften der Seitenkette drastisch verändert. Die daraus resultierenden Konsequenzen für die Funktionalität der Pumpe sind im Weiteren beschrieben.



**Abb. 3.3-6: Vergleich stationärer Ströme von R937S und R937L.**

A,B) I(V)-Kurven ouabainsensitiver stationärer Ströme bei 10 mM und 0 mM  $K^+$  für R937S (A) und R937L (B) in 100 mM  $Na^+$ .

C,D) Zum besseren Vergleich der Leckströme sind die I(V)-Kurven ouabainsensitiver Ströme in Abwesenheit von  $K^+$  in 100 mM  $Na^+$  (rot) und 0 mM  $Na^+$  (grün) für R937S (C) und R937L (D) dargestellt. Die WT-Kurven sind jeweils zum Vergleich mit offenen Symbolen dargestellt.

Die Mutante R937L zeigte bei  $[K^+]_{ext} = 0$  mM und positiven Potentialen ebenfalls auswärtsgerichtete Leckströme bei 0 und 100 mM extrazellulärer  $Na^+$ -Konzentration, die denen von R937S ähnelten (Abb. 3.3-6C,D). Dabei stiegen die Ströme mit zunehmender Depolarisation an und waren in Abwesenheit von  $Na^+$  größer im Vergleich zu denen unter  $Na^+$ -freien Bedingungen. Im Unterschied zu R937S (Abb. 3.3-6A) zeigte R937L bei  $[K^+]_{ext} = 0$  mM und Hyperpolarisationen unter 0 mV keine einwärtsgerichteten Leckströme in 100 mM  $Na^+$  (Abb. 3.3-6B), wohl aber in Abwesenheit von extrazellulärem  $Na^+$  (Abb. 3.3-6D). Bei  $[Na^+]_{ext} = 100$  mM war die ouabainsensitive Stromspannungs-Kennlinie für 10 mM  $K^+$  von R937L nicht signifikant von der des WT-Enzyms verschie-

den (Abb. 3.3-6B), wohingegen die entsprechende I(V)-Kurve von R937S vor allem im negativen Potentialbereich eine deutlich schwächere Spannungsabhängigkeit aufwies (Abb. 3.3-6A). Dies ist ein Hinweis auf eine veränderte apparente Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$ : bei R937S scheint extrazelluläres  $\text{Na}^+$  bei Hyperpolarisation den Vorwärtszyklus des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Austauschtransports der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe nicht so stark zu hemmen wie beim WT-Enzym, wohingegen für R937L eine ähnliche Hemmung, wenn nicht gar tendenziell etwas stärker ausgeprägt als beim WT-Protein, beobachtet werden konnte.

Aufgrund all dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, durch welche Ladungsträger die ouabain-sensitiven Leckströme überhaupt vermittelt werden. Da die Auswärtsströme in Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  die größten Amplituden aufwiesen, wurde vermutet, dass es sich hierbei weder um  $\text{Na}^+$ - noch um  $\text{K}^+$ -getragene Ströme, sondern möglicherweise um Protonenströme handelte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde im Weiteren die pH-Abhängigkeit dieser Ströme in Hinblick auf eine pH-abhängige Veränderung der Umkehrpotentiale untersucht (Abschnitt 2.4.3).

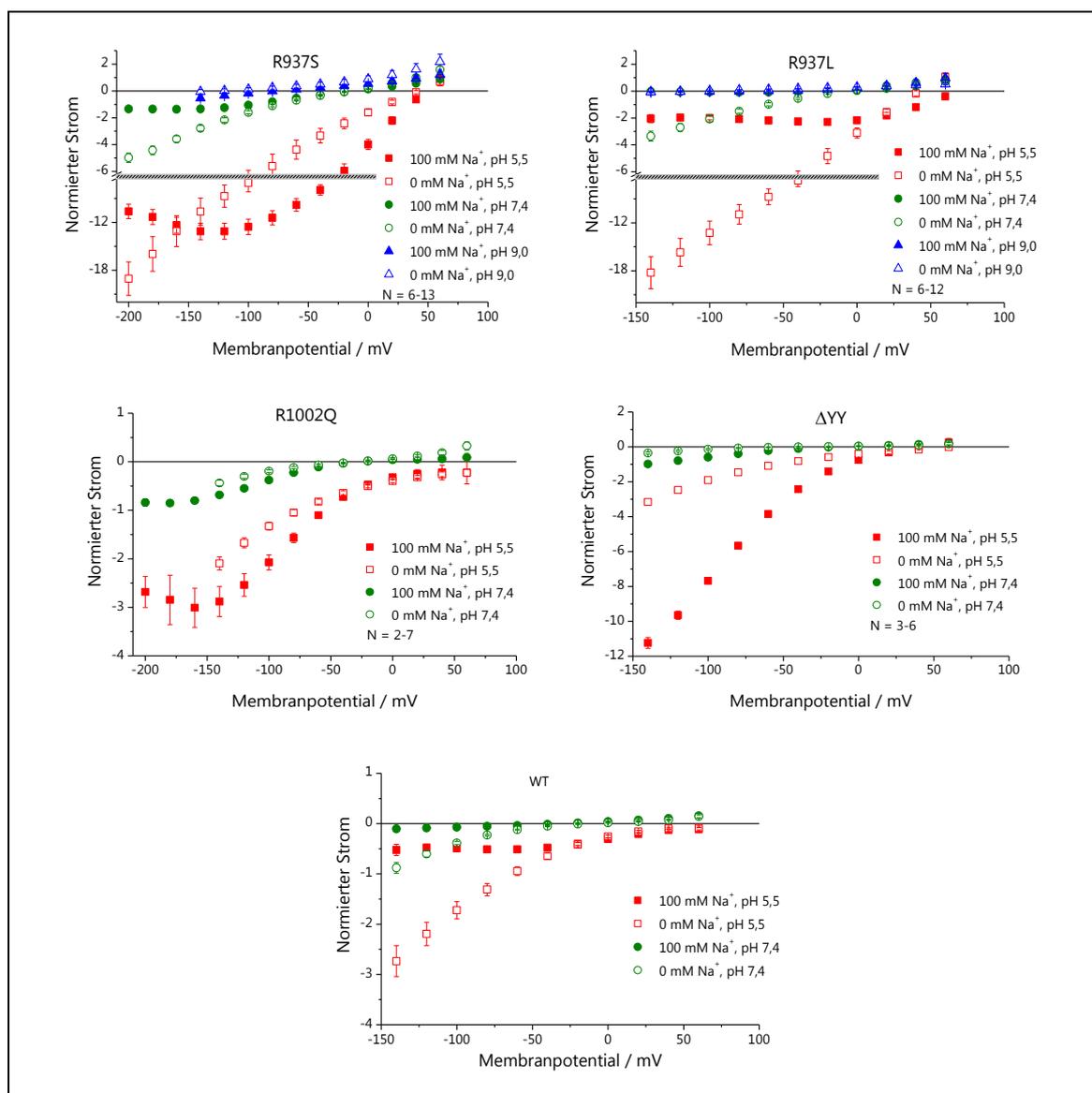
### 3.3.3 pH-Abhängigkeit stationärer Leckströme in $\text{K}^+$ -freien Lösungen

In  $\text{K}^+$ -freien Lösungen wurden für die Konstrukte R937S, R937L, D999H, R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  sowohl in 0 als auch in 100 mM  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  stationäre ouabainsensitive Leckströme beobachtet (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2). Aufgrund des vermuteten Einflusses von Protonen sollte die Abhängigkeit dieser stationären Leckströme vom extrazellulären pH-Wert untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3-7 für R937S, R937L, R1002Q,  $\Delta\text{YY}$  und WT dargestellt. Da die ouabainsensitiven Leckströme von R937S und R937L nicht gleichgerichtet waren, können die Umkehrpotentiale  $V_{\text{rev}}$  dieser Ströme bestimmt und abhängig von der extrazellulären  $\text{H}^+$ -Konzentration ausgewertet werden (Abschnitt 2.4.3). Für D999H wurde die pH-Abhängigkeit nicht untersucht, da die  $\text{Na}^+$ -abhängigen Leckströme durch das hier verwendete Assay vermutlich nicht komplett inhibiert werden konnten (Abb. 3.3-2B und Abb. 3.3-4).

#### Ouabainsensitive Leckströme bei pH 7,4

In  $\text{Na}^+$ -reichen Lösungen (100 mM) bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4 konnten beim WT-Protein nur vernachlässigbar kleine Leckströme gemessen werden (Abschnitt 3.1.1, Abb. 3.1-1A). R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  hingegen zeigten bei Potentialen unter 0 mV einwärts gerichtete Leckströme, deren Amplituden mit sinkendem Potential stiegen (Abb. 3.3-7). Die Ströme bei Potentialen über 0 mV waren vernachlässigbar klein und auf die oozyteneigenen Leitfähigkeiten zurückzuführen. R937L zeigte unter den gleichen Bedingungen nur auswärts gerichtete Leckströme, die bei Potentialen über 0 mV beobachtet wurden. Bei negativen Potentialen konnten hingegen nur die endogenen Leitfähigkeiten der Oozyten detektiert werden, die sehr kleine Amplituden aufwiesen (Abb. 3.3-6B). Im Gegensatz dazu vermittelte R937S spannungsabhängig Leckströme in beide Richtungen (Abb. 3.3-6A und Abb. 3.3-7), wobei die Stromamplituden um ein Vielfaches größer waren als die der oozyteneigenen Leitfähigkeiten. Das Umkehrpotential der I(V)-Kurve lag bei ca. -12 mV (Abb. 3.3-8, Tab. 3.3-2).

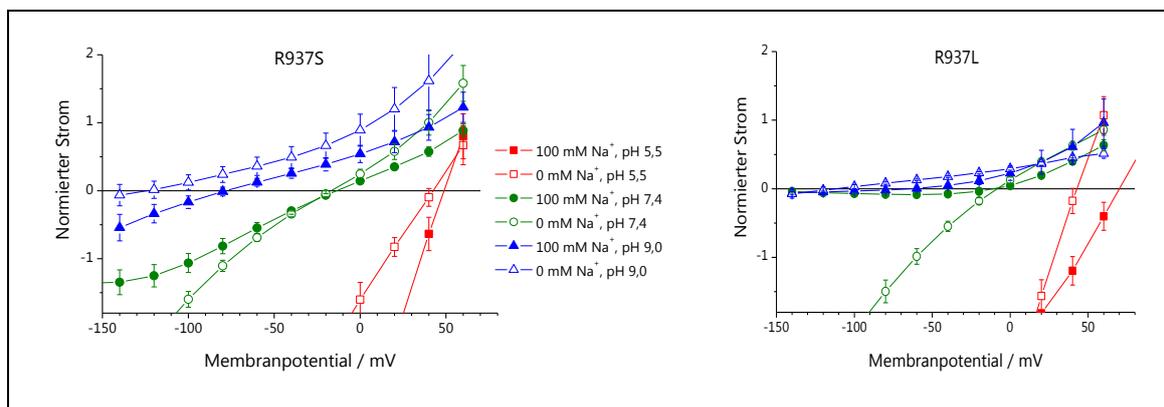
In  $\text{Na}^+$ -freien Lösungen bei pH 7,4 zeigte auch das Wildtyp-Enzym nur einwärtsgerichtete Leckströme bei einer Hyperpolarisation von unter  $-40$  mV (Abschnitt 3.1.1, Abb. 3.1-2A), die eine annähernd lineare Spannungsabhängigkeit aufwiesen und deren Amplitude bei  $-140$  mV bis auf das umgekehrte Vorzeichen der des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Vorwärtspumpstroms bei  $10$  mM  $\text{K}^+$  und  $0$  mV sehr ähnlich war (Abb. 3.3-7). Die Konstrukte R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  zeigten auch derartige Leckströme, nur waren die Amplituden kleiner als die des WT-Proteins, vor allem bei  $\Delta\text{YY}$  (Abb. 3.3-5B und Abb. 3.3-7).



**Abb. 3.3-7: pH-Abhängigkeit stationärer Leckströme unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen für die Konstrukte R937S, R937L, R1002Q und WT.**

Die ouabainsensitiven Leckströme wurden in  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 100$  mM (gefüllte Symbole) und  $0$  mM (offene Symbole) und bei pH 5,5 (rot), pH 7,4 (grün) und 9,0 (blau) gemessen. Die Ströme wurden innerhalb eines Experiments auf die Amplituden bei  $10$  mM  $\text{K}^+_{\text{ext}}$  und  $0$  mV normiert (nicht gezeigt). Zu beachten ist die Achsenunterbrechung in den Graphen für R937S und R937L zur besseren Übersichtlichkeit. Bei den Messungen der Mutanten R937S und R1002Q konnten teilweise Spannungen bis zu  $-200$  mV angelegt werden.

Die ouabainsensitiven Leckströme der Konstrukte R937S und R937L waren im Vergleich zu denen der übrigen Mutanten und zu den  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpstromamplituden stark überhöht und wiesen eine im Wesentlichen lineare Spannungsabhängigkeit auf (Abb. 3.3-7); ein ausgeprägtes Gleichrichtungsverhalten war nicht erkennbar, sodass  $V_{\text{rev}}$  bestimmt werden konnte. Das Umkehrpotential lag hierbei für R937S bei ca. -17 mV, für R937L bei ca. -10 mV (Abb. 3.3-8, Tab. 3.3-2).



**Abb. 3.3-8: Vergrößerte Darstellung der pH-abhängigen Leckströme von R937S und R937L.**

Gezeigt sind die I(V)-Kurven der Konstrukte R937S und R937L aus Abb. 3.3-7, wobei der Bereich, in dem die ouabainsensitiven Leckströme ihr Umkehrpotential hatten ( $I = 0$ ), vergrößert dargestellt ist.

#### Ouabainsensitive Leckströme bei pH 5,5

Ein Ansäuern der extrazellulären Lösung auf pH 5,5 bewirkte bei allen Konstrukten eine starke Zunahme der Leckstromamplituden sowohl in 100 mM als auch in 0 mM  $\text{Na}^+$ , wobei sich die Auswirkungen auf die I(V)-Kennlinien der Konstrukte voneinander unterschieden. In Anwesenheit von 100 mM extrazellulärem  $\text{Na}^+$  zeigten nun auch das WT-Enzym und die Mutante R937L einwärtsgerichtete Leckströme, die ab Hyperpolarisationen unter -20 mV bei beiden Konstrukten sättigten. Die Amplituden der Einwärtsströme der Mutanten R937S, R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  waren nahezu über den gesamten hier getesteten Potentialbereich größer als beim WT-Protein. Diese Verstärkung wurde besonders bei Potentialen unter -20 mV deutlich. Für die Mutanten R937S und  $\Delta\text{YY}$  wurden die Amplituden dieser Leckströme im Verhältnis zu ihrer  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpstromamplitude bei 0 mV sehr groß (12-facher Wert bei -140 mV, was einer Amplitude in der Größenordnung von 1-2  $\mu\text{A}$  entsprach; s. Anhang A2) Jedoch sättigten die Ströme bei R1002Q zwischen -140 und -160 mV und gingen bei noch stärkerer Hyperpolarisation (unter -160 mV) wieder zurück. Bei einer Erniedrigung des angelegten Membranpotentials auf -200 mV konnte auch für R937S eine Sättigung der Leckströme mit einem anschließenden Rückgang der Stromamplitude beobachtet werden. Bei Experimenten mit der  $\Delta\text{YY}$ -Mutante gelang es hingegen nicht, die Oozyten unter diesen pH-Bedingungen auf -200 mV zu klemmen.

In  $\text{Na}^+$ -freien Lösungen und pH 5,5 verdreifachte sich die Leckstromamplitude beim Wildtyp-Enzym bei Hyperpolarisationen unter -40 mV im Vergleich zu der, die bei pH 7,4 gemessen wurde. Für die Konstrukte  $\Delta\text{YY}$  und R1002Q, die bei pH 7,4 nur kleine Leckströme vermittelten, waren die Amplituden der einwärtsgerichteten Leckströme unter diesen Bedingungen vergleichbar mit denen des WT-Enzyms. Eine Sättigung der Ströme konnte nicht mehr beobachtet werden. Die beiden Mutanten R937S und R937L generierten stationäre Leckströme, deren Amplituden annähernd linear

abhängig vom angelegten Membranpotential waren. Erst ab Potentialen über +40 mV waren diese Ströme auswärtsgerichtet. Hierbei konnte keine Sättigung beobachtet werden, auch nicht bei Spannungspulsen zu -200 mV, wie sie in den Messungen der R937S-Mutante angelegt werden konnten. Das Umkehrpotential der Leckströme der Konstrukte R937S und R937L lag bei pH 5,5 sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  bei ca. +45 mV (Abb. 3.3-8, Tab. 3.3-2). Wenn die Membranleitfähigkeit idealerweise durch das Gleichgewichtspotential von Protonen bestimmt wäre, so läge die Verschiebung des Umkehrpotentials nach der Nernst-Gleichung berechnet bei ca. 59 mV pro pH-Einheit (Abschnitt 2.4.3). Da sich  $\Delta V_{\text{rev}}$  bei R937S und R947L diesem Wert stark annähert, ist dies ein Hinweis darauf, dass die beiden Mutationen einen protonenselektiven Transportmechanismus ermöglichen könnten.

#### Ouabainsensitive Leckströme bei pH 9,0

Zur Kontrolle wurden R937S und R937S zusätzlich noch unter basischen Bedingungen untersucht. Bei pH 9,0 wurden die einwärtsgerichteten Leckströme in An- und Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  sehr klein. Für das WT-Enzym wurde schon früher gezeigt, dass bei pH 8,5 die Leckströme bei Hyperpolarisation der Membran in  $\text{Na}^+$ -freien Lösungen zurückgehen (Efthymiadis et al., 1993). Das Umkehrpotential der Leckströme für die Konstrukte R937S und R937L verschob sich jedoch bezüglich des Werts bei pH 7,4 um ca. -60 mV (in 100 mM  $\text{Na}^+$ ) bzw. ca. -100 mV (in 0 mM  $\text{Na}^+$ ). Somit lag  $\Delta V_{\text{rev}}(\pm\text{Na}^+)$  für  $\Delta\text{pH} = 1$  bei ca. 45 mV (Tab. 3.3-2).

#### Auswertung der ungerichteten Leckströme von R937L und R937S

Da in Abwesenheit von  $\text{Na}^+$ , d. h. in 100 mM NMDG<sup>+</sup>-haltigen Lösungen,  $\text{H}^+$ -Ionen die einzigen einwertigen Kationen sind, die die Oozytenmembran passieren können, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den Leckströmen der Mutanten R937L und R937S um Protonenströme handelte. Das Bemerkenswerte ist, dass diese Mutanten Leckströme in beide Richtungen zuließen, wobei die Umkehrpotentiale und die Höhe der Stromamplituden nicht nur vom Membranpotential, sondern auch vom pH-Gradienten abhingen, und zwar in einem viel größerem Maß als es beim WT-Protein und den anderen Konstrukten mit C-terminalen Mutationen zu beobachten war. In Abb. 3.3-9B und C wurde das Umkehrpotential gegen  $\text{pH}_{\text{ext}}$  für beide Mutanten aufgetragen. Aus der Steigung  $\Delta V_{\text{rev}}/\Delta\text{pH}_{\text{ext}}$  ergab sich eine Umkehrpotentialverschiebung von ca. 35 mV pro  $\text{pH}_{\text{ext}}$ -Einheit in 100 mM  $\text{Na}^+$  und um ca. 45 mV pro  $\text{pH}_{\text{ext}}$ -Einheit in  $\text{Na}^+$ -freien Lösungen (Tab. 3.3-2). Die  $V_{\text{rev}}$ -Verschiebung war also in  $\text{Na}^+$ -haltiger Lösung kleiner, während sich  $\Delta V_{\text{rev}}$  in  $\text{Na}^+$ -freien Lösungen dem aus der Nernst-Gleichung berechneten Wert von 59 mV pro pH-Einheit annäherte. Dies könnte durch einen inhibierenden oder blockierenden Effekt erklärt werden, den  $\text{Na}^+$ -Ionen auf die Protonenströme haben könnten. Daher ist die Frage zu klären, wie das Permeabilitätsverhältnis von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen in den Mutanten R937S und R937L ist und welche Rolle  $\text{Na}^+$ -Ionen spielen.

Auffällenderweise verliefen die I(V)-Kurven für R937S und R937L nicht ideal linear, vor allem im Bereich des Umkehrpotentials  $V_{\text{rev}}$  war eine ausgeprägte Krümmung erkennbar, und sie näherten sich für unendlich groß oder klein werdende Potentiale asymptotisch einer Geraden an. Ein solches Rektifizierungsverhalten wird üblicherweise bei Ionenkanälen beobachtet und wurde bereits von Goldman und Hodgkin beschrieben (Goldman, 1943; Hodgkin et al., 1952). Dieser als „Goldman-

Rektifizierung“ bezeichnete Effekt beruht auf der Tatsache, dass bei ungleichen Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran die Stromamplitude von der Richtung des Stromflusses abhängt. Eine hohe Leitfähigkeit (Steigung der I(V)-Kurve) wird beobachtet, wenn der Stromfluss von der Seite der hohen zur Seite mit der niedrigen Ionenkonzentration fließt, weil für diese Stromrichtung mehr Ladungsträger zur Verfügung stehen als beim Fluss in die umgekehrte Richtung. Insgesamt charakterisiert der Goldman-Hodgkin-Katz-Formalismus (Gl. 2.4-2) die Permeabilität von Membranen für mehrere Ionensorten (Abschnitt 2.4.3). Aus dem Umkehrpotential, welches abhängig von der Konzentration der permeierenden Ionen auf beiden Seiten der Membran ist, können Rückschlüsse auf den Permeabilitätsquotienten von Proteinen für diese Ionensorten geschlossen werden. Im Falle der hier untersuchten Leckströme sollte die Frage geklärt werden, ob es sich um Protonen- oder  $\text{Na}^+$ -getragene Ströme handelt. Mithilfe der GHK-Gleichung kann in diesem Fall der Permeabilitätsquotient  $P_{\text{Na}}/P_{\text{H}}$  (Gl. 2.4-5) und das Verhältnis der Flussdichten  $\Phi_{\text{Na}}/\Phi_{\text{H}}$  (Gl. 2.4-6) berechnet werden.

Das Verhältnis der Permeabilitäten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}^+$ , sowie das Verhältnis der Flussdichten  $\Phi_{\text{Na}}/\Phi_{\text{H}}$  wurden für R937S und R937L (Tab. 3.3-2) ausgehend von der GHK-Gleichung berechnet. So war die  $\text{H}^+$ -Permeabilität unter allen hier getesteten pH-Bedingungen wesentlich größer im Vergleich zu der von  $\text{Na}^+$ , was in den  $P_{\text{Na}}/P_{\text{H}}$ -Quotienten deutlich wird, die alle weit unter dem Wert von 1 lagen. Außerdem ist zu erkennen, dass dieser Quotient kleiner wird, je niedriger  $\text{pH}_{\text{ext}}$  ist, was erneut auf die Abhängigkeit der Membranpermeabilität von der extrazellulären Protonenkonzentration hinweist. Hervorzuheben seien hierbei die Besonderheiten der Flussdichte-Verhältnisse  $\Phi_{\text{Na}}/\Phi_{\text{H}}$ , die unter basischen Bedingungen bestimmt wurden. So lag dieses Verhältnis für R937S bei 5,5 und für R937L bei 5,4, was bedeuten würde, dass die Leckströme bei  $\text{pH}_{\text{ext}} = 9,0$  für beide Mutanten eher durch  $\text{Na}^+$  anstatt durch Protonen getragen wurden. Hier ist zu berücksichtigen, dass ein pH-Wert von 9,0 einer  $\text{H}^+$ -Konzentration von 1 nM entspricht, so dass unter diesen Bedingungen  $\text{Na}^+$ -Ionen (Konzentration 150 mM) die hauptsächlich stromtragenden Ionen sind.

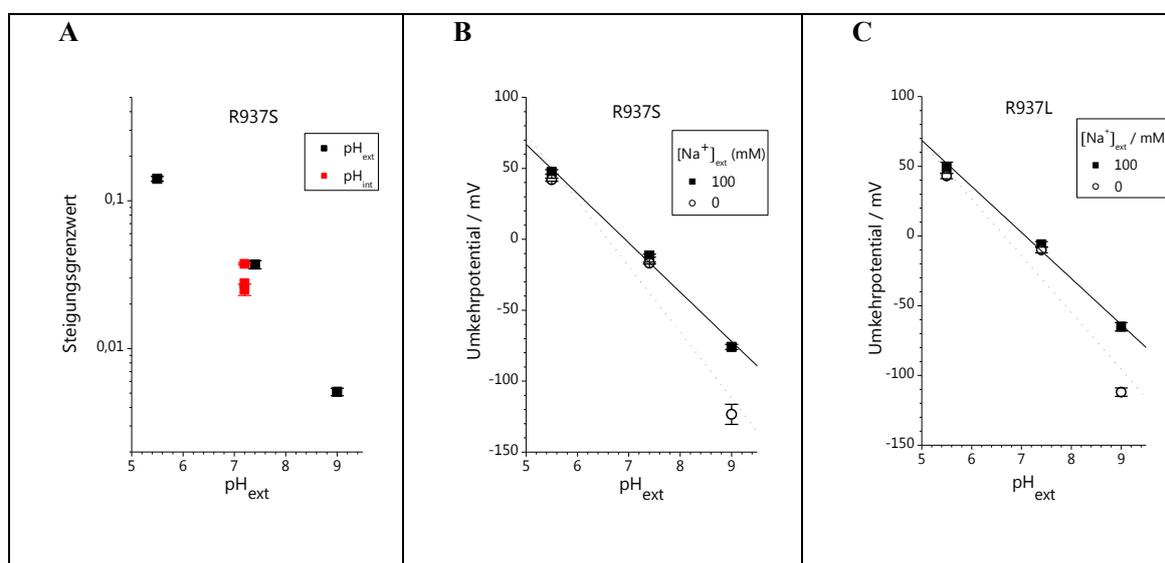
|   | pH  | $V_{\text{rev}}$ (mV)<br>[ $\text{Na}^+$ ] $_{\text{ext}}=100$ mM | $V_{\text{rev}}$ (mV)<br>[ $\text{Na}^+$ ] $_{\text{ext}}=0$ mM | $\Delta V_{\text{rev}}(\pm\text{Na})$<br>(mV) | $P_{\text{Na}}/P_{\text{H}}$ | $\Phi_{\text{Na}}/\Phi_{\text{H}}$ |
|---|-----|---|---|---|------------------------------|------------------------------------|
| R937S   | 9   | $-76 \pm 2$   | $-123 \pm 7$  | $47 \pm 7$                                    | $5,5 \cdot 10^{-8}$          | 5,5                                |
|   | 7,4 | $-12 \pm 1$   | $-17 \pm 1$   | $5 \pm 1$                                     | $9,1 \cdot 10^{-8}$          | 0,23                               |
|   | 5,5 | $47 \pm 26$   | $42 \pm 1$  | $5 \pm 2$                                     | $7,5 \cdot 10^{-6}$          | 0,24                               |
| $\Delta V_{\text{rev}} / \Delta \text{pH}$ (mV) |     | $34,7 \pm 2,4$  | $46,5 \pm 10,4$   |   |                              |                                    |
| R937L   | 9   | $-65 \pm 4$   | $-112 \pm 3$  | $47 \pm 5$                                    | $5,4 \cdot 10^{-8}$          | 5,4                                |
|   | 7,4 | $-8 \pm 3$  | $-10 \pm 3$   | $4 \pm 4$                                     | $6,8 \cdot 10^{-8}$          | 0,17                               |
|   | 5,5 | $49 \pm 6$  | $43 \pm 3$  | $6 \pm 7$                                     | $8,4 \cdot 10^{-6}$          | 0,27                               |
| $\Delta V_{\text{rev}} / \Delta \text{pH}$ (mV) |     | $33,0 \pm 1,4$  | $40,7 \pm 9,7$  |   |                              |                                    |

**Tab. 3.3-2: Parameter der pH-abhängigen stationären Leckströme für R937S und R937L.**

Die Umkehrpotentiale  $V_{\text{rev}}$  bei verschiedenen pH-Werten wurden anhand der I(V)-Kennlinien in Abb. 3.3-8 für  $\text{Na}^+$ -haltige und  $\text{Na}^+$ -freie Lösungen bestimmt. Das Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten  $P_{\text{Na}}/P_{\text{H}}$  und der Flussdichten  $\Phi_{\text{Na}}/\Phi_{\text{H}}$  wurden mithilfe der GHK-Gl. 2.4-2 aus  $\Delta V_{\text{rev}}(\pm\text{Na})$  (Abschnitt 2.4.3) bestimmt.

Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass die Bestimmung des Umkehrpotentials bei pH 9,0, so wie es oben beschrieben wurde, sehr fehlerbehaftet ist, da die einwärtsgerichteten Leckströme der Mutanten unter basischen Bedingungen sehr klein waren (vergleichbar dem vernachlässigbar kleinen Leckströmen des WT-Enzyms) und nur die auswärtsgerichteten Leckströme deutlich detektiert werden konnten. Somit gestaltete sich die Bestimmung des Umkehrpotentials unter basischen Bedingungen als schwierig, da immer zu berücksichtigen ist, dass es sich bei den dargestellten Strom-Spannungs-Kennlinien um Differenzsignale handelt. Insbesondere bei kleinen Stromamplituden können sich leichte Schwankungen in der Hintergrundleitfähigkeit der Oozytenmembran als signifikanter Störeinfluss bemerkbar machen.

Wenn allerdings angenommen wird, dass es Protonen sind, die ein- und ausströmen, dann ist es verständlich, dass es bei pH 9,0 aufgrund der geringen extrazellulären Protonenkonzentration nur einen sehr kleinen Einstrom gibt, dafür einen umso größeren Auswärtsstrom. Daher stünde der qualitative Verlauf der I(V)-Kurven von R937S und R937L mit der Annahme protonengetragener Leckströme in Einklang. Anhand der Permeabilitätsquotienten wird deutlich, dass Protonen die mit Abstand beste Permeabilität haben. Allerdings sind die  $\text{Na}^+$ -Ionen bei pH 9,0 und  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 100 \text{ mM}$  in vielfach höherer Konzentration vorhanden, sodass nicht auszuschließen ist, dass ein sehr kleiner Teil des Stroms durch  $\text{Na}^+$  getragen wird. Das kann aber nicht allein mit elektrophysiologischen Messungen geklärt werden, sondern eher mit  $^{22}\text{Na}^+$ -Efflux-Messungen.



**Abb. 3.3-9: pH-abhängige Eigenschaften der I(V)-Kurven der Konstrukte R937S und R937L.**

A) Auftragung der Steigungsgrenzwerte von R937S, die am Punkt des Umkehrpotentials der I(V)-Kurve für  $\text{Na}^+$ -freie Bedingungen ermittelt wurden (Abb. 3.3-7). Diese sind gegen  $\text{pH}_{\text{ext}}$  für  $V \rightarrow -\infty$  (schwarz) und gegen  $\text{pH}_{\text{int}}$  (mithilfe der Nernst-Gleichung aus dem Umkehrpotential bei pH 7,4 berechnet) für  $V \rightarrow +\infty$  (rot) aufgetragen.

B,C) Gezeigt ist die  $\text{pH}_{\text{ext}}$ -Abhängigkeit des Umkehrpotentials  $V_{\text{rev}}$  der ouabainsensitiven Leckströme unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen (Abb. 3.3-7) für R937S (B) und R937L (C).

Da die Hinweise zahlreich sind, die auf einen protonenselektiven Transportmechanismus hindeuten, wurden die ouabainsensitiven Leckströme von R937S auf diesen Aspekt hin untersucht. Goldman beschrieb das Rektifizierungsverhalten einer I(V)-Kurve, wenn die Ströme durch eine Ionensorte getragen werden (Gl. 2.4-7). Anhand dieses Formalismus können Grenzwerte für die Steigungen  $dI/dV$  der I(V)-Kurve berechnet werden, wenn das Potential unendlich positiv oder nega-

tiv wird, und zwar insbesondere unter der Maßgabe, dass die Ionenkonzentration auf beiden Seiten der Membran unterschiedlich ist. Für  $H^+$ -abhängige Ströme sind die Steigungsgrenzwerte für  $V \rightarrow -\infty$  proportional zum extrazellulären pH und für  $V \rightarrow +\infty$  proportional zum intrazellulären pH (Gl. 2.4-8 und -9 in Abschnitt 2.4.3). Daher wurden also die Steigungsgrenzwerte für  $V \rightarrow \infty$  aus den in Abb. 3.3-7 dargestellten pH-abhängigen  $I(V)$ -Kurven bei 0 mM extrazellulärem  $Na^+$  ermittelt und für  $V \rightarrow -\infty$  gegen den extrazellulären pH und für  $V \rightarrow +\infty$  gegen den intrazellulären pH-Wert aufgetragen (Abb. 3.3-9A). Dabei wurde der intrazelluläre pH-Wert mithilfe der Nernst-Gleichung aus dem Umkehrpotential bei  $pH_{ext} = 7,4$  berechnet. Auf diese Weise ergab sich ein linearer Zusammenhang, wobei die Steigungsgrenzwerte bei niedrigem  $pH_{ext}$  von 5,5 am größten und bei hohem  $pH_{ext}$  von 9,0 am kleinsten waren. Es zeigte sich auch, dass die asymptotischen Steigungen der  $I(V)$ -Kurven proportional zu  $[H^+]_{int}$  bzw.  $[H^+]_{ext}$  waren (Abb. 3.3-9B,C), wie aufgrund der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für eine rein passive  $H^+$ -Leitfähigkeit zu erwarten ist. All diese Ergebnisse untermauern die Schlussfolgerung, dass die ouabainsensitiven Leckströme der R937S- und R937L-Mutanten durch Protonen vermittelt werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass bei den anderen Mutanten ähnliche Mechanismen eine Rolle spielen.

### 3.3.4 Temperaturabhängigkeit stationärer Ströme in $K^+$ -freien Lösungen

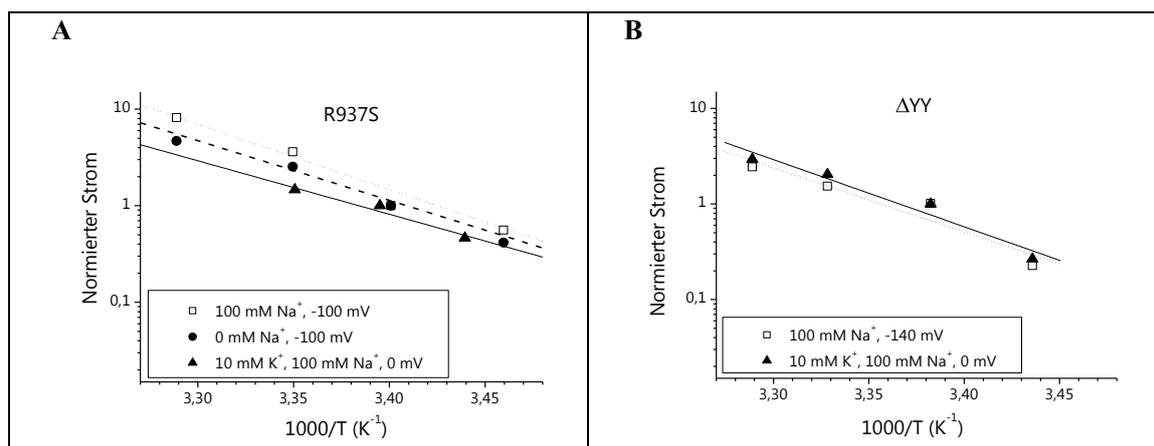
Da die Mutanten  $\Delta YY$  und R937S unter  $K^+$ -freien, aber vor allem unter  $Na^+$ -haltigen Bedingungen ouabainsensitive Leckströme mit großen Amplituden aufwiesen (Abb. 3.3-7), wurde überprüft, ob es sich dabei um diffusionskontrollierte Ströme handelte oder um Ströme, die einen Konformationswechsel der Pumpe erforderten. Da sich diese beiden Prozesse in ihrer Aktivierungsenergie unterscheiden, wurden im Weiteren die Temperaturabhängigkeiten der Leckströme untersucht. Dafür wurden Spannungspulsexperimente bei verschiedenen Temperaturen, zwischen 16 und 30°C, durchgeführt. Für die Temperaturabhängigkeit der Kinetik eines physikalisch-chemischen Prozesses gilt die Arrhenius-Gleichung:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad \text{Gl. 3.3-1}$$

(k: Geschwindigkeitskonstante;  $E_A$ : Aktivierungsenergie, A: präexponentieller Faktor; R: ideale Gaskonstante; T: Temperatur in K).

Für k kann der normierte Strom  $I_{norm}$  eingesetzt werden und aus der logarithmischen Auftragung nach Gl. 3.3-1 kann die Aktivierungsenergie  $E_A$  mit der folgenden Gleichung bestimmt werden (Abb. 3.3-10):

$$\log(I_{norm}) = \log(A) - \log(e) \cdot \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{1000T} \quad \text{Gl. 3.3-2}$$



**Abb. 3.3-10: Temperaturabhängigkeit der ouabainsensitiven stationären Ströme für R937S und  $\Delta Y Y$ .**

Die ouabainsensitiven Differenzströme bei einem bestimmten Membranpotential (-140, -100 oder 0 mV) wurden für unterschiedliche Temperaturen zwischen 16 und 30°C gemessen, auf den jeweiligen Wert bei Raumtemperatur normiert und gemäß der Arrhenius-Gleichung (Gl. 3.3-2) halblogarithmisch gegen die reziproke Temperatur aufgetragen. Aus der Steigung wurde die Aktivierungsenergie  $E_A$  (Tab. 3.3-3) für die jeweiligen ionischen Bedingungen bei einem vorgegebenen Membranpotential bestimmt.

Sowohl in  $\text{Na}^+$ -freien als auch in  $\text{Na}^+$ -haltigen Lösungen betragen die Aktivierungsenergien der ouabainsensitiven Leckströme für beide Konstrukte R937S und  $\Delta Y Y$  zwischen 115 und 136 kJ/mol und lagen somit in der gleichen Größenordnung wie die Aktivierungsenergien der bei  $[\text{K}^+]_{\text{ext}} = 10 \text{ mM}$  gemessenen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpströme (Tab. 3.3-3). Für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wurden für  $E_A$  des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpstroms Werte von ca. 90-130 kJ/mol bestimmt (Friedrich & Nagel, 1997; Tavraz et al., 2009; Castillo et al., 2011). Die  $E_A$  der Diffusion von kleinen Molekülen/Ionen in wässriger Lösung liegt unterhalb von 20 kJ/mol und auch bei verschiedenen Kanälen wurden für den  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - oder  $\text{H}^+$ -Transfer Aktivierungsenergien von 15-47 kJ/mol ermittelt (Milburn et al., 1995; Tiwari & Sikdar, 1999; Chernyshev & Cukierman, 2002; Chraïbi & Horisberger, 2002). Eine  $E_A$  von 100 kJ/mol und größer deutet also auf einen Transportmechanismus hin, der nicht auf einen Diffusionsprozess zurückzuführen ist, sondern einen Konformationswechsel des Transportproteins erfordert.

|                       |   | $E_A$ (kJ/mol) |
|-----------------------|---|----------------|
| R937S<br>N = 5        | 100 mM $\text{Na}^+$ , 0 mM $\text{K}^+$<br>-100 mV | $129 \pm 10$   |
|                       | 100 mM $\text{Na}^+$ , 10 mM $\text{K}^+$<br>0 mV   | $136 \pm 22$   |
|                       | 0 mM $\text{Na}^+$ , 0 mM $\text{K}^+$<br>-100 mV   | $121 \pm 8$    |
| $\Delta Y Y$<br>N = 4 | 100 mM $\text{Na}^+$ , 0 mM $\text{K}^+$<br>-140 mV | $115 \pm 24$   |
|                       | 100 mM $\text{Na}^+$ , 10 mM $\text{K}^+$<br>0 mV   | $122 \pm 26$   |

**Tab. 3.3-3: Aktivierungsenergien für R937S und  $\Delta Y Y$ .**

Aufgelistet sind die aus den Steigungen einer Arrhenius-Auftragung (Gl. 3.3-3, Abb. 3.3-10) ermittelten Aktivierungsenergien der ouabainsensitiven stationären Ströme von R937S und  $\Delta Y Y$  bei einem bestimmten Membranpotential und für unterschiedliche ionische Bedingungen. Berechnet wurde der Mittelwert  $\pm$  S.E. aus 4-5 Einzel-Zellexperimenten.

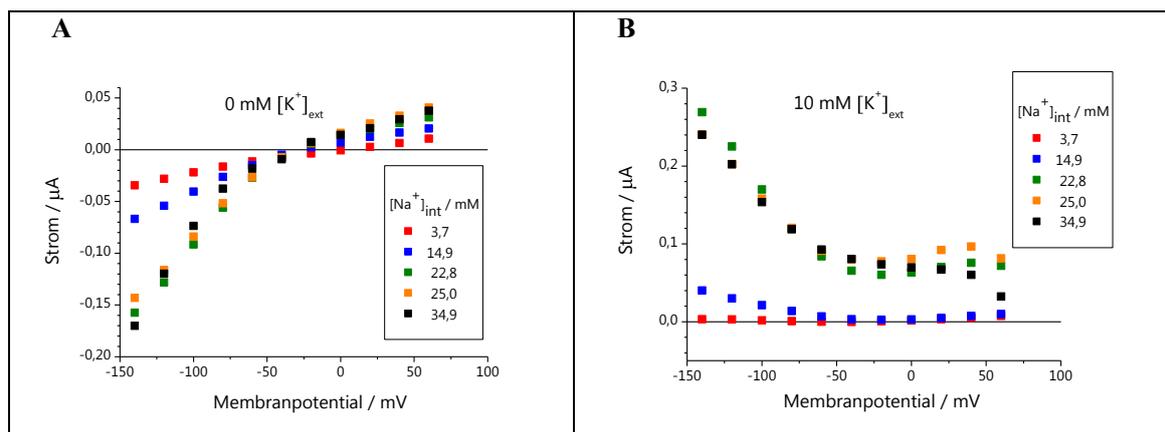
### 3.3.5 $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ -Abhängigkeit stationärer Leckströme von $\Delta\text{YY}$

Es wurde bereits berichtet, dass der C-Terminus die Affinität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sowohl für intra- als auch für extrazelluläres Natrium beeinflusst (Morth et al., 2007; Toustrup-Jensen et al., 2009). Toustrup-Jensen und Kollegen zeigten an der  $\alpha_1$ -UE der Ratte in COS-Zellen, dass die  $\text{Na}^+$ -Affinität der Phosphorylierungsreaktion im  $\text{E}_1$ -Zustand bei der Deletionsmutante  $\Delta\text{YY}$  verringert war. Aus Abschnitt 3.3.4 wurde deutlich, dass der Leckstrom der  $\Delta\text{YY}$ -Mutante einen Konformationswechsel der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erfordert, der jedoch nur bei ausreichend intrazellulärem Natrium erfolgen kann. Somit war es notwendig zu überprüfen, ob die hier angewandte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Beladungsprozedur der Oozyten (Abschnitt 2.4.2) überhaupt ausreicht, damit die Mutante  $\Delta\text{YY}$  den Pumpzyklus optimal durchlaufen kann. Daher wurde die intrazelluläre Natriumkonzentration bestimmt, die sich in den Zellen während der Beladung einstellte. Hierfür wurde der konstitutiv aktive Natriumkanal ENaC in den Oozyten exprimiert und die in Abschnitt 2.4.2 beschriebene Beladungsprozedur angewandt. Während dieser Prozedur war der ENaC-Kanal durch Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Amilorid inhibiert. Nach der Beladung mit  $\text{Na}^+$  wurde das Amilorid ausgewaschen und das sich durch den ENaC einstellende Umkehrpotential der Zellen mittels der TEVC gemessen (Abschnitt 2.4.5). Anhand dieses Werts wurde eine mittlere  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$  von  $40 \pm 4$  mM mithilfe der Nernst-Gleichung (Gl. 2.4-17) berechnet, wobei davon ausgegangen wurde, dass die Membran der Oozyten in Anwesenheit des aktiven ENaC-Kanals nahezu ideal semipermeabel für  $\text{Na}^+$  ist.

Toustrup-Jensen et al. berichteten für die  $\alpha_1$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase der Ratte einen  $K_{0,5}(\text{Na}^+_{\text{int}})$ -Wert von ca. 4 mM für die  $\text{Na}^+$ -abhängige Phosphorylierung des  $\Delta\text{YY}$ -Konstrukts, im Gegensatz zum WT-Enzym, dessen  $K_{0,5}(\text{Na}^+_{\text{int}})$ -Wert bei ca. 0,49 mM lag (Toustrup-Jensen et al., 2009). Daher ist anzunehmen, dass die hier verwendete Beladungsprozedur geeignet war, um die intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Bindungsstellen der Mutante abzusättigen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die bisherig beschriebenen ouabainsensitiven Leckströme für  $\Delta\text{YY}$  unter Bedingungen gemessen wurden, bei denen die Pumpe in der Lage war, einen Konformationswechsel zu durchlaufen. Im Weiteren wurde überprüft, welchen Einfluss die intrazelluläre Natriumkonzentration auf die Leckströme der Mutante hat.

Um die  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ -Abhängigkeit der ouabainsensitiven Leckströme für  $\Delta\text{YY}$  zu ermitteln, wurden unbeladene Oozyten, die die Mutante und den ENaC-Kanal koexprimierten, schrittweise mit  $\text{Na}^+$  beladen (Abschnitt 2.4.5). Die ouabainsensitiven Leckströme ( $[\text{K}^+]_{\text{ext}} = 0$  mM) wurden anschließend für verschiedene  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$  bestimmt (Abb. 3.3-11A). Dabei konnte beobachtet werden, dass die einwärtsgerichteten Leckströme stark von  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$  abhingen und ab einer intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration von ca. 25 mM sättigten. Die  $K_{0,5}(\text{Na}^+_{\text{int}})$ -Werte betragen für negative Potentiale 10-15 mM. Auch die  $\text{K}^+$ -induzierten Ströme (Abb. 3.3-11B) stiegen über den gesamten Potentialbereich nicht weiter an für  $[\text{Na}^+]_{\text{int}} > 20$  mM. Die halbmaximale Konzentration lag zwischen 8 und 12 mM. Ähnliche Werte für  $K_{0,5}(\text{Na}^+_{\text{int}})$  wurden auch für die C-terminale  $\Delta\text{KETYY}$ -Deletionsmutante der  $\alpha_1$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase von *Xenopus laevis* ermittelt (Yaragatupalli et al., 2009). In der Literatur liegt der  $K_{0,5}(\text{Na}^+_{\text{int}})$ -Wert für das WT-Enzym je nach verwendeter  $\alpha$ -Isoform und Spezies zwischen 0,4 und 0,8 mM (Morth et al., 2007; Toustrup-Jensen et al., 2009; Yaragatupalli et al., 2009).

Der Vergleich der hier ermittelten  $K_{0,5}(\text{Na}^+_{\text{int}})$ -Werte mit Daten aus den anderen Studien legt nahe, dass bei  $\Delta\text{YY}$  neben der extra- auch die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Affinität verringert war. Dennoch kann bei der hier verwendeten Methodik nicht darauf geschlossen werden, dass die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration limitierend für z. B. die Phosphorylierungsreaktion ist, die zum  $\text{Na}^+$ -okkludierten  $\text{E}_1\text{P}(3\text{Na}^+)$ -Zustand führt. Dies zeigte sich auch anhand der  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ -Abhängigkeit der stationären Pumpströme, deren Amplitude bei  $[\text{Na}^+]_{\text{int}} > 23 \text{ mM}$  sättigten, und in etwa ähnlich große Amplituden aufwiesen, wie an WT-exprimierenden Zellen gemessen werden konnten.



**Abb. 3.3-11:  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ -Abhängigkeit stationärer Leckströme von  $\Delta\text{YY}$ .**

A)  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ -Abhängigkeit der ouabainsensitiven Leckströme in 0 mM  $\text{K}^+$  und 100 mM  $\text{Na}^+_{\text{ext}}$  und (B) der  $\text{K}^+$ -induzierten Ströme bei 10 mM  $\text{K}^+$  und 100 mM  $\text{Na}^+_{\text{ext}}$  repräsentativ für eine Oozyte, die den ENaC-Kanal und das  $\Delta\text{YY}$ -Konstrukt koexprimierte.

Es stellte sich zwar heraus, dass die mutationsbedingten einwärtsgerichteten Leckströme in  $\text{Na}^+$ -reichen Lösungen stark von der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration abhingen, dennoch war die durch die Beladungsprozedur erreichte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration auch bei der  $\Delta\text{YY}$ -Mutanten nicht limitierend für die Leckströme.

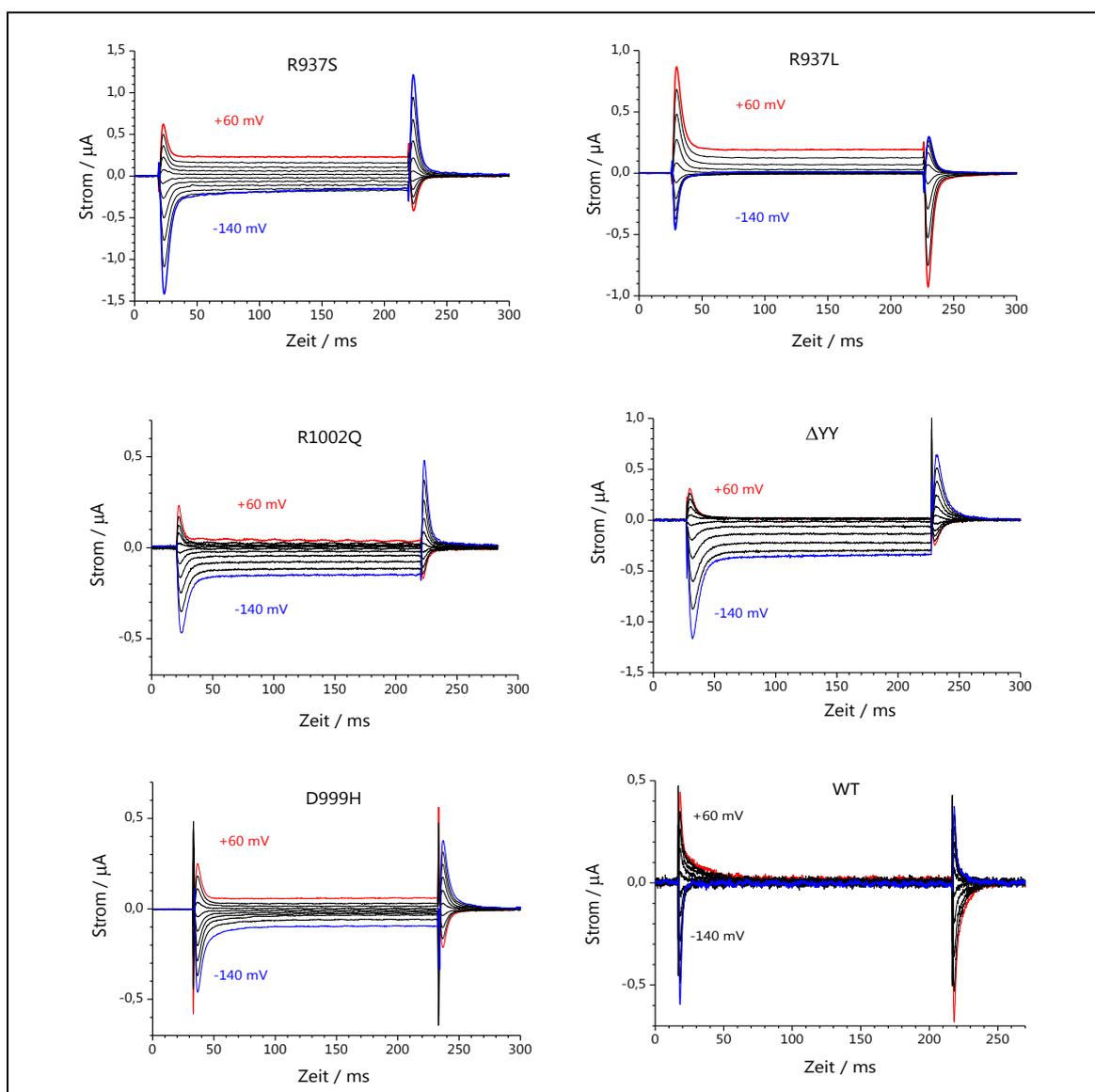
Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die ouabainsensitiven Leckströme einen Konformationswechsel des Proteins erfordern bzw. dass die  $\text{Na}^+$ -abhängige Phosphorylierung erfolgen muss, die die Voraussetzung für den  $\text{E}_1\text{P}-\text{E}_2\text{P}$ -Konformationswechsel ist.

### 3.3.6 Spannungsabhängigkeit und Kinetik transientser Ströme

Rückschlüsse auf eine Veränderung der apparenten  $\text{Na}^+_{\text{ext}}$ -Affinität einer mutierten  $\alpha$ -Untereinheit können aus den ouabainsensitiven transienten Ströme unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen gezogen werden. In Abb. 3.3-12 sind die Strom-Zeit-Verläufe der Konstrukte R937S, R937L, D999H, R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  in Antwort auf ein Spannungssprung-Protokoll zu sehen.

Unter diesen Messbedingungen konnten für die Konstrukte D999H, R937S, R937L, R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  stationäre Stromanteile detektiert werden. Dies ist daran zu erkennen, dass die transienten Ströme nicht auf Null zurückgingen, wie es beim WT-Enzym beobachtet wurde. Diese stationären Stromanteile wurden zuvor als ouabainsensitive Leckströme identifiziert.

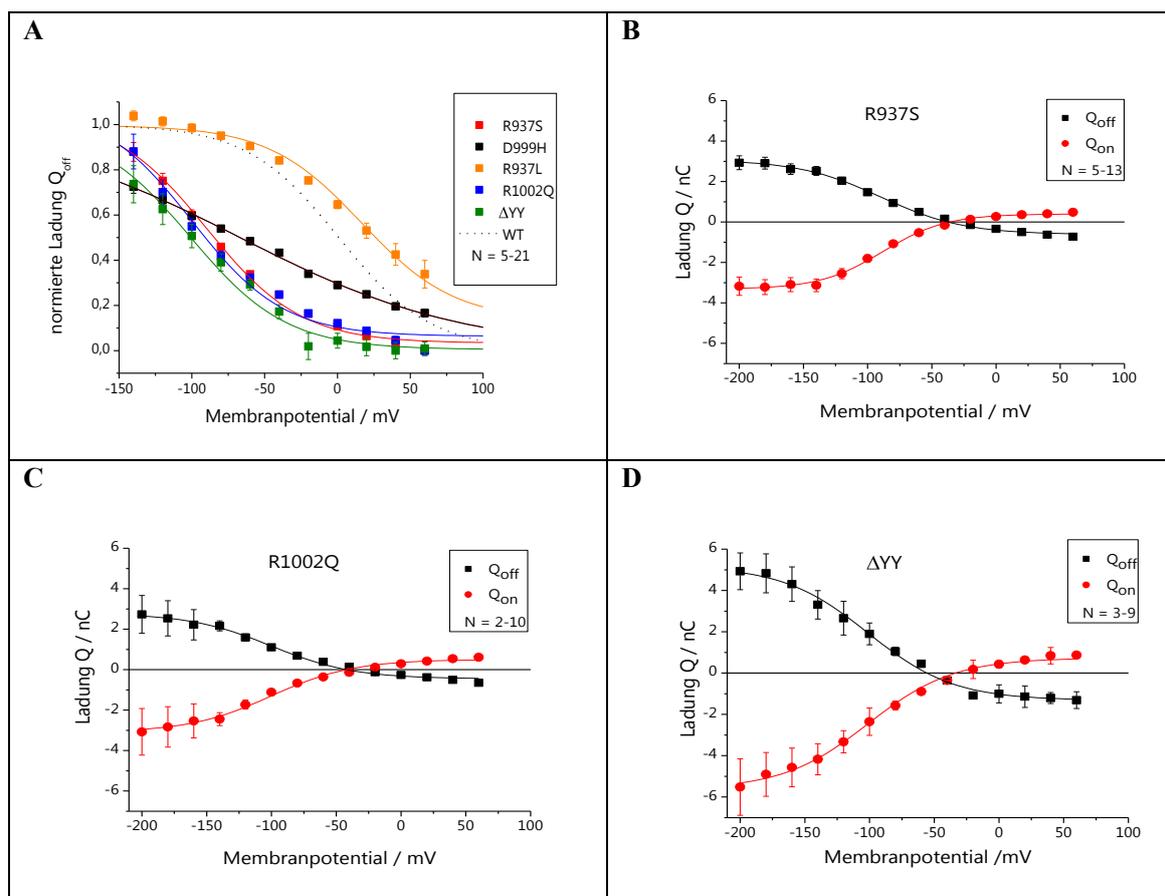
## 3.3 Strukturelevante Aminosäurepositionen im Bereich der dritten Natrium-Bindungsstelle



**Abb. 3.3-12: Repräsentativer Zeitverlauf transienter Ströme für die Konstrukte WT, R937S, R937L, D999H, R1002Q und  $\Delta YY$  unter  $K^+$ -freien Bedingungen und  $[Na^+]_{ext} = 100$  mM.**

Die Differenzströme wurden für Spannungspulse zwischen +60 und -140 mV (in 20 mV-Schritten) an jeweils einer Oozyte bestimmt, wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben.

Der abklingende Anteil der transienten Ströme wurde sowohl für die „on“-, als auch für die „off“-Pulsphase mit einer Exponentialfunktion approximiert und die dabei ermittelte verschobene Ladungsmenge  $Q$  ermittelt. Diese Werte wurden gegen das Membranpotential aufgetragen. Die  $Q$ -Werte von R937S, R1002Q und  $\Delta YY$  konnten nur dadurch auf einen Maximalwert ( $Q_{max}$ ) normiert werden, weil es gelungen war, einen kleinen Anteil der Zellen bis zu einem Potential von -200 mV zu klemmen, bei dem die  $Q(V)$ -Kurven anfangen zu sättigen (Abb. 3.3-13B,C,D). Auf diese Weise konnte  $V_{0,5}$  genauer bestimmt werden.



**Abb. 3.3-13: Spannungsabhängigkeit der verschobenen Ladung im elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschmodus unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen für die Konstrukte D999H, R937S, R937L, R1002Q und  $\Delta\text{YY}$ .**

A) Aufgetragen sind die normierten  $Q(V)$ -Kurven aus den transienten „off“-Strömen der Konstrukte D999H, R937S, R937L, R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  (Abschnitt 2.4.4). Die Normierung der  $Q$ -Werte für R937S (B), R1002Q (C) und  $\Delta\text{YY}$  (D) erfolgte anhand der Daten von Oozyten, die bis  $-200$  mV geklemmt werden konnten, da die  $Q$ -Werte erst bei  $V < -140$  mV ein Plateau erreichten. Die Parameter der Boltzmann-Approximation sind in Tab. 3.3-4 aufgeführt.

Eine bemerkenswerte Ausnahme stellte die Mutante D999H dar. Zwar wies dieses Konstrukt nur kleine stationäre Leckströme auf, die Spannungsabhängigkeit der transportierten Ladung verlief jedoch über den gesamten untersuchten Bereich linear, so dass eine Normierung der  $Q(V)$ -Werte und die Bestimmung eines  $V_{0,5}$ -Werts sehr schwierig war. Zudem waren die transienten Stromsignale im Vergleich zu denen des WT-Proteins schnell und klein (Abb. 3.3-12). Für die Approximation wurde der  $z_q$ -Wert daher so lange reduziert, bis die approximierte Kurve gut mit den Messwerten übereinstimmte. Somit ist der hier bestimmte  $z_q$ -Wert nur ein oberer Grenzwert und der so ermittelte  $Q_{\text{max}}$ -Wert stellt nur einen abgeschätzten Parameter dar. Da  $V_{0,5}$  direkt von dieser Approximation abhängt, ist somit nicht auszuschließen, dass die Verschiebung von  $V_{0,5}$  um ca.  $-70$  mV nur ungenau die tatsächliche Verschiebung widerspiegelt. Mit 0,33 war  $z_q$  im Vergleich zu allen anderen Mutanten sehr klein. Sein Wert sollte im Idealfall bei 1 liegen. Auch dies ist ein Hinweis für die hier nur unpräzise durchführbare Analyse der transienten Ströme, obwohl die Messungen von mindestens 21 gut exprimierenden Oozyten aus neun Zellchargen ausgewertet wurden.

Trotz dieser Ungenauigkeiten bei der Wertermittlung wird bereits am Verlauf der Q(V)-Kurve von D999H die veränderte Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung im Vergleich zum WT-Protein deutlich (Abb. 3.3-13A). Allerdings muss einschränkend gesagt werden, dass 10 mM Ouabain möglicherweise nicht ausreichen, um die Na<sup>+</sup>-abhängigen Ströme komplett zu inhibieren, wie in Abschnitt 3.3.1 erläutert (Abb. 3.3-4). Die Schwierigkeiten bei der Approximation der ouabainsensitiven transienten Ströme könnten auch dadurch bedingt sein. Nichtsdestotrotz zeigt dieses Konstrukt eine deutliche funktionelle Abweichung.

Die V<sub>0,5</sub>-Werte der Konstrukte R937S, R937L, R1002Q und ΔYY waren im Vergleich zum WT-Enzym um ca. 90-100 mV zu negativen Potentialen verschoben (Abb. 3.3-13A, Tab. 3.3-4). Einzig für R937L war V<sub>0,5</sub> um ca. 15 mV zu positiven Membranpotentialen verschoben.

Die starke negative Kurvenverschiebung der Konstrukte R937S, R1002Q und ΔYY, aber auch von D999H zeigt, dass diese Mutanten eine deutlich verringerte apparente Affinität für extrazelluläres Na<sup>+</sup> aufwiesen, da wesentlich stärker hyperpolarisiert werden musste, um Na<sup>+</sup> Ionen in die extrazellulär orientierten Bindungsstellen zu zwingen und so den Konformationswechsel in den E<sub>1</sub>P-Zustand zu ermöglichen. Diese reduzierte Affinität zeigte sich bereits in den ouabainsensitiven I(V)-Kurven unter Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Austauschbedingungen, d. h. in Anwesenheit von extrazellulärem K<sup>+</sup>, da die Vorwärtspumpströme bei negativen Membranpotentialen nicht so effektiv gehemmt wurden wie beim WT-Enzym (Abschnitt 3.3.1).

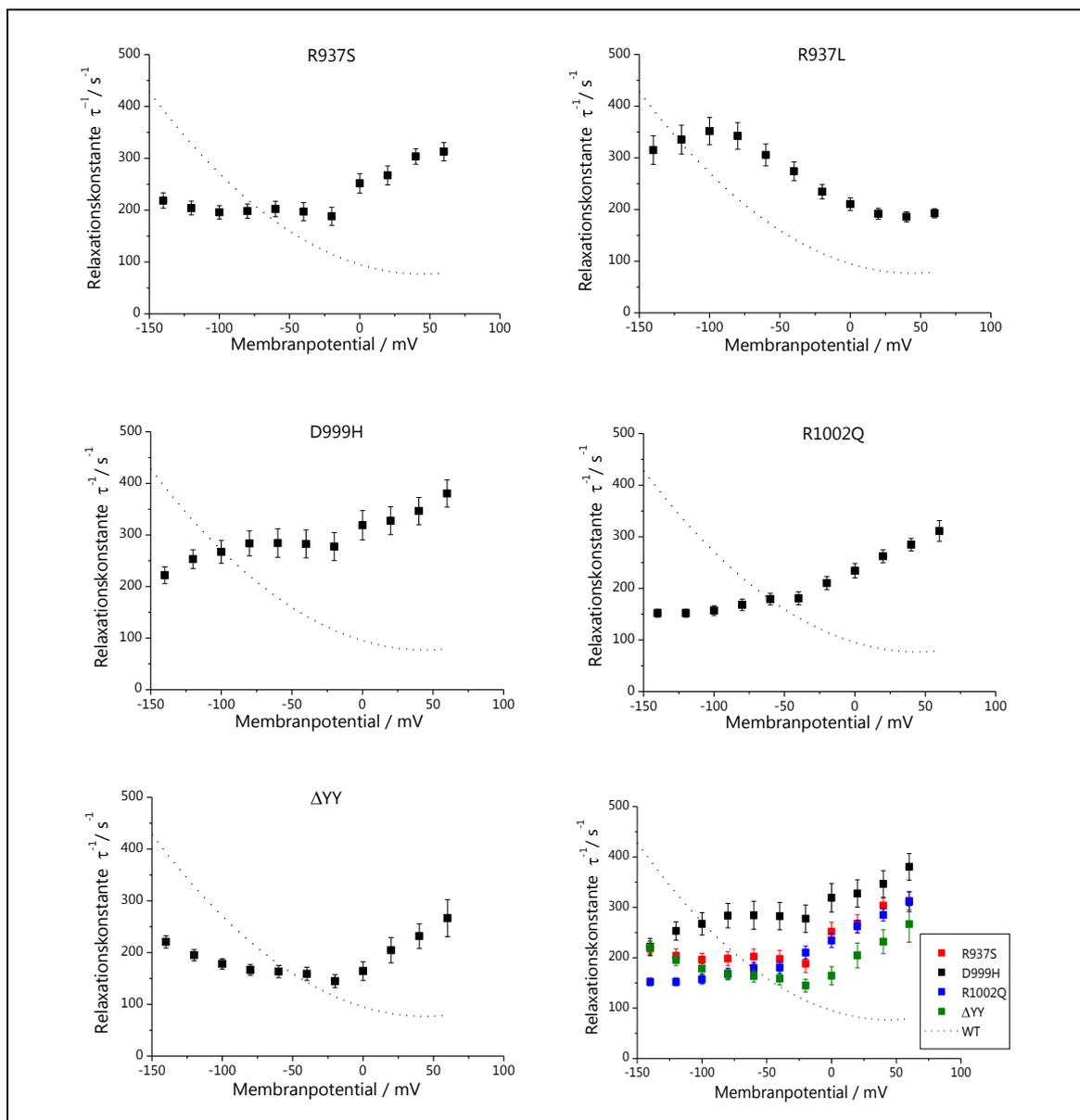
Im Gegensatz dazu ist für R937L aufgrund der positiven Verschiebung der Q(V)-Kurve sogar eine leicht erhöhte apparente Na<sup>+</sup><sub>ext</sub>-Affinität zu vermuten. Offenbar ist das Arginin an Position 937 strukturell entscheidend für die Effektivität, mit der extrazelluläres Na<sup>+</sup> gebunden/okkludiert werden kann, da sich die Substitution dieser Aminosäure je nach Eigenschaft der eingeführten Mutation anders und sogar gegensätzlich auf die apparente Na<sup>+</sup><sub>ext</sub>-Affinität der Pumpe auswirken kann.

|        | Q <sub>min</sub><br>(nC) | Q <sub>max</sub><br>(nC) | V <sub>0,5</sub><br>(mV) | z <sub>q</sub> |
|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| WT     | -6,70 ± 0,70             | 2,30 ± 0,30              | 1 ± 1                    | 0,77 ± 0,02    |
| R937S  | -0,62 ± 0,03             | 3,19 ± 0,11              | -90 ± 3                  | 0,77 ± 0,08    |
| R937L  | -2,56 ± 0,08             | 0,64 ± 0,02              | 17 ± 2                   | 0,78 ± 0,07    |
| D999H  | -1,57 ± 0,33             | 2,45 ± 0,60              | -67 ± 14                 | 0,33 ± 0,11    |
| R1002Q | -0,41 ± 0,04             | 2,79 ± 0,17              | -100 ± 5                 | 0,79 ± 0,08    |
| ΔYY    | -1,4 ± 0,30              | 5,40 ± 0,20              | -101 ± 5                 | 0,76 ± 0,07    |

Tab. 3.3-4: Boltzmann-Parameter der Q(V)-Kurven aus den transienten „off“-Strömen für die Konstrukte WT, D999H, R937S, R937L, R1002Q und ΔYY.

Neben der Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung liefert die Approximation der transienten Stromsignale mit einer Exponentialfunktion auch noch Informationen über die Kinetik der Ladungstranslokation. Die dabei ermittelten Relaxationskonstanten τ<sup>-1</sup> wurden in Abhängigkeit von der Spannung aufgetragen (Abb. 3.3-14).

R937L zeigte hierbei als einzige Mutante einen qualitativ ähnlich spannungsabhängigen Verlauf der Relaxationskonstanten wie das WT-Protein, allerdings sättigten die Werte des Konstrukts bei Potentialen unter -80 mV, während sie das beim WT-Enzym erst bei Potentialen unterhalb von -140 mV taten. Auch war die Kinetik von R937L insgesamt schneller als beim WT-Enzym (Abb. 3.3-14). Eine Sättigung von  $\tau^{-1}$  ist wahrscheinlich durch die Zeitauflösung der Apparatur bedingt, sodass bei starker Hyperpolarisation eine eindeutige Unterscheidung der transienten Ströme und Artefakte erschwert wird.



**Abb. 3.3-14: Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstanten aus den transienten „on“-Strömen der Mutanten D999H, R937S, R937L, R1002Q und  $\Delta YY$  unter  $K^+$ -freien Bedingungen ( $[Na^+]_{ext} = 100$  mM).**

Die aus den „on“-Strömen ermittelten Relaxationskonstanten sind gegen das Testpotential aufgetragen. Der  $\tau^{-1}(V)$ -Verlauf des Wildtyp-Enzyms wurde mit einer Polynomfunktion approximiert und ist jeweils gestrichelt dargestellt. Zum Vergleich wurden die Kurven von R937S, D999H, R1002Q und  $\Delta YY$  übereinandergelegt (Graph unten rechts). Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  S.E. aus 9-20 Zellen.

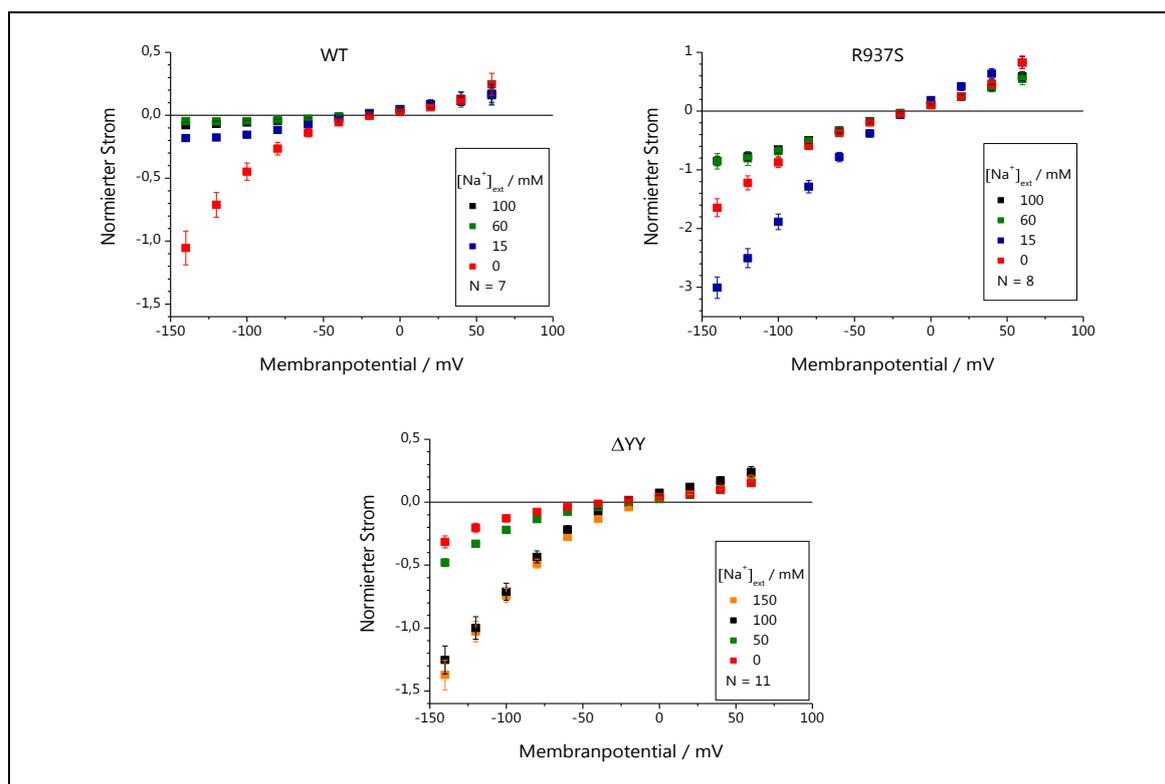
Bei den Konstrukten D999H, R937S, R1002Q und  $\Delta$ YY war die Kinetik der transienten Ströme weniger spannungsabhängig als beim WT-Enzym. Der Verlauf von  $\tau^{-1}$  war für diese Konstrukte ähnlich (Abb. 3.3-14 unten rechts). So waren die Werte bei Potentialen unter 0 mV annähernd konstant und lagen zwischen 150 und 200 s<sup>-1</sup>. Mit steigender Depolarisation erhöhten sie sich auf ca. 300 s<sup>-1</sup>, für D999H sogar auf 400 s<sup>-1</sup>. Insgesamt wies D999H die schnellsten reziproken Zeitkonstanten von allen fünf untersuchten Mutanten auf. Die veränderte Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstanten sind ein Hinweis darauf, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Reaktionszyklus verändert ist.

### 3.3.7 [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub>-Abhängigkeit der Leckströme bei Hyperpolarisation

Da sich die Größe der ouabainsensitiven Leckströme, die bei Membranpotentialen unter 0 mV detektiert wurden je nach extrazellulärer Ionenzusammensetzung für einige Konstrukte unterschieden, und auch angesichts deutlich verringerter apparenter Affinitäten einiger Konstrukte für extrazelluläres Na<sup>+</sup> war es wichtig den Einfluss von extrazellulärem Na<sup>+</sup> auf die ouabainsensitiven Leckströme zu untersuchen. R937S wies unter allen Bedingungen große Leckstromamplituden auf (Abb. 3.3-7). Daher wurde im Weiteren die [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub>-Abhängigkeit dieser Ströme bei pH 7,4 für diese Mutante und zum Vergleich für das WT-Enzym untersucht (Abb. 3.3-15). Dadurch sollte die extrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration ermittelt werden, bei der die ouabainsensitiven Leckströme maximal bzw. minimal werden.

Für das WT-Enzym wurden nur einwärtsgerichtete Leckströme beobachtet, deren Amplituden bei 0 mM Na<sup>+</sup> maximal waren und mit steigender [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub>-Konzentration kleiner wurden. Im Gegensatz dazu waren für R937S die Leckstromamplituden bei Hyperpolarisation in 0 mM Na<sup>+</sup> zwar größer als die in 100 mM Na<sup>+</sup>, allerdings waren sie bei [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> = 15 mM maximal. Dieser Effekt wurde bereits beim WT-Enzym beobachtet, allerdings bei einem pH-Wert von 5,6 (Vasilyev et al., 2004). Es ist zu vermuten, dass geringe extrazelluläre [Na<sup>+</sup>] einen Konformationszustand ermöglichen, der diese Leckströme begünstigt: beim WT-Enzym bei saurem pH<sub>ext</sub> und bei R937S bereits bei neutralem pH<sub>ext</sub>.

Für alle Konstrukte (außer R937L) deutete die Verschiebung der Q(V)-Kurven an, dass die apparente Affinität für extrazelluläres Na<sup>+</sup> deutlich herabgesetzt war (Abschnitt 3.3.6). Daher wurde hier getestet, ob eine Na<sup>+</sup><sub>ext</sub>-Konzentration von 100 mM ausreichte, um die Leckströme dieser Mutanten bei starker Hyperpolarisation zu sättigen. Da  $\Delta$ YY die größte V<sub>0,5</sub>-Verschiebung aufwies, wurden die Leckströme auch bei 150 mM extrazellulärem Na<sup>+</sup> gemessen (Abb. 3.3-15).  $\Delta$ YY generierte bei 50 mM Na<sup>+</sup> größere Leckströme als in Na<sup>+</sup>-freien Lösungen. Die Amplituden dieser Ströme wurden mit zunehmender [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> größer. Zwar fingen die Leckströme bei 100 und 150 mM Na<sup>+</sup> (bei -140 mV) nicht an zu sättigen, aber die Amplituden in 150 mM Na<sup>+</sup> waren nicht größer als in 100 mM Na<sup>+</sup> (Meier et al., 2010). Die Natriumkonzentration, bei der der Leckstrom halbmaximal war, lag für diese Mutante bei ca. 70 mM. Auch für R937S ist ersichtlich, dass die Leckströme, die in Gegenwart von 60 mM und 100 mM Na<sup>+</sup> im extrazellulären Puffer, bei Hyperpolarisation nahezu identisch waren und zusätzlich ab Potentialen unterhalb von -120 mV sättigten.



**Abb. 3.3-15: Spannungsabhängigkeit stationärer Leckströme unter  $K^+$ -freien Bedingungen in Abhängigkeit von der extrazellulären  $Na^+$ -Konzentration für R937S und  $\Delta YY$  im Vergleich zum WT-Protein.**

Dargestellt sind die ouabainsensitiven Leckströme in Abhängigkeit vom Membranpotential bei unterschiedlichen  $[Na^+]_{ext}$  für WT, R937S und  $\Delta YY$ . Die Ströme wurden innerhalb jedes Experiments auf die Amplitude in 10 mM  $K^+$  und 100 mM  $Na^+$  bei 0 mV normiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten aus 7-11 Zellen.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Leckströme in  $Na^+$ -haltigen Lösungen im direkten Zusammenhang mit der Absättigung der extrazellulären Bindungsstellen durch die  $Na^+$ -Rückbindung und dem damit ermöglichten Konformationswechsel ( $E_2P$ - $E_1P$ ) stehen. Da bei hohen extrazellulären  $Na^+$ -Konzentrationen und auch bei stark negativen Potentialen (Abschnitt 3.3.3) keine weitere Steigerung der Leckströme bzw. ein ausgeprägtes Sättigungsverhalten der Stromamplituden zu beobachten ist (zumindest bei R937S), ist zu vermuten, dass unter diesen Bedingungen alle Pumpmoleküle in der Membran unter Änderungen des Konformationszustandes Ionen ins Zellinnere transportieren. Somit wäre die Anzahl der Pumpmoleküle in der Membran und die Geschwindigkeit des Konformationswechsels ein limitierender Faktor.

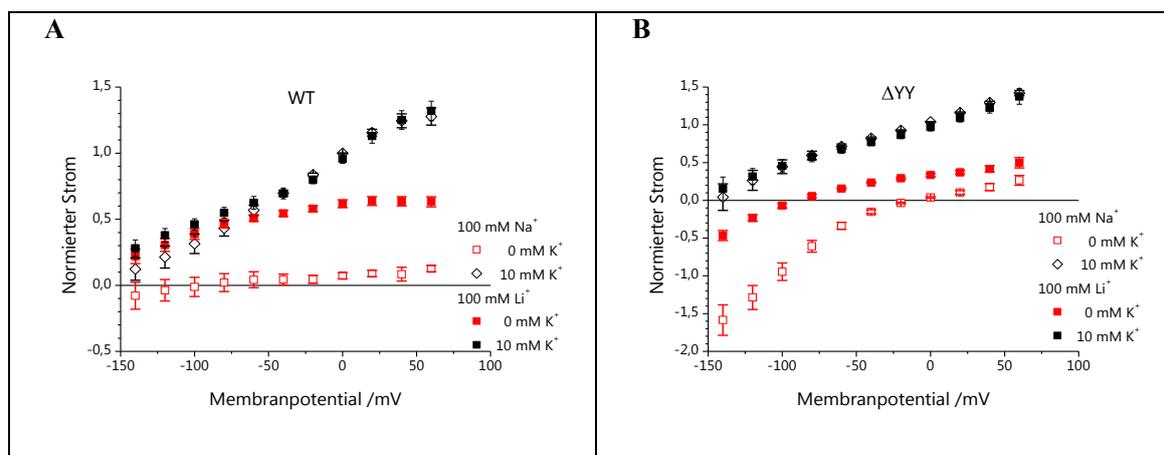
### 3.3.8 Messungen in $Li^+$ -Puffern an $\Delta YY$

$\Delta YY$  zeigte einwärts gleichgerichtete Leckströme in Abwesenheit von extrazellulärem  $K^+$  (Abb. 3.3-7). Diese Ströme waren in Anwesenheit von 100 mM  $Na^+$  allerdings deutlich größer als in  $Na^+$ -freien Lösungen, und zwar bei pH 7,4 und noch ausgeprägter bei pH 5,5. Dies legte den Schluss nahe, dass die Leckströme der Mutante durch  $Na^+$  und nicht, wie es für andere C-terminale Mutanten vermutet wurde, durch Protonen vermittelt werden. Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurden Messungen in  $Li^+$ -haltigen Lösungen vorgenommen, da Lithium in mehreren elektrophysiologischen Studien bereits als möglicher Ersatz für  $Na^+$  diskutiert wurde: in  $K^+$ -haltigen Lösungen kann  $Li^+$  ähnlich agieren wie extrazelluläres  $Na^+$ , d. h.,  $K^+$  und  $Li^+$  können um die extrazellulären

## 3.3 Strukturelevante Aminosäurepositionen im Bereich der dritten Natrium-Bindungsstelle

Bindungsstellen konkurrieren (Bielen et al., 1991). Auch scheint  $\text{Li}^+$  ein adäquates Substitut für intrazelluläres  $\text{Na}^+$  zu sein, da sowohl ein elektrogener  $\text{Li}^+/\text{K}^+$ -Austausch, als auch ein elektrogener  $\text{Li}^+/\text{Li}^+$ -Austausch nachgewiesen werden konnten (Hemsworth et al., 1997; Hermans et al., 1997). In Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{K}^+$  kann die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase allerdings auch einen elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -Austausch vermitteln, sodass  $\text{Li}^+$  auch ähnlich wie  $\text{K}^+$  ins Innere der Zelle transportiert werden kann (Eisner & Lederer, 1980; Bielen et al., 1991; Ratheal et al., 2010). Im Weiteren wurden für  $\Delta\text{YY}$  Messungen in Lösungen durchgeführt, in denen das extrazelluläre  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Li}^+$  ersetzt wurde, um den Effekt auf die ouabainsensitiven Leckströme zu untersuchen (Abb. 3.3-16). Zum Vergleich wurden die gleichen Messungen auch beim WT-Enzym durchgeführt.

Enthielt der extrazelluläre Puffer  $10\text{ mM K}^+$ , unterschieden sich die ouabainsensitiven Ströme des WT-Proteins und der  $\Delta\text{YY}$ -Mutante in  $\text{Na}^+$ -haltigen Lösungen nur wenig von denen, die in  $\text{Li}^+$ -haltigen Lösungen beobachtet wurden (Abb. 3.3-16). Die Stromamplituden des WT-Enzyms als auch von  $\Delta\text{YY}$  wurden mit steigender Depolarisation größer. Auch wurde der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Vorwärtspumpzyklus mit zunehmender Hyperpolarisation gehemmt, was im Rückgang der Stromamplitude deutlich wird. Diese Hemmung war jedoch in  $100\text{ mM Li}^+$  geringer als in  $100\text{ mM Na}^+$ , was auf eine weniger effiziente Konkurrenz von  $\text{Li}^+$  gegenüber  $\text{Na}^+$  an den extrazellulär orientierten Bindungsstellen hindeutet.



**Abb. 3.3-16: Ouabainsensitive stationäre Ströme in An- und Abwesenheit von  $10\text{ mM K}^+_{\text{ext}}$  in  $100\text{ mM Na}^+_{\text{ext}}$  oder  $100\text{ mM Li}^+_{\text{ext}}$  für WT und  $\Delta\text{YY}$ .**

Es wurde die Spannungsabhängigkeit ouabainsensitiver Ströme in  $[\text{Li}^+]_{\text{ext}} = 100\text{ mM}$  oder  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 100\text{ mM}$  sowohl in An- als auch in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{K}^+$  gemessen. Die ouabainsensitiven stationären Ströme in  $100\text{ mM Li}^+_{\text{ext}}$  sind durch gefüllte Symbole und Ströme in  $100\text{ mM Na}^+_{\text{ext}}$  Ströme durch leere Symbole dargestellt. Die Ströme wurden innerhalb jedes Experiments auf die Amplitude in  $10\text{ mM K}^+$  und  $100\text{ mM Na}^+$  bei  $0\text{ mV}$  normiert. Die Daten entsprechen Mittelwerten  $\pm$  S.E. an 4-5 Zellen.

In Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{K}^+$  wurde in  $\text{Li}^+$ -haltigen Lösungen der Vorwärtspumpzyklus des WT-Enzyms bereits bei negativen Potentialen unter  $-100\text{ mV}$  aktiviert, was in den positiven, d. h. den auswärtsgerichteten ouabainsensitiven Strömen sichtbar wird (Abb. 3.3-16A). Diese Ströme stiegen mit zunehmender Depolarisation an und sättigten bei Potentialen über  $0\text{ mV}$ . Dabei lag die maximale Stromamplitude bei nur ca.  $40\%$  der Maximalstromamplitude bei  $10\text{ mM K}^+$ . Dies könnte auf einen elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -Austauschtransport unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen hinweisen, bei der  $\text{Na}^+$  nach außen und  $\text{Li}^+$  nach innen transportiert werden würde. Der hyperpolarisations-

bedingte Rückgang der ouabainsensitiven Ströme in  $\text{Li}^+$ -haltigen Puffern beim WT-Enzym (Abb. 3.3.-10A) deutet außerdem darauf hin, dass es eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zur Ionenrückbindung gibt, ähnlich wie es in  $\text{Na}^+$ -haltigen Lösungen zu beobachten ist, allerdings geringer ausgeprägt. Aus beiden Beobachtungen lässt sich schließen, dass  $\text{Li}^+$  für die Pumpaktivität des WT-Proteins sowohl die Rolle von  $\text{Na}^+$ , als auch die von  $\text{K}^+$  übernehmen könnte.

Dies verkompliziert die Interpretation der Ergebnisse für  $\Delta\text{YY}$ . Die ouabainsensitiven Leckströme der Mutante in  $\text{K}^+$ -freien Lösungen bei starker Hyperpolarisation (unter  $-80\text{ mV}$ ) reduzierten sich in  $100\text{ mM Li}^+$  um etwa  $2/3$  im Vergleich zu  $100\text{ mM Na}^+$  (Abb. 3.3-16B). Allerdings ist die Stromamplitude des einwärtsgerichteten Leckstroms bei  $-140\text{ mV}$  in  $\text{Li}^+$ -haltigen Puffern größer als die, die in  $100\text{ mM NMDG}^+$  ermittelt wurde (Abb. 3.3-5). Aus Abb. 3.3-16B könnte geschlossen werden, dass der Einstrom bei  $0\text{ mM }[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  in  $\text{Li}^+$ -haltigen Puffern durch  $\text{Li}^+$  getragen wird. Allerdings wurde im vorherigen Abschnitt 3.3.7 festgestellt, dass die Leckströme sowohl für R937S ( $\text{pH } 7,4$ ) als auch für das WT-Enzym bei  $\text{pH } 5,6$  am größten in Puffern mit niedriger  $\text{Na}^+$ -Konzentration sind. Daraus wurde geschlossen, dass niedrige  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen einen Konformationszustand begünstigen könnten, der für Protonen durchlässig ist.  $\Delta\text{YY}$  hatte von allen hier untersuchten Konstrukte die geringste apparente  $\text{Na}^+$ -Affinität, sodass es möglich ist, dass dieser Konformationszustand erst bei höheren  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen stimuliert wird. Das gleiche würde für Messungen in  $\text{Li}^+$ -haltigen Puffern gelten, falls  $\text{Li}^+$  ein passendes Substitut für  $\text{Na}^+$  ist.

Außerdem kommt ein weiterer Aspekt hinzu: die  $I(V)$ -Kurve von  $\Delta\text{YY}$  zeigte bei  $100\text{ mM Li}^+$  und  $0\text{ mM K}^+$  einen qualitativ ähnlichen Verlauf wie die ouabainsensitiven  $I(V)$ -Kurven bei nicht-sättigenden  $\text{K}^+$ -Konzentrationen in  $100\text{ mM Na}^+$  oder  $100\text{ mM NMDG}^+$  (Abb. 3.3-1B und Abb. 3.3-5B). In  $\text{K}^+$ -freien  $\text{Li}^+$ -Puffern war bei Potentialen oberhalb von  $-80\text{ mV}$  ein ouabainsensitiver Ausstrom messbar, dessen Maximalamplitude allerdings nur die Hälfte der Stromamplitude des WT-Enzyms betrug. Da nicht auszuschließen ist, dass es bei  $0\text{ mM K}^+$  in  $\text{Li}^+$ -haltigen Puffern zu einem  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -Austausch kommt, könnte der Leckstrom der Mutante von diesem Austauschstrom überlagert sein.

Anhand der Ergebnisse, die unter  $\text{Li}^+$ -haltigen Bedingungen gewonnen wurden, kann also keine verlässliche Antwort auf die Frage gegeben werden, welchen Anteil  $\text{Li}^+$  an den ouabainsensitiven Leckströmen hat. Es ist nicht auszuschließen, dass die Leckströme von  $\Delta\text{YY}$  zumindest z. T. durch  $\text{Li}^+$ - bzw.  $\text{Na}^+$ -Ionen getragen werden. Die Ergebnisse deuten aber vielmehr an, dass ein möglicher Protonenleckstrom durch einen elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -Austausch überlagert wird, also ein ähnlicher Mechanismus stattfindet wie beim  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Austausch in  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffern mit der Einschränkung, dass das Enzym eine geringere Affinität für  $\text{Li}^+$  als für  $\text{K}^+$  hat.

## 4 Diskussion

### 4.1 Strukturelle und funktionelle Bedeutung des C-Terminus‘

Die Veröffentlichung der Kristallstruktur der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im  $\text{E}_2\text{P}$ -Zustand hatte das Hauptinteresse der Forschung auf den C-terminalen Bereich der  $\alpha$ -UE gelenkt (Morth et al., 2007). Im  $\text{E}_2\text{P}$ -Zustand sind die beiden  $\text{K}^+$ -Bindungsstellen (bzw.  $\text{Na}^+$ -Bindungsstellen) mit  $\text{K}^+(\text{Rb}^+)$ -Ionen besetzt. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist die einzige P-Typ-ATPase, die eine dritte Kationenbindungsstelle für  $\text{Na}^+$  aufweist (im Gegensatz z. B. zur  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase), aber bislang konnte nur aufgrund von Mutationsstudien und Modellierungen anhand der SERCA-Struktur die dritte  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle strukturell eingegrenzt werden (Abschnitt 1.1.3). Die Kristallstruktur im  $\text{E}_2\text{P}$ -Zustand zeigte, dass der C-Terminus in eine Bindungstasche zwischen den Transmembrandomänen M5, M7 und M8 ragt, mit dem Loop zwischen M8 und M9 interagiert (am Rest Arg937) und damit an der Stabilisierung der dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle beteiligt sein könnte (Abb. 1.1-5). Morth und Kollegen untersuchten das  $\Delta\text{KETYY}$ -Konstrukt, in dem die letzten C-terminalen Aminosäuren der  $\alpha$ -UE deletiert waren, und stellte eine ähnliche Verringerung der  $\text{Na}^+$ -Affinität fest, wie sie vorher bei Konstrukten bestimmt worden waren, in denen die Reste Tyr775 und Thr811, die mutmaßlich an der dritten Bindungsstelle beteiligt sein sollen, mutiert waren (Vilsen, 1995; Vilsen et al., 1997). Da nicht bekannt ist, wie der C-Terminus in der  $\text{E}_1$ -Konformation strukturell organisiert ist und welche funktionelle Bedeutung er hat, wurden in dieser Arbeit Mutationsstudien am C-Terminus und an Resten, mit denen er interagieren könnte, durchgeführt.

Die Studien wurden an der humanen  $\alpha_2$ -Untereinheit vorgenommen, da in humangenetischen Studien mehrere Mutationen im C-terminalen Bereich identifiziert wurden, die ursächlich für die familiäre (oder sporadische) hemiplegische Migräne sind. Einige dieser Mutationen wurden in dieser Arbeit elektrophysiologisch und proteinbiochemisch untersucht: L994del, D999H, R1002Q, K1003E (M10), R1007W und Y1009X (Deletion der letzten 12 Aminosäuren). Aus diesen Untersuchungen in Kombination mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen können dem C-Terminus verschiedene Rollen zugewiesen, aber auch Annahmen widerlegt werden, die im Folgenden erläutert werden.

#### 4.1.1 C-terminales Arginin-Cluster

Für die Funktionsweise von Spannungssensoren in spannungsaktivierten Kationen-Kanälen sind positiv geladene (basische) Aminosäuren, die sich im elektrischen Feld neu orientieren können, essentiell (Bezanilla, 2008). Arginin-Cluster sind beispielsweise Bestandteile des Spannungssensors in Kalium-Kanälen und tragen dort zu dem spannungsabhängigen Aktivierungsmechanismus der Kanäle bei (Jiang et al., 2003; Tombola et al., 2005; Gonzalez-Perez et al., 2010).

Die humanen  $\alpha$ -Isoformen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase haben einen hochkonservierten C-Terminus, der sich allerdings in einem Bereich bei allen vier Isoformen unterscheidet (Abb. 4.1-1). Die  $\alpha_1$ -Isoform enthält in diesem Bereich (Position 1007-1009; Nummerierung der humanen  $\alpha_2$ -Isoform) drei aufeinanderfolgende Arginine, in der  $\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Untereinheit ist die dritte Position jeweils verändert und in der  $\alpha_4$ -UE ist nur das erste Arginin konserviert. Da sich alle vier Isoformen in ihrer spannungsabhängigkeit unterscheiden, schlugen Morth und Kollegen vor, dass der C-Terminus aufgrund

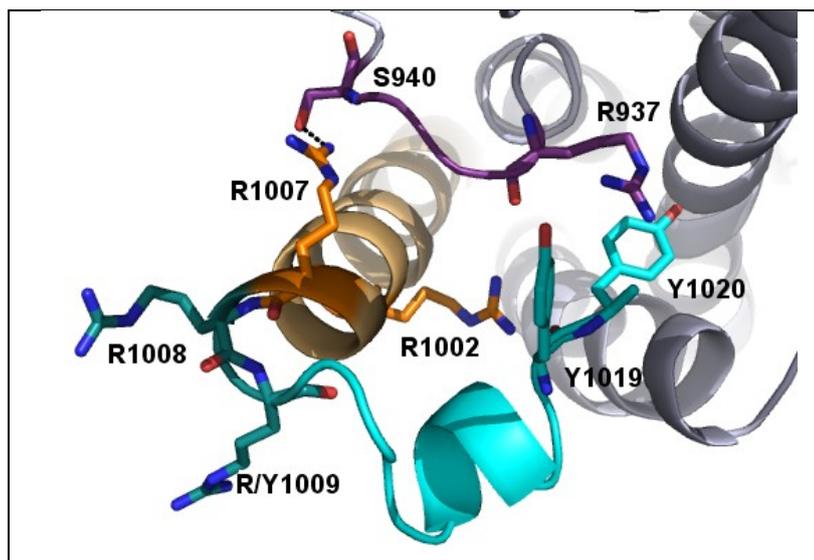
eines Clusters aus drei Argininen (im Falle der  $\alpha_1$ -Isoform) an den Positionen 1007-1009 und 937, 938 und 1002 eine hohe positive Überschussladung trägt (Abb. 4.1-2). Dadurch könnte er (bei Hyper- und Depolarisation) als eine Art spannungssensitiver Schalter agieren, mit direkten Folgen für die  $\text{Na}^+$ -Affinität an der dritten Bindungsstelle (Morth et al., 2007). In Bezug auf die spannungsabhängige Reduktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpstromamplituden bei negativen Potentialen weist die  $\alpha_2$ -Isoform die stärkste Spannungsabhängigkeit auf, wohingegen die  $\alpha_3$ -Isoform nahezu spannungsunabhängig ist (Crambert et al., 2000; Horisberger & Kharoubi-Hess, 2002). Morth und Kollegen konzentrierten sich auf die dritte Arginin-Position 1009 (Morth et al., 2009), da in allen Isoformen an homologer Position eine andere Aminosäure vorhanden ist, und mutierten Arg1009 in der  $\alpha_2$ -UE in ein Asparagin (Y-N), und vice versa das in der  $\alpha_3$ -UE vorhandene Asparagin in ein Tyrosin (N-Y). Die Strom-Spannungs-Kennlinien waren im Vergleich zu den Wildtyp-Isoformen für die meisten Mutanten nicht verändert, allenfalls die  $\alpha_2$ -Y1009N-Mutante ließ ein Abflachen der Strom-Spannungs-Kurve erkennen, das aber nicht als signifikant eingestuft wurde. Auch die Mutation Y1009R der  $\alpha_2$ -UE wies keine Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit, bzw. in der apparenten  $\text{K}^+$ - oder  $\text{Na}^+$ -Affinität auf (Meier, 2009). Diese dritte Position ist nach aktueller Datenlage also nicht für Unterschiede in der Spannungssensitivität verantwortlich. Allerdings ist hier zu erwähnen, dass auch die  $\alpha_1$ -RRR-AAA-Mutante keine Veränderung der Spannungsabhängigkeit erkennen ließ, was generell die Rolle des C-terminalen Arginin-Clusters als Spannungs-„Schalter“ in Frage stellte (Morth et al., 2009). Nach Expression in COS-Zellen ergab die Untersuchung der ATPase-Aktivität der Tripelmutante eine leichte Reduktion der  $\text{Na}^+$ -Affinität und der  $\text{K}^+$ -Affinität (WT:  $K_{0,5} = 0,669 \text{ mM}$ ; RRR-AAA:  $K_{0,5} = 0,843 \text{ mM}$ ), wobei in diesem Expressionssystem die Spannungsabhängigkeit nicht untersucht wurde (Morth et al., 2009). Auch eine Mutation der zweiten Argininposition im  $\alpha_2$ -Konstrukt R1008Q hatte keine elektrophysiologisch nachweisbaren Auswirkungen (Meier, 2009).

|            |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\alpha_1$ | D | E | V | R | K | L | I | I | R | R | R | P | G | G | W | V | E | K | E | T | Y | Y |
| $\alpha_2$ | D | E | V | R | K | L | I | L | R | R | Y | P | G | G | W | V | E | K | E | T | Y | Y |
| $\alpha_3$ | D | E | I | R | K | L | I | L | R | R | N | P | G | G | W | V | E | K | E | T | Y | Y |
| $\alpha_4$ | D | E | I | R | K | L | L | I | R | Q | H | P | D | G | W | V | E | R | E | T | Y | Y |

**Abb. 4.1-1: Die C-terminalen Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ -Isoformen der humanen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.** Der Bereich, in dem sich die Sequenzen deutlich unterscheiden, wurde eingerahmt. Identische Sequenzen im Arginin-Cluster sind rot eingefärbt. Die Aminosäuren, die nicht konserviert sind, sind in unterschiedlichen Schattierungen grau unterlegt.

Die in dieser Arbeit untersuchte Mutation R1007W hingegen zeigte eine veränderte apparente  $\text{K}^+$ -Affinität. Im physiologisch relevanten Potentialbereich von -80 bis +60 mV war die apparente  $\text{K}^+$ -Affinität niedriger (WT:  $K_{0,5} = 1,12 \text{ mM}$ ; R1007W:  $K_{0,5} = 1,55 \text{ mM}$ ) und bei stärkerer Hyperpolarisation ( $V < -80 \text{ mV}$ ) stieg der  $K_{0,5}$ -Wert nicht wie beim WT-Enzym an (Abb. 3.2-2). Ein solches Verhalten wurde vorher noch bei keiner FHM/SHM-Mutanten der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase beobachtet. Allerdings waren die Ströme in diesem Potentialbereich sehr klein, sodass die Bestimmung der  $K_{0,5}$ -Werte mit größeren Fehlern behaftet war. Die apparente  $\text{Na}^+$ -Affinität war hingegen im Ver-

gleich zum WT-Enzym sogar erhöht, was sich auch an den steiler zu negativen Potentialen abfallenden  $K^+$ -induzierten I(V)-Kennlinien zeigte. Arg1007 befindet sich in direkter Nähe zu Ser940 (Abb. 4.1-2), einer bekannten Phosphorylierungsposition der Proteinkinase A (PKA), und könnte zu diesem Rest eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden (Bertorello et al., 1991; Cheng et al., 1997; Therien & Blostein, 2000). Aus molekulardynamischen Simulationen und Mutationsstudien am Ser940 haben Poulsen und Kollegen jüngst geschlossen, dass die Phosphorylierung dieses Rests einen Einfluss auf die Ionenbindung nehmen könnte, da sich bei Phosphorylierung Reste (wie z. B. Gln927, Tyr775 oder Thr811) neu orientieren, die an der dritten  $Na^+$ -Bindungsstelle beteiligt sein könnten (Poulsen et al., 2012). Es ist somit nicht unwahrscheinlich, dass eine Veränderung der Wechselwirkungen zwischen Ser940 und Arg1007 Auswirkungen auf die  $Na^+$ -Affinität haben könnte und, wie im Fall R1007W, durch eine leicht erhöhte apparente  $Na^+$ -Affinität die Kompetitivität zwischen  $Na^+$  und  $K^+$  verändert wird. Anhand dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass die Aminosäurepositionen 1007-1009 aus Struktur-Funktions-Gesichtspunkten zwar eine gewisse Relevanz für extrazelluläre  $Na^+$  und auf  $K^+$ -Affinitäten haben, aber keine Rolle bei der Spannungssensitivität des Ionentransports spielen.



**Abb. 4.1-2: Aminosäurereste des C-terminalen Bereichs der  $\alpha$ -Untereinheit.**

Basierend auf der Röntgenkristallstruktur (PDB-Datei 3B8E) sind die C-terminalen Tyrosine und die Arginine, die zu einem Cluster gehören könnten, im *ball-and-stick*-Modus hervorgehoben (Morth et al., 2007). Zu beachten sind die möglichen Wechselwirkungen zwischen Arg1007 in M10 (orange) und Ser940 im M8/M9-Loop (lila). Der C-Terminus ist cyanfarben dargestellt. Position 1009 ist in der 3B8E-Struktur ( $\alpha_1$ -UE der Schweineniere) ein Arginin und in der humanen  $\alpha_2$ -UE ein Tyrosin (s. Text).

Da in der Literatur die Frage aufgeworfen wurde, ob an einem C-terminalen, für die Spannungssensitivität möglicherweise wichtigen Arginin-Cluster auch Arg1002 und Arg937 beteiligt sind (Morth et al., 2007), richtete sich das allgemeine Interesse auf die Konstrukte R1002Q und R937P, beides FHM2-Mutationen (Tavraz et al., 2008; Poulsen et al., 2010). Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit gezielt die Mutationen R937S und R937L generiert, die die wahrscheinlich stark strukturbrechenden Einflüsse eines Prolins nicht aufweisen sollten. R1002Q, R937P und R937S zeigten eine stark verringerte apparente  $Na^+_{ext}$ -Affinität und die  $K^+$ -abhängigen ouabainsensitiven Ströme waren weniger stark spannungsabhängig als die des WT-Enzyms (Abb. 3.3-1B und

Poulsen et al., 2010). R937L hatte im Gegensatz dazu eine leicht erhöhte apparente Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  und zeigte in den  $\text{K}^+$ -abhängigen I(V)-Kurven bei 10 mM  $\text{K}^+$  keine Abweichung in der Spannungsabhängigkeit (Abb. 3.3-6B). Es wurde bereits von Toustrup-Jensen und Kollegen gezeigt, dass Arg937 eine bedeutende Rolle für die intra- und extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Affinität spielt. Allerdings konnte in dieser biochemischen Studie an aufgereinigtem Protein die Spannungssensitivität nicht untersucht werden (Toustrup-Jensen et al., 2009).

Bei R1002Q, R937P und R937S war die Spannungsabhängigkeit der aus den transienten Strömen bestimmten Relaxationskonstanten (unter  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschbedingungen) erheblich verändert; was auch für die R937L-Mutante gilt, wenn auch der spannungsabhängige Verlauf (Anstieg mit Hyperpolarisation) für diese Mutante noch am ehesten mit dem WT-Verhalten vergleichbar war (Abb. 3.3-14 und Poulsen et al., 2010). Auch aus diesen experimentellen Befunden lässt sich nicht begründen, dass Arg1002 und Arg937 etwas mit der Spannungssensitivität des Ionentransports zu tun haben. Basierend auf dem kinetischen Modell von Holmgren und Rakowski (Abschnitt 1.2.3) legen die charakteristischen Änderungen im spannungsabhängigen Verlauf der Relaxationskonstanten vielmehr die Interpretation nahe, dass es nicht mehr allein die Kinetik der Rückreaktion ( $\text{Na}^+$ -Rückbindung und -Okklusion) ist, die die Relaxationskonstante dominiert, und somit die Kationenokklusion verändert sein könnte (s. dazu im Detail: Abschnitt 4.1.6).

R1002Q, R937P, R937L und R937S allerdings zeigten eine andere Besonderheit: Sie vermittelten pH-abhängig große ouabainsensitive stationäre Leckströme unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen (Abb. 3.3-7 und Poulsen et al., 2010), wie sie auch bei C-terminalen Trunkationskonstrukten beobachtet wurden (Yaragatupalli et al., 2009; Meier et al., 2010; Vedovato & Gadsby, 2010). Daher liegt der Schluss nahe, dass diese Arginine nicht primär die Rolle eines Spannungssensors übernehmen, sondern strukturell bedeutend sind für einen  $\text{Na}^+$ - bzw. Protonen-Zugangskanal zur dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle oder für die Bindungsstelle selbst. Daher können die Ergebnisse nicht im Sinne eines spannungssensorischen C-terminalen Arginin-Clusters interpretiert werden, und Änderungen in der Spannungsabhängigkeit der mutierten Konstrukte beruhen wahrscheinlich auf anderen mechanistischen Effekten.

#### 4.1.2 Stabilisierung der dritten $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle

Aus vielen unterschiedlichen Funktionsstudien kann geschlossen werden, dass der C-Terminus entscheidend an der Stabilisierung der dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle beteiligt ist. Darauf weisen auch verschiedene Mutationen hin, die im Verdacht stehen, neurologische Erkrankungen auszulösen.

Bei einer Verlängerung des C-Terminus<sup>4</sup> kommt es beispielsweise zu verschiedenen funktionellen Abweichungen. In der  $\alpha_3$ -UE wurde eine Mutation nachgewiesen und untersucht, bei der das terminale Tyrosin genetisch dupliziert war: Y1013dup in der Nomenklatur der humanen  $\alpha_3$ -UE (Blanco-Arias et al., 2009). Diese Mutation löste bei der in der Studie untersuchten Patientin ein Dystonie-Parkinson-Syndrom aus. Unter Ouabain-Stressbedingungen zeigten mit  $\alpha_3$ -Y1013dup transfizierte Säugerzellen eine deutlich reduzierte Überlebensfähigkeit; auch wies diese Mutante eine stark verringerte  $\text{Na}^+$ -Affinität auf (Blanco-Arias et al., 2009). Dabei wurde die Mutation sowohl in der  $\alpha_2$ -UE als auch in der  $\alpha_3$ -UE untersucht. Blanco-Arias und Kollegen kamen aufgrund dieser Ergebnisse in Kombination mit Modellierungen zu dem Schluss, dass der C-Terminus direkt an der

dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle beteiligt ist (Blanco-Arias et al., 2009). Tavraz und Kollegen untersuchten die X1021R-Mutante (Verlängerung des C-Terminus‘ um 28 Aminosäuren aufgrund der Mutation des STOP-Codons) elektrophysiologisch in *Xenopus*-Oozyten (Tavraz et al., 2008). Auf die  $\text{Na}^+$ -Affinität hatte die Verlängerung des C-Terminus‘ einen ähnlich Effekt wie die in dieser Arbeit untersuchte D999H-Mutation. Die Kinetik der transienten Ströme lässt sich durch eine im Vergleich zum WT-Enzym umgekehrte Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten beschreiben ( $\tau^{-1}$  stieg mit zunehmender Depolarisation). Auch die Q(V)-Kurve der X1021R-Mutante war ähnlich flach wie die von D999H, und über den untersuchten Spannungsbereich linear, sodass eine Approximierung mittels einer Boltzmann-Funktion schwierig war. Es konnten keine Sättigungswerte der Ladungstranslokation bestimmt werden und der  $z_q$ -Wert war mit ca. 0,3 sehr niedrig, was auch daraufhin deutet, dass die  $\text{Na}^+$ -Rückbindung/Freisetzung weniger spannungsabhängig ist.

In verschiedenen Mutationsstudien an unterschiedlichen  $\alpha$ -Isoformen wurden Konstrukte untersucht, in denen der C-Terminus um eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren verkürzt war:  $\Delta Y$ ,  $\Delta YY$ ,  $\Delta TYY$ ,  $\Delta KES/TYY$ ,  $\Delta WVEKETYY$  und Y1009X, wobei die Ausprägung der funktionellen Einschränkungen mit der Anzahl der deletierten Aminosäuren zunahm, vor allem betraf dies die Affinität sowohl für extra- als auch intrazelluläres  $\text{Na}^+$ . Toustrup-Jensen und Kollegen zeigten an der  $\alpha_1$ -UE der Ratte in COS-Zellen, dass die  $\text{Na}^+$ -Affinität der Phosphorylierungsreaktion im  $E_1$ -Zustand mit zunehmender Verkürzung des C-Terminus‘ immer geringer wurde:  $\Delta Y = 2$ -fach,  $\Delta YY = 9$ -fach,  $\Delta TYY = 17$ -fach,  $\Delta WVEKETYY = 25$ -fach (Toustrup-Jensen et al., 2009). Diese Ergebnisse stimmten mit der vorherigen Studie von Morth und Kollegen überein, die mit derselben Methodik eine 26-fache Verringerung der  $\text{Na}^+$ -Affinität für das  $\Delta KETYY$ -Konstrukt ( $\alpha_1$ -UE vom Schwein) bestimmten (Morth et al., 2007). Auch elektrophysiologische Experimente kamen zu ähnlichen Ergebnissen. In Patch-Clamp-Messungen am  $\Delta KESYY$ -Konstrukt ( $\alpha_1$ -UE von *Xenopus laevis*) wurde eine ca. 10-fache Verringerung der  $\text{Na}^+$ -Affinität bestimmt (WT:  $K_{0,5} = 0,5-1,2$  mM;  $\Delta KESYY$ :  $K_{0,5} = 7-12$  mM) und eine ca. 16-fache Verringerung der apparenten  $\text{Na}^+$ -Affinität (Yaragatupalli et al., 2009). Basierend auf dem *access-channel*-Modell kann die Veränderung der apparenten Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  aus den Q(V)-Kurven der transienten Ströme ermittelt werden. Bei einem  $z_q$  von ca. 0,7 entspricht eine Verschiebung des  $V_{0,5}$ -Werts um -25 mV einer Halbierung der  $\text{Na}^+$ -Affinität (Gadsby et al., 1993; Holmgren & Rakowski, 2006). Mit der in dieser Arbeit für das  $\Delta YY$ -Konstrukt (humane  $\alpha_2$ -UE) ermittelten  $V_{0,5}$ -Verschiebung konnte eine 12- bis 16-fach verringerte apparente  $\text{Na}^+$ -Affinität bestimmt werden (Tab. 3.3-4). Zusätzlich konnte aus den Strömen, die in Abhängigkeit von der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration gemessen wurden (Abb. 3.3-15), ein  $K_{0,5}(\text{Na}^+_{\text{int}})$ -Wert von 10-15 mM berechnet werden, welcher mit dem von Yaragatupalli und Kollegen berichteten Wert für das  $\Delta KESYY$ -Konstrukt übereinstimmt. In elektrophysiologischen Experimenten, in denen die transienten Ströme dieser C-terminal deletierten Konstrukte untersucht wurden, war die Spannungsabhängigkeit der Kinetik erheblich verändert (Yaragatupalli et al., 2009; Meier et al., 2010; Vedovato & Gadsby, 2010). Da diese *pre-steady-state*-Ströme der Bewegung des dritten  $\text{Na}^+$ -Ions durch die Membran entsprechen, welches durch einen *access channel* an die dritte Bindungsstelle gelangt, kann aus diesen gesamten Resultaten geschlossen werden (ohne die Struktur der  $E_1$ -Konformation zu kennen), dass der C-Terminus einen

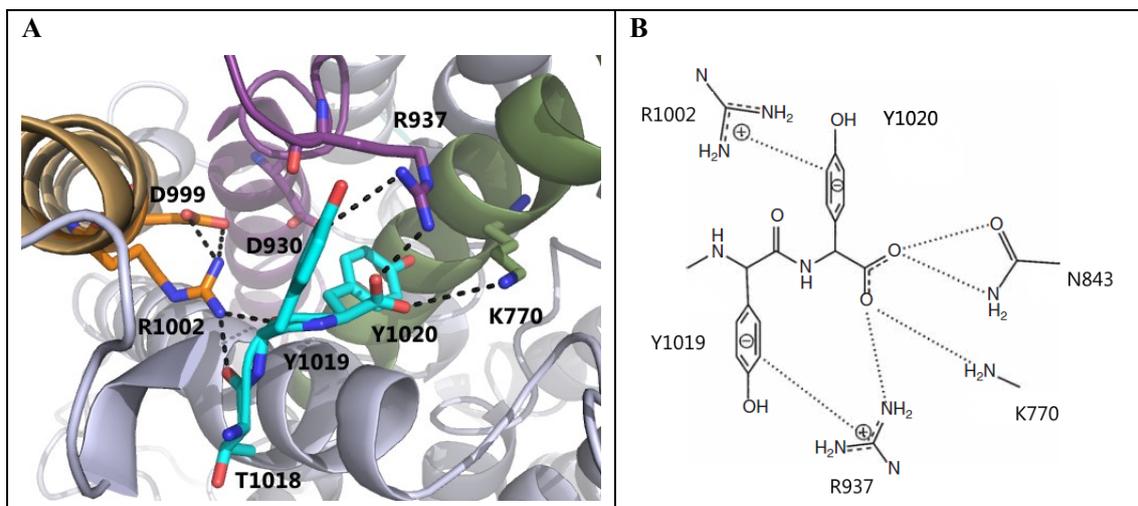
essentiellen Anteil an der Stabilisierung der dritten Kationenbindungsstelle hat und zwar Spezies- und Isoformen-übergreifend.

Aber nicht nur die beiden terminalen Tyrosine scheinen an der Stabilisierung der dritten Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle beteiligt zu sein, wie aus der Kristallstruktur hervorgeht (Abb. 4.1-3A). Die Reste Arg937 (M8/M9-Loop), Asp999 (M10) und Arg1002 (M10) scheinen direkt mit diesen beiden Tyrosinen zu interagieren. Elektrophysiologische Untersuchungen an den Konstrukten R937S, R937P, D999H und R1002Q wiesen alle ähnliche Abweichungen wie die C-terminal deletierten Konstrukte auf, sowohl in der Kinetik als auch in der Q(V)-Verteilung der transienten Ströme (Abschnitt 3.3.6 und Poulsen et al., 2010).

Um genaue Aussagen über die Wechselwirkungen der C-terminalen Tyrosine auf die Na<sup>+</sup>-Pumpfunktion treffen zu können, wurden Tyr1019 und Tyr1020 durch Alanine bzw. Phenylalanine ersetzt (Toustrup-Jensen et al., 2009; Meier et al., 2010; Poulsen et al., 2010). Alanin hat als Seitenkette nur eine Methylgruppe, wohingegen beim Phenylalanin der aromatische Phenylring wie beim Tyrosin vorhanden ist, aber selektiv die OH-Gruppe und damit die Möglichkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung fehlt. Die Substitution der Tyrosine durch Phenylalanine hatte nur einen relativ geringen Einfluss auf die Pumpaktivität. Den OH-Gruppen der Tyrosine wurde auf Grundlage der Kristallstruktur eine besondere Funktionalität zugeschrieben. Morth et al. schlugen vor, dass diese Hydroxylgruppen durch Wasserstoffbrücken mit Arg937 in der Schleife zwischen M8 und M9 und mit Lys770 in M5 wechselwirken (Morth et al., 2007). Die Substitution der Tyrosine durch Alanine hatte allerdings wesentlich tiefergreifende Konsequenzen für die Proteinaktivität. Die I(V)-Kurven, die K<sub>0,5</sub>-Werte, die Q(V)-Verteilung und die Kinetik der transienten Ströme waren denen der ΔYY-Mutanten sehr ähnlich (Meier et al., 2010). Toustrup-Jensen und Kollegen fanden eine 32-fach verringerte Affinität für intrazelluläres Na<sup>+</sup>. Die Eliminierung des aromatischen Rests hatte erhebliche Folgen für die Pumpfunktionalität. Daher scheint die Erhaltung dieser beiden terminalen Phenylringe des C-Terminus<sup>c</sup> von entscheidender Bedeutung für die Stabilisierung der Konformationen zu sein, wobei hier offenbar andere Wechselwirkungen als Wasserstoffbrückenbindungen zum Tragen kommen. Hierbei könnte es sich um amino-aromatische Wechselwirkungen der Phenylringe von Tyr1019/Tyr1020 mit den Amin-Gruppen von Arg937/Lys770 und Arg1002 handeln (Abb. 4.1-3). Dabei würden die partial positiv geladenen (δ<sup>+</sup>) Aminogruppen der Lysin- bzw. Arginin-Seitenketten mit den partial negativ geladenen (δ<sup>-</sup>) π-Elektronensystemen der Tyrosin-Seitenketten wechselwirken (Abb. 4.1-3B), ähnlich wie bereits von Burley und Petsko anhand von Strukturanalysen an globulären Proteinen beschrieben (Burley & Petsko, 1986).

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie unterstreicht die Bedeutung des C-Terminus<sup>c</sup> für die dritte Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle. Paulsen und Kollegen analysierten die Eigenschaften der C-terminalen Bindungstasche, indem Docking-Experimente mit unterschiedlichen Dipeptiden durchgeführt und die Wechselwirkungen in der Bindungstasche simuliert wurden. Bemerkenswerterweise wurden dabei Aminosäurepaare identifiziert (insbesondere deren Wechselwirkungen), die der Simulation zufolge eine größere Bindungsaffinität aufweisen sollten als das natürliche Tyrosinpaar. Anschließend wurden die beiden C-terminalen Tyrosine durch die zuvor als aussichtsreich bestimmten Aminosäure-Dubletts ersetzt und die Konstrukte elektrophysiologisch untersucht (Paulsen et al., 2013). Dabei zeigte sich, dass die YY-WW-Mutante, in der die Tyrosine durch Tryptophane ersetzt wurden, sogar

eine höhere apparente Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  aufwies (Verschiebung der Q(V)-Kurve zu positiven Potentialen). Dies wurde durch verstärkte Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen zu Arg1002 und Arg937 erklärt, da das aromatische Ringsystem von Tryptophan elektronenreicher ist als der aromatische Ring des Tyrosins und die beiden Tryptophane gut in die Bindungstasche passten. Die Studien in ihrer Gesamtheit zeigen also, dass der C-Terminus die Affinität des Enzyms für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  in der  $E_2$ -Konformation reguliert, aber auch für intrazelluläres  $\text{Na}^+$  in der  $E_1$ -Konformation. In diesem Zusammenhang wäre die Frage interessant, ob der Anstieg der apparenten  $\text{Na}^+$ -Affinität, der in dieser Arbeit für die R937L-Mutante gefunden wurde, ebenfalls mit einer erhöhten Wechselwirkungsstärke der C-terminalen Tyrosine korreliert.



**Abb. 4.1-3: Mögliche C-terminale Interaktionen.**

A) Gezeigt sind die möglichen Wechselwirkungen zwischen dem C-Terminus (cyanfarben) und den Aminosäuren Arg1002 und Asp999 in M10 (orangefarben). Die C-terminalen Tyrosine können mit Arg937 (M8/M9-Loop in Lila) und Lys770 (M5 in Grün) interagieren. Am Ende der C-terminalen Kavität befindet sich Asp930.

B) Dargestellt sind die chemischen Interaktionen C-terminaler Aminosäuren. Die Strukturen wurden mit chemDraw (PerkinElmer) gezeichnet, adaptiert von Paulsen et al., 2013.

#### 4.1.3 Charakterisierung der Leckströme: $\text{H}^+$ - oder $\text{Na}^+$ -Ströme

Seit Veröffentlichung der Röntgenkristallstruktur der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wurden verschiedene Sequenzvarianten im C-Terminalen Bereich untersucht (Morth et al., 2007; Toustrup-Jensen et al., 2009; Yaragatupalli et al., 2009; Meier et al., 2010; Vedovato & Gadsby, 2010). In den elektrophysiologischen Studien wie in dieser Arbeit, wurden für eine ganze Reihe von Konstrukten ouabainsensitive Leckströme unter  $\text{K}^+$ -freien Bedingungen gemessen, insbesondere auch in  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffern. Seither wird vor allem die Frage diskutiert, ob diese Ströme durch Protonen oder  $\text{Na}^+$ -Ionen getragen und wie die Ströme vermittelt werden.

Die für die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase erstmals 1991 nachgewiesenen hyperpolarisationsinduzierten stationären Einstrome unter Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-freien Bedingungen sind vom extrazellulären pH abhängig und verursachen eine intrazelluläre Ansäuerung (Rakowski et al., 1991; Wang & Horisberger, 1995). Somit können diese Ströme beim WT-Protein nur durch Protonen, als einzige einwertige Kationen im extrazellulären Puffer, getragen sein. Daher wurde davon ausgegangen, dass das WT-Protein unter Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-freien Bedingungen eine Protonen-permeable Konformation annehmen kann, die der E<sub>2</sub>-Konformation ähnelt (Efthymiadis et al., 1993; Wang & Horisberger, 1995).

Anhand von <sup>22</sup>Na-Efflux-Messungen in Na<sup>+</sup>-freien Lösungen legten Vasilyev und Kollegen dar, dass sich das WT-Protein bei neutralem pH<sub>ext</sub> in einem 3Na<sup>+</sup>/2H<sup>+</sup>-Austauschmodus befindet, da ein leichter Ausstrom detektierbar war (Vasilyev et al., 2004). Sobald aber die Zelle extrazellulär angesäuert wurde, verstärkte sich einerseits der <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>-Efflux, andererseits kam es zugleich zu einem Einwärtsstrom, der nur von Protonen getragen sein konnte, sodass sich das Enzym unter diesen Bedingungen nicht im 3Na<sup>+</sup>/2H<sup>+</sup>-Austauschmodus befinden konnte. Daher kamen Vasilyev und Kollegen zu dem Schluss, dass bei niedrigen pH<sub>ext</sub> ein sowohl H<sup>+</sup>- als auch Na<sup>+</sup>-leitender Weg durch das Protein aktiviert wird, wenn sich das Protein in der E<sub>2</sub>-Konformation befindet, und zwar in vergleichbarer Weise wie bei Ionenkanälen. Ein ähnliches Ergebnis hatte eine Studie von Li und Kollegen, die Mutationen an solchen Aminosäureresten untersuchten, die mutmaßlich an der dritten Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle beteiligt sein sollen, und zwar: Glu958 (M9), Thr811(M6) und Tyr775 (M5) in Abb. 1.1-5. Es zeigte sich, dass die apparente extrazelluläre Na<sup>+</sup>-Affinität zu- oder abnahm, je mehr der extrazelluläre pH anstieg oder respektive sank (Li et al., 2006). Aus den Ergebnissen ihrer Studie schlossen die Autoren, dass die Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle III funktionell an den durch sauren pH-stimulierten Leckstrom gekoppelt ist und dass Protonen und Na<sup>+</sup>-Ionen einen gemeinsamen Zugangsweg zwischen Bindungsstelle und extrazellulärem Medium nutzen.

Das Interessante an einer anderen Studie von Li und Kollegen ist, dass das Konstrukt E958A<sup>6</sup> elektrophysiologisch viele Gemeinsamkeiten zu dem ΔYY-Konstrukt, welches auch von Vedovato und Gadsby untersucht wurde, und dem von Yaragatupalli und Kollegen untersuchten Konstrukt ΔKESYY aufwies (Li et al., 2005; Yaragatupalli et al., 2009; Vedovato & Gadsby, 2010). Dazu gehört: die bei Hyperpolarisation höhere apparente K<sup>+</sup>-Affinität in Na<sup>+</sup>-haltigen Puffern und die unveränderte apparente K<sup>+</sup>-Affinität in Na<sup>+</sup>-freien Medien (Abb. 3.3-3), die reduzierte apparente Na<sup>+</sup>-Affinität (starke Verschiebung der Q(V)-Kurve hin zu negativen Potentialen in Abb. 3.3-13), die in gleicher Weise veränderte Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstanten (Abb. 3.3-14) und die im Vergleich zum WT-Protein kleinen einwärtsgerichteten Leckströme bei negativen Potentialen in Na<sup>+</sup>-freien Puffern. Allerdings zeigte das E958A-Konstrukt keine Leckströme in Na<sup>+</sup>-haltigen Puffern (Li et al., 2005). All diese Gemeinsamkeiten sind erstaunlich, da Glu958 zwar mutmaßlicherweise direkt an der dritten Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle beteiligt ist, aber nicht in das Wechselwirkungs-Netzwerk mit den C-terminalen Tyrosinen eingebunden ist (Abb. 1.1-5). Das untermauert zusätzlich die These, dass der C-Terminus die dritte Kationenbindungsstelle stabilisiert, aber auch, dass sich Na<sup>+</sup>- und H<sup>+</sup>-Ionen einen gemeinsamen Weg zur dritten Bindungsstelle teilen, an dem der C-Terminus beteiligt ist. Des Weiteren kristallisiert sich immer mehr die verallgemeinernde These heraus, dass sämtliche Mutationen, die eine verminderte Na<sup>+</sup>-Affinität hervorrufen - nicht nur im

---

<sup>6</sup> E961A (α<sub>1</sub>-UE der Ratte) bei Li et al., 2005 und 2006.

Bereich des C-Terminus<sup>4</sup> oder der Bindungsstelle III, sondern auch an den beiden Kationenbindungsstellen I und II<sup>7</sup> - mit einer Erhöhung des Na<sup>+</sup>-aktivierbaren Anteils der Leckströme korreliert. Nun bleibt die Frage, ob die einwärtsgerichteten Leckströme, die bei den in dieser Arbeit untersuchten Konstrukten in Na<sup>+</sup>-haltigen Puffern gemessen wurden, durch Na<sup>+</sup>- oder H<sup>+</sup>-Ionen getragen werden, da es sein könnte, dass der Zugangsweg an Bindungsstelle III durch Mutationen im C-Terminus für Na<sup>+</sup> durchlässig ist.

Das Konstrukt D999H zeigte einwärtsgerichtete ouabainsensitive Leckströme nur unter Na<sup>+</sup>-haltigen Pufferbedingungen. Allerdings ist dieses Ergebnis nicht mit ausreichender Sicherheit belegt, da D999H möglicherweise eine herabgesetzte Ouabainsensitivität hat (Abb. 3.3-4). Überdies wiesen  $\Delta$ YY und  $\Delta$ KET/SYY größere Leckströme in 100 mM Na<sup>+</sup><sub>ext</sub> auf als in Abwesenheit von extrazellulärem Na<sup>+</sup>, woraus anfangs geschlossen wurde, dass die Ströme zumindest zum Teil auf einströmendes Na<sup>+</sup> zurückzuführen sind (Yaragatupalli et al., 2009; Meier et al., 2010). Eine weitere Studie an einem ähnlichen  $\Delta$ YY-Konstrukt kam jedoch zu einem anderen Ergebnis (Vedovato & Gadsby, 2010). Vedovato und Gadsby untersuchten die  $\alpha_1$ -Untereinheit von *Xenopus*, wobei sie zunächst die Auswirkungen unterschiedlicher Ouabainresistenz-vermittelnder Mutationen auf die Transporteigenschaften verglichen: zum einen die Kombination Q120R/N131D (welches dem WT-Protein in dieser Arbeit entspricht und bei Vedovato & Gadsby „RD“ genannt wird) und zum anderen die C113Y-Mutation. Das RD- und das C113Y-Konstrukt wiesen beide in Abwesenheit von extrazellulärem Na<sup>+</sup> einwärtsgerichtete Leckströme in der gleichen Größenordnung auf. Die jeweiligen  $\Delta$ YY- und  $\Delta$ KETYY-Mutanten zeigten dagegen ein unterschiedliches Verhalten. RD- $\Delta$ KETYY und RD- $\Delta$ YY zeigten beide größere Leckströme bei [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> = 100 mM als bei [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> = 0 mM. C113Y- $\Delta$ YY dagegen wies genau die umgekehrte Abhängigkeit von den extrazellulären Pufferbedingungen auf (größere Leckströme in [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub> = 0 mM) und bei C113Y- $\Delta$ KETYY waren die Leckströme in An- und Abwesenheit von Na<sup>+</sup> etwa gleich groß. Diese Resultate zeigen zum einen, dass die eingeführten Mutationen zur Ouabainresistenz einen indirekten Einfluss auf die Leckströme haben, der aber bisher nicht nachvollzogen werden konnte. Zum anderen ist die Schlussfolgerung, dass  $\Delta$ YY eher Na<sup>+</sup>- als H<sup>+</sup>-getragene Leckströme vermittelt, nicht zwingend.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu den Konstrukten R937S und R937L legen vor allem den Schluss nahe, dass es sich bei den Leckströmen um passive, nur durch das H<sup>+</sup>-Konzentrationsgefälle getriebene, hoch protonenselektive Ströme handelt, die aber durch die extrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration beeinflusst werden. So verschieben sich die Umkehrpotentiale der bidirektional vermittelten Leckströme bei 0 mM Na<sup>+</sup><sub>ext</sub> um ca. 40-47 mV pro pH-Einheit und in 100 mM extrazellulärem Na<sup>+</sup> um 33-35 mV pro pH-Einheit (Tab. 3.3-2 in Abschnitt 3.3.3). Wären die Ströme auf eine ideale Semipermeabilität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Mutanten für Protonen zurückzuführen, dann würde sich das Umkehrpotential nach der Nernst-Gleichung um ca. 59 mV pro pH-Einheit verschieben. Also ist die starke pH-Abhängigkeit von  $\Delta V_{rev}$  ein deutlicher Hinweis, dass es sich um Protonenströme handelt. Für das WT-Enzym wurde sogar eine Verschiebung des Umkehrpotentials dieser Leckströme von 58 mV/pH-Einheit bei 0 mM Na<sup>+</sup><sub>ext</sub> berichtet (Wang &

<sup>7</sup> Koenderink und Kollegen untersuchten Mutationen an Aminosäureresten, die an den Bindungsstellen I und II beteiligt sind. Die I(V)-Kurven dieser Konstrukte könnten auch auf eine K<sup>+</sup>-abhängige Leckstrominhibierung hindeuten (Koenderink et al., 2003).

Horisberger, 1995). Durch eine weitere Analyse der Leckströme von R937L und R937S anhand der Umkehrpotentiale bei 0 mM und 100 mM  $\text{Na}^+_{\text{ext}}$  auf der Grundlage der GHK-Gleichung konnte das Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten berechnet werden. Aus diesem konnte für sauren, neutralen und basischen pH eine  $\sim 10^8$ -fach bessere Permeabilität für  $\text{H}^+$ -Ionen gegenüber  $\text{Na}^+$ -Ionen abgeleitet werden (Tab. 3.3-2). Beim WT-Protein werden diese Leckströme bei neutralem pH durch extrazelluläres  $\text{Na}^+$  inhibiert. Das Konstrukt R937L vermittelte unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen bidirektional große Leckströme. Wenn extrazellulär  $\text{Na}^+$  vorhanden war, wurden die Leckströme in Einwärtsrichtung wie beim WT-Enzym fast komplett inhibiert, aber nicht in Auswärtsrichtung. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Leckströme durch  $\text{Na}^+$  getragen werden, d. h., dass der Zugangskanal zur Bindungsstelle III nicht für  $\text{Na}^+$  „leak“ ist; zumal dieses Konstrukt keine verringerte apparente Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  aufwies, welches sich bei Hyperpolarisation in der Bindungstasche anreichern würde. Bei den Konstrukten  $\Delta\text{YY}$ , R1002Q und R937S ist diese Inhibition der Einwärtsleckströme durch extrazelluläres  $\text{Na}^+$  außer Kraft gesetzt, woraus geschlossen werden kann, dass die  $\text{Na}^+$ -Ionen nicht mehr in der Lage sind, den Zugangskanal zur Bindungsstelle III für Protonen zu blockieren. Wahrscheinlich können die am  $\text{Na}^+$ -Zugangskanal beteiligten Reste nicht mehr effektiv mit  $\text{Na}^+$  interagieren, denn die hier untersuchten Mutanten wiesen auch alle eine Verringerung der extrazellulären, aber auch intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Affinität auf.

#### 4.1.4 Eigenschaften des Protonentransports

Nach elektrophysiologischer Untersuchung unterschiedlicher Mutationen im C-Terminus erhärtete sich die Hypothese, dass die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase unter bestimmten Umständen Protonen transportiert. Allerdings wurde über die Art und Weise, wie die Protonen transportiert werden, viel diskutiert, vor allem ob es sich um einen passiven Transportmechanismus handelt, wie er für Ionenkanäle charakteristisch ist (Wang & Horisberger, 1995; Rettinger, 1996; Li et al., 2006; Meier et al., 2010).

Bei der Bestimmung von Aktivierungsenergien der Leckströme und des Vorwärtspumpstroms für die Konstrukte  $\Delta\text{YY}$  und R937S zeigte sich, dass sowohl die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Austauschreaktion als auch die Einwärtsleckströme in An- und Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  Aktivierungsenergien in der gleichen Größenordnung hatten, ca. 115-130 kJ/mol (Tab. 3.3-3 in Abschnitt 3.3.4). Diese entsprechen auch den für das WT-Protein bestimmten hohen Aktivierungsenergien des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpstroms ((Friedrich & Nagel, 1997; Tavraz et al., 2009; Castillo et al., 2011). Dadurch kann ein reiner Diffusionsprozess, ausgeschlossen werden, denn in der Literatur sind für die Aktivierungsenergien der viskosen Strömung von Wasser (Eigendiffusion) oder der Ionenleitung in Wasser bei ca. 25°C Werte von 15-20 kJ angegeben (Glasstone et al., 1941; Miller, 1963; Horne et al., 1965; Gillen et al., 1972). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass für Protonenleitfähigkeiten einige Besonderheiten zu beachten sind, wie in einem Übersichtsartikel von T. DeCoursey für spannungsaktivierte Protonenkanäle dargelegt. So weisen die Ionenströme spannungsaktivierter Protonenkanäle ebenfalls hohe Aktivierungsenergien von 125-160 kJ/mol auf, während die Werte für andere Kationenkanäle weitaus geringer sind (Decoursey, 2003). Dieser Umstand wird durch temperaturabhängige und geschwindigkeitsbestimmende Konformationsänderungen im Kanal während des Transports bzw. vor dem Transport erklärt. Auch bei der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und den hier untersuchten Mutanten deutet

alles auf einen Protonentransport hin, der an einen Konformationswechsel gekoppelt und energetisch ähnlicher Natur ist wie die Konformationswechsel während des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Austauschs.

In diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass sich die Eigenschaften der Protonenströme je nach extrazellulären Bedingungen veränderten. Vor allem wirken sich hohe Konzentrationen von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  aus. Das äußerte sich bei den hier untersuchten Mutanten in der  $\text{pH}_{\text{ext}}$ -abhängigen Verschiebung der Umkehrpotentiale (Tab. 3.3-2), die kleiner war in  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffern als in  $\text{Na}^+$ -freien Puffern, und auch in dem Sättigungsverhalten der Einwärtsleckströme in Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  (Abb. 3.3-7).

Dabei muss bedacht werden, dass die Pumpmoleküle in Oozyten-Experimenten im  $\text{E}_2\text{P}$ - oder wahrscheinlich eher in einem  $\text{E}_2\text{P}$ -ähnlichen Zustand festgehalten werden, wenn extrazellulär kein  $\text{Na}^+$  angeboten wird, da der Reaktionsmechanismus aufgrund des Fehlens extrazellulärer  $\text{K}^+$ -Ionen im  $\text{E}_2\text{P}$ -Zustand gestoppt wird. In dieser Konformation ist auch das WT-Protein in der Lage, Protonen zu transportieren, insbesondere je niedriger der extrazelluläre pH-Wert ist. In Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  dagegen, können die Pumpmoleküle einen Konformationswechsel spannungsabhängig in den  $\text{E}_1\text{P}$ -Zustand durchlaufen, was durch Hyperpolarisation begünstigt wird. Das deutet also auf verschiedene Transport-Zustände hin, und zwar abhängig von der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration.

Einen Hinweis auf diese unterschiedlichen Zustände gaben die Resultate aus den Messungen bei verschiedenen  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  (Abschnitt 3.3.7). Für R937S waren die Einwärtsleckströme bei geringen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen von 15 mM am größten. Auch beim WT-Enzym waren die Leckströme bei niedrigen extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen bei pH 5,6 bzw. pH 6,0 am größten (Wang & Horisberger, 1995; Vasilyev et al., 2004). Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es einen Konformationszustand gibt, der eine geringe Barriere für den Zugang von  $\text{H}^+$ -Ionen aufweist, da geringe  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen nicht ausreichen, um den Wechsel in den  $\text{E}_1$ -Zustand zu induzieren, aber vielleicht eine kleine konformationelle Änderung bewirken, die den Protonentransport begünstigt. Das könnte auch ein Grund sein, warum  $\Delta\text{YY}$  größere Ströme in  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffern aufweist (Abb. 3.3-7). Da dieses Konstrukt eine sehr geringe  $\text{Na}^+$ -Affinität hat, könnte der protonenaffine Konformationszustand erst durch höhere extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen stimuliert werden. Faktoren, die diesen Konformationszustand begünstigen, sind also extrazellulär niedrige  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen und auch extrazelluläre Ansäuerung, da die Leckströme bei saurem pH größer werden und sogar beim WT-Enzym in  $\text{Na}^+$ -reichen Puffern induziert werden (Abb. 3.3-7).

Hinweise auf unterschiedliche Transport-Mechanismen je nach extrazellulärer Pufferbedingung gibt die Tatsache, dass die ouabainsensitiven Leckströme bei Hyperpolarisation in  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffern bei allen Konstrukten (außer bei  $\Delta\text{YY}$ , das nicht bei Spannungen unterhalb von -140 mV untersucht werden konnte) anfangen, ab einem bestimmten negativen Potential zu sättigen, während dieses Phänomen bei  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}} = 0$  nicht auftrat (Abb. 3.3-7). Ein ähnlicher Effekt konnte bei bestimmten Mutanten des spannungsgesteuerten *Shaker*  $\text{K}^+$ -Kanals beobachtet werden (Starace & Bezanilla, 2004). Starace und Bezanilla verwendeten hierbei die nicht-ionenleitfähige *Shaker*-IR-Mutante W434F als Hintergrund für Histidin-Mutationen der ersten Arginine des S4-Segments, welches Teil des Spannungssensors ist. Einige der Histidin-Mutanten zeigten einwärts gleichgerichtete Protonenströme bei Hyperpolarisation. Dabei gab es aber Unterschiede: beim Konstrukt R365H erreichten die

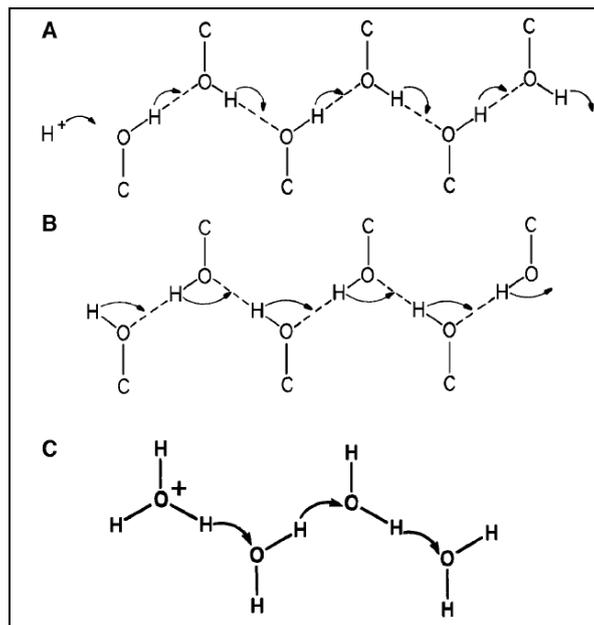
Amplituden der Einwärtsströme ein Maximum bei ca. -60 mV und gingen dann wieder zurück, während beim Konstrukt R362H die Stromamplituden linear mit zunehmender Hyperpolarisation größer wurden. Es wurde argumentiert, dass sich die Seitenkette des Histidins in R365H spannungsabhängig in verschiedenen Konformationen (nach intra- oder extrazellulär, bzw. in einem aktivierten oder inaktivierten Zustand) ausrichten kann, was einer Art *shuttle*-Mechanismus entspricht. Bei  $V_{0,5}$  der halbmaximalen Aktivierung des Kanals ist die Rate, mit der sich der Spannungssensor zwischen der „inaktivierten“ und „aktivierten“ Position hin und her bewegt, am schnellsten. Da bei diesem Übergang die Zugänglichkeit des reversibel protonierbaren Histidins jeweils von außen nach innen wechselt, ist der „*shuttle*“-Strom bei  $V_{0,5}$  maximal. Bei extrem negativen bzw. positiven Potentialen ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für den Übergang vom inaktivierten in den aktivierten Zustand und vice versa minimal und damit auch der „*shuttle*“-Strom. Bei R362H dagegen plädierten Starace und Bezanilla auf einen spannungsgesteuerten Transportmechanismus über eine Protonenpore. Das Histidin von R362H sei ab einem bestimmten Potential von beiden Seiten der Membran zugänglich und ermöglicht so eine  $H^+$ -Leitung durch die Membran, quasi Kanal-artig.

Auch für  $Na^+/K^+$ -ATPase-Mutanten kämen ähnliche Mechanismen in Frage. Da extrazelluläres  $Na^+$  einen Konformationswechsel mit Ausrichtung der Bindungsstellen ins Intrazelluläre induziert und der Protonentransport an einen Konformationswechsel gekoppelt ist, stellt sich ein Reaktionsgleichgewicht zwischen den Konformationszuständen ein. Dieses Gleichgewicht kann abhängig vom Membranpotential verschoben sein, sodass es ab einem bestimmten negativen Potential auf der Seite des Konformationszustandes liegt, der den Protonenfluss nach innen ermöglicht, und die Ströme fangen an zu sättigen (die Ströme sind durch die Anzahl der Pumpmoleküle, die den Konformationswechsel betreiben, limitiert). Im Unterschied zu R365H des *Shaker*-Kanals gehen die Einströme nicht auf null zurück, da die Pumpmoleküle auch bei extremer Hyperpolarisation zwischen zwei Konformationen hin und her pendeln, während bei R365H die Seitenkette auf einer Membranseite ausgerichtet wird. Es wurde bei den Mutanten R1002Q, R937L und auch beim WT-Enzym bei pH 5,5 aber nicht nur eine Sättigung, sondern auch ein Rückgang der Einwärtsleckströme beobachtet. Erklärt werden kann das durch die Konkurrenz von extrazellulären Protonen mit  $Na^+$ , sodass neben dem  $H^+$ -Transport auch der elektroneutrale  $Na^+/Na^+$ -Austausch stattfindet, der bei steigender Hyperpolarisation eventuell favorisiert wird. Beim WT-Protein wird er bei neutralen pH-Werten vollständig bevorzugt.

In Anwesenheit von extrazellulärem  $Na^+$  ist der Protonenstrom wahrscheinlich eng an Konformationswechsel gekoppelt, die durch  $Na^+$  stimuliert werden. Anders sieht es bei den ouabainsensitiven Leckströmen unter  $Na^+$ -freien Bedingungen aus. Der Konformationswechsel kann nicht durch  $Na^+$  induziert werden und es gibt auch extrazellulär keine Konkurrenz zwischen  $Na^+$ - und  $H^+$ -Ionen. Allerdings liegt der Schluss nahe, dass das Membranpotential einen kleinen Konformationswechsel induziert (oder auch die Neutralisation der Bindungsstellen durch Protonen) und damit eine Protonenleitung ermöglicht, aber nur in  $Na^+$ -freien Medien. R937S und R937L ließen unter diesem Umständen Protonenströme in beide Richtungen zu, was bei diesen Konstrukten für eine Zugänglichkeit der Protonen sowohl von extra- als auch von intrazellulär spricht. Damit ähneln die Leckströme der Mutanten den Strömen von R362H des *Shaker*-Kanals, allerdings ließ dieses Konstrukt nur einwärts gleichrichtend Ströme zu.

An die Argumentation von Starace und Bezanilla anknüpfend diskutierten Vedovato und Gadsby in diesem Zusammenhang bei der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase einen  $\text{E}_2\text{P}$ -ähnlichen Zustand, in dem eine protonierbare Seitenkette zum extrazellulären *access channel* gerichtet ist, welche sich dann im protonierten Zustand zum Zytoplasma ausrichtet (Vedovato & Gadsby, 2010). Dies entspricht quasi dem *Shuttle*-Mechanismus einer schwachen Säure, die als Protonencarrier agiert (McLaughlin & Dilger, 1980; Boron, 1983). Diese Seitenkette wäre wahrscheinlich über den C-Terminus zugänglich, da Konstrukte mit Mutationen in diesem Bereich Protonenfluss auch in  $\text{Na}^+$ -haltigen Lösungen zulassen.

Da der extrazelluläre pH die Protonenleitung begünstigt, ist es denkbar, dass die Protonierung verschiedener Reste eine Rolle spielt, entweder beim Protonentransport (also der Weiterleitung) oder eben bei einem Konformationswechsel. An dieser Stelle muss also die Frage aufgeworfen werden, wie die Protonenleitung in anderen für  $\text{H}^+$ -Ionen selektive Proteine organisiert ist, da Protonen mithilfe eines andersartigen Mechanismus‘ durch ein Protein geleitet werden als andere Kationen. Onsager schlug eine Protonenleitung über Wasserstoffbrückenbindungsketten (engl. *Hydrogen Bond Chain*, HBC) vor (Onsager, 1967b; Onsager, 1967a). Protonen können demnach durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen verschiedenen Aminosäureresten im Protein wandern (Abb. 4.1-4). Dies hat den Vorteil, dass es keiner Wasser-gefüllten Pore im Protein bedarf (zur Ermöglichung eines Grotthus-Mechanismus‘, Abb. 4.1-4C). Der Mechanismus wird im Folgenden anhand von Wasserstoffbrückenbindungen, die von Hydroxylresten ausgebildet werden, erläutert (Decoursey, 2003). Ein Proton trifft auf den Beginn einer HBC, wobei die erste Hydroxylgruppe eine günstige Orientierung haben muss. Es folgt ein Protonentransfer entlang der HBC (Abb. 4.1-4A). Nachdem ein Proton die HBC verlassen hat, hat diese eine andere Orientierung als zu Beginn des Transfers (Abb. 4.1-4B). Das nächste Proton kann erst transferiert werden, wenn sich die HBC in die Ausgangsposition zurück orientiert, und erst dann wurde eine Nettoladung transportiert. Treibende Kräfte dieses Prozesses sind der Protonengradient und das Membranpotential. Protonentransfer durch HBC wird besonders durch Wechselwirkungen folgender Reste begünstigt: Tyr-Arg, Cys-Lys, Tyr-Lys, Glu-His und Asp-His (Zundel, 1997). Es können aber auch Wassermoleküle an dieser Kette beteiligt sein. Es gibt inzwischen viele Mutationsstudien, in denen eine signifikante Beteiligung am Protonentransfer für etliche Aminosäurereste nachgewiesen werden konnte, allerdings ist es schwer zu unterscheiden, ob ein Rest direkt an der HBC beteiligt ist, ob er die Struktur stabilisiert oder ob er einfach dazu benötigt wird, ein Wassermolekül in die richtige Position zu koordinieren (Decoursey, 2003). Aminosäuren wie Asp, Glu und His sind gute Kandidaten zur Weitergabe eines Protons, da ihr  $\text{pK}_a$ -Wert niedrig genug ist, um die Protonen nicht zu fest zu binden. Es gibt auch noch die Möglichkeit für Protonen, entlang eines Wassernetzwerks zu wandern, ohne die Position der Wassermoleküle zu verändern, also ein Grotthus-ähnlicher Mechanismus wie beim Gramacidin-Kanal (Abb. 4.1-4C). Besonders wichtig für einen schnellen Protonentransfer sind zum einen die günstige Positionierung der Wassermoleküle zueinander und zum anderen die Länge der Wasserstoffbrücken. In einer engen, mit Wasser gefüllten Pore eines Ionenkanals bewegen sich die Wassermoleküle nicht frei. So können auch hier Aminosäurereste für die richtige Positionierung der  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle sorgen.



**Abb. 4.1-4: Der Mechanismus des Protonentransfers über eine Wasserstoffbrückenbindungskette (HBC).**

In diesem Beispiel wird die HBC durch Hydroxylgruppen (wie z. B. bei Serinen) gebildet. Die Abbildung ist von Decoursey, 2003 entlehnt.

A) Der Protontransfer beginnt auf der linken Seite und setzt sich durch Sprünge einzelner Protonen fort.

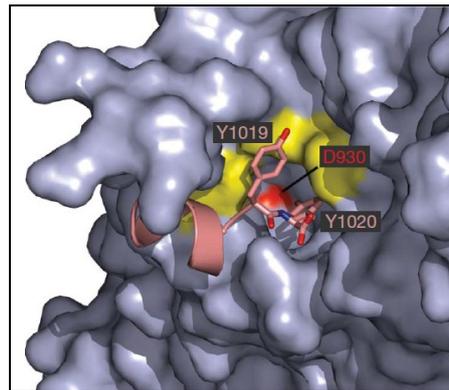
B) Nach dem Transferprozess hat die HBC eine andere Orientierung als am Anfang und muss sich neu positionieren, z. B. durch Rotierung der Hydroxylreste. Erst dann kann ein weiteres Proton transferiert werden (Nagle & Morowitz, 1978).

C) Protonentransfer entlang eines einfachen Wassernetzwerkes.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es unterschiedliche Mechanismen in Proteinen gibt, wie Protonen transportiert werden. Festzuhalten bleibt, dass es bei den  $Na^+/K^+$ -ATPase-Mutanten anscheinend mechanistische Unterschiede gibt, je nachdem ob  $Na^+$  im extrazellulären Medium enthalten ist. Es ist allerdings nicht mit Gewissheit zu klären, wie der Protonentransport in den Mutanten oder auch im WT-Enzym organisiert ist. Es kann durch einen *shuttle*-Mechanismus sein (entweder einer einzelnen Seitenkette oder durch einen Konformationswechsel, der durch Protonierung initiiert wird), über eine Art Grotthus-Mechanismus durch einen mit  $H_2O$ -gefüllten Kanal, der durch den C-Terminus geöffnet wird oder aber auch über eine Wasserstoffbrückenbindungskette durch das Protein. Der Zugang der Protonen zu diesen Prozessen wird allerdings durch den C-Terminus kontrolliert. Bleibt die Frage, welche Reste und strukturellen Elemente an diesem Zugangskanal für Protonen beteiligt sein könnten.

### 4.1.5 Beschaffenheit des C-terminalen Zugangskanals

Die dänische Forschungsgruppe um H. Poulsen fand mithilfe von molekulardynamischen Simulationen Hinweise auf den diskutierten C-terminalen Protonenkanal (Poulsen et al., 2010). In diesen Simulationen an der C-terminal mutierten  $\alpha_2$ -UE und am WT-Protein können Wassermoleküle in eine C-terminale Kavität eindringen, deren Ende durch Asp930 gebildet wird (Abb. 1.2-4, Abb. 4.1-5).



**Abb. 4.1-5: Darstellung der C-terminalen Kavität (aus: Poulsen et al., 2010).**

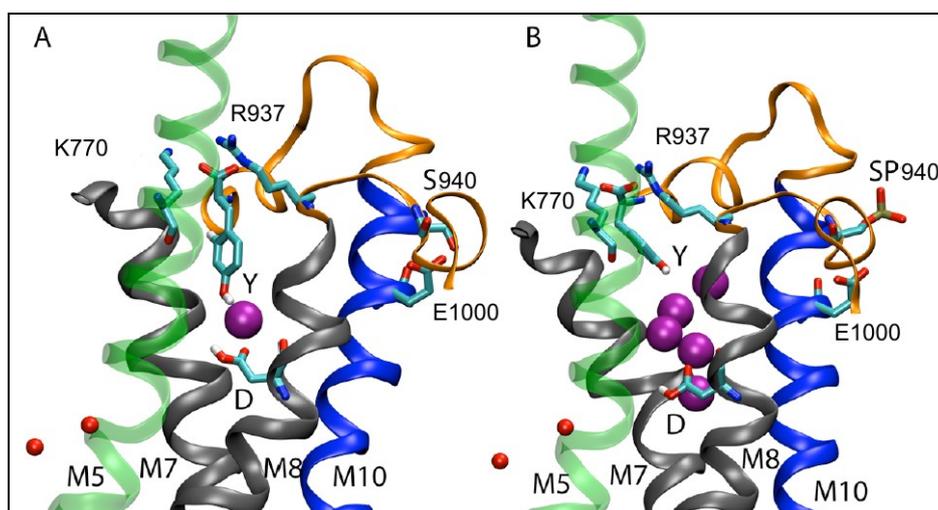
Die Proteinoberfläche zeigt eine Kavität ausgehend vom C-Terminus (Tyr1019 und Tyr1020) zu Asp930 (rot). Die Aminosäuren Arg937, Asp999 und Arg1002 sind gelb koloriert. Die Struktur basiert auf der  $\alpha$ -UE der Rektaldrüse des Hais (PDB-Datei 2ZXE).

Asp930 soll den Zugang zur dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle am Ende des hypothetischen C-terminalen Zugangskanals (engl. *pathway*) zwischen C-Terminus und Bindungsstelle III kontrollieren, und zwar wahrscheinlich abhängig von seinem Protonierungsgrad (Poulsen et al., 2010). Die Asparaginsäure wurde in ein Asparagin mutiert (diese Mutation wurde bei einem Patienten mit RDP in der  $\alpha_3$ -Isoform nachgewiesen (Anselm et al., 2009)), um den protonierten (elektrisch neutralen) Zustand zu imitieren. Dieses Konstrukt<sup>8</sup> zeigte keinerlei ouabainsensitive Einwärtsleckströme (auch nicht in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Na}^+$ ) und keine ouabainsensitiven transienten Ströme (bzw. sehr schnelle, nicht auflösbare transiente Stromsignale). Anhand dieser Ergebnisse wurde die Hypothese entwickelt, dass sich der C-Terminus bei positiven Potentialen neu orientiert und die  $\text{Na}^+$ -Freisetzung ins Extrazelluläre ermöglicht. Durch die Absetzbewegung („*disengagement*“ nach Poulsen et al., 2010) des C-Terminus<sup>4</sup> kann ein intrazelluläres  $\text{H}^+$ -Ion Asp930 protonieren, welches dann den Zugang zur Bindungsstelle III blockiert, sodass die beiden  $\text{K}^+$ -Ionen extrazellulär binden können (Abschnitt 1.2.4, Abb. 1.2-5). Bei negativen Membranpotentialen wird die dritte  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle durch  $\text{Na}^+$  besetzt und blockiert beim WT-Protein jeglichen Einwärtsleckstrom. Fehlen jedoch einige Aminosäuren des C-Terminus<sup>4</sup>, wird der Zugangskanal geöffnet. Dadurch wäre Asp930 direkt zugänglich für  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle, welche bei Hyperpolarisation ungehindert bis zur Bindungsstelle III gelangen, und somit eine durchgängige Protonentranslokationskette ermöglicht.

<sup>8</sup> D923N der humanen  $\alpha_3$ -Untereinheit

Dieser C-terminale Wasserkanal öffnet sich in molekulardynamischen Simulationen auch, wenn Ser940 phosphoryliert wird (Poulsen et al., 2012). Ser940 gehört zu dem konservierten Phosphorylierungsmotiv Arg-Arg-Asn-Ser-Val/Leu/ILE, welches als Erkennungssequenz für die Proteinkinase A dient. In Abb. 4.1-6 ist zu sehen, dass die Phosphorylierung von Ser940 (SP940) im E<sub>2</sub>-Zustand in einer Bewegung des M8/M9-Loops weg vom C-Terminus resultiert, sodass sich alternative Wechselwirkungen der Loops in dichter Nähe zum C-Terminus ausbilden können. Dadurch wird es H<sub>2</sub>O-Molekülen ermöglicht, in die Kavität zwischen den Helices von M5, M7 und M8 zu wandern (Poulsen et al., 2012). Auch diskutierten Poulsen und Kollegen, dass die Neuorientierung der an der Bindungsstelle III beteiligten Reste durch SP940 eine Schwächung der Ionenbindung zur Folge haben könnte. Zum Beweis stehen allerdings noch geeignete Mutationsstudien aus, welche die Phosphorylierungsreaktion imitieren könnten.

Der Einfluss der Phosphorylierungsreaktion von Ser940 auf die Bildung eines Wasserkanals ist dennoch interessant, da hierdurch der indirekte Einfluss auf den Kationentransport bzw. die Kationenzugangswege beleuchtet wird. Ser940 liegt nicht in dem C-terminalen Netzwerk und ist auch nicht an Bindungsstelle III beteiligt. Eine strukturelle Veränderung dieser Aminosäureposition hat dennoch einen großen Einfluss auf die C-terminale Kavität. Auch konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch PKA (wie sie in manchen Zelltypen erfolgt) die Pumpaktivität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bzw. den Na<sup>+</sup>-Efflux beeinflusst (Andersson et al., 1998; Venosa, 2005). Die Veränderungen des C-terminalen intrazellulären Zugangskanals stehen also im direkten Zusammenhang mit Veränderung im Ionentransport und sind vor allem physiologisch relevant, da auch Mechanismen in Zellen (und nicht nur experimentell simulierte) diesen Zugangskanal öffnen/schließen könnten.



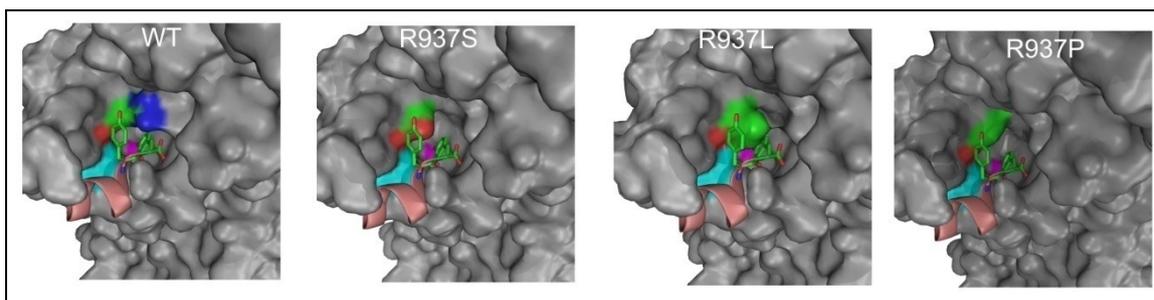
**Abb. 4.1-6: C-terminale Strukturveränderung während der Phosphorylierung von Ser940.**

Simuliert ist das Eindringen von Wasser (lilafarbene Kugeln) zwischen den Helices von M5, M7 und M8 für das WT-Protein (A) und das am Rest Ser940 phosphorylierte Enzym (B). K<sup>+</sup>-Ionen sind als rote Kügelchen dargestellt. Y und D benennen die Reste Tyr1020 und Asp930. Der M8/M9-Loop und die letzten C-terminal gelegenen Reste sind als orangefarbene Bänder gezeigt. Die Strukturen sind an die humane  $\alpha_2$ -UE adaptiert (aus: Poulsen et al., 2012).

Einen weiteren Aspekt des Mechanismus‘ diskutierten Ratheal und Kollegen (Ratheal et al., 2010). Diese Gruppe untersuchte die Selektivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase für verschiedene organische Kationen und Alkalimetalle. Dabei setzten sie Guanidinium-Ionen ( $\text{Gua}^+$ ) als Surrogat für  $\text{Na}^+$  ein und konnten Einwärtsleckströme beim WT-Enzym messen, die anscheinend von  $\text{Gua}^+$  und nicht von Protonen getragen waren (keine pH-abhängige, sondern eine  $[\text{Gua}^+]$ -abhängige  $V_{\text{rev}}$ -Verschiebung). Ratheal und Kollegen stellten daraufhin die These auf, dass Bindungsstelle I und II, die extrazellulär bei der  $\text{Na}^+$ -Rückbindung zuerst besetzt werden (Schneeberger & Apell, 2001), den Zugang zur Bindungsstelle III kontrollieren. Wenn also extrazellulär Kationen wie  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  an Bindungsstelle I und II binden, gibt es keine Einwärtsströme. Wenn aber die Okklusion an diesen beiden Stellen reduziert ist wie bei  $\text{Gua}^+$ , wird ein Zugangskanal zur Bindungsstelle III geöffnet. Dies könnte auch bei Protonierung der Bindungsstelle I und II der Fall sein, welche den C-terminalen Protonenzugang öffnet. Diese These steht nicht im Widerspruch zu der Vermutung von Poulsen und Kollegen, dass die Bewegung des C-Terminus‘ den intrazellulären Zugang öffnet. Eine Konformationsänderung des C-Terminus‘ kann durch die Okklusion an Bindungsstelle I und II initiiert sein.

Es gibt also inzwischen einige Modelle, mit denen die Entstehung des Zugangskanals für Protonen erläutert werden kann. Welche Funktionen üben also die Aminosäurereste aus, die mutmaßlich an diesem Kanal beteiligt sind? Es ist unstrittig, dass die beiden C-terminalen Tyrosine eine wichtige funktionelle Beteiligung an der Stabilisierung der  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle III und aber auch an der Zugänglichkeit des Protonenkanals haben. Der C-Terminus wirkt wie ein Schalter (engl. *switch*), der sich je nach Bindungsverhältnissen neu orientieren kann. Es ist denkbar, dass er durch indirekte Wechselwirkungen die Bindungsstellen, insbesondere die dritte, nach intra- oder extrazellulär ausrichtet. Des Weiteren weisen die C-terminal deletierten Konstrukte eine verringerte apparente Affinität für intrazelluläres  $\text{Na}^+$  auf. Es ist leider nicht bekannt, wie die beiden Tyrosine in der  $E_1$ -Konformation orientiert sind. Sie interagieren wahrscheinlich direkt mit Arg937 und Arg1002 (Abb. 4.1-3), denn es zeigte sich, dass Mutationen an diesen beiden Resten ähnliche funktionelle Konsequenzen haben wie die Deletion der Tyrosine.

Arg937 scheint in diesem Zusammenhang eine noch wichtigere Funktion zu haben. Bei Mutation dieses Rests wurden nicht nur Einwärtsleckströme beobachtet, sondern auch von innen nach außen gerichtete Protonenströme (Abschnitt 3.3.2). Vor allem die Einführung eines Serins, das die Seitenkette des Arginins in einen polaren Rest umwandelt, ermöglichte unter allen Pufferbedingungen einen Aus- und Einwärtsleckstrom, mit allen Eigenschaften eines rein passiven Protonentransports. In Abb. 4.1-7 ist die Beschaffenheit des C-terminalen Zugangskanals im  $E_2$ -Zustand abhängig vom eingefügten Aminosäurerest an Position 937 gezeigt. Arginin (WT) hat eine lange positiv geladene Seitenkette, die über Interaktion mit den Tyrosinen die Kavität ausfüllt. Die Seitenkette des Serins richtet die polare Hydroxylgruppe zur Kavität hin aus, wohingegen das Leucin den Zugang behindert (keine Einwärtsleckströme in  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffer bei pH 7,4) und Prolin den Zugang erweitert (einwärtsgerichtete Leckströme in  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffer bei pH 7,4 (Poulsen et al., 2010)). Um also diese Leckströme zu verhindern scheint Arg937 der kontrollierende Rest zu sein, und zwar sowohl intrazellulär als auch extrazellulär. Da Poulsen und Kollegen auch Asp930 als kontrollierenden Rest für den intrazellulären Zugang zur Bindungsstelle III vorgeschlagen haben, wäre es in zukünftigen Experimenten von großem Interesse eine Doppelmutante D930N/R937S zu untersuchen.



**Abb. 4.1-7: Oberflächendarstellung der C-terminalen Kavität für WT, R937S, R937L und R937P.**

Dargestellt ist die Oberflächenbeschaffenheit des C-terminalen Zugangskanals im  $E_2$ -Zustand abhängig vom eingefügten Rest an Position 937. Die Aminosäure Arg-937 wurde mithilfe des „mutate“-Werkzeugs im Programm PyMol gegen andere ausgetauscht und das Konformer mit den geringsten sterischen Konflikten gewählt. Zur Darstellung diente eine Oberflächenrepräsentation, bei der die C-terminalen Aminosäuren 1013-WVEKETYY ausgenommen wurden und nur die beiden letzten Aminosäuren in *ball-and-stick*-Repräsentation dargestellt sind, um die Form der C-terminalen Kavität kenntlich zu machen. Asp930 ist in Magenta und Arg1002 in Hellblau gezeigt. Das Rückgrat der C-terminalen Sequenz 1013-WVEKETYY ist rosa eingefärbt. In der Oberflächendarstellung der Seitenketten an Position 937 sind Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome dunkelblau und Kohlenstoffatome grün eingefärbt.

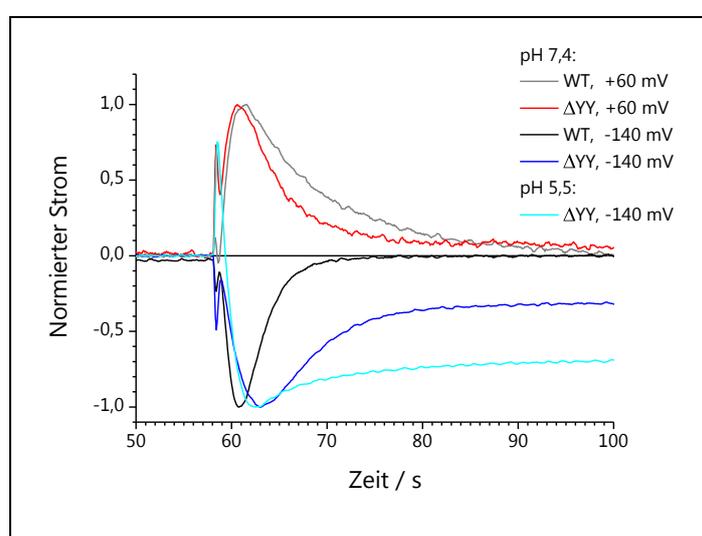
Die Kristallstruktur der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase lässt vermuten, dass Asp999 auch in dem Bereich des Protonenzugangskanals liegt. In der Tat wies das Konstrukt D999H kleine Einwärtsleckströme in  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffern auf. Daraus lässt aber noch nicht schließen, dass Asp999 direkt an der Protonenleitung beteiligt ist. Es ist aber möglich, dass Asp999 einen strukturellen Einfluss auf einen Zugangsweg für  $\text{Na}^+$  hat, da die Mutante die Elektrogenizität der langsamen Komponente der Ladungstranslokation veränderte ( $z_q = 0,3$  in Abb. 3.3-13A, Tab. 3.3-1). Allerdings ist die Interpretation eines veränderten  $z_q$ -Werts schwierig. Die apparente Valenz der Gesamtladungstranslokation ist idealerweise 1 und die Summe aus der dielektrischen Konstante für einen intra- und einen extrazellulären *access channel* (Vasilyev et al., 2004). Ein veränderter  $z_q$ -Wert (bestimmt für den extrazellulären *access channel*) kann auch durch eine Veränderung des intrazellulären *access channels*<sup>9</sup> oder auch des okkludierten Zustands hervorgerufen sein. Dies ist allerdings spekulativ und müsste durch weitere Experimente untersucht werden. Festzuhalten ist, dass die Mutation D999H den spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Transport erheblich beeinflusst.

Die hier diskutierten Mechanismen und molekularen Prozesse scheinen komplex und sind bisher auch nicht zweifelsfrei nachgewiesen. Sie lassen sich aber mit den hier gewonnenen Daten vereinbaren. Dennoch bleiben viele Fragen offen, die allein mit der TEVC-Technik nicht zu beantworten sind. Einen immensen Fortschritt gäbe es, wenn es gelänge, die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im  $E_1$ -Zustand zu kristallisieren, um Erkenntnisse über die Ausrichtung des C-Terminus<sup>4</sup> und auch die genaue Koordination der dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle zu erlangen. Vielversprechende Ergebnisse dazu liefern Untersuchungen zur kovalenten Bindung von Cisplatin an die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, welches ersten Erkenntnissen zufolge in der Lage ist, das Enzym während der Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsreaktion zu inhibieren (Huličiak et al., 2012). Die Untersuchung dieses Themas bleibt somit weiterhin herausfordernd.

<sup>9</sup> In diesem Zusammenhang sei auf den Appendix S3 in einer Studie von Dürr und Kollegen hingewiesen (Dürr et al., 2012). Dort wird berechnet wie die Parameter der Boltzman-Funktion die Form der  $Q(V)$ -Verteilung verändern können. Unter Einbeziehung eines intrazellulären *access channels* (mit  $z_{q,im}$ ) in die mathematischen Überlegungen, verändert sich der effektive  $z_q$ -Wert und kann sogar kleiner werden als die Summe der  $z_q$ -Werte für den extra- und intrazellulären *access channel*. Dies zeigt, dass die Interpretation des  $z_q$ -Werts sehr schwierig ist, wenn die Elektrogenizität von Teilreaktionen nicht eindeutig geklärt ist.

#### 4.1.6 Einfluss der C-terminalen Mutationen auf die Kinetik des Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austauschs

Im Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austauschmodus werden ouabainsensitive transiente Ströme in Na<sup>+</sup>-reichen Puffern (100 mM Na<sup>+</sup>, 0 mM K<sup>+</sup>) gemessen, wodurch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase reversibel den Na<sup>+</sup>-abhängigen Zweig des Reaktionszyklus<sup>4</sup> durchlaufen kann. Da der C-Terminus einen bedeutenden Anteil an der Stabilisierung der dritten Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle hat und insbesondere die Kinetik der transienten Ströme bei den C-terminal mutierten Konstrukten verändert war (Abb. 3.3-14), muss an dieser Stelle das *access-channel*-Modell diskutiert werden, um zu verstehen, welche Rolle der C-Terminus spielen könnte. Zur Veranschaulichung sind am Beispiel von  $\Delta$ YY die qualitativen Unterschiede der transienten „on“-Ströme zum WT-Enzym in Abb. 4.1-8 gezeigt.

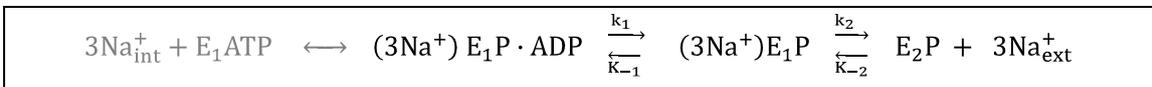


**Abb. 4.1-8: Direkter Vergleich der normierten transienten „on“-Ströme von  $\Delta$ YY und WT.**

Dargestellt sind die Strom-Zeit-Verläufe der „on“-Ströme für das Wildtyp-Protein und für  $\Delta$ YY beispielhaft bei +60 mV und -140 mV (pH 7,4). Zum Vergleich ist die Stromspur bei -140 mV und pH 5,5 für  $\Delta$ YY gezeigt. Die Ströme sind auf den Betrag des jeweiligen Maximums bzw. Minimums normiert, um den qualitativen Verlauf besser darstellen zu können.

Die Stromspuren bei +60 mV und -140 mV wurden auf den Betrag des Maximums bzw. Minimums des transienten Stroms normiert. Beim Anlegen eines Spannungspulses von -140 mV stieg das transiente Signal von  $\Delta$ YY (bei pH 7,4) langsamer an und relaxierte dann auch langsamer als beim WT-Enzym. Dadurch war das Transienten-Signal insgesamt verbreitert. Bei Ansäuerung auf pH 5,5 war die transiente Stromspur von  $\Delta$ YY bei -140 mV noch flacher als bei pH 7,4 und wurde überlagert von einem großen stationären Einstrom. Bei +60 mV hingegen war der „on“-Strom von  $\Delta$ YY schneller als der des WT-Proteins. Daraus wurde ersichtlich, dass die Zeitkonstante der „on“-Ströme für  $\Delta$ YY eine veränderte Spannungsabhängigkeit aufwies. Ähnliche Strom-Zeit-Verläufe wiesen auch die Konstrukte R937S und R1002Q auf. Allein diese qualitative Analyse zeigt, dass bei den C-terminal mutierten Konstrukten (mit Ausnahme von R937L) der Mechanismus der Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austauschreaktion massiv verändert ist, weswegen sich die Frage stellt, welcher Schritt im Reaktionsmechanismus gestört ist.

Ausgehend vom *access-channel*-Modell haben Holmgren und Rakowski ein Vier-Zustands-Modell basierend auf Überlegungen von Peluffo vorgestellt (Peluffo, 2004; Holmgren & Rakowski, 2006). Dabei wurden folgende Schritte im Reaktionszyklus betrachtet (Abschnitt 1.2.3 und Abb. 4.1-9):



**Abb. 4.1-9: Reaktionsschema des Vier-Zustands-Modells des Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austauschmodus.**

Gezeigt sind vier Schritte des Na<sup>+</sup>-Zweigs im Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. k<sub>1</sub> und K<sub>-1</sub> beschreiben respektive die Freisetzung und die Rückbindung von ADP. k<sub>2</sub> beschreibt den E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P-Konformationswechsel, die Deokklusion von Na<sup>+</sup> und seine schnelle Freisetzung. K<sub>-2</sub> ist die spannungs- und [Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub>-abhängige Geschwindigkeitskonstante der Na<sup>+</sup>-Rückbindung und -Okklusion. In Grau gezeigt sind die Na<sup>+</sup>-Bindungsschritte, die durch die anschließend langsame Okklusion kinetisch von der Na<sup>+</sup>-Freisetzung isoliert sind.

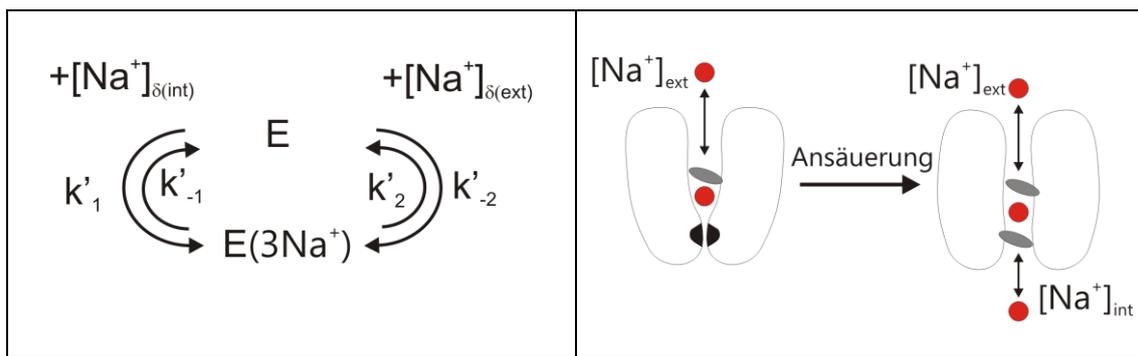
In einem ersten Schritt erfolgt die elektrogene Bindung von Na<sup>+</sup> in einem flachen intrazellulären *ion well*, gefolgt von einer langsamen Okklusion von drei Na<sup>+</sup>-Ionen. Diese Na<sup>+</sup><sub>int</sub>-Bindungsschritte (grau in Abb. 4.1-9) sind jedoch im Vergleich zu den Na<sup>+</sup>-Freisetzungsschritten langsam und kinetisch isoliert, sodass die Spannungsabhängigkeit der Na<sup>+</sup><sub>int</sub>-Bindung keinen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion hat. Der okkludierte Zustand stellt somit eine energetische Barriere, quasi als *gate*, für die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Freisetzung dar. Zudem ist die Dephosphorylierungsreaktion im Verhältnis zur Vorwärtsreaktion sehr langsam, daher wird davon ausgegangen, dass die Pumpmoleküle im Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Austauschmodus reversibel auf drei phosphorylierte Zustände (schwarz in Abb. 4.1-9) verteilt sind und zwischen diesen Phosphointermediaten hin und her pendeln (engl. *shuttle*). Die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion wird dabei von K<sub>-2</sub><sup>10</sup> dominiert. Es ist also die Elektrogenizität der Na<sup>+</sup>-Rückbindung/Reokklusion, die durch Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten aus den transienten Strömen untersucht werden kann, wobei die Pumpmoleküle zwischen dem okkludierten E<sub>1</sub>P-Zustand, der die Na<sup>+</sup><sub>int</sub>-Bindung kinetisch von der Na<sup>+</sup>-Freisetzung ins Extrazelluläre isoliert, und dem deokkludierten E<sub>2</sub>P-Zustand hin und her wechseln.

#### Veränderung der Kinetik durch Ansäuerung beim WT-Enzym

Vasilyev und Kollegen beobachteten, dass sich die Spannungsabhängigkeit der Kinetik des WT-Enzyms abhängig vom extrazellulären pH-Wert änderte (Vasilyev et al., 2004). Bei einem pH<sub>ext</sub> von 5,6 stieg die Geschwindigkeitskonstante bei Depolarisation an, sodass die τ<sup>-1</sup>(V)-Kurve einen parabelförmigen Verlauf hatte. V<sub>0,5</sub> und z<sub>q</sub> der Q(V)-Verteilung waren dagegen nicht verändert. Daraufhin wurde ein weiteres kinetisches Modell entwickelt (Abb. 4.1-10, Anhang A1).

Vasilyev und Kollegen schlugen vor, dass die Protonierung eines bestimmten (aber nicht näher erläuterten) Aminosäurerests die Aktivierungsenergie für die Okklusionsreaktion 3Na<sup>+</sup> + E<sub>1</sub>ATP ↔ E<sub>1</sub>P(3Na<sup>+</sup>) senkt. Dies würde zu einer proportionalen Steigerung der Geschwindigkeitskonstanten für die Vorwärts- (k'<sub>1</sub>) und die Rückreaktion (k'<sub>-1</sub>) führen.

<sup>10</sup> Eine mathematische Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten im obigen Reaktionsschema befindet sich im Anhang A1.



**Abb. 4.1-10: Kinetisches Modell der  $Na^+/Na^+$ -Austauschreaktion bei extrazellulärer Ansäuerung.**

Die Abbildung basiert auf dem von Vasilyev et al. (2004) vorgeschlagenen Reaktionsmodell, welches sich mit der Kinetik der  $Na^+/Na^+$ -Austauschreaktion in Abhängigkeit vom pH-Wert auseinandersetzt. Es werden zwei Zustände angenommen: der okkludierte  $E(3Na^+)$  und der deokkludierte Zustand E.  $[Na^+]_{\delta(int)}$  und  $[Na^+]_{\delta(ext)}$  sind die  $Na^+$ -Konzentration an ihren Bindungsstellen, und zwar intrazellulär mit der dielektrischen Konstante  $\delta_{(int)}$  und extrazellulär mit  $\delta_{(ext)}$ . Bei niedrigen pH-Werten ist die Energiebarriere für das Gleichgewicht zwischen den intrazellulären und den okkludierten  $Na^+$ -Ionen derartig gesenkt, dass der okkludierte Zustand sowohl intra- als auch extrazellulär zugänglich ist.

In ihrem kinetischen Modell erläutern sie, dass der okkludierte Zustand, der bei neutralem pH die intrazelluläre Energiebarriere (*gate*) darstellt, zugänglich wird für extrazelluläres  $Na^+$  (durch einen tiefen *access channel* mit der dielektrischen Konstante  $\delta_{(ext)}$ ), genauso wie für intrazelluläres  $Na^+$  (durch einen flachen *ion well* der Tiefe  $\delta_{(int)}$ ). Dabei gilt  $\delta_{(int)} + \delta_{(ext)} = 1$ . Daraus folgt, dass die Relaxationskonstante  $\tau^{-1}$  sowohl bei negativen als auch bei positiven Potentialen ansteigt gemäß der Gleichung 4.1-2, wobei das Ausmaß des Anstiegs durch die beiden Geschwindigkeitskonstanten  $k'_{-1}$  und  $k'_{-2}$  bestimmt wird.

$$\tau^{-1} = k'_{-1}[Na^+]_{int} \cdot \exp\left(\frac{\delta_{(int)} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) + k'_{-2}[Na^+]_{ext} \cdot \exp\left(-\frac{\delta_{(ext)} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) + C \quad \text{Gl. 4.1-1}$$

(F: Faraday-Konstante;  $V_m$ : Membranpotential; R: Gaskonstante; T: Temperatur).

Zur Vereinfachung ersetzt in dieser Gleichung die Konstante C einen mathematischen Ausdruck, der die spannungsunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten  $k'_{-1}$ ,  $k'_{-1}$  und  $k'_{-2}$  beinhaltet (s. Anhang A1). Dieses Modell stellte also eine Erweiterung des Verständnisses für die Änderung der kinetischen Verhältnisse im WT-Enzym dar und ist hilfreich für die Interpretation der Ergebnisse für die C-terminal mutierten Mutanten.

#### Veränderte Kinetik der mutierten Konstrukte

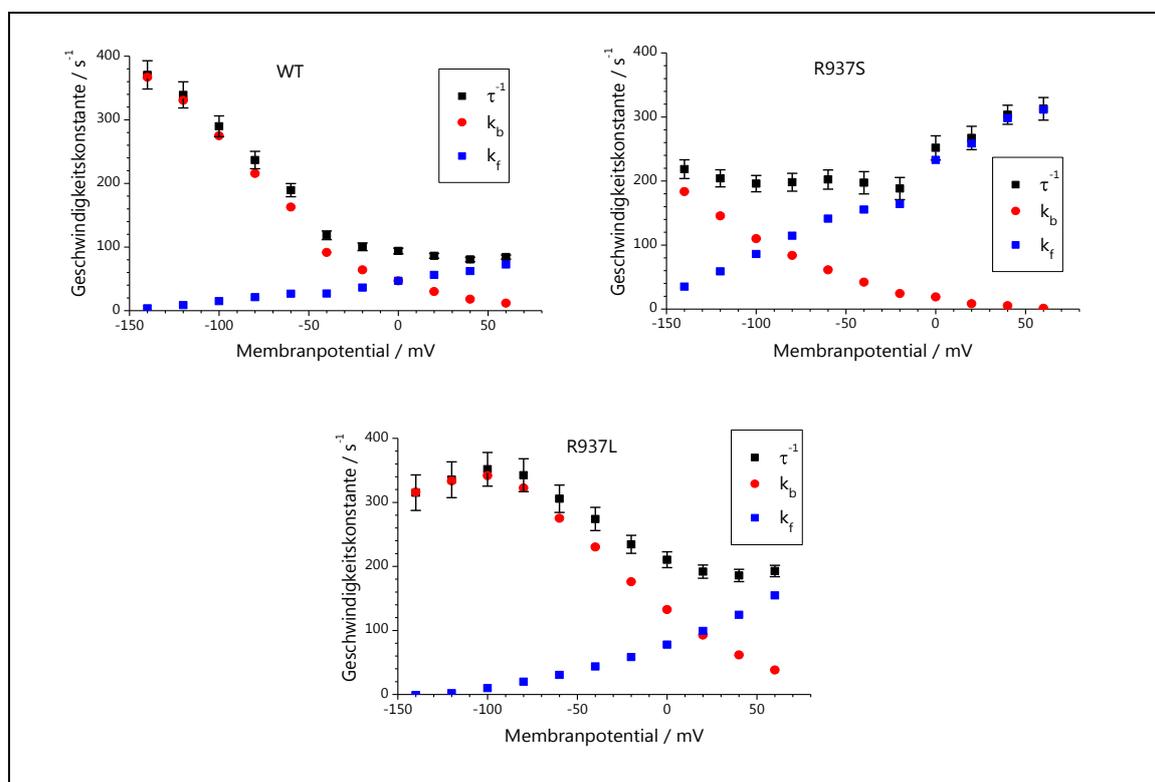
Wie oben erläutert wurde, kann eine umgekehrte Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstante durch eine Schwächung des okkludierten Zustands erklärt werden, der vom Zytoplasma leichter zugänglich ist. Die Mutanten R937S und R937L unterschieden sich in ihrer Kinetik deutlich voneinander. Während R937L einen zum WT-Enzym qualitativ ähnlichen  $\tau^{-1}(V)$ -Verlauf aufwies (Abb. 3.3-14), zeigte die reziproke Zeitkonstante von R937S eine umgekehrte Spannungsabhängigkeit. Dies deutet auf einen ähnlichen kinetischen Mechanismus hin wie der von Vasilyev und Kollegen beschriebene (Vasilyev et al., 2004). Um dieses Modell für die Konstrukte R937L und R937S zu testen, können die Relaxationskonstanten wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben ausgewertet werden.

## Diskussion

### 4.1 Strukturelle und funktionelle Bedeutung des C-Terminus<sup>4</sup>

Die Relaxationskonstante ist im Prinzip die Summe aus der Vorwärts- ( $k_f$ ) und Rückwärts-Geschwindigkeitskonstante ( $k_b$ ). Die Spannungsabhängigkeit von  $k_f$  und  $k_b$  kann aus der Spannungsabhängigkeit von  $\tau^{-1}$  und der Ladung  $Q$  berechnet werden (Abschnitt 2.4.4). Bei dieser vereinfachten Betrachtung kann die Spannungsabhängigkeit der reziproken Zeitkonstante durch verschiedene Effekte verursacht werden. Die Spannungsabhängigkeit von  $k_f$  kann auf der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Freisetzung durch den *access channel* basieren oder ist auf den Einfluss des Membranpotentials auf die effektive  $\text{Na}^+$ -Konzentration im intrazellulären *ion well* (bzw. auf das Gleichgewicht zwischen  $\text{Na}^+$ -Bindung und okkludierten  $\text{E}_1\text{P}$ -Zustand) zurückzuführen. Vice versa kann die Spannungsabhängigkeit von  $k_b$  einerseits die  $\text{Na}^+$ -Freisetzung ins Intrazelluläre widerspiegeln oder aber den Einfluss des Membranpotentials auf die effektive  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen im extrazellulären *access channel*.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Vorwärts- und Rückreaktion wurde auf diese Weise für WT, R937S und R937L bei jedem Membranpotential berechnet (Abb. 4.1-11).



**Abb. 4.1-11: Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Vorwärts- und Rückreaktion im  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschmodus für R937S, R937L und das WT-Enzym.**

Aus der jeweiligen  $\tau^{-1}(V)$ -Kurve und der  $Q(V)$ -Kurve der Konstrukte R937L, R937S und WT wurde für jedes angelegte Membranpotential die Geschwindigkeitskonstante der Vorwärtsreaktion ( $k_f$ ) und der Rückreaktion ( $k_b$ ) nach Gl. 2.4-16 berechnet.

Für das WT-Enzym ist zu sehen, dass  $k_f$  langsam und kaum spannungsabhängig ist. Die Vorwärtsreaktion trägt also wenig zur Spannungsabhängigkeit von  $\tau^{-1}$  bei, sondern es ist die Rückreaktion, die spannungsabhängig ist, wie von Holmgren und Rakowski beschrieben (Holmgren & Rakowski, 2006). Sie ist umso schneller, je stärker die Hyperpolarisation ist, da sich die  $\text{Na}^+$ -Ionen im extrazellulären *ion well* anreichern. Bei R937L unterscheidet sich die Spannungsabhängigkeit von  $k_b$  der

Rückreaktion nur wenig vom WT-Enzym. Die Kurve ist allerdings leicht zu positiven Potentialen verschoben. R937L ließ keine Einwärtsleckströme unter diesen Bedingungen zu, auch schien es, dass die apparente Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  etwas erhöht war. Allerdings wird  $k_f$  der Vorwärtsreaktion schneller, je stärker depolarisiert wird. R937L vermittelte unter diesen Bedingungen auswärtsgerichtete Leckströme. Dies lässt darauf schließen, dass der intrazelluläre Zugang zum okkludierten Zustand destabilisiert sein könnte oder auch der  $\text{E}_1\text{P}-\text{E}_2\text{P}$ - Konformationswechsel eine geringere Energiebarriere hat. Bei R937S ist die Kinetik der Vorwärtsreaktion deutlich verändert.  $k_f$  weist eine nahezu lineare Spannungsabhängigkeit mit einer im Verhältnis zum WT-Protein großen Steigung auf. Die Steigung von  $k_b$  mit zunehmender Hyperpolarisation ist dagegen flacher als beim WT-Enzym oder bei R937L, und die Rückreaktion ist insgesamt langsamer. Bei der Mutante R937S gibt es also zwei Effekte, die mit den bisherigen Überlegungen erklärt werden können. Der extrazelluläre *access channel* ist bei R937S verändert und die  $\text{Na}^+$ -Rückbindung destabilisiert. Gleichzeitig ist die Vorwärtsreaktion schneller und wird durch positive Potentiale erleichtert, was auch hier darauf hindeutet, dass die Energiebarriere entweder für den  $\text{E}_1\text{P}-\text{E}_2\text{P}$ - Konformationswechsel oder für den intrazellulären Zugang zum okkludierten Zustand gesenkt ist.

Der  $\tau^{-1}(\text{V})$ -Verlauf von R937S oder auch von D999H, R1002Q und  $\Delta\text{YY}$  entspricht im Wesentlichen dem Verlauf, den Vasilyev und Kollegen für einen Pumpzyklus vorhergesagt haben, in dem der okkludierte Zustand destabilisiert ist, also der Zugang sowohl von extra- als auch von intrazellulär erleichtert ist. Dies kann eine plausible Erklärung dafür sein, weshalb diese Mutanten diese großen Leckströme zeigen, sogar in  $\text{Na}^+$ -reichen Puffern.

Der C-Terminus hat also eine stabilisierende Funktion auf die  $\text{Na}^+$ -okkludierte Konformation. Diese Argumentation wurde auch von Vedovato und Gadsby geteilt, die darlegten, dass die C-terminal deletierten Mutanten die freie Energie für  $\text{E}_1\text{P}(3\text{Na}^+)$  erhöhen (Vedovato & Gadsby, 2010). Eine Destabilisierung äußert sich in einem schnelleren Konformationswechsel oder einem erleichterten Zugang bzw. einer leichteren Freisetzung intrazellulärer Kationen, sodass die Funktion der  $\text{E}_1\text{P}(3\text{Na}^+)$ -Konformation als intrazelluläres *gate* geschwächt ist. Dabei scheint die Bindung von Protonen (sowohl intra- als auch extrazellulär) an bestimmten Seitenketten von entscheidender Bedeutung zu sein. Diese Bindungen senken die Energiebarriere für den Zugang zum okkludierten Zustand. Beim WT-Protein erschwert der C-Terminus die Bindung dieser Protonen zumindest bei neutralen pH-Werten. Ein extrazellulär saures Milieu hat auch beim WT-Protein ähnliche kinetische Konsequenzen wie die der C-terminal mutierten Mutanten.

#### 4.1.7 Beteiligung des C-Terminus<sup>4</sup> an gemeinsamen K<sup>+</sup>-Bindungsstellen

Es bleibt eine letzte Frage, die in jüngster Zeit diskutiert wurde: Hat der C-Terminus einen strukturellen Einfluss auf die beiden gemeinsamen Bindungsstellen I und II (für Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>)? Über diesen Aspekt gehen die Meinungen in der wissenschaftlichen Gemeinde auseinander. Als erstes plädierten Yaragatupalli und Kollegen, die das  $\Delta$ KESYY-Konstrukt untersuchten, auf einen Einfluss des C-Terminus<sup>4</sup> auf Bindungsstelle I und II, allerdings nur die Affinität für Na<sup>+</sup> betreffend (Yaragatupalli et al., 2009). Als Indiz sahen sie die reduzierten  $K_{0,5}(\text{Na}^+)$ -Werte der K<sup>+</sup>-induzierten Ströme ( $^{\text{Na}}I_{\text{XK}}$ ) bei Hyperpolarisation. Diese Werte wurden mit einer verringerten Konkurrenz von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> um die beiden gemeinsamen Bindungsstellen erklärt, und zwar wegen einer verminderten Affinität für extrazelluläres Na<sup>+</sup> an den Bindungsstellen I und II. Allerdings war (nach Yaragatupalli et al.) die Affinität für K<sup>+</sup> im Gegenzug nicht beeinflusst, da sich die  $\Delta$ KESYY-Mutation nicht auf die stationären Ströme bei sättigenden  $[\text{K}^+]_{\text{ext}}$  auswirkte. Zweites Argument von Yaragatupalli et al. waren die zu negativen Potentialen verschobenen Q(V)-Kurven. Die Na<sup>+</sup>-Rückbindung erfolgt sequentiell, also erst durch die Besetzung der Bindungsstellen I und II gefolgt von der Besetzung der Bindungsstelle III, die der langsamste Bindungsschritt ist. Da die Na<sup>+</sup>-Rückbindung so stark zu negativen Potentialen verschoben war, schlossen Yaragatupalli und Kollegen auf eine verminderte Na<sup>+</sup>-Affinität an den gemeinsamen Bindungsstellen I und II, da diese als erstes besetzt werden müssen und dieser Vorgang abgeschlossen sein muss, bevor die Bindungsstelle III besetzt werden kann. Diesem letzten Argument lässt sich insofern widersprechen, als dass die Besetzung der Bindungsstellen I und II nur leicht spannungsabhängig sind (Holmgren et al., 2000), wohingegen die Besetzung der dritten Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle stark spannungsabhängig ist, sodass eine zu negativen Potentialen verschobene Ladungstranslokation in den transienten Strömen, welche die Bewegung des dritten Na<sup>+</sup>-Ions durch die Membran widerspiegeln, auf einen Einfluss der Mutation auf die spannungsabhängige Besetzung der dritten Bindungsstelle hindeutet.

Die elektrophysiologischen Ergebnisse legen nahe, dass die Bindungsstellen I und II hinsichtlich der K<sup>+</sup>-Affinität nicht von den C-terminalen Mutationen betroffen sind. Die  $K_{0,5}(0\text{Na}^+)$ -Werte waren für die  $\Delta$ KESYY- ( $\alpha_1$ -UE von *Xenopus*) und die hier untersuchte  $\Delta$ YY-Mutante nicht signifikant verändert im Vergleich zum WT-Enzym (Yaragatupalli et al., 2009). Allerdings sind diese Werte und auch die  $K_{0,5}(\text{Na}^+)$ -Werte, wie bereits ausgeführt (Abschnitt 3.3.1), nicht direkt mit WT-Werten vergleichbare Parameter, da der Einfluss der Leckströme nicht klar abgegrenzt werden konnte. Nichtsdestotrotz ist aus den K<sup>+</sup>-abhängigen ouabainsensitiven I(V)-Kurven ( $^{\text{Na}}I_{10\text{K,ouab}}$ ) der Konstrukte R937S, R1002Q und  $\Delta$ YY keine verringerte maximale apparente K<sup>+</sup>-Affinität an den Bindungsstellen I und II zu erkennen, da die I(V)-Kennlinien bei Hyperpolarisation weniger spannungsabhängig und die Kurven insgesamt leicht zu negativen Potentialen verschoben sind (Abb. 3.3-1). Dies deutet auf eine alleinige Beteiligung des C-Terminus<sup>4</sup> an der Bindungsstelle III hin. Das  $\Delta$ KETYY-Konstrukt (humane  $\alpha_2$ -UE) hatte derweil größere funktionelle Auswirkungen auf die Pumpaktivität, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es einen weitreichenden Effekt dieser Mutation auf die Bindungsstellen I und II gibt (Meier et al., 2010).

Vedovato und Gadsby, die Palytoxin-basierte Messungen durchführten, argumentierten allerdings für einen Einfluss des C-Terminus‘ auf die beiden  $K^+$ -Bindungsstellen (Vedovato & Gadsby, 2010). Die Bindung von Palytoxin verwandelt die  $Na^+/K^+$ -ATPase in einen Ionenkanal, der Einwärtsströme in 125 mM extrazellulären  $Na^+$  aufweist (Artigas & Gadsby, 2002). Bei Austausch von extrazellulärem  $Na^+$  gegen  $K^+$  reduzieren sich die Einwärtsströme erst sprunghaft und dann in einer zweiten Phase langsam. Aus diesen Messungen wurde geschlossen, dass  $K^+$  die Offenwahrscheinlichkeit des durch  $Na^+$  geöffneten extrazellulären *gates* reduziert und dadurch die Ablösung des Palytoxins auslöst. Vedovato und Gadsby zeigten in den Palytoxin-Messungen, dass der schnell abklingende Stromanteil bei den C-terminal deletierten Konstrukten (bei Austausch von  $Na^+$  gegen  $K^+$ ) kleiner war als beim WT-Protein. Daraus schlossen sie, dass extrazelluläres  $K^+$  den Kanal weniger effektiv schließen konnte, was als Destabilisierung des  $E_2(2K^+)$ -Zustands interpretiert wurde (Vedovato & Gadsby, 2010).

Schließlich gibt es bisher noch keine klare Antwort auf die Frage, ob die Bindungsstellen I und II von Mutationen im C-terminalen Bereich betroffen sind, da sich einige mechanistische Effekte überlagern. Kürzlich wurde eine Methode zur Messung der  $Rb^+$ -Aufnahme an Oozyten vorgestellt (Dürr et al., 2013). Durch diese Methode konnten  $Rb^+$ -Affinitäten bei der  $H^+/K^+$ -ATPase ermittelt werden (Dürr et al., 2009). Die  $Na^+/K^+$ -ATPase hat eine ähnlich hohe Affinität für  $Rb^+$  wie für  $K^+$ . *Xenopus*-Oozyten, die mit der cRNA der  $Na^+/K^+$ -ATPase (bzw. den jeweiligen Konstrukten) injiziert worden sind, können für einen definierten Zeitraum in einem Puffer mit einer festgelegten  $Rb^+$ -Konzentration inkubiert werden. Die aufgenommene  $Rb^+$ -Menge kann spektralphotometrisch mithilfe eines Atomabsorptions-Spektralphotometers detektiert werden. In einem solchen Experiment könnte die tatsächliche  $Rb^+$ -Aufnahme als Funktion von  $[Rb^+]_{ext}$  von stationären elektrophysiologisch gemessenen Strömen entkoppelt werden (Tavraz et al., 2008). Denkbar wäre auch, dass die Oozyten während der Perfusion mit  $Rb^+$ -Puffer auf ein bestimmtes Potential geklemmt werden. Somit könnten Rückschlüsse auf die tatsächliche  $K^+$ -Affinität insbesondere bei Hyperpolarisation, bei der die Leckströme auftreten, gezogen werden.

## 4.2 Wechselwirkungen mit der $\beta$ -Untereinheit

In höheren Organismen sind die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sowie die gastrische und die nicht-gastrische  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase die einzigen P-Typ-ATPasen, die mit einer  $\beta$ -Untereinheit oligomerisieren. Daher wird angenommen, dass die  $\beta$ -UE eine wichtige Rolle speziell für den Kaliumtransport spielt, da sie erforderlich ist für die Expression, die Faltung des Proteins und letztendlich auch, um die katalytische  $\alpha$ -UE korrekt in die Plasmamembran zu integrieren (Geering, 2001). Da bei Menschen mit familiärer hemiplegischer Migräne Mutationen in der  $\alpha$ -Untereinheit identifiziert wurden, die sich in direkter Nähe zu Interaktionsstellen mit der  $\beta$ -Untereinheit befinden, waren diese Mutanten von besonderem Interesse.

### 4.2.1 Wechselwirkungen mit der $\beta$ -Ektodomäne

Einige Studien haben bereits gezeigt, dass es vor allem die C-terminale extrazelluläre Domäne (Ektodomäne) der  $\beta$ -Untereinheit ist, die den Transport moduliert. Vor allem scheinen hochkonservierte Disulfidbrücken in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen. Außerdem wurde vermutet, dass die  $\beta$ -UE eine Rolle bei der  $\text{K}^+$ -Okklusion spielen könnte (Kawamura et al., 1985; Lutsenko & Kaplan, 1993). Dass es die extrazellulären  $\alpha/\beta$ -Interaktionen sind, die für den Einfluss der  $\beta$ -UE auf die Kationenantaffinitäten verantwortlich sind, konnte durch weitere Studien bestätigt werden (Jaunin et al., 1993; Hasler et al., 1998). Von besonderer Bedeutung scheint hier ein Motiv, bestehend aus ca. acht Aminosäuren (Asp897-Tyr905), im M7/M8-Loop der  $\alpha$ -Untereinheit zu sein. Die Interaktionen der  $\beta$ -Untereinheit mit diesem SYGQ-Motiv wurde als Schlüsselereignis für die korrekte Faltung von neu synthetisierten  $\alpha$ -Untereinheiten identifiziert (Colonna et al., 1997; Beguin et al., 2000). Durch Alanin-Mutationen in dieser Region der  $\alpha_1$ -UE wurde die Assemblierung mit der  $\beta_1$ -UE verhindert, sodass die  $\alpha$ -Untereinheit in einem falsch gefalteten Zustand verblieb und noch im endoplasmatischen Retikulum (ER) abgebaut wurde (Beguin et al., 2000). Es wurde daraufhin ein Modell zur modulierenden Funktion der  $\beta$ -Untereinheit entwickelt (Geering, 2001): In der ER-Membran assembliert die  $\beta$ -UE mit denjenigen neu synthetisierten  $\alpha$ -Untereinheiten, die ihren M7/M8-Loop zur lumenalen Seite des ER ausgerichtet haben. Während dieses Prozesses bleibt M7 in der ER-Membran stabil und ein Konformationswechsel im M7/M8-Loop findet statt, der neue Möglichkeiten zu intramolekularen Wechselwirkungen mit den anderen  $\alpha$ -Transmembrandomänen schafft. Dadurch können diese korrekt in die ER-Membran integriert werden, wodurch die  $\alpha$ -Untereinheit in ihrer Gesamtstruktur stabilisiert wird und zur Plasmamembran transportiert werden kann. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Interaktion zwischen der  $\beta$ -UE und der  $\alpha$ -UE (insbesondere am M7/M8-Loop) eine Erkennungssequenz für den proteolytischen Abbau der  $\alpha$ -Untereinheit maskiert (Beguin et al., 2000).

In diesem extrazellulären M7/M8-Loop wurden bereits mehrere FHM- bzw. SHM-relevante Mutationen identifiziert, darunter W887R, G900R, E902K und R908Q (De Fusco et al., 2003; Jurkat-Rott et al., 2004; de Vries et al., 2007; Deprez et al., 2007). W887R und R908Q, die sich nicht direkt am SYGQ-Motiv befinden, wurden bereits untersucht (Koenderink et al., 2005; Tavraz et al., 2009). Das W887R-Konstrukt konnte in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Koenderink et al., 2005). Diese Mutation hatte aber einen kompletten Funktionsverlust zur Folge, da die Pumpaktivität weder

elektrophysiologisch gemessen noch über  $\text{Rb}^{2+}$ -Aufnahmeexperimente nachgewiesen werden konnte. Auch ließ sich keine ATP-Aktivität detektieren. Außerdem hatte das Konstrukt eine stark verringerte Ouabainsensitivität. Dieser Umstand wurde mit der Nähe von Trp887 zu Arg880 begründet, welches die Ouabainaffinität beeinflusst. Die Mutation W887R schien allerdings nicht störend auf das Targeting zu wirken, sodass die Wechselwirkung mit der  $\beta$ -Untereinheit scheinbar nicht beeinträchtigt war. Andererseits haben Koenderink und Kollegen nicht ausgeschlossen, dass die Substitution des neutralen Tryptophans durch ein positiv geladenes Arginin trotz allem die Interaktion der  $\alpha$ - mit der  $\beta$ -Untereinheit während des katalytischen Zyklus, in dem es zu großen Konformationsänderungen kommt, stören könnte.

Die R908Q-Mutation, die näher am SYGQ-Motiv liegt, hatte allerdings einen Einfluss auf das Targeting (Tavraz et al., 2009). Das Konstrukt war in *Xenopus*-Oozyten elektrophysiologisch funktionell, wies aber gegenüber dem WT-Protein eine verringerte Expression in der Plasmamembran auf, was sich auch in stark verringerten Pumpströmen widerspiegelte. Arg908 kann eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoff von Leu797 im M5/M6-Loop ausbilden. Eine Mutation dieses Rests könnte also die Stabilisierung von M5 stören. Eine komplette Störung der Wechselwirkung mit der  $\beta$ -UE ist allerdings nicht wahrscheinlich, da das Konstrukt R908Q in der Totalmembranfraktion (also im Ganzzell-Lysat) in ähnlicher Menge wie das WT-Protein nachgewiesen werden konnte. Anscheinend wurde das Protein nicht bereits im ER abgebaut, wie es zu erwarten wäre, wenn die  $\beta$ -UE nicht korrekt an der Faltung beteiligt ist (s. oben).

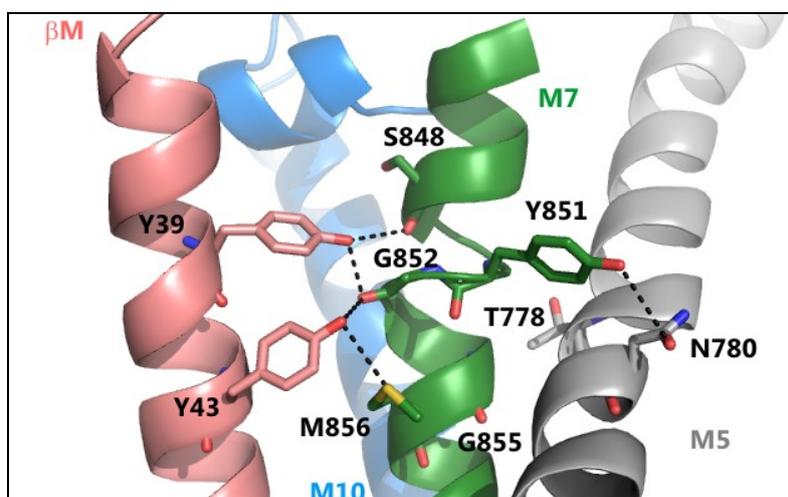
Die Aminosäuren Gly900 und Glu902 befinden sich direkt im SYGQ-Motiv und sollten aufgrund des hohen Konservierungsgrads am wichtigsten für die Interaktion mit der  $\beta$ -Ektodomäne sein. Die beiden Konstrukte G900R und E902K zeigten aber weder in ihrer Pumpstromaktivität noch in den apparenten Affinitäten für  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  Abweichungen vom WT-Protein. Es ist also zu vermuten, dass entweder diese Aminosäurereste nicht die Reste sind, die direkt mit der Ektodomäne der  $\beta$ -Untereinheit interagieren, bzw. die untersuchten Mutationen dieser Reste nicht ausreichend sind, um die Interaktion zu stören, oder dass die positiv geladenen Seitenketten von Arginin und Lysin nicht störend in diese Wechselwirkungen eingreifen, zumindest unter den hier getesteten Bedingungen.

#### 4.2.2 Intrazelluläre $\alpha/\beta$ -Interaktionen

Wichtige Interaktionen finden zwischen den Tyrosinen 39 und 43 der  $\beta\text{M}$  und den Aminosäurepositionen 848-856 in M7 der  $\alpha$ -Untereinheit statt (Abb. 4.2-1). Insbesondere Gly852 (M7) liegt in Interaktionsnähe für beide Tyrosine ( $\beta\text{M}$ ). An dieser Stelle ist die  $\alpha$ -Helix von M7 entwunden, was zu einem leichten Knick der Helix führt. Diese normalerweise ungünstige Entwindung wird stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen von Tyr43 ( $\beta\text{M}$ ) zu Gly852 der  $\alpha$ -Untereinheit und durch ein Cholesterolemolekül. Das ist von Bedeutung, da bereits eine Abhängigkeit der Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase von Cholesterolemolekülen beobachtet wurde (Sotomayor et al., 2000; Cornelius et al., 2003). Daraus lässt sich schließen, dass dieses Cholesterolemolekül, die Position von Gly852 festigt, das ohne Stabilisierung in der flexiblen Doppellipidschicht liegen würde (Shinoda et al., 2009). Der aus der Entwindung entstandene Knick von M7 am zytoplasmatischen Ende scheint wichtig zu sein für die  $\text{K}^+$ -Bindung, denn dadurch kann Tyr851 in M7 mit Asn780 in M5 wechselwirken, welches direkt

an der Koordinierung der beiden  $K^+$ -Ionen beteiligt ist (Abb. 1.1-4 und Abb. 4.2-1). Interessanterweise ist auch M5 am Rest Asn780 entwunden, sodass die Helix in M5 einen leichten Knick hat. Diese Entwindungen von M7 und M5 gibt es in der vergleichbaren SERCA-Struktur nicht und die entsprechenden Reste von M5 und M7 sind daher anders positioniert, sodass SERCA kein  $K^+$  binden kann. Da SERCA keine  $\beta$ -Untereinheit hat, kann also angenommen werden, dass die  $\beta$ -UE eine wichtige modulierende oder strukturstabilisierende Rolle, insbesondere durch die Positionierung von M5 und M7, in der  $K^+$ -Bindung einnimmt (Shinoda et al., 2009).

Diese Vermutungen konnten durch Mutationsstudien bestätigt werden (Hasler et al., 2001; Dürr et al., 2009). Dürr und Kollegen ersetzten die beiden Tyrosine der  $\beta$ -Untereinheit gegen Tryptophane, Phenylalanine oder Serine im  $\alpha_1/\beta_1$ -Isozym des Schafs. Dabei zeigte die Doppelmutante  $\beta$ -(Y39W,Y43W) eine erhöhte apparente  $Na^+$ -Affinität und eine erniedrigte apparente  $K^+$ -Affinität in  $Na^+$ -haltigen Puffern. Bei dieser Mutante war das Reaktionsgleichgewicht in  $E_1$ -Richtung verschoben. Dieser Effekt war noch ausgeprägter für die homologen Doppelmutante der gastrischen  $H^+/K^+$ -ATPase ( $\beta$ -(Y44W,Y48W)), bei der sogar die maximale Turnover-Rate für den Vorwärtsreaktionszyklus kleiner war. Durch Untersuchung der Doppelmutanten  $\beta$ -(Y39S,Y43S) und  $\beta$ -(Y39F,Y43F) konnte außerdem gezeigt werden, dass nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen in der Wechselwirkung mit M7 eine Rolle spielen, sondern dass es vielmehr die aromatischen Ringe der Tyrosine sind, die die  $E_2$ -Konformation stabilisieren. Dürr und Kollegen untersuchten auch Konstrukte, in denen die Reste Tyr851, Gly852 und Gln853 in der M7 mutiert waren (Dürr et al., 2009). Anhand ihrer Ergebnisse wurde vorgeschlagen, dass es nicht Gln853, sondern in der Tat Gly852 ist, das direkt mit Tyr39 und Tyr43 interagiert. Die Einführung eines Tryptophans am Rest Y851, das mit N780 in der M5 interagieren kann (Abb. 4.2-1), bewirkte eine geringere  $K^+$ -Affinität und auch einen geringeren  $z_q$ -Wert in der  $Q(V)$ -Verteilung der transienten Ströme, was auf einen Einfluss auf den *access channel* für  $Na^+$  hindeuten könnte. Zumindest ist die Reaktion weniger stark elektrogen. Diese Studie zeigte also, dass die  $\beta$ -Untereinheit zur Stabilisierung des  $E_2$ -Konformationszustands und somit auch für den  $K^+$ -Transport wichtig ist.



**Abb. 4.2-1: Mögliche Wechselwirkungen zwischen der  $\beta$ -Transmembrandomäne und der  $\alpha$ -Untereinheit.**

In der  $\beta$ M (rosa) können Tyr39 und Tyr43 über Wasserstoffbrückenbindung mit M7 (grün) der  $\alpha$ -Untereinheit interagieren. Am Rest Gly852 ist die M7-Helix entwunden. Tyr851 kann mit Asn780 von M5 interagieren, welches an den  $K^+$ -Bindungsstellen I und II beteiligt ist.

Gly855 befindet sich drei Aminosäurepositionen entfernt von Gly852, ist aber aufgrund der  $\alpha$ -helikalen Struktur eher zu M5 als zur  $\beta$ M ausgerichtet (Abb. 4.2-1). An diesem Rest wurden bereits die Mutationen G855R (FHM2) und G855V (SHM) bei Patienten mit hemiplegischer Migräne identifiziert, sodass vermutet werden kann, dass auch diese Position nicht unbedeutend für die Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist (de Vries et al., 2009; Riant et al., 2010). Valin ist wie Glycin unpolar. Arginin hat aber ein längere positiv geladene Seitenkette, sodass die Mutation G855R wahrscheinlich einen stärkeren Effekt auf die Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase hat. Die Untersuchungen in dieser Arbeit haben in der Tat gezeigt, dass das Konstrukt G855R gar nicht erst in die Plasmamembran der Oozyten gelangt (Abschnitt 3.2.3). Jedoch konnte das G855R-Protein in der Totalmembranfraktion nachgewiesen werden. Nun ist bekannt, dass die  $\beta$ -Untereinheit wichtig ist für die korrekte Faltung, das Targeting und den Einbau des Enzyms in die Membran (Hasler et al., 1998; Geering, 2001). Allerdings werden neu synthetisierte  $\alpha$ -Untereinheiten bereits im ER abgebaut, falls es zu massiven Störungen von Interaktionen mit der  $\beta$ -UE kommt (Abschnitt 4.2.1). Denkbar wäre aber, dass die Seitenkette des Arginins an Position 855 die strukturellen Gegebenheiten derart stört, dass die Transmembrandomänen (insbesondere M7 oder M5) anders positioniert sein könnten. Ob der gestörte Transport zur Plasmamembran allerdings tatsächlich auf veränderten Wechselwirkungen der  $\alpha$ -UE mit der  $\beta$ M oder auf Fehlfaltungen beruht, kann anhand der hier durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch Gly855 eine sensible Position für die Funktion des Proteins ist.

In diesem Zusammenhang kann auch der Effekt der Y1009X- und L994del-Mutanten erwähnt werden. In Abb. 4.2-1 (in Blau) ist zu sehen, dass der flexible C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit in den Bereich zwischen  $\beta$ M und M7 ragt und mit M5 interagieren kann. Tyr998 in M10 interagiert vermutlich direkt mit der  $\beta$ M (Shinoda et al., 2009). Der zytosolische N-terminale Bereich der  $\beta$ -Untereinheit konnte bisher nicht aufgelöst werden, daher ist über mögliche Wechselwirkungen nichts Konkretes bekannt. Y1009X, bei der die letzten 11 Aminosäurereste fehlen und L994del, die um eine Aminosäure verkürzt ist (und somit die letzten 15 Aminosäurereste um eine Position N-terminal verschoben sind), gelangten ebenfalls nicht in die Plasmamembran, obwohl sie in der Totalmembranfraktion nachweisbar waren. Daher ist denkbar, dass auch hier durch Veränderungen im C-terminalen Bereich der  $\alpha$ -UE die Positionen von M7 und M5 massiv modifiziert sein könnten. Inwieweit dadurch Wechselwirkungen mit der  $\beta$ -Untereinheit beeinflusst werden, darüber kann keine konkrete Aussage getroffen werden. Dazu müssten weitere biochemische Verfahren angewandt werden wie z. B. die native Gelelektrophorese, um die PM- und TM-Fraktion zu untersuchen. Auch könnte der Glykolysierungsgrad der  $\beta$ -UE, welche zusammen mit den Mutanten exprimiert wurde, im Western-Blot-Verfahren analysiert werden, wie bei Beguin und Kollegen beschrieben (Beguin et al., 2000).

### 4.3 Physiologischer Einfluss der HM-Mutationen

In Abschnitt 1.3 wurde bereits ausgeführt, dass eine Funktionsstörung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Einfluss auf die Erregungsleitung hat. Menschen, die Mutationen im ATP1A2-Gen haben, leiden u. a. an einer seltenen erblichen Form von Migräne (Hemiplegische Migräne, HM). Nun bleibt die Frage, welchen Einfluss die hier untersuchten HM-Mutationen überhaupt auf die physiologischen Vorgänge bei der neuronalen Signalweiterleitung haben können, da die  $\alpha_2$ -Untereinheit vor allem in Astrozyten vorkommt und nicht in Neuronen. In Abschnitt 1.3.3 wurde bereits die CSD als pathophysiologischer Mechanismus der Migräne-Aura erläutert. Förderlich für die Entstehung einer CSD ist die Hyperexzitabilität, welche auf einer erhöhten  $\text{K}^+$ - und Neurotransmitter-Konzentration im synaptischen Spalt beruht. Der Abtransport von  $\text{K}^+$  und Glutamat aus dem synaptischen Spalt ist eine der Hauptfunktionen von Astrozyten (für einen Überblick: Magistretti & Ransom, 2002).  $\text{K}^+$  kann also von der glialen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aus dem synaptischen Spalt transportiert werden. Indirekt hat die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aber auch einen Einfluss auf den Glutamattransport, indem sie den  $\text{Na}^+$ -Gradienten reguliert: der  $\text{Na}^+$ -Gradient ist einerseits für die Funktion des Glutamattransporters EAAT in Astrozyten und andererseits für die des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle reguliert, wichtig. Daher können sich funktionelle Störungen der  $\alpha_2$ -UE der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, in der HM-Mutationen identifiziert wurden, besonders auf den Glutamathaushalt auswirken. In dieser Arbeit wurden die HM-Mutationen G855R, G900R, K902E, welche im Verdacht standen, die Bindung zur  $\beta$ -UE zu stören, sowie L994del, D999H, R1002Q, K1003E, R1007W und Y1009X, die C-terminal gelegen sind, untersucht.

G900R, K902E und K1003E zeigten keine funktionellen Abweichungen im Vergleich zum WT-Protein (Abschnitt 3.2), zumindest unter den hier getesteten Bedingungen. Es ist möglich, dass sie trotz allem in menschlichen Zellen unter anderen Temperaturbedingungen andere Störungen aufweisen. Diese konnten hier nicht identifiziert werden. Des Weiteren gelangten die Konstrukte G855R, L994del und Y1009X nicht oder nur sehr gering konzentriert in die Plasmamembran. Dies ist ein Indiz für unvollständige Faltung dieser Konstrukte, sodass sie nicht korrekt in die Plasmamembran integriert werden können. Bei Patienten mit solchen Mutationen ist das Pumpenzym schwer geschädigt und kann nicht zur Aufrechterhaltung eines Gradienten oder zum Abtransport von  $\text{K}^+$  beitragen, sodass eine Hyperexzitabilität wahrscheinlicher ist. Allerdings ist nicht bekannt, wie schwerwiegend die Faltungsstörung in der menschlichen Zelle unter physiologischen Bedingungen ist. Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang ist, dass die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase anscheinend einen großen Einfluss auf die Glykolyse-Aktivität einer Zelle hat, da die Lactat-Freisetzung durch Ouabain gehemmt wird (Racker et al., 1983; Yarowsky et al., 1986; James et al., 1996). Pellerin und Magistretti schlugen ein Modell vor wie die Glutamataufnahme, die Glykolyse und die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Astrozyten zusammenhängen könnten (Pellerin & Magistretti, 1994; Magistretti & Ransom, 2002). EAAT transportiert ein Glutamat und drei  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Astrozyte. Während der Glykolyse werden zwei ATP-Moleküle pro Glukose-Molekül synthetisiert. Ein ATP-Molekül wird von der Glutaminsynthese verbraucht, um Glutamat in Glutamin umzuwandeln, und das zweite Molekül wird während des Pumpzyklus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase hydrolysiert, um drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle zu transportieren. Das dabei frei werdende Phosphat wird wiederum für die Glykolyse

(wahrscheinlich durch die Phosphoglycerat-Kinase) und zur Synthese von Lactat benötigt. Die Astrozyte setzt das Lactat frei, welches von den Neuronen zur Unterstützung ihres Energiehaushalts verwendet wird. Es ist also vorstellbar, dass ein Funktionsverlust der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (z. B. wenn das Enzym gar nicht in die Plasmamembran gelangt wie G855R, L994del und Y1009X) nicht nur die neuronale Aktivität, sondern auch den Metabolismus, der beispielsweise auch während einer CSD gestört ist, beeinflussen kann. Dieses Modell ist allerdings nicht zweifelsfrei bewiesen. Es macht aber deutlich, wie komplex die Zusammenhänge in einer Zelle bzw. zwischen Gliazellen und Neuronen sein können.

Das Konstrukt R1007W wies unter physiologischen Potentialbedingungen eine verringerte Affinität für extrazelluläres  $\text{K}^+$  auf. Das Interessante an dieser Mutation ist, dass die Patienten nicht nur an Migräne, sondern fast alle auch an Epilepsie litten, sodass eine ähnliche Pathogenese dieser beider neurologischen Störungen vermutet werden kann. Allerdings reichen die Ergebnisse nicht aus, um ATP1A2 als eines der Gene zu identifizieren, das für Epilepsie ursächlich ist. Eine verringerte  $\text{K}^+$ -Affinität kann zur Folge haben, dass  $\text{K}^+$  nicht so effektiv aus dem synaptischen Spalt abtransportiert werden kann, was wie beschrieben die Schwelle für die CSD senkt. Einen gleichen Effekt, aber durch eine andere Funktionsstörung bedingt, könnten die Mutationen D999H und R1002Q haben. Die Pumpaktivität von D999H war im Vergleich zum WT-Enzym zu positiven Potentialen verschoben. Auch verlief die ouabainsensitive Stromkurve bei 10 mM  $\text{K}^+$  insgesamt flacher als beim WT-Enzym (Abb. 3.3-2). Es ist zu vermuten, dass dieses Konstrukt  $\text{K}^+$  nur bei Depolarisation effektiv transportiert. Da die  $\alpha_2$ -Isoform vorherrschend in den Astrozyten ist, welche ein Ruhepotential im negativen Potentialbereich (bei ca. -85 bis -90 mV) haben, weist dieses Konstrukt einen schwerwiegenden Funktionsverlust auf. R1002Q hingegen zeigte die gleichen Funktionsstörungen wie  $\Delta\text{YY}$ . Für dieses Konstrukt wurde eine stark verminderte  $\text{Na}^+$ -Affinität berichtet, was auch in dieser Arbeit bestätigt wurde. Arg1002 interagiert direkt mit den C-terminalen Tyrosinen und da die R1002Q-Mutante eine ähnlich verringerte apparente Affinität für extrazelluläres  $\text{Na}^+$  aufweist, ist es wahrscheinlich, dass R1002Q auch eine verringerte  $\text{Na}^+_{\text{int}}$ -Affinität hat.

Die  $\alpha_2$ -Isoform, die hauptsächlich in den nicht erregbaren Astrozyten exprimiert wird, hat eine leicht erhöhte Affinität für intrazelluläres  $\text{Na}^+$  im Vergleich zur  $\alpha_3$ -Isoform, welche hauptsächlich in Neuronen vorkommt. Das ist von Vorteil, da die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Astrozyten vermutlich hauptsächlich vom Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration abhängt, bzw.  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$  der bestimmende Faktor für die Empfindlichkeit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gegenüber einem Anstieg der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration ist (Rose & Ransom, 1997). Ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration geschieht bei der Glutamataufnahme durch den Glutamattransporter EAAT, sodass eine erhöhte Glutamataufnahme die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase stimuliert (Abschnitt 1.3.3). Der Abtransport von  $\text{K}^+$  aus dem synaptischen Spalt hängt mutmaßlich vor allem von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, vom  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symporter, und vom Donnan-Effekt<sup>11</sup> ab (Walz & Hinks, 1985; Ballanyi et al., 1987; Rose & Ransom, 1996; Ransom et al., 2000) ab. Es wird aber vermutet, dass

<sup>11</sup> Bei erhöhten extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentrationen wird KCl in die Astrozyte getrieben, sodass sich die Ionenprodukte der Konzentrationen von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  ausgleichen. Da die intrazellulären geladenen Proteine die Membran nicht passieren können, baut sich das Donnan-Potential auf.

die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dabei die wichtigste Rolle spielt (Rose & Ransom, 1996). Umso gravierender ist die Konsequenz einer reduzierten  $\text{Na}^+$ <sub>int</sub>-Affinität, die den Vorwärtspumpzyklus behindert.

R1002Q und auch D999H zeigten Leckströme bei negativen Potentialen und hohen extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen. Ob diese Leckströme auch unter physiologischen Bedingungen auftreten, kann nur spekuliert werden. Extrazellulär ist  $\text{K}^+$  vorhanden, wenn auch nur in geringen Konzentrationen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass selbst geringe  $[\text{K}^+]$  von 0,2 mM diese Leckströme inhibieren. Extrazellulär beträgt die  $\text{K}^+$ -Konzentration zwischen 3-5 mM, sodass sich diese Funktionsstörungen unter physiologischen Bedingungen wohl nicht zeigen. Dennoch ist der Kationentransport destabilisiert.

Nun hängt der  $\text{K}^+$ -Transport oder auch der Glutamattransport aus dem synaptischen Spalt nicht allein von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ab (s. oben), sodass die physiologischen Auswirkungen einer Mutation der  $\alpha_2$ -Isoform unterschiedlich stark sein können. Auch wurde berichtet, dass die Penetranz von ATP1A2-Mutationen gering sein kann, d. h., dass es eine große Variabilität in der phänotypischen Ausprägung gibt, und zwar in Abhängigkeit von genetischen und Umweltbedingungen (Ducros et al., 1997; Haan et al., 2008; Shyti et al., 2011). Daher kann eine Mutation im ATP1A2-Gen dramatische Auswirkungen haben, da die mechanistischen Vorgänge im synaptischen Spalt komplex und sehr genau aufeinander abgestimmt sind; dies ist aber nicht zwingend.

## 5 Zusammenfassung

Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist ein Transmembranprotein, das die Gradienten für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen über der Zellmembran aufrecht erhält, indem sie drei  $\text{Na}^+$ -Ionen ins extrazelluläre und zwei  $\text{K}^+$ -Ionen ins intrazelluläre Medium unter Verbrauch eines ATP-Moleküls transportiert. Diese Gradienten sind von elementarer Bedeutung für die Funktion und den Stoffwechsel von Zellen. Wenn die Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Mutationen in der katalytischen ( $\alpha$ -)Untereinheit verändert ist, kann dies teilweise zu schweren Erkrankungen führen. Ein neurologisches Krankheitsbild, das auf Gendefekte der vorwiegend in Gliazellen exprimierten  $\alpha_2$ -Isoform der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zurückzuführen ist, ist die familiäre hemiplegische Migräne Typ 2 (FHM2). Anhand der Röntgenkristallstruktur wurde deutlich, dass einige der bisher identifizierten FHM-Mutationen in Bereichen liegen, deren funktionelle Relevanz noch nicht eindeutig aufgeklärt wurde.

In diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit diverse FHM-Mutationen untersucht, die sich an möglichen Interaktionsstellen zwischen der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit und der regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit befinden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag aber auf Mutationen im C-terminalen Bereich der  $\alpha$ -Untereinheit. Dabei lag das Augenmerk nicht nur auf FHM-Mutationen, sondern auch auf Mutationen von Aminosäureresten, die mutmaßlich eine wichtige Rolle beim Ionentransport spielen. Die beiden C-terminalen Reste Tyr1019 und Tyr1020 befinden sich am Ende einer Kavität, die sich von der intrazellulären Seite bis zu Asp930 erstreckt, das sich in der Nähe der dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle befindet. Nach neueren Erkenntnissen könnte diese Kavität einen intrazellulären Zugang für  $\text{Na}^+$ -Ionen oder auch  $\text{H}^+$ -Ionen bilden, die eine Rolle im Pumpzyklus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase spielen.

Durch ihren elektrogenen Transportzyklus kann die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase elektrophysiologisch untersucht werden. In dieser Arbeit wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC) an Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* angewendet, um strukturelle und mechanistische Details im Reaktionszyklus der humanen  $\alpha_2$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufzuklären. Dabei war vor allem die Frage von Interesse, wie der C-Terminus den intrazellulären Zugang zur dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle für Protonen reguliert. Des Weiteren sollten tiefere Kenntnisse über die Interaktionen zwischen der  $\beta$ - und der  $\alpha$ -Untereinheit erlangt und funktionelle Mechanismen, die zur Ausbildung einer hemiplegischen Migräne (HM) führen, besser charakterisiert werden.

Für die HM-Mutanten, die elektrophysiologisch nicht charakterisiert werden konnten, ist in dieser Arbeit durch proteinbiochemische Methoden nachgewiesen worden, dass sie nicht in die Plasmamembran gelangen und somit funktionell gestört sind (Y1009X, L994del und G855R). Weitere untersuchte HM-Mutationen (G900R, E902K und K1003E) zeigten unter den hier durchgeführten experimentellen Bedingungen keine Abweichungen zum Verhalten des Wildtyp-Enzyms. Die Mutante R1007W, die kürzlich sowohl mit dem Auftreten von FHM2 als auch von Epilepsie in Verbindung gebracht werden konnte, wies eine niedrigere apparente  $\text{K}^+$ -Affinität auf, was für die Ausbildung einer hemiplegischen Migräne physiologisch relevant sein könnte. Allerdings lieferten die hier gewonnenen Daten zu Mutationen an mutmaßlichen Interaktionsstellen mit der  $\beta$ -Untereinheit keine Hinweise darauf, ob und wie Störungen dieser Interaktion durch die genannten Mutationen hervorgerufen werden.

In Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  zeigt die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ouabainsensitive, einwärtsgerichtete Leckströme, die bei negativen Potentialen stark vom extrazellulären pH-Wert abhängig sind. Der Mechanismus, der diesen von Protonen getragenen Strömen zugrunde liegt, ist bisher nicht verstanden. Die in dieser Arbeit untersuchten C-terminalen Mutationskonstrukte  $\Delta\text{YY}$ , R937L, R937S, D999H und R1002Q zeigten pH-abhängig große ouabainsensitive Leckströme, und zwar auch in  $\text{Na}^+$ -haltigen Lösungen, die aber durch  $\text{K}^+$  inhibiert wurden. Diese Aminosäurepositionen stehen im Verdacht, an einem durch den C-Terminus kontrollierten Zugangskanal für Protonen zur dritten  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle beteiligt zu sein. Daher wurden die Leckströme unter verschiedenen ionischen Bedingungen untersucht. R937S und R937L vermittelten diese Ströme in beide Richtungen mit Umkehrpotentialen, die abhängig waren vom pH-Wert. Die Auswertung dieser Leckströme deutete auf einen passiven, protonenselektiven Transportmechanismus hin, der jedoch einen Konformationswechsel der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erfordert.

Unter kaliumfreien Bedingungen vermittelt die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase einen elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austausch. Die Untersuchung der daraus resultierenden transienten Ströme enthält Informationen zum Mechanismus dieses  $\text{Na}^+$ -Transports. Bei den Konstrukten  $\Delta\text{YY}$ , R937S, D999H und R1002Q war die Spannungsabhängigkeit der Kinetik der  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ -Austauschreaktion erheblich verändert. Diese Ergebnisse ließen die Schlüsse zu, dass der  $\text{Na}^+$ -okkludierter Zustand und der Zugang von  $\text{Na}^+$  zu diesem Zustand bei den C-terminal mutierten Konstrukten destabilisiert sein könnte. Des Weiteren untermauern die hier gewonnenen Daten die These, dass die dritte  $\text{Na}^+$ -Bindungsstelle intrazellulär für Protonen zugänglich ist und dass dieser Zugang durch den C-Terminus kontrolliert wird. Auch zeigte sich, dass Arg937 durch die Wechselwirkung mit den C-terminalen Tyrosinen und Arg1002 die Zugänglichkeit für Protonen von beiden Seiten der Membran kontrolliert. Wie sich dieser intrazelluläre Zugang mechanistisch gestalten könnte, wurde anhand von Daten aus anderen Mutationsstudien und molekulardynamischen Simulationsstudien diskutiert.





---

## Literaturverzeichnis

- ALBERS RW. 1967. Biochemical aspects of active transport. — *Annu Rev Biochem* 36, 727-56.
- AMINKENG F. 2012. Mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood. — *Clin Genet* 83, 32-3.
- ANDERSEN JP & VILSEN B. 1994. Amino acids Asn796 and Thr799 of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum bind Ca<sup>2+</sup> at different sites. — *J Biol Chem* 269, 15931-6.
- ANDERSON CM & SWANSON RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. — *Glia* 32, 1-14.
- ANDERSSON RM, CHENG SX & APERIA A. 1998. Forskolin-induced down-regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is not associated with internalization of the enzyme. — *Acta Physiol Scand* 164, 39-46.
- ANSELM IA, SWEADNER KJ, GOLLAMUDI S, OZELIUS LJ & DARRAS BT. 2009. Rapid-onset dystonia-parkinsonism in a child with a novel ATP1A3 gene mutation. — *Neurology* 73, 400-1.
- APELL HJ & KARLISH SJ. 2001. Functional properties of Na,K-ATPase, and their structural implications, as detected with biophysical techniques. — *J Membr Biol* 180, 1-9.
- ARTIGAS P & GADSBY DC. 2002. Ion channel-like properties of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Pump. — *Ann N Y Acad Sci* 976, 31-40.
- AXELSEN KB & PALMGREN MG. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. — *J Mol Evol* 46, 84-101.
- BAHINSKI A, NAKAO M & GADSBY DC. 1988. Potassium translocation by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump is voltage insensitive. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3412-6.
- BAKER PF, BLAUSTEIN MP, HODGKIN AL & STEINHARDT RA. 1969. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. — *J Physiol* 200, 431-58.
- BALLANYI K, GRAFE P & TEN BRUGGENCATE G. 1987. Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. — *J Physiol* 382, 159-74.
- BASSI MT, BRESOLIN N, TONELLI A, NAZOS K, CRIPPA F, BASCHIROTTI C, ZUCCA C, BERSANO A, DOLCETTA D, BONESCHI FM, et al. 2004. A novel mutation in the ATP1A2 gene causes alternating hemiplegia of childhood. — *J Med Genet* 41, 621-8.
- BEGUIN P, HASLER U, STAUB O & GEERING K. 2000. Endoplasmic reticulum quality control of oligomeric membrane proteins: topogenic determinants involved in the degradation of the unassembled Na,K-ATPase a subunit and in its stabilization by b subunit assembly. — *Mol Biol Cell* 11, 1657-72.
- BEGUIN P, WANG X, FIRSOV D, PUOTI A, CLAEYS D, HORISBERGER JD & GEERING K. 1997. The  $\gamma$  subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. — *Embo J* 16, 4250-60.
- BERTORELLO AM, APERIA A, WALAAS SI, NAIRN AC & GREENGARD P. 1991. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibits the activity of the enzyme. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11359-62.
- BETZ WJ & ANGLESON JK. 1998. The synaptic vesicle cycle. — *Annu Rev Physiol* 60, 347-63.
- BEZANILLA F. 2005. Voltage-gated ion channels. — *IEEE Trans Nanobioscience* 4, 34-48.
- BEZANILLA F. 2008. How membrane proteins sense voltage. — *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 323-32.
- BIELIEN FV, GLITSCH HG & VERDONCK F. 1991. Dependence of Na<sup>+</sup> pump current on external monovalent cations and membrane potential in rabbit cardiac Purkinje cells. — *J Physiol* 442, 169-89.
- BLANCO-ARIAS P, EINHOLM AP, MAMSA H, CONCEIRO C, GUTIERREZ-DE-TERAN H, ROMERO J, TOUSTRUP-JENSEN MS, CARRACEDO A, JEN JC, VILSEN B, et al. 2009. A C-terminal mutation of *ATP1A3* underscores the crucial role of sodium affinity in the pathophysiology of rapid-onset dystonia-parkinsonism. — *Hum Mol Genet* 18, 2370-7.

- BLANCO G & MERCER RW. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. — *Am J Physiol* 275, F633-50.
- BLAUSTEIN MP, ARNON A & HAMLIN JM. 2000. How ouabain works: control of subplasmalemmal Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, and their influence on Ca<sup>2+</sup> signaling. — In: *Na/K-ATPase and related ATPases* (Taniguchi K & Kaya S, eds). Elsevier Science Ltd, Amsterdam, p. 633-638.
- BORON WF. 1983. Transport of H<sup>+</sup> and of ionic weak acids and bases. — *J Membr Biol* 72, 1-16.
- BRASHEAR A, MINK JW, HILL DF, BOGGS N, MCCALL WV, STACY MA, SNIVELY B, LIGHT LS, SWEADNER KJ, OZELIUS LJ, et al. 2012. ATP1A3 mutations in infants: a new rapid-onset dystonia-Parkinsonism phenotype characterized by motor delay and ataxia. — *Dev Med Child Neurol* 54, 1065-1067.
- BREITWIESER GE, ALTAMIRANO AA & RUSSELL JM. 1987. Effects of pH changes on sodium pump fluxes in squid giant axon. — *Am J Physiol* 253, C547-54.
- BUBLITZ M, POULSEN H, MORTH JP & NISSEN P. 2010. In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. — *Curr Opin Struct Biol* 20, 431-9.
- BUHLER R & APELL HJ. 1995. Sequential potassium binding at the extracellular side of the Na,K-pump. — *J Membr Biol* 145, 165-73.
- BURLEY SK & PETSCH GA. 1986. Amino-aromatic interactions in proteins. — *FEBS Lett* 203, 139-43.
- CASTILLO JP, DE GIORGIS D, BASILIO D, GADSBY DC, ROSENTHAL JJ, LATORRE R, HOLMGREN M & BEZANILLA F. 2011. Energy landscape of the reactions governing the Na<sup>+</sup> deeply occluded state of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the giant axon of the Humboldt squid. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20556-61.
- CATTERALL WA. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. — *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 521-55.
- CEVOLI S, PIERANGELI G, MONARI L, VALENTINO ML, BERNARDONI P, MOCHI M, CORTELLI P & MONTAGNA P. 2002. Familial hemiplegic migraine: clinical features and probable linkage to chromosome 1 in an Italian family. — *Neurol Sci* 23, 7-10.
- CHENG XJ, FISONE G, AIZMAN O, AIZMAN R, LEVENSON R, GREENGARD P & APERIA A. 1997. PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in response to beta-adrenergic hormone. — *Am J Physiol* 273, C893-901.
- CHERNYSHEV A & CUKIERMAN S. 2002. Thermodynamic view of activation energies of proton transfer in various gramicidin A channels. — *Biophys J* 82, 182-92.
- CHOI DW. 1992. Excitotoxic cell death. — *J Neurobiol* 23, 1261-76.
- CHRAÏBI A & HORISBERGER JD. 2002. Na self inhibition of human epithelial Na channel: temperature dependence and effect of extracellular proteases. — *J Gen Physiol* 120, 133-45.
- CLAES L, DEL-FAVERO J, CEULEMANS B, LAGAE L, VAN BROECKHOVEN C & DE JONGHE P. 2001. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. — *Am J Hum Genet* 68, 1327-32.
- CLARKE DM, LOO TW, INESI G & MACLENNAN DH. 1989. Location of high affinity Ca<sup>2+</sup>-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. — *Nature* 339, 476-8.
- COLMAN A. 1984. Translation of eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* Oocytes. — In: *Transcription and Translation* (Hames B & Higgins S, eds). IRL Press, Oxford Washington, p. 271-302.
- COLONNA TE, HUYNH L & FAMBROUGH DM. 1997. Subunit interactions in the Na,K-ATPase explored with the yeast two-hybrid system. — *J Biol Chem* 272, 12366-72.
- CORNELIUS F, TURNER N & CHRISTENSEN HR. 2003. Modulation of Na,K-ATPase by phospholipids and cholesterol. II. Steady-state and presteady-state kinetics. — *Biochemistry* 42, 8541-9.

- CRAMBERT G, HASLER U, BEGGAH AT, YU C, MODYANOV NN, HORISBERGER JD, LELIEVRE L & GEERING K. 2000. Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. — *J Biol Chem* 275, 1976-86.
- CUCU D, SIMAELS J, EGGERMONT J, VAN DRIESSCHE W & ZEISKE W. 2005. Opposite effects of Ni<sup>2+</sup> on *Xenopus* and rat ENaCs expressed in *Xenopus* oocytes. — *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C946-58.
- DANBOLT NC. 2001. Glutamate uptake. — *Prog Neurobiol* 65, 1-105.
- DE FUSCO M, MARCONI R & SILVESTRI L, L. ATORINO, L. RAMPOLDI, L. MORGANTE, A. BALLABIO, P. ARIDON, G. CASARI. 2003. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. — *Nat Genet* 33, 192-6.
- DE VRIES B, CALLENBACH PM, KAMPHORST JT, WELLER CM, KOELEWIJN SC, HOUTEN RT, DE COO IF, BROUWER OF & VAN DEN MAAGDENBERG AM. 2012. PRRT2 mutation causes benign familial infantile convulsions. — *Neurology* 79, 2154-5.
- DE VRIES B, FREILINGER T, VANMOLKOT KR, KOENDERINK JB, STAM AH, TERWINDT GM, BABINI E, VAN DEN BOOGERD EH, VAN DEN HEUVEL JJ, FRANTS RR, et al. 2007. Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine. — *Neurology* 69(23), 2170-6.
- DE VRIES B, STAM AH, BEKER F, VAN DEN MAAGDENBERG AM, VANMOLKOT KR, LAAN L, GINJAAR IB, FRANTS RR, LAUFFER H, HAAN J, et al. 2008. CACNA1A mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood. — *Cephalalgia* 28, 887-91.
- DE VRIES B, STAM AH, KIRKPATRICK M, VANMOLKOT KR, KOENDERINK JB, VAN DEN HEUVEL JJ, STUNNENBERG B, GOUDIE D, SHETTY J, JAIN V, et al. 2009. Familial hemiplegic migraine is associated with febrile seizures in an FHM2 family with a novel de novo ATP1A2 mutation. — *Epilepsia* 50, 2503-4.
- DE WEER P, RAKOWSKI RF & GADSBY DC. 1992. Kinetic evidence that the Na/K pump delivers Na<sup>+</sup> to the cell exterior through a high-field channel. — *Biophysical Journal* 61, A135.
- DECOURSEY TE. 2003. Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. — *Physiol Rev* 83, 475-579.
- DEITMER JW & SCHNEIDER HP. 2000. Enhancement of glutamate uptake transport by CO<sub>2</sub>/bicarbonate in the leech giant glial cell. — *Glia* 30, 392-400.
- DEPREZ L, PEETERS K, VAN PAESSCHEN W, CLAEYS KG, CLAES LR, SULS A, AUDENAERT D, VAN DYCK T, GOOSSENS D, DEL-FAVERO J, et al. 2007. Familial occipitotemporal lobe epilepsy and migraine with visual aura: linkage to chromosome 9q. — *Neurology* 68, 1995-2002.
- DICHGANS M, FREILINGER T, ECKSTEIN G, BABINI E, LORENZ-DEPIEREUX B, BISKUP S, FERRARI MD, HERZOG J, VAN DEN MAAGDENBERG AM, PUSCH M, et al. 2005. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. — *Lancet* 366, 371-7.
- DINGLEDINE R, BORGES K, BOWIE D & TRAYNELIS SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. — *Pharmacol Rev* 51, 7-61.
- DOMASZEWICZ W & APELL H. 1999. Binding of the third Na<sup>+</sup> ion to the cytoplasmic side of the Na,K-ATPase is electrogenic. — *FEBS Lett* 458, 241-6.
- DUCROS A, DENIER C, JOUTEL A, CECILLON M, LESCOAT C, VAHEDI K, DARCEL F, VICAUT E, BOUSSER MG & TOURNIER-LASSERVE E. 2001. The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. — *N Engl J Med* 345, 17-24.
- DUCROS A, JOUTEL A, VAHEDI K, CECILLON M, FERREIRA A, BERNARD E, VERIER A, ECHENNE B, LOPEZ DE MUNAIN A, BOUSSER MG, et al. 1997. Mapping of a second locus for familial hemiplegic migraine to 1q21-q23 and evidence of further heterogeneity. — *Ann Neurol* 42, 885-90.
- DUMONT JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. — *J Morphol* 136, 153-79.

- DÜRR KL, TAVRAZ NN, DEMPSKI RE, BAMBERG E & FRIEDRICH T. 2009. Functional significance of E2 state stabilization by specific  $\alpha/\beta$ -subunit interactions of Na,K- and H,K-ATPase. — *J Biol Chem* 284, 3842-54.
- DÜRR KL, TAVRAZ NN & FRIEDRICH T. 2012. Control of gastric H,K-ATPase activity by cations, voltage and intracellular pH analyzed by voltage clamp fluorometry in *Xenopus* oocytes. — *PLoS One* 7, e33645.
- DÜRR KL, TAVRAZ NN, SPILLER S & FRIEDRICH T. 2013. Measuring Cation Transport By Na,K- And H,K-ATPase In *Xenopus* Oocytes By Atomic Absorption Spectrophotometry: An Alternative To Radioisotope Assays. — *J. Vis. Exp.* DOI 10.3791/50201.
- EFTHYMIADIS A, RETTINGER J & SCHWARZ W. 1993. Inward-directed current generated by the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump in Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-free medium. — *Cell Biol Int* 17, 1107-16.
- EISNER DA & LEDERER WJ. 1980. Characterization of the electrogenic sodium pump in cardiac Purkinje fibres. — *J Physiol* 303, 441-74.
- FENDLER K, GRELL E, HAUBS M & BAMBERG E. 1985. Pump currents generated by the purified Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase from kidney on black lipid membranes. — *Embo J* 4, 3079-85.
- FERNANDEZ DM, HAND CK, SWEENEY BJ & PARFREY NA. 2008. A novel ATP1A2 gene mutation in an Irish familial hemiplegic migraine kindred. — *Headache* 48, 101-8.
- FERREIRA HG & MARSHALL MW. 1985. The biophysical basis of excitability. — Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- FINKEL AS & GAGE PW. 1985. Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. — In: *Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes* (Smith TG, Lecar H, Redman SJ & Gage PW, eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 47-94.
- FREILINGER T, KOCH J & DICHGANS M. 2010. A novel mutation in SLC1A3 associated with pure hemiplegic migraine. — *J. Headache Pain* 11 (suppl.1), 90.
- FRIEDRICH T & NAGEL G. 1997. Transient currents of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in giant patches from guinea pig cardiomyocytes induced by ATP concentration jumps or voltage pulses. — *Ann N Y Acad Sci* 834, 435-8.
- GADSBY DC, RAKOWSKI RF & DE WEER P. 1993. Extracellular access to the Na,K pump: pathway similar to ion channel. — *Science* 260, 100-3.
- GALLANTI A, TONELLI A, CARDIN V, BUSSONE G, BRESOLIN N & BASSI MT. 2008. A novel de novo nonsense mutation in ATP1A2 associated with sporadic hemiplegic migraine and epileptic seizures. — *J Neurol Sci* 273, 123-6.
- GEERING K. 2001. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. — *J Bioenerg Biomembr* 33, 425-38.
- GEIBEL S, KAPLAN JH, BAMBERG E & FRIEDRICH T. 2003a. Conformational dynamics of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase probed by voltage clamp fluorometry. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 964-9.
- GEIBEL S, ZIMMERMANN D, ZIFARELLI G, BECKER A, KOENDERINK JB, HU YK, KAPLAN JH, FRIEDRICH T & BAMBERG E. 2003b. Conformational dynamics of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase probed by voltage clamp fluorometry. — *Ann N Y Acad Sci* 986, 31-8.
- GERVIL M, ULRICH V, KYVIK KO, OLESEN J & RUSSELL MB. 1999. Migraine without aura: a population-based twin study. — *Ann Neurol* 46, 606-11.
- GHOSH B, KAR P, MANDAL A, DEY K, CHAKRABORTI T & CHAKRABORTI S. 2009. Ca<sup>2+</sup> influx mechanisms in caveolae vesicles of pulmonary smooth muscle plasma membrane under inhibition of  $\alpha 2\beta 1$  isozyme of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by ouabain. — *Life Sci* 84, 139-48.
- GILLEN KT, DOUGLASS DC & HORCH MRJ. 1972. Self-Diffusion in Liquid Water to  $-31^{\circ}\text{C}$ . — *J. Chem. Phys.* 57, 5117.
- GLASSTONE S, LAIDLER KJ & EYRING H. 1941. The Theory of Rate Processes. — McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

- GLYNN IM. 1962. An adenosine triphosphatase from electric organ activated by sodium and potassium and inhibited by ouabain or oligomycin. — *Biochem. J.* 84, 74-83.
- GLYNN IM & KARLISH SJ. 1990. Occluded cations in active transport. — *Annu Rev Biochem* 59, 171-205.
- GOLDMAN DE. 1943. Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. — *J Gen Physiol* 27, 37-60.
- GONZALEZ-PEREZ V, STACK K, BORIC K & NARANJO D. 2010. Reduced voltage sensitivity in a K<sup>+</sup>-channel voltage sensor by electric field remodeling. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5178-83.
- GURDON JB, LANE CD, WOODLAND HR & MARBAIX G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. — *Nature* 233, 177-82.
- HAAN J, TERWINDT GM, VAN DEN MAAGDENBERG AM, STAM AH & FERRARI MD. 2008. A review of the genetic relation between migraine and epilepsy. — *Cephalalgia* 28, 105-13.
- HASLER U, CRAMBERT G, HORISBERGER JD & GEERING K. 2001. Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning. — *J Biol Chem* 276, 16356-64.
- HASLER U, WANG X, CRAMBERT G, BEGUIN P, JAISSE F, HORISBERGER JD & GEERING K. 1998. Role of  $\beta$ -subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. — *J Biol Chem* 273, 30826-35.
- HASSEL B, BOLDINGH KA, NARVESEN C, IVERSEN EG & SKREDE KK. 2003. Glutamate transport, glutamine synthetase and phosphate-activated glutaminase in rat CNS white matter. A quantitative study. — *J Neurochem* 87, 230-7.
- HAZELL AS. 2007. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. — *Neurochem Int* 50, 941-53.
- HEINZEN EL, SWOBODA KJ, HITOMI Y, GURRIERI F, NICOLE S, DE VRIES B, TIZIANO FD, FONTAINE B, WALLEY NM, HEAVIN S, et al. 2012. De novo mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood. — *Nat Genet* 44, 1030-4.
- HEMSWORTH PD, WHALLEY DW & RASMUSSEN HH. 1997. Electrogenic Li<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup> exchange mediated by the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in rabbit cardiac myocytes. — *Am J Physiol* 272, C1186-92.
- HERMANS AN, GLITSCH HG & VERDONCK F. 1997. Activation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump current by intra- and extracellular Li ions in single guinea-pig cardiac cells. — *Biochim Biophys Acta* 1330, 83-93.
- HEYSE S, WUDEL I, APELL HJ & STURMER W. 1994. Partial reactions of the Na,K-ATPase: determination of rate constants. — *J Gen Physiol* 104, 197-240.
- HILGEMANN DW. 1994. Channel-like function of the Na,K pump probed at microsecond resolution in giant membrane patches. — *Science* 263, 1429-32.
- HILKEN G, IGLAUER F & RICHTER H-P. 1997. Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. — Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- HODGKIN AL, HUXLEY AF & KATZ B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. — *J. Physiol.* 116, 424-448.
- HOLMGREN M & RAKOWSKI RF. 1993. Equality of on and off charge movement by the Na/K pump in *Xenopus* oocytes. — *Biophys J* 64, A332.
- HOLMGREN M & RAKOWSKI RF. 1994. Pre-steady-state transient currents mediated by the Na/K pump in internally perfused *Xenopus* oocytes. — *Biophys J* 66, 912-22.
- HOLMGREN M & RAKOWSKI RF. 2006. Charge translocation by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump under Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> exchange conditions: intracellular Na<sup>+</sup> dependence. — *Biophys J* 90, 1607-16.

- HOLMGREN M, WAGG J, BEZANILLA F, RAKOWSKI RF, DE WEER P & GADSBY DC. 2000. Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. — *Nature* 403, 898-901.
- HORISBERGER JD & KHAROUBI-HESS S. 2002. Functional differences between  $\alpha$  subunit isoforms of the rat Na,K-ATPase expressed in *Xenopus* oocytes. — *J Physiol* 539, 669-80.
- HORNE RA, COURANT RA, JOHNSON DS & MARGOSIAN FF. 1965. The Activation Energy of Viscous Flow of Pure Water and Sea Water in the Temperature Region of Maximum Density. — *J. Phys. Chem.* 96, 3988-3991.
- HULÍČIAK M, VACEK J, SEBELA M, OROLINOVÁ E, ZNALEZIONA J, HAVLÍKOVÁ M & KUBALA M. 2012. Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by binding to its cytoplasmic part. — *Biochem Pharmacol* 83, 1507-13.
- IHS. 2004. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. — *Cephalalgia* 24 Suppl 1, 9-160.
- IMAGAWA T, YAMAMOTO T, KAYA S, SAKAGUCHI K & TANIGUCHI K. 2005. Thr-774 (transmembrane segment M5), Val-920 (M8), and Glu-954 (M9) are involved in Na<sup>+</sup> transport, and Gln-923 (M8) is essential for Na,K-ATPase activity. — *J Biol Chem* 280, 18736-44.
- JAMES JH, FANG CH, SCHRANTZ SJ, HASSELGREN PO, PAUL RJ & FISCHER JE. 1996. Linkage of aerobic glycolysis to sodium-potassium transport in rat skeletal muscle. Implications for increased muscle lactate production in sepsis. — *J Clin Invest* 98, 2388-97.
- JAN LY & STEVENS CF. 2000. Signalling mechanisms: a decade of signalling. — *Curr Opin Neurobiol* 10, 625-30.
- JARDETZKY O. 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. — *Nature* 211, 969-70.
- JAUNIN P, JAISSE F, BEGGAH AT, TAKEYASU K, MANGEAT P, ROSSIER BC, HORISBERGER JD & GEERING K. 1993. Role of the transmembrane and extracytoplasmic domain of beta subunits in subunit assembly, intracellular transport, and functional expression of Na,K-pumps. — *J Cell Biol* 123, 1751-9.
- JEN JC, KLEIN A, BOLTSHAUSER E, CARTWRIGHT MS, ROACH ES, MAMSA H & BALOH RW. 2007. Prolonged hemiplegic episodes in children due to mutations in ATP1A2. — *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 523-6.
- JENSEN AM, SØRENSEN TL, OLESEN C, MØLLER JV & NISSEN P. 2006. Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. — *Embo J* 25, 2305-14.
- JIANG Y, RUTA V, CHEN J, LEE A & MACKINNON R. 2003. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. — *Nature* 423, 42-8.
- JØRGENSEN PL. 1975. Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme. Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool. — *Biochim Biophys Acta* 401, 399-415.
- JØRGENSEN PL & ANDERSEN JP. 1988. Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. — *J Membr Biol* 103, 95-120.
- JØRGENSEN PL, HÅKANSSON KO & KARLISH SJ. 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. — *Annu Rev Physiol* 65, 817-49.
- JØRGENSEN PL & PEDERSEN PA. 2001. Structure-function relationships of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATP, or Mg<sup>2+</sup> binding and energy transduction in Na,K-ATPase. — *Biochim Biophys Acta* 1505, 57-74.
- JURKAT-ROTT K, FREILINGER T, DREIER JP, HERZOG J, GOBEL H, PETZOLD GC, MONTAGNA P, GASSER T, LEHMANN-HORN F & DICHGANS M. 2004. Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase variants. — *Neurology* 62, 1857-61.
- KAMSTEEG EJ & DEEN PM. 2000. Importance of aquaporin-2 expression levels in genotype -phenotype studies in nephrogenic diabetes insipidus. — *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F778-84.
- KANNER BI & SCHULDINER S. 1987. Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. — *CRC Crit Rev Biochem* 22, 1-38.

- KAPLAN JH. 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. — *Annu Rev Biochem* 71, 511-35.
- KAWAMURA M, OHMIZO K, MOROHASHI M & NAGANO K. 1985. Protective effect of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> against inactivation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by high concentrations of 2-mercaptoethanol at high temperatures. — *Biochim Biophys Acta* 821, 115-20.
- KOENDERINK JB, GEIBEL S, GRABSCH E, DE PONT JJ, BAMBERG E & FRIEDRICH T. 2003. Electrophysiological analysis of the mutated Na,K-ATPase cation binding pocket. — *J Biol Chem* 278, 51213-22.
- KOENDERINK JB, ZIFARELLI G, QIU LY, DE PONT J, J., SCHWARZ W, E. BAMBERG E & FRIEDRICH T. 2005. Na,K-ATPase mutations in familial hemiplegic migraine lead to functional inactivation. — *Biochim Biophys Acta* 1669, 61-8.
- KÜHLBRANDT W. 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. — *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 282-95.
- KUSCHE-VIHRIG K, SEGAL A, GRYGORCZYK R, BANGEL-RULAND N, VAN DRIESSCHE W & WEBER WM. 2009. Expression of ENaC and other transport proteins in *Xenopus* oocytes is modulated by intracellular Na<sup>+</sup>. — *Cell Physiol Biochem* 23, 9-24.
- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. — *Nature* 227, 680-5.
- LAFRENIÈRE RG, CADER MZ, POULIN JF, ANDRES-ENGUIG I, SIMONEAU M, GUPTA N, BOISVERT K, LAFRENIÈRE F, MCLAUGHLAN S, DUBÉ MP, et al. 2010. A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. — *Nat Med* 16, 1157-60.
- LATONA J. 1990. Ion concentration and voltage dependence of Na/K pump current in *Xenopus laevis* oocytes. — Ph.D. Thesis, The University of Health Sciences/The Chicago Medical School, North Chicago, IL, University Microfilms, Ann Arbor, MI.
- LÄUGER P. 1979. A channel mechanism for electrogenic ion pumps. — *Biochim Biophys Acta* 552, 143-61.
- LÄUGER P. 1991. *Electrogenic Ion Pumps*. — Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- LAURITZEN M, DREIER JP, FABRICIUS M, HARTINGS JA, GRAF R & STRONG AJ. 2010. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. — *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 17-35.
- LEÃO AA. 1944. Spreading depression activity in the cerebral cortex. — *J Neurophysiol* 7, 359-390.
- LI C, CAPENDEGUY O, GEERING K & HORISBERGER JD. 2005. A third Na<sup>+</sup>-binding site in the sodium pump. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12706-11.
- LI C, GEERING K & HORISBERGER JD. 2006. The third sodium binding site of Na,K-ATPase is functionally linked to acidic pH-activated inward current. — *J Membr Biol* 213, 1-9.
- LINGREL JB. 1992. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. — *J Bioenerg Biomembr* 24, 263-70.
- LUTSENKO S & KAPLAN JH. 1993. An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. — *Biochemistry* 32, 6737-43.
- MAGISTRETTI PJ & RANSOM BR. 2002. Chapter 10: Astrocytes. — In: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress* (Davis KL, Charney D, Coyle JT & Nemeroff C, eds). Lippincott Williams & Wilkins.
- MCCUDDEN CR, HAINS MD, KIMPLE RJ, SIDEROVSKI DP & WILLARD FS. 2005. G-protein signaling: back to the future. — *Cell Mol Life Sci* 62, 551-77.
- MCLAUGHLIN SG & DILGER JP. 1980. Transport of protons across membranes by weak acids. — *Physiol Rev* 60, 825-63.
- MEIER S. 2009. Untersuchungen zum Einfluss carboxy-terminaler Mutationen auf die Funktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. — Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.

- MEIER S, TAVRAZ NN, DURR KL & FRIEDRICH T. 2010. Hyperpolarization-activated inward leakage currents caused by deletion or mutation of carboxy-terminal tyrosines of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit. — *J Gen Physiol* 135, 115-34.
- MEIJ IC, KOENDERINK JB, VAN BOKHOVEN H, ASSINK KF, GROENESTEGE WT, DE PONT JJ, BINDELS RJ, MONNENS LA, VAN DEN HEUVEL LP & KNOERS NV. 2000. Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gamma-subunit. — *Nat Genet* 26, 265-6.
- MILBURN T, SAINT DA & CHUNG SH. 1995. The temperature dependence of conductance of the sodium channel: implications for mechanisms of ion permeation. — *Receptors Channels* 3, 201-211.
- MILLER AA. 1963. "Free Volume" and the Viscosity of Liquid Water. — *J. Chem. Phys.* 38, 1568.
- MISSIAEN L, ROBBERECHT W, VAN DEN BOSCH L, CALLEWAERT G, PARYS JB, WUYTACK F, RAEYMAEKERS L, NILIUS B, EGGERMONT J & DE SMEDT H. 2000. Abnormal intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and disease. — *Cell Calcium* 28, 1-21.
- MORTH JP, PEDERSEN BP, TOUSTRUP-JENSEN MS, SØRENSEN TL, PETERSEN J, ANDERSEN JP, VILSEN B & NISSEN P. 2007. Crystal structure of the sodium-potassium pump. — *Nature* 450, 1043-9.
- MORTH JP, POULSEN H, TOUSTRUP-JENSEN MS, SCHACK VR, EGEBJERG J, ANDERSEN JP, B. V & NISSEN P. 2009. The structure of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations. — *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 217-27.
- MOSKOWITZ MA, BOLAY H & DALKARA T. 2004. Deciphering migraine mechanisms: clues from familial hemiplegic migraine genotypes. — *Ann Neurol* 55, 276-80.
- NAGLE JF & MOROWITZ HJ. 1978. Molecular mechanisms for proton transport in membranes. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 298-302.
- NAKAO M & GADSBY DC. 1986. Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump. — *Nature* 323, 628-30.
- NEUBAUER G & UJLAKY R. 2002. Migräne - eine Volkskrankheit und ihre Kosten. — *Pharm Unserer Zeit* 31, 494-7.
- NIELSEN JM, PEDERSEN PA, KARLISH SJ & JØRGENSEN PL. 1998. Importance of intramembrane carboxylic acids for occlusion of K<sup>+</sup> ions at equilibrium in renal Na,K-ATPase. — *Biochemistry* 37, 1961-8.
- NOGUCHI S, NODA M, TAKAHASHI H, KAWAKAMI K, OHTA T, NAGANO K, HIROSE T, INAYAMA S, KAWAMURA M & NUMA S. 1986. Primary structure of the  $\beta$ -subunit of *Torpedo californica* (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase deduced from the cDNA sequence. — *FEBS Lett* 196, 315-20.
- NORENBERG MD & MARTINEZ-HERNANDEZ A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. — *Brain Res* 161, 303-10.
- O'SHEA RD. 2002. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. — *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 1018-23.
- OGAWA H, SHINODA T, CORNELIUS F & TOYOSHIMA C. 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) with bound potassium and ouabain. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13742-7.
- OGAWA H & TOYOSHIMA C. 2002. Homology modeling of the cation binding sites of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15977-82.
- OLESEN C, PICARD M, A., WINTHER M, GYRUP C, MORTH JP, OXVIG C, MØLLER JV & NISSEN P. 2007. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. — *Nature* 450, 1036-42.
- OLESEN C, SØRENSEN TL, NIELSEN RC, MØLLER JV & NISSEN P. 2004. Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. — *Science* 306, 2251-5.
- OLNEY JW. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. — *Science* 164, 719-21.
- ONSAGER L. 1967a. Ion passages in lipid bilayers. — *Science* 156, 541.

- ONSAGER L. 1967b. Thermodynamics and some molecular aspects of biology. — In: *The Neurosciences. A Study Program* (Quarion GC, Melnechuk T & Schmitt FO, eds). New York: Rockefeller Univ. Press, p. 75–79.
- OPHOFF RA, TERWINDT GM, VERGOUWE MN, VAN EIJK R, OEFNER PJ, HOFFMAN SM, LAMERDIN JE, MOHRENWEISER HW, BULMAN DE, FERRARI M, et al. 1996. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. — *Cell* 87, 543-52.
- PALMGREN MG & NISSEN P. 2011. P-type ATPases. — *Annu Rev Biophys* 40, 243-66.
- PAULSEN PA, JURKOWSKI W, APOSTOLOV R, LINDAHL E, NISSEN P & POULSEN H. 2013. The C-terminal cavity of the Na,K-ATPase analyzed by docking and electrophysiology. — *Mol Membr Biol* 30, 195-205.
- PEDERSEN PA, NIELSEN JM, RASMUSSEN JH & JØRGENSEN PL. 1998. Contribution to Ti<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Na<sup>+</sup> binding of Asn776, Ser775, Thr774, Thr772, and Tyr771 in cytoplasmic part of fifth transmembrane segment in alpha-subunit of renal Na,K-ATPase. — *Biochemistry* 37, 17818-27.
- PELLERIN L & MAGISTRETTI PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10625-9.
- PELUFFO RD. 2004. Effect of ADP on Na<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> exchange reaction kinetics of Na,K-ATPase. — *Biophys J* 87, 883-98.
- POST RL, HEGYVARY C & KUME S. 1972. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. — *J Biol Chem* 247, 6530-40.
- POST RL & JOLLY PC. 1957. The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. — *Biochim Biophys Acta* 25, 118-28.
- POULSEN H, KHANDELIA H, MORTH JP, BUBLITZ M, MOURITSEN OG, EGEBJERG J & NISSEN P. 2010. Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. — *Nature* 467, 99-102.
- POULSEN H, NISSEN P, MOURITSEN OG & KHANDELIA H. 2012. Protein kinase A (PKA) phosphorylation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase opens intracellular C-terminal water pathway leading to third Na<sup>+</sup>-binding site in molecular dynamics simulations. — *J Biol Chem* 287, 15959-65.
- PRICE EM & LINGREL JB. 1988. Structure-function relationships in the Na,K-ATPase  $\alpha$  subunit: site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme. — *Biochemistry* 27, 8400-8.
- PRICE EM, RICE DA & LINGREL JB. 1990. Structure-function studies of Na,K-ATPase. Site-directed mutagenesis of the border residues from the H1-H2 extracellular domain of the alpha subunit. — *J Biol Chem* 265, 6638-41.
- RACKER E, JOHNSON JH & BLACKWELL MT. 1983. The role of ATPase in glycolysis of Ehrlich ascites tumor cells. — *J Biol Chem* 258, 3702-5.
- RAKOWSKI RF. 1993. Charge movement by the Na/K pump in *Xenopus* oocytes. — *J Gen Physiol* 101, 117-44.
- RAKOWSKI RF, GADSBY DC & DEWEER P. 1997. Voltage dependence of the Na/K pump. — *J Membr Biol* 155, 105-12.
- RAKOWSKI RF, VASILETS LA, LATONA J & SCHWARZ W. 1991. A negative slope in the current-voltage relationship of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump in *Xenopus* oocytes produced by reduction of external [K<sup>+</sup>]. — *J Membr Biol* 121, 177-87.
- RANSOM CB, RANSOM BR & SONTHEIMER H. 2000. Activity-dependent extracellular K<sup>+</sup> accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na<sup>+</sup> pumps. — *J Physiol* 522 Pt 3, 427-42.
- RATHEAL IM, VIRGIN GK, YU H, ROUX B, GATTO C & ARTIGAS P. 2010. Selectivity of externally facing ion-binding sites in the Na/K pump to alkali metals and organic cations. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18718-23.
- RETINGER J. 1996. Characteristics of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mediated proton current in Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-free extracellular solutions. Indications for kinetic similarities between H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. — *Biochim Biophys Acta* 1282, 207-15.

- RIANT F, DE FUSCO M, ARIDON P, DUCROS A, PLOTON C, MARCHELLI F, MACIAZEK J, BOUSSER MG, CASARI G & TOURNIER-LASSERVE E. 2005. ATP1A2 mutations in 11 families with familial hemiplegic migraine. — *Hum Mutat* 26, 281.
- RIANT F, DUCROS A, PLOTON C, BARBANCE C, DEPIENNE C & TOURNIER-LASSERVE E. 2010. De novo mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine. — *Neurology* 75, 967-72.
- RIANT F, ROZE E, BARBANCE C, MÉNERET A, GUYANT-MARÉCHAL L, LUCAS C, SABOURAUD P, TRÉBUCHON A, DEPIENNE C & TOURNIER-LASSERVE E. 2012. PRRT2 mutations cause hemiplegic migraine. — *Neurology* 79, 2122-4.
- ROSE CR & RANSOM BR. 1996. Intracellular sodium homeostasis in rat hippocampal astrocytes. — *J Physiol* 491 ( Pt 2), 291-305.
- ROSE CR & RANSOM BR. 1997. Gap junctions equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentration in astrocytes. — *Glia* 20, 299-307.
- RUSSELL MB & DUCROS A. 2011. Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. — *Lancet Neurol* 10, 457-70.
- RUSSELL MB, ISELIUS L & OLESEN J. 1995. Inheritance of migraine investigated by complex segregation analysis. — *Hum Genet* 96, 726-30.
- SAGAR A & RAKOWSKI RF. 1994. Access channel model for the voltage dependence of the forward-running Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump. — *J Gen Physiol* 103, 869-93.
- SCHATZMANN HJ. 1953. [Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane.]. — *Helv Physiol Pharmacol Acta* 11, 346-54.
- SCHNEEBERGER A & APELL HJ. 2001. Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: II. Competition of various cations. — *J Membr Biol* 179, 263-73.
- SCHOENEN J, AMBROSINI A, SANDOR PS & MAERTENS DE NOORDHOUT A. 2003. Evoked potentials and transcranial magnetic stimulation in migraine: published data and viewpoint on their pathophysiologic significance. — *Clin Neurophysiol* 114, 955-72.
- SCHUBERT D & PIASECKI D. 2001. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. — *J Neurosci* 21, 7455-62.
- SHAMRAJ OI, GRUPP IL, GRUPP G, MELVIN D, GRADOUX N, KREMERS W, LINGREL JB & DE POVER A. 1993. Characterisation of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts. — *Cardiovasc Res* 27, 2229-37.
- SHAMRAJ OI & LINGREL JB. 1994. A putative fourth Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit gene is expressed in testis. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12952-6.
- SHINODA T, OGAWA H, CORNELIUS F & TOYOSHIMA C. 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. — *Nature* 459, 446-50.
- SHULL GE, SCHWARTZ A & LINGREL JB. 1985. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase deduced from a complementary DNA. — *Nature* 316, 691-5.
- SHYTI R, DE VRIES B & VAN DEN MAAGDENBERG A. 2011. Migraine genes and the relation to gender. — *Headache* 51, 880-90.
- SILBERSTEIN SD. 2004. Migraine. — *Lancet* 363, 381-91.
- SKOU JC. 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. — *Biochim Biophys Acta* 23, 394-401.
- SKOU JC. 1960. Further investigation on a magnesium and sodium activated ATPase possibly related to the active linked transport of sodium and potassium across the nerve membrane. — *Biochim. Biophys. Acta* 42, 6-23.

- SKOU JC & ESMANN M. 1980. Effects of ATP and protons on the Na : K selectivity of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase studied by ligand effects on intrinsic and extrinsic fluorescence. — *Biochim Biophys Acta* 601, 386-402.
- SOMJEN GG. 2001. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. — *Physiol Rev* 81, 1065-96.
- SØRENSEN TL, J., MØLLER JV & NISSEN P. 2004. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. — *Science* 304, 1672-5.
- SOTOMAYOR CP, AGUILAR LF, CUEVAS FJ, HELMS MK & JAMESON DM. 2000. Modulation of pig kidney Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by cholesterol: role of hydration. — *Biochemistry* 39, 10928-35.
- STARACE DM & BEZANILLA F. 2004. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. — *Nature* 427, 548-53.
- SWEADNER KJ & RAE E. 2000. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. — *Genomics* 68, 41-56.
- SWOBODA KJ, KANAVAKIS E, XAIDARA A, JOHNSON JE, LEPPERT MF, SCHLESINGER-MASSART MB, PTACEK LJ, SILVER K & YOUROUKOS S. 2004. Alternating hemiplegia of childhood or familial hemiplegic migraine? A novel ATP1A2 mutation. — *Ann Neurol* 55, 884-7.
- TAKEUCHI A, REYES N, ARTIGAS P & GADSBY DC. 2008. The ion pathway through the opened Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pump. — *Nature* 456, 413-6.
- TAVRAZ NN, DURR KL, KOENDERINK JB, FREILINGER T, BAMBERG E, DICHGANS M & FRIEDRICH T. 2009. Impaired plasma membrane targeting or protein stability by certain *ATP1A2* mutations identified in sporadic or familial hemiplegic migraine. — *Channels (Austin)* 3, 82-7.
- TAVRAZ NN, FRIEDRICH T, DURR KL, KOENDERINK JB, BAMBERG E, FREILINGER T & DICHGANS M. 2008. Diverse functional consequences of mutations in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_2$ -subunit causing familial hemiplegic migraine type 2. — *J Biol Chem* 283, 31097-106.
- THERIEN AG & BLOSTEIN R. 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. — *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C541-66.
- THERIEN AG, GOLDSHLEGER R, KARLISH SJ & BLOSTEIN R. 1997. Tissue-specific distribution and modulatory role of the  $\gamma$  subunit of the Na,K-ATPase. — *J Biol Chem* 272, 32628-34.
- THOMAS RC. 1969. Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium. — *J Physiol* 201, 495-514.
- THOMPSON SM. 1986. Relations between chord and slope conductances and equivalent electromotive forces. — *Am J Physiol* 250, C333-9.
- THOMSEN LL, KIRCHMANN M, BJORNSSON A, STEFANSSON H, JENSEN RM, FASQUEL AC, PETURSSON H, STEFANSSON M, FRIGGE ML, KONG A, et al. 2007. The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine. — *Brain* 130, 346-56.
- TIWARI JK & SIKDAR SK. 1999. Temperature-dependent conformational changes in a voltage-gated potassium channel. — *Eur Biophys J* 28, 338-45.
- TOMBOLA F, PATHAK MM & ISACOFF EY. 2005. Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. — *Neuron* 45, 379-88.
- TÖRÖK TL. 2007. Electrogenic Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchange of nerve and muscle cells. — *Prog Neurobiol* 82, 287-347.
- TOUSTRUP-JENSEN MS, HOLM R, EINHOLM AP, SCHACK VR, MORTH JP, NISSEN P, ANDERSEN JP & VILSEN B. 2009. The C terminus of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase controls Na<sup>+</sup> affinity on both sides of the membrane through Arg935. — *J Biol Chem* 284, 18715-25.
- TOYOSHIMA C. 2009. How Ca<sup>2+</sup>-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. — *Biochim Biophys Acta* 1793, 941-6.

- TOYOSHIMA C & MIZUTANI T. 2004. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. — *Nature* 430, 529-35.
- TOYOSHIMA C, NAKASAKO M, NOMURA H & OGAWA H. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. — *Nature* 405, 647-55.
- TOYOSHIMA C & NOMURA H. 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. — *Nature* 418, 605-11.
- ULRICH V, GERVIL M, KYVIK KO, OLESEN J & RUSSELL MB. 1999. Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study. — *Ann Neurol* 45, 242-6.
- URAYAMA O, SHUTT H & SWEADNER KJ. 1989. Identification of three isozyme proteins of the catalytic subunit of the Na,K-ATPase in rat brain. — *J Biol Chem* 264, 8271-80.
- VANMOLKOT KR, KORS EE, HOTTENGA JJ, TERWINDT GM, HAAN J, HOEFNAGELS WA, BLACK DF, SANDKUIJL LA, FRANTS RR, FERRARI MD, et al. 2003. Novel mutations in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. — *Ann Neurol* 54, 360-6.
- VASILYEV A, KHATER K & RAKOWSKI RF. 2004. Effect of extracellular pH on presteady-state and steady-state current mediated by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump. — *J Membr Biol* 198, 65-76.
- VEDOVATO N & GADSBY DC. 2010. The two C-terminal tyrosines stabilize occluded Na/K pump conformations containing Na or K ions. — *J Gen Physiol* 136, 63-82.
- VENOSA RA. 2005. Protein kinases A and C stimulate the Na<sup>+</sup> active transport in frog skeletal muscle without an appreciable change in the number of sarcolemmal Na<sup>+</sup> pumps. — *Acta Physiol Scand* 185, 329-34.
- VILSEN B. 1995. Mutant Glu781-->Ala of the rat kidney Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase displays low cation affinity and catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions. — *Biochemistry* 34, 1455-63.
- VILSEN B, RAMLOV D & ANDERSEN JP. 1997. Functional consequences of mutations in the transmembrane core region for cation translocation and energy transduction in the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and the SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase. — *Ann N Y Acad Sci* 834, 297-309.
- WALZ W & HINKS EC. 1985. Carrier-mediated KCl accumulation accompanied by water movements is involved in the control of physiological K<sup>+</sup> levels by astrocytes. — *Brain Res* 343, 44-51.
- WANG J, VELOTTA JB, MCDONOUGH AA & FARLEY RA. 2001. All human Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides. — *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1336-43.
- WANG X & HORISBERGER JD. 1995. A conformation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump is permeable to proton. — *Am J Physiol* 268, C590-5.
- WEBER W. 1999. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. — *Biochim Biophys Acta* 1421, 213-33.
- WUDEL I & APELL HJ. 1995. Electrogenicity of the sodium transport pathway in the Na,K-ATPase probed by charge-pulse experiments. — *Biophys J* 69, 909-21.
- YARAGATUPALLI S, OLIVERA JF, GATTO C & ARTIGAS P. 2009. Altered Na<sup>+</sup> transport after an intracellular  $\alpha$ -subunit deletion reveals strict external sequential release of Na<sup>+</sup> from the Na/K pump. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15507-12.
- YAROWSKY P, BOYNE AF, WIERWILLE R & BROOKES N. 1986. Effect of monensin on deoxyglucose uptake in cultured astrocytes: energy metabolism is coupled to sodium entry. — *J Neurosci* 6, 859-66.
- ZUNDEL G. 1997. Proton Polarizability of Hydrogen Bonds and Proton Transfer Processes, Their Role in Electrochemistry and Biology. — Institut für Physikalische Chemie der Universität München, München, Deutschland.

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1.1-1: Schematische Struktur von P-Typ-ATPasen und deren allgemeiner Reaktionsmechanismus.  | 12 |
| Abb. 1.1-2: Röntgenkristallstruktur der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase in der E <sub>2</sub> -Konformation.   | 14 |
| Abb. 1.1-3: Interaktionsmöglichkeiten zwischen der α- und der β-Untereinheit.  | 15 |
| Abb. 1.1-4: Koordinierung der K <sup>+</sup> -Bindungsstellen I und II und Strukturvergleich mit SERCA.  | 16 |
| Abb. 1.1-5: Die mutmaßliche Na <sup>+</sup> -Bindungsstelle III und Stabilisierung durch den C-Terminus.   | 17 |
| Abb. 1.2-1: Schematische Darstellung des Albers-Post-Reaktionsschemas der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.   | 20 |
| Abb. 1.2-2: Schematische Darstellung des <i>access-channel</i> -Modells für K <sup>+</sup> und Na <sup>+</sup> .   | 22 |
| Abb. 1.2-3: Reaktionsschritte des Vier-Zustandsmodells von Holmgren & Rakowski (2006).   | 23 |
| Abb. 1.2-4: Darstellung des C-terminalen Zugangskanals für Protonen (aus: Poulsen et al., 2010).   | 25 |
| Abb. 1.2-5: Die Rolle von H <sup>+</sup> -Ionen im Albers-Post-Schema der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase (aus: Poulsen et al., 2010).   | 26 |
| Abb. 1.2-6: Die chemische Struktur von Ouabain.  | 28 |
| Abb. 1.3-1: Zeitlicher Verlauf eines Aktionspotentials.  | 29 |
| Abb. 1.3-2: Schematische Darstellung eines neuronalen synaptischen Spalts.   | 33 |
| Abb. 2.3-1: Weibliches Tier des Südafrikanischen Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i> und Oozyten im Stadium V und VI (Dumont, 1972).   | 41 |
| Abb. 2.4-1: Schematische Darstellung der Messapparatur.  | 42 |
| Abb. 2.4-2: Angewandtes Spannungssprung-Protokoll und exemplarisch die dazugehörige Stromantwort einer Oozyte.   | 43 |
| Abb. 2.4-3: Exemplarische Darstellung einer K <sup>+</sup> -induzierten I(V)-Kurve und einer Stromkurve in Abhängigkeit von [K <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> .   | 45 |
| Abb. 2.4-4: Transiente Ströme der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.   | 48 |
| Abb. 3.1-1: Spannungs- und [K <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> -Abhängigkeit stationärer Pumpströme des WT-Enzyms bei [Na <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> = 100 mM.   | 53 |
| Abb. 3.1-2: Spannungs- und [K <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> -Abhängigkeit stationärer Pumpströme des WT-Enzyms bei [Na <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> = 0 mM.   | 54 |
| Abb. 3.1-3: Spannungsabhängigkeit und Kinetik transienter Ströme des WT-Proteins.  | 56 |
| Abb. 3.2-1: Spannungs- und [K <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> -Abhängigkeit stationärer Pumpströme der Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W bei [Na <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> = 100 mM.  | 58 |
| Abb. 3.2-2: Na <sup>+</sup> -abhängige K <sup>+</sup> -Affinitäten der Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W.   | 59 |
| Abb. 3.2-3: Spannungsabhängigkeit der reziproken Zeitkonstanten aus den transienten „on“-Strömen der Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W unter K <sup>+</sup> -freien Bedingungen ([Na <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> = 100 mM).     | 60 |
| Abb. 3.2-4: Q(V)-Kurven von G900R, K902E, K1003E und R1007W.   | 61 |
| Abb. 3.2-5: Repräsentative Western Blots von L994del, G855R und Y1009X.  | 63 |
| Abb. 3.3-1: Spannungsabhängigkeit der K <sup>+</sup> -induzierten und ouabainsensitiven Ströme bei verschiedenen [K <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> und bei [Na <sup>+</sup> ] <sub>ext</sub> = 100 mM der Mutanten R937S, R1002Q und ΔYY. | 65 |
| Abb. 3.3-2: I(V)-Kennlinien der Mutanten D999H unter verschiedenen Bedingungen.  | 67 |

|   |     |
|---|-----|
| Abb. 3.3-3: Spannungsabhängigkeit der aus $K_{0,5}$ -Werte von D999H, R937S, R1002Q und $\Delta YY$ .....   | 68  |
| Abb. 3.3-4: Strom-Zeit-Verläufe in $K^+$ -freien Puffern von D999H.....   | 69  |
| Abb. 3.3-5: Spannungsabhängigkeit der $K^+$ -induzierten und ouabainsensitiven Ströme bei verschiedenen $[K^+]_{ext}$ und bei $[Na^+]_{ext} = 0$ mM der Mutanten R937S, R1002Q und $\Delta YY$ .....                        | 70  |
| Abb. 3.3-6: Vergleich stationärer Ströme von R937S und R937L.....   | 72  |
| Abb. 3.3-7: pH-Abhängigkeit stationärer Leckströme unter $K^+$ -freien Bedingungen für die Konstrukte R937S, R937L, R1002Q und WT.....  | 74  |
| Abb. 3.3-8: Vergrößerte Darstellung der pH-abhängigen Leckströme von R937S und R937L.....   | 75  |
| Abb. 3.3-9: pH-abhängige Eigenschaften der I(V)-Kurven der Konstrukte R937S und R937L.....  | 78  |
| Abb. 3.3-10: Temperaturabhängigkeit der ouabainsensitiven stationären Ströme für R937S und $\Delta YY$ ....   | 80  |
| Abb. 3.3-11: $[Na^+]_{int}$ -Abhängigkeit stationärer Leckströme von $\Delta YY$ .....  | 82  |
| Abb. 3.3-12: Repräsentativer Zeitverlauf transienter Ströme für die Konstrukte WT, R937S, R937L, D999H R1002Q und $\Delta YY$ unter $K^+$ -freien Bedingungen und $[Na^+]_{ext} = 100$ mM.....                              | 83  |
| Abb. 3.3-13: Spannungsabhängigkeit der verschobenen Ladung im elektrogenen $Na^+/Na^+$ -Austauschmodus unter $K^+$ -freien Bedingungen für die Konstrukte D999H, R937S, R937L, R1002Q und $\Delta YY$ .....                 | 84  |
| Abb. 3.3-14: Spannungsabhängigkeit der Relaxationskonstanten aus den transienten „on“-Strömen der Mutanten D999H, R937S, R937L, R1002Q und $\Delta YY$ unter $K^+$ -freien Bedingungen ( $[Na^+]_{ext} = 100$ mM).<br>..... | 86  |
| Abb. 3.3-15: Spannungsabhängigkeit stationärer Leckströme unter $K^+$ -freien Bedingungen in Abhängigkeit von der extrazellulären $Na^+$ -Konzentration für R937S und $\Delta YY$ im Vergleich zum WT-Protein.....          | 88  |
| Abb. 3.3-16: Ouabainsensitive stationäre Ströme in An- und Abwesenheit von 10 mM $K^+_{ext}$ in 100 mM $Na^+_{ext}$ oder 100 mM $Li^+_{ext}$ für WT und $\Delta YY$ .....   | 89  |
| Abb. 4.1-1: Die C-terminalen Aminosäuresequenzen der $\alpha$ -Isoformen der humanen $Na^+/K^+$ -ATPase.....  | 92  |
| Abb. 4.1-2: Aminosäurereste des C-terminalen Bereichs der $\alpha$ -Untereinheit.....   | 93  |
| Abb. 4.1-3: Mögliche C-terminale Interaktionen.....   | 97  |
| Abb. 4.1-4: Der Mechanismus des Protonentransfers über eine Wasserstoffbrückenbindungskette (HBC).<br>.....   | 104 |
| Abb. 4.1-5: Darstellung der C-terminalen Kavität (aus: Poulsen et al., 2010).<br>.....  | 105 |
| Abb. 4.1-6: C-terminale Strukturveränderung während der Phosphorylierung von Ser940.....  | 106 |
| Abb. 4.1-7: Oberflächendarstellung der C-terminalen Kavität für WT, R937S, R937L und R937P.....   | 108 |
| Abb. 4.1-8: Direkter Vergleich der normierten transienten „on“-Ströme von $\Delta YY$ und WT.....   | 109 |
| Abb. 4.1-9: Reaktionsschema des Vier-Zustands-Modells des $Na^+/Na^+$ -Austauschmodus.....  | 110 |
| Abb. 4.1-10: Kinetisches Modell der $Na^+/Na^+$ -Austauschreaktion bei extrazellulärer Ansäuerung.....  | 111 |
| Abb. 4.1-11: Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Vorwärts- und Rückreaktion im $Na^+/Na^+$ -Austauschmodus für R937S, R937L und das WT-Enzym.....  | 112 |
| Abb. 4.2-1: Mögliche Wechselwirkungen zwischen der $\beta$ -Transmembrandomäne und der $\alpha$ -Untereinheit.<br>.....   | 118 |

|  |     |
|--|-----|
| Tab. 3.2-1: Parameter der $K_{0,5}(V)$ -Kurven für WT, G900R, K902E, K1003E und R1007W. ....   | 59  |
| Tab. 3.2-2: Parameter der Approximierung der $Q(V)$ -Kurven durch eine Boltzmann-Funktion für das WT-Protein und die Mutanten G900R, K902E, K1003E und R1007W..... | 62  |
| Tab. 3.3-1: Parameter der spannungsabhängigen $K_{0,5}(Na^+)$ -Kurven für WT, R937S, D999H, R1002Q und $\Delta YY$ . ....  | 68  |
| Tab. 3.3-2: Parameter der pH-abhängigen stationären Leckströme für R937S und R937L. ....   | 77  |
| Tab. 3.3-3: Aktivierungsenergien für R937S und $\Delta YY$ . ....  | 80  |
| Tab. 3.3-4: Boltzmann-Parameter der $Q(V)$ -Kurven aus den transienten „off“-Strömen für die Konstrukte WT, D999H, R937S, R937L, R1002Q und $\Delta YY$ .....      | 85  |
| <br>   |     |
| Gl. 1.2-1.....   | 23  |
| Gl. 1.2-2.....   | 23  |
| Gl. 2.4-1.....   | 45  |
| Gl. 2.4-2.....   | 46  |
| Gl. 2.4-3.....   | 47  |
| Gl. 2.4-4.....   | 47  |
| Gl. 2.4-5.....   | 47  |
| Gl. 2.4-6.....   | 47  |
| Gl. 2.4-7.....   | 47  |
| Gl. 2.4-8.....   | 47  |
| Gl. 2.4-9.....   | 47  |
| Gl. 2.4-10.....  | 48  |
| Gl. 2.4-11.....  | 49  |
| Gl. 2.4-12.....  | 49  |
| Gl. 2.4-13.....  | 50  |
| Gl. 2.4-14.....  | 50  |
| Gl. 2.4-15.....  | 50  |
| Gl. 2.4-16.....  | 50  |
| Gl. 2.4-17.....  | 50  |
| Gl. 3.3-1.....   | 79  |
| Gl. 3.3-2.....   | 79  |
| Gl. 4.1-1.....   | 111 |



## Anhang

### A1 Mathematische Details kinetischer Modelle

#### Das Vier-Zustands-Modell nach Holmgren und Rakowski (2006)

Das Modell von Holmgren und Rakowski beschreibt, welchen Einfluss die Bindung und Okklusion von  $\text{Na}^+$  in einem flachen intrazellulären *ion well* auf die transiente Ladungsverschiebung, die aus der stark elektrogenen Deokklusion und Freisetzung des ersten  $\text{Na}^+$ -Ions in den Extrazellularraum resultiert, hat (Peluffo, 2004; Holmgren & Rakowski, 2006). Betrachtet werden folgende Teilreaktionen im Reaktionszyklus:



Schema A 1

Das Intermediat  $(3\text{Na}^+) \text{E}_1\text{P} \cdot \text{ADP}$  ist ein Phosphoenzym mit einer energiereichen Phosphatgruppe, einem gebundenen ADP-Molekül und okkludiertem  $\text{Na}^+$ . Die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung,  $k_1$ , beschreibt die Freisetzung von ADP. Sie hängt aber nicht von der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration und dem Membranpotential ab. Die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung,  $K_{-1}$ , beschreibt die Rückreaktion abhängig von der ADP-Konzentration und von  $k_{-1}$  (Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung) wie folgt:

$$K_{-1} = k_{-1}[\text{ADP}] \quad \text{Gl. A 1}$$

Die als spannungsunabhängig definierte Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  fasst mehrere Reaktionen zusammen: die  $\text{Na}^+$ -Deokklusion und dessen extrazelluläre Freisetzung und den  $\text{E}_1\text{P}$ - $\text{E}_2\text{P}$ -Konformationswechsel. Die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung der Rückreaktion,  $K_{-2}$ , ist abhängig vom Membranpotential und von der lokalen  $\text{Na}^+$ -Konzentration im extrazellulären *ion well* ( $[\text{Na}^+]_{\delta(\text{ext})}$ ):

$$K_{-2} = k_{-2}[\text{Na}^+]_{\delta(\text{ext})}^n \quad (n: \text{Hill-Koeffizient für } \text{Na}_{\text{ext}}^+) \quad \text{Gl. A 2}$$

Hierbei ist  $k_{-2}$  die spannungsunabhängige Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung, die die extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Rückbindung, -Okklusion und den  $\text{E}_2\text{P}$ - $\text{E}_1\text{P}$ -Konformationswechsel beschreibt. Für  $[\text{Na}^+]_{\delta(\text{ext})}$  ergibt sich eine durch eine Boltzmann-Funktion beschriebene Abhängigkeit von der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration und dem Membranpotential  $V_m$ :

$$[\text{Na}^+]_{\delta(\text{ext})}^n = [\text{Na}^+]_{\text{ext}}^n \cdot \exp\left(-\frac{z \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \quad \text{Gl. A 3}$$

$F$  ist die Faraday-Konstante,  $R$  die universelle Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $z$  die apparente Valenz, die durch folgende Beziehung definiert ist:

$$z = n \cdot q \cdot \delta \quad \text{Gl. A 4}$$

In dieser Gleichung (Gl. A 4) repräsentiert  $n$  die Molekularität der Ladungstranslokation,  $q$  die Valenz des transportierten Ions und  $\delta$  die dielektrische Konstante, die als der Anteil des elektrischen Felds in der Membran, welcher von der transportierten Ladung „gspürt“ wird, interpretiert werden kann. Die Kombination aus Gl. A 2 und Gl. A 3 ergibt Gl. A 5, in der allerdings eine Sättigung der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Bindungsstellen nicht berücksichtigt ist:

$$K_{-2} = k_{-2}[\text{Na}^+]_{\text{ext}} \cdot \exp\left(-\frac{\delta_{(\text{ext})} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \quad \text{Gl. A 5}$$

Im Prinzip ist auch die Vorwärtsreaktion, beschrieben durch  $k_2$ , elektrogen, da die  $\text{Na}^+$ -Freisetzung durch den extrazellulären *access channel* geschieht, allerdings ist die Spannungsabhängigkeit von  $k_2$  vernachlässigbar, da in der Vorwärtsreaktion der vorangegangene Konformationswechsel geschwindigkeitsbestimmend ist.

Das Differentialgleichungssystem für die Reaktionsschritte, die in Schema A 1 schwarz abgebildet sind, hat drei Eigenwerte. Der kleinste Eigenwert (ungleich null) dominiert die Geschwindigkeitskonstante  $k$  für die Gesamtreaktion der Ladungstranslokation:

$$k = 0,5 \cdot \left[ k_1 + K_{-1} + k_2 + K_{-2} - \sqrt{(k_1 + K_{-1} + k_2 + K_{-2})^2 - 4[k_1 \cdot k_2 + K_{-2}(k_1 + K_{-1})]} \right] \quad \text{Gl. A 6}$$

Es wird angenommen, dass  $\text{Na}^+$  in einem flachen intrazellulären *ion well* der Tiefe  $\delta_{(\text{int})}$  an seine Bindungsstellen bindet. Dieser Schritt ist verhältnismäßig schnell im Vergleich zu dem anschließenden langsamen Okklusionsschritt. Es handelt sich also um eine Gleichgewichtsgleichgewichtsreaktion der  $\text{Na}^+$ -Bindung an  $E_1\text{ATP}$  (grau in Schema A 1), welche bei gegebenem Haltepotential  $V_h$  (Haltepotential vor einem Spannungspuls) durch die Gleichgewichtskonstante  $K_{m(V_h)}$  beschrieben wird:

$$K_{m(V_h)} = K_{m(V_h=0)} \cdot \exp\left(-\frac{\delta_{(\text{int})} \cdot F \cdot V_h}{RT}\right) \quad \text{Gl. A 7}$$

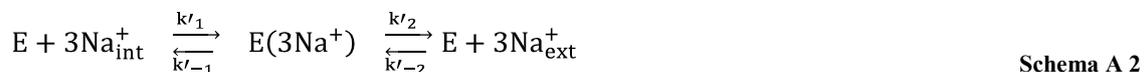
Holmgren und Rakowski machen deutlich, dass die Geschwindigkeit der Reaktion (beschrieben durch  $k_1$ ) limitiert ist durch nicht-sättigende  $[\text{Na}^+]_{\text{int}}$ . Daher ersetzen sie  $k_1$  in Gl. A 6 durch eine effektive Vorwärts-Geschwindigkeitskonstante  $k_f$ :

$$k_f = \frac{k_1 \cdot [\text{Na}^+]_{\text{int}}}{[\text{Na}^+]_{\text{int}} + K_{m(V)}} \quad \text{Gl. A 8}$$

$k_f$  beschreibt also den Einfluss des Membranpotentials und der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration auf die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Ladungstranslokation.  $K_{m(V_h)}$  selbst hängt zwar vom Haltepotential ab, ist aber konstant für das jeweilige Spannungssprung-Protokoll (da das Haltepotential innerhalb des Protokolls gleich ist). Daher gibt es keinen Effekt auf die Spannungsabhängigkeit von  $k$ . Aus Schema A 1 wird deutlich, dass die elektrogene intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Bindung nicht beobachtet wird, da sie gefolgt wird durch die langsame Okklusionsreaktion, welche sich wie beschrieben in ihren Gleichgewichtszustand bei  $V_h$  einpegelt und die intrazellulären Bindungsschritte kinetisch von der schnelleren  $\text{Na}^+$ -Freisetzung isoliert. Das heißt im Endeffekt, dass die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Bindung kinetisch keinen Einfluss auf  $k$  hat. Es ist vielmehr  $K_{-2}$ , welches die Spannungsabhängigkeit von  $k$  verursacht und verantwortlich ist für den Anstieg von  $k$  bei hyperpolarisierenden Membranpotentialen.

Modell nach Vasilyev und Kollegen (2004)

Vasilyev, Khater und Rakowski benutzten ein vereinfachtes kinetisches Modell, um den Einfluss vom extrazellulären pH auf die ouabainsensitiven transienten Ströme zu beschreiben (Vasilyev et al., 2004).



In Schema A 2 ist  $E(3Na^+)$  der  $Na^+$ -okkludierter Zustand, welcher sowohl von der extra- als auch von der intrazellulären Seite zugänglich ist. E steht für sämtliche nicht okkludierten Zustände, sodass für die Gesamtzahl der Zustände gilt:

$$E_{\text{tot}} = E + E(3Na^+) \quad \text{Gl. A 9}$$

Die Geschwindigkeitskonstanten  $k'_1$ ,  $k'_{-1}$ ,  $k'_2$  und  $k'_{-2}$  sind spannungsunabhängig. Aus dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität (in einem sich im Gleichgewicht befindenden System ist die Geschwindigkeit eines Elementarprozesses gleich der des umgekehrten Prozesses) ergibt sich:

$k'_{-1} \cdot k'_{-2} = k'_1 \cdot k'_2$ . Zur Einführung der Spannungsabhängigkeit der Kinetik werden die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung  $K'_1$  und  $K'_{-2}$  mittels einer Boltzmann-Funktion definiert, die die  $Na^+$ -Bindungs-/Okklusionsreaktionen beschreiben und abhängig sind von der lokalen  $Na^+$ -Konzentrationen an den Bindungsstellen:

$$K'_1 = k'_1 [Na^+]_{\text{int}} \cdot \exp\left(\frac{\delta_{(\text{int})} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \quad \text{Gl. A 10}$$

$$K'_{-2} = k'_{-2} [Na^+]_{\text{ext}} \cdot \exp\left(-\frac{\delta_{(\text{ext})} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \quad \text{Gl. A 11}$$

$\delta$  ist der jeweilige Anteil des Transmembran-Feldes, welches von den  $Na^+$ -Ionen entlang eines *access channels* zu seinen Bindungsstellen durchquert wird ( $\delta_{(\text{int})} + \delta_{(\text{ext})} = 1$ ). Mithilfe dieser spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstante kann eine Differentialgleichung für die okkludierten Zustände aufgestellt werden:

$$\frac{dE(3Na^+)}{dt} = E_{\text{tot}} \cdot (K'_1 + K'_{-2}) - E(3Na^+) \cdot (K'_1 + k'_{-1} + k'_2 + K'_{-2}) \quad \text{Gl. A 12}$$

Die Lösung der Gl. A 12 ergibt die Relaxationsgeschwindigkeitskonstante der transienten Ströme:

$$\tau^{-1} = k_1 + K_{-1} + k_2 + K_{-2} \quad \text{Gl. A 13}$$

Der Gesamt-Strom besteht aus einer transienten und einer stationären ( $I_{\text{ss}}$ ) Komponente, die durch die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten und die Zeitabhängigkeit der Zustände definiert ist:

$$I_{\text{ss}} = F \cdot E_{\text{tot}} \cdot \frac{K'_1 \cdot k'_2 - K'_{-2} \cdot k'_{-1}}{K'_1 + k'_{-1} + k'_2 + K'_{-2}} \quad \text{Gl. A 14}$$

Bei Hyperpolarisation ist der stationäre Strom limitiert durch:  $F \cdot E_{\text{tot}} \cdot k'_{-1}$ .

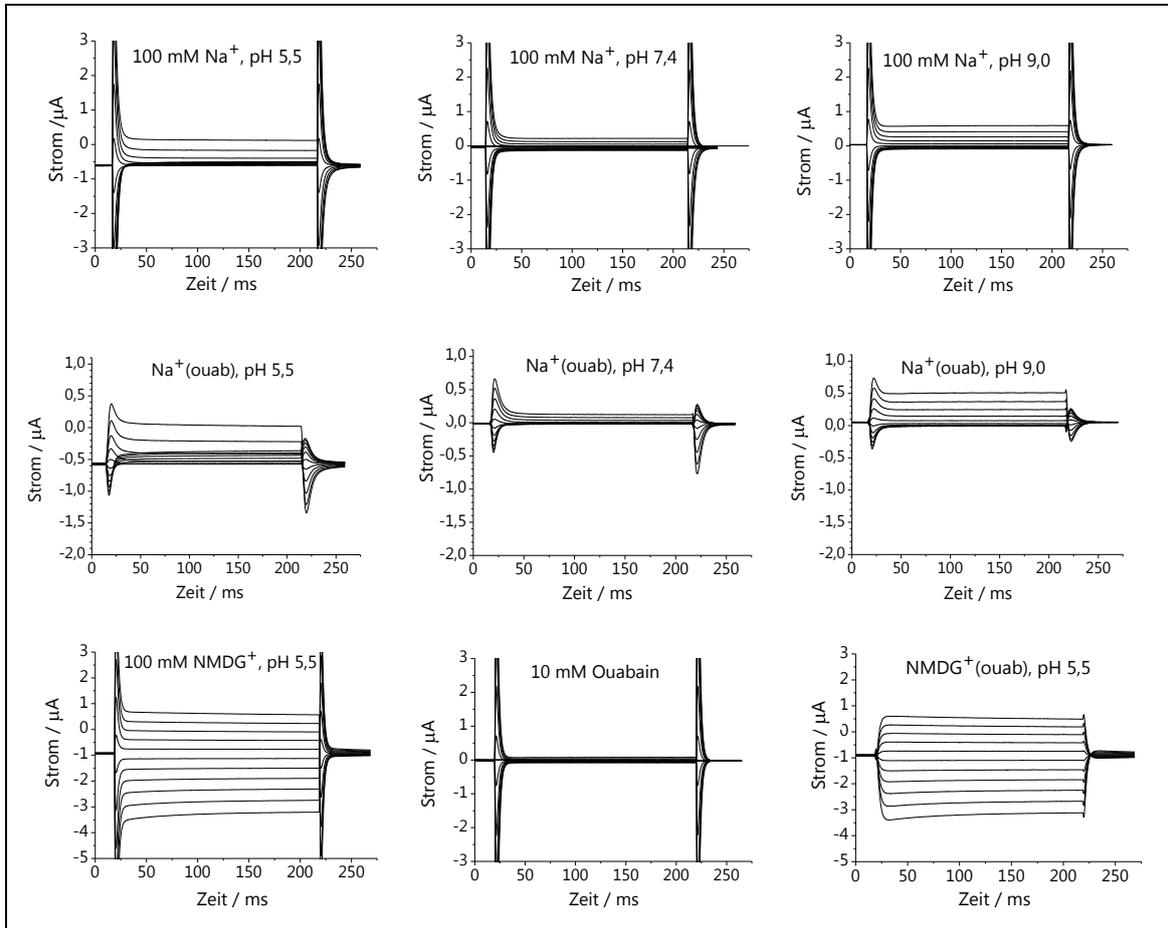
Der transiente Anteil des Stroms relaxiert mit der Geschwindigkeitskonstante  $k$ :

$$\tau^{-1} = k'_1 [Na^+]_{\text{int}} \cdot \exp\left(\frac{\delta_{(\text{int})} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) + \frac{k'_1 \cdot k'_2}{k'_{-2}} + k'_2 + k'_{-2} [Na^+]_{\text{ext}} \cdot \exp\left(-\frac{\delta_{(\text{ext})} \cdot F \cdot V_m}{RT}\right) \quad \text{Gl. A 15}$$

Nach Gl. A 15 steigt  $\tau^{-1}$  sowohl bei hyper- als auch bei depolarisierenden Potentialen an. Das ergibt sich aus der Annahme, dass der okkludierter Zustand von beiden Seiten der Membran zugänglich ist.

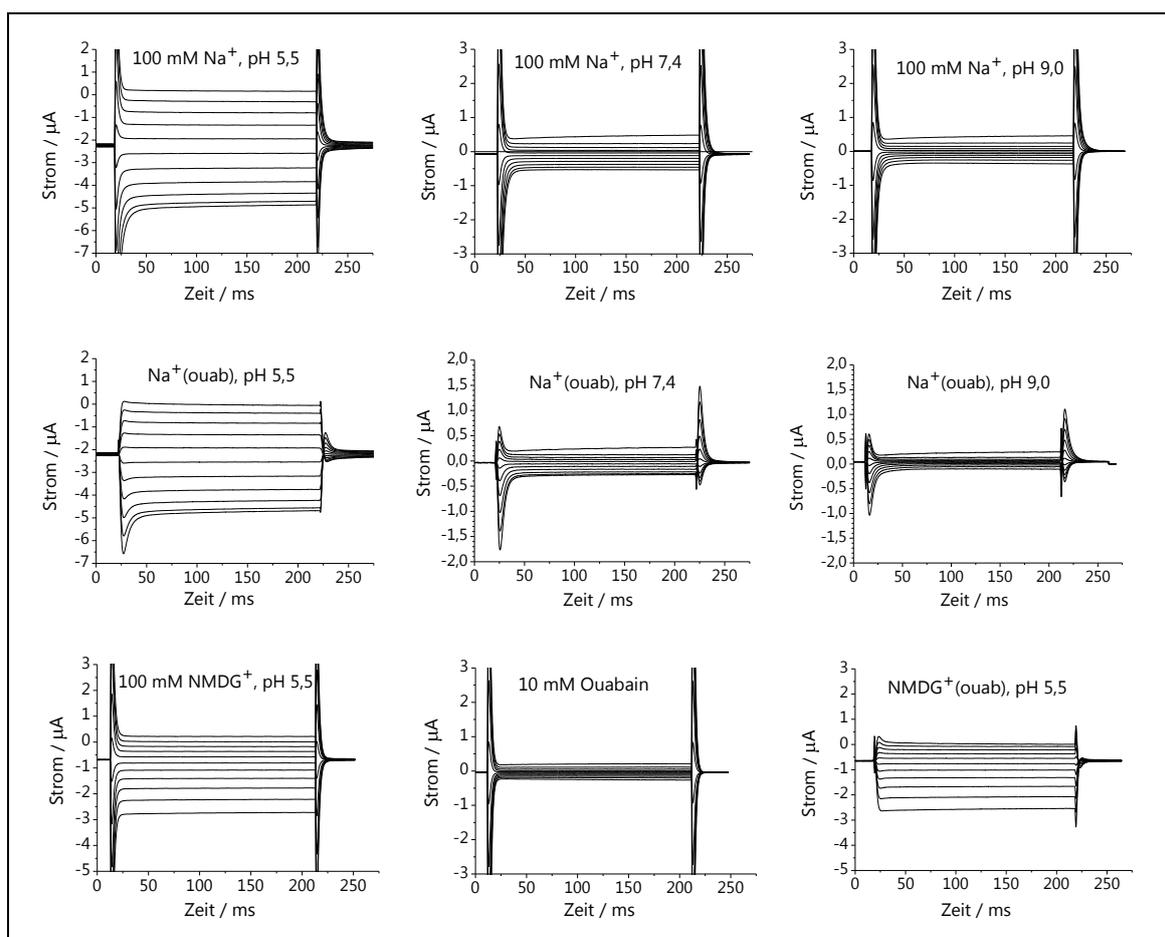
## A2 Strom-Zeit-Verläufe stationärer Ströme in kaliumfreien Lösungen

Im Folgenden sind die originalen Stromspuren der Ströme und die daraus gebildeten ouabainsensitiven Differenzströme der Konstrukte R937S und R937L unter kaliumfreien Bedingungen bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten abgebildet.



**Abb. A 1: Strom-Zeit-Verläufe stationärer Ströme in kaliumfreien Lösungen des Konstrukts R937L.**

Gezeigt sind die originalen Stromspuren der Ströme bei der Anwendung des Spannungssprung-Protokolls und die dazugehörigen ouabainsensitiven Differenzströme unter kaliumfreien Bedingungen bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten. Alle Stromantworten stammen von ein und derselben Zelle.



**Abb. A 2: Strom-Zeit-Verläufe stationärer Ströme in kaliumfreien Lösungen des Konstrukts R937S.** Gezeigt sind die originalen Stromspuren der Ströme bei der Anwendung des Spannungssprung-Protokolls und die dazugehörigen ouabainsensitiven Differenzströme unter kaliumfreien Bedingungen bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten. Alle Stromantworten stammen von ein und derselben Zelle.

### A3 Aminosäuresequenz des WT-Enzyms

Um die Nummerierung der Aminosäuren des hier genannten WT-Enzyms (humane  $\alpha_2$ -Untereinheit mit den Mutationen Q116R und N127D) mit den Isoformen verschiedener Organismen, wie sie in anderen Forschungsgruppen und Veröffentlichungen verwendet werden, vergleichen zu können, wurden die verschiedenen Aminosäuresequenzen abgeglichen. Dieser Abgleich ist mit der jeweiligen Nummerierung im Folgenden angegeben. Dabei wurden die ersten 50 Aminosäuren ausgespart, da diese Sequenzen weniger homolog (und unterschiedlich lang) sind und in dieser Arbeit keine Rolle spielen.

|                    |     |             |                     |            |            |             |
|--------------------|-----|-------------|---------------------|------------|------------|-------------|
| Mensch $\alpha_2$  | 51  | RKYQVDLSKG  | LTNQRAQDVL          | ARDGPNALTP | PPTTPEWVKF | CRQLFGGFSI  |
| Ratte $\alpha_1$   | 53  | RKYGTDLSRG  | LTPARAAEIL          | ARDGPNALTP | PPTTPEWVKF | CRQLFGGFSM  |
| Schwein $\alpha_1$ | 46  | RKYGTDLSRG  | LTPARAAEIL          | ARDGPNALTP | PPTTPEWVKF | CRQLFGGFSM  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 54  | RKFGTDMQRG  | LTTARAAEIL          | ARDGPNALTP | PPTTPEWVKF | CRQLFGGFSM  |
| Hai $\alpha_1$     | 53  | NKYGTDLTRG  | LTNARAKEIL          | ARDGPNALTP | PPTTPEWVKF | CRQLFGGFSI  |
| Mensch $\alpha_2$  | 101 | LLWIGAILCF  | LAYGI <b>R</b> AAME | DEPSNDDLYL | GVVLAADVIV | TGCFSYQEA   |
| Ratte $\alpha_1$   | 103 | LLWIGAILCF  | LAYGIRSATE          | EPPNDDLYL  | GVVLSAVVII | TGCFSYQEA   |
| Schwein $\alpha_1$ | 96  | LLWIGAILCF  | LAYGIQAATE          | EPPQNDNLYL | GVVLSAVVII | TGCFSYQEA   |
| Xenopus $\alpha_1$ | 104 | LLWIGAILCF  | LAYGIQAAME          | EPPQNDNLYL | GVVLSAVVII | TGCFSYQEA   |
| Hai $\alpha_1$     | 103 | LLWIGAILCF  | LAYGIQAATE          | DEPANDNLYL | GVVLSAVVII | TGCFSYQEA   |
| Mensch $\alpha_2$  | 151 | KSSKIMDSFK  | NMVPQQALVI          | REGEKMQINA | EEVVVGLDVE | VKGGDRVPAD  |
| Ratte $\alpha_1$   | 153 | KSSKIMESFK  | NMVPQQALVI          | RNGEKMSINA | EDVVVGLDVE | VKGGDRIPAD  |
| Schwein $\alpha_1$ | 146 | KSSKIMESFK  | NMVPQQALVI          | RNGEKMSINA | EEVVVGLDVE | VKGGDRIPAD  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 154 | KSSKIMESFK  | NMVPQQALVI          | RSGEKLSINA | EEVVLGLDVE | VKGGDRIPAD  |
| Hai $\alpha_1$     | 153 | KSSRIMDSFK  | NMVPQQALVI          | RDGEKSTINA | EFVVAGLDVE | VKGGDRIPAD  |
| Mensch $\alpha_2$  | 201 | LRIISSHGCK  | VDNSSLTGES          | EPQTRSPEFT | HENPLETRNI | CFSTNCVEG   |
| Ratte $\alpha_1$   | 203 | LRIISANGCK  | VDNSSLTGES          | EPQTRSPDFT | NENPLETRNI | AFSTNCVEG   |
| Schwein $\alpha_1$ | 196 | LRIISANGCK  | VDNSSLTGES          | EPQTRSPDFT | NENPLETRNI | AFSTNCVEG   |
| Xenopus $\alpha_1$ | 204 | LRVISSHGCK  | VDNSSLTGES          | EPQTRSPDFT | NENPLETRNI | AFSTNCVEG   |
| Hai $\alpha_1$     | 203 | LRIISAHGCK  | VDNSSLTGES          | EPQTRSPEFS | SENPLETRNI | AFSTNCVEG   |
| Mensch $\alpha_2$  | 251 | TARGIVIATG  | DRTVMGRIAT          | LASGLEVGRT | PIAMEIEHFI | QLITGVAVFL  |
| Ratte $\alpha_1$   | 253 | TARGIVVYTG  | DRTVMGRIAT          | LASGLEGGQT | PIAEEIEHFI | HLITGVAVFL  |
| Schwein $\alpha_1$ | 246 | TARGIVVYTG  | DRTVMGRIAT          | LASGLEGGQT | PIAAEIEHFI | HIITGVAVFL  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 254 | TARGIVVNTG  | DRTVMGRIAT          | LASGLDGGRT | PIAIEIEHFI | HIITGVAVFL  |
| Hai $\alpha_1$     | 253 | TARGVVVYTG  | DRTVMGRIAT          | LASGLEVGRT | PIAIEIEHFI | HIITGVAVFL  |
| Mensch $\alpha_2$  | 301 | GVSFFVLSLI  | LGYSWLEAVI          | FLIGIIVANV | PEGLLATVTV | CLTLTAKRMA  |
| Ratte $\alpha_1$   | 303 | GVSFFILSLI  | LEYTWLEAVI          | FLIGIIVANV | PEGLLATVTV | CLTLTAKRMA  |
| Schwein $\alpha_1$ | 296 | GVSFFILSLI  | LEYTWLEAVI          | FLIGIIVANV | PEGLLATVTV | CLTLTAKRMA  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 304 | GVSFFILSLI  | LQYTWLEAVI          | FLIGIIVANV | PEGLLATVTV | CLTLTAKRMA  |
| Hai $\alpha_1$     | 303 | GVSFFILSLI  | LGYSWLEAVI          | FLIGIIVANV | PEGLLATVTV | CLTLTAKRMA  |
| Mensch $\alpha_2$  | 351 | RKNCLVKNLE  | AVETLGSTST          | ICSDKTGTLT | QNRMTVAHMW | FDNQIHEADT  |
| Ratte $\alpha_1$   | 353 | RKNCLVKNLE  | AVETLGSTST          | ICSDKTGTLT | QNRMTVAHMW | FDNQIHEADT  |
| Schwein $\alpha_1$ | 346 | RKNCLVKNLE  | AVETLGSTST          | ICSDKTGTLT | QNRMTVAHMW | SDNQIHEADT  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 354 | RKNCLVKNLE  | AVETLGSTST          | ICSDKTGTLT | QNRMTVAHMW | FDNQIHEADT  |
| Hai $\alpha_1$     | 353 | RKNCLVKNLE  | AVETLGSTST          | ICSDKTGTLT | QNRMTVAHMW | FDNQIHEADT  |
| Mensch $\alpha_2$  | 401 | TEDQSGATFD  | KRSPTWTALS          | RIAGLCNRAV | FKAGQENISV | SKRDTAGDAS  |
| Ratte $\alpha_1$   | 403 | TENQSGVVSFD | KTSATWFALS          | RIAGLCNRAV | FQANQENLPI | LKRAVAGDAS  |
| Schwein $\alpha_1$ | 396 | TENQSGVVSFD | KTSATWLALS          | RIAGLCNRAV | FQANQENLPI | LKRAVAGDAS  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 404 | TENQSGASFD  | KSSPTWTALS          | RVAGLCNRAV | FQAGQENTPI | LKRDVAGDAS  |
| Hai $\alpha_1$     | 403 | TENQSGAAFD  | KTSATWSALS          | RIAALCNRAV | FQAGQDNVPI | LKRVSAGDAS  |
| Mensch $\alpha_2$  | 451 | ESALLKCIEL  | SCGSVRKMRD          | RNPKVAEIPF | NSTNKYQLSI | HEREDSPQS-  |
| Ratte $\alpha_1$   | 453 | ESALLKCIEV  | CCGSVMEMRE          | KYTKIVEIPF | NSTNKYQLSI | HKNPNASEPK  |
| Schwein $\alpha_1$ | 446 | ESALLKCIEL  | CCGSVKEMRE          | RYTKIVEIPF | NSTNKYQLSI | HKNPNASEPR  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 454 | ESALLKCIEL  | CCGSVRDMRE          | KNHKVAEIPF | NSTNKYQLSV | HKNANPSESER |
| Hai $\alpha_1$     | 453 | ESALLKCIEL  | CCGSVQGMRD          | RNPKIVEIPF | NSTNKYQLSI | HENEKSSER   |

|                    |      |             |             |             |            |             |
|--------------------|------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| Mensch $\alpha_2$  | 501  | HVLVMKGAPE  | RILDRCSSTIL | VQGKEIPLDK  | EMQDAFQNAV | MELGGLGERV  |
| Ratte $\alpha_1$   | 503  | HLLVMKGAPE  | RILDRCSSTIL | LHGKEQPLDE  | ELKDAFQNAV | LELGGGLGERV |
| Schwein $\alpha_1$ | 496  | HLLVMKGAPE  | RILDRCSSTIL | IHGKEQPLDE  | ELKDAFQNAV | LELGGGLGERV |
| Xenopus $\alpha_1$ | 504  | YILVMKGAPE  | RILDRCSSTII | LQGKEQPLDE  | ELKDAFQNAV | LELGGGLGERV |
| Hai $\alpha_1$     | 503  | YLLVMKGAPE  | RILDRCSSTIL | LNGAEPEPLKE | DMKEAFQNAV | LELGGGLGERV |
| Mensch $\alpha_2$  | 550  | LGFCQLNLPS  | GKFPRGFKFD  | TDELNFPTEK  | LCFVGLMSMI | DPPRAAVPDA  |
| Ratte $\alpha_1$   | 553  | LGFCHELLLPD | EQFPEGFQFD  | TDEVNFPVDN  | LCFVGLISMI | DPPRAAVPDA  |
| Schwein $\alpha_1$ | 546  | LGFCFLFLPD  | EQFPEGFQFD  | TDDVNFPLDN  | LCFVGLISMI | DPPRAAVPDA  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 554  | LGFCFLALPD  | DQFPDGFQFD  | TEEVNFPPTEN | LCFVGLISMI | DPPRAAVPDA  |
| Hai $\alpha_1$     | 553  | LGFCFHALPE  | DKYNEGYPFD  | ADEPNFPPTD  | LCFVGLMAMI | DPPRAAVPDA  |
| Mensch $\alpha_2$  | 600  | VGKCRSAGIK  | VIMVTGDHPI  | TAKAIAKGVG  | IISEGNETVE | DIAARLNIPM  |
| Ratte $\alpha_1$   | 603  | VGKCRSAGIK  | VIMVTGDHPI  | TAKAIAKGVG  | IISEGNETVE | DIAARLNIPV  |
| Schwein $\alpha_1$ | 596  | VGKCRSAGIK  | VIMVTGDHPI  | TAKAIAKGVG  | IISEGNETVE | DIAARLNIPV  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 604  | VGKCRSAGIK  | VIMVTGDHPI  | TAKAIAKGVG  | IISEGNETVE | DIAARLNIPV  |
| Hai $\alpha_1$     | 603  | VGKCRSAGIK  | VIMVTGDHPI  | TAKAIAKGVG  | IISEGNETIE | DIAARLNIPV  |
| Mensch $\alpha_2$  | 650  | SQVNPREAKA  | CVVHGSDLKD  | MTSEQLDEIL  | KNHTEIVFAR | TSPQQKLIIV  |
| Ratte $\alpha_1$   | 653  | NQVNPRDAKA  | CVVHGSDLKD  | MTSEELDDIL  | RYHTEIVFAR | TSPQQKLIIV  |
| Schwein $\alpha_1$ | 646  | SQVNPRDAKA  | CVVHGSDLKD  | MTSEQLDDIL  | KYHTEIVFAR | TSPQQKLIIV  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 654  | NQVNPRDAKA  | CVIHGTDLKD  | MTEEQIDDIL  | RHHTEIVFAR | TSPQQKLIIV  |
| Hai $\alpha_1$     | 653  | GQVNPRDAKA  | CVVHGSDLKD  | LSTEVLDDIL  | HYHTEIVFAR | TSPQQKLIIV  |
| Mensch $\alpha_2$  | 700  | EGCQRQGAIV  | AVTGDGVNDS  | PALKKADIGI  | AMGISGSDVS | KQAADMILLD  |
| Ratte $\alpha_1$   | 703  | EGCQRQGAIV  | AVTGDGVNDS  | PALKKADIGV  | AMGIVGSDVS | KQAADMILLD  |
| Schwein $\alpha_1$ | 696  | EGCQRQGAIV  | AVTGDGVNDS  | PASKKADIGV  | AMGIAGSDVS | KQAADMILLD  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 704  | EGCQRQGAIV  | AVTGDGVNDS  | PALKKADIGI  | AMGIAGSDVS | KQAADMILLD  |
| Hai $\alpha_1$     | 703  | EGCQRQGAIV  | AVTGDGVNDS  | PALKKADIGV  | AMGISGSDVS | KQAADMILLD  |
| Mensch $\alpha_2$  | 750  | DNFASIVTGV  | EEGRILFDNL  | KKSIAYTLTS  | NIPEITPFLI | FIIANIPLPL  |
| Ratte $\alpha_1$   | 753  | DNFASIVTGV  | EEGRILFDNL  | KKSIAYTLTS  | NIPEITPFLI | FIIANIPLPL  |
| Schwein $\alpha_1$ | 746  | DNFASIVTGV  | EEGRILFDNL  | KKSIAYTLTS  | NIPEITPFLI | FIIANIPLPL  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 754  | DNFASIVTGV  | EEGRILFDNL  | KKSIAYTLTS  | NIPEITPFLI | FIIANIPLPL  |
| Hai $\alpha_1$     | 753  | DNFASIVTGV  | EEGRILFDNL  | KKSIAYTLTS  | NIPEITPFLV | FIIGNVPLPL  |
| Mensch $\alpha_2$  | 800  | GTVTILCIDL  | GTDMPAISL   | AYEAAESDIM  | KRQPRNSQTD | KLVNERLISM  |
| Ratte $\alpha_1$   | 803  | GTVTILCIDL  | GTDMPAISL   | AYEQAESDIM  | KRQPRNPKT  | KLVNERLISM  |
| Schwein $\alpha_1$ | 796  | GTVTILCIDL  | GTDMPAISL   | AYEQAESDIM  | KRQPRNPKT  | KLVNEQLISM  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 804  | GTVTILCIDL  | GTDMPAISL   | AYEQAESDIM  | KRQPRNPKT  | KLVNERLISM  |
| Hai $\alpha_1$     | 803  | GTVTILCIDL  | GTDMPAISL   | AYEQAESDIM  | KRQPRNPKT  | KLVNERLISM  |
| Mensch $\alpha_2$  | 850  | AYGQIGMIQA  | LGGFFTYFVI  | LAENGFLPSR  | LLGIRLDWDD | RTMNDLEDSY  |
| Ratte $\alpha_1$   | 853  | AYGQIGMIQA  | LGGFFTYFVI  | LAENGFLPFH  | LLGIRETWDD | RWINDVEDSY  |
| Schwein $\alpha_1$ | 846  | AYGQIGMIQA  | LGGFFTYFVI  | LAENGFLPIH  | LLGLRVNWDD | RWINDVEDSY  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 854  | AYGQIGMIQA  | LGGFFTYFVI  | LAENGFLPWT  | LLGIRVNWDD | RWTNDVEDSY  |
| Hai $\alpha_1$     | 853  | AYGQIGMIQA  | LGGFFSYFVI  | LAENGFLPMD  | LIGKRVRWDD | RWISDVEDSF  |
| Mensch $\alpha_2$  | 900  | GQEWTYEQRK  | VVEFTCHTAF  | FASIVVVQWA  | DLICKTRRN  | SVFQQGMKNK  |
| Ratte $\alpha_1$   | 903  | GQQWTYEQRK  | IVEFTCHTAF  | FVSIVVVQWA  | DLVICKTRRN | SVFQQGMKNK  |
| Schwein $\alpha_1$ | 896  | GQQWTYEQRK  | IVEFTCHTAF  | FVTIVVVQWA  | DLVICKTRRN | SVFQQGMKNK  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 904  | GQQWTYEQRK  | IVEFTCHTSF  | FISIVVVQWA  | DLICKTRRN  | SVFQQGMKNK  |
| Hai $\alpha_1$     | 903  | GQQWTYEQRK  | IVEFTCHTSF  | FISIVVVQWA  | DLICKTRRN  | SIFQQGMKNK  |
| Mensch $\alpha_2$  | 950  | ILIFGLLEET  | ALAAFLSYCP  | GMGVALRMYP  | LKVTWWFCAF | PYSLLIFIYD  |
| Ratte $\alpha_1$   | 953  | ILIFGLFEET  | ALAAFLSYCP  | GMGAALRMYP  | LKPTWWFCAF | PYSLLIFVYD  |
| Schwein $\alpha_1$ | 946  | ILIFGLFEET  | ALAAFLSYCP  | GMGVALRMYP  | LKPTWWFCAF | PYSLLIFVYD  |
| Xenopus $\alpha_1$ | 954  | ILIFGLFEET  | ALAAFLSYCP  | GMDVALRMYP  | LKPTWWFCAF | PYSLLIFIYD  |
| Hai $\alpha_1$     | 953  | ILIFGLFEET  | ALAAFLSYCP  | GTDVALRMYP  | LKPSWWFCAF | PYSLLIFLYD  |
| Mensch $\alpha_2$  | 1000 | EVRKLILRRY  | PGGWVEKETY  | Y           |            |             |
| Ratte $\alpha_1$   | 1003 | EVRKLIIRRR  | PGGWVEKETY  | Y           |            |             |
| Schwein $\alpha_1$ | 996  | EVRKLIIRRR  | PGGWVEKETY  | Y           |            |             |
| Xenopus $\alpha_1$ | 1004 | EVRKLIIRRS  | PGGWVEKESY  | Y           |            |             |
| Hai $\alpha_1$     | 1003 | EMRRFIIRRS  | PGGWVEQETY  | Y           |            |             |



# Danksagung

Ich möchte meinen Dank zu allererst an Prof. Dr. Thomas Friedrich richten, der mein Promotionsvorhaben von Anfang an sehr wohlwollend und mit viel Vertrauen in meine wissenschaftliche Arbeit gefördert hat. Er war stets Ansprechpartner für viele komplexe Themen und hat mich in meinem Urteilsvermögen ernst genommen. Auch in schwierigen Zeiten hat er mich durchgängig unterstützt. Nicht zuletzt das spannende Thema und die zu Tage geförderten Ergebnisse, haben mich bis zuletzt bestärkt, am Ball zu bleiben.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Jan Koenderink, der diese Dissertation begutachtet hat. Prof. Koenderink war mir bereits aus einigen wichtigen Veröffentlichungen zur elektrophysiologischen Untersuchung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase bekannt. Umso mehr freue ich mich, dass er Interesse an meiner Arbeit zeigte.

Einen riesig großen Dank richte ich an die gesamte AG Friedrich mit allen Kollegen und ehemaligen Kollegen, die mich herzlich in ihren Kreis mit aufgenommen haben und auch mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch gab es einige lustige Stunden, die ich nicht missen will. Das Kollegenverhältnis war sehr angenehm und es wurde sich gegenseitig in jeder Hinsicht unterstützt, was für mich eine sehr positive Erfahrung war. Ein großes Dankeschön an: Matthias Broser, Katharina Dürr, Jan Geißendörfer, Kirstin Hobiger, Cornelia Junghans, Sabine Kussin, Jenny Langbein, Wienke Lange, Prof. Gernot Renger, Vijay Tejwani, Steffen Sarstedt, Franz-Josef Schmitt, Ina Seuffert, Neslihan Tavraz und Monika Weiß.

An dieser Stelle möchte ich meine Kollegin Kirstin, inzwischen selbst promoviert, gesondert herausheben. Mit Dir war es möglich sehr intensiv und konstruktiv über mein Projekt zu diskutieren. Dabei warst Du immer sehr kritisch und hast quasi „Das Beste“ aus mir herausgeholt. Aber auch für die anderen Lebenslagen warst Du mir immer eine große Hilfe. Dass ich diese Dissertation schreiben konnte, ist auch Dir in einem großen Maß zu verdanken. Ich bedanke mich also bei Dir, Kirstin, für den regen und intensiven Austausch in allen Bereichen; Du gehörst sicherlich zu den Menschen, die mich in den letzten Jahren sehr geprägt haben.

Auch unserem Elektrotechniker Lars Paasche gebührt ein großes Lob und Dank für seinen unermüdlichen Einsatz und seine fachliche Kompetenz. Ich danke Dir, Lars, auch dafür, dass Deine Tür immer offen stand.

Vielen Dank an die anderen Mitarbeiter des MVL für lustige Mittagessen, Weihnachtsfeiern und regen Austausch.

Die wichtigste Unterstützung in dieser ganzen Zeit bekam ich von meinem Ehemann Mathias. Danke für alles in den letzten Jahren. Mehr brauch ich Dir wohl nicht zu sagen.

Ich bedanke mich auch bei meinen Eltern für die ständige Unterstützung. Es ist schön zu wissen, dass Ihr immer stolz auf mich seid.

Dass ich diese Dissertation bewältigen konnte, verdanke ich noch einigen anderen, die ich nicht namentlich erwähnt habe, die aber trotzdem wichtig waren. Zu guter Letzt bedanke ich mich also bei allen, die mir eine Hilfe waren, mich bestärkt haben, in dieser Zeit für mich da waren oder mich auch einfach nur ertragen haben, als die Nerven blank lagen ☺.