# Charakterisierung Migräne-relevanter Mutationen anhand Struktur-Funktions-Untersuchungen der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Nedime Neslihan Tavraz
aus Mainz

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. Marga Lensen |
| Gutachter: | Prof. Dr. Thomas Friedrich |
| Gutachter: | Prof. Dr. Peter Hildebrandt |
| Gutachter: | Prof. Dr. Ernst Bamberg |

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17. Dezember 2010

Berlin 2010
D 83

„Forschung ist immer das Weiterforschen, wo andere aufgehört haben, das Weiterbauen auf Grundsteinen und Gerüsten, die andere vorbereitet haben, und damit allerdings leider zugleich auch mitunter das Weitergehen auf Irrwegen, die andere eingeschlagen haben."

Hubert S. Markl (*1938), dt. Biologe und Hochschullehrer, 1986-91 Präsident der DFG, 1996-2002 Präsident der Max-Planck-Gesellschaft

*Für Robert Schumann*

## Inhaltsverzeichnis

I

Abkürzungsverzeichnis III

Publikationen, Vorträge, Posterbeiträge V

**1 Einleitung** 01

**1.1 Die ATPasen-Superfamilie** 03

1.1.1 Die $Na^+/K^+$-ATPase: Untereinheiten und Isoformen 05

1.1.1.1 α-Untereinheit 05

1.1.1.2 β-Untereinheit 08

1.1.1.3 γ-Untereinheit 10

1.1.2 Weitere funktionell wichtige Bereiche der $Na^+/K^+$-ATPase 13

1.1.2.1 Inhibitoren der $Na^+/K^+$-ATPase und ihre Bindungsstellen 13

1.1.2.2 Kationen-Bindungsstellen 15

1.1.3 Aktiver Transport und katalytischer Zyklus 17

1.1.4 Elektrogenizität 18

**1.2 $Na^+/K^+$-ATPase-assoziierte Erkrankungen** 19

1.2.1 Die klassische Migräne 23

1.2.2 Pathophysiologie der Migräneaura 24

1.2.3 Cortical Spreading Depression 25

1.2.4 Familiäre Hemiplegische Migräne Typ 2, FHM-2 29

**1.3 Zielsetzung der Arbeit** 33

**2 Materialien & Methoden** 35

**2.1 Molekularbiologische Methoden und *Xenopus laevis*-Ooyzten-Präparation** 36

2.1.1 Herstellung der cDNA-Konstrukte 36

2.1.2 Partielle Ovarektomie und Oozytenbehandlung 36

2.1.3 cRNA-Synthese und -Injektion 38

**2.2 Proteinbiochemische und zellbiologische Methoden** 38

2.2.1 Isolierung von Plasmamembranfragmenten 38

2.2.2 Präparation der Totalmembranfraktion 39

2.2.3 HEK293FT-Zellen: Transfektion und Gewinnung von Ganzzell-Lysaten 39

2.2.4 SDS-Gel-Elektrophorese und Western Blots 39

**2.3 Transportmessungen der humanen $Na^+/K^+$-ATPase** 40

2.3.1 Vorbereitung der Oozyten 40

2.3.2 Rubidium-Transport-Messungen mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie 40

**2.4 Elektrophysiologische Messungen und Auswertung der Messdaten** 41

2.4.1 Verwendete Lösungen und Geräte 41

2.4.2 Spannungsprotokoll 42

2.4.3 Messung und Untersuchung der stationären und transienten Ströme 43

2.4.4 Bestimmung der Aktivierungsenergie $E_A$ 45

**3 Resultate** ---- 46
3.1 Kalium-induzierte Pumpströme ---- 48
3.2 Untersuchung der Rubidium-Aufnahme ---- 49
3.3 Expression der ATP1A2-Konstrukte in *Xenopus laevis*-Oozyten ---- 50
3.4 $[K^+]_{ext}$- und Spannungsabhängigkeit der $K^+$-induzierten Pumpströme ---- 51
3.5 Transiente Ströme: Kinetiken und Spannungsabhängigkeiten ---- 55
3.6 Wechselzahlen ---- 58
3.7 Proteinstabilität ---- 60

**4 Diskussion** ---- 64
4.1 Auswirkung auf die katalytische Aktivität und die Plasmamembran-Expression ---- 67
4.1.1 Elektrophysiologisch nicht charakterisierbare Konstrukte ---- 71
4.2 Vernetzung via R1-X1-H•••X2-R2 zwischen der Schleife L6/7, der P- & TM-Domäne ---- 74
4.2.1 Mutation in der Region des Gelenkstücks zwischen der P- und N-Domäne ---- 77
4.3 Temperaturabhängige Instabilität des $Na^+/K^+$-ATPase-Proteins ---- 78
4.4 Expansion des C-Terminus durch Mutation des Stopp-Codons TGA ---- 81
4.5 Zusammenhang zwischen Funktionsstörungen der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit und Migräne ---- 84

**5 Zusammenfassung** ---- 88

**6 Literaturverzeichnis** ---- 90

**7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis** ---- 114

**8 Danksagung** ---- 118

# Abkürzungen

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABC-ATPasen | ATP-bindende Kassette (enthaltene) ATPasen (*"ATP binding cassette"*) |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Ag | Silber |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATPase | ATP-hydrolysierendes Enzym |
| AS | Aminosäure |
| BFIC | benigne familiäre infantile Krampfanfälle (*"benign familial infantile convulsions")* |
| BFNC | benigne familiäre neonatale Krampfanfälle (*"benign familial neonatal convulsions"*) |
| BOLD | *"blood oxygen level dependency"* |
| bp | Basenpaar |
| °C | Grad Celsius |
| $CaCl_2$ | Calciumchlorid |
| CADASIL | (*"Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy"*) |
| Cd | Cadmium |
| Cl | Chlorid |
| CFTR | "*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator"* |
| cRNA | komplementäre Ribonukleinsäure ("*complementary ribonucleic acid*") |
| CSD | kortikale Streudepolarisierung (*"cortical spreading depression")* |
| Cu | Kupfer |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure ("*desoxyribonucleic acid*") |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| EA-2 | episodische Ataxie Typ 2 |
| ENaC | epithelialer Natriumkanal |
| et al. | "und andere" ("e*t alii*") |
| F | Faraday-Konstante ($9{,}64853 \cdot 10^4$ C•mol$^{-1}$) |
| FHM | Familiäre Hemiplegische Migräne |
| fMRT, fMRI | funktionelle Magnetresonanztomographie ("*functional magnetic resonance imaging*") |
| g | Gramm |
| GLAST | Glutamat-Transporter in Astrozyten ("*glutamate aspartate transporter*") |
| HbA | Homogenisierungspuffer A (*homogenisation buffer A*) |
| HEPES | N-2-Hydroxethylpiperazin-N-Ethansulfonsäure |
| I | Strom |
| K | Kalium |
| kb | Kilo-Basenpaare |
| $K_{0.5}$ | Konzentration der halbmaximalen Aktivität |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| l bzw. L | Liter |
| M | Molar |
| MA | Migräne mit Aura |
| MBS | Modified Barth Solution |
| MBSS | MES-gepufferte Salzlösung |
| MES | 2(-N-Morpholino)-Ethansulfonsäure |
| mg | Milligramm |
| Mg | Magnesium |
| $MgCl_2$ | Magnesiumchlorid |

| | |
|---|---|
| min | Minuten |
| mM | Millimolar |
| ml | Milliliter |
| MOPS | 3(-N-Morpholino)-propansulfonsäure |
| MRS | Magnet Resonanz Spektroskopie (*"magnetic resonance spectroscopy"*) |
| n | nano |
| Na | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NCX | Natrium-Kalzium-Austauscher (*"sodium calcium exchanger"*) |
| NMDA-Rezeptoren | Glutamat-Rezeptor ("*N-methyl-D-aspartate receptor*") |
| NMR | Kernspinresonanzspektroskopie (*"nuclear nagnetic resonance")* |
| ORI | Oozyten-Ringerlösung |
| p | pico |
| PAGE | Polyacrylamidgel-Elektrophorese |
| Pb | Blei |
| PBST | Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween 20 |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PLB | Post-Ladelösung (*"post loading buffer"*) |
| PMCA | Plasmamembran Kalzium-ATPase |
| PS | Phosphatidylserin |
| R | molare Gaskonstante (8,314472 J $mol^{-1}$ $K^{-1}$) |
| rCBF | regionaler zerebraler Blutfluss ("*regional cerebral blood flow"*) |
| RNA | Ribonukleinsäure ("*ribonucleic acid*") |
| Rb | Rubidium |
| RDP | "*Rapid-Onset Dystonia-Parkinsonism*" |
| Q | Ladung |
| s | Sekunde |
| SCA-6 | Spinozerebelläre Ataxie Typ 6 (*"spinocerebral ataxie type 6"*) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat ("*sodium dodecyl sulfate*") |
| SERCA | Kalzium-ATPase im Sarkoplasmatischem Retikulum |
| sf9 | Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen von *Spodoptera frugiperda* |
| SHM | Sporadische Hemiplegische Migräne |
| T | Temperatur |
| TEMED | N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin |
| TEVC | Zwei-Elekroden-Spannungsklemme (*"two electrode voltage clamp"*) |
| TM | Transmembran |
| TRIS | Tris(-hydroxylmethyl-)aminomethan |
| V | Volt, Einheit für Spannung |
| $V_{0.5}$ | Spannung des halbmaximalen Ladungswertes |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation (*"world health organization"*) |
| WT | Wildtyp |
| xg | x 9,81 $m/s^2$ |
| Q | Ladung |
| Zn | Zink |
| | |
| µ | mikro |
| Ω | Ohm |

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

## Publikationen

Diese Arbeit ist teilweise in folgenden Publikationen bereits veröffentlicht worden:

* **TAVRAZ, N. N.**, FRIEDRICH, T., DÜRR, K. L., KOENDERINK, J. B., BAMBERG, E., FREILINGER, T., DICHGANS, M. (2008) "Diverse functional consequences of mutations in the $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-subunit causing familial hemiplegic migraine type 2."
  *J. Biol. Chem.* **283**, 31097-31106

* **TAVRAZ, N. N.**, DÜRR, K. L., KOENDERINK, J. B., 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**, 82-87

## Vorträge

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen/Konferenzen vorgetragen:

* Göttinger Transporttage, 03. Dezember 2005, Universität Göttingen, Göttingen, Deutschland
  [von Prof. Dr. Thomas Friedrich]

* 12th International ATPase Conference, 05.-10. August 2008, Universität Århus, Århus, Dänemark
  [von Prof. Dr. Thomas Friedrich]

* 18th Annual Computational Neuroscience Meeting CNS*2009, Workshop vom 22.-23. Juli 2009, Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften, Berlin
  [von Prof. Dr. Thomas Friedrich]

## Poster

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Tagungen/Konferenzen präsentiert:

* 11th International ATPase Conference and 59th Annual Meeting and Symposium of the Society of General Physiologists, 06. - 11. September 2005, Woods Hole, Massachusetts, (USA)

* Joint Meeting of The German Society of Physiology and The Federation of European Physiological Societies, 26. - 29. März 2006, München, Deutschland

* 12th International ATPase Conference, 05. - 10. August 2008, Universität Århus, Århus, Dänemark

## Weitere Publikationen

1. DÜRR, K. L., **TAVRAZ, N. N.**, ZIMMERMANN, D., BAMBERG, E., and FRIEDRICH, T. (2008)

   "Characterization of Na,K-ATPase and H,K-ATPase enzymes with glycosylation-deficient β-subunit variants by voltage-clamp fluorometry in *Xenopus* oocytes."

   *Biochemistry* 47, 4288-4297

2. DÜRR, K. L., **TAVRAZ, N. N.**, DEMPSKI, R. E., BAMBERG, E., and FRIEDRICH, T. (2009)

   "Functional significance of $E_2$ state stabilization by specific α/β-subunit interactions of Na,K- and H,K-ATPase."

   *J. Biol. Chem.* 284, 3842-3854

3. DÜRR, K. L., ABE, K., **TAVRAZ, N. N.**, and FRIEDRICH, T. (2009)

   „$E_2$P-state stabilization by the N-terminal tail of the H,K-ATPase β-subunit is critical for efficient proton pumping under *in vivo* conditions."

   *J. Biol. Chem.* 284, 20147-20154

4. MEIER, S., **TAVRAZ, N. N.**, DÜRR, K. L., and FRIEDRICH, T. (2010)

   „Hyperpolarization-activated inward $Na^+$ leakage currents caused by deletion or mutation of carboxy-terminal tyrosines of the $Na^+/K^+$-ATPase α-subunit."

   *J. Gen. Physiol*. 135, 115-134

# *Einleitung*

# 1 Einleitung

Noch bevor die DNA als „Nuclein“ in Zellkernen von Lymphoyzten entdeckt [MIESCHER, 1871] und viel später auch ihre molekulare Struktur aufgeklärt wurde [WATSON und CRICK, 1953], war die Existenz von Enzymen bekannt [PAYEN und PERSOZ, 1833]. Der Begriff Enzym stammt ursprünglich aus dem Lateinischen (*fermentum*), steht für „Ferment“ und bedeutet „Gärungsmittel“ oder „Sauerteig“. Erst im Jahre 1878 erhielt die heute in der Wissenschaft gebräuchliche Bezeichnung „Enzym“ seinen eigentlichen Namen [KÜHNE, 1878]. Dieses Wort entstammt dem Griechischen (ένζυμον, ’enzymon’) von en (έν) ’in’ und zýmē (ζύμη), dem ebenfalls die Bedeutung „Sauerteig“ zugewiesen wird.

Zu einem der bekanntesten Lehrbuch-Enzyme gehört die $Na^+/K^+$-ATPase. Sie wurde 1957 vom dänischen Mediziner Jens Christian Skou entdeckt [SKOU, 1957], wofür er im Jahre 1997 gemeinsam mit John Ernest Walker und Paul Delos Boyer den Nobelpreis für Chemie erhielt. Die $Na^+/K^+$-ATPase bzw. die $Na^+/K^+$-Pumpe, wie sie teilweise auch bezeichnet wird, ist für den Aufbau und die Aufrechterhaltung des Konzentrationsunterschieds der Ionen Natrium und Kalium zwischen dem Zytoplasma und dem extrazellulären Raum verantwortlich. Im Inneren der Zelle liegt eine Natriumkonzentration ($[Na^+]$) von etwa 10-20 mM vor, während sie im Außenmedium eine $[Na^+]$ von ca. 120 mM aufweist. Im Falle des Kaliums verhält sich die Konzentrationsverteilung genau umgekehrt, hier herrscht im zytoplasmatischen Raum eine hohe $[K^+]$ von ca. 130 mM und eine niedrige extrazelluläre $[K^+]$ von lediglich etwa 5-10 mM. Dies bewerkstelligt das Enzym unter ATP-Hydrolyse und katalysiert pro ATP-Molekül den Transport von zwei Kalium-Ionen ins Zellinnere und drei Natrium-Ionen aus der Zelle heraus (siehe Abbildung 1.1) [POST und JOLLY, 1957, GARRAHAN und GLYNN, 1967].

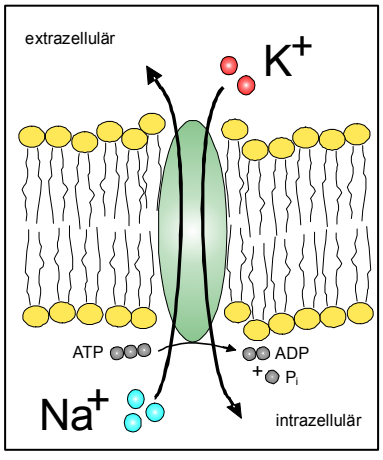



Abbildung 1.1

In die Plasmamembran integrierte $Na^+/K^+$-ATPase. Die beiden Prozesse ATP-Spaltung und Ionentransport sind bei ATPasen strikt gekoppelt und finden unter physiologischen Bedingungen gegen den elektrochemischen Gradienten statt.

## 1.1 Die ATPasen-Superfamilie

ATPasen kommen sowohl in Membranen von Pro- als auch Eukaryoten vor und haben die gemeinsame Eigenschaft, dass sie die Hydrolyse von ATP in ADP katalysieren und die dabei frei werdende Energie für den Transport von Ionen nutzen. Sie lassen sich in membrangebundene und nicht-membrangebundene ATPasen einteilen. Membran-assoziierte Transport-ATPasen werden kategorisiert in F-, P-, V- und ABC-ATPasen [PEDERSEN und CARAFOLI, 1987, PEDERSEN 2002, 2005].

**ABC-ATPasen** sind eher unter der Bezeichnung ABC-Transporter bekannt [HIGGINS, 2001, DAVIDSON und CHEN, 2004, DEAN und ANNILO, 2005, HOLLENSTEIN, et al., 2007]. Die Namensgebung ist darauf zurückzuführen, dass sie alle eine ATP-bindende Kassette (*ATP Binding Cassette*) besitzen. Neben der ATPase-Untereinheit gibt es noch die Permease-Domäne, die für Substrat-Spezifität und -Transport verantwortlich ist. Die ABC-Transporter repräsentieren die größte Familie der ATPasen, da sie in fast allen Organismen zu finden sind. Allein im menschlichen Organismus existieren etwa 50 ABC-Transporter [GOTTESMAN und AMBUDKAR, 2001, AMBUDKAR et al., 2003, DEAN und ANNILO, 2005]. Zu den bekanntesten ABC-ATPasen gehören der MDR1-Transporter (*Multi Drug Resistent Transporter*) und der Chloridkanal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Häufig führen Mutationen in ABC-Transportern zu erblichen Erkrankungen, wie z. B. Adrenoleukodystrophie (ABCD-Transporter, Substrat: relativ langkettige Fettsäuren) [BLAW, 1970, GRIFFIN et al., 1977, MIGEON et al., 1981, MOSSER et al., 1993, BEZMAN et al., 2001], Mukoviszidose auch genannt Zystische Fibrose (CFTR, Substrat: Chlorid) [FARBER, 1945, KEREM et al., 1989, BEAR et al., 1992, NAGEL et al., 1992] und Lipoproteinämie, die Tangier-Krankheit (ABCA 1-Transporter, Substrat: Cholesterol) [FREDRICKSON et al., 1961, REMALEY et al., 1999, BROOKS et al., 1999, ZARUBICA et al., 2007].

Dem **F-Typ** zugehörige ATPasen sind vertreten in prokaryotischen Plasmamembranen, eukaryotischen Mitochondrienmembranen und in Thylakoidmembranen von Chloroplasten. Sie bestehen aus zwei funktionell verschiedenen Komponenten, die jeweils aus mehreren unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut sind, dem katalytischen Kopfteil $F_1$ und dem Protonen-transportierenden $F_o$-Komplex. Hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion sind F-Typ-ATPasen eigentlich ATP-Synthasen, weil sie nicht (wie die ATPasen im engeren Sinne) ATP hydrolysieren, sondern ATP synthetisieren.

Der Name **V-Typ-ATPase** geht auf die Besonderheit zurück, dass diese Enzyme in Vakuolen und in Vesikeln der Endo- und Exozytose zu finden sind. Sie kommen aber auch in Endo- und Lysosomen sowie im Golgi-Apparat vor. Aufgebaut sind sie teilweise aus mehr als 20 Untereinheiten [XU et al., 2007] und weisen eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu den F-Typ-ATPasen auf, da sich ihr $V_1$-Komplex wie der $F_1$-Komplex der F-Typ-ATPase auf der zytosolischen Membranseite befindet und der $V_o$-Teil kanalartig die Membran durchzieht, wie es auch bei dem $F_o$-Teil der F-Typ-ATPase der Fall ist.

Enzyme, die während des Transportzyklus ein phosphoryliertes Zwischenprodukt bilden, werden der Familie der **P-Typ-ATPasen** zugeordnet [PEDERSEN und CARAFOLI, 1987]. Im Laufe der ATP-Hydrolyse wird das terminale Phosphat (das γ-Phosphat) des ATPs an einen Aspartatrest der katalytischen Untereinheit übertragen [POST und KUME, 1973]. Dieses Aspartat befindet sich innerhalb des für P-Typ-ATPasen charakteristischen Motivs **D**KTGTLT (Abbildung 1.2), wobei die letzten drei Aminosäuren eine Variabilität aufweisen [JØRGENSEN und ANDERSEN, 1988]. Neben diesem Motiv gibt es noch zwei weitere ebenfalls hochkonservierte Bereiche: das TGES-Motiv (vor der DKTG-Sequenz) [MØLLER et al., 1996] und das GDGXNDXP-Motiv (kurz hinter der DKTG-Sequenz). Das TGES-Motiv ist an der hydrolytischen Abspaltung des Phosphatrestes beteiligt und greift während der Phosphorylierung die Phosphatgruppe an [CLAUSEN et al., 2004, MØLLER et al., 2005]. Eine Vermutung ist, dass Kalium die Wechselwirkung der Aktuator- (A) und Phosphorylierungs-Domäne (P) beschleunigt und auf diese Weise die von der A-Domäne katalysierte Abspaltung des in der P-Domäne vorhandenen $P_i$ begünstigt [PEDERSEN et al., 2006]. Die Domänen werden unter 1.1.1.1 näher beschrieben (siehe auch Abb. 1.3).

Abhängig von der Substratspezifität unterscheidet man fünf Gruppen innerhalb der P-Typ-Superfamilie, nämlich Typ I-V (Tabelle 1.1) [SACHS und MUNSON, 1991, FAGAN und SAIER, 1994, LUTSENKO und KAPLAN, 1995, PALMGREN und AXELSEN, 1998, AXELSEN und PALMGREN, 1998, KÜHLBRANDT, 2004]. Die bislang am besten charakterisierten P-Typ-ATPasen sind zwei aus der Gruppe des $P_{II}$-Typs: die $Ca^{2+}$-ATPase [HASSELBACH und MAKINOSE, 1961, EBASHI und LIPMANN, 1962, HASSELBACH, 1979, SCOFANO und de MEIS, 1981, HASSELBACH und OETLIKER, 1983, TANFORD, 1984, INESI, 1985, ANDERSEN, 1989, SCHATZMANN, 1989, JENCKS, 1989, INESI et al., 1990, TOYOSHIMA und INESI, 2004, TOYOSHIMA, 2007] und die $Na^+/K^+$-ATPase [SKOU, 1975, ROBINSON und FLASHNER, 1979, CANTLEY, 1981, SCHUURMANNS-STEKHOVEN und BONTING, 1981, JØRGENSEN, 1982, GLYNN, 1985, JØRGENSEN und ANDERSEN, 1988, SKOU, 1988, ANDERSEN und VILSEN, 1995, MORTH et al., 2007]. $Ca^{2+}$-ATPasen werden nach ihrer zellulären Lokalisation in die Subtypen SERCA (im Sarkoendoplasmatischen Retikulum, *SarcoEndoplasmatic Reticulum $Ca^{2+}$-ATPase*) und PMCA (in der Plasmamembran, *Plasma Membrane $Ca^{2+}$-ATPase*) unterschieden. Die SERCA zählt zu den $P_{IIA}$-Typ-ATPasen [LEE, 2002, STOKES und GREEN, 2003], während die Plasmamembran-gebundene $Ca^{2+}$-ATPase dem $P_{IIB}$-Typ zugeordnet wird.

Die meisten P-Typ-ATPasen sind als Monomere aus einer einzigen Untereinheit aufgebaut. Zu den Ausnahmen gehört die bakterielle Kdp-ATPase des $P_{IA}$-Typs [HESSE et al., 1984, BUURMAN et al., 1995, ALTENDORF et al., 1998], die aus vier verschiedenen Einheiten aufgebaut ist (A, B, C und F), mit der KdpB-Untereinheit als katalytische Komponente [ALTENDORF et al., 1998]. Weiterhin gehören die $Na^+/K^+$- und die $H^+/K^+$-ATPase ($Typ_{IIC}$) mit ihren katalytischen alpha- (α) und akzessorischen beta- (β) Untereinheiten zu den oligomeren Ionenpumpen, wobei im Falle der $Na^+/K^+$-ATPase gewebsspezifisch eine weitere Untereinheit, die gamma- (γ) im funktionellen Komplex vorhanden sein kann. Einige Phospholipid-transportierenden $P_{IV}$-ATPasen [TANG et al., 1996, KÜHLBRANDT, 2004, LENOIR et al., 2007,]

besitzen ebenfalls mehr als eine Untereinheit. Neben der α- gibt es eine zweite Untereinheit, die einer Kombination der β- und γ-Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPasen ähnelt [POULSEN et al., 2008].

| ATPase Typ | Trivial-Name | Vorkommen | Anzahl TM | Anzahl UE | Transportiertes Kation/Substrat |
|---|---|---|---|---|---|
| Typ I A | Kdp-ATPase | Prokaryoten | 6 | 4 | $K^+$ |
| Typ I B | CopA, ZntA, CadA | Pro- & Eukaryoten | 8 | 1 | $Cu^+$, $Ag^+$, $Zn^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Pb^{2+}$ |
| Typ II A | SERCA | Pro- & Eukaryoten; SR | 10 | 1 | $Ca^+$ |
| Typ II B | PMCA | Pro- & Eukaryotren; PM | 10 | 1 | $Ca^+$ |
| Typ II C | $Na^+/K^+$- & $H^+/K^+$-ATPase | Pro- & Eukaryoten | 10 | 2 bzw. 3 | $Na^+/K^+$, $H^+/K^+$ |
| Typ II D | $Na^+$- & $Ca^+$-ATPase | Eukaryoten | 10 | 1 | $Na^+$, $Ca^+$ |
| Typ III A | $H^+$-ATPase | Pflanzen, Pilze; PM | 10 | 1 | $H^+$ |
| Typ III B | $Mg^{2+}$-ATPasen | Prokaryoten | 10 | 1 | $Mg^{2+}$ |
| Typ IV | Lipid-Flippasen | Eukaryoten | 10 | 2 | Phospholipide (PC, PE, PS) |
| Typ V A | | Eukaryoten; ER, *cis*-Golgi | 10 | 1 | ohne Zuordnung |
| Typ V B | | Eukaryoten; Lysosom | 10 | 1 | ohne Zuordnung |

Tabelle 1.1

Übersicht über die P-Typ-ATPasen (PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin, PS = Phosphatidylserin).

## 1.1.1 Die $Na^+/K^+$-ATPase: Untereinheiten und Isoformen

Die kleinste funktionelle Einheit, aus der die oligomere $Na^+/K^+$-ATPase (und auch die $H^+/K^+$-ATPase) aufgebaut ist, besteht aus einer α- und einer β-Untereinheit [JØRGENSEN et al., 1988, BLANCO und MERCER, 1998]. Im Jahre 1978 entdeckten Forbush und Kollegen eine weitere Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase, die sogenannte γ-Untereinheit [FORBUSH et al., 1978].

### 1.1.1.1 α-Untereinheit

Insgesamt sind vier Isoformen der α-Untereinheit bekannt, welche mit $\alpha_1$-$\alpha_4$ bezeichnet werden. Alle α-Isoformen haben ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa und bestehen aus etwas mehr als 1000 Aminosäuren (AS). Die Sequenzidentität liegt bei ~85 % und variiert selbst innerhalb einer Spezies, insbesondere in der Anzahl der Aminosäuren, wie beispielsweise an den α-Isoformen der Ratte veranschaulicht werden kann: Hier ist die $\alpha_1$-Isoform aus 1024 AS, die $\alpha_2$-Isoform aus 1021 AS, die $\alpha_3$- als kürzeste Isoform aus 1014 AS, und die $\alpha_4$-Isoform als längste aus 1028 AS aufgebaut [SCHNEIDER et al., 1985, SHULL et al., 1986, HERRERA et al., 1987]. Neben der unterschiedlichen Aminosäureanzahl ist zudem die Anwesenheit von verschiedenartigen regulatorischen Proteinen, die je nach Gewebe und Organismus variieren (sogenannte FXYD-Proteine, siehe auch "γ-Untereinheit") und deren unterschiedliche Interaktionen an der zytoplasmatischen Seite [CORNELIUS et al., 2005] für die Feinregulierung funktioneller Parameter verantwortlich.

Ein weiterer gravierender Unterschied der vier α-Isoformen liegt in ihrem Vorkommen in verschiedenen Gewebearten [SHULL et al., 1986, SWEADNER, 1989, LINGREL et al., 1990, SHAMRAJ und LINGREL, 1994]. Während die $\alpha_1$-Isoform ubiquitär ist und in fast allen Geweben vorliegt, werden die anderen Isoformen zell- und gewebsspezifischer exprimiert. Die $\alpha_2$-Isoform wird bevorzugt im Herzen und im Gehirn (insbesondere in Gliazellen) exprimiert, die $\alpha_3$-Isoform ist in größeren Mengen in neuronalem Gewebe lokalisiert und die $\alpha_4$-Isoform ist ausschließlich in testinalem Gewebe vorzufinden [BLANCO et al., 1999, WOO et al., 2000].

Bei allen α-Isoformen befinden sich die **C-** (*carboxyl, C00H*) und **N-** (*amino, $NH_2$*) **Termini** auf der zytosolischen Seite (Abbildung 1.2). In der **M-Domäne** (*membrane domain*), dem transmembranären Bereich, sind zehn helikale Transmembrandomänen (TM1-TM10) integriert.

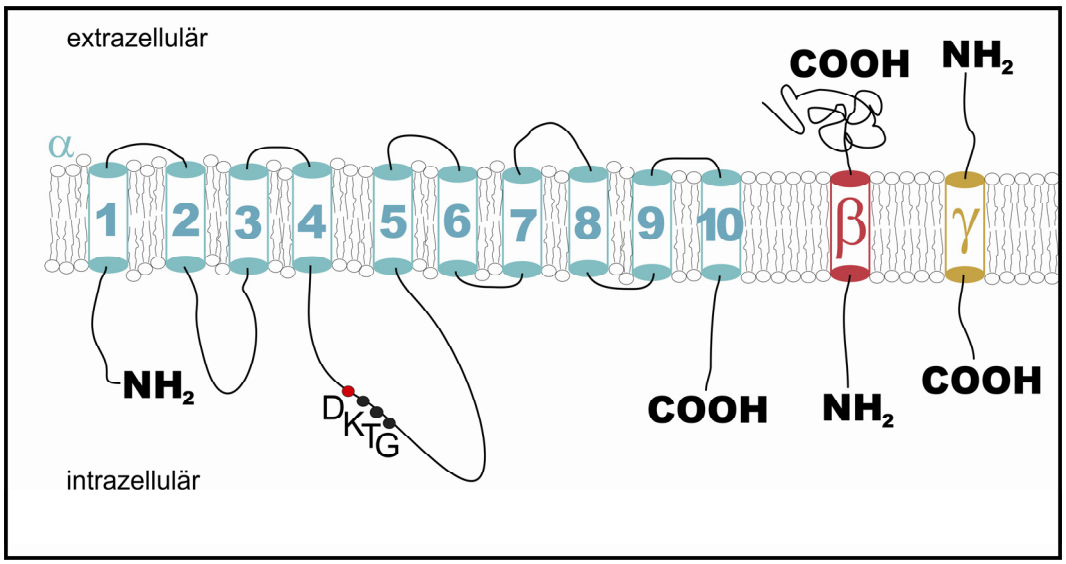



Abbildung 1.2 Topologische Anordnung der drei Untereinheiten (α, β, γ) der $Na^+/K^+$-ATPase.

Von den fünf extrazellulären und vier intrazellulären Schleifen wird der großen intrazellulären Schleife zwischen dem vierten und fünften Segment (M4/M5) eine bedeutende Rolle zugeschrieben. In diesem Bereich befindet sich das für P-Typ-ATPasen charakteristische DKTG-Motiv mit dem hochkonservierten Aspartat - im Falle der humanen $\alpha_2$-Untereinheit an Position 374 (Asp374 bzw. D374) - das reversibel phosphoryliert wird und daher maßgeblich an der Namensgebung der **P-Domäne** (*phosphorylation domain*) beteiligt ist. Die **N-Domäne** (*nucleotide binding domain*) enthält die bindende Struktur für das Adenosin-Triphosphat-Molekül (ATP) - das Rossmann-Motiv [KÜHLBRANDT, 2004]. Durch die Bindung des ATP-Moleküls wird eine beachtliche Konformationsänderung der Bindungstasche und der Aminosäurereste im „Gelenkstück" (*hinge region*), das die N- und P-Domänen miteinander verbindet, bewerkstelligt [HILGE et al., 2003]. Bereits seit über 30 Jahren ist bekannt, dass P-Typ-ATPasen während des katalytischen Zyklus' umfangreiche Konformationsänderungen durchführen [JØRGENSEN, 1975]. Es werden dabei zwei prinzipielle Konformationszustände $E_1$ und $E_2$ unterschieden, welche sich

durch jeweils eigene Affinitäten für Nukleotide und transportierte Ionen auszeichnen. Detaillierte Ausführungen zum Pumpzyklus und den darin involvierten Intermediärzuständen sind unter „Aktiver Transport und katalytischer Zyklus“ (Kapitel 1.1.3) nachzulesen.

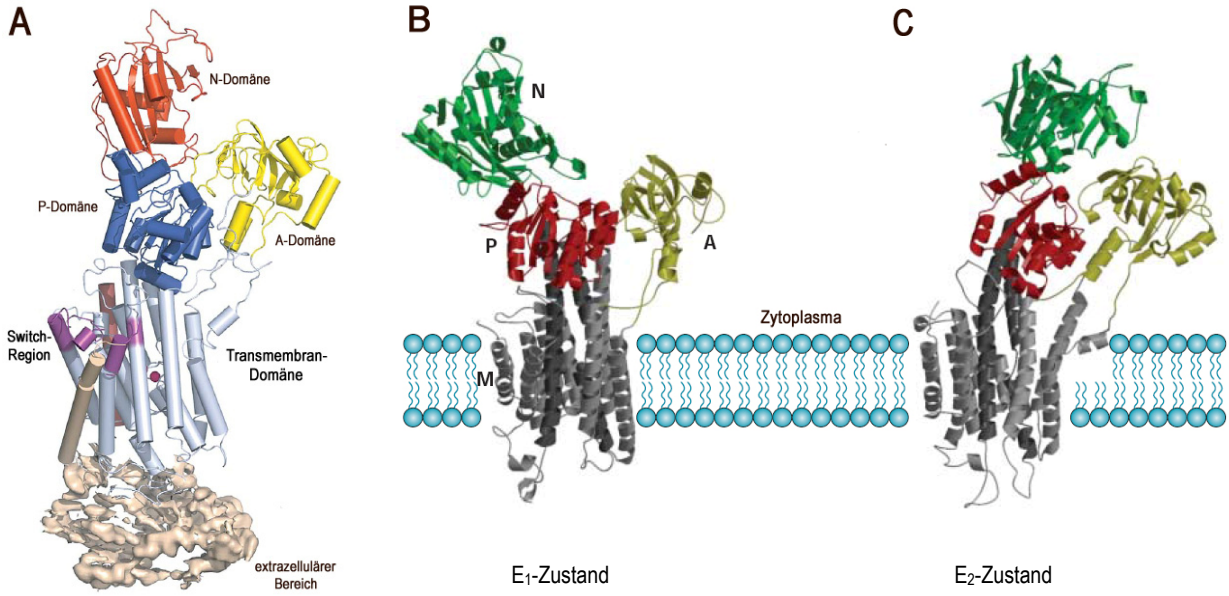



Abbildung 1.3

P-Typ-ATPase-Struktur. (A) $Na^+/K^+$-ATPase ist farblich in ihre eindeutig definierten Domänen unterteilt: A- (gelb), N- (rot), P- (blau), TM-Domäne (grau) und die Switch-Region (violett) [basierend auf MORTH et al., 2009]. (B) und (C) $Ca^{2+}$-ATPase (SERCA) in den beiden Prinzipalkonformationen $E_1$ (B) und $E_2$ (C) [basierend auf KÜHLBRANDT, 2004].

Die **A-Domäne** (*actuator domain*) ist die kleinste zytoplasmatische Domäne der α-Untereinheit. Sie enthält neben dem bereits erwähnten TGES-Motiv den stark hydrophilen N-terminalen Bereich und die Schleife zwischen dem M2- und M3-Segment. Der **N-Terminus** bildet zusammen mit der M2-M3-Schleife eine regulatorische Einheit, die mit der M4-M5-Schleife interagiert [SEGALL et al., 2002]. Am N-Terminus ist eine bedeutsame Sequenzabweichung festzustellen [DALY et al., 1994]. Interessanterweise ist die Sequenz im N-Terminus der $Na^+/K^+$-ATPase um ca. 35 AS länger als in der AS-Sequenz der $Ca^{2+}$-ATPase; die $H^+/K^+$-ATPase enthält in diesem zytosolischen Bereich sogar 10-20 weitere Aminosäuren. Trunkationen des Lysin-reichen N-Terminus führen zu veränderten ATPase-Eigenschaften, da dieser Bereich möglicherweise die Zugänglichkeit der Kationen-Bindungsstellen reguliert (ohne direkt die Ionenbindung zu beeinflussen). Zu den Auswirkungen N-terminaler Trunkationen gehören veränderte $K^+$-Affinitäten an der extrazellulären Seite [VASILETS et al., 1993] und erhöhte $K^+$-Deokklusionsraten (*occlusion*, okkludieren = vom Protein eingeschlossen werden) [WIERBICKI und BLOSTEIN, 1993]. Die Verkürzung wirkt sich nicht nur auf die $K^+$-Eigenschaften aus, sondern betrifft auch die ATP- und Natrium-Bindungseigenschaften [ISHII et al., 1994]. Mit Hilfe zahlreicher Untersuchungen konnten einzelne Aminosäuren im N-Terminus identifiziert werden, die einen

gravierenden Einfluss auf die Enzymfunktion haben [VASILETS et al, 1991, DALY et al., 1994, DALY, et al., 1996, BOXENBAUM, 1998]. Eine weitere Rolle, welche dem N-Terminus der $Na^+/K^+$-ATPase zugeschrieben wird, ist die eines Signaltranducers, die durch die Interaktion mit dem N-Terminus des Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptors ($InsP_3R$) zustande kommt [ZHANG et al., 2006]. Dieser Rezeptor besitzt eine Vielzahl an Funktionen, welche die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und die Apoptose beeinflussen [FURUICHI und MIKOSHIBA, 1995, BOEHNING et al., 2003]. Letzteres wird über die $Ca^{2+}$-Regulation bewerkstelligt, auf die sich die Interaktion der beiden N-Termini auswirkt [LI et al., 2006].

Bisher gibt es nur wenige Studien darüber, inwieweit sich die verschiedenen α-Isoformen in ihren Eigenschaften voneinander unterscheiden. Die Experimente konzentrieren sich hauptsächlich auf die apparenten Affinitäten für Kalium, Natrium und das Cardenolidglykosid Ouabain. Die Ergebnisse der Studien differieren, je nachdem welches Expressionssystem eingesetzt wird. Während in Experimenten mit HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) die $\alpha_3$-Isoform der Ratte eine höhere apparente $K^+$-Affinität als die $\alpha_1$- und $\alpha_2$-Isoform aufweist [JEWELL und LINGREL, 1991, MUNZER et al., 1994, THERIEN at al., 1996], zeigt die $\alpha_3$-Isoform in Sf9-Zellen (Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen von *Spodoptera frugiperda*) im Vergleich zur $\alpha_1$-Isoform eine geringere apparente Affinität für Kalium [BLANCO und MERCER, 1998]. In *Xenopus laevis*-Oozyten verhalten sich die α-Isoformen der humanen $Na^+/K^+$-ATPase unter identischen experimentellen Bedingungen ebenfalls voneinander abweichend. Bei der Betrachtung der Ouabain-Sensitivität der einzelnen α-Isoformen zeigte sich, dass alle eine ähnlich hohe Affinität zu diesem Inhibitor haben [WANG et al., 2001], die $\alpha_2$-Isoform jedoch im Vergleich zur $\alpha_1$- und $\alpha_3$-Isoform schnellere Assoziations- und Dissoziations-Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten hat [CRAMBERT et al., 2000]. Diese Unterschiede scheinen nicht nur auf die menschlichen Isozyme beschränkt, sondern eher ein generelles Phänomen zu sein [CRAMBERT et al., 2004]. Der Aspekt der inotropischen Wirkung von Cardenolidglykosiden und dem damit korrelierten $Ca^{2+}$-Transport wird unter dem Punkt „Inhibitoren der $Na^+/K^+$-ATPase und ihre Bindungsstellen“ genauer erläutert.

#### 1.1.1.2 β-Untereinheit

Die β-Untereinheit ist aus etwa 370 Aminosäuren aufgebaut und existiert in vier verschiedenen Isoformen: $\beta_1$, $\beta_2$, $\beta_3$ und $\beta_m$ (*muscle* β) [GEERING et al., 2001, BLANCO et al., 2005, PESTOV et al., 2007]. Im Gegensatz zur α-Untereinheit enthält die β-Untereinheit ($\beta_1$ und $\beta_3$) drei konservierte, extrazelluläre Konsensusmotive für die N-Glykosylierung, an denen eine intensive Glykosylierung stattfindet. Dadurch kommt es zu Variationen ihres Molekulargewichts zwischen 35-55 kDa. Allgemein dienen Glykosylierungen an Proteinen der Qualitätskontrolle, dem Plasmamembran-Targeting, der Erhöhung ihrer Stabilität und somit ihrem Schutz vor proteolytischem Abbau. Darüber hinaus können sie die Affinitäten ihrer Bindungsspartner verändern. Im Falle der $Na^+/K^+$-ATPase β-Untereinheit hat die

Glykosylierung zudem noch eine wichtige Funktion bei der Ausbildung der Zellpolarität, sowie der Bildung von Desmosomen und Tight Junctions, die die Zellbeweglichkeit einschränken und somit die Polarität aufrechterhalten [VAGIN et al., 2005, 2006, 2009, RAJASEKARAN et al., 2001, 2001].

Eine der bisher ausführlich erforschten Hauptfunktionen der β-Untereinheit besteht darin, als eine Art Chaperon die strukturelle und funktionelle Entwicklung und Stabilisierung der α-Untereinheit zu unterstützen, indem sie u. a. dazu beiträgt, die α-Untereinheit fehlerfrei in die Membran zu integrieren [GEERING et al., 1989, MØLLER et al., 1996, HASLER et al. 1998]. Außerdem moduliert sie die Transporteigenschaften und beeinflusst in geringem Maße die apparenten $K^+$- und $Na^+$-Affinitäten der gereiften $Na^+/K^+$-ATPase [GEERING, 2001]. Während die diversen β-Isoformen die apparenten $K^+$-Affinitäten beeinflussen, sind gewisse Regionen der β-Untereinheit für die apparenten $Na^+$-Affinitäten verantwortlich [EAKLE et al., 1992, SCHMALZING et al., 1992, JAUNIN et al., 1993, JAISSER et al., 1994, BLANCO und MERCER, 1998, HASLER et al., 1998, KOENDERINK et al., 1999, CRAMBERT et al., 2000, GEERING, 2001].

Mit Hilfe der Kristallstruktur der $Na^+/K^+$-ATPase, die im Dezember 2007 veröffentlicht wurde [MORTH et al., 2007], konnten die α/β-Interaktionsstellen teilweise identifiziert und mit den bisherigen elektrophysiologischen und biochemischen Studien in Einklang gebracht werden. Involviert sind die beiden Segmente M7 und M10 sowie die M7-M8-Schleife der α-Untereinheit, inklusive des in dieser Schleife enthaltenen hochkonservierten SYGQ-Motivs [COLONNA et al., 1997, WANG et al., 1997, BÉGUIN et al., 2000, LEMAS et al., 2004, MORTH et al., 2007]. Die extrazellulären Schleifen der Domänen M5-M6 und M7-M8 werden in der Kristallstruktur vollständig von der β-Untereinheit bedeckt. Es wird daher davon ausgegangen, dass die β-Untereinheit wesentlich an der $K^+$-Okklusion beteiligt ist [LUTSENKO und KAPLAN, 1993, MORTH et al., 2007].

Als Interaktionsstelle seitens der β-Untereinheit sind die beiden hochkonservierten Tyrosine Y39 und Y43 sowie F42 in der unmittelbaren Umgebung des G848 (auf TM7 der α-Untereinheit) beteiligt (die Positionen der Aminosäuren richten sich nach der $\beta_1$-und $\alpha_1$-Sequenz der $Na^+/K^+$-ATPase aus der Schweineniere). Anhand von Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass Mutationen dieser beiden hochkonservierten Tyrosine die apparenten Kalium-Affinitäten signifikant herabsetzen und eine Verschiebung des Gleichgewichts der beiden möglichen Konformationszustände ($E_1$ und $E_2$) zugunsten des $E_2$-Zustands bei physiologischen Membranpotentialen begünstigen [DÜRR et al., 2009]. Durch die kürzlich von Shinoda und Kollegen veröffentlichte Kristallstruktur lässt sich die Interaktion zwischen der α- und β-Untereinheit eingehender charakterisieren [SHINODA et al., 2009]. Die Bindung der beiden Untereinheiten erfolgt über viele Wasserstoffbrücken und zahlreiche weitere Kontakte zwischen aromatischen Resten der β-Untereinheit zu zwei Transmembrandomänen der α-Untereinheit (TM7 und TM10). Ein Teil dieser aromatischen Reste stammt von den Aminosäuren F39-Y44 (β-Untereinheit), die mit TM10 (Y1001) der α-Untereinheit interagieren bzw. Y40 und Y44 mit TM7 und einem Cholesterol-

Molekül (Abbildung 1.4). Wie bereits in der Arbeit von Colonna und Kollegen beschrieben [COLONNA et al., 1997], ist auch in der aktuellen Kristallstruktur zu erkennen, dass der Bereich um die Konsensus-Sequenz SYGQ, die Schleife zwischen TM7/TM8 - genauer genommen D892 bis Q910 - eine Schlüsselrolle in der α/β-Interaktion spielt. T247 der β-Untereinheit fixiert R183 (ebenfalls in der β-Untereinheit), um eine Wechselwirkung mit E899 der α-Untereinheit zu vermitteln, welches wiederum mit K250 (β-Untereinheit) interagiert.

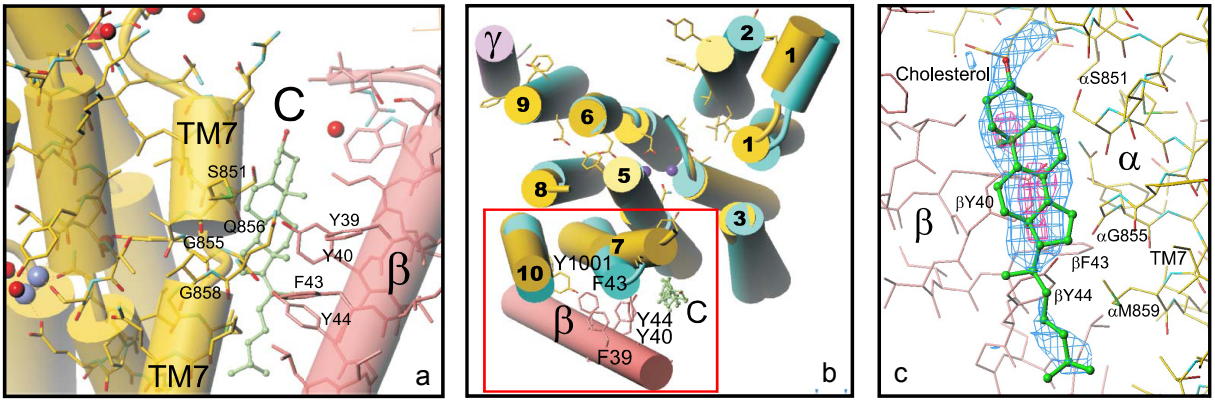



Abbildung 1.4

Interaktionsschnittstelle zwischen α- und β-Untereinheit. a) und c) Zwischen der Transmembrandomäne 7 (TM7) und der β-Untereinheit ist das Cholesterol-Molekül (C) dargestellt. b) rot eingerahmt sind sowohl die beiden Domänen TM7 und TM10 als auch die Aminosäuren, die zur β-Untereinheit gehören. Rote Kugeln entsprechen Wassermolekülen. Die Abbildungen sind angelehnt an die Publikation von [SHINODA et al., 2009].

Da die $Na^+/K^+$-ATPase-Kristallstruktur bisher lediglich im $E_2P{\bullet}2K^+$-Zustand vorliegt, bietet die Voltage-Clamp-Fluorometrie-Technik (VCF) die Möglichkeit, die relative Orientierung der beiden Untereinheiten während der Konformationsänderung beobachten und zuordnen zu können [GEIBEL et al., 2003, DEMPSKI et al., 2005].

Weitere Interaktionspartner der β-Untereinheit sind die Proteine MONaKA (*modulates $Na^+/K^+$-ATPase*) [MAO et al., 2005] und NKAIN1 (*$Na^+/K^+$-ATPase interacting, $\beta_1$*) [GOROKHOVA et al., 2007], die ebenfalls Einfluss auf die Transportaktivität der $Na^+/K^+$-ATPase haben. Jedoch ist der regulatorische Einfluss dieser beiden Proteine in Bezug auf die $Na^+/K^+$-ATPase noch weitestgehend unbekannt.

### 1.1.1.3 γ-Untereinheit

Die kleinste Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase ist die γ-Untereinheit. Wie auch die β-Untereinheit weist sie lediglich eine einzelne Transmembrandomäne auf und hat mit etwa 65 Aminosäuren ein Molekulargewicht von ca. 7 kDa. Die erste Aufreinigung und die primären Informationen über die Aminosäuresequenz wurden im Jahre 1980 von Reeves und Kollegen erbracht [REEVES et al, 1980]. Von Mercer und Kollegen konnte gezeigt werden, dass dieses kleine Protein ein Bestandteil der

$Na^+/K^+$-ATPase ist und dass das Auftreten mit der α-Untereinheit korreliert [MERCER et al., 1993]. Die γ-Untereinheit bindet ausschließlich an einen α/β-Komplex und nicht an einzeln vorkommende α- bzw. β-Untereinheiten [BÉGUIN et al., 1997]. Isoliert vorkommende γ-Untereinheiten gelangen nicht an die Plasmamembran, sondern werden zügig abgebaut [BÉGUIN et al., 1997]. Während die β-Untereinheit für die Stabilität und die Faltung der $Na^+/K^+$-ATPase unerlässlich ist, ist das Mitwirken der γ-Untereinheit bei der strukturellen und funktionellen Reifung der $Na^+/K^+$-ATPase nicht essentiell, sondern hat vielmehr eine regulatorische Funktion und ist für die gewebsspezifische Feinabstimmung der Transportfunktion zuständig.

Die γ-Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase wird auch als FXYD2 bezeichnet und gehört aufgrund ihrer im Namen enthaltenen hochkonservierten Sequenzregion zur **FXYD**-Proteinfamilie [SWEADNER und RAEL, 2000]. Die Homologie zwischen den bisher bekannten sieben FXYD-Familienmitgliedern (Tabelle 1.2) liegt im Sequenzvergleich verschiedener Arten untereinander bei etwa 75 % und im Vergleich innerhalb der Säugetiere sogar bei ~93 % [THERIEN und BLOSTEIN, 2000]. Béguin und seine Kollegen erbrachten die ersten Hinweise darauf, dass die $Na^+/K^+$-ATPase-Aktivität durch die γ-Untereinheit beeinflusst wird [BÉGUIN et al., 1997].

Neben FXYD2 werden auch die anderen FXYD-Familienmitglieder mit der $Na^+/K^+$-ATPase assoziiert, da sie ebenfalls die Fähigkeit haben die $Na^+/K^+$-ATPase-Aktivität modulieren und/oder regulieren zu können [GEERING, 2006]. Hiervon betroffen sind die apparenten ATP-, $K^+$- und die $Na^+$-Affinitäten [BÉGUIN et al., 1997, ARYSTARKHOVA et al., 1999, THERIEN et al., 1999, BÉGUIN et al., 2001].

Das FXYD2-Protein, die γ-Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase, existiert in zwei Spleißvarianten γa und γb, die sich strukturell lediglich in ihrem N-Terminus voneinander unterscheiden [KÜSTER et al., 2000, SWEADNER et al., 2000]. FXYD2a und FXYD2b werden in separaten Bereichen des Nierenmarks exprimiert [PIHAKASKI-MAUNSBACH et al., 2006]. Nennenswert ist eine erbliche Erkrankung, die mit der Mutation G41R der γ-Untereinheit einhergeht [MEIJ et al., 2000]. Das Glycin an Position 41 ist für das Oligomerisieren des FXYD2-Proteins notwendig [THERIEN und DEBER, 2002, CAIRO et al, 2008] und führt zu einer autosomal vererbbaren Form der Hypomagnesiämie (erhöhte $Mg^{2+}$-Ausscheidung in der Niere) [MEIJ et al., 2000]. Dieses Glycin befindet sich in einer Region der γ-Untereinheit, die mit dem TM9-Segment der α-Untereinheit interagiert [MORTH et al., 2007]. In der Arbeit von Morth und Kollegen konnten die an der α/γ-Interaktion involvierten Aminosäuren seitens der α-Untereinheit identifiziert werden, wie es bereits in Mutagenesestudien aus dem Jahr 2004 beschrieben wurde [LI et al., 2004, MORTH et al, 2007]. Hierzu gehört das Phenylalanin an Position 949 (F949), die Glutaminsäure E953, das Leucin L957 und das Phenylalanin F960 im TM9-Segment der renalen $\alpha_1$-Untereinheit vom Hausschwein (*sus scrofa domestica*) bzw. äquivalent dazu die Aminosäuren F953, E957, L961 und F964 der humanen $\alpha_2$-Untereinheit. Nach neuesten Erkenntnissen lässt sich dies auch anhand des

FXYD-Proteins der Rektaldrüse vom Hai weitestgehend miteinander in Einklang bringen [SHINODA et al., 2009].

| Typ | Bezeichnung | Vorkommen | Referenz |
|---|---|---|---|
| FXYD1 | Phospholemman | Herz, Leber, Skelettmuskulatur | PALMER et al., 1991<br>BOGAEV et al., 2001 |
| FXYD2 | γ-Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase | Niere | FORBUSH et al., 1978<br>MERCER et al., 1993<br>BÉGUIN et al., 1997<br>THERIEN et al., 1997<br>PU et al., 2001 |
| FXYD3 | Mat-8 (*mammary tumor marker*) | Uterus, Magen, Darm, Haut | MORRISON et al., 1995<br>RUNKEL et al., 2003 |
| FXYD4 | CHIF<br>(*corticosteroid hormone-induced factor*) | Sammelrohr und Papillen des Nierenmarks | CAPURRO et al., 1996<br>SHI et al., 2001 |
| FXYD5 | Dysadherin bzw. RIC<br>(*related to ion channe*l) | versch. Gewebearten, meist in Karzinomgewebe | FU & KAMPS, 1997<br>INO et al., 2002 |
| FXYD6 | Phosphohippolin | diverse Gewebearten | SWEADNER & RAEL, 2000<br>YAMAGUCHI et al., 2001 |
| FXYD7 | | ausschließlich im Gehirn | BÉGUIN et al., 2002 |

Tabelle 1.2

Die bisher charakterisierten sieben Proteine der FXYD-Familie und ihre Verteilung im Gewebe.

Die verschiedenen Untereinheiten der $Na^+/K^+$-ATPase (α, β, γ) und ihre Isoformen ($\alpha_1$, $\alpha_2$, $\alpha_3$, $\alpha_4$, $\beta_1$, $\beta_2$, $\beta_3$) lassen sich in vielen Expressionssystemen unter physiologisch relevanten Bedingungen sehr gut miteinander kombinieren, während die in vivo am häufigsten vorkommende Kombination die $\alpha_1/\beta_1$-Variante ist. Mit Hilfe diverser Studien konnte gezeigt werden, dass sich $Na^+/K^+$-ATPase-Oligomere (α-β-γ) zu höhermolekularen Einheiten zusammenschließen können. In der $Na^+/K^+$-ATPase-Kristallstruktur sind zwei $Na^+/K^+$-ATPase-Oligomere zu erkennen, die im leichten Kontakt über ihre A-Domänen in Verbindung stehen, jedoch kaum über Interaktionen im Transmembranbereich. Während Morth und seine Kollegen indes von einem einzelnen $Na^+/K^+$-ATPase-Oligomer ausgehen, postulieren andere Arbeitsgruppen eine Dimerisierung (2α-2β-2γ) oder aber auch eine Tetramerisierung (4α-4β-4γ) [KOBAYASHI et al., 2007, MORTH et al. 2007, MIMURA et al., 2008].

## 1.1.2 Weitere funktionell wichtige Bereiche der $Na^+/K^+$-ATPase

Um ihrer Funktion als Transportprotein nachkommen und die von der Zelle benötigten Ionengradienten aufrechterhalten zu können, besitzt die $Na^+/K^+$-ATPase spezifische Bindungsstellen für die transportierten Kationen, $Na^+$ und $K^+$. Ebenso ist es von essentieller Bedeutung, dass die $Na^+/K^+$-ATPase Bindungsstellen für selektive Inhibitoren aufweist.

### 1.1.2.1 Inhibitoren der $Na^+/K^+$-ATPase und ihre Bindungsstellen

Einer der natürlich vorkommenden Inhibitoren der $Na^+/K^+$-ATPase ist das g-Strophanthin. Es stammt aus dem Samen afrikanischer Schlinggewächse der Gattung *Strophanthus*, dessen Aussehen sich in der Namensgebung wieder findet ('Strophe': στροφος = Band, Strick, Seil. στροφας = sich drehend). Das g-Strophanthin wird auch als Ouabain bezeichnet. Dieser Name ist auf den afrikanischen Ouabaio-Baum (ostafrikanische Aussprache 'Wabayo') zurückzuführen, dessen Samen ebenfalls das g-Strophanthin enthält. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts hat das Extrakt des bis heute pharmakologisch genutzten Präparats einen Eintrag im deutschen Arzneibuch erhalten. Das bis Ende des 20. Jahrhunderts bei akuter Herzinsuffizienz eingesetzte Herzglykosid [ALLEN et al., 1985] findet auch in der Erforschung der $Na^+/K^+$-ATPase Verwendung. Herzglykoside besitzen die zunächst einmal paradox erscheinende Eigenschaft die Herzkontraktilität zu steigern, was auch als positiv inotroper Effekt bezeichnet wird. Durch die Inhibition der $Na^+/K^+$-ATPase steigt die Konzentration des intrazellulären Natriums. Das Angleichen der intra- und extrazellulären $[Na^+]$ wiederum bewirkt, dass durch das verringerte Konzentrationsgefälle die Aktivität des $Na^+/Ca^+$-Austauschers (*NCX*) herabgesetzt wird und dies schließlich zu einer Anreicherung der intrazellulären $[Ca^+]$ führt. Das angereicherte Calcium wird über $Ca^{2+}$-ATPasen ins sarkoplasmatische Retikulum, einem Calciumspeicher, transportiert und bei der Erregung der Muskulatur vermehrt ausgeschüttet, was letztendlich zu einer erhöhten Kontraktilität führt [BLAUSTEIN et al., 1998, 2002]. Die eng begrenzten funktionellen Kompartimente der neuronalen Zellen, in denen die beiden Ouabain-sensitiven Isoformen $\alpha_2$ und $\alpha_3$ gemeinsam mit dem $Na^+/Ca^+$-Austauscher und der $Ca^{2+}$-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums eine Mikrodomäne bilden, werden als „PlasmERosom" bezeichnet (Abbildung 1.5). Die $\alpha_1$-Isoform ist allerdings in diesem diffusionsbegrenzten Bereich zwischen Plasmamembran und sarkoplasmatischem Retikulum nicht vorzufinden. Auch in Bezug auf ihre Ouabain-Affinität stellt die $\alpha_1$-Isoform eine Sonderform dar. In Nagetieren, wie beispielsweise Ratten und Mäusen, ist sie nahezu Ouabain-resistent (1000fach geringere Ouabain-Affinität im Vergleich zur $\alpha_2$- und $\alpha_3$-Isoform); bei den anderen Spezies jedoch nicht [CRAMBERT et al., 2000, WANG et al., 2001]. Die Ouabain-Affinität wird von Aminosäuren diverser Regionen beeinflusst, wobei zwei Aminosäuren von besonderer Bedeutung sind, die sich an den Rändern der ersten extrazellulären Schleife (H1-H2) zwischen den Segmenten M1 und M2 befinden. Die Ouabain-sensitiven α-Isoformen verfügen an den entsprechenden Positionen über

ungeladene Aminosäuren, während die nahezu resistente Isoform geladene Aminosäuren aufweist ($\alpha_1$ Schaf: Gln-111 und Asn-122, $\alpha_1$ Ratte: Arg-113 und Asp-124) [PRICE und LINGREL, 1990]. Eine Ouabain-Resistenz der Ouabain-sensitiven α-Isoformen kann durch Substitution der beiden Aminosäuren Glutamin und Asparagin erzielt werden (Q111R und N122D) [PRICE und LINGREL, 1988].

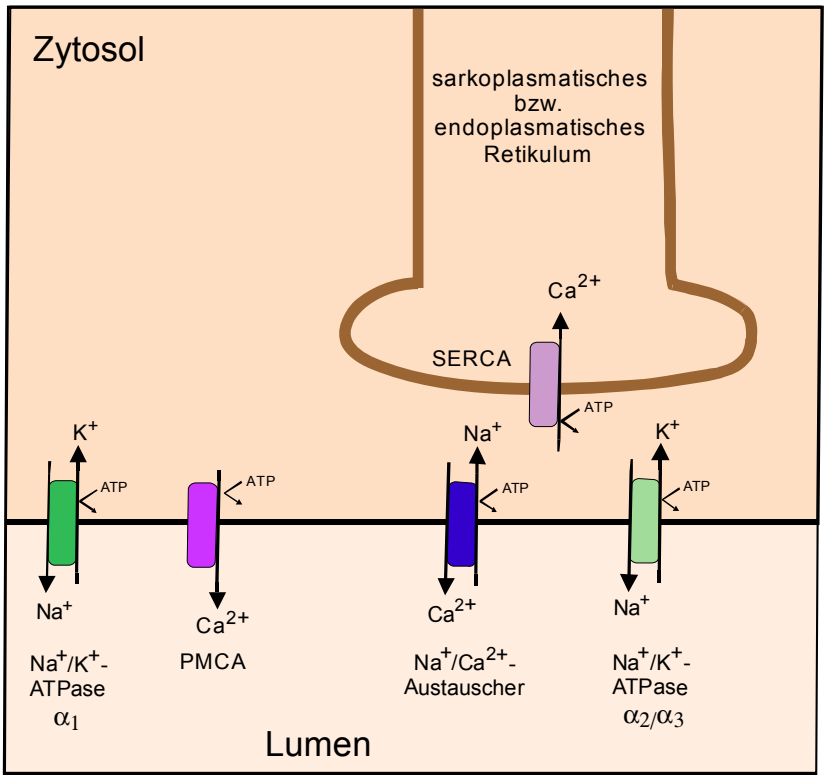



Abbildung 1.5

Schematische Darstellung der PLasmERosom-Region. Die beiden besonders Ouabain-sensitiven α-Untereinheiten ($\alpha_2$ und $\alpha_3$) der $Na^+/K^+$-ATPase befinden sich gemeinsam mit dem $Na^+/Ca^{2+}$-Austauscher in unmittelbarer Nähe des endo- bzw. sarkoplasmatischen Retikulums (ER, SR) und bilden auf diese Weise das „PLasmERosom". Sie wurden sowohl in Nervenzellen als auch in arteriellen Muskelzellen nachgewiesen [BLAUSTEIN et al., 1998 und 2002] und sind vermutlich auch in Skelett- und Herzmuskelzellen existent [JAMES et al. 1999]. Die nahezu Ouabain-resistente $\alpha_1$-Untereinheit hingegen ist gleichmäßig in der Plasmamembran vorhanden und ist nicht in direkter Umgebung zur Plasmamembran-Mikrodomäne.

Im Juli 2009 wurde durch Veröffentlichung die Kristallstruktur der $Na^+/K^+$-ATPase mit gebundenem Ouabain und $K^+$-Ionen ($E_2 \bullet 2K^+ \bullet P_i$) bekannt [OGAWA et al., 2009]. Aufgrund des Antagonismus zwischen Ouabain und Kalium repräsentiert die Struktur einen niederaffinen Ouabain-gebundenen Zustand. Ouabain besitzt eine dreiteilige Struktur, bestehend aus einem γ-Lacton (Fünfring), einem Steroidgerüst und dem Monosaccharid Rhamnose. Jeder einzelne Bestandteil scheint eine andersartige Funktion zu realisieren. Allgemein lässt sich festhalten, dass unter Beteiligung der Transmembranhelices M1, M2, M4, M5 und M6 eine Vertiefung geformt wird, in der das Ouabain-Molekül gebunden werden kann. Diese Kavität befindet sich in unmittelbarer Nähe der $K^+$-Bindungsstellen, die unter anderem eine

partielle Entwindung der Helix M4 beinhalten. Diese Entwindung könnte eine mögliche Erklärung sein, weshalb die Ouabain-Bindung relativ langsam stattfindet [WALLICK und SCHWARTZ, 1988].

Weitere $Na^+/K^+$-ATPase-Inhibitoren sind (ortho)-Vanadat $VO^{3-}_4$ (*„transition state analogue“*), welches eine Ähnlichkeit mit dem Phosphat-Anion $PO^{3-}_4$ aufweist, sowie Oligomycin [GLYNN, 1985, SKOU, 1988]. In dieser Arbeit wird ausschließlich auf den Inhibitor Ouabain eingegangen.

### 1.1.2.2 Kationen-Bindungsstellen

Als Ausgangspunkt für Struktur-Funktions-Analysen der $Na^+/K^+$-ATPase musste bis vor kurzer Zeit auf die Struktur der SERCA zurückgegriffen werden [TOYOSHIMA et al., 2000], wobei nur eine 30%ige Identität und eine 65%ige Sequenzähnlichkeit zwischen diesen beiden P-Typ-ATPasen vorliegt [SWEADNER und DONNET, 2001]. Gegenwärtig existieren mehrere hoch aufgelöste (2,6 Å) Kristallstrukturen der SERCA, die sowohl in den beiden Konformationszuständen $E_1$ und $E_2$ als auch mit verschiedenen Fluorid-Salzen (Aluminium-, Beryllium- oder Magnesiumfluorid) stabilisiert gebunden vorliegen, die die unterschiedlichen Phasen des $E_2P$-Zustandes widerspiegeln [TOYOSHIMA et al., 2000, TOYOSHIMA und NOMURA, 2002, TOYOSHIMA und MIZUTANI, 2004, SØRENSEN et al., 2004, OLESEN et al., 2004, OLESEN et al., 2007]. Die Kationen-Bindungsstellen der SERCA sind genau identifiziert und definiert [TOYOSHIMA et al., 2000, TOYOSHIMA und INESI, 2004] und Homologiestudien weisen darauf hin, dass diese beiden Kationen-Bindungsstellen mit denen in der $Na^+/K^+$-ATPase übereinstimmen und hier sowohl von Natrium- als auch von Kalium-Ionen besetzt werden können [OGAWA und TOYOSHIMA, 2002]. Mit Hilfe von zahlreichen Mutagenese- und Homologiestudien konnten ferner die an der Ionenkoordination beteiligten Transmembranregionen der $Na^+/K^+$-ATPase lokalisiert und auf die Segmente M4, M5 und M6 eingegrenzt werden [FENG und LINGREL, 1995, ANDERSEN, 1995, VILSEN, 1995, KUNTZWEILER et al., 1996, BLOSTEIN et al., 1997, VILSEN und ANDERSEN, 1998, NIELSEN et al., 1998, PEDERSEN et al., 1998, ARGÜELLO et al., 1999, TOYOSHIMA et al., 2000, JØRGENSEN und PEDERSEN, 2001, JØRGENSEN et al., 2003]. Genau 50 Jahre nach Entdeckung der $Na^+/K^+$-ATPase wurde ihre Kristallstruktur mit einer Auflösung von 3,5 Å veröffentlicht [MORTH et al., 2007]. In der Struktur sind zwei Rubidium-Ionen erkennbar ($E_2P$-Zustand), die verglichen mit $K^+$-Ionen aufgrund ihres sehr ähnlichen Ionenradius ($Rb^+$ = 2,35 Å, $K^+$ = 2,2 Å) wie ebensolche von der $Na^+/K^+$-ATPase transportiert werden können. Die beiden $Rb^+$-Ionen umgebenden Aminosäurereste sind an folgenden Positionen vorzufinden ($\alpha_1$-Untereinheit der Schweineniere): E327 (M4), S775 (M5), N776 (M5), E779 (M5), D804 (M6) und D808 (M6). Diese stimmen mit den Resten überein, die an der $Ca^{2+}$-Bindung der SERCA beteiligt sind und denen die die Sauerstoff-Liganden hierfür zur Verfügung stellen [MORTH et al., 2007]. Aufgrund der Tatsache, dass die $Na^+/K^+$-ATPase drei $Na^+$-Ionen im Vergleich zur SERCA, die zwei $Ca^{2+}$-Ionen bindet und okkludiert, resultiert eine Abweichung des Kationentransports, insbesondere bezüglich der dritten Bindungsstelle für Natrium-Ionen.

Erst kürzlich wurde eine weitere Kristallstruktur der $Na^+/K^+$-ATPase mit einer höheren Auflösung von 2.4 Å veröffentlicht, in der zwei der drei Kationen-Bindungstellen einzelnen Aminosäureresten zugeordnet werden können [SHINODA et al., 2009]. Diese Struktur, die unter dem PDB-Dateinamen 2ZXE zu finden ist, zeigt im Vergleich zu der vorhergehenden einen größeren Anteil der β- und enthält zusätzlich die γ-Untereinheit, das FXYD10. Die aus der Rektaldrüse von Haien erhaltene Kristallstruktur ist ebenso in einem $E_2$-P•$2K^+$-analogen Zustand kristallisiert wie die auf dem Schweinenierenenzym basierende erste Struktur der $Na^+/K^+$-ATPase.

Die drei Kationen-Bindungsstellen, wovon zwei sich ungefähr in der Mitte der Transmembran-Region (I und II) befinden und die dritte zur zytosolischen Seite (C) hin orientiert ist, werden von Sauerstoffatomen des Proteinrückgrats koordiniert. Im Falle der Bindungsstelle I sind fünf Sauerstoffatome beteiligt, die einem Wassermolekül und folgenden Aminosäuren zugeordnet sind: T779 (Sauerstoff stammt aus der Hauptkette), S782, N783 und D811 (aus den Seitenketten). Bei der Bindungsstelle II sind drei Carbonylgruppen aus der Hauptkette beteiligt (V329, A330 und V332) und drei bis vier Sauerstoffatome der Seitenketten von N783, E786, D811 und möglicherweise von E334, jedoch kein Wassermolekül (Abbildung 1.6). Weiterhin spielt das Q930 eine indirekte Rolle bei der Regulierung der $K^+$-Affinität, da diese Aminosäure aus der Transmembrandomäne TM8 - gemeinsam mit der Hydroxylgruppe von Y778 - die Seitenkette von D815 stabilisiert [SHINODA et al., 2009]. Interessanterweise interagieren die beiden zusammenstehenden $K^+$-Ionen nicht direkt miteinander, obwohl sie von zwei gleichen Aminosäuren jeweils ein Sauerstoffatom zur Verfügung gestellt bekommen. Bemerkenswert ist auch das Vorhandensein des P785 in der TM5-Helix (äquivalent zu G770 der SERCA), wodurch eine Entwindung und ein leichter Knick der Helix verursacht wird, so dass das T779 seinen Sauerstoff für die $K^+$-Koordination bereitstellen kann. Diese Entwindung der TM7 wird zusätzlich von Wasserstoffbrücken über Y44 der β-Untereinheit zum G855 der α-Untereinheit stabilisiert. Das Vorhandensein eines Cholesterol-Moleküls scheint diese entwundene Stelle der TM7 zu schützen, indem es die umgebenden Lipide fernhält, so dass dem Cholesterin-Molekül eine wichtige Struktur-stabilisierende Funktion zukommt. Wie bereits zuvor vorgeschlagen [LUTSENKO und KAPLAN, 1993, HASLER et al., 2001, GEERING, 2001], wird somit aus der neuen Struktur besonders deutlich, dass die β-Untereinheit einen weitreichenden Einfluss auf die $K^+$-Bindung hat.

Partielle Bestätigungen und Ergänzungen zu bisherigen Spekulationen über die Lokalisation der dritten Natrium-Bindungsstelle [JØRGENSEN et al., 2003, LI et al., 2005] erbrachte bereits die 2007 veröffentlichte Kristallstruktur der $Na^+/K^+$-ATPase [MORTH et al., 2007]. Fünf Aminosäurereste in den Segmenten M5 (Y771), M6 (Y807, D808), M8 (Q923) und M9 (E954) werden näher in Betracht gezogen, in der $Na^+$-Bindung involviert zu sein. Des Weiteren wird vorgeschlagen, dass der C-Terminus an der Optimierung der Bindung des dritten Natrium-Ions einen Beitrag leistet, in dem er mit dem M5-Segment und der Schleife zwischen M8 und M9 interagiert [MORTH et al., 2007]. Über die Beteiligung

des C-Terminus an der Kationen-Okklusion wurde bereits im Jahr 1992 spekuliert [CAPASSO et al., 1992].

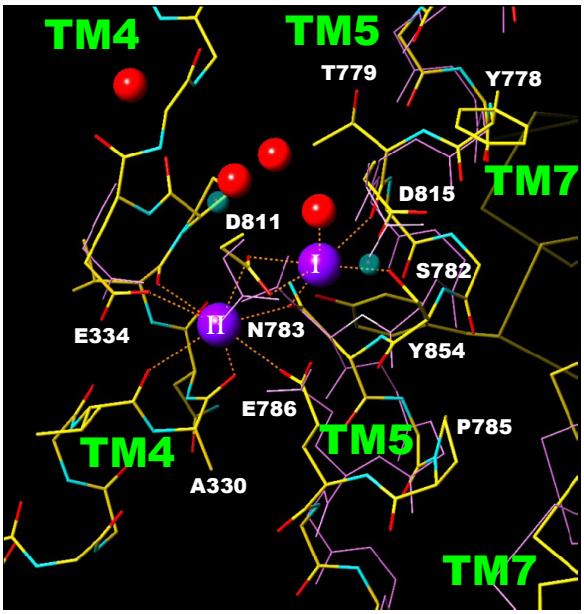



Abbildung 1.6

Parallele Ansicht auf die Membran mit Einblick auf zwei Kationen-Bindungsstellen. Die Darstellung basiert auf der Kristallstruktur, die unter dem PDB-File 2ZXE zu finden ist, und der Veröffentlichung von [SHINODA et al., 2009]. Die Präsenz von P785 entwindet die TM7, was dazu führt, dass ein Sauerstoffatom von T779 für die $K^+$-Koordination zur Verfügung gestellt werden kann (violette Kugeln = $K^+$-Ionen, rote Kugeln = Wassermoleküle, cyan-farbige Kugeln = gebundenes $Ca^{2+}$ im $E_1$•$2Ca^{2+}$-Zustand der SERCA).

### 1.1.3 Aktiver Transport und katalytischer Zyklus

Im katalytischen Zyklus unterscheidet man zwei Prinzipalkonformationen: den $E_1$- und $E_2$-Zustand. Diese beiden Konformationen unterscheiden sich hinsichtlich Orientierung und Spezifität ihrer Bindungsstellen für $Na^+$ und $K^+$. Während die $E_1$-Konformation nach innen gerichtete Kationen-Bindungsstellen besitzt und eine hohe Affinität für $Na^+$ und ATP hat, sind in der $E_2$-Konformation die Bindungsstellen nach außen gerichtet und es wird $K^+$ und $P_i$ präferiert gebunden (Abbildung 1.7). Aufgrund des reversiblen Phosphorylierungsschrittes existieren zudem phosphorylierte Intermediärformen.

Der Reaktionszyklus wird häufig in Form eines Mechanismus dargestellt, der auf Arbeiten von R. L. Post und W. R. Albers zurückgeht [ALBERS, 1967, POST et al., 1972]. In Anwesenheit von intrazellulärem Natrium wird das Enzym im $E_1$-Zustand durch ATP phosphoryliert, wobei ADP freigesetzt wird und die $Na^+$-Ionen okkludiert werden. Das Enzym geht in den $E_2P$-Zustand über, die Bindungsstellen reorientieren sich zur extrazellulären Seite und die $Na^+$-Ionen werden entlassen.

Daraufhin folgt die $K^+$-Bindung, Okklusion der beiden $K^+$-Ionen und die Dephosphorylierung. Das Post-Albers-Schema mitsamt den einzelnen Reaktionsschritten ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

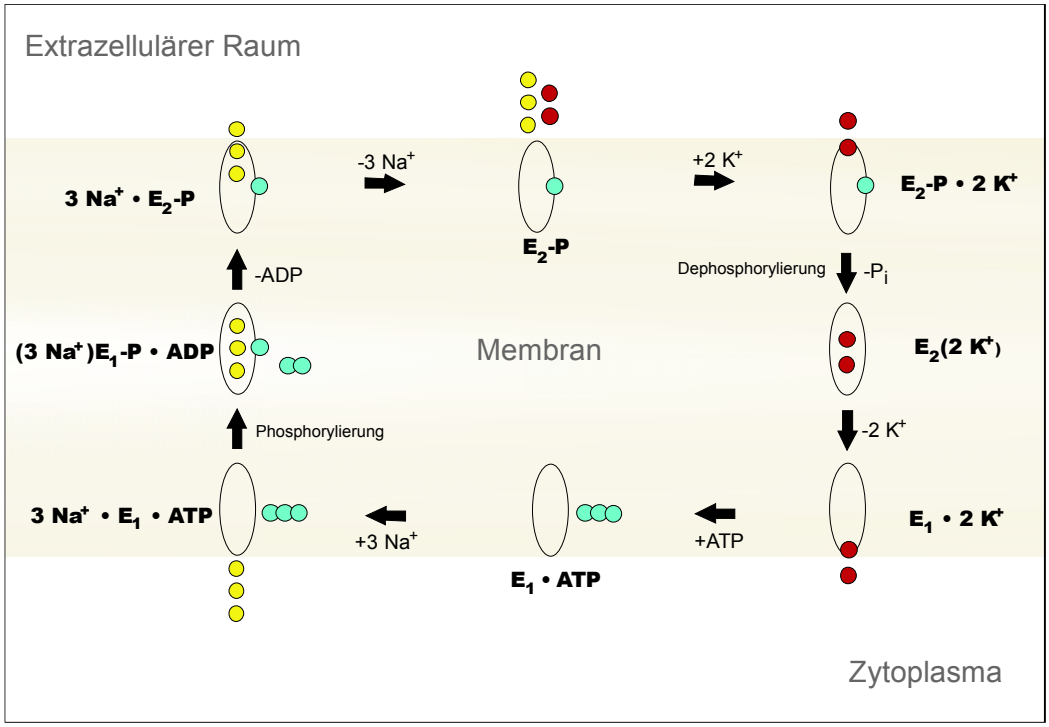



Abbildung 1.7

Reaktionszyklus der $Na^+/K^+$-ATPase dargestellt im modifizierten Post-Albers-Schema. Ausgehend von der zytoplasmatischen Seite binden drei $Na^+$-Ionen im $E_1$-Zustand an die intrazellulär orientierten Kationen-Bindungsstellen ($E_1$). Durch den Phosphorylierungsschritt kommt es zur Okklusion der drei $Na^+$-Ionen und die $Na^+/K^+$-ATPase wechselt ihre Konformation in den $E_2$-Zustand, wobei ADP freigesetzt wird ($E_2P$). An der extrazellulären Seite werden nun die $Na^+$-Ionen deokkludiert und freigesetzt, woraufhin die beiden hochaffinen $K^+$-Ionen gebunden und okkludiert werden. Dies geht mit der Dephosphorylierung einher ($E_2$). Das Enzym ändert seine Konformation erneut in den $E_1$-Zustand und es kommt zur Freisetzung der $K^+$-Ionen an der intrazellulären Seite. Blau = ATP, ADP und $P_i$, gelb = $Na^+$-Ionen, rot = $Ka^+$-Ionen.

### 1.1.4 Elektrogenizität

Die 3:2-Stöchiometrie der $Na^+/K^+$-ATPase ist unabhängig von der $[Na^+]_{int}$ [GADSBY und CRANEFIELD, 1979, EISNER et al., 1981, GLITSCH et al., 1982], der $[Na^+]_{ext}$, der $[K^+]_{ext}$ [ABERCROMBIE und DE WEER, 1978, GADSBY, 1980, EISNER et al. 1981], vom Membranpotential [RAKOWSKI et al., 1989] und von der ATP-Konzentration [GOLDSCHLEGER et al., 1987]. Aufgrund der $3Na^+/2K^+$-Stöchiometrie entsteht indes ein Netto-Transport einer elektrischen Ladung [THOMAS, 1969]. Der maßgebende elektrogene Vorgang findet während des Natrium-Transportschritts statt, genauer formuliert erfolgt der Großteil der Ladungsverschiebung während der extrazellulären Freisetzung bzw. der Rückbindung von Natrium. Dies konnte 1985 mittels BLM-Experimenten (BLM, *Black Lipid Membrane*) von Fendler und seinen

Mitarbeitern [FENDLER et al., 1985] bzw. ein Jahr später von Nakao und Gadsby anhand elektrophysiologischer Messungen nachgewiesen werden [NAKAO und GADSBY, 1986]. Mittels Spannungssprungexperimenten (VC, *Voltage Clamp technique b*zw. TEVC, *Two Electrode Voltage Clamp*), die in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium und in Gegenwart von hohem intra- und extrazellulären Natrium durchgeführt werden (unter so genannten $Na^+/Na^+$-Austausch-Bedingungen), können die $Na^+$-abhängigen Transportschritte gezielt untersucht werden. Diese Spannungssprünge, die ATP-abhängig sind und Ouabain-sensitive transiente Ströme erzeugen, werden als „*pre-steady-state*-Ströme“ bezeichnet. Die extrazelluläre Freisetzung von Natrium-Ionen wird durch Spannungssprünge zu positiven Potentialen hervorgerufen, was zu positiven transienten Strömen und zu einer Verschiebung des $E_1P$-$E_2P$-Gleichgewichts in Richtung $E_2P$ führt. Pulse zu negativen Potentialen fördern die $Na^+$-Rückbindung und verschieben somit das Gleichgewicht in Richtung $E_1P$ [RAKOWSKI, 1993, HOLMGREN und RAKOWSKI, 1994, FRIEDRICH und NAGEL, 1997]. Folglich sind die $Na^+$-Bindungs- und die $Na^+$-Freisetzungsschritte unmittelbar mit der $E_1P$-$E_2P$-Gleichgewichtsreaktion assoziiert. Überdies konnte nachgewiesen werden, dass die $Na^+$-Bindungs- und die $Na^+$-Freisetzungsschritte in drei unabhängige und reversible Ladungsverschiebungsschritte unterteilt sind und strikt sequentiell verlaufen [HOLMGREN et al., 2000]:

$$(3\ Na^+)E_1P \leftrightarrow (3\ Na^+)E_2P \leftrightarrow E_2P + 3\ Na^+$$

Der Zeitverlauf der Natrium-abhängigen Reaktionsschritte (transiente Ströme), welcher durch apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt werden kann, ist in der Vorwärtsreaktion ($Na^+$-Freisetzung) spannungsunabhängig und in der Rückwärtsreaktion (Bindung von extrazellulärem Natrium) spannungsabhängig [DE WEER et al., 1992].

## 1.2 $Na^+/K^+$-ATPase-assoziierte Erkrankungen

Die $Na^+/K^+$-ATPase, die als essentielles „Haushaltsenzym“ konstitutiv exprimiert wird, weckt seit einigen Jahren bei Humangenetikern und Neurologen ein immer größer werdendes Interesse. Bei der Erforschung diverser Krankheiten sind einige Defekte bekannt geworden, die auf Genen lokalisiert sind, die für α-Isoformen der $Na^+/K^+$-ATPase kodieren. Hierzu gehören die beiden Gene ***ATP1A2*** (lokalisiert auf Chromosom 1q21-1q23, 1q31) [DUCROS et al., 1997, GARDNER et al., 1997] und ***ATP1A3*** (lokalisiert auf Chromosom 19p13) [SHULL und LINGREL, 1987, YANG-FENG et al., 1988, DE CARVALHO AGUIAR et al., 2004]. Mutationen auf dem letztgenannten Gen (kodiert die $\alpha_3$-Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase) führen zu einer seltenen autosomal-dominanten Erbkrankheit, die als **Dystonie-Parkinsonismus-Syndrom** mit raschem Erkrankungsbild (DYT12, *Rapid-Onset Dystonia-Parkinsonism*, RDP) bezeichnet wird [DOBYNS et al., 1993, BRASHEAR et al., 1997, PITTOCK et al., 2000, LINAZASORO et al., 2002]. Die ersten

Beobachtungen machte der Mediziner William B. Dobyns im Jahre 1992 an einer 15-Jährigen und benannte die Krankheit nach den schnell auftretenden Anfällen von dystonischen Krämpfen, die mit Anzeichen von Parkinson einhergingen, wie beispielsweise Rigor (Muskelstarre), Tremor (Muskelzittern) und Bradykinese (verlangsamte Bewegungen) sowie posturale Instabilität (Haltungsinstabilität). Nach über 15 Jahren sind inzwischen mehr als 50 Patienten aus 20 Familien registriert worden.

Bisher gibt es noch keine Erkenntnisse darüber, ob Mutationen in den beiden $Na^+/K^+$-ATPase-Untereinheiten $\alpha_1$ und $\alpha_4$ ebenfalls mit Krankheiten assoziiert sind. Indessen werden Veränderungen auf dem oben erwähnten Gen *ATP1A2*, das die $\alpha_2$-Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase kodiert, mit einer vererbbaren Form der Migräne in Verbindung gebracht [MAY et al., 1995, GARDNER et al., 1997, DUCROS et al., 1997]. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-dominante Erbkrankheit, die als „**Familiäre Hemiplegische Migräne**“ (FHM, *Familial Hemiplegic Migraine*) bezeichnet wird. Die ersten Beschreibungen der familiären hemiplegischen Migräne gehen auf J. Michell Clarke zurück [CLARKE, 1910]. Der Ausdruck „hemiplegisch“ leitet sich her vom (symptomatischen) Auftreten einer halbseitigen Lähmung, welche dem eigentlichen Kopfschmerz vorausgeht.

Die Internationale Kopfschmerzgesellschaft (IHS, *International Headache Society*) kategorisiert die verschiedenartigsten Kopfschmerzen und untergliedert die Migräne in „**Migräne ohne Aura**“ und „**Migräne mit Aura**“ (Tabelle 1.3). Die familiäre und auch die „**Sporadische Hemiplegische Migräne“** werden der Klassifizierung „mit Aura“ zugeordnet. Diese neurologischen Symptome, die entweder als „Vorboten“ oder als „Begleiter“ des eigentlichen Kopfschmerzes einhergehen, sind unter dem Abschnitt „Die klassische Migräne“ (1.2.1) näher erläutert.

Die sporadische hemiplegische Migräne ähnelt symptomatisch betrachtet der familiären hemiplegischen Migräne, unterscheidet sich jedoch darin, dass innerhalb der Familie - Verwandtschaft ersten und zweiten Grades - keine äquivalente Diagnose vorliegt. Die Krankheitshäufigkeit (Prävalenz) beider Migräne-Formen ist vergleichbar selten (1:10000) [THOMSEN et al., 2002, THOMSEN und OLESEN, 2004]. Als weitere Ursache für eine Erkrankung an familiärer hemiplegischer Migräne seien noch zusätzlich die beiden Gene ***CACNA1A*** (frühere Bezeichnung *CACNL1A4*, auf Chromosom 19p13, FHM-1) [OPHOFF et al., 1996] und ***SCN1A*** (auf Chromosom 2q24, FHM-3) erwähnt [DICHGANS et al., 2005, GARGUS und TOURNAY, 2007]: *SCN1A* kodiert die $\alpha_1$-Untereinheit eines spannungsabhängigen neuronalen Natriumkanals ($Na_v1.1$), während das *CACNA1A*-Gen für die $\alpha_1$-Untereinheit des spannungsabhängigen P/Q-Typ-Calciumkanals ($Ca_v2.1$) kodiert. Interessanterweise wurden auf dem gleichen Genlocus (Chromosom 19p) und damit einhergehend in der $\alpha_1$-Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals Mutationen entdeckt, die neben der FHM noch mit weiteren dominant vererbbaren neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden: **Spinozerebelläre Ataxie Typ 6** (SCA-6) [ZHUCHENKO et al., 1997] und **episodische Ataxie Typ 2** (EA-2) [OPHOFF et al., 1996]. Einige klinische Merkmale der EA-2 und der FHM sind überlappend, wie beispielsweise das

Auftreten von Schwindelgefühlen [HAAN et al., 1995, DENIER et al., 1999]. Außerdem weisen etwa 50 % der an EA-2 Erkrankten die Symptome einer Migräne auf, insbesondere der Migräne vom Basilaris-Typ (Tabelle 1.3) [BALOH et al., 1997].

| | | |
|---|---|---|
| 1 | **Migräne ohne Aura** (gewöhnliche Migräne) | |
| 2 | **Migräne mit Aura** (klassische Migräne) | |
| | 2.1 | Migräne mit typischer Aura |
| | 2.2 | typische Aura mit untypischen Kopfschmerzen |
| | 2.3 | typische Aura ohne Kopfschmerzen |
| | 2.4 | familiäre hemiplegische Migräne (FHM) |
| | 2.5 | sporadische hemiplegische Migräne (SHM) |
| | 2.6 | Migräne vom Basilaristyp |
| 3 | **periodische Syndrome in der Kindheit** (die im Allg. Vorläufer einer Migräne sind) | |
| | 3.1 | zyklisches Erbrechen |
| | 3.2 | abdominelle Migräne |
| | 3.3 | benigner paroxysmaler Schwindel |
| 4 | **retinale Migräne** | |
| 5 | **wahrscheinliche Migräne** | |
| | 5.1 | wahrscheinliche Migräne ohne Aura |
| | 5.2 | wahrscheinliche Migräne mit Aura |
| | 5.3 | wahrscheinliche chronische Migräne |
| 6 | **Migränekomplikationen** | |
| | 6.1 | chronische Migräne |
| | 6.2 | Status migränosus |
| | 6.3 | migränöser Infarkt |
| | 6.4 | persistierende Aura ohne Infarkt |
| | 6.5 | migränegetriggerte epileptische Anfälle |

Tabelle 1.3

Übersicht über die Klassifikation der Migräne einschließlich ihrer Subtypen aus der Ende 2003 erschienenen überarbeiteten Auflage der Internationalen Kopfschmerzgesellschaft (IHS, *International Headache Society*). Die zweite Auflage der IHS-Kriterien (ICHD-II) ist vollständig in den Zeitschriften „Nervenheilkunde“ (2003, 22: 531-610) und „Cephalalgia“ (2004, 24: Suppl. 1: 1-160) aufgeführt.

Migräne-Symptome weisen Ähnlichkeiten zu weiteren neurologischen Erkrankungen auf, wie beispielsweise Hirnschlag, Depressionen und Epilepsie. FHM wird auch häufig irrtümlich als Epilepsie diagnostiziert und dementsprechend falsch behandelt [JOUVENCEAU et al., 2001, VANMOLKOT et al., 2003, KORS et al., 2004, BEAUVAIS et al., 2004]. Es gibt aber auch Epilepsie-Formen, die mit der familiären hemiplegischen Migräne teilweise kosegregieren (Tabelle 1.4), wie zum Beispiel „**benigne familiäre infantile Krampfanfälle**“ (BFIC, *Benign Familial Infantile Convulsions*, autosomal-dominant, Genort: 19q13, Gen: CHRNA4) und „**benigne familiäre neonatale Krampfanfälle**“ (BFNC, *Benign Familial Neonatale Convulsions*, autosomal-dominant, Genort: 20q und 8q24, Gen: KCNQ2 und KCNQ3)

[TERWINDT et al., 1997, CHARLIER et al., 1998, SINGH et al., 1998, VANMOLKOT et al., 2003, BONESCHI et al., 2005]. Das Gen *ATP1A2* ist wahrscheinlich auch in anderen Epilepsie-Formen involviert, da auch Fälle mit BFIC-freien Epilepsien in Familien mit FHM existieren, die in direktem Zusammenhang mit dem Chromosom 1q21-1q23 stehen [DUCROS et al., 1997, CEVOLI et al., 2002, MARCONI et al., 2003, VANMOLKOT et al., 2003].

| Krankheit | Abkürzung | Gen | Chromosom |
|---|---|---|---|
| Familiäre Hemiplegische Migräne Typ 1 | FHM-1 | *CACNA1A* | 19p13 |
| Familiäre Hemiplegische Migräne Typ 2 | FHM-2 | *ATP1A2* | 1q21-1q23 |
| Familiäre Hemiplegische Migräne Typ 3 | FHM-3 | *SCN1A* | 2q24 |
| Familiäre Hemiplegische Migräne Typ 4 | FHM-4 | ? | 14q32 |
| Sporadische Hemiplegische Migräne | SHM | *CACNA1A, SCN1A, ATP1A2* | 19p13, 2q24, 1q21-1q23 |
| Benigne Familiäre Infantile Krampfanfälle | BFIC | *ATP1A2* | 19q13 |
| Benigne Familiäre Neonatale Krampfanfälle | BNIC | *SCN1A* | 20q, 8q24 |
| Zerebral autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie | CADASIL | *Notch3* | 19p13.2-p13.1 |
| Episodische Ataxie Typ 2 | EA-2 | *CACNA1A* | 19p13 |
| Spinozerebelläre Ataxie Typ 6 | SCA-6 | *CACNA1A* | 19p13 |

Tabelle 1.4

Vier Gene, die entweder direkt oder indirekt mit hemiplegischer Migräne in Verbindung stehen, einschließlich ihrer Lokalisation auf den entsprechenden Chromosomen.

Die klassische Migräne („Migräne mit Aura“) tritt ebenfalls in Verbindung mit anderen neurologischen Erkrankungen auf. Die **zerebral autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie** (CADASIL, *Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*) weist in ihrer frühen Symptomatik migräneartige Kopfschmerzen auf [DICHGANS et al., 1998], was in den meisten Fällen dazu führt, dass diese seltene genetische Erkrankung relativ spät als solche erkannt wird. Die entsprechenden Mutationen kommen auf dem Chromosom 19p

(*Notch3*-Gen) vor, auf dem auch die Gene *CACNA1A* und *SCA-6* lokalisiert sind (Tabelle 1.4) [DUCROS et al., 1996].

Im Januar 2009 wurde ein Genlocus auf Chromosom 14q32 mit FHM assoziiert [CUENCA-LEÓN et al., 2009]. Das deutet auf eine noch größere genetische Heterogenität der hemiplegischen Migräne hin, als bisher angenommen wurde. In dieser Arbeit wird jedoch im Weiteren hauptsächlich auf die sporadische und familiäre hemiplegische Migräne des Typs 2 (SHM und FHM-2) eingegangen.

### 1.2.1 Die klassische Migräne

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) hat Migräne unter den chronischen Erkrankungen weltweit auf Platz 19 der Hauptursachen für Arbeitsunfähigkeit eingeordnet und auf Platz 4 der neurologischen Erkrankungen, die innerhalb Europas mit einer Höhe von >27 Mrd. Euro pro Jahr am kostspieligsten sind [MENKEN et al., 2000, ANDLIN-SOBOCKI et al., 2005, GOADSBY, 2005 und 2006, DODICK und GARGUS, 2008]. Es leiden schätzungsweise 15 % der Weltbevölkerung an Migräne, darunter dreimal mehr Frauen als Männer [STEWART et al., 1994, LAUNER et al., 1999, STOVNER et al., 2006]. Migräne zeichnet sich dadurch aus, dass anfallartige, pulsierende Kopfschmerzen auftreten, die meist auf eine Kopfhälfte begrenzt sind und periodisch wiederkehren. Ein Migräneanfall kann in fünf Phasen unterteilt werden: (1) interiktale Phase, (2) Prodromalphase, (3) Auraphase, (4) Schmerzphase und (5) Rückbildungsphase [BLAU, 1992]. Die erste Phase ist beschwerdefrei und zeigt neben veränderten Gehirnaktivitäten eine niedrige Serotoninkonzentration. Jedoch ist noch weitestgehend unklar, in welchem Ausmaß der Serotoninstoffwechsel bei einem Migräneanfall eine Rolle spielt. In der zweiten Phase, der Prodromalphase, treten Symptome wie Konzentrationsmangel, Stimmungsschwankungen, Appetitsteigerung sowie Übelkeit und Erbrechen auf, die über mehrere Stunden andauern und der Aura vorausgehen [RUSSELL und OLESEN, 1996]. Zu den häufigsten vor der Kopfschmerzphase (Auraphase) auftretenden vegetativen Begleiterscheinungen gehören neben den visuellen, motorischen, sensorischen und sensiblen Störungen die Sprachstörungen. Etwa 30 % der Migränepatienten erfahren eine Auraphase, jedoch treten nicht immer alle Auraformen auf [RASMUSSEN und OLESEN, 1992, SILBERSTEIN, 2004]. Die diversen neurologischen Reiz- und Ausfallsymptome sind in Tabelle 1.5 detaillierter aufgelistet. Binnen einer Stunde nach Beginn der Aura setzt die Kopfschmerzphase ein. Die Schmerzphase lässt sich mit dem pathophysiologischen Korrelat der Migräne-Aura, der „kortikalen Streudepolarisierung“ (CSD, *Cortical Spreading Depression*), anschaulich darstellen und mittels bildgebender Verfahren (fMRI) raum-zeitlich darstellen. Die Rückbildungsphase dauert im Durchschnitt etwa einen bis zu drei Tage, in denen begünstigt durch Schlaf der Normalzustand und damit auch das Wohlbefinden des Erkrankten regeneriert werden können.

| Art der Symptomatik | Art der Störung |
|---|---|
| visuell | Augenflimmern, helle und dunkle Flecken an bestimmten Stellen des Gesichtsfeldes in wechselnder Kombination und Bewegung, Doppelbilder, Augenbewegungsstörungen, Sehen gezackter Linien |
| motorisch | Gang- und Standunsicherheit, Gleichgewichtsstörungen, Lähmungserscheinungen |
| sensorisch & sensibel | Gefühlsstörungen oder Missempfindungen an versch. Körperregionen (Mund, Zunge, Wange, Hand, Fuß) wie Kribbeln, Ameisenlaufen, Stechen, Spinnwebgefühl, Jucken, Schwellungsgefühl, gestörte Kälte- und/oder Warmempfindung, Licht- und Geräuschempfindlichkeit, Geruchs- und Geschmacksstörungen |
| artikulatorisch | Allgemeine Sprach- und Sprechstörungen, wie Stottern, Lallen, Stammeln und Wortfindungsstörungen |
| Begleitsymptome | Erbrechen, Übelkeit, Schwindel, Unwohlsein, Krämpfe in inneren Organen der Bauchhöhle, Hyperaktivität, Appetitlosigkeit, Gesichtsblässe |

Tabelle 1.5

Während der Aura- bzw. Kopfschmerzphase auftretende Symptome.

### 1.2.2 Pathophysiologie der Migräneaura

Bisher war umstritten, ob die Entstehung des Migräneschmerzes vaskulären oder neurogenen Ursprungs ist, da es für beide Ursachearten haltbare Theorien gibt. Die neurogene Annahme geht davon aus, dass die Migräne-Aura durch eine Störung der Nervenzellaktivität im zentralen Nervensystem hervorgerufen wird, während die vaskuläre eine zentrale Rolle der Gefäßpathologie in Betracht zieht [BOES und DALESSIO, 2008]. Mittlerweile wird von einer Kombination aus beiden denkbaren Ursachen ausgegangen, die als „neurovaskuläre Theorie“ bezeichnet wird und derzeit allgemein akzeptiert ist. Das Phänomen der „Cortical Spreading Depression“ ist Bestandteil der neurogenen Komponente der Migräne. Die ersten Beobachtungen diesbezüglich machte Karl Spencer Lashley an sich selbst. Er konnte während einer Migräne-Aura die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Flimmerns in seinem Gesichtsfeld mit 2-5 mm/min bestimmen [LASHLEY, 1941]. Drei Jahre später wurde die gleiche Geschwindigkeit in unabhängigen Experimenten (an Kaninchenhirnarealen) von Aristides A. P. Leão ebenfalls gemessen [LEÃO, 1944]. Der Ausdruck „spreading depression“, den der brasilianische

Neurophysiologe Leão damals prägte, wurde im Jahr 1958 zum ersten Mal in Verbindung mit Migräneaura verwendet [MILNER, 1958].

### 1.2.3 Cortical Spreading Depression

Die Cortical Spreading Depression ist eine transiente (1-2 min) Depolarisation (negative Potentialverschiebung um ~20-35 mV) der Nerven- und Gliazellen der Hirnrinde (Cortex), die sich wellenartig mit einer Geschwindigkeit von 2-5 mm/min über die Hirnoberfläche ausbreitet [SANCHEZ DEL RIO und REUTER, 2004]. Hierbei kommt es zur massiven Umverteilung der Ionen $Na^+$, $K^+$, $Cl^-$ und $Ca^{2+}$ [HANSEN et al., 1990, HANSEN und ZEUTHEN, 1981] und verschiedener Neurotransmitter [DAVIES et al., 1995] zwischen dem intra- und extrazellulären Raum. Es ist nachgewiesen, dass die extrazelluläre Glutamatkonzentration um etwa das 20-fache ansteigt [SCHELLER et al., 1991] und über die **NMDA-Rezeptoren** (Glutamat-Rezeptor, *NMDA, N-Methyl-D-Aspartat*) zur Weiterleitung der CSD beiträgt. Zudem erhöht sich die Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum kurzzeitig von ~3 mM auf bis zu 60 mM [HANSEN und ZEUTHEN, 1981]. Parallel kommt es zu einer Reduktion der extrazellulären $Na^+$- (von ~130 mM auf 70 mM) und $Ca^{2+}$-Konzentration (von ~1,5 auf 0,15 mM). Dies führt dazu, dass ebenso $Cl^-$-Ionen und in der Folge auch Wasser auf osmotischem Wege ins Zellinnere gelangt. Die Größe des Extrazellulärraums reduziert sich dabei vorübergehend fast um die Hälfte. Der pH-Wert erfährt während der Depolarisation ebenfalls eine Verschiebung: zunächst in den alkalischen (um ~0,3 Einheiten) und dann in den aziden Bereich (um ~0,05-0,1 Einheiten im Vergleich zum Ausgangswert). Auf die transiente neuronale Übererregung folgt schließlich eine länger anhaltende neuronale Inhibition.

Parallel zur Depolarisationsphase kommt es zu einem Anstieg bzw. unmittelbar im Anschluss an die elektrophysiologischen Veränderungen zur Reduktion des **regionalen zerebralen Blutflusses** (rCBF, *regional Cerebral Blood Flow*) [OLESEN et al., 1981, OLESEN, 1991]. Durch die Cortical Spreading Depression wird das „trigemino-vaskuläre System“ (periphere trigeminale Verbindungen mit zerebralen Blutgefässen) aktiviert. In den Endothelien der zerebralen Blutgefäße induzieren Astrozyten die Funktion der Blut-Hirn-Schranke. Diese sternförmigen Zellen des Nervengewebes unterscheiden sich strukturell und funktionell von den typischen Neuronen und stehen ungeachtet dessen in direktem Kontakt zu ihnen. In ihrer Zellmembran befinden sich verschiedene Transporter, Rezeptoren und spannungsabhängige Kanäle, die an der Regulation und Aufrechterhaltung insbesondere des Glutamat- und Kalium-Haushalts beteiligt sind (Abbildung 1.8). In diesem Zusammenhang sei der Glutamat-Transporter **GLAST** (*GLutamate ASpartate Transporter*, auch als EAAT1 *Excitatory Amino Acid Transporter 1* bezeichnet) erwähnt, der nach Erregung von Neuronen freigesetztes Glutamat aus dem synaptischen Spalt im Co-Transport zu drei $Na^+$-Ionen, einem $H^+$-Ion (Symport) und einem $K^+$-Ion (Antiport) befördert [DANBOLT, 2001, BALCAR, 2002]. Das Glutamat wird in Astrozyten über die Glutamin-

Synthetase in Glutamin umgewandelt und kann nach der Ausscheidung in den extrazellulären Raum erneut von Neuronen aufgenommen und nach Umwandlung über die Glutaminase wieder als Glutamat in synaptische Vesikel verpackt werden (Abbildung 1.8).

Die exzitatorische Aminosäure Glutamat und das extrazelluläre Kalium tragen - neben den hohen intrazellulären $Na^+$- und $Ca^{2+}$-Konzentrationen - ebenfalls einen wesentlichen Beitrag zur Erzeugung einer Cortical Spreading Depression und zum parallel stattfindenden gefäßverengenden bzw. -erweiternden Effekt. Der vaskuläre Anteil der Migräne-Aura, die Gefäßdysfunktion, kann heutzutage sehr erfolgreich mit Hilfe von sogenannten „**Neuroimaging-Techniken**" untersucht werden [SCHWEDT und DODICK, 2009]. Neurologen verwenden diverse Verfahren zur *in vivo*-Untersuchung der sich in den entsprechenden Hirnarealen pathologisch ereignenden Prozesse. Einige der häufig angewendeten Verfahren, die zur Charakterisierung der CSD herangezogen werden, seien an dieser Stelle kurz erwähnt. Die Magnetresonanzspektroskopie (MRS, *Magnetic Resonance Spectroscopy*) basiert beispielsweise auf dem Verfahren der Kernspinresonanz (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) und kann hervorragend *in vivo* durchgeführt werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit die biochemischen Informationen des Gewebes zu erforschen und somit die Unterschiede zu den physiologischen Gegebenheiten zu erhalten. In Kombination mit der Magnetresonanztomographie (MRT bzw. MRI, *Magnetic Resonance Imaging*) kann die MRS sehr gut dazu eingesetzt werden, um Informationen zur metabolischen Funktion der Neuronen zur Verfügung zu stellen. Um detaillierte Struktur-Funktions-Beziehungen innerhalb des Gehirns messen zu können, wurde das gegenüber der Computer-Tomographie kontrastreichere MRT-Verfahren verbessert. Zu den speziellen Weiterentwicklungen gehören die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT oder fMRI, *functional Magnetic Resonance Imaging*) und die „BOLD"-Methode (*Blood Oxygen Level Dependency*) [HADJIKHANI et al., 2001, CAO et al., 2002]. Wie die Bezeichnung „*blood oxygen*" bereits andeutet, ist es mit dieser Methode möglich die Durchblutung von Organen und Geweben gezielt zu betrachten, indem die magnetischen Eigenschaften vom Hämoglobin und dessen Sauerstoffbeladung kernspintomografisch erfasst werden. Während mit Sauerstoff beladenes Hämoglobin sich diamagnetisch verhält, zeigt die ungeladene Form ein paramagnetisches Verhalten. Mithilfe dieser Methode können durch die Bestimmung der veränderten Diffusionsverhalten, die bei Erkrankungen im Gehirn vorliegen, Rückschlüsse auf die Neuronenaktivität gezogen werden. Lokale Änderungen der Gehirnaktivität lassen sich somit millimetergenau messen.

Für die dynamischen Regulationen des Blutflusses innerhalb des Gehirns wurde der medizinische Ausdruck „Hämodynamik" eingeführt. Das Prinzip der fMRT bzw. des BOLD-Verfahrens beruht auf diesen hämodynamischen Reaktionen. Hierunter fallen, wie bereits oben erläutert, die Erregung von Neuronen, die Freisetzung von Glutamat, dessen Bindung an den NMDA-Rezeptor, den Calciumeinstrom in die Zelle und schließlich die über mehrere Kaskaden ablaufenden $Ca^{2+}$-aktivierten

Prozesse bis hin zur Blutgefässerweiterung und dem dadurch bedingten gesteigerten Blutfluss („Hyperämie“) [ROSSI, 2006, TAKANO et al., 2006].

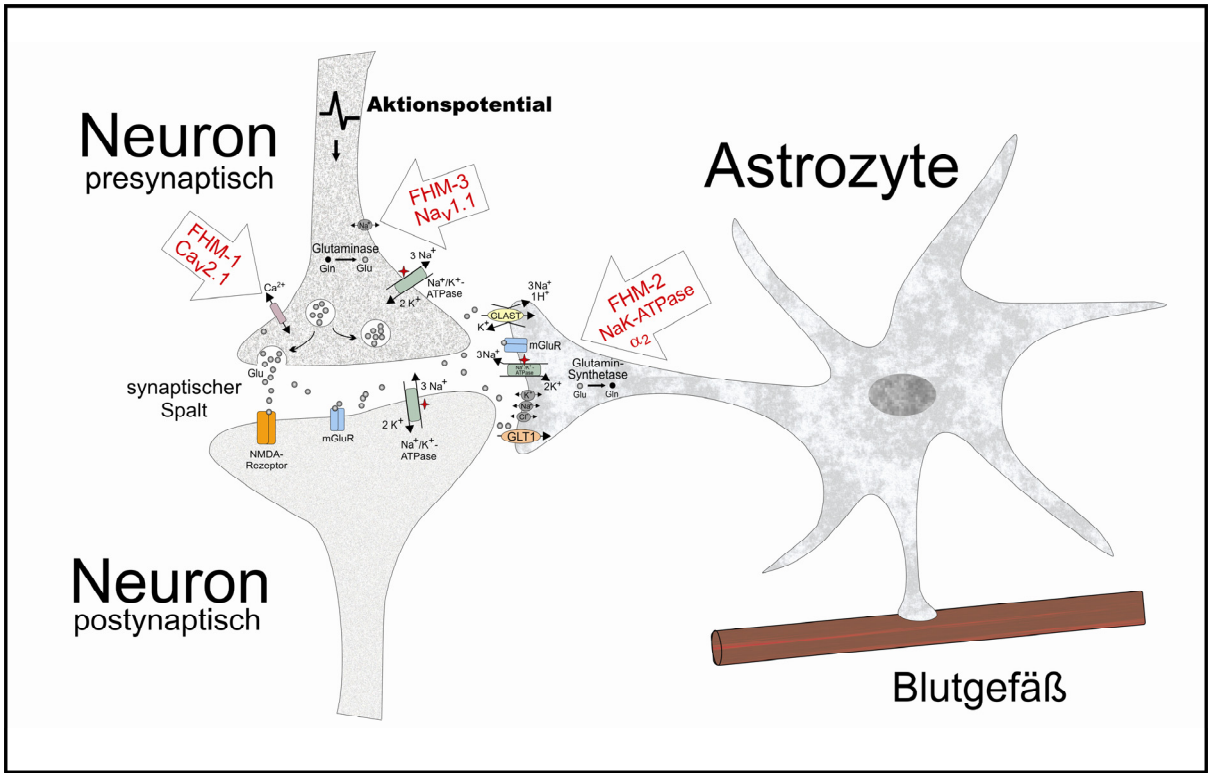



Abbildung 1.8 a

Schematische Darstellung zweier Neuronen (prä- und postsynaptisch), dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt und einer angrenzenden Astrozyte. Eingezeichnet sind unter anderem die drei FHM-verursachenden Proteine $Ca_v2.1$ ($\alpha_1$-Untereinheit des spannungsabhängigen P/Q-Typ-Calciumkanals, FHM-1), $Na_v1.1$ ($\alpha_1$-Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals, FHM-3) und die $Na^+/K^+$-ATPase ($\alpha_2$-Untereinheit, FHM-2). Mutationen in allen drei Proteinen scheinen zu einer erhöhten neuronalen Hypererregbarkeit (Exzitabilität) zu führen und dadurch an der Entstehung und Fortleitung der kortikalen Streudepolarisation beteiligt zu sein. Die funktionellen Folgen aller FHM-Mutationen sind im Einzelnen recht komplex, doch allgemein werden FHM-1- und FHM-3-Mutationen zu „gain-of-function“-Mutationen gezählt und FHM-2-Mutationen zu „loss-of-function“-Mutationen. Bei einem „Funktionsgewinn“ wird die erhöhte neuronale Exzitabilität durch veränderte Kanalkinetik erreicht, was die Absenkung des Schwellenpotentials zu negativeren Spannungen und/oder die Erhöhung der Leitfähigkeit für $Na^+$- (FHM-3, *SCN1A*) bzw. $Ca^{2+}$-Ionen (FHM-1, *CACNA*) zur Folge hat. Die gesteigerte $Ca^{2+}$- bzw. $Na^+$-Aktivierung bewirkt über eine verlängerte Depolarisation die erhöhte Erregbarkeit. FHM-2-Mutationen hingegen weisen einheitlich auf einen Funktionsverlust der $Na^+/K^+$-ATPase hin. Aufgrund der eingeschränkten bzw. dem völligen Verlust der Funktion kommt es intrazellulär zur $K^+$- und extrazellulär zur $Na^+$-Anreicherung. Hier wird die kortikale Streudepolarisation zum einen über die direkte Depolarisation der Neuronen (erhöhte $[K^+]_{int}$) oder durch die Beteiligung des Glutamat-Transporters und/oder des $Na^+/Ca^{2+}$-Austauschers (erhöhte $[Glutamat]_{int}$ bzw. $[Ca^{2+}]_{int}$) begünstigt.

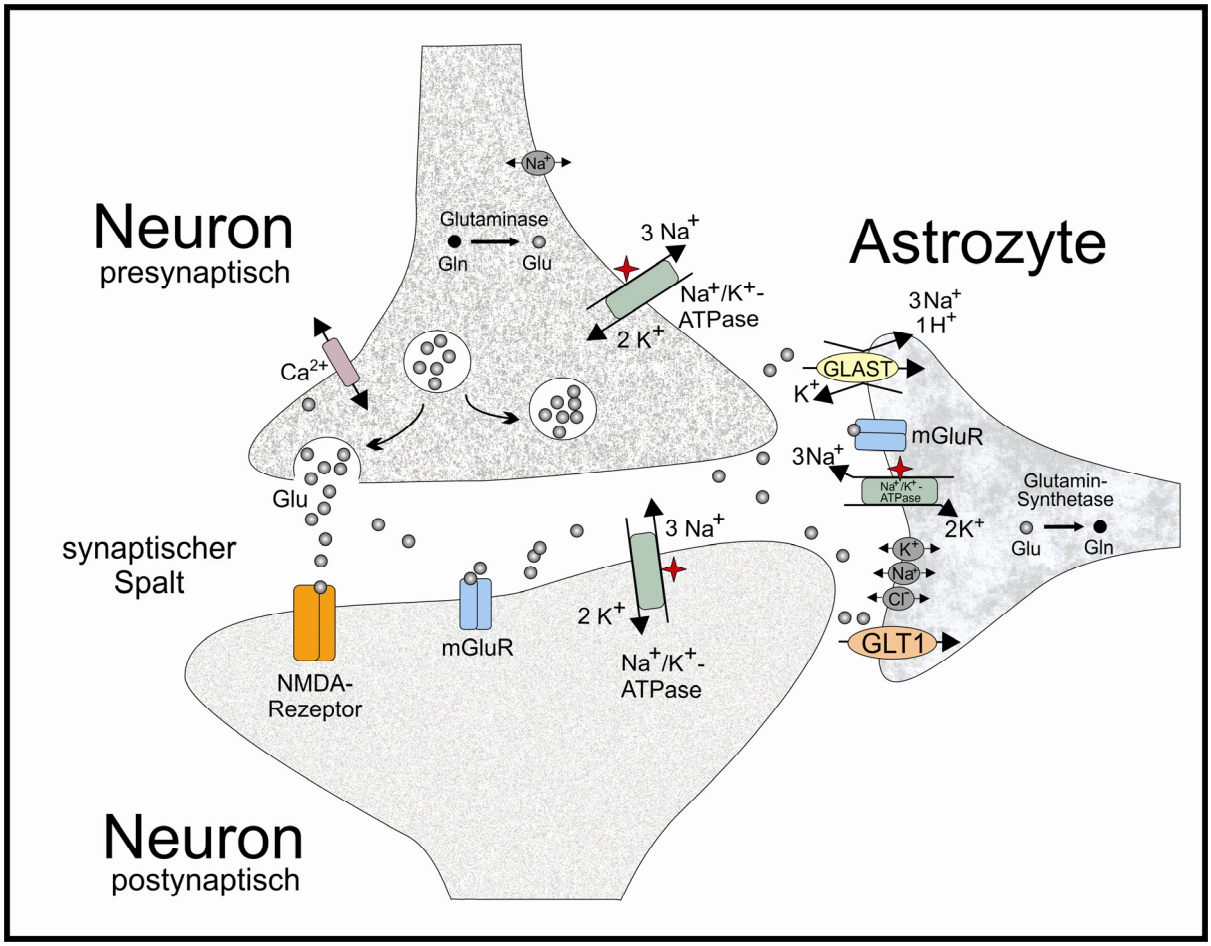



Abbildung 1.8 b

Schematische Darstellung zweier Neuronen (prä- und postsynaptisch), dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt und einer angrenzenden Astrozyte. Bei Eintreffen eines Aktionspotentials im präsynaptischen Neuron kommt es zur Aktivierung der spannungsgesteuerten $Ca^{2+}$-Kanäle. Durch den dadurch veranlassten $Ca^{2+}$-Einstrom wird die Freisetzung der Aminosäure Glutamat aus synaptischen Vesikeln bewirkt. Das Glutamat wird entweder über den NMDA-Rezeptor postsynaptisch oder über den Glutamat-Transpoter GLAST in Astrozyten aufgenommen. Dieser Transporter ist vom Natriumgradienten der Astrozytenmembran abhängig, der von der $Na^+/K^+$-ATPase aufgebaut und aufrechterhalten wird (rote Sterne = ATP-getrieben).

In Zusammenhang mit der CSD wurden zwei Proteine entdeckt, die während bzw. im Anschluss an die Depolarisation vermehrt im Kortex anzutreffen sind: das Galanin (LIU und HOKFELT, 2002), das imstande ist diverse Neurotransmitter freizusetzen, und das Matrixmetalloproteinase-9 (GURSOY-OZDEMIR et al., 2004), dessen überhöhte Produktion zu Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke führt. Diese beiden Proteine leiten einen entzündungsfördernden Prozess ein, wobei unklar ist, wie dies zu einer Aktivierung des trigeminalen Systems führt [SANCHEZ DEL RIO und REUTER, 2004].

Ferner existiert eine überschaubare Anzahl weiterer Erkrankungen, die mit der CSD in Beziehung gebracht werden. Dazu gehören das Schädelhirntrauma [MAYEVSKY, 1996], der ischämische Schlaganfall (Hirninfarkt) [NEDERGAARD und ASTRUP, 1986], die Hypoglykämie (niedriger Blutzuckerspiegel) [ASTRUP und NORBERG, 1976] und die Epilepsie [LEÃO, 1944]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der CSD in Verbindung mit der familiären hemiplegischen Migräne, insbesondere des Typs 2.

### 1.2.4 Familiäre Hemiplegische Migräne Typ 2, FHM-2

Die ersten Mutationen, die mit FHM-2 assoziiert wurden, sind im Jahr 2003 veröffentlicht worden (DE FUSCO et al., 2003). Mittlerweile ist die Existenz von etwa 50 Mutationen im Gen *ATP1A2* bekannt (Tabelle 1.6, Abbildung 1.9). Die meisten von ihnen sind Missense-Mutationen, die durch die Substitution einer einzelnen – fast ausschließlich hochkonservierten – Aminosäure hervorgerufen werden. Auffallend bevorzugt werden Arginine ausgetauscht (besonders häufig gegen Histidin, Glutamat und Tyrosin). Arginin tritt aber auch vermehrt als Substituent auf, gefolgt von Histidin, Lysin und Glutamin (Tabelle 1.6). Der Argininanteil der $\alpha_2$-Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase liegt bei knapp 5 % des Aminosäurebestands.

Die Mehrzahl der Aminosäureaustausche ist in der großen intrazellulären Schleife L4/5 (*L* = *loop*) vorzufinden, in der sich das DKTG-Motiv befindet, und in der extrazellulären Schleife L7/8, die an der Bindung der akzessorischen β-Untereinheit beteiligt ist. Betroffen sind aber auch der N- und der C-Terminus (Abbildung 1.9 und 1.10). Spätestens seit der Veröffentlichung von Morth und Kollegen wird dem C-Terminus der α-Untereinheit bei der Bildung der dritten Kationen-Bindungsstelle eine wichtige Rolle zugeschrieben. Es wird vorgeschlagen, dass die dritte Bindungsstelle durch Wechselwirkungen des C-Terminus mit der Transmembrandomäne TM5 und der Schleife zwischen TM8 und TM9 gebildet wird [MORTH et al., 2007]. Die letzten beiden hochkonservierten Tyrosine im KETYY-Motiv (das exakt vor dem Stopp-Signal lokalisiert ist) interagieren mit positiv geladenen Resten: K766 ($\alpha_1$TM5) und R933 (Schleife in 8-9). Dieses Arginin an Position 933 entspricht in der $\alpha_2$-Isoform R937, das interessanterweise als Locus für eine FHM2-Mutation bekannt ist (R937P).

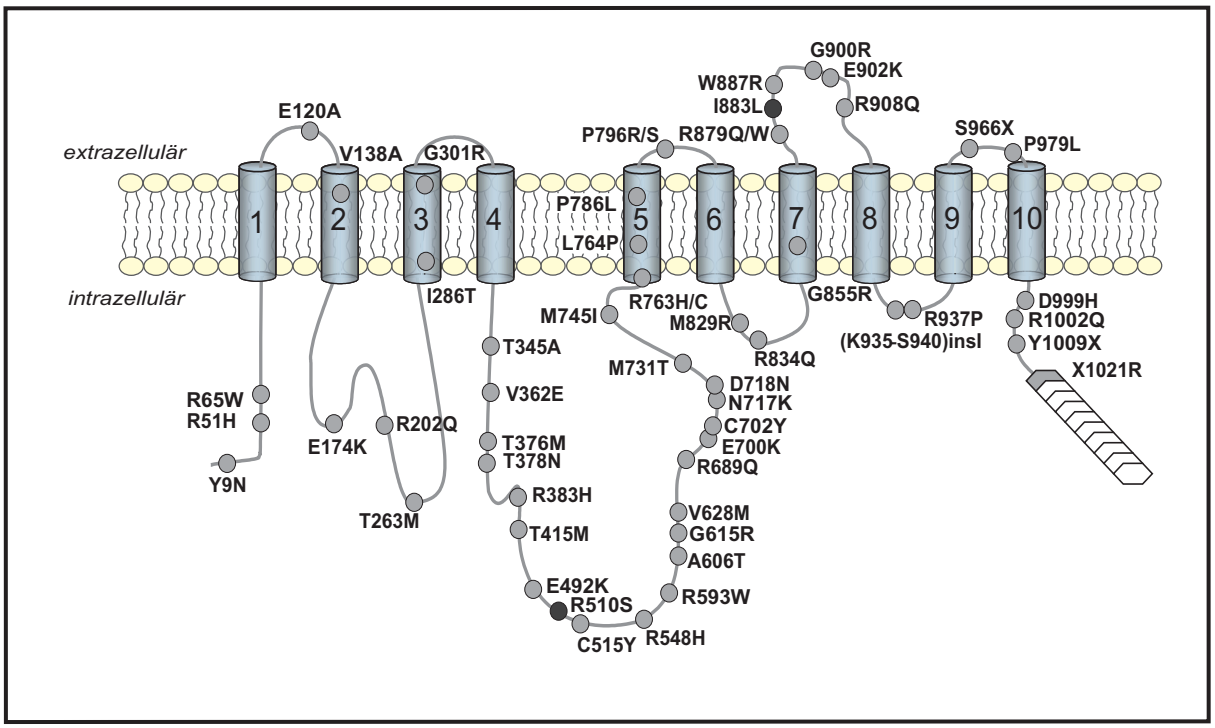



Abbildung 1.9

Schematische Darstellung der $Na^+/K^+$-ATPase und den bisher im Gen *ATP1A2* humangenetisch identifizierten Mutationen (Stand April 2010). Bläuliche Zylinder stellen die zehn Transmembrandomänen der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit dar, die in der Plasmamembran integriert vorliegen. Bislang entdeckte Mutationen sind als graue Kreise dargestellt. Die Mutation X1021R, die das Stopp-Codon betrifft (graue Wabe) enthält 28 zusätzlich angefügte Aminosäuren (weiße Waben). Die beiden Polymorphismen (nicht krankheitsbedingte Sequenzvariationen) R510S und I883L sind in dunklem Grau abgebildet.

Mediziner und Humangenetiker sprechen im Falle der FHM-2 von einer Haploinsuffizienz, was zum Ausdruck bringt, dass die Mutation zwar auf einem Allel vorliegt, es aber dennoch zu einer Dominanz dieses genetisch veränderten Allels führt. Mittels so genannter "Cell Survival Assays", die auf dem Expressionssystem menschlicher Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen, ***He****nrietta* ***La****cks*) basieren, wurden einige der entdeckten Mutationen hinsichtlich der Überlebensfähigkeit in Anwesenheit von Ouabain charakterisiert. Bei Behandlung von transient transfizierten Zellen mit Ouabain zeigt die Ouabain-insensitive Form (Oua-R) normales Wachstum, wohingegen die Ouabain-sensitive (Oua-S) Form eine beachtlich reduzierte Lebenszeit aufweist. Wenn nun eine Ouabain-insensitive Mutation in Gegenwart des Inhibitors kultiviert wird, so wird die endogene Pumpe vollständig inhibiert und das Überleben der Zellen hängt von der Funktionalität des exogen exprimierten Enzyms ab. Auf diese Weise lassen sich Aussagen darüber treffen, wie stark die Enzymfunktion durch die Mutation beeinträchtigt wird. Weitergehende funktionelle Untersuchungen wurden hingegen lediglich an einer unbeträchtlichen Anzahl an ATP1A2-Mutationen durchgeführt.

| Mutation | Mutationsart | Phänotyp | Lokalisation | Referenz |
|---|---|---|---|---|
| **Y9N** | Punktmutation | SHM | A-Domäne | THOMSEN et al., 2008 |
| **R51H** | Punktmutation | MO | A-Domäne | CASTRO et al., 2004 |
| **R65W** | Punktmutation | FHM | A-Domäne | TONELLI et al., 2007 |
| **E120A** | Punktmutation | SHM | Loop zw. TM1-2 | DE VRIES et al., 2007 |
| **V138A** | Punktmutation | FHM | TM2 | THOMSEN et al., 2007 |
| **E174K** | Punktmutation | MA/MO | A-Domäne | TODT et al., 2005 |
| **R202Q** | Punktmutation | FHM | A-Domäne | HANSEN et al., 2008 |
| **T263M** | Punktmutation | FHM | A-Domäne | RIANT et al., 2005 |
| **I286T** | Punktmutation | FHM | TM3 | VANMOLKOT et al., 2007 |
| **G301R** | Punktmutation | FHM | TM3 | SPADARO et al., 2004 |
| **T345A** | Punktmutation | FHM | P-Domäne | KAUNISTO et al., 2004, SEGALL et al., 2004 |
| **V362E** | Punktmutation | FHM | P-Domäne | CASTRO et al., 2008 |
| **T376M** | Punktmutation | FHM | P-Domäne | RIANT et al., 2005 |
| **T378N** | Punktmutation | FHM AHC | P-Domäne | BASSI et al., 2004, SWOBODA et al., 2004 |
| **R383H** | Punktmutation | SHM | N-Domäne | JURKATT-ROTT et al., 2004 |
| **T415M** | Punktmutation | FHM | N-Domäne | VANMOLKOT et al., 2007 |
| **E492K** | Punktmutation | SHM | N-Domäne | DE VRIES et al., 2007 |
| **R510S** | Polymorphismus | - | N-Domäne | THOMSEN et al., 2007 |
| **C515Y** | Punktmutation | MA/MO | N-Domäne | TODT et al., 2005 |
| **R548H** | Punktmutation | BM/MA | N-Domäne | AMBROSINI et al., 2005 |
| **R593W** | Punktmutation | FHM | P-Domäne | VANMOLKOT et al., 2006a |
| **A606T** | Punktmutation | FHM | P-Domäne | RIANT et al., 2005, JEN et al., 2007 |
| **G615R** | Punktmutation | FHM & MR | P-Domäne | VANMOLKOT et al., 2006b |
| **V628M** | Punktmutation | FHM | P-Domäne | VANMOLKOT et al., 2006a |
| **R689Q** | Punktmutation | FHM & BFIC | P-Domäne | VANMOLKOT et al., 2003, SEGALL et al., 2005 |
| **E700K** | Punktmutation | FHM | P-Domäne | PIERELLI et al., 2006 |
| **C702Y** | Punktmutation | MA/MO & Epilepsie | P-Domäne | DEPREZ et al., 2007 |
| **N717K** | Punktmutation | SHM | P-Domäne | JEN et al., 2007 |
| **D718N** | Punktmutation | FHM | P-Domäne | JURKATT-ROTT et al., 2004 |
| **M731T** | Punktmutation | FHM, BFIC | P-Domäne | VANMOLKOT et al., 2003, SEGALL et al., 2005, CASTRO et al., 2007 |
| **M745I** | Punktmutation | SHM | P-Domäne | THOMSEN et al., 2008 |
| **R763H/C** | Punktmutation | FHM | TM5 | JURKATT-ROTT et al., 2004, THOMSEN et al., 2007 |
| **L764P** | Punktmutation | FHM | TM5 | DE FUSCO et al., 2003, KOENDERINK et al., 2005 |
| **P786L** | Punktmutation | SHM | TM5 | DE VRIES et al., 2007 |
| **P796R/S** | Punktmutation | FHM | Loop zw. TM5-6 | JURKATT-ROTT et al., 2004, CASTRO et al., 2008 |
| **M829R** | Punktmutation | FHM | Loop zw. TM6-7 | RIANT et al., 2005 |
| **R834Q/X** | Punktmutation | FHM/SHM | Loop zw. TM6-7 | RIANT et al., 2005, DE VRIES et al., 2007 |
| **G855R** | Punktmutation | FHM & Fieberkrämpfe | TM 7 | DE VRIES et al, 2009 |
| **R879Q/W** | Punktmutation | SHM | Loop zw. TM7-8 | THOMSEN et al., 2008 |
| **I883L** | Polymorphismus | - | Loop zw. TM7-8 | JURKATT-ROTT et al., 2004 |
| **W887R** | Punktmutation | FHM | Loop zw. TM7-8 | DE FUSCO et al., 2003, KOENDERINK et al., 2005 |
| **G900R** | Punktmutation | FHM & Epilepsie | Loop zw. TM7-8 | DEPREZ et al., 2007 |
| **E902K** | Punktmutation | FHM | Loop zw. TM7-8 | JURKATT-ROTT et al., 2004 |
| **R908Q** | Punktmutation | SHM | Loop zw. TM7-8 | DE VRIES et al., 2007 |
| **del(K935-S940)insI** | Deletion & Insertion | FHM | TM8-9 | RIANT et al., 2005 |
| **R937P** | Punktmutation | FHM | TM8-9 | RIANT et al., 2005 |
| **S966X** | Frameshift | FHM | Loop zw. TM9-10 | RIANT et al., 2005 |
| **P979L** | Punktmutation | FHM | Loop zw. TM9-10 | JURKATT-ROTT et al., 2004 |
| **D999H** | Punktmutation | FHM | C-Terminus | FERNANDEZ et al., 2008 |
| **R1002Q** | Punktmutation | FHM | C-Terminus | JEN et al., 2007 |
| **Y1009X** | Punktmutation | SHM | C-Terminus | MORTH et al., 2007, GALLANTI et al., 2008 |
| **X1021R** | Elongation | FHM | Stopp-Codon | JURKATT-ROTT et al., 2004 |

Tabelle 1.6 Bisher entdeckte FHM2- und SHM-Mutationen und ihre topologische Lokalisation (April 2010).

In ersten funktionellen Untersuchungen von FHM2-Mutanten (L764P und W887R) an *Xenopus laevis*-Oozyten konnte ein kompletter Funktionsverlust nachgewiesen werden, obwohl die charakteristische Expression in der Plasmamembran nicht beeinträchtigt war [DE FUSCO et al., 2003, KOENDERINK et al., 2005]. Segall und Kollegen zeigten anhand drei weiteren Mutationen, dass die heterolog exprimierten $Na^+/K^+$-ATPase-Mutanten zwar enzymatisch aktiv waren, jedoch teilweise mit veränderten Eigenschaften. Beispielsweise hatte T345M eine geringere, während R689Q und M731T eine höhere apparente Affinität für $K^+$-Ionen aufwiesen [SEGALL et al., 2004, 2005]. Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym zeigten die beiden letztgenannten Mutationen reduzierte katalytische Wechselzahlen (*turnover number*, Einheit in $s^{-1}$), was bedeutet, dass die Anzahl der Pumpzyklen pro Zeiteinheit herabgesetzt ist.

Bislang fehlt noch das Verständnis für die pathophysiologischen Konsequenzen von FHM2-Mutationen im *ATP1A2*-Gen. Um die miteinander verzahnten Mechanismen und Zusammenhänge verstehen zu können, bedarf es weiterer intensiver Untersuchungen der Ursachen auf molekularer Ebene.

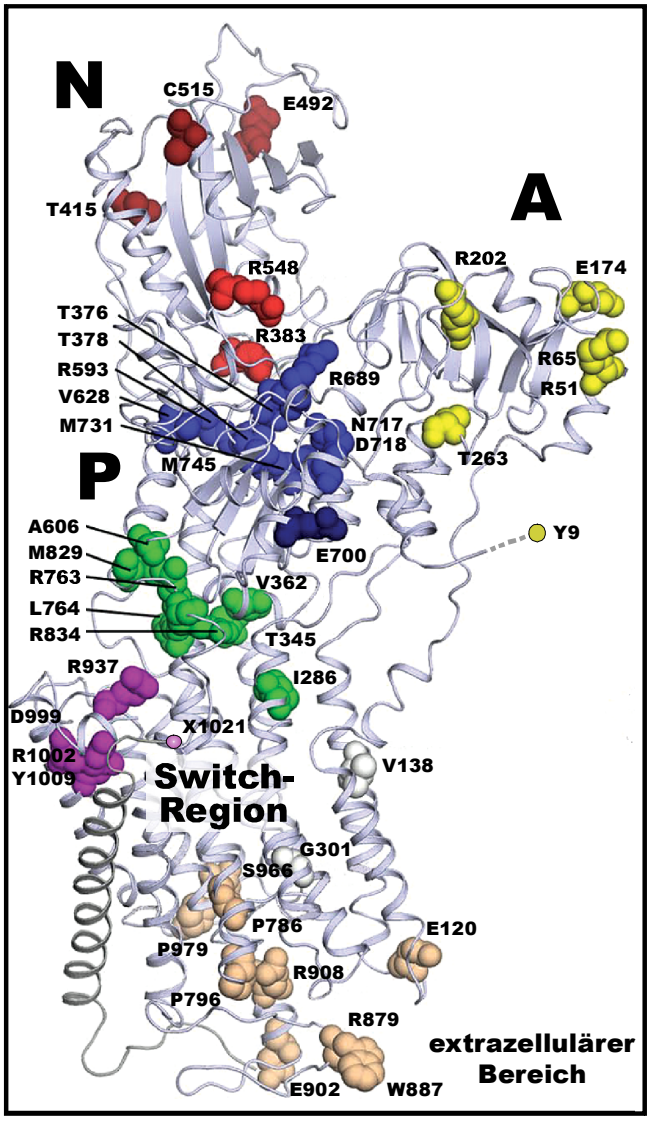



Abbildung 1.10

Strukturelle Darstellung der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit inklusive der FHM2- und SHM-Mutationen. Die Farbgebung spiegelt die einzelnen Regionen wider: gelb markierte Mutationen befinden sich in der A-Domäne, rote in der N-Domäne und blaue in der P-Domäne, grüne in der Übergangsstelle zwischen der Transmembran-Region und der P-Domäne. Violett dargestellt ist die sogenannte „Switch-Region", in der sich auch der C-Terminus befindet. Weiß eingezeichnete Mutationen kommen in der Transmembran-Region vor und die beigefarbenen befinden sich im extrazellulären Bereich. Die Kristallstruktur ist in der Protein-Datenbank RCSB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*) als PDB-Datei mit der Bezeichnung 3B8E hinterlegt. Die hier abgebildete $Na^+/K^+$-ATPase-Kristallstruktur basiert auf der Veröffentlichung von Morth und Kollegen aus dem Jahr 2009 [Philosophical Transactions of The Royal Society 364, 217-227, 2009].

## 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Antriebskraft des Menschen, das Wissen durch Forschung zu erweitern, ist ihm von Anbeginn der Menschheitsentwicklung gegeben, genauso wie der Drang, Krankheiten verstehen und heilen zu können. Mit Hilfe von neu erworbenen medizinischen Erkenntnissen und technischen Erneuerungen kann der Mensch in immer tiefere Bereiche des täglichen Lebens eindringen. Herausragende Projekte, wie das Humangenomprojekt, erlauben es Humangenetikern, Erbkrankheiten zu erforschen und molekulare Mechanismen der Entstehung besser zu verstehen.

Seit Entdeckung verschiedener Gendefekte, die für gewisse Migräneformen verantwortlich sind, wie beispielsweise die familiäre hemiplegische Migräne, ist es von großem Interesse die komplexen Vorgänge im menschlichen Körper zu erfassen. Mutationen, die sich im Gen *ATP1A2* befinden, das die $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit kodiert, führen zur Erkrankung an der familiären hemiplegischen Migräne des Typs II (FHM2). In diesem Zusammenhang ist auch die $Na^+/K^+$-ATPase wieder näher in den Fokus der Forscher gerückt. Bisher ist von den bislang entdeckten FHM2-Mutationen lediglich ein kleiner Anteil funktionell im Detail untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit ist es, Mutationen aus funktionell und strukturell relevanten Domänen der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit mittels verschiedener Methoden zu charakterisieren. Zu diesem Zweck kommen neben der elektrophysiologischen Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik außerdem biochemische Verfahren sowie Transportmessungen zum Einsatz. Von der Mutation bis hin zum

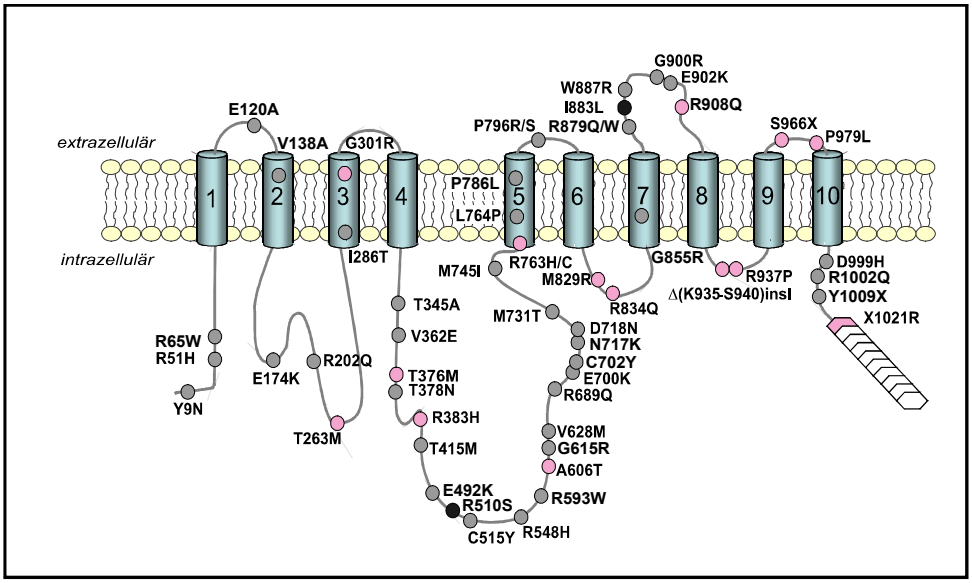



Abbildung 1.11

Schematisierte Darstellung der $Na^+/K^+$-ATPase und der im entsprechenden Gen *ATP1A2* vorkommenden Mutationen. Die blauen Zylinder stellen die zehn Transmembrandomänen der $Na^+/K^+$-ATPase dar, die in die Plasmamembran integriert sind. Von den bisher entdeckten ~50 Mutationen (magentafarbene und graue Kreise) sind diejenigen in Magenta unterlegt, die in dieser Arbeit näher betrachtet werden. Die Mutation, die das Stopp-Codon betrifft (magentafarbene Raute) enthält 28 zusätzlich angefügte Aminosäuren (weiße Rauten). Die Polymorphismen R510S und I883L sind in dunklem Grau dargestellt.

Kopfschmerz gibt es zahlreiche, bislang unbekannte Kaskaden. Mittels Struktur-Funktions-Untersuchungen soll ein tieferer Einblick in die Zusammenhänge gewonnen werden. In Abbildung 1.11 sind die für diesen Zweck selektierten 14 FHM2-Mutationen aufgeführt. Neben gewöhnlichen Punktmutationen, sind ebenso Mutationen ausgewählt, die nicht nur einzelne Basen bzw. Aminosäuren betreffen, sondern auch größere Abschnitte, die durch Deletionen bzw. Additionen auftreten. Seit der vor kurzem veröffentlichten $Na^+/K^+$-ATPase-Kristallstruktur ist es nun auch möglich, eine ausführlichere Einsicht in die strukturellen Eigentümlichkeiten des ionentransportierenden Enzyms zu erlangen.

# *Materialien & Methoden*

# 2 Materialien & Methoden

## 2.1 Molekularbiologische Methoden und *Xenopus laevis*-Oozyten-Präparation

### 2.1.1 Herstellung der cDNA-Konstrukte

Die cDNA-Konstrukte der beiden Untereinheiten $\alpha_2$ und $\beta_1$ der humanen $Na^+/K^+$-ATPase sowie Mutanten wurden durch rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) und in besonders schwierigen Fällen mittels des QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, La Jolla, CA, USA) erhalten. Die PCR-Fragmente wurden in den für die Oozytenexpression optimierten Vektor pCDNA3.1 kloniert (IonGate Biosciences, Frankfurt am Main). Nach der Ligation des Vektors mit dem Insert im Verhältnis 3:1 (Rapid DNA Ligation Kit, Roche, Mannheim) erfolgte die Transformation in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen (rekombinante PCR: „XL1-Blue Competent Cells", „QuikChange: XL10-Gold Ultracompent Cells" von Stratagene, La Jolla, CA, USA). Im Anschluss an die Gewinnung der Plasmid-DNA wurden die Konstrukte per Sequenzierung (Eurofins MWG Operon in Ebersberg) verifiziert.

Um die endogene von der heterolog-exprimierten $Na^+/K^+$-ATPase unterscheiden zu können, wurden die Mutationen Q116R und N127D in die $\alpha_2$-Untereinheit eingefügt, wodurch eine Ouabain-resistente Form ($IC_{50}$ im mM Bereich) erzeugt wurde [PRICE und LINGREL, 1988]. Dieses Konstrukt wird als (hum. Na/K$\alpha_2$-) WT bezeichnet und für die entsprechenden Mutagenesen verwendet, sofern nicht anders angegeben. Die untersuchten Konstrukte wurden nach ihrer Aminosäure-Substitution benannt, wie zum Beispiel T263M.

### 2.1.2 Partielle Ovarektomie und Oozytenbehandlung

Weibliche Tiere der Spezies *Xenopus laevis* (Abbildung 2.1) wurden mit 0,2 %igem Tricain pH 7,0 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) anästhesiert, und durch einen 10 – 15 mm langen Schnitt am ventralen Abdominalbereich wurde jeweils ein Teil des Ovargewebes (einige $cm^3$) entnommen.

Um die Oozyten zu vereinzeln (Abbildung 2.2), wurde das ovarielle Gewebe einer Kollagenase-Behandlung unterzogen. Hierfür wurden die mit Bindegewebe umhüllten Oozyten in 1 ml Kollagenase Typ 1A aus *Clostridium histolyticum* [20 mg/ml], 1 ml Trypsin-Inhibitor Typ III-O aus Hühnereiweiß [10 mg/ml] und 8 ml $Ca^{2+}$-freie Oozyten-Ringer-Lösung ORI-$Ca^{2+}$ (110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 5 mM HEPES, pH7,4) eingelegt und für 3 - 4 Stunden bei ca. 18°C sehr vorsichtig geschwenkt.

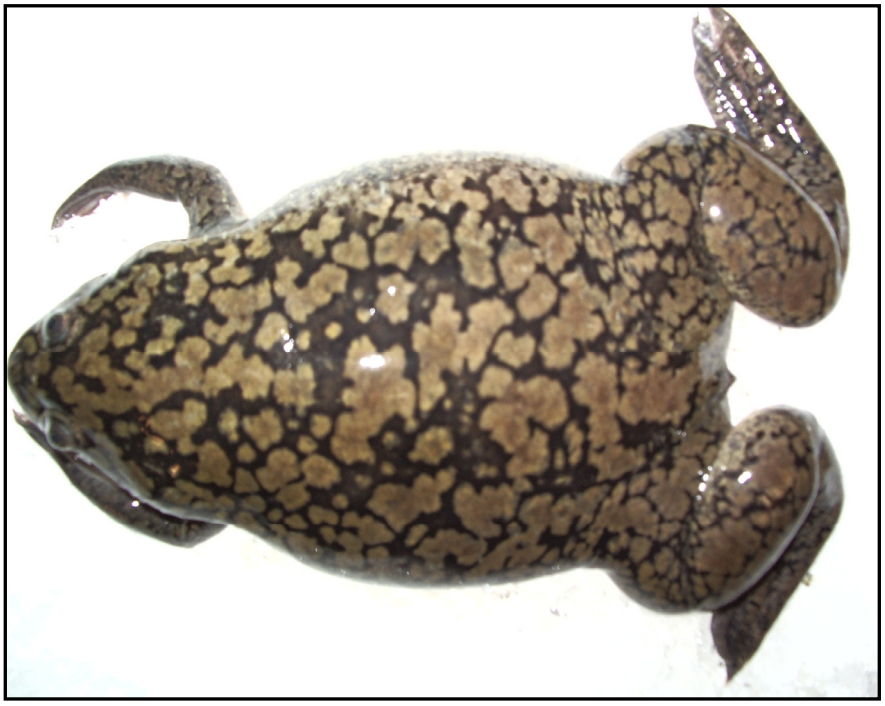


Abbildung 2.1

Weibliches Individuum der Spezies *Xenopus laevis* (afrikanischer Krallenfrosch). Die adulten Tiere können eine Kopf-/Steiß-Länge von bis zu 13 cm erlangen und erreichen in freier Natur ein Alter von etwa 15 bis 25 Jahren. Trotz ihrer aquatischen Lebensweise (seichte Gewässer und Tümpel) handelt es sich bei dieser Amphibien-Klasse um Lungenatmer, die regelmäßig an der Wasseroberfläche durch Schluckatmung Luft holen.



Abbildung 2.2

Oozyten eines weiblichen Krallenfrosches im Stadium V mit einem Durchmesser von etwa 1 bis 1,2 mm. Die helle Hälfte ist der schwere, dotterhaltige Anteil der Oozyte, die als „vegetaler Pol“ bezeichnet wird, während die dunkle Hälfte leicht zytoplasma- und ribosomenreich ist und den „animalen Pol“ darstellt.

### 2.1.3 cRNA-Synthese und -Injektion

Nach Linearisieren der Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Xba I* wurde die Synthese der zu injizierenden cRNA (kodierende Ribonukleinsäure, *complementary ribonucleic acid*) mit dem mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit (Ambion, Austin, TX, USA) durchgeführt. Pro Oozyte der Stadien V und VI [DUMONT, 1972] mit einem Durchmesser von ca. 1 - 1,2 mm (Follikelschicht-frei) wurden 25 ng der $\alpha_2$-Untereinheit- und 2,5 ng der $\beta_1$-Untereinheit-cRNA injiziert. Die Oozyten wurden in einer Gentamycin-haltigen (50 mg/l) ORI+$Ca^{2+}$-Lösung für 3 - 5 Tage bei 18°C aufbewahrt.

## 2.2 Proteinbiochemische und zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung von Plasmamembranfragmenten

Die Durchführung der Plasmamembran-Präparation erfolgte bis auf kleine Modifikationen nach der Methode von Kamsteeg und Deen [KAMSTEEG und DEEN, 2001]. In einer MBSS-Lösung (20 mM MES, 80 mM NaCl, pH 6,0) inklusive 1 %iger kolloidaler Quarz-Kügelchen (*beads*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurden 8 -12 Oozyten für 30 Minuten bei 4°C rotiert. Nach zweimaligem Waschen mit MBSS-Lösung wurden die Oozyten erneut für 30 Minuten rotiert. Die MBSS-Lösung für den zweiten Rotationsschritt enthielt außerdem 0,1 %ige Polyacrylsäure (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nach zwei weiteren Waschschritten mit einer MBS-Lösung (*Modified Barth's Solution*, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 0,82 mM $MgSO_4$, 0,33 mM $Ca(NO_3)_2$, 0,41 mM $CaCl_2$, pH 7,4) [BARTH und BARTH, 1959] wurden die noch intakten Oozyten in je 1,5 ml HbA-Lösung homogenisiert, die mit Complete® Protease-Inhibitoren (1 Tablette/50 ml, Roche Applied Science, Mannheim) versetzt war. Anschließend wurde insgesamt viermal zentrifugiert, wobei die Beschleunigung von 10xg (die ersten beiden Zentrifugationen) über 20xg (dritte Zentrifugation) bis zu 40xg erhöht wurde. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt enthielt der Überstand den Großteil des zellulären Membrananteils, weshalb der Überstand (1,3 ml) auch zur Weiterverwendung für eine Totalmembran-Präparation aufbewahrt wurde (siehe unten). Bei den darauffolgenden drei Zentrifugationsschritten wurde je 1 ml des Überstandes verworfen und mit 1 ml HbA-Puffer aufgefüllt. Die nach der letzten Zentrifugation in den verbliebenen 200 µl enthaltenen Beads wurden bei 4°C mindestens für 30 Minuten bei 16000xg pelletiert. Das Pellet wurde mit 4 µl Laemmli-Puffer [LAEMMLI, 1970] für jede in die Präparation eingegangene Oozyte resuspendiert.

### 2.2.2 Präparation der Totalmembranfraktion

Die aufbewahrten 1,3 ml des Überstandes (nach der allerersten Zentrifugation bei 10xg aus der Plasmamembran-Präparation) wurden für die Analyse des zellulären Proteinanteils verwendet. Einer dreiminütigen Zentrifugation bei 2000xg und 4°C folgte eine weitere für 30 Minuten bei 16000xg. Die resultierenden Pellets wurden ebenfalls in je 4 µl Laemmli-Puffer pro Oozyte gelöst.

### 2.2.3 HEK293FT-Zellen: Transfektion und Gewinnung von Ganzzell-Lysaten

Für die Zellkultur wurde eine $\alpha_2$-Untereinheit der humanen $Na^+/K^+$-ATPase eingesetzt, die am N-Terminus mit einem HA-Tag markiert war. Diese neun Aminosäure lange Sequenz "YPYDVPDYA" wurde ebenfalls durch die rekombinante Polymerase-Kettenreaktion zwischen dem Start-Methionin und dem offenen Leserahmen (*ORF, open reading frame*) eingefügt. Die beiden humanen $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$- und $\beta_1$-Untereinheiten wurden mit Hilfe von Lipofectamine™ 2000-Reagenzien (Invitrogen, Carlsbad, CA) in einem Verhältnis 1:1 in HEK293FT-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden in einem DMEM/Glutamax-Medium in 10 cm-Petrischalen unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 10 µM Ouabain bis zu einer 70 %igen Konfluenz kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in zwei Fraktionen unterteilt. Eine der beiden Fraktionen wurde bei einer Temperatur von 28°C und die andere bei 37°C inkubiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber (in PBS) abgeerntet. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 2000xg wurde der Überstand vorsichtig verworfen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das nach einer zweiten Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mit einem äquivalenten Volumen Lyse-Puffer (30 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X, 10 % Glyzerol, 2 mM DDT, 200 µM PMSF, inklusive Protease-Inhibitor) resuspendiert. Die Gesamtproteinmenge in dem Ganzzell-Lysat wurde mittels eines BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure, *bicinchoninic acid*, Perbio, Bonn) spektroskopisch bestimmt. Für die anstehenden SDS-Gele wurde jeweils eine Menge von 15 µg Gesamtprotein eingesetzt.

### 2.2.4 SDS-Gel-Elektrophorese und Western Blots

Die 10 %igen SDS-Gele wurden nach dem Protokoll von Maniatis gegossen, das jedoch leicht modifiziert war [HARLOW und LANE, 1988] (Trenngel: 6,7 ml Bis-/Acrylamid (30 %), 7,9 ml $H_20$, 5 ml TRIS pH 8.8 (1,5 M), 0,2 ml SDS (10 %), 0,2 ml APS (10 %), 0,02 ml TEMED und Sammelgel: 1,7 ml Bis-/Acrylamid (30 %), 6,8 ml $H_20$, 1,25 ml TRIS pH 6.8 (1 M), 0,1 ml SDS (10 %), 0,1 ml APS (10 %), 0,01 ml TEMED). Je Konstrukt wurde eine Probenmenge äquivalent zum Proteingehalt einer bzw. zweier Oozyten aufgetragen. Nach dem Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrozellulose-Membran wurde diese mehrmals mit PBST (Phosphat-gepufferte Salzlösung, *phosphate*

*buffered saline*, inklusive 0,1 % Tween) gewaschen. Zur spezifischen Detektion der humanen $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit (~100 kD) kam der polyklonale Antikörper AB9094 (Milipore, Bedford, MA, USA) zum Einsatz [LENCESOVA et al., 2004]. Im Falle der HA-getaggten $\alpha_2$-Untereinheit wurde ein monoklonaler anti-HA-Antikörper (hergestellt in Ratten) 3F10 (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Das endogen exprimierte β-Aktin ließ sich mit einem monoklonalen anti-β-Aktin-Antikörper (hergestellt in Mäusen) AC-15 (Sigma, Taufkirchen) detektieren. Als sekundärer Antikörper dienten gegen Ratte bzw. Maus gerichtete Meerrettichperoxidase-Konjugate (Promega, Mannheim) durch welche die anschließenden Chemilumineszenzreaktionen (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) zur Detektion auf Kodak BioMax Light Filmen (Sigma Aldrich) katalysiert werden konnten.

## 2.3 Transportmessungen der humanen $Na^+/K^+$-ATPase

### 2.3.1 Vorbereitung der Oozyten

Um die intrazelluläre Natrium-Konzentration zu erhöhen, wurden die Oozyten für 60 Minuten in einer Natrium-Ladelösung (110 mM NaCl, 2,5 mM Natrium-Citrat, 2,5 mM MOPS, 2,5 mM TRIS, pH7,4) und danach zur Äquilibrierung für mindestens 30 Minuten in einer Post-Ladelösung (100 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM $BaCl_2$, 5 mM $NiCl_2$, 2,5 mM MOPS, 2,5 mM TRIS, pH 7,4) inkubiert [RAKOWSKI, 1993].

### 2.3.2 Rubidium-Transport-Messungen mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie

Die in $Na^+$-Ladelösung und anschließender Post-Ladelösung inkubierten *Xenopus laevis*-Oozyten wurden für 3 Minuten in einer 1 mM bzw. 5 mM Rubidium-Lösung (1 bzw. 5 mM RbCl, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM $BaCl_2$, 5 mM $NiCl_2$, 2,5 mM MOPS, 2,5 mM TRIS) bei einer Raumtemperatur von 21 - 22°C inkubiert. In der $Rb^+$-Lösung waren außerdem entweder 10 µM oder 10 mM Ouabain enthalten, um die Aktivität der endogenen $Na^+/K^+$-ATPase von der heterolog-exprimierten unterscheiden zu können. Anschließend erfolgten drei Waschschritte mit der Post-Ladelösung (ohne $Rb^+$) und ein Waschschritt mit Milipore-Wasser. Jede Oozyte wurde einzeln in 1 ml Milipore-Wasser homogenisiert und für die AAS-Messung wurden davon 20 µl Probenvolumen eingesetzt. Die über die $Na^+/K^+$-ATPase in die Oozyte aufgenommene Rubidium-Menge wurde mit dem Atom-Absorptions-Spektrometer AAnalyst800™ (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) bestimmt, welches mit einer $Rb^+$-Hohlkathodenlampe (Photron, Melbourne, Australien) und einem transversal geheizten Graphitrohr (THGA) ausgestattet war. Das Zeit- und Temperatur-Protokoll folgte den Angaben des Herstellers (siehe Tabelle 2.1) und die Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 780 nm. Zur Berechnung der

aufgenommenen $Rb^+$-Menge wurde jeweils vor der Messung eine Standard-Eichkurve in einem Bereich von 0 - 50 µg/l $Rb^+$ aufgenommen. Die noch detektierbare $Rb^+$-Menge beträgt etwa 10 pg und wird als charakteristische Masse bezeichnet.

| Schritt | Temperatur (°C) | Anstiegszeit (s) | Haltezeit (s) | Acetylenverbrauch (ml/min) |
|---|---|---|---|---|
| Trocknung 1 | 110 | 1 | 20 | 250 |
| Trocknung 2 | 130 | 5 | 30 | 250 |
| Pyrolyse | 300-600 | 10 | 20 | 250 |
| Atomisierung | 1700-1800 | 0 | 5 | 0 |
| Ausheizen | 2400 | 1 | 2 | 250 |

Tabelle 2.1

Vom Hersteller empfohlenes Zeit- und Temperaturprotokoll für ein transversal geheiztes Graphitrohr.

## 2.4 Elektrophysiologische Messungen und Auswertung der Messdaten

### 2.4.1 Verwendete Lösungen und Geräte

Auch hierfür wurden die überexprimierenden Oozyten mit Natrium beladen (siehe 'Vorbereitung der Oozyten'), um die intrazelluläre [$Na^+$] zu erhöhen. Strommessungen wurden mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC, *two electrode voltage clamp*) durchgeführt. Eine einzelne Oozyte wurde in die Perfusionskammer überführt und konnte auf diese Weise mit verschiedenen Lösungen perfundiert werden. Die $Na^+$-haltige Lösung (siehe unter 2.3.1) enthielt zusätzlich entweder 10 µM oder 10 mM Ouabain, um die endogene $Na^+/K^+$-Pumpe von der heterolog-exprimierten unterscheiden bzw. letztere vollständig inhibieren zu können. Die $K^+$-haltige Lösung (100 mM KCl, 5 mM $BaCl_2$, 5 mM $NiCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2,5 mM TRIS, 2,5 MOPS, pH 7,4) wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: 0,2 mM, 0,5 mM, 2 mM, 5 mM und 10 mM (entsprechend mit der $Na^+$-haltigen Lösung verdünnt).

Die Messungen wurden zum einen mit einem Flachbettschreiber BD 11 aufgezeichnet (Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) und zum anderen über einen Computer, an den ein Turbo Tec10CX Verstärker (NPI Electronic GmbH, Tamm), eine Digidata 1200 Schnittstelle (Axon, Instruments Inc., Union City, CA, USA) und die Software pClamp 9.2 (Axon, Instruments Inc., Union City, CA, USA), die zur Erzeugung von Spannungspulsen sowie Haltepotentialen und zur Aufzeichnung der Stromsignale angeschlossen bzw. integriert war (Abbildung 2.3). Für die Datenverarbeitung (Auswertung und Präsentation) wurden die Programme Clampfit 9.2 Axon, Instruments Inc., Union City, CA, USA) und Origin 7.5G (OriginLab Corporation, Northampton and Wellesley Hills, MA, USA) verwendet.

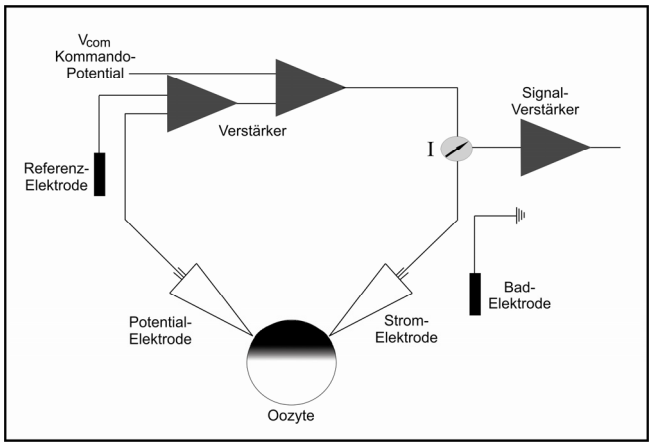



Abbildung 2.3 Schaltplan für eine Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC).

Die elektrophysiologischen Experimente wurden bei einer Raumtemperatur von 22-23°C durchgeführt. Die Mikropipetten wurden mit einem Pipettenziehgerät PC-10 (*puller*, Narishige, Japan) mit Spitzendurchmessern von etwa 20 – 30 µm gezogen und mit einer hochkonzentrierten Elektrolytlösung (3 M KCl) befüllt. Für die Messungen wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Die Pipetten-Widerstände lagen zwischen 0,7 - 2 MΩ.

### 2.4.2 Spannungsprotokoll

Es wurden lediglich Zellen gemessen, die bei einem Haltepotential von -30 mV einen Haltestrom von bis zu -300 nA aufwiesen. Ausgehend von -30 mV wurden die Oozyten für eine Dauer von 200 ms auf Potentiale von +60 mV bis -180 mV in 20 mV-Schritten geklemmt, wobei nach jedem Spannungssprung wieder zum Haltepotential von -30 mV zurückgekehrt wurde.

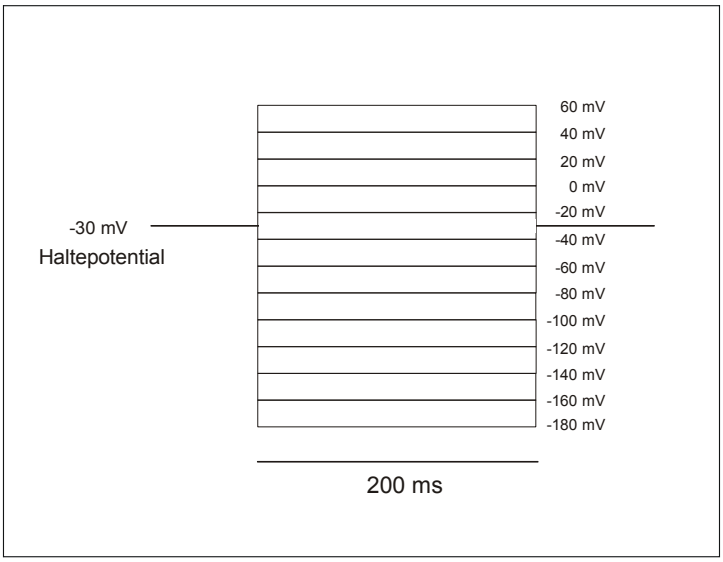



Abbildung 2.4

Angewendetes Spannungsprotokoll. Ausgehend von einem Haltepotential von -30 mV werden die Oozyten Spannungssprüngen in 20 mV-Schritten von positiven (+60 mV) zu negativen (-180 mV) Potentialen ausgesetzt.

### 2.4.3 Messung und Untersuchung der stationären und transienten Ströme

Als „stationärer Strom“ werden die $K^+$-stimulierten Pumpströme bei einem konstanten Haltepotential (in diesem Fall bei -30 mV) bezeichnet. Hierzu wurden Oozyten vor und nach der Perfusion mit verschiedenen [$K^+$] mit der oben genannten $Na^+$-haltigen Lösung perfundiert (Abbildung 2.5). Alle Lösungen enthielten zudem 10 µM Ouabain, um die Pumpströme der endogenen $Na^+/K^+$-ATPase zu unterdrücken.

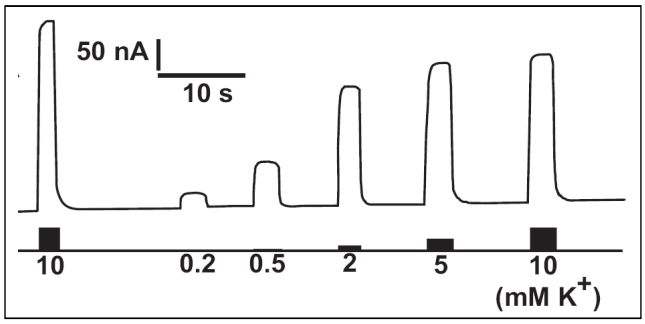



Abbildung 2.5

Mit verschiedenen Kalium-Konzentrationen stimulierte Pumpströme bei einem Haltepotential von -30 mV.

Bei der Ermittlung der Kalium-Affinitäten ($K_{0.5}$) wurde mittels der Schreiberaufzeichnungen, falls erforderlich, eine *rundown*-Korrektur durchgeführt. Die Korrektur bestand darin, die zeitliche Abnahme der maximalen Pumpstromamplitude (bei 10 mM $[K^+]_{ext}$) durch eine lineare Interpolation zu berücksichtigen.

Mit Hilfe des oben angegebenen Spannungsprotokolls kann auch die Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen sowohl vor und nach der Zugabe von $K^+_{ext}$ als auch währenddessen diesem Spannungsprotokoll ausgesetzt (Abbildung 2.6, graue Markierung).

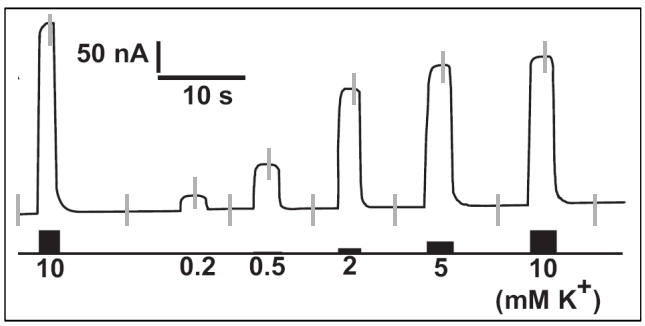



Abbildung 2.6

Sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Kalium wurde ein Spannungsprotokoll mit Pulsen von +60 mV bis -180 mV (in 20 mV-Schritten) durchlaufen.

Um die Abhängigkeit der Pumpströme vom Membranpotential (Strom-/Spannungs-Diagramme) und von extrazellulärem Kalium ($K^+_{ext}$) zu bestimmen, wurden die digital aufgezeichneten kaliumfreien Vorher- und Nachher-Messungen gemittelt und von den kaliumhaltigen Messungen abgezogen und falls notwendig ebenfalls *rundown*-korrigiert. Die Stromantworten wurden auf den Wert normiert, der in Gegenwart von 10 mM $K^+$ bei einer angelegten Spannung von 0 mV gemessen wurde. Die Bestimmung der spannungsabhängigen Kalium-Affinitäten ($K_{0.5}$) erfolgte unter Verwendung folgender Hill-Gleichung:

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \left( \frac{K_{0.5}}{[K^+]} \right)^{n_H}} \qquad \text{(Gleichung 2.1)}$$

($I_{max}$: maximaler Strom, $[K^+]$: Kaliumkonzentration, $K_{0.5}$: Konzentration der halbmaximalen Aktivität, $n_H$: Hill-Koeffizient)

Das gleiche Spannungsprotokoll wurde auch verwendet, um transiente („vorstationäre“, *pre-steady-state*) Ströme in Gegenwart von hohen $[Na^+]_{ext}$ und in Abwesenheit von $K^+_{ext}$ zu messen. Die extrazelluläre Natriumlösung enthielt entweder 10 µM (zur Inhibition der endogenen $Na^+/K^+$-ATPase) oder 10 mM Ouabain (zusätzlich zur Inhibition der heterologen $Na^+/K^+$-ATPase). Die Daten wurden voneinander subtrahiert (10 µM-Messung – 10 mM-Messung) und die Differenzstromsignale durch eine monoexponentielle Funktion angepasst. Hierbei wurden die ersten drei bis fünf Sekunden nicht einbezogen, um kapazitive Artefakte weitestgehend auszuschließen. Dies wurde sowohl bei den so genannten „on-Pulsen“ als auch „off-Pulsen“ berücksichtigt.

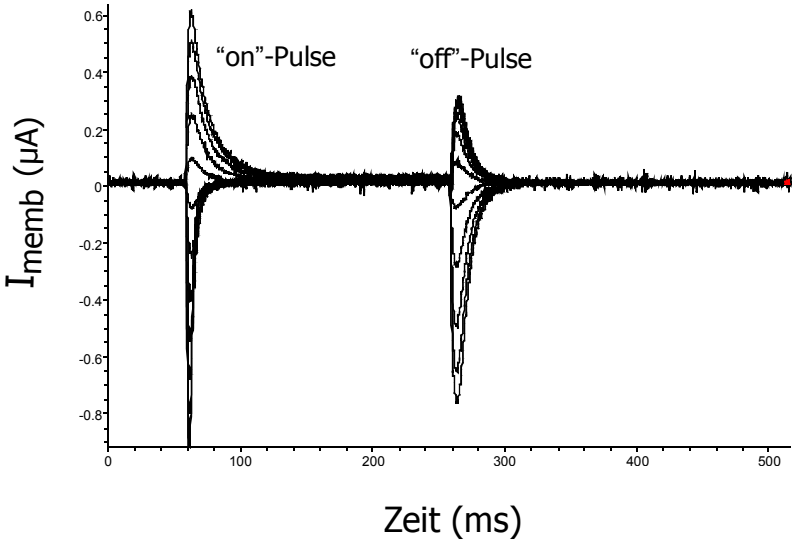



Abbildung 2.7

Mit dem Programm pClamp aufgezeichnete Stromantworten, die auf die entsprechenden Spannungspulse (13 Sprünge) folgten. Die Aufnahme zeigt eine Differenzstrommessung (WT), bei der die 10 µM-Ouabain-haltige Lösung von der 10 mM-haltigen (hohe $[Na^+]$ und $K^+$-frei) abgezogen wurde.

Aus den transienten Strömen direkt nach einem Spannungssprung („on-Pulse“) wurden die apparenten Geschwindigkeitskonstanten bestimmt (Abbildung 2.5). Aus den transienten Strömen unmittelbar nach Rückkehr zum Haltepotential bei -30 mV („off-Pulse“) konnten die transportierten Ladungen (Q), die $V_{0.5}$-Werte (Spannung des halbmaximalen Q-Wertes), die $z_q$-Werte (Anteil der Ladung, die die gesamte Membran passiert) und die Wechselzahlen (*turnover number*) bestimmt werden. Hierfür wurde die transportierte Ladung Q als Zeitintegral der mittels einer monoexponentiellen Funktion angepassten transienten Ströme bestimmt. Die Q/V-Kurven wurden mithilfe einer Boltzmann-Funktion des folgenden Typs angepasst:

$$Q(V) = Q_{\max} + \frac{Q_{\max} - Q_{\min}}{\left(1 + \exp\left(\frac{z_q \cdot F}{R \cdot T}(V - V_{0.5})\right)\right)} \qquad \text{(Gleichung 2.2)}$$

$Q_{max}$ und $Q_{min}$ sind die jeweiligen Sättigungswerte der verschobenen Ladung, $z_q$ ist die Äquivalentladung, F ist die Faraday-Konstante, R ist die molare Gaskonstante, T ist die Temperatur in Kelvin, $V_{0.5}$ ist die Spannung des halbmaximalen Q-Wertes und V ist das Membranpotential.

Die Berechnung der molekularen Aktivität (Wechselzahl, *turnover number*) erfolgte durch Division des stationären Stroms, der in Gegenwart von 10 mM Kalium bei einem Haltepotential von -30 mV gemessen wurde, durch die Summe der transportierten Ladung ($Q_{tot} = Q_{max} - Q_{min}$), die aus der Anpassung der Q/V-Kurven erhalten wurde. Da pro Pumpzyklus eine Nettoladung verschoben wird, stellt die Differenz $Q_{max}$-$Q_{min}$ eine Abschätzung für die Anzahl der $Na^+/K^+$-ATPase-Moleküle dar, die den jeweiligen Strom in der Oozyte verursachen.

### 2.4.4 Bestimmung der Aktivierungsenergie $E_A$

An den Analog-Digital-Wandlereingang des Digidata 1200-Interfaces des Voltage-Clamp-Setups wurde ein zusätzliches Präzisions-Labormessgerät (T900 series, Dostmann electronic GmbH, Wertheim) angeschlossen, mit dessen Hilfe die jeweils herrschende Temperatur digital aufgezeichnet werden konnte. Der Temperaturfühler wurde in der Messkammer in unmittelbarer Nähe der Oozyte platziert. Der untersuchte Temperaturbereich lag zwischen 18 bis 34°C und aufgetragen wurde der logarithmierte Pumpstrom (bei 10 mM $[K^+]_{ext}$) gegen den Reziprokwert der Temperatur 1000/T (T in Kelvin). Aus der Steigung *m* der Geraden in dieser Arrhenius-Auftragung konnte die Aktivierungsenergie $E_A$ nach $E_A = -m \cdot R$ (R = molare Gaskonstante) bestimmt werden.

# *Resultate*

# 3 Resultate

Alle in der $\alpha_2$-Untereinheit der humanen $Na^+/K^+$-ATPase nachgewiesenen FHM- und SHM-assoziierten Mutationen sind in hochkonservierten Regionen lokalisiert, die für jegliche $P_{II}$-Typ-ATPasen ($Na^+/K^+$-, $H^+/K^+$- und $Ca^{2+}$-ATPasen) kennzeichnend sind [AXELSEN und PALMGREN, 1998]. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen wurden entsprechend ihrer Lokalisation in strukturell wichtigen Domänen der $Na^+/K^+$-ATPase selektiert. Eine der näher betrachteten FHM2-Mutationen, T263M, befindet sich in der Aktuator-Domäne (A) innerhalb der intrazellulären Schleife zwischen den Transmembran-Segmenten TM2 und TM3. Zwei der Migräne-verursachenden Mutationen, T376M und R383H, sind in der Nukleotid-Domäne (N) vorzufinden. Während T376M ein Bestandteil des SDK**T**GT-Motivs ist, liegt R383H zwischen zwei β-Faltblättern in einer Scharnier-Region (*„hinge region“*) zwischen den beiden Domänen N und P. Von den zwischen der P-Domäne und dem transmembranären Teil des Proteins gelegenen Mutationen wurden vier für die funktionellen Untersuchungen ausgewählt: A606T, R763H, M829R und R834Q. Daneben wurden vier weitere Mutationen untersucht, die den extrazellulären Teil der $Na^+/K^+$-ATPase betreffen (R908Q, P979L, del(K935-S940)ins**I**, S966X). R908Q und P979L sind klassische Punktmutationen. S966X hingegen stellt eine Frameshift-Mutation dar, die durch die Deletion von zwei Basen, die Serin in Position 966 kodieren, entsteht und zu einer Verschiebung des Leserasters führt, so dass das Protein nach weiteren 31 Aminosäuren abbricht (Abbildung 3.1). Bei del(K935-S940)ins**I** handelt es sich um eine Deletion von fünf Aminosäuren mit einer simultanen Insertion einer einzelnen Aminosäure, einem Isoleucin, so dass diese beiden Sequenzänderungen zu einem mehr oder minder verkürzten Protein führen (statt 1020 lediglich 1015 Aminosäuren). Ebenso wurde die in der Transmembrandomäne TM4 gelegene Mutation G301R in die Struktur-Funktions-Analyse einbezogen. Ein überaus interessanter Bereich stellt außerdem die sogenannte “Switch-Region“ dar, in der auch der C-Terminus vorliegt. Auch hier wurden zwei FHM2-Mutationen ausgewählt, um aufschlussreiche Informationen auf strukturelle und funktionelle Veränderungen der $Na^+/K^+$-ATPase durch Migräne-assoziierte Mutationen zu erlangen. R937P und die das Stopp-Codon an Position 1021 betreffende Mutation mit der Bezeichnung X1021R (R = Arginin, insgesamt eine Addition von 28 zusätzlichen Aminosäuren, RPHWKKNQAWKDGELWRCCGDGDGEGWK), sind ebenfalls mit diversen Methoden charakterisiert worden.

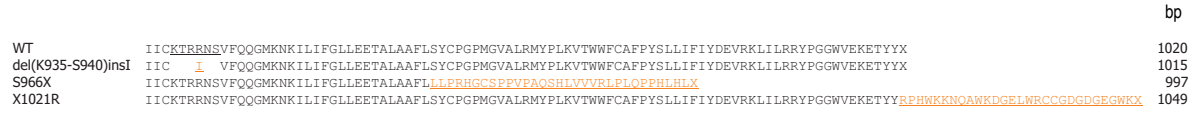



Abbildung 3.1

Sequenzvergleich zwischen dem Wildtyp-Protein und den ATP1A2-Mutationen del(K935-S940)ins**I**, S966X und X1021R.

## 3.1 Kalium-induzierte Pumpströme

Etwa drei bis fünf Tage nach simultaner Injektion der $\alpha_2$- und $\beta_1$-Untereinheit cRNAs der humanen $Na^+/K^+$-ATPase ($\alpha_2$ = 25 ng, $\beta_1$ = 2,5 ng) wurden die *Xenopus laevis*-Oozyten elektrophysiologisch untersucht. Eine erfolgreiche Expression konnte anhand der Pumpströme mittels einer 10 mM $K^+$-Lösung nachgewiesen werden. Die als Wildtyp (WT) bezeichnete unveränderte $Na^+/K^+$-ATPase wies einen durchschnittlichen stationären Strom von 184 nA auf (Abbildung 3.2). Während die Mutationen P979L und M829R mit 67 % bzw. 73 % etwa zwei Drittel des WT-Pumpstroms erreichten, lagen sechs Konstrukte mit 27 – 43 % unter der Hälfte des Wildtypwertes. Weitere sechs der vierzehn untersuchten Mutationen zeigten entweder absolut keinen Pumpstrom oder weniger als 10 nA. Hierzu gehören neben der S966X Frameshift- und del(K935-S940)insI Deletionsmutation die Konstrukte T263M, G301R, T376M und R937P.

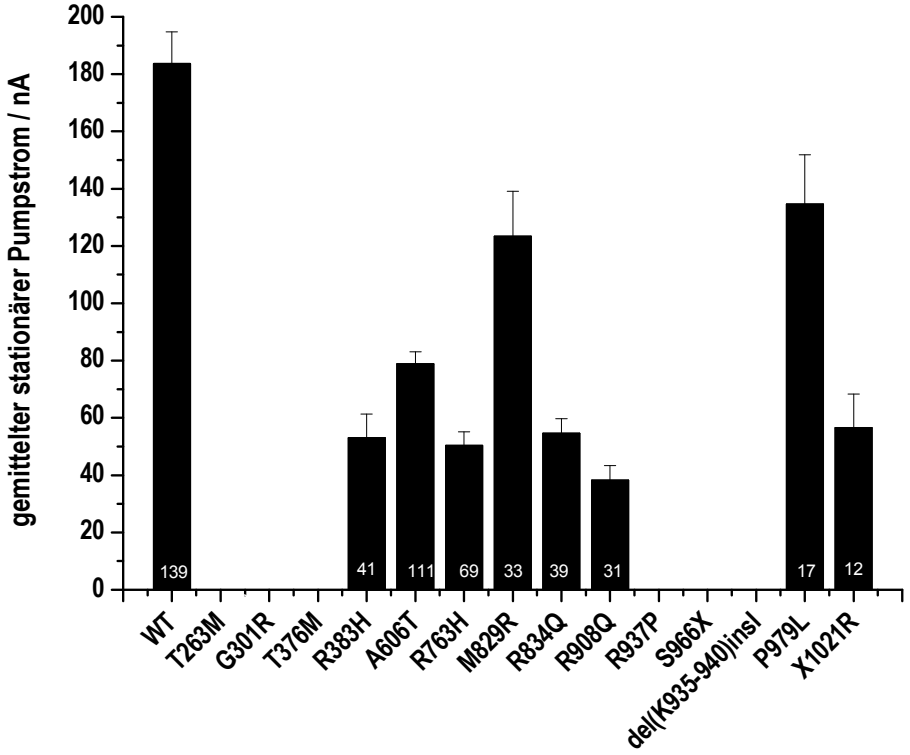



Abbildung 3.2

Durch Zugabe von 10 mM Kalium induzierte stationäre Pumpströme. Dargestellt sind gemittelte Werte verschiedener ATP1A2-Konstrukte im Vergleich zum Wildtyp (WT) mit einem durchschnittlichen Pumpstrom von etwa 184 nA. Gemessen wurden lediglich Zellen, die bei einem angelegten Haltepotential von -30 mV einen stationären Pumpstrom von mehr als 10 nA aufwiesen. Für die Auftragung der Fehlerbalken wurden die entsprechenden Standardfehler (± S.E.) verwendet. In weißer Schrift ist die Anzahl der gemessenen Zellen pro Konstrukt unterlegt.

## 3.2 Untersuchung der Rubidium-Aufnahme

Die $Na^+/K^+$-ATPase ist dazu befähigt, anstelle von $K^+$ auch $Rb^+$ in die Zelle zu transportieren, da beide Ionen sehr ähnliche Radien besitzen. Nachgewiesen werden kann die $Rb^+$-Aufnahme unter anderem mit Hilfe der Atom-Absorptions-Spektroskopie. Diese Art der nicht-radioaktiven Analyse ist eine sehr sensitive Methode, um selbst geringe Ionentransport-Aktivitäten messen zu können. Die $Rb^+$-Aufnahme-Messung an *Xenopus laevis*-Oozyten kann bereits am dritten Expressionstag durchgeführt werden. Untersucht wurden neben dem Wildtyp in erster Linie die Konstrukte, die absolut keinen oder lediglich einen sehr kleinen (< 10 nA) stationären Pumpstrom zeigten. Zusätzlich wurde das Konstrukt X1021R mit dieser Methode näher betrachtet, da bei der Untersuchung der stationären Pumpströme (mit 10 mM $K^+$) sehr große Schwankungen beobachtet wurden. Dabei zeigte sich, dass die funktionelle Aktivität dieses Konstrukts von der Dauer der Expressionszeit abhängig war. Dies ließ sich anhand der Transportmessungen mit der Atom-Absorptions-Spektroskopie nachweisen (Abbildung 3.3). Während nach drei Tagen weniger als 50 % (~ 42 %) des Pumpstroms des Wildtyps erreicht wurde, war nach vier Tagen bereits ¾ der Wildtyp-Aktivität (~ 75 %) zu beobachten. Bei den restlichen Konstrukten konnte diese Abhängigkeit (Expressionszeit ↔ Expressionslevel) jedoch nicht beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass Proteinexpression, -faltung und -transport zur Plasmamembran bei einer Elongation des C-Terminus mit zeitlicher Verzögerung ablaufen.

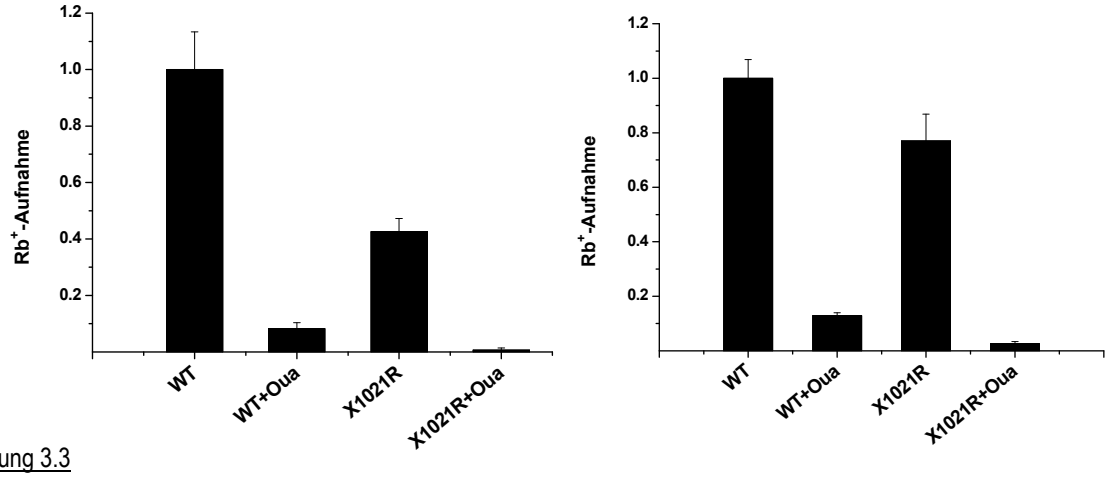



Abbildung 3.3

Normierte Rubidium-Aufnahme vom Wildtyp und dem Konstrukt X1021R. Vergleichend dargestellt sind Messungen nach einer Expressionszeit von drei Tagen (linkes Panel) und nach vier Tagen (Panel rechts). Die Zellen wurden in Gegenwart von 10 µM (WT bzw. X1021R) bzw. 10 mM Ouabain (WT+Oua bzw. X1021R+Oua) gemessen.

Im Vergleich zu uninjizierten Kontrollzellen zeigten G301R, T376M und S966X keine signifikant erhöhten $Rb^+$-Aufnahmeraten, wohingegen T263M und R937P etwa 20 % der $Rb^+$-Aufnahme des Wildtyps aufwiesen, wodurch ebenfalls eine drastische Reduktion der Pump-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.4).

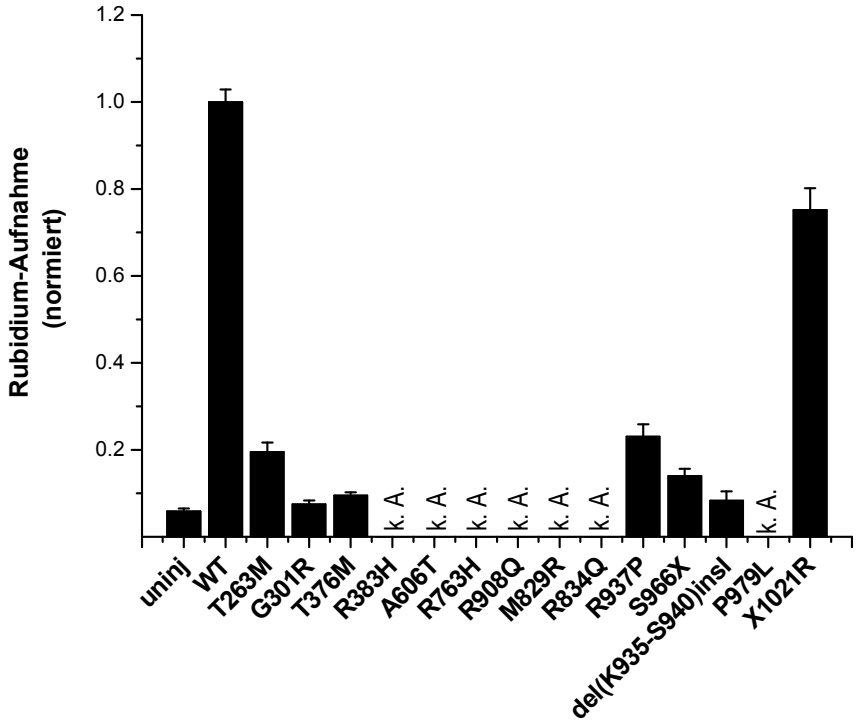



Abbildung 3.4

Ouabain-sensitive Differenzströme der Messungen in Gegenwart von 10 µM und 10 mM Ouabain. Die Messungen stammen aus vier verschiedenen Experimenten und beinhalten etwa 14-30 Zellen pro Konstrukt. Die Daten wurden auf die Wildtyp-Messung in Gegenwart von 10 µM Oubain normiert (Experiment 1: 49 pmol/Oozyte/min; Experiment 2: 130 pmol/Oozyte/min; Experiment 3: 38 pmol/Oozyte/min; Experiment 4: 61 pmol/Oozyte/min). k. A. = keine Angabe.

## 3.3 Expression der ATP1A2-Konstrukte in *Xenopus laevis*-Oozyten

Um die Unterschiede im Expressionsverhalten der einzelnen Konstrukte beurteilen zu können, wurden Western Blots von Plasmamembran- und Totalmembran-Präparationen durchgeführt. Hierdurch sollten Aussagen darüber gewonnen werden, ob die Reduktion bzw. das völlige Ausbleiben der Transport-Aktivität darauf zurück zu führen ist, dass weniger Protein in die Plasmamembran gelangt oder ob das Enzym in gleicher Menge wie der WT in der Membran vorliegt, aber völlig inaktiv ist. Für eine korrekte Faltung und das daran anschließende Targeting der $Na^+/K^+$-ATPase ist die β-Untereinheit von essentieller Bedeutung, weshalb bei der cRNA-Injektion auch stets ein exaktes Verhältnis zwischen den beiden Untereinheiten α und β eingehalten werden muss. Grundsätzliche Information über eine intakte α/β-Interaktion, lässt sich der Abbildung 3.5 entnehmen: Alle Konstrukte waren in der Totalmembran-Präparation (Ganzzell-Lysate) in annähernd gleichen Mengen vertreten (Abbildung 3.5, unten). In den Plasmamembran-Präparationen (Abbildung 3.5, oben) hingegen ließ sich erkennen, dass die beiden Konstrukte del(K935-S940)insI und R908Q in geringer Menge und die Frameshift-Mutation S966X so gut wie gar nicht in die Plasmamembran integriert wurden.

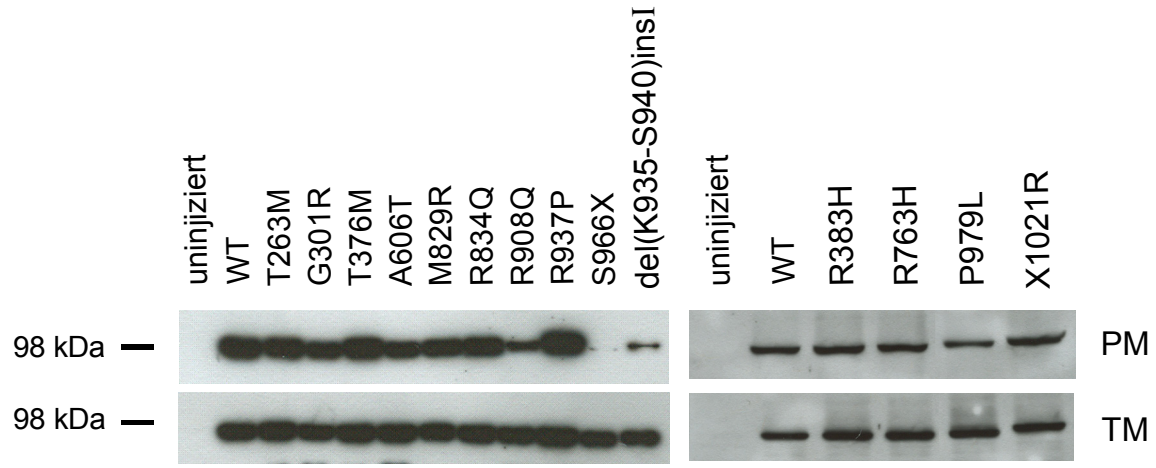



Abbildung 3.5

Repräsentativer Western Blot mit Proteinproben aus Plasmamembran- (PM) bzw. Totalmembran-Präparationen (TM). Im linken Teil der Abbildung wurde ein Probenvolumen äquivalent zu einer Oozyte und im rechten das Äquivalent von zwei Oozyten aufgetragen. Eingesetzt wurde ein polyklonaler Antikörper, der an die $\alpha_2$-spezifische HERED-Region bindet (Aminosäureposition 491 bis 495). Dies dient der Unterscheidung von der Xenopus $\alpha_1$-Form.

## 3.4 $[K^+]_{ext}$- und Spannungsabhängigkeit der $K^+$-induzierten Pumpströme

In Gegenwart von extrazellulärem $K^+$ ist die $Na^+/K^+$-ATPase dazu fähig zwei $K^+$-Ionen ins Zellinnere und drei $Na^+$-Ionen nach außen zu transportieren. Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) kann unter Zugabe von Lösungen mit unterschiedlichen $K^+$-Konzentrationen ($[K^+]_{ext}$ = 0,2 - 10 mM) neben der $K^+$-Abhängigkeit der Strom-Spannungs-Kennlinien (I/V-Kurven) auch die Spannungsabhängigkeit der $K_m$-Werte der stationären Pumpströmen bestimmt werden. Diese Untersuchungen konnten lediglich an $Na^+/K^+$-ATPase-exprimierenden Oozyten durchgeführt werden, die bei einem Haltepotential von -30 mV ausreichenden Pumpstrom aufwiesen (>30 nA, Abbildung 3.2). Die Konstrukte T263M, G301R, T376M, R937P, S966X und del(K935-S940)insI ließen sich aufgrund zu geringer stationärer Pumpströme auf diese Weise nicht eingehender untersuchen. Die beiden Konstrukte R763H und X1021R zeigten mit $K_{0.5}$-Werten von 0,72 ± 0,05 mM bzw. 0,37 ± 0,05 mM eine leichte bzw. drastische Erhöhung der $K^+$-Affinität im Vergleich zum WT (0,95 ± 0,04 mM), wohingegen die Mutation A606T mit einem $K_{0.5}$-Wert von 1,42 ± 0,12 mM eine insgesamt niedrigere Affinität für $K^+$ aufwies (Tabelle 3.1). Verglichen mit dem Wildtyp lagen die $K_{0.5}$-Werte der restlichen Konstrukte im Bereich des angegebenen Fehlers und zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Die spannungsabhängigen Stromantworten auf die verschiedenen extrazellulären $[K^+]$ sind für alle mit dieser Methodik analysierbaren Konstrukte in Abbildung 3.6 dargestellt. Am Beispiel des Wildtyps lässt

sich erkennen, dass in Gegenwart von 10 mM $K^+$ eine Sättigung einsetzt. Mit zunehmender Hyperpolarisierung kommt es bei allen $K^+$-Konzentrationen zur Abnahme der normierten Pumpströme. Diese Abnahme spiegelt die Inhibition der Vorwärtsreaktion durch die spannungsabhängige extrazelluläre Rückbindung von extrazellulären $Na^+$-Ionen wider (Abbildung 3.6) [RAKOWSKI et al., 1997]. Unter nicht sättigenden $K^+$-Konzentrationen (< 5 mM) deutet sich eine glockenförmige I/V-Kurve mit einem Maximum bei etwa 20 mV an, die bei positiven Potentialen eine charakteristische Abnahme aufweist. Dies kommt dadurch zustande, dass unter diesen Bedingungen die spannungsabhängige $K^+$-Bindung für den Vorwärtstransport geschwindigkeitsbegrenzend ist [LAFAIRE und SCHWARZ, 1986, NAKAO und GADSBY, 1989, RAKOWSKI et al., 1991]. In der vergleichbaren I/V-Kurve für das Konstrukt A606T erscheint das Maximum zu positiveren Potentialen verschoben (≥50 mV). Hier ist allerdings generell keine Glockenform zu sehen, da das Maximum der I/V-Kurven bei den angelegten positiven Potentialen (bis +60 mV) selbst in Gegenwart von 10 mM extrazellulärem Kalium nicht erreicht werden konnte.

| | $K_{0.5}$ ($K^+$) [mM] | Anzahl Zellen |
|---|---|---|
| **WT** | **0,95 ± 0,04** | **41** |
| **R383H** | **0,98 ± 0,06** | **14** |
| **A606T** | **1,42 ± 0,12** | **32** |
| **R763H** | **0,72 ± 0,05** | **25** |
| **M829R** | **0,85 ± 0,02** | **16** |
| **R834Q** | **0,87 ± 0,06** | **10** |
| **R908Q** | **1,03 ± 0,03** | **10** |
| **P979L** | **1,06 ± 0,07** | **11** |
| **X1021R** | **0,37 ± 0,05** | **9** |

Tabelle 3.1

Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ermittelte $K_{0.5}$-Werte für die $[K^+]$-Abhängigkeit der stationären Pumpströme in Gegenwart von 100 mM $[Na^+]_{ext}$.

In den I/V-Kurven von R763H und R834Q sind selbst bei höheren Konzentrationen (≥ 5 mM) glockenförmige Kurven zu erkennen. Andeutungsweise ist dieses Verhalten auch bei dem Konstrukt R383H zu beobachten. Die verbleibenden auswertbaren Konstrukte (M829R, R908Q und P979L) zeigten in den aufgezeichneten Strom-Spannungs-Kennlinien keine nennenswerten Abweichungen bezüglich ihrer $K^+$-Abhängigkeit. Das Konstrukt X1021R ließ sich aufgrund von erhöhten Hintergrund-Leitfähigkeiten der exprimierenden Oozyten und den daraus resultierenden Schwankungen der Nullstrom-Amplituden nicht mit ausreichender Genauigkeit charakterisieren.

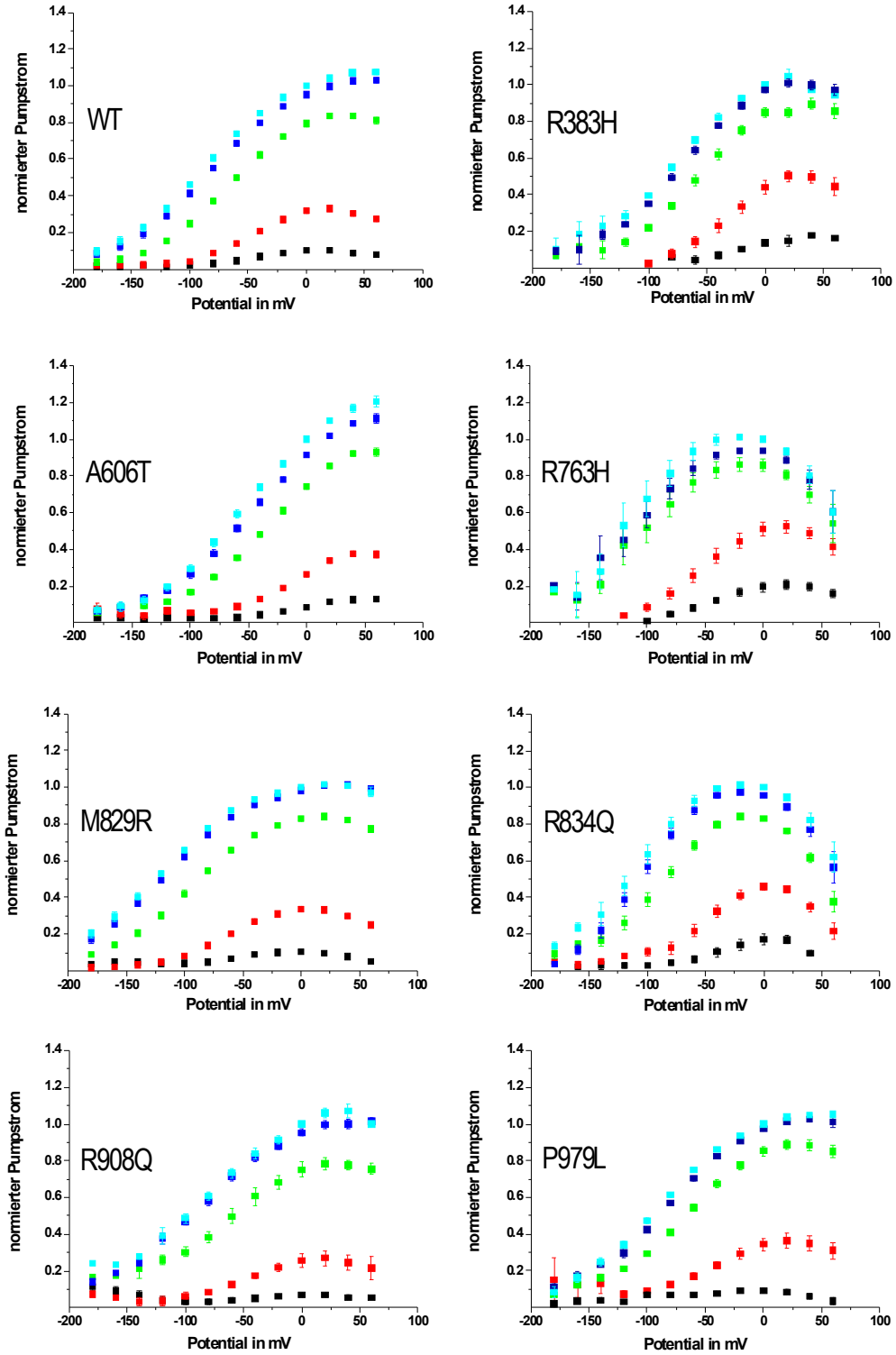



Abbildung 3.6

$[K^+]_{ext}$-abhängige Strom-Spannungs-Kennlinien der verschiedenen ATP1A2-Konstrukte und des WT-Proteins. Die Zellen (≥ 3 pro Konstrukt, aus ≥ 3 Chargen) wurden Spannungssprüngen von +60 bis -180 mV in 20 mV-Schritten ausgesetzt. Normiert wurde auf den Pumpstromwert, der bei einem Potential von 0 mV in Gegenwart von 10 mM $K^+$ aufgezeichnet wurde. Farbgebung für die unterschiedlichen $[K^+]$-Werte: schwarz = 0,2 mM, rot = 0,5 mM, grün = 2 mM, dunkelblau = 5 mM und cyan = 10 mM $K^+$. Anzahl Zellen/Anzahl Charge: WT=10/6, R383H=10/3, A606T=20/10, R763H=5/3, M829R=12/5, R834Q=6/3, R908Q=3/3, P979L=10/3.

Die spannungsabhängigen $K_{0.5}$-Werte des Wildtyps folgen einer charakteristischen parabelförmigen Kurve mit einem Minimum von 0.86 mM bei etwa +10 mV (Abbildung 3.7). Das Minimum ist bei R383H und A606T deutlich in Richtung positiver Potentiale verschoben und liegt etwa bei +50 mV. Eine leichte Verringerung bzw. Erhöhung der apparenten $K^+$-Affinität (Verschiebung der $K_{0.5}(K^+)$-Kurven nach oben bzw. unten) ist bei fast allen Konstrukten zu sehen. Jedoch sind diese $K_{0.5}$-Werte nicht wesentlich größer bzw. kleiner als die für den Wildtyp ermittelten Werte. Eine signifikante Veränderung ist allerdings im Falle der ATP1A2-Mutation R763H zu beobachten. Die $K_{0.5}$-Werte fallen im Vergleich zum Wildtyp über den gesamten untersuchten Spannungsbereich niedriger aus. Der bei einem Haltepotential von -30 mV ermittelte $K_{0.5}$-Wert von 0,72 ± 0,05 stimmt mit dieser Beobachtung sehr gut überein und ist ein weiterer Beleg für die erkennbar erhöhte apparente $K^+$-Affinität. Im gänzlichen Gegensatz zum WT ist hier außerdem keine Parabelform sondern vielmehr eine lineare Abnahme von -120 mV bis zu +60 mV erkennbar. Das Minimum ist, wie bei den Mutationen R383H und A606T, nach rechts verschoben und liegt im positiven Spannungsbereich bei ca. +60 mV. Bei R908Q fiel auf, dass die Spannungsabhängigkeit der $K_{0.5}$-Werte deutlich schwächer ausgeprägt war als beim Wildtyp-Protein.

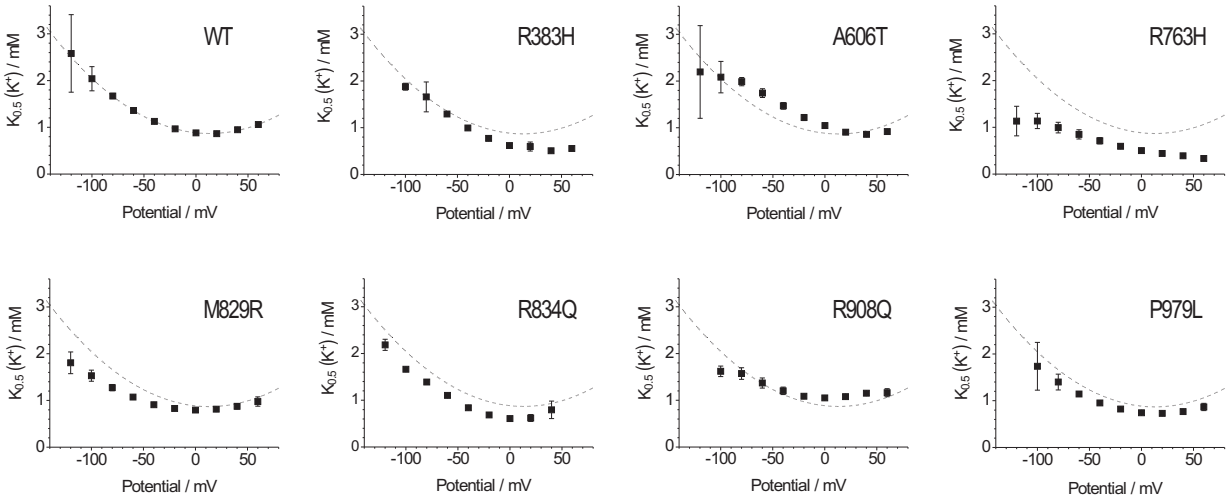



Abbildung 3.7

Spannungsabhängige $K_{0.5}$-Werte von $K^+$-stimulierten Pumpströmen, die aus Anpassungen einer Hill-Funktion an die in Abbildung 3.6 dargestellten Daten bestimmt wurden. Die Wildtyp-Kurve ist in gepunkteter Form in die Diagramme der jeweiligen ATP1A2-Mutanten eingefügt (polynomiale Anpassung). Anzahl Zellen/Anzahl Chargen: WT=10/6, R383H=10/3, A606T=20/10, R763H=5/3, M829R=12/5, R834Q=6/3, R908Q=3/3, P979L=10/3 (± S.D.).

## 3.5 Transiente Ströme: Kinetiken und Spannungsabhängigkeiten

Zur Untersuchung der $Na^+$-transportierenden Schritte innerhalb des Post-Albers-Reaktionsschemas eignen sich Messungen, die in Abwesenheit von extrazellulärem Kalium und in Gegenwart von hohen extrazellulären $Na^+$-Konzentrationen durchgeführt werden. Unter diesen Umständen ist die $Na^+/K^+$-ATPase nicht in der Lage die vorwärtsgerichtete „normale“ Transportreaktion durchzuführen. Es kann jedoch durch Anlegen von Spannungssprüngen eine vorübergehende (transiente) Ladungsverschiebung im Natriumzweig des Reaktionszyklus' hervorgerufen werden, die beim Verlauf der Teilreaktionssequenz

$$(3Na^+)E_1\text{-}P \leftrightarrow E_2\text{-}P \bullet 3Na^+ \leftrightarrow E_2\text{-}P + 3Na^+$$

erfolgt. Das bedeutet, es findet eine vom vorliegenden Potential abhängige extrazelluläre $Na^+$-Freigesetzung bzw. eine $Na^+$-Rückbindungsreaktion statt. Spannungspulse zu positiven Potentialen begünstigen die extrazelluläre $Na^+$-Freisetzung, was zu positiven transienten Strömen und zur Verschiebung des $E_1P$-$E_2P$-Gleichgewichts in Richtung $E_2P$ führt. Negative Potentiale hingegen fördern die extrazelluläre $Na^+$-Rückbindung und verursachen negative transiente Ströme: Das Gleichgewicht wird in Richtung $E_1P$ verschoben. Spannungssprungexperimente unter solchen $Na^+/Na^+$-Austausch-Bedingungen werden in An- und Abwesenheit von 10 mM Ouabain durchgeführt. Anhand der daraus resultierenden Differenzströme lassen sich Aussagen über die Reaktionskinetik des elektrogenen $Na^+$-Transports treffen. Die Spannungsabhängigkeiten der apparenten Reaktionsgeschwindigkeits-konstanten und der translozierten Ladung sind in den Abbildungen 3.8 und 3.9 dargestellt. Mit zunehmender Hyperpolarisation steigen die reziproken Zeitkonstanten stetig an, während sie bei positiven Potentialen einen limitierenden Wert von etwa 55-60 $s^{-1}$ erreichen. Der Anstieg bei negativen Potentialen ist auf die elektrogene Rückbindung extrazellulärer Natrium-Ionen zurückzuführen und das gleich bleibende Niveau im positiven Spannungsbereich spiegelt den nicht bzw. kaum elektrogenen Vorwärtsreaktionsschritt wider. Dieses Verhalten ließ sich bei fast allen untersuchten Konstrukten beobachten, die auf diese Weise elektrophysiologisch charakterisiert werden konnten. Eine leichte Erhöhung bzw. Verminderung der reziproken Zeitkonstanten konnte bei den Konstrukten R383H, A606T, R763H, M829R, R834Q, R908Q und P979L beobachtet werden (Abbildung 3.8 A,C,E,G,J,L,N). R383H zeigte prinzipiell etwas langsamere apparente Ratenkonstanten mit einem Sättigungswert von etwa 250 $s^{-1}$ bei Potentialen unterhalb von -120 mV. Die Konstrukte A606T und P979L zeigten bei negativen Potentialen eine Verschiebung in Richtung positiver Potentiale, während R763H, M829R und R834Q über den gesamten untersuchten Spannungsbereich eine Verschiebung aufwiesen (Abbildung 3.8).

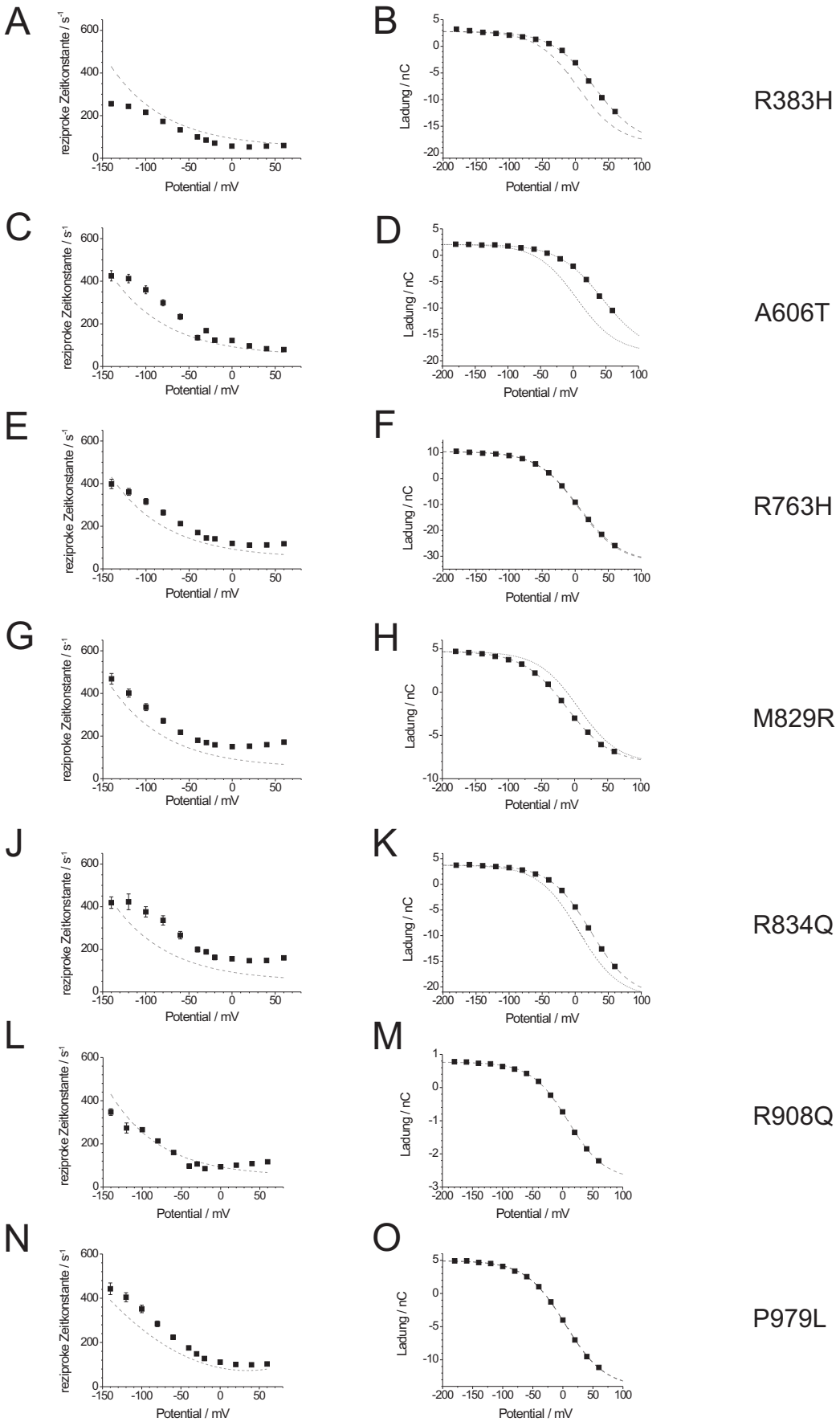



Abbildung 3.8

Aus transienten Strömen bestimmte apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (links) und Q/V-Kurven (rechts) gemessen in Abwesenheit von Kalium und in Gegenwart hoher $Na^+$-Konzentrationen (100 mM).

A

```
ATP1A2 WT          1000-EVRKLILRRYPGGWVEKETYY*
ATP1A2 X1021R      1000-EVRKLILRRYPGGWVEKETYYRPHWKKNQAWKDGELWRCCGDGDGEGWK*
```

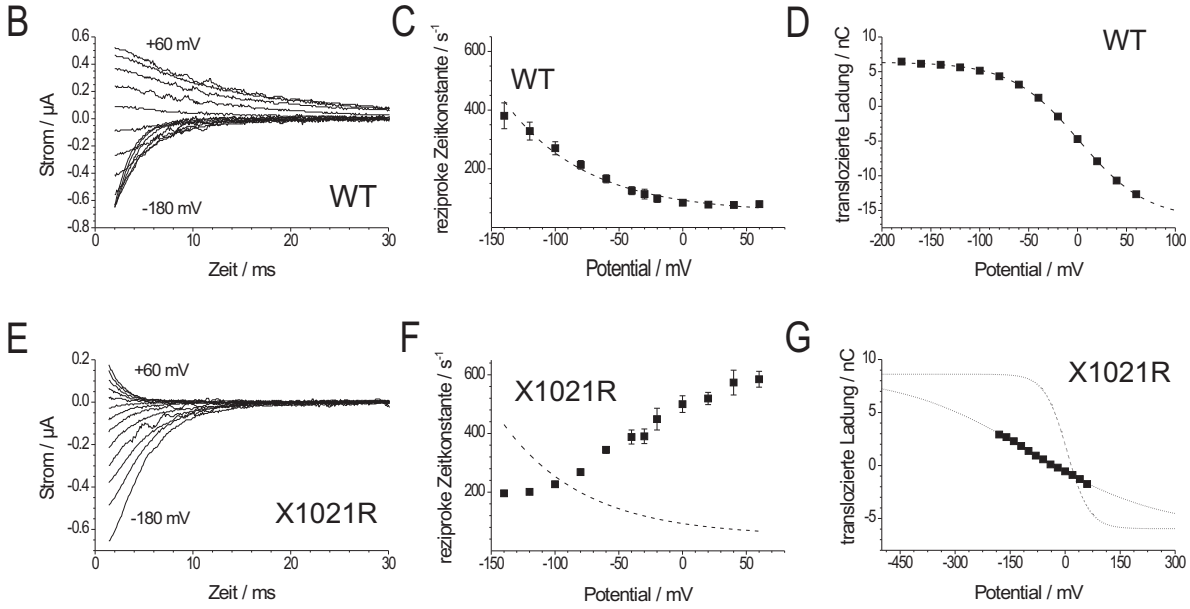



Abbildung 3.9

Das Konstrukt X1021R im Vergleich zum Wildtyp. (A) Sequenzen des Wildtyp-Proteins und dem um 28 Aminosäuren elongierten C-Terminus von X1021R. (B) und (E) Repräsentative transiente Ströme aufgezeichnet an je einer einzelnen ATP1A2 WT bzw. X1021R exprimierenden Oozyte, die Spannungssprüngen von +60 mV bis -180 mV ausgesetzt wurde. (C) und (F) Unter hohen [$Na^+$] und in Abwesenheit von $K^+$ gemessene und gegen die Spannung aufgetragenen reziproken Zeitkonstanten für WT (C) und X1021R (F). (D) und (G) Q/V-Kurven, die durch Integration der transienten Ströme (dargestellt in (B) und (E)) ermittelt wurden. Gestrichelte Linien geben zum Vergleich den Kurvenverlauf des WT-Proteins an.

Eine interessante Ausnahme bezüglich der reziproken Zeitkonstanten stellte das Konstrukt X1021R dar, welches einen um 28 Aminosäuren verlängerten C-Terminus aufweist. Im drastischen Gegensatz zum Wildtyp zeigte sich hier mit zunehmender Depolarisierung ein Anstieg der reziproken Zeitkonstanten. Während beim Wildtyp die niedrigsten apparenten Ratenkonstanten bei positiven Potentialen erreicht wurden, wies X1021R bei stark hyperpolarisierenden Potentialen die niedrigsten Geschwindigkeits-Konstanten auf. Bei negativen Potentialen unterhalb von -100 mV erreichten die Zeitkonstanten einen limitierenden Wert von ~ 200 $s^{-1}$ (Abbildung 3.9). Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass einer der Reaktionsschritte in der Vorwärtsrichtung des Natrium-Transportzweiges elektrogen sein könnte.

Durch Integration der transienten Ströme kann die während des Transportvorgangs auftretende Ladungsverschiebung errechnet werden. Die Auftragung der infolge eines Spannungssprungs über die Membran verschobenen Ladung gegen das angelegte Membranpotential ergibt sogenannte Q/V-Kurven, die die Spannungsabhängigkeit der translozierten Ladung widerspiegeln. Diese Kurven folgen dem Verlauf einer Boltzmann-Funktion (siehe Material & Methoden, Gleichung 2.2). In Q/V-

Kurven nähern sich die Zahlenwerte sowohl bei positiven als auch bei negativen Potentialen einem Sättigungswert. Dies ergibt sich daraus, dass durch die begrenzte Anzahl der $Na^+/K^+$-ATPase-Moleküle in der Membran schließlich alle Moleküle entsprechend des gegenwärtigen Membranpotentials entweder vollständig im $E_1$- oder $E_2$-Zustand vorliegen ($E_1$ : bei negativen Potentialen, $E_2$ : bei positiven Potentialen). Die Messung transienter Ströme erfolgte bei Spannungssprüngen von -180 mV bis +60 mV, wohingegen für die Extrapolation der Q/V-Kurven in der Anpassung an die Boltzmann-Funktion ein Potentialbereich von -200 mV bis +100 mV ausgewählt wurde.

Die Q/V-Kurven der drei ATP1A2-Mutationen R383H, A606T und R834Q waren zu depolarisierenden Potentialen verschoben und deuteten somit auf eine erhöhte apparente Affinität für extrazelluläre Natrium-Ionen an (Abbildung 3.8 B,D,K). Unter hohen extrazellulären $Na^+$-Konzentrationen erfolgt bei diesen Konstrukten die extrazelluläre $Na^+$-Freisetzung offenbar weniger effizient. Eine zu hyperpolarisierenden Potentialen verschobene Q/V-Kurve war lediglich bei einem einzigen Konstrukt, der M829R-Mutante, zu beobachten, was im Gegenteil auf eine reduzierte apparente $Na^+$-Affinität hindeutet (Abbildung 3.8 H).

Insgesamt war die höchste Verschiebung der Q/V-Kurve zu positiven Potentialen bei A606T mit einem $V_{0.5}$-Wert von 43,2 ± 8,6 mV zu beobachten (Tabelle 3.2), was im Vergleich zum Wildtyp einer Differenz von etwa 39 mV entspricht. Dieser als „halbmaximaler Spannungswert“ bezeichnete Parameter $V_{0.5}$ ist der Spannungswert, bei dem die Hälfte alle in der Membran vorliegenden $Na^+/K^+$-ATPase-Moleküle im $E_1$- bzw. $E_2$-Zustand anzutreffen sind. Besonders auffällig bei diesem Konstrukt war auch die Tatsache, dass selbst bei +100 mV noch keine Sättigung der Ladungswerte erkennbar war. Noch ausgeprägter waren die Veränderungen der I/V-Kurve bei der Mutation X1021R. Über den gesamten untersuchten Spannungsbereich hinweg war der Q/V-Kurvenverlauf der X1021R-exprimierenden Zellen linear. Beim Versuch der Extrapolation der Boltzmann-Funktion über einen erweiterten Spannungsbereich von -500 mV bis +300 mV wird die drastische Verringerung der Spannungsabhängigkeit der $Na^+$-Translokation im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich (Abbildung 3.9 G).

## 3.6 Wechselzahlen

Weitere Parameter, die unter $Na^+/Na^+$-Austausch-Bedingungen mit elektrophysiologischen Methoden ermittelt werden können, sind die Turnover-Zahl und der Steigungsfaktor $z_q$ der Q/V-Kurven, der die verschobene Ladung während eines Elementarereignisses darstellt. Der $z_q$-Wert liegt nach einer Veröffentlichung im Jahre 1994 von Holmgren und Rakowski bei ~ 0,8, was den Transfer einer Elementarladung über 80 % des Membranpotentials indiziert [HOLMGREN und RAKOWSKI, 1994]. Die

Mutante X1021R wies jedoch einen stark reduzierten $z_q$-Wert von 0,29 ± 0,03 $s^{-1}$, was vermutlich sogar eher der oberen Grenze entspricht. Auch die berechneten Turnover-Werte für dieses Konstrukt sind im Vergleich zum Wildtyp (12,8 ± 3,0 $s^{-1}$) relativ gering mit 3,5 ± 1,2 $s^{-1}$. Das dürfte wahrscheinlich ebenfalls eine Obergrenze darstellen, da bei einer Ausweitung des Spannungsbereichs die lineare Entwicklung der Q/V-Kurve noch kleinere Werte liefern würde. Die ATP1A2-Mutanten R383H, R763H und R834Q zeigten ebenso signifikant reduzierte Turnover-Zahlen ($p > 0.005$), jedoch nicht in einem solchen Ausmaß wie X1021R (Tabelle 3.2). A606T weist mit einem Wert von 8,9 ± 2,5 eine relativ geringfügige Reduktion der Transportkapazität auf.

| | $V_{0.5}$ mV | $z_q$ | Turnover $s^{-1}$ | n |
|---|---|---|---|---|
| **WT** | 4,3 ± 3,5 | 0,82 ± 0,03 | 12,8 ± 3,0 | 18 |
| **T263M** | nicht bestimmbar | | | - |
| **T376M** | nicht bestimmbar | | | - |
| **R383H** | 30,4 ± 6,4 | 0,80 ± 0,07 | 6,1 ± 1,2 | 12 |
| **A606T** | 43,2 ± 8,6 | 0,85 ± 0,07 | 8,9 ± 2,5 | 15 |
| **R763H** | 6,2 ± 6,9 | 0,81 ± 0,02 | 4,2 ± 1,8 | 18 |
| **M829R** | -12,0 ± 6,4 | 0,77 ± 0,04 | 11,6 ± 3,7 | 15 |
| **R834Q** | 25,6 ± 8,6 | 0,93 ± 0,20 | 3,6 ± 1,0 | 6 |
| **R908Q** | 11,7 ± 9,3 | 0,79 ± 0,08 | 13,0 ± 4,7 | 8 |
| **R937P** | nicht bestimmbar | | | - |
| **P979L** | 4,0 ± 7,1 | 0,79 ± 0,04 | 18,6 ± 5,4 | 21 |
| **S966X** | nicht bestimmbar | | | - |
| **del(K935-S940)insI** | nicht bestimmbar | | | - |
| **X1021R** | 30 ± 20 | 0,29 ± 0,03 | 3,5 ± 1,2 | 11 |

Tabelle 3.2

Aus transienten Strömen unter $Na^+/Na^+$-Austausch-Bedingungen ermittelte Eigenschaften der ATP1A2-Mutanten. Aufgelistet sind der Spannungswert für die halbmaximale Ladungsverschiebung $V_{0.5}$, die Äquivalentladungen und die Turnover-Zahlen, die in Spannungssprungexperimenten unter hohen $Na^+$-Konzentrationen und $K^+$-freien Bedingungen für messbare Konstrukte bestimmt wurden.

## 3.7 Proteinstabilität

Insgesamt zeigten zwei ATP1A2-Mutanten, die mit den verwendeten Methoden eingehend untersucht werden konnten, trotz der eindeutigen humangenetischen Klassifikation als FHM2/SHM-Mutationen keine funktionellen Veränderungen. Hierzu gehören die Konstrukte R908Q und P979L.

Der Austausch von Arginin zu Glutamat an Position 908 führt zu einer auffällig verminderten Proteinexpression in der Plasmamembran (Abbildung 3.5), was auch der Grund dafür sein könnte, weshalb diese SHM-Mutation im Mittel geringere stationäre Pumpströme aufweist, obwohl weder Turnover-Zahl noch $V_{0.5}$, und auch keine Veränderungen der Q/V-Kurve beobachtet werden konnten. Gleichermaßen waren die reziproken Zeitkonstanten identisch im Vergleich zu den Konstanten des Wildtyps. Die R908Q-Punktmutation befindet sich in der Schleife zwischen den beiden Transmembrandomänen TM8 und TM9 und ruft offenbar eine Beeinträchtigung im Targeting bzw. in der Integration in die Plasmamembran oder in der mittleren Verweildauer des Proteins in der Plasmamembran hervor, wobei die Proteinmenge in Ganzzell-Lysaten gegenüber dem WT-Protein nicht verringert war (Abbildung 3.5). Auf eine verringerte Plasmamembran-Expression lässt sich auch unabhängig von den Western Blots schließen. Die Ladungswerte ($Q_{max} – Q_{min}$) des Wildtyp-Proteins lagen im Durchschnitt bei ~19 nC, während R908Q einen durchschnittlichen Wert von 4.35 nC aufwies.

Die P979L-Mutante hingegen zeigte mit allen verwendeten Methoden zur Charakterisierung der Funktionalität in keiner Weise eine nennenswerte Abweichung der Enzymeigenschaften im Vergleich zur unmutierten $Na^+/K^+$-ATPase. Da in Oozyten-Experimenten, die bei einer Raumtemperatur von etwa 20-22°C durchgeführt wurden, absolut keine funktionellen Veränderungen zu erkennen waren, sind die Untersuchungen auf höhere Temperaturen ausgedehnt worden. Hierbei wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass bei verschiedenen Temperaturen unterschiedliche Schritte im Reaktionszyklus temperaturabhängig werden, so dass dadurch Unterschiede in der Temperaturabhängigkeit der Turnover-Rate verursacht werden könnten. Die Pumpströme des Konstrukts P979L und des Wildtyps wurden in einem Temperaturbereich von 18 bis 34°C untersucht und jeweils in Form einer Arrhenius-Auftragung dargestellt (Abbildung 3.10). Die Analyse ergab, dass die Pumpströme beider Konstrukte identische Aktivierungsenergien ($E_A$) besitzen. In einem Temperaturbereich von 18-26°C weisen der WT eine Aktivierungsenergie von 132 ± 14 kJ/mol und P979L eine $E_A$ von 124 ± 6 kJ/mol auf. Bei Temperaturen zwischen 26 - 34°C zeigten die beiden Enzyme ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bezüglich ihrer Aktivierungsenergien: 87 ± 15 kJ/mol (WT) versus 80 ± 2 (P979L). Die Unterteilung in zwei Temperaturbereiche bzw. das Auftreten solcher „Knickstellen“ in Arrhenius-Diagrammen ist gemäß früherer Publikationen charakteristisch für natürliche Membransysteme und resultiert aus der Gegebenheit, dass es in der Lipid-haltigen Zellmembran zu Phasenübergängen zwischen einer flüssig-kristallinen und einer Gelphase kommt [FRIEDRICH et al., 1996].

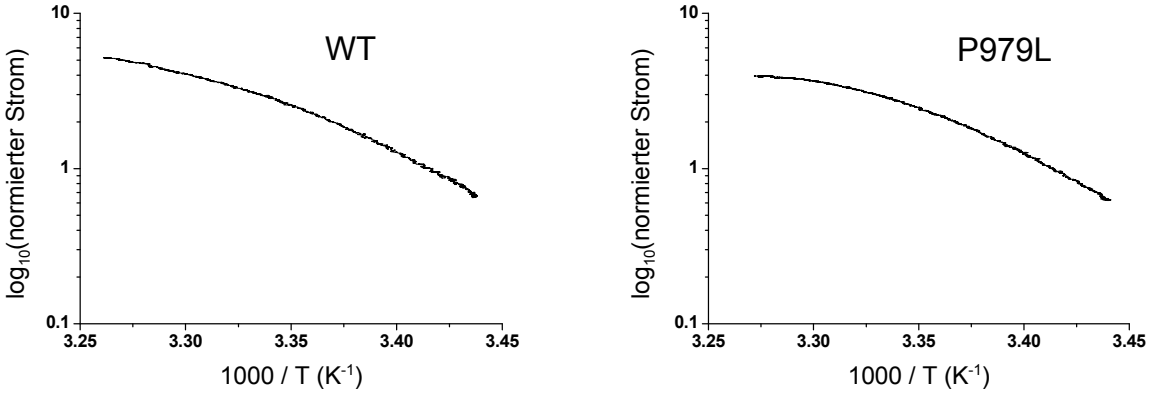



Abbildung 3.10

Repräsentative Arrhenius-Diagramme für das WT-Protein und die ATP1A2-Mutante P979L. Entsprechend exprimierende *Xenopus laevis*-Zellen wurden bei verschiedenen Temperaturen (18-34°C) untersucht. Die Aktivierungsenergien wurden durch lineare Anpassungen ermittelt.

Des Weiteren wurden Experimente mit Säugerzellen der Zelllinie „HEK293FT“ anstelle des Expressionssystems „Oozyte“ durchgeführt. Dies war erforderlich, um die Auswirkungen der physiologischen Körpertemperatur von 37°C untersuchen zu können. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass faltungsbedingt eine temperaturabhängige Proteindegradierung auftreten könnte. HEK293FT-Zellen, die bei zwei verschiedenen Temperaturen (28°C und 37°C) kultiviert wurden, zeigten in Western Blots von Ganzzell-Lysaten tatsächlich unterschiedliche Bandenintensitäten (Abbildung 3.11). Während die Proteinmenge des Konstrukts P979L bei einer Kultivierungstemperatur von 28°C identisch zur WT-Proteinexpression war, zeigte sie bei 37°C eine schwächere Bande. Die Ergebnisse von insgesamt fünf unabhängigen Experimenten ließen sehr deutlich erkennen, dass die Proteinmenge der ATP1A2-Mutante P979L bei einer Temperatur von 37°C im Vergleich zum Wildtyp stets bedeutend geringer ausfiel. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Als Kontrolle diente einerseits das WT-ähnlich exprimierende ATP1A2-Konstrukt I883L (ein sich nicht pathologisch auswirkender Polymorphismus), und das β-Aktin, ein endogen zytosolisch exprimiertes Strukturprotein, welches als Ladekontrolle für die aufgetragene Gesamtproteinmenge fungierte.

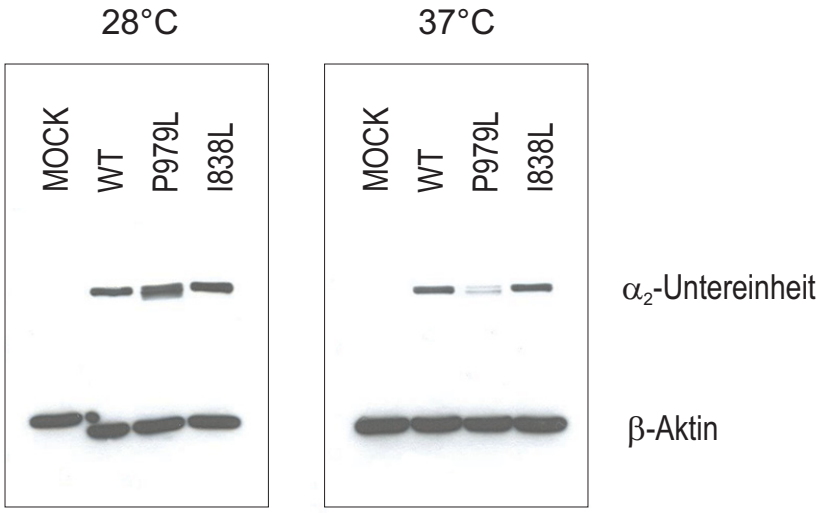



Abbildung 3.11

Repräsentativer Western Blot mit Proben aus Ganzzell-Lysaten (je 15 µg Protein), die aus transient transfizierten HEK293FT-Zellen stammen und bei Temperaturen von 28°C bzw. 37°C kultiviert wurden. Untersucht wurden mit Wasser (= MOCK), mit WT, P979L und I883L transfizierte Zellen. Die β-Aktin-Bande diente als Kontrolle der äquivalenten Beladung der Geltaschen. I883L ist ein nicht Krankheit verursachender Polymorphismus, der ebenfalls zur internen Kontrolle aufgetragen wurde.

Es ist weitestgehend bekannt, dass in sämtlichen Expressionssystemen die α-Untereinheit der $Na^+/K^+$-ATPase das Endoplasmatische Retikulum nicht ohne die Assemblierung mit der β-Untereinheit verlassen kann [NOGUCHI et al., 1987]. Die Degradierung hingegen geschieht bei diesen beiden $Na^+/K^+$-ATPase-Untereinheiten separat: Die β-Untereinheit wird schneller abgebaut als die α-Untereinheit [YOSHIMURA et al., 2008]. Auch wenn die molekulare Natur der Faktoren, die die Degradierung von nicht intakten Proteinen vermitteln, im Falle der oligomeren Membranproteine nicht vollständig verstanden ist, wird davon ausgegangen, dass der Abbau sowohl auf proteasomalem/lysosomalen als auch über den endozytotischen Weg stattfindet. Der proteasomale bzw. lysosomale Abbau ist eine Degradierungsform, der über mehrere Schritte verläuft und mit Anhängen des als Signalsequenz dienenden 8,5 kDa schweren Proteins Ubiquitin initiiert wird. Je nach Anzahl der angehängten Ubiquitinmoleküle wird zwischen verschiedenen Ubiquitinierungsarten unterschieden: Mono-, Oligo-, Multi- und Poly-Ubiquitinierung [MUKHOPADHYAY und RIEZMAN, 2007]. Abhängig davon, über welches Lysin die Moleküle verknüpft sind, wird der Zielort festgelegt. Bei der Verkettung über das Lysin 48 wird das ubiquitinierte Protein zum Proteasom und bei der Verkettung über das Lysin 63 zum Lysosom transportiert [HERSHKO und CIECHANOVER, 1992, BARRIERE er al, 2007]. Die beiden Abbauwege können mit entsprechenden Inhibitoren untersucht werden. Während der lysosomale Abbau über Inhibitoren wie beispielsweise

Chloroquin und Ammoniumchlorid gehemmt werden kann, sind MG-132 und Lactacystin zwei Beispiele als Inhibitoren für das Proteasom.

In der vorliegenden Arbeit kamen sowohl MG-132 als auch Lactacystin zum Einsatz. Leider ließen sich *Xenopus laevis*-Oozyten nicht über einen längeren Zeitraum bei Temperaturen um 37°C lagern, so dass bei diesem Expressionssystem keine temperaturabhängige Degradierung der $Na^+/K^+$-ATPase untersucht werden konnte. In HEK293FT-Zellen führte die Zugabe von MG-132 und Lactacystin zu keiner erhöhten Anreicherung des mutierten Proteins (Abbildung 3.12). Daher scheint der proteasomale Abbauweg unwahrscheinlich zu sein, so dass für künftige Experimente andere Möglichkeiten, wie beispielsweise die lysosomale und die endozytotische Inhibition, noch offen bleiben.

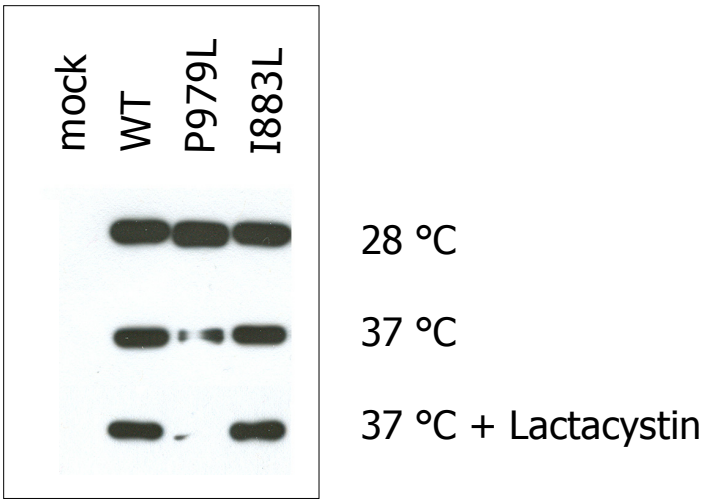



Abbildung 3.12

Western Blots vorläufiger Untersuchungen der proteasomalen Inhibition mittels Lactacystin. HEK293FT-Zellen, die mit dem Konstrukt P979L transfiziert wurden, zeigten bei Temperaturen von 28 °C keine Degradierung, während das bei 37 °C inkubierte Protein eine schwächere Bandenintensität aufwies. Diese jedoch ließ sich nach der dreistündigen Behandlung mit Lactacystin (10 µM) keine Anreicherung des mutierten Proteins erkennen. Aufgetragen wurden je 15 µg Gesamtprotein (quantitative Bestimmung nach Bradford). I883L wurde als nicht krankheitsverursachende FHM2-Mutation zur internen Kontrolle eingesetzt. Verwendete Antikörper: anti-HA (monoklonal, Klon 3F10) als Erst-Antikörper, anti-Ratte (Peroxidase-konjugiert) als zweiter Antikörper.

# *Diskussion*

# 4 Diskussion

Seit der Entdeckung und Veröffentlichung der ersten Mutationen im Gen *ATP1A2* hat die $Na^+/K^+$-ATPase aus humangenetischer Sicht ein verstärktes Interesse an ihrer Erforschung erlangt. Die mit Familiärer Hemiplegischer Migräne des Typs 2 assoziierten Mutationen sind in unterschiedlichen Domänen der humanen $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit lokalisiert. Im Rahmen der Struktur-Funktions-Untersuchungen wurden insgesamt 14 ATP1A2-Mutationen aus diversen Regionen des Enzyms ausgewählt. Die Selektion konzentrierte sich dabei auf Mutationen in hochkonservierten Kernregionen, die für alle P-Typ-ATPasen charakteristisch sind bzw. in allen $P_{II}$-Typ-ATPasen vorkommen ($Na^+/K^+$-, $H^+/K^+$-, $Ca^{2+}$-ATPase).

**A-DOMÄNE**: Bislang sind in der Aktuator-Domäne nicht viele FHM2-Mutationen bekannt geworden. T263M beispielsweise ist in der intrazellulären L2/3-Schleife lokalisiert. Diese Region ist deswegen interessant, weil sich die Positionierung der A-Domänenschleife auf die ATPase-Aktivität auswirkt. Die L2/3-Schleife bildet mit dem N-Terminus eine regulatorische Einheit, die wiederum mit der L4/5-Schleife interagiert [SEGALL et al., 2002].

**N-DOMÄNE**: Eine direkt an der Scharnierstelle zwischen der N- und P-Domäne lokalisierte Mutation ist R383H. Neben der Tatsache, dass diese Mutation eine Art "Gelenkstück" zwischen diesen beiden Domänen bildet, liegt sie zudem nur neun Aminosäuren von der Phosphorylierungsstelle D374 entfernt. Hier ist es überaus aufschlussreich, inwieweit sich der Aminosäureaustausch auf die Dynamik von Konformationsänderungen auswirkt.

**P-DOMÄNE**: Die FHM2-Mutation T376M betrifft das Threonin im DKTG-Motiv und ist lediglich zwei Aminosäuren vom Aspartat (D374) entfernt, das während der ATP-Hydrolyse phosphoryliert wird. Da es sehr wahrscheinlich ist, dass Mutationen in diesem hochkonservierten Motiv die enzymatische Funktion beeinflussen, ist es von fundamentaler Bedeutung, die strukturellen und funktionellen Auswirkungen des Aminosäureaustauschs (Threonin→Methionin) an dieser Position zu untersuchen.

**TRANSMEMBRAN-REGION**: G301R befindet sich im Transmembran-Segment TM3. Der Austausch von einem Glycin gegen ein Arginin könnte aufgrund der langen Seitenkette des Arginins sterische Probleme hervorrufen. Die Position der Mutante G301R ist hinsichtlich ihrer regionalen Lokalisation zunächst unauffällig. Phänotypisch hingegen stellt diese Mutation eine besonders schwere Form der FHM2-Erkrankung dar. Neben der hemiplegischen Migräne kommt es außerdem zu starken

sensorischen Defiziten und transienten oder permanenten zerebellären Anzeichen, wie Ataxie (Störungen der Bewegungskoordination), Nystagmus (Augenzittern) und Dysarthrie (Sprechstörungen).

**ÜBERGANGSREGION TRANSMEMBRAN-BEREICH UND P-DOMÄNE**: Die Mehrheit der näher betrachteten FHM2- und SHM-Mutationen liegt in dieser Region. Insgesamt sind hier vier Mutationen ausgewählt worden, die einer funktionellen Charakterisierung unterzogen wurden: A606T, R763H, M829R und R834Q. R763 liegt unmittelbar benachbart zur Aminosäure L764, die bei einer Mutation zu Prolin zu einem völlig inaktiven Protein führt [KOENDERINK et al., 2005]. M829R und R834Q sind die einzigen FHM2-Mutationen, die in der intrazellulären Schleife L6/7 zwischen den Transmembrandomänen TM6 und TM7 lokalisiert sind. Diese Schleife ist während der Bindung der Kationen maßgeblich an der Konformationsänderung des TM6-Segments beteiligt. A606 wird ebenfalls eine essentielle Funktion in der Stabilisierung der P-Domäne mit der L6/7-Scheife zugeschrieben.

**EXTRAZELLULÄRER BEREICH**: Bisher ist nur eine kleine Anzahl an Mutationen im extrazellulären Bereich bekannt. Hier sind aus zwei unterschiedlichen Schleifen drei Mutationen untersucht worden: R908Q (SHM) in L7/8, P979L (FHM) und S966X (FHM) in L9/10. R908Q ist eine in der extrazellulären Schleife zwischen TM7 und TM8 lokalisierte Mutation. Diese Schleife ist von essentieller Bedeutung für die Interaktion der α- und β-Untereinheit. Im Falle der S966X-Mutation handelt es sich um eine Frameshift-Mutation, die aufgrund eines frühzeitigen Stopp-Codons anstelle der aus den üblichen 1020 Aminosäuren aufgebauten zu einem lediglich aus 997 Aminosäuren bestehenden Enzym führt. Daher stellt sich die Frage, wie sich in diesem Fall die veränderte Aminosäuresequenz auf die nachfolgenden Transmembrandomänen auswirkt. P979L ist eine zu Beginn des TM10-Segments extrazellulär gelegene Mutation, die relativ nahe am C-Terminus lokalisiert ist und einen Einfluss auf die Proteinstruktur mit möglichen funktionellen Konsequenzen haben könnte.

**SWITCH-REGION UND C-TERMINUS**: Bei den drei zytoplasmatisch positionierten Mutationen in der sogenannten Switch-Region bzw. am äußersten Ende des C-Terminus handelt es sich einerseits um eine typische Punktmutation (R937P), des Weiteren um eine Deletion (Deletion von fünf Aminosäuren) mit simultaner Insertion einer einzelnen Aminosäure (Δ(K935-S940)insI, insgesamt 1015 AS) und außerdem um eine Mutation, die für die Addition 28 zusätzlicher Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins verantwortlich ist (X1021R). Im Falle dieser drei Mutationen sind strukturelle Veränderungen und somit auch funktionelle Abweichungen zu erwarten. Der Austausch des Arginins gegen ein Prolin (R937P), einem potentiellen Helixbrecher, lässt vermuten, dass eine Störung der ATPase-Sekundär- und Tertiär-Struktur auftritt. Außerdem ist zu erwarten, dass die amino-aromatischen Wechselwirkungen zu den Tyrosinen am C-Terminus beeinträchtigt werden.

Diese mit besonderem Augenmerk ausgewählten ATP1A2-Mutanten wurden mit Hilfe von elektrophysiologischen, spektroskopischen und biochemischen Methoden eingehend auf ihre Funktionalität untersucht. Vorweg lassen sich die Auswirkungen der Mutationen anhand der Resultate zahlreicher Untersuchungen in zwei Gruppen zusammenfassen. Zur ersten Gruppe gehören Mutationen, die entweder eine verschwindend geringe katalytische Aktivität oder sogar den vollständigen Verlust jeglicher Funktion aufwiesen, aber auch die, die einen beeinträchtigten Transport zur Plasmamembran zeigten. Als Diskussionsgrundlage wird für diese Gruppe von Mutationen ihre strukturelle Bedeutung mit Hilfe von Grafikprogrammen zur Darstellung von Makromolekülen betrachtet und hinsichtlich ihrer mutmaßlichen Auswirkungen erörtert. Der zweiten Gruppe werden Mutationen zugeordnet, die mit den angewendeten Methoden als leicht bis relativ stark in ihrer Funktionalität beeinträchtigt oder verändert beurteilt wurden. Zu diesen Aberrationen gehören Veränderungen in apparenten Affinitäten für die transportierten Kationen ($Rb^+$, $Na^+$, $K^+$) und Abweichungen hinsichtlich ihrer Kinetik und Spannungsabhängigkeit. In diesem Fall ist eine detaillierte Diskussion bezüglich Struktur-Funktions-Beziehungen durchführbar.

## 4.1 Auswirkung auf die katalytische Aktivität und die Plasmamembran-Expression

Verschwindend geringen bzw. keinen stationären Pumpstrom zeigten die Mutationen T263M, G301R, T376M, Δ(K935-S940)insI, R937P und S966X, und auch in Experimenten zur Untersuchung der Rubidiumaufnahme wiesen sie teilweise eine ausgeprägt reduzierte Pumpaktivität auf. Im Falle der Mutanten T263M, G301R, T376M und R937P war die Menge an Total- und Plasmamembranprotein gegenüber dem Wildtyp unverändert, so dass hier der beobachtete Funktionsverlust mit größter Wahrscheinlichkeit auf einen stark reduzierten oder gar völlig aufgehobenen katalytischen Umsatz bei unbeeinträchtigter Proteinfaltung und Plasmamembran-Expression zurückzuführen ist (siehe 4.1.1). Sowohl die beiden verbleibenden Mutationen, die Deletions- und Frameshift-Mutante, als auch R908Q hatten hingegen eine beeinträchtige Plasmamembran-Expression. Bei Δ(K935-S940)insI und S966X sind diese Effekte sehr wahrscheinlich durch die verkürzte bzw. stark veränderte Sequenz bedingt. Untersuchungen der durch diese beiden Mutationen bewirkten Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Transmembran-Vorhersageprogramms TMMOD zeigten, dass bei S966X die zehnte Transmembran-Domäne vollständig fehlt (Abbildung 4.1). Durch das Wegfallen von zwei Basen des Serin kodierenden Tripletts an Position 966 kommt es zu folgender Aminosäuresequenz: LLPRHGCSPPVPAQSHLVVVRLPLQPPHLHL. Die hier vorkommenden sieben Proline haben erheblichen Einfluss auf die Proteinfaltung, da es durch das Vorhandensein der *cis*-Amidbindung zu

Unterbrechungen der lokalen Sekundärstruktur (α-Helices und β-Faltblätter) kommt. Die zentrale Bedeutung des C-Terminus wird im Zusammenhang mit der Mutante X1021R eingehend diskutiert.

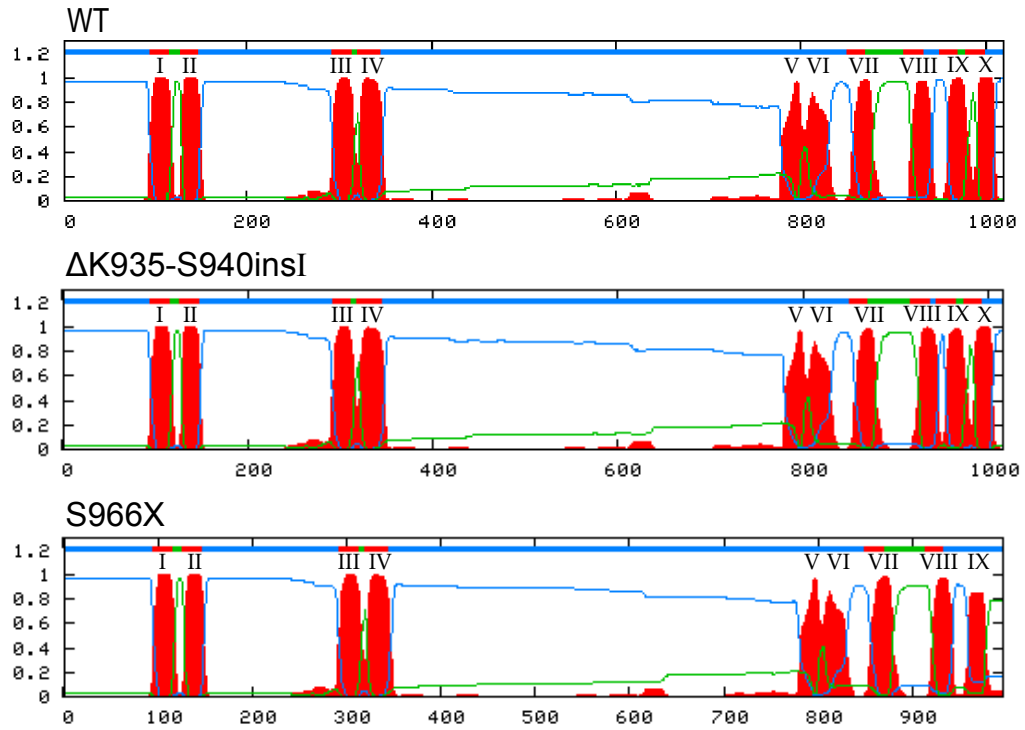


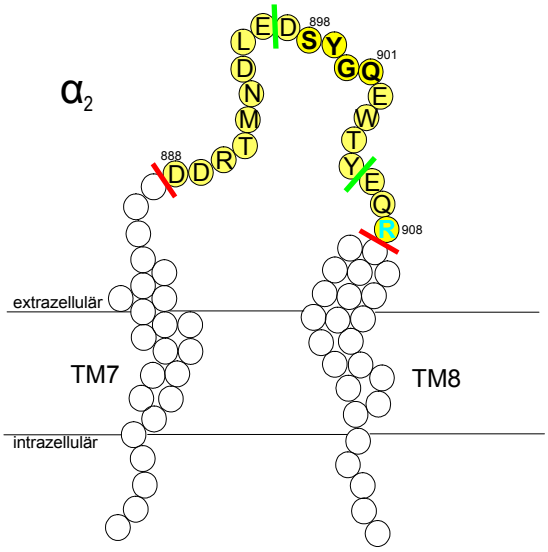

Abbildung 4.1

Mit Hilfe von im Internet verfügbarer Software (TMMOD: *Hidden Markov Model for Transmembrane Protein Topology Prediction* http://liao.cis.udel.edu/website/servers/TMMOD/scripts/frame.php?p=submit) erstellte Vorhersagen über transmembranäre Helices (rot) und ihre Topologie. In blau dargestellt ist der intrazelluläre und in grün der extrazelluläre Bereich. Untersucht wurden der Wildtyp und die Mutanten Δ(K935-S940)insI und S966X.

Auch bei der Mutanten Δ(K935-S940)insI kann in der Vorhersage beobachtet werden, dass die bereits recht kurze intrazelluläre Schleife zwischen TM8 und TM9 noch kürzer wird (Abbildung 4.1). Das Fehlen der sechs Aminosäuren KTRRNS scheint einen gewichtigen Einfluss auf die korrekte Proteinfaltung und die Plasmamembran-Expression und wahrscheinlich ebenso auf die katalytische Aktivität zu haben. Da in dieser Region auch die FHM-Mutation R937P (KTRRNS) gelegen ist, wird auf die Bedeutung von diesem Sequenzabschnitt in einem späteren Teil der Diskussion näher eingegangen.

R908Q hingegen zeigte in den untersuchten Plasmamembran-Präparationen zwar ebenfalls keine WT-äquivalente Proteinmenge, doch konnten außer den reduzierten Pumpströmen keine weiteren Veränderungen der funktionellen Eigenschaften beobachtet werden. Demnach ist das fehlerhafte Plasmamembran-Targeting sehr wahrscheinlich der Grund für die verminderte Ionentransport-Aktivität. Das Arginin in Position 908 befindet sich in der extrazellulären Schleife zwischen den beiden

Transmembrandomänen TM7 und TM8, welche sich lediglich acht Aminosäuren entfernt von dem hoch konservierten $^{898}$SYGQ$^{901}$-Motiv befindet (Positionen entsprechen der humanen $\alpha_2$-Isoform, Abbildung 4.2). Wie bereits eingangs erwähnt, ist dieses Motiv für die einwandfreie Faltung der α-Untereinheit und die effiziente α/β-Interaktion notwendig. In einer Studie von Béguin und Kollegen wurde beschrieben, dass dieses Motiv zwar wichtig aber nicht alleinig ausreichend für das korrekte Aneinanderfügen der beiden Untereinheiten ist [BÉGUIN et al., 2000]. Möglicherweise dient das SYGQ-Motiv als primäre Interaktionsstelle für die β-Untereinheit und gewährleistet das Eintreten von nachfolgenden sekundären Interaktionsabläufen.




| | | |
|---|---|---|
| $Na^+/K^+$ $\alpha_1$ | $^{893}$ | [DDRWINDVE[DSYGQQWTY]EQR]KIVEFTCHTA$^{923}$ |
| $Na^+/K^+$ $\alpha_2$ | $^{888}$ | [DDRTMNDLE[DSYGQEWTY]EQR]KVVEFTCHTA$^{918}$ |
| $Na^+/K^+$ $\alpha_3$ | $^{887}$ | [DDRTVNDLE[DSYGQQWTY]EQR]KVVEFTCHTA$^{917}$ |
| $H^+/K^+$ | $^{900}$ | [EDHHLQDLQ[DSYGQEWTF]GQR]LYQQYTCYTV$^{930}$ |

Abbildung 4.2

Schematische Darstellung (oben) und Sequenz-Vergleich (unten) der Region TM7/TM8 der humanen $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit. In diesem Bereich befindet sich sowohl das SYGQ-Motiv als auch dieses umgebend weitere Aminosäuren, die ebenfalls unmittelbar an der Bindung der β- an die α-Untereinheit beteiligt sind. Grün abgesetzt ist die Sequenz, welche sich stabilisierend auf die α-Untereinheit auswirkt. In rot dargestellte Aminosäuren sind an darauf folgenden Faltungsprozessen beteiligt. Die untersuchte Mutation R908Q befindet sich genau in dieser bedeutsamen Region.

Eine wichtige funktionelle Bedeutung wird der Verbindungsschleife zwischen den Transmembran-Domänen TM7 und TM8 zugeschrieben: hierbei handelt es sich um einen Abschnitt von etwas mehr als 20 Aminosäuren. Es wird vorgeschlagen, dass die Assemblierung der β-Untereinheit an einen Teilbereich von insgesamt neun Aminosäuren ($\alpha_2$: D897-Y905, Abbildung 4.2, grüne Banden) bereits während der Proteinsynthese wichtig für die Stabilisierung der α-Untereinheit ist. Die um wenige Aminosäuren längere Sequenz ($\alpha_2$ D888-R908 in Abbildung 4.2, rote Banden) ist an weiteren

Faltungsereignissen beteiligt, die erst nach der Interaktion mit der β-Untereinheit stattfinden. Solche sekundären intramolekularen Interaktionen könnten (a) die korrekte Verpackung der C-terminalen Membrandomäne und (b) eventuell auch deren Integration in die Lipiddoppelschicht sein [BÉGUIN et al., 2000]. Wie bereits erwähnt, wird dieser vormals eingehend unter Punkt 4.4 beschriebenen C-terminalen Membrandomäne eine zentrale Rolle beim Ionentransport zugeschrieben.

Interessanterweise wurde von Béguin und Kollegen dem in Abbildung 4.2 dargestellten hochkonservierten Sequenzabschnitt die Funktion eines Degradierungssignals zugesprochen, das von der luminalen Seite im Endoplasmatischen Retikulum erkannt wird [BÉGUIN et al., 2000]. Das bedeutet, dass die Sequenz unmittelbar nach Anlagerung der β-Untereinheit an die extrazelluläre Schleife L7/8 „verdeckt" wird und so die α-Untereinheit vor einer vorzeitigen Degradierung schützt. Die Anwesenheit der Mutation R908Q in diesem Sequenzbereich rechtfertigt die Annahme, dass der Austausch des basischen Arginins durch ein saures Glutamin in dieser hochkonservierten Region zu einem verfrühten Abbau der $Na^+/K^+$-ATPase beiträgt.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der Integritätsstörungen der α-Untereinheit im Falle der Mutation R908Q könnte das Ausbleiben einer eventuell vorhandenen Wasserstoffbrücke zwischen der Guanidingruppe des Arginins und dem Sauerstoff des L797-Rückgrats (extrazelluläre Schleife zwischen TM5 und TM6) sein (Abbildung 4.3).

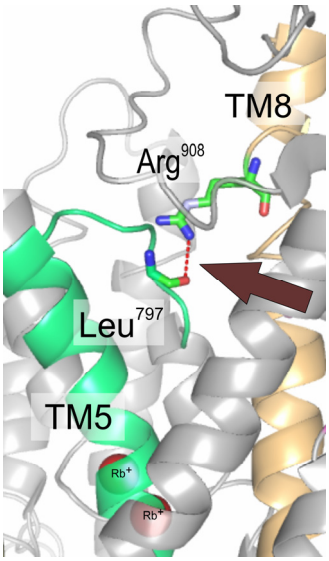



Abbildung 4.3

Strukturelle Darstellung der beiden über eine potentielle Wasserstoffbrücke (rot gestrichelt) miteinander wechselwirkenden extrazellulären Schleifen der Transmembrandomänen TM5/TM6 und TM7/TM8. Die Carboxylgruppe des Leucin-Rückgrats und eine der terminalen Guanidingruppe des Arginins bilden die einzig mögliche Wasserstoffbrücke zwischen den beiden genannten extrazellulären Schleifen (dunkel eingezeichneter Pfeil). Zugrunde liegt die PDB-Datei 3B8E, wobei die Beschriftung der homologen Aminosäurepositionen der humanen $\alpha_2$-Unteinheit entspricht. In der PDB-Datenbank hinterlegten $Na^+/K^+$-ATPase-Struktur liegen zwei $Rb^+$-Ionen (rot) in der Kationen-Bindungsstelle gebunden vor. Zur anschaulichen Darstellung wurde das Grafikprogramm PyMOL verwendet.

### 4.1.1 Elektrophysiologisch nicht charakterisierbare Konstrukte

Wie zuvor erwähnt, gibt es auch FHM2-Mutationen, die trotz ihrer einwandfreien Integration in die Plasmamembran absolut keine stationären Pumpströme aufwiesen. Die Mutationen G301R und T376M zeigten selbst in den hochsensitiven Atom-Absorptions-Spektroskopiemessungen keine bzw. nur eine sehr niedrige $Rb^+$-Aufnahme, die der von uninjizierten Oozyten entsprach. Dieser Effekt, dass uninjizierte Zellen ebenfalls eine geringe Menge an $Rb^+$ aufnehmen, ist auf unspezifische Aufnahme zurückzuführen. Für die Mutanten T263M und R937P liegt die gemessene $Rb^+$-Aufnahme lediglich geringfügig über dem Hintergrund der uninjizierten Oozyten. Demnach sind diese vier Mutanten strukturell derart beeinträchtigt, dass sie zwar richtig gefaltet und in die Plasmamembran eingebaut werden, es sich aber dabei um nichtfunktionsfähige Proteine handelt. Dieser völlige Funktionsverlust lässt sich gut mit einer durch die entsprechende Punktmutation beeinträchtigten Struktur erklären.

**T263M**: Der Austausch von einem Threonin zu einem Methionin führt zu einem Wegfall der terminalen Hydroxyl-Gruppe und somit auch zum Verlust einer möglichen Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Das Threonin an der Position 263 befindet sich unmittelbar vor einem Glycin (G264), welches in allen P-Typ-ATPasen vorkommt. Anscheinend duldet die hochkonservierte Kernsequenz in dieser Region nicht die kleinste Veränderung. Obwohl die Seitenkette des Methionins im Vergleich zu der des Threonins nur geringfügig größer ist, wird durch den Austausch die lokale Struktur offenbar so stark beeinträchtigt, dass die Interaktion zwischen den Anteilen der A-Domäne, die aus der L2/3-Schleife und dem N-Terminus zusammengesetzt ist, gestört wird und keine regulatorische Einheit (A-Domäne) gebildet werden kann. Daher könnte zusätzlich auch die Interaktion mit der N-Domäne (L4/5-Schleife) betroffen sein [SEGALL et al., 2002]. Im Falle der homologen $Ca^{2+}$-ATPase SERCA existieren bereits diverse Kristallstrukturen beider Konformationszustände $E_1$ und $E_2$, aus denen sich schließen lässt, dass sich im Bereich des T263-Äquivalents T230 das α-helikale Muster im Verlauf der $E_1$-$E_2$-Konformationsänderung teilweise entwunden bzw. unterbrochen wird [TOYOSHIMA et al., 2000, TOYOSHIMA und NOMURA, 2002]. Womöglich ist dies auch bei der $Na^+/K^+$-ATPase der Fall, weshalb es folglich zur Beeinträchtigung bzw. zum Ausbleiben der notwendigen Interaktionsschritte kommt.

**G301R**: Durch den Austausch der kurzkettigen Aminosäure Glycin gegen die positiv-geladene Aminosäure Arginin mit relativ langer Seitenkette treten zwei Wasserstoffatome auf (Guanidingruppe des Arginins), die potentiell zur Ausbildung von weiteren Wasserstoffbrücken beitragen können. Glycin G301 könnte lediglich Wasserstoffbrücken-Bindungen zu Aminosäuren innerhalb der Transmembrandomäne TM3 ausbilden. Die Mutante G301R hingegen wäre imstande weitere Bindungen auszubauen,

wie beispielsweise zur nahe gelegenen Helix M5. Ein Glycin in einer Transmembran kann entweder einen leichten Knick bewirken oder ist dort anzutreffen, wo es räumlich beengt ist. Im Falle dieser Mutation dürfte die Störung der lokalen Struktur und somit des Kationen-Transports durch eine sterische Hinderung hervorgerufen sein.

**T376M**: Wie bei T263M handelt es sich hierbei ebenfalls um einen Austausch von einem Threonin zu einem Methionin, wodurch die Wasserstoffbrücken-bildende OH-Gruppe verloren geht. Thr-376 befindet sich inmitten des DKTGT-Motivs und trägt entscheidend zur $Mg^{2+}$-Koordination und somit zur ATP-Spaltung bei. T376 bildet über den Stickstoff der Hauptkette eine Wasserstoffbrücke zum terminalen Sauerstoff des D374 - der Aminosäure, auf die das γ-Phosphat des Adenosintriphosphats über eine Phosphoanhydrid-Bindung übertragen wird. Mit Hilfe des Grafikprogramms Swiss-PDBViewer und dem PDB-File 3B8E kann dargestellt werden, dass das in der Kristallstruktur der $Na^+/K^+$-ATPase befindliche Magnesium von insgesamt drei Aminosäuren koordiniert wird: T374, T376 und D714 (AS-Position entspricht der $\alpha_2$-Isoform). Der Abbildung 4.4 kann entnommen werden, dass T376 eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit E219 eingeht. Durch die Mutation zu einem Methionin entfällt die Wasserstoffbrücken-Bindung von der terminalen OH-Gruppe des T376 und es wird stattdessen eine Bindung vom Schwefel des Methionins zum Sauerstoff des E219 ausgebildet (Abbildung 4.4 B). Die mit dem Swiss-PDBViewer simulierte Mutation von Threonin zu Methionin deutet auf keine Beeinflussung der Magnesium-Koordination hin. Jedoch muss hierbei der Verzicht auf Optimierungen wie beispielsweise Energie-Minimierungen berücksichtigt werden.
Es ist auch durchaus denkbar, dass die endständige Methyl-Gruppe des Methionins einen großen Beitrag zum Funktionsverlust der $Na^+/K^+$-ATPase leistet. Bonn und Kollegen haben herausgefunden, dass die Reorientierung von Wassermolekülen, die eine Methyl-Gruppe umgeben, von 2.5 ps bis mehr als 10 ps verlangsamt wird [BONN et al., 2009]. Eine einzige Methyl-Gruppe kann die Reorientierungsdynamik von bis zu fünf Hydroxylgruppen in ihrer Umgebung beeinflussen [HAUPTS et al., 1999]. Zwar handelt es sich bei den Untersuchungen von Bonn und Kollegen nicht explizit um Protonen, deren Mobilität durch die Anwesenheit einer Methyl-Gruppe verringert wird. Dennoch ist die Möglichkeit einer Beeinträchtigung der Orientierung bzw. Koordination des Magnesium-Ions und des Phosphats durch die neu erworbene $CH_3$-Gruppe und des daraus resultierenden vollständigen Verlusts der ATPase-Aktivität nicht auszuschließen. Bedauerlicherweise konnte die Kristallstruktur der $Na^+/K^+$-ATPase im $E_1$-Zustand noch nicht aufgeklärt werden. Denn möglicherweise sind Wasserstoffbrücken-Bindungen bzw. andere molekulare Wechselwirkungen, die im $E_2P$-Zustand vorliegen, erst gar nicht in der $E_1$-Konformation vorhanden bzw. umgekehrt.

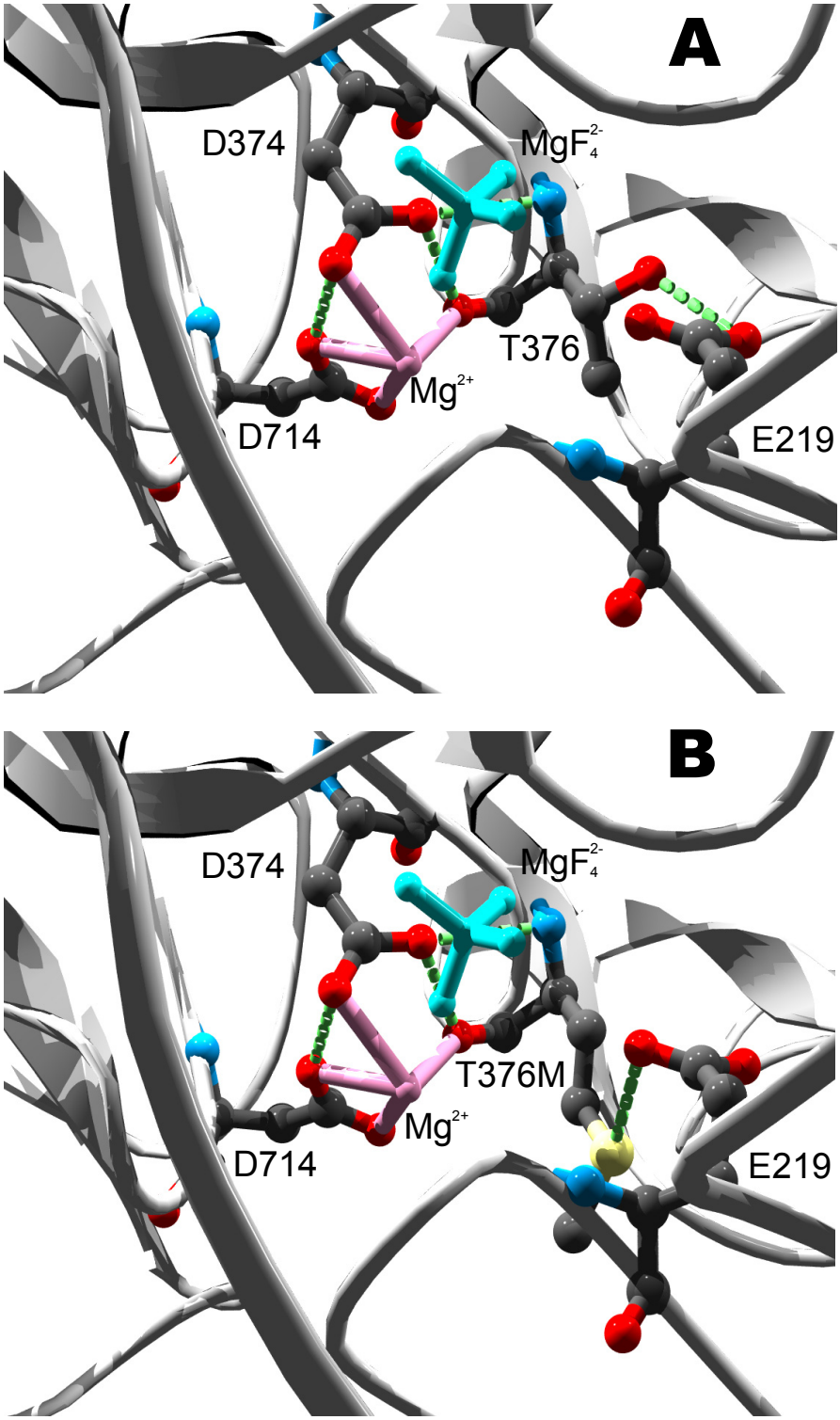



Abbildung 4.4

(A) T376 und die in einem Umkreis von 5 Å lokalisierten Aminosäuren mit den zugehörigen Wasserstoffbrücken-Bindungen. In (B) ist Threonin an Position 376 mit Hilfe des Programms Swiss-PDBViewers zu Methionin mutiert worden, wodurch neue Wechselwirkungen entstehen. T376 koordiniert mit D374 und D714 das Magnesium-Ion, das zur ATP-Hydrolyse benötigt wird. Türkis = Phosphatanalogon (Magnesiumtetrafluorid), magenta = Magnesium, rot = Sauerstoff, blau = Stickstoff, gelb = Schwefel, anthrazit = Kohlenstoff.

**R937P**: Seit der Veröffentlichung der $Na^+/K^+$-ATPase-Struktur im Dezember 2007 wird Arg-937 eine elementare Rolle in der korrekten Positionierung des C-Terminus zugeschrieben. Das sich in der intrazellulären Schleife L8/9 befindliche Arginin bildet zu den beiden terminalen Tyrosinen Y1019 (OH-Gruppe der aromatischen Seitenkette) und Y1020 (Sauerstoff der terminalen COOH-Gruppe des Rückgrats) Wasserstoffbrücken aus (Abbildung 4.5) und ist unter Beteiligung einer weiteren Wasserstoffbrücke (Y1020 ↔ K770) darin involviert, die dritte Natrium-Bindungsstelle zu bilden [MORTH et al., 2007]. Sowohl Toustrup-Jensen und Kollegen als auch Meier und Kollegen fanden heraus, dass die Hydroxylgruppen der Tyrosine einen geringeren Einfluss auf die strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen dem C-Terminus und der dritten $Na^+$-Bindungsstelle haben als die aromatischen Ringe der Tyrosine [TOUSTRUP-JENSEN et al., 2009, MEIER et al., 2010]. Die amino-aromatischen Wechselwirkungen werden durch den Austausch des Arginins durch Prolin eliminiert, so dass auch hier ein völliger Funktionsverlust die Folge ist.

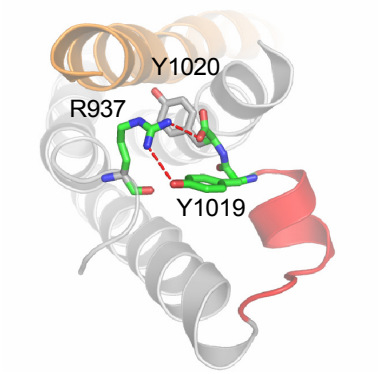



Abbildung 4.5

Strukturelle Detail-Darstellung des Arg-937 und der entsprechenden Wasserstoffbrücken-Bindungen zu den beiden Tyrosinen Y1019 und Y1020. In orange ist die Helix M5 dargestellt und in rot die Sequenz kurz vor dem C-Terminus, inklusive des C-Terminus (Grafikprogramm = PyMOL, Protein-Datenbank-Eintrag = 3B8E).

## 4.2 Vernetzung via $R_1$-$X_1$-H•••$X_2$-$R_2$ zwischen der Schleife L6/7, der P- & TM-Domäne

Neben der Tatsache, dass die ATP1A2-Mutationen A606T, R763H, M829R und R834Q allesamt reduzierte Turnover-Zahlen aufwiesen, gehören zu weiteren Gemeinsamkeiten erhöhte apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der transienten Ströme und diverse Veränderungen spannungsabhängiger Eigenschaften bzw. der Kationen-Affinitäten. Die genannten vier Mutationen betreffen ausnahmslos hoch konservierte Aminosäuren, die vermutlich sehr stark in einem Netzwerk aus Wasserstoffbrücken-Bindungen ($R_1$-$X_1$-H•••$X_2$-$R_2$) eingebunden sind. In Abbildung 4.6 ist zu erkennen, welche Transmembrandomänen bzw. Schleifen hierbei involviert sind. R763 (Helix M5) bildet

die zentrale Aminosäure, die über Wasserstoffbrücken mit A606 (P-Domäne), M829 (Schleife L6/7) und G365 (P-Domäne) in Verbindung steht (Abbildung 4.6 A). Durch diese Anordnung wird die relative Position der L6/7-Schleife, der P-Domäne und der M5-Helix stabilisiert. Die ATP1A2-Aminosäuren A606, R763 und M829 entsprechen den SERCA-Aminosäuren A617, R751 und M817, bei denen ebenfalls das Auftreten eines solchen Netzwerks von Wasserstoffbrücken-Bindungen beschrieben wurde [TOYOSHIMA et al., 2000, TOYOSHIMA und NOMURA, 2002]. Während der Konformationsänderung der SERCA von der $E_1$- (Protein-Datenbank Eintrag 1SU4, [TOYOSHIMA et al., 2000]) zur $E_2$-Struktur (Protein-Datenbank Eintrag 1IWO, [TOYOSHIMA und NOMURA, 2002]) werden die Wasserstoffbrücken zwar neu angeordnet, jedoch bleiben sie dabei zwischen R751 und A617 oder M817 im Wesentlichen intakt. Dies deutet auf die Notwendigkeit einer sehr strikt stabilisierten lokalen Struktur während des katalytischen Zyklus hin.

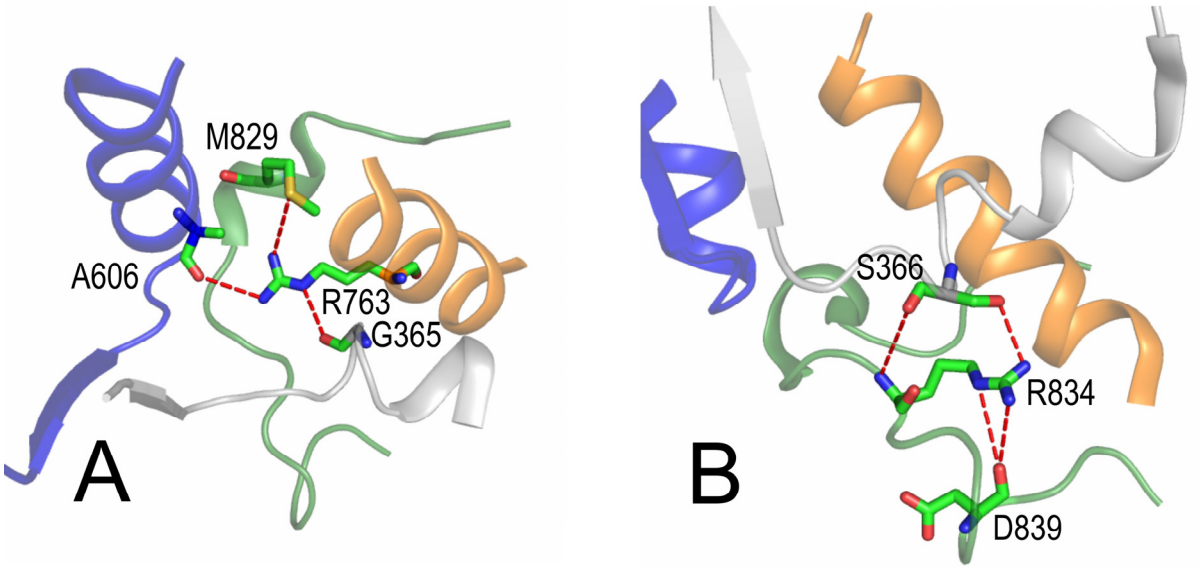



Abbildung 4.6

In Netzwerken von Wasserstoffbrücken-Bindungen im Zentralbereich des Proteins involvierte ATP1A2-Aminosäuren. (A) R763 bildet die Verknüpfungsstelle zwischen der Schleife L6/7 (M829) und der P-Domäne (A606 und G365). (B) Wasserstoffbrücken-Bindungen (rot gestrichelt) von R834 zu D839 (L67/) und S366 (P-Domäne). Potentielle Wasserstoffbrücken sind bis zu einer Länge von 3,3 Å berücksichtigt.

In Abbildung 4.6 B ist zu erkennen, dass R834 sowohl zur Aminosäure D839 (Schleife L6/7) als auch zu S366 (P-Domäne) Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Die hierzu entsprechende SERCA-Aminosäure R822 ist unter Vermittlung eines Wassermoleküls über Wasserstoffbrücken mit einem hochkonservierten Glutamat verknüpft, das sich innerhalb der ersten α-Helix der P-Domäne befindet [TOYOSHIMA et al., 2000]. Anhand von Vergleichen mit der $Ca^{2+}$-ATPase ist davon auszugehen, dass im Falle der $Na^+/K^+$-ATPase die entsprechenden Aminosäuren A606, R763, M829 und R834 während des

katalytischen Zyklus ebenfalls für die komplexe strukturelle Stabilisierung der Verknüpfungsstellen zwischen den verschiedenen Domänen verantwortlich sind. Die vier FHM2-Mutationen A606T, R763H, M829R und R834Q scheinen das Netzwerk aus Wasserstoffbrücken-Bindungen so stark zu stören, dass eine abnorme Flexibilität während der Konformationsänderung des $E_1P$- in den $E_2P$-Zustand erreicht wird.

Ein bedeutender Befund dieser Untersuchung ist, dass die unterschiedlichen Mutationen innerhalb der Wasserstoffbrücken-Netzwerke, die die diversen Domänen des Enzyms miteinander verbinden, nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der $Na^+/K^+$-ATPase führen, es aber zu Veränderungen der Kinetiken des $E_1P/E_2P$-Konformationsübergangs und/oder der spannungsabhängigen Eigenschaften kommt, die von komplexen Effekten auf die Wechselwirkung mit den transportierten Kationen begleitet werden. Da sich die Kationen-Bindungsstellen nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zur „Netzwerk-Region“ befinden, kann die Veränderung der Kationen-Affinität nicht durch eine direkte Störung der Struktur der Kationen-Bindungsstellen begründet werden. Vielmehr kann das Gleichgewicht der spannungsabhängigen Verteilung zwischen den beiden Zuständen $E_1P$ und $E_2P$ durch außergewöhnlich hohe apparente Ratenkonstanten der Vorwärts- und/oder Rückwärtsreaktion beeinflusst sein. In der Tat weisen die verschobenen Q/V-Kurven auf Veränderungen der spannungsabhängigen Verteilung zwischen den Zuständen $E_1P$ und $E_2P$ hin. Deshalb kann in Anlehnung an die von Jørgensen und Kollegen angestellten Überlegungen [JØRGENSEN et al., 2001] davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Veränderungen der apparenten Kationen-Affinitäten lediglich eine sekundäre Konsequenz der Verschiebung des Konformationsgleichgewichts sind. Allerdings sind die beobachteten langreichweitigen Effekte auf die Kationen-Bindungsstellen sehr komplex, da die Verschiebungen des dynamischen $E_1P$-$E_2P$-Gleichgewichts scheinbar nicht konsistent mit den Veränderungen der apparenten Kationen-Affinitäten korrelieren. Das bedeutet, dass sich keine „vorzugsweise Richtung“ der Effekte erkennen lässt, da sowohl negativ als auch positiv verschobene Q/V-Kurven und neben erhöhten auch reduzierte Kationen-Affinitäten vorzufinden sind. Obwohl die Mutationen räumlich eng benachbarte Aminosäuren betreffen, beeinflussen sie in differenzieller Weise die apparenten Affinitäten an den Kationen-Bindungsstellen. In diesem Zusammenhang ist die unterschiedliche Benennung der drei Bindungsstellen zu erwähnen. Die beiden Kationen-Bindungsstellen, die sowohl $K^+$- als auch $Na^+$-Ionen binden, werden in der Literatur meist als „common cation binding sites“ (manchmal auch „shared sites“) und die dritte Bindestelle als „unique $Na^+$ binding site“ bezeichnet. In Anlehnung an kürzlich publizierte Arbeiten [YARAGATUPALLI et al., 2009, MEIER et al., 2010], die den Einfluss von diversen Deletionen und Mutationen am C-Terminus der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit auf die entsprechenden Bindungsstellen beschreiben, können die hier beobachteten Effekte ebenfalls mit den Auswirkungen auf die ungleichen Bindungsstellen erklärt werden. A606T wies

Q/V-Kurven auf, die relativ stark zu positiven Potentialen verschoben waren, was auf eine erhöhte $Na^+$-Affinität hindeutet. In Kombination mit einer niedrigeren Affinität für $K^+$ lässt sich schließen, dass die „common sites“ betroffen sind. Wenn an diesen Bindungsstellen die $Na^+$-Affinität höher ist, wird die $K^+$-Affinität geringer und umgekehrt. Denn positivere Potentiale als der halbmaximale Spannungswert $V_{0.5}$ begünstigen die $Na^+$-Freisetzung von der dritten Bindungsstelle, was wiederum die $Na^+$-Freisetzung an den beiden anderen Bindungsstellen ermöglicht. Bei R763H hingegen ist die $K^+$-Affinität erhöht, ohne dass eine Verschiebung der Q/V-Kurve beobachtet werden kann. Dies könnte den Schluss zulassen, die „common sites“ wären betroffen, nicht aber die „unique site“. Die beiden FHM-Mutationen M829R und R834Q zeigten keine veränderten Affinitäten für $K^+$, jedoch für $Na^+$ (M829R = Reduktion der apparenten Affinitäten für extrazelluläres $Na^+$, R834Q = Erhöhung der apparenten Affinitäten für extrazelluläres $Na^+$). Hier scheint sich die jeweilige Mutation nicht auf die beiden $Na^+$- und $K^+$-transportierenden Bindungsstellen („common sites“), sondern ausschließlich auf die dritte $Na^+$-Bindungsstelle auszuwirken.

Höchstwahrscheinlich sind die ermittelten Affinitätsveränderungen eine Kombination aus komplexen Überlagerungen der langreichweitigen strukturellen Auswirkungen der Beeinträchtigung von Kationen koordinierenden Aminosäureresten einerseits und anderseits der veränderten Kinetik, mit denen der $E_1P$-$E_2P$-Konformationsübergang stattfindet. Die konsistent beobachtete Erhöhung der apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der transienten Ströme sind ein Hinweis darauf, dass die Mutanten A606T, R763H, M829R und R834Q eine abnorm hohe Flexibilität während der $E_1P$-$E_2P$-Konformationsänderung aufweisen. Obwohl all diese Veränderungen die Beeinträchtigung der $Na^+/K^+$-ATPase-Funktion unter physiologischen Bedingungen begründen können, wird es in Zukunft immer wieder eine Herausforderung sein, die beobachteten Funktionsabnormitäten mit strukturellen Überlegungen konsistent zu vereinbaren.

### 4.2.1 Mutation in der Region des Gelenkstücks zwischen der P- und N-Domäne

Das hochkonservierte Arginin R383 (SERCA-Homolog: Q360 im TNQMS-Motiv) befindet sich im fünften Kernmotiv [AXELSEN und PALMGREN, 1998] der P-Typ-ATPasen und ist Bestandteil des Gelenkstücks, das die N-Domäne flexibel mit der P-Domäne verbindet (Abbildung 4.7). Da die N-Domäne während des katalytischen Zyklus beachtliche Bewegungen relativ zur P-Domäne vollzieht, könnte die Mutation R383H die Flexibilität der Konformationsänderung behindern. Aufgrund der Histidin-Substitution sind sowohl die apparenten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten während der Spannungssprung-induzierten $E_1P \leftrightarrow E_2P$-Konformationsänderung als auch die Turnover-Zahl sehr stark reduziert. Die außerdem beobachtete Verschiebung der Q/V-Kurve um ca. +26 mV weist auf eine Beeinflussung des

Konformationsgleichgewichts hin, wobei bei physiologischen Potentialen die $E_1P$-Konformation stabilisiert zu sein scheint. Eine ebenfalls in dem zweiten Gelenkstück zwischen der N- und P-Domäne lokalisierte FHM2-Mutation (R593W) ist zwar funktionell nicht im Detail charakterisiert worden, aber es konnte immerhin gezeigt werden, dass in sogenannten „*cell survival assays*" mit diesem Konstrukt das Überleben der Zellen stark beeinträchtigt war, was ebenfalls die kritische Rolle dieser Gelenkstücke für die Pump-Aktivität und die Flexibilität der Konformation hervorhebt. Der Funktionsverlust lässt sich durch die beobachtete Reduktion der Wechselzahl hervorragend erklären.

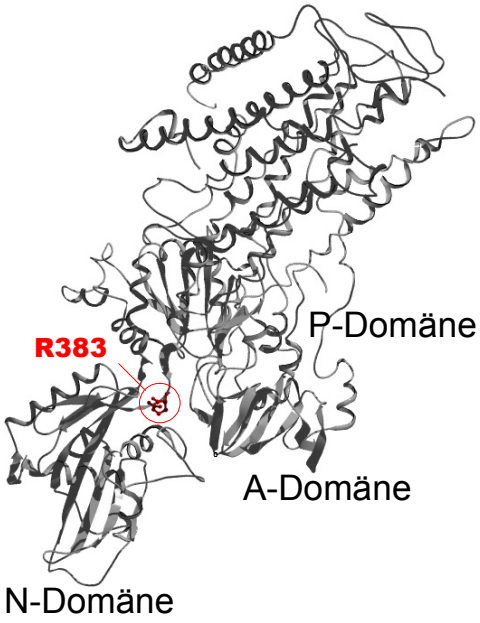



Abbildung 4.7

Lokalisation von R383 in der $Na^+/K^+$-ATPase-Struktur. Das hochkonservierte Arginin an Position 383 ($\alpha_2$-Untereinheit) liegt exakt im Gelenkstück zwischen der N- und P-Domäne.

## 4.3 Temperaturabhängige Instabilität des $Na^+/K^+$-ATPase-Proteins

Die ATP1A2-Mutation P979L zeigte in elektrophysiologischen Experimenten keinerlei Abweichungen im Vergleich zum Wildtyp, weshalb für dieses Konstrukt eine Erweiterung des Methodenspektrums notwendig wurde. Hierfür kamen ein weiteres Expressionssystem und höhere Temperaturen zum Einsatz. Es ist durchaus bekannt, dass die Temperatur die Proteinfaltung, die Proteinstabilität und die zellulären Qualitätskontrollmechanismen beeinflusst. Erst kürzlich wurde in einem Artikel veröffentlicht, dass unterschiedliche Temperaturen bei dem Polyglutamin-reichen Protein Huntingtin (*huntingtin-exon1, thtt*), welches für die Erkrankung an Chorea Huntington verantwortlich ist, zu unterschiedlichen Strukturen des Polypeptids führen. Während es bei 4°C zu einer etwas lockereren Form der Fibrillen-

Anordnung kommt, (β-Fibrillen: unlösliche Ablagerungen in Form kleiner Fasern, so genannter Fibrillen, die als Amyloid bezeichnet werden), wird die Polypeptid-Sequenz bei 37°C in eine Amyloid-Form gefaltet, die weniger auffällig und toxisch ist (Abbildung 4.8) [NEBOOKI-MACHIDA et al., 2009]. Die bei niedriger Temperatur gebildeten Amyloide weisen neben ihrer Detergens-Empfindlichkeit und der signifikant höheren Zelltodrate eine höhere Affinität zu Marker-Farbstoffen auf. Demnach kann ein und dasselbe Protein, in Abhängigkeit der vorliegenden Temperatur, in zwei verschiedene Strukturen mit völlig unterschiedlichen Eigenschaften gefaltet werden.

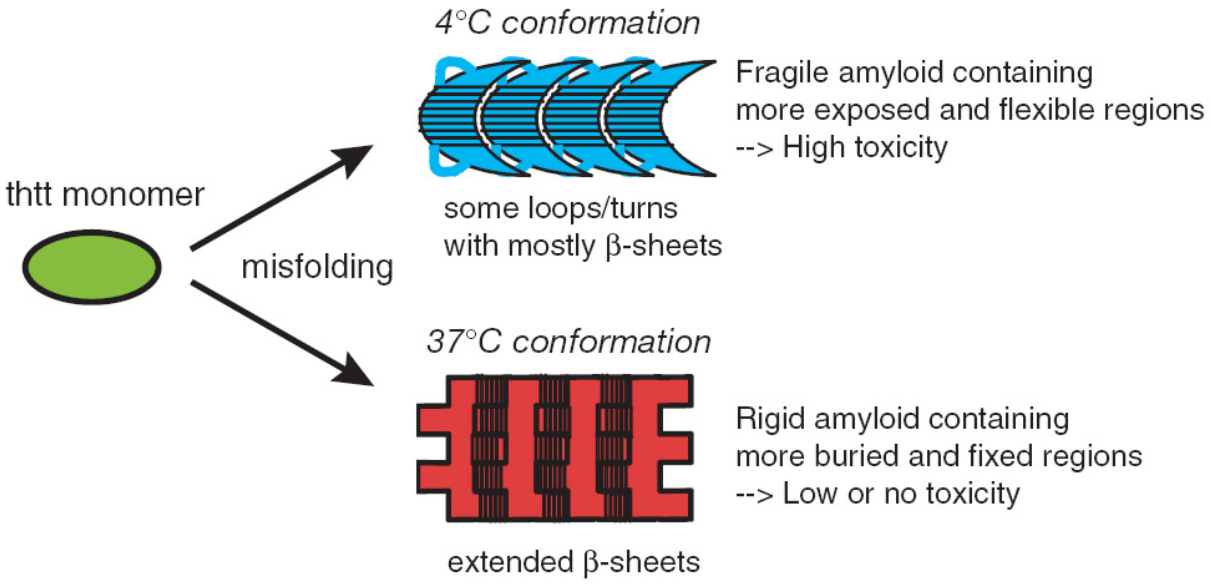



Abbildung 4.8

Die Faltung des Proteins Huntingtin in zwei verschiedene Amyloid-Konformationen. Bei 4°C entsteht eine toxische, fragile Struktur, während in Gegenwart von Temperaturen um 37°C stabilere und weniger toxische Fibrillen gebildet werden. Abbildung entstammt der Veröffentlichung von [NEBOOKI-MACHIDA et al., 2009].

Ein weiteres, sehr gründlich erforschtes Beispiel für den Einfluss der Temperatur auf die Proteinexpression und das Targeting zur Plasmamembran ist die ΔF508-Mutation im CFTR-Chloridkanal (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Üblicherweise werden während der Faltung zelluläre Qualitätskontrollmerkmale an das naszierende CFTR-Protein angefügt. Im Falle der ΔF508-Mutation wurde in Zellkulturversuchen gezeigt, dass das Protein rasch und effizient abgebaut wird, noch bevor es das Endoplasmatische Retikulum der Säugerzellen verlässt [SHARMA et al., 2001]. Es konnte ebenfalls die Temperaturempfindlichkeit dieses Effekts gezeigt werden [DENNING et al., 1992], was auch erklärt, weshalb CFTR-ΔF508 in *Xenopus*-Zellen (18°C) aufgrund des Erreichens der Plasmamembran funktionell exprimiert werden kann, aber nicht in Zellkultur (37°C), da das Protein vor Erreichen der Plasmamembran abgebaut wird [DRUMM et al., 1991].

Die ATP1A2-Mutante P979L gelangt in *Xenopus laevis*-Zellen ebenfalls erfolgreich in die Plasmamembran und wird dort auch völlig funktionsfähig eingebaut. Temperaturen von 37°C jedoch, wie sie in der Zellkultur vorzufinden sind, führen offensichtlich zu einer reduzierten Proteinmenge in der Plasmamembran. Es ist wahrscheinlich, dass es bei P979L ebenfalls zu einer vorzeitigen Degradation kommt. Solch eine temperaturabhängige Degradation scheint in der Tat bei P979L vorzuliegen. Während es bei HEK293FT-Zellen, die bei 28°C kultiviert wurden, zu äquivalenten Proteinmengen der Mutante und des Wildtyps führt, ist die Gesamtproteinmenge von P979L bei 37°C sehr stark reduziert.

Im Allgemeinen werden Proteine auf unterschiedliche Weise abgebaut; entweder über die Lysosom- oder die Proteasom-vermittelte Proteolyse. Exogene Proteine gelangen über Endozytose (aber auch über Phagozytose) in die Zelle und werden durch lysosomale Proteasen (Cathepsine) im Inneren der Lysosomen zerlegt. Diese Zellorganellen haben einen Durchmesser von 0,2 – 0,5 µm und enthalten eine Vielzahl (>50 Typen) an sauren Hydrolasen (Nukleasen, Proteasen, Lipasen, Phosphatasen, u.v.m.), die unter aziden Bedingungen (pH~5,0) aktiv sind. Der niedrige pH-Wert wird über eine ATP-getriebene Protonen-Pumpe (V-Typ-ATPase) aufgebaut und aufrechterhalten. Auch endogene Proteine werden auf lysosomalem Weg verdaut, was als „Autophagie“ bezeichnet wird. Im Vergleich zum proteasomalen Abbau wird hier dem zu degradierenden Protein ein einziges Ubiquitin-Molekül angeheftet (Ubiquitinierung über Lys-63). Je mehr Ubiquitin-Moleküle angehängt werden, umso schneller wird das zu degradierende Protein abgebaut. Beim proteasomalen Abbau handelt es sich um eine Multi-Ubiquitinylierung (ubiquitiniert wird über Lys-48) - das impliziert auch, dass dieser Proteolyseweg schneller stattfindet als der lysosomale. Die Entdeckung der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation und die entsprechende Grundlagenforschung in den 80er Jahren erbrachten Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose den Nobelpreis für Chemie [NANDI et al., 2006]. Durch die schnelle Degradation von geschwindigkeitsbestimmenden Enzymen ist die ATP-abhängige Protease, das Proteasom, in der Lage, regulatorisch auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse einzuwirken. 1997 wurde an COS-7-Zellen erstmals gezeigt, dass die $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_1$- und $\alpha_2$-Untereinheit ubiquitiniert wird [COPPI und GUIDOTTI, 1997]. In der Plasmamembran werden die beiden Untereinheiten α und β unterschiedlich abgebaut: lysosomale Degradation der α-Untereinheit und proteosomale der β-Untereinheit [YOSHIMURA und TAKEYASU, 2003]. Es gibt aber auch den Ubiquitin-unabhängigen proteasomalen Proteinabbau. Fehlgefaltete Proteine werden umgehend transloziert, d. h. zurück ins Zytosol transportiert, und durch das Proteasom degradiert.

Die Behandlung von Zellen mit Proteasom-Inhibitoren führt zur Verlängerung der Halbwertszeit der Proteine und somit zu deren Akkumulation in den entsprechenden Zellkompartimenten. In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe der beiden Proteasom-Inhibitoren MG-132 und Lactacystin gezeigt werden, ob und inwieweit das Konstrukt P979L vom proteasomalen Abbau betroffen ist, wenn es bei

Temperaturen von 37°C inkubiert wird. Der Abbau von P979L in Gegenwart hoher Temperaturen scheint entweder keiner Ubiquitinylierung zu bedürfen, da auch unter Verwendung des anti-Ubiquitin-Antikörpers keine Akkumulation des $Na^+/K^+$-ATPase-Proteins zu sehen war, oder er geschieht nicht über den proteasomalen Weg (nicht gezeigt). Die nicht signifikanten Ergebnisse dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass im Falle der P979L vermutlich der Abbau über den endosomal/lysosomalen Weg stattfindet. Um den Mechanismus der FHM2-Mutation P979L einzugrenzen, könnten die diversen Proteolyse-Varianten mit entsprechenden Inhibitoren beeinflusst werden. Brefeldin A beispielsweise hemmt den Proteintransport vom Golgi-Apparat zum ER, so dass das Protein innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums akkumuliert wird. Eine ganze Reihe von verschiedenartigen Hemmstoffen, wie zum Beispiel Bafilomycin A1, Amantadin, Concanamycin A, Concanamycin B, Chloroquin, Ammoniumchlorid und N-Acetylcystein, u.v.m., kann den endo-/lysosomalen Abbauweg gänzlich inhibieren. Auf diese Weise könnte ein Hinweis darauf erlangt werden, in welchem Kompartiment die temperatursensitive Mutation P979L zur Degradation führt. Möglicherweise könnte das Protein bereits im Golgi-Apparat oder im ER zurückgehalten werden oder aber auch erst kurz vor oder nachdem sie in die Plasmamembran eingebaut wird. Die Ergebnisse von Untersuchungen der posttranslationellen Regulation der $Na^+/K^+$-ATPase-Mutation P979L in Gegenwart verschiedener Temperaturen würden einen wichtigen Beitrag dazu leisten, einen bedeutsamen Zusammenhang zwischen der Proteindegradation/Temperatursensitivität von ATP1A2-Mutationen und der Erkrankung an Familiärer Hemiplegischer Migräne des Typs II aufzuzeigen.

## 4.4 Expansion des C-Terminus durch Mutation des Stopp-Codons TGA

Spätestens seit Veröffentlichung der ersten $Na^+/K^+$-ATPase-Struktur im Jahr 2007 wird dem Carboxy-Terminus eine äußerst gewichtige Bedeutung für die Spannungsabhängigkeit der Bindungsstellen für die transportierten Kationen zugeschrieben [MORTH et al., 2007]. Diese Vermutungen wurden in jüngster Vergangenheit von Toustrup-Jensen und Kollegen gestützt, die darlegen konnten, dass der C-Terminus einen wesentlichen Beitrag zur Ausbildung und Stabilisierung der dritten $Na^+$-Bindungsstelle leistet [TOUSTRUP-JENSEN et al., 2009]. Deletionen und Mutationen im C-terminalen WVEKETYY-Motiv führten zu einer enormen Herabsetzung der apparenten $Na^+$-Affinitäten ($Na^+_{außen}$ und $Na^+_{innen}$). Je länger die deletierte Sequenz, umso geringer war die $Na^+$-Affinität der $Na^+$-abhängigen $E_1$-Phosphorylierung (ΔY = 2,3-fach, ΔYY = 9-fach, ΔTYY= 17-fach, ΔKETYY = 26-fach, $\alpha_1$-Untereinheit der Ratte) [TOUSTRUP-JENSEN et al., 2009]. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Meier und Kollegen, die zeigen

konnten, dass die humane $\alpha_2$-Untereinheit bei Trunkation der beiden terminalen Tyrosine (ΔYY) eine 12 - 14-fach reduzierte apparente $Na^+$-Affinität aufweist [MEIER et al., 2010].

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur Verkürzungen des intrazellulären C-Terminus die Spannungssensitivität und die Kationen-Interaktion beeinflussen, sondern auch dessen Elongation. Die Auswirkungen der Addition von 28 Aminosäuren an den C-Terminus der $Na^+/K^+$-ATPase, wie es bei der FHM2-Mutation X1021R zum Ausdruck kommt, sind sehr ähnlich zu den mit biochemischen Methoden untersuchten Deletionskonstrukten: die Natrium-Affinität sinkt ebenfalls. Ferner sind auch die Turnover-Zahl und die apparente intrazelluläre $K^+$-Affinität sehr stark reduziert. Außerdem verhalten sich die Spannungsabhängigkeiten und die Kinetiken der transienten Ströme vollkommen anders als beim Wildtyp-Protein, da die apparenten Ratenkonstanten mit depolarisierenden Potentialen ansteigen, anstelle zu sinken. Solch ein invertiertes Verhalten wurde bereits für die Mutation D808E beschrieben, welche explizit eine Aminosäure betrifft, die sich in der Kationen-Bindungsstelle befindet und für die Kationen-Koordination relevant ist [OGAWA und TOYOSHIMA, 2002, KOENDERINK et al., 2003]. Während beim Wildtyp die extrazelluläre $Na^+$-Rückbindung spannungsabhängig ist, scheint hier einer der vorwärtsgerichteten Reaktionsschritte des Natrium-Zweiges (die intrazelluläre $Na^+$-Bindung, der $E_1P$-$E_2P$-Konformationswechsel, die extrazelluläre $Na^+$-Freisetzung) spannungsabhängig zu sein (Abbildung 4.9). Die Elektrogenizität des $Na^+$-Transports ist bei der X1021R-Mutante drastisch reduziert, ebenso die Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung (der $z_q$-Wert entspricht ~0,29 im Vergleich zu ~0,82).

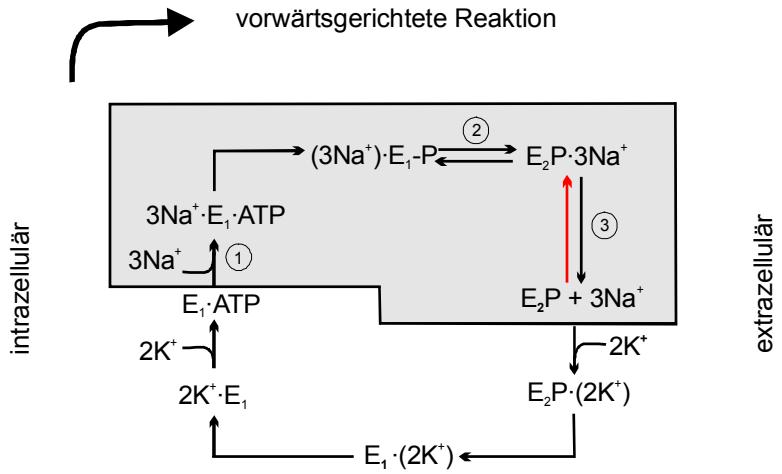



Abbildung 4.9

Reaktionszyklus der $Na^+/K^+$-ATPase. In grau unterlegt sind die vorwärtsgerichteten Reaktionsschritte des Natrium-Zweiges: (1) intrazelluläre $Na^+$-Bindung, (2) Konformationsübergang vom $E_1P$- in den $E_2P$-Zustand und (3) extrazelluläre $Na^+$-Freisetzung. Die mit dem roten Pfeil markierte Rückwärtsreaktion stellt die elektrogene $Na^+$-Rückbindung dar, die unter hohen $[Na^+]_{ext}$- und $K^+$-freien Bedingungen elektrophysiologisch untersucht werden kann. Beim WT-Protein ist diese Rückwärtsreaktion maßgebend spannungsabhängig, wohingegen die X1021R-Mutante in einer der Vorwärtsreaktionen des $Na^+$-Zweiges elektrogen zu sein scheint.

Ein ähnliches Verhalten hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten aus den transienten Strömen zeigten auch die beiden Deletionsmutanten ΔYY und ΔKETYY am C-Terminus der humanen $\alpha_2$-Unterinheit [MEIER et al., 2010]. Hier konnte ebenfalls ein invertiertes Verhalten beobachtet werden, d. h. ein Ansteigen der Geschwindigkeitskonstanten bei hyperpolarisierenden Potentialen. Bei einem weiteren Vergleich dieser beiden Konstrukte mit der hier untersuchten FHM2-Mutante X1021 scheinen die Veränderungen der apparenten Affinitäten an den Kationen-Bindungsstellen unterschiedlich zu sein. ΔYY wies eine veränderte $Na^+$-Affinität an der dritten $Na^+$-Bindungsstelle („unique $Na^+$ binding site“) auf, während die Deletion der letzten fünf Aminosäuren (ΔKETYY) sowohl die „common sites“ als auch die „unique site“ beeinträchtigt [MEIER et al., 2010]. Die Elongation des C-Terminus führt zu einer erhöhten apparenten $K^+$-Affinität und minimal veränderten Reduktion der apparenten $Na^+$-Affinitäten (1,1 - 1,9-fach), was darauf schließen lässt, dass lediglich die „common sites“ betroffen zu sein scheinen, aber nicht die „unique $Na^+$ binding site“. Trotz allem zeigt X1021R nicht die für die Deletionsmutanten typischen stationären Einwärtsströme, was auf eine noch im Wesentlichen intakt zu sein scheinende Kationen-Okklusion hindeutet. Die YY-Deletion hingegen setzt die Energiebarriere für die intrazelluläre $Na^+$-Okklusionsreaktion herab und destabilisiert somit den $Na^+$-okkludierten Zustand, was einen stationären $Na^+$-Einwärtsstrom zur Folge hat [MEIER et al., 2010].

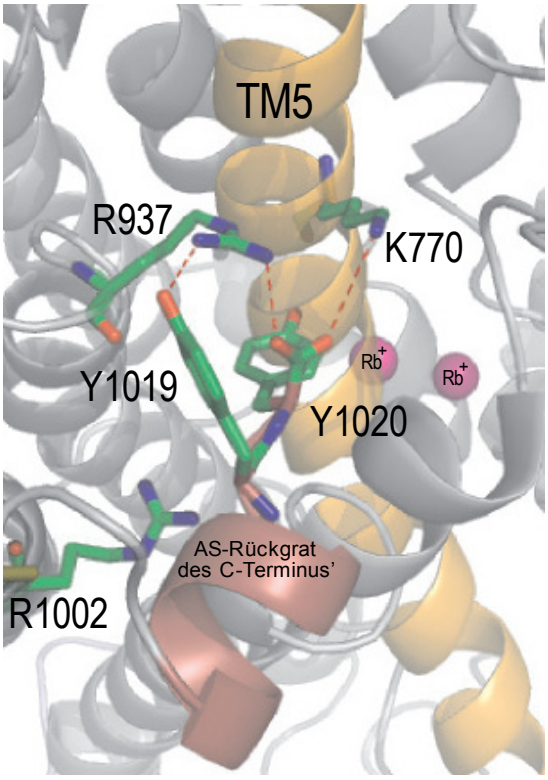



Abbildung 4.10

Wechselwirkungen des C-Terminus' der humanen $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit (terminale Tyrosine Y1019 und Y1020) mit den umliegenden Aminosäuren R937 und K770.

Die ATP1A2-Mutante X1021R ist jedoch nicht die einzige FHM2-verursachende Mutation, die sich in der sogenannten Switch-Region befindet. Neben der bereits erwähnten Aminosäure R937P (4.1.1 Elektrophysiologisch nicht charakterisierbare Konstrukte, Abbildung 4.5) befinden sich auch die Mutationen D999H, R1002Q und Y1009X in dieser Region. Bei Betrachtung der strukturellen Anordnung des Carboxy-Terminus ist erkennbar, dass die Aminosäure Arg-937 eine strategisch wichtige Position einnimmt und für die strukturelle Stabilisierung des C-Terminus und die durch ihn kontrollierte Natrium-Bindung an der dritten Kationen-Bindungsstelle verantwortlich ist (Abbildung 4.10). Toustrup-Jensen und Kollegen konnten durch Mutagenese-Studien zeigen, dass der Austausch des positiv geladenen Arginins gegen ein Alanin (R937→R937A) zu einer 5-fachen Reduktion der apparenten $Na^+$-Affinität führt [TOUSTRUP-JENSEN et al., 2009]. Ähnliches tritt auf, wenn das endständige Tyrosin gegen ein Alanin ausgetauscht (5-fache Reduktion) bzw. es vollständig entfernt wird (2,3-fache Reduktion).

Gleichermaßen interessant ist die Tatsache, dass die Aminosäure Lys-770, die mit dem terminalen Tyr-1020 potentiell eine Wasserstoffbrücken-Bindung eingeht und somit auch an der Ausbildung der dritten $Na^+$-Bindungsstelle beteiligt ist (Abbildung 4.10), bei einem Austausch zu einem Alanin (K770A) eine fünffache Reduktion der apparenten $Na^+$-Affinität bewirkt [TOUSTRUP-JENSEN et al., 2009]. Die Reduktion der $Na^+$-Affinitäten sowohl durch Deletionen bzw. Elongation als auch durch die Störung der ausgebildeten Quervernetzungen zum C-Terminus beschränkt sich nicht nur auf die $\alpha_2$-Untereinheit, sondern betrifft auch andere $Na^+/K^+$-ATPase α-Isoformen. Blanco-Arias und Kollegen konnten sogar eine 50-fache Reduktion der $Na^+$-Affinität verursacht durch die Duplikation des terminalen Tyrosins der $\alpha_3$-Untereinheit (WVEKETYYY) zeigen [BLANCO-ARIAS et al., 2009]. Diese Mutation wird mit der vererbbaren Form der Parkinson-Krankheit assoziiert (*RDP*, *rapid-onset dystonia-parkinsonism*).

Durch Untersuchungen von Struktur-Funktions-Beziehungen und Kausalzusammenhängen wird etwas deutlicher, weshalb Veränderungen in der Switch-Region und direkt am C-Terminus zu pathophysiologischen Auswirkungen führen können. Die Erforschung der Ätiologie der erblichen Migräneformen bleibt weiterhin von großer Relevanz.

## 4.5 Zusammenhang zwischen Funktionsstörungen der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit und Migräne

Nahezu alle untersuchten ATP1A2-Mutationen führten entweder zu partiellem oder gar vollständigem Funktionsverlust. Die funktionellen Veränderungen sind hierbei recht vielfältig und reichen von leichten Abweichungen der Kationen-Affinitäten bis hin zu völlig entgegengesetzter Spannungsabhängigkeiten

und Kinetiken der transienten Ströme. Nun stellt sich die Frage, wie sich die FHM2-Mutationen unter physiologischen Bedingungen auswirken? Was passiert in der Zelle und wie kann ein funktionell beeinträchtigtes Enzym zum Auftreten von Migräne führen? Diese und weitere Fragen lassen sich einerseits anhand des einleitend beschriebenen Phänomens der Cortical Spreading Depression und andererseits durch die Betrachtung der *in vivo* stattfindenden Prozesse eingehend erläutern. Die Natrium-Kalium-Pumpe ist in zahlreichen zellulären Vorgängen sowohl im Gehirn als auch in anderen Organen involviert. Viele sekundäre Transporter, wie beispielsweise die astrozytischen Glutamat-Transporter GLAST und GLT-1, nutzen als Energiequelle den elektrochemischen $Na^+$-Gradienten, der durch die $Na^+/K^+$-ATPase aufgebaut und aufrechterhalten wird. Unter pathologischen Bedingungen ist der gekoppelte Mechanismus zwischen der neuronalen Aktivität und dem Energie-Metabolismus in der Astrozyte und somit zwischen der $Na^+/K^+$-ATPase und Glutamat-Transportern GLAST und GLT-1 enorm beeinträchtigt. Chatton und Kollegen konnten bereits im Jahr 2000 durch eine quantitative Analyse aufzeigen, dass die intrazelluläre Natrium-Konzentration sowohl durch die Glutamat-Aufnahme als auch durch die $Na^+/K^+$-ATPase-Aktivität in Astrozyten beeinflusst wird [CHATTON et al., 2000]. Die rasche Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt ist eine Voraussetzung für die neuronale Informationsübertragung. Sie verhindert die Desensitivierung neuronaler Glutamat-Rezeptoren und die Übererregung umgebender Neuronen. Wenn nun die $Na^+/K^+$-ATPase einen durch eine Mutation bedingten Funktionsdefekt aufweist, so kommt es zum Zusammenbruch des $Na^+$-Gradienten und die dadurch erhöhte Glutamat-Konzentration führt schließlich ebenfalls zur Übererregbarkeit der Nervenzellen und folglich zur Streudepolarisation.

Weiterhin sei die Bedeutung der $\alpha_2$-Untereinheit genauer betrachtet. Diese α-Isoform besitzt eine geringfügig höhere Affinität für intrazelluläres Natrium (möglicherweise bedingt durch die Verschiebung in Richtung der $E_1$-Konformation), was bei niedrigen $Na^+$-Konzentrationen in nicht-erregbaren Gliazellen enorm von Vorteil ist [SEGALL et al., 2001]. Dies ist ebenso äußerst bedeutsam für das effiziente Entfernen von extrazellulärem Kalium, um weitere Depolarisationen der umgebenden Zellen zu vermeiden. ATP1A2-Knockout-Mäuse ohne die $\alpha_2$-Untereinheit sterben sofort nach der Geburt aufgrund ihrer Unfähigkeit mit der Atmung beginnen zu können [JAMES et al., 1999, IKEDA et al., 2003]. Die $\alpha_2$-Untereinheit wird, wie bereits erwähnt, hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert, genauer in Gliazellen (Astrogliazellen oder Astrozyten). Ihr Anteil an der gesamten $Na^+/K^+$-ATPase-Aktivität im Gehirn beträgt weniger als 10 %, weshalb es relativ unwahrscheinlich ist, dass der dominante Krankheitsphänotyp durch die globale Veränderungen der Konzentrationen von monovalenten Kationen im Zytosol oder im extrazellulären Raum herbeigeführt wird [GARGUS, 2009]. Vielmehr beeinflusst die reduzierte Pumpaktivität über den Natrium-Gradienten und den funktionell gekoppelten $Na^+/Ca^{2+}$-Austauscher NCX (der sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen vorkommt) die $Ca^{2+}$-Homöostase.

NCX kann abhängig von dem vorliegenden Natrium-Gradienten $Ca^{2+}$ entweder in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus transportieren. Wie in Abbildung 1.5 dargestellt ist, wird in den als PlasmERosomen bezeichneten Mikrodomänen neben dem NCX auch die PMCA (in der Plasmamembran vorkommende $Ca^{2+}$-ATPase) exprimiert. Die beiden Transporterarten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften. Während PMCA eine hohe $Ca^{2+}$-Affinität und eine geringe Turnoverzahl besitzt, hat NCX eine niedrigere Affinität für $Ca^{2+}$ und eine um einiges höhere Turnoverrate, was darauf hindeutet, dass NCX durch nicht-transportiertes intrazelluläres $Ca^{2+}$ aktiviert wird [BLAUSTEIN et al., 2002]. Als Folge einer stark verringerten $Na^+/K^+$-ATPase-Aktivität wird intrazellulär angereichertes $Ca^{2+}$ in speziellen Depots gespeichert. Sofern in den PlasmERosomen auch Inositoltriphosphat-Rezeptoren ($IP_3$-Rezeptor = Liganden-aktivierter $Ca^{2+}$-Kanal) vorhanden sind, kann die erhöhte intrazelluläre $Ca^{2+}$-Konzentration den $IP_3$-Rezeptor für Inositioltriphosphat sensibilisieren [ARNON et al., 2000]. Das wiederum bewirkt die verstärkte Freisetzung von $Ca^{2+}$-Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Eine Dysfunktion der $Na^+/K^+$-ATPase hat somit einen sehr weitreichenden Einfluss auf zahlreiche physiologische Prozesse. Im Folgenden ist anhand des Zytoskelett-Proteins Ankyrin B ein Beispiel für phänotypische Modifikationen aufgeführt. Ankyrin B interagiert über nicht-kovalente Bindungen mit diversen Ionen-Pumpen und Ionen-Kanälen ($Na^+/K^+$-ATPase, $Na^+/Ca^{2+}$-Austauscher, $IP_3$-Rezeptor) und ist an ihrer Verankerung in der Plasmamembran und in speziellen Mikrodomänen in Membranen von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) beteiligt, die am $Ca^{2+}$-Signaling mitwirken [MOHLER et al., 2003, MOHLER et al., 2005]. Mutationen im *LQT4*-Gen, welches das Protein Ankyrin B kodiert, führen zur Long-QT-Krankheit, bei der es zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen kommen kann. Ein charakteristisches Merkmal ist die namensgebende Verlängerung der QT-Zeit im Elektrokardiogramm (EKG). Die QT-Zeit ist die Zeitspanne des EKGs, währenddessen der Herzmuskel elektrisch repolarisiert und in Vorbereitung für die nächste Depolarisation relaxiert, was zur Kontraktion und zum Ausströmen des Blutes in die Hauptarterien führt. Dieser Prozess beinhaltet die Inaktivierung der depolarisierenden $Na^+$- und $Ca^{2+}$-Kanalströme und die Aktivierung der $K^+$-Kanalströme. Mutationen in diesem Gerüst stören ebenfalls in extremer Weise das Zusammenspiel der verschiedenen Ionen-Arten. Diese Fehlfunktion verursacht eine Verlängerung der Repolarisationsphase des Aktionspotentials in Herzmuskelzellen und dadurch die Verlängerung der QT-Zeit im Elektrokardiogramm. Die $Ca^{2+}$-Homöostase unterliegt einer sorgfältigen Feinregulierung: Durch das Ausströmen von $Ca^{2+}$ kommt es zur Kontraktion der Zelle. Das eingeströmte $Ca^{2+}$ wird durch den $Na^+/Ca^{2+}$-Austauscher aus der Zelle befördert und im Antiport werden $Na^+$-Ionen in die Zelle transportiert. $Na^+$-Ionen können dann wiederum über die $Na^+/K^+$-ATPase wieder aus der Zelle befördert werden. Ankyrin B, der $Na^+/Ca^{2+}$-Austauscher, die $Na^+/K^+$-ATPase und der $IP_3$-Rezeptor bilden einen Multienzym-Komplex und sorgen auf diese Weise für ein exaktes Zusammenspiel, um elektrische

Erregungen von der Zelloberfläche ins Zellinnere weiterzuleiten. Hierbei wird deutlich, wie es zur englischen Begriffsentstehung „Channelopathy“ bzw. „Calciumopathy“ kommt und welche Bedeutung sie haben. Mutationen in allen bisher bekannten FHM-Genen zeigen solch einen prototypischen neuronalen „Channelopathy-Phänotyp“. Da die $Na^+/K^+$-ATPase den Interaktionspartner einer Vielzahl von Proteinen darstellt, können bereits sehr leichte Veränderungen an den beteiligten Interaktionsstellen zu enormen pathologischen Ereignissen und Prozessen führen. Die nähere Betrachtung diverser genetischer Modifikationen im *ATP1A2*-Gen und die hier dargelegten Kausalitäten zwischen Mutationsart, elektrophysiologischer und struktureller Charakterisierung verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer systematischer Untersuchungen von Struktur-Funktions-Beziehungen. Das Verständnis dieser Zusammenhänge steht an einem viel versprechenden Anfang.

# 5 Zusammenfassung

Die aus drei verschiedenen Untereinheiten (α-, β-, γ-) aufgebaute $Na^+/K^+$-ATPase ist ein ubiquitäres Membranprotein, das zu den P-Typ-ATPasen gehört und maßgeblich an der Bildung und Erhaltung des Transmembranpotentials beteiligt ist. Als omnipräsente Ionenpumpe transportiert sie unter Verbrauch eines ATP-Moleküls drei Natrium-Ionen aus der Zelle und im selben Zyklus zwei Kalium-Ionen ins Zellinnere. Durch diesen aktiven Transport wird auch das Ruhepotential in Neuronen aufrechterhalten, das kritisch für die Erregbarkeit ist. Mutationen in der $Na^+/K^+$-ATPase α-Untereinheit können wesentliche Proteinfunktionen massiv beeinträchtigen. Von den bisher bekannten vier humanen α-Untereinheiten sind die beiden Isoformen $\alpha_2$ und $\alpha_3$ mit neurologischen Erkrankungen assoziiert. Während Mutationen in der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_3$-Untereinheit zu der seltenen Erbkrankheit "Dystonie-Parkinsonismus-Syndrom" führen, kommt es bei genetischen Veränderungen in der $\alpha_2$-Untereinheit zu einer autosomal-dominant vererbbaren Form der Migräne mit Aura, der "Familiären Hemiplegischen Migräne" des Typs II (FHM-2).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss 14 migräne-relevanter Mutationen auf Struktur-Funktions-Beziehungen der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit untersucht. Überwiegend handelte es sich hierbei um typische Punktmutationen, wobei auch je eine Deletions- und eine Frameshift-Mutation näher betrachtet wurden. Die Auswahl der ATP1A2-Mutanten erfolgte nach ihrer Lokalisation in funktionell wichtigen bzw. hochkonservierten Regionen der $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit.

Mit Hilfe des Expressionssystems der *Xenopus laevis*-Oozyten konnten die Konsequenzen der unterschiedlichen Aminosäure-Austausche eingehend charakterisiert werden. Hierfür standen neben elektrophysiologischen auch biochemische und spektroskopische Methoden zur Verfügung. Ausgenommen von zwei ATP1A2-Mutationen konnten die übrigen erfolgreich in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Die beiden Mutationen S966X (Frameshift) und del(K935-S940)insI (Deletion) befinden sich unmittelbar in der Nähe der C-terminal gelegenen Transmembrandomäne TM9 und verursachen starke strukturelle Veränderungen, die dazu führen, dass ein verkürztes und nicht korrekt in die Plasmamembran integrierbares Protein entsteht. Vier weitere FHM2-Mutationen (T263M, G301R, T376M und R937P) wiesen ebenfalls keine stationären Pumpströme auf, trotz ihrer fehlerfreien Integration in die Plasmamembran. Durch die strukturelle Veränderung in den hochkonservierten Regionen ist die $Na^+/K^+$-ATPase-Funktion dieser Mutanten schwerwiegend beeinträchtigt. Anhand der $Na^+/K^+$-ATPase-Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass hier essentielle Wasserstoffbrücken-Netzwerke destabilisiert werden, die die Transportaktivität massiv beeinträchtigen.
Bei acht der untersuchten FHM2-Mutationen ließen sich diverse Parameter, wie Spannungswerte für halbmaximale Ladungsverschiebungen, Wechselzahlen, sowie $Na^+$- und $K^+$-Affinitäten im Detail

bestimmen. Nennenswert sind hierbei insbesondere die zwei Mutanten: P979L und X1021R. Die Charakterisierung der P979L-Mutation führte zu der Erkenntnis, dass sie sich funktionell wie das Wildtyp-Enzym verhält und keinerlei Abweichungen aufweist. Allerdings lässt sich diese Beobachtung lediglich bei *Xenopus laevis*-Oozyten machen, die bei etwa 18°C kultiviert und analysiert werden. In Säugerzellen, die bei einer Temperatur von 37°C wachsen und untersucht werden, zeigte sich, dass die Mutation bei Körpertemperatur offensichtlich zu einem degradierten Protein führt.

Durch die FHM2-Mutation X1021R ist der C-Terminus um 28 Aminosäuren elongiert. Elektrophysiologische Messungen ergaben ein vollkommen kontroverses Verhalten des veränderten Proteins gegenüber dem Wildtyp. Die Addition von zusätzlichen Aminosäuren an den C-Terminus führt zu gravierenden Veränderungen in der Natrium-Interaktion und der Spannungssensitivität. Strukturell betrachtet leisten der C-Terminus und die zugehörige Switch-Region einen erheblichen Beitrag zur Bildung der dritten Natrium-Bindungsstelle.

# *Literaturverzeichnis*

# 6 Literaturverzeichnis

**Abercrombie**, R. F., De Weer P. (1978)
”Electric current generated by squid giant axon sodium pump: external K and internal ADP effects.”
*Am. J. Physiol.* **235**, C63-68

**Albers**, W. R. (1967)
“Biochemical aspects of active transports”
*Ann. Rev. Biochem.* **36**, 727-756

**Allen**, D. G., Eisner, D. A., Wray, S. C. (1985)
“Birthday present for digitalis.”
*Nature* **316**, 674-675

**Altendorf**, K., Gassel, M., Puppe, W., Möllenkamp, T., Zeeck, A., Boddien, C., Fendler, K., Bamberg, E., Dröse, S. (1998)
“Structure and function of the Kdp-ATPase of Escherichia coli.”
*Acta. Physiol. Scand. Suppl*. **643**, 137-146

**Ambudkar**, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., Gottesman, M. M. (2003)
”P-glycoprotein: from genomics to mechanism.“
*Oncogene* **22,** 7468-7485

**Ambrosini**, A., D'Onofrio, M., Grieco, G. S., Di Mambro, A., Montagna, G., Fortini, D., Nicoletti, F., Nappi, G., Sances, G., Schoenen, J., Buzzi, M. G., Santorelli, F. M., Pierelli, F. (2005)
“Familial basilar migraine associated with a new mutation in the ATP1A2 gene.”
*Neurology* **65**,1826-1828

**Andersen**, J. P. (1989)
“Monomer-oligomer equilibrium of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and the role of subunit interaction in the $Ca^{2+}$ pump mechanism.”
*Biochim. Biophys. Acta.* **988**, 47-72

**Andersen**, J. P. (1995)
”Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase by site-directed mutagenesis.“
*Biosci. Rep.* **15**, 243-261

**Andersen**, J. P. und Vilsen, B. (1995)
“Structure-function relationships of cation translocation by $Ca^{2+}$- and $Na^{+}$,$K^{+}$-ATPases studied by site-directed mutagenesis.”
*FEBS Lett.* **359**,101-106

**Andlin-Sobocki**, P., Jönsson, B., Wittchen, H. U., Olesen, J. (2005)
“Cost of disorders of the brain in Europe.“
*Eur. J. Neurol.* **12** (Suppl 1), 1-27

**Argüello**, J. M., Whitis, J., Cheung, M. C., Lingrel, J. B. (1999)
“Functional role of oxygen-containing residues in the fifth transmembrane segment of the Na,K-ATPase alpha subunit.“
*Arch. Biochem. Biophys.* **364**, 254-263

**Arnon**, A., Hamlyn J. M., Blaustein, M. (2002)
„The $Na^{+}$-$Ca^{2+}$ exchanger is essential fort he action of cardiac glycosides.“
*Circ. Res*. **90**, 305-308

**Arystarkhova**, E., Wetzel, R. K., Asinovski, N. K., Sweadner, K. J. (1999)
“The gamma subunit modulates $Na^{+}$ and $K^{+}$ affinity of the renal Na,K-ATPase.“
*J. Biol. Chem.* **274,** 33183-33185

**Astrup**, J. und Norberg, K. (1976)
“Potassium activity in cerebral cortex in rats during progressive severe hypoglycemia”
*Brain Res.* **103**, 418-423

**Axelsen**, K. B. und Palmgren, M. G. (1998)
"Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily."
*J. Mol. Evol.* **46**, 84-101

**Balcar**, V. J. (2002)
"Molecular pharmacology of the $Na^+$-dependent transport of acidic amino acids in the mammalian central nervous system."
*Biol Pharm Bull* **25**, 291-301

**Baloh**, R. W., Yue, Q., Furman, J. M., Nelson, S. F. (1997)
"Familial episodic ataxia: clinical heterogeneity in four families linked to chromosome 19p."
*Ann. Neurol.* **41**, 8-16

**Barriere**, H., Nemes, C., Du, K., Lukacs, G. L. (2007)
"Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery."
*Mol Biol Cell* **10**, 3952–3965

**Barth**, L. G. und Barth, L. J. (1959)
"Differentation of cells of the *Rana pipiens* gastrula in unconditioned medium."
*J. Embryol. Exp. Morphol.* **7**, 210-222

**Bassi**, M. T., Bresolin, N., Tonelli, A., Nazos, K., Crippa, F., Baschirotto, C., Zucca, C., Bersano, A., Dolcetta, D., Boneschi, F. M., Barone, V., Casari, G. (2004)
"A novel mutation in the ATP1A2 gene causes alternating hemiplegia of childhood."
*J. Med. Genet.* **41**, 621-628

**Bear**, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M., Riordan, J. (1992)
"Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane
conductance regulator (CFTR)."
*Cell*, **68**, 809-818

**Beauvais**, K., Cavé-Riant, F., De Barace, C., Tardieu, M., Tournier-Lasserve, E., Furby, A. (2004)
"New CACNA1A gene mutation in a case of familial hemiplegic migraine with status epilepticus."
*Eur. Neurol.* **52**, 58-61

**Béguin**, P., Wang, X., Firsov, D., Puoti, A., Claeys, D., Horisberger, J. D., Geering, K. (1997)
"The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function."
*EMBO J.* **16**, 4250-4260

**Béguin**, 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 alpha subunit and in its stabilization by beta subunit assembly."
*Mol. Biol. Cell.* **11**, 1657-1672

**Béguin**, P., Crambert, G., Guennoun, S., Garty, H., Horisberger, J. D., Geering, K. (2001)
"CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit."
*EMBO J.* **20**, 3993-4002

**Bezman**, L., Moser, A. B., Raymond, G. V., Rinaldo, P., Watkins, P. A., Smith, K. D., Kass, N. E., Moser, H. W. (2001)
"Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening."
*Ann. Neurol.* **49**, 512-517

**Blanco**, G. (2005)
"Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation"
*Semin. Nephrol.* **25**, 292-303

**Blanco**, G., Melton, R. J., Sánchez, G., Mercer, R. W. (1999)
"Functional characterization of a testes-specific alpha-subunit isoform of the sodium/potassium adenosinetriphosphatase."
*Biochemistry* **38**, 13661-13669

**Blanco**, G. und Mercer, R. W. (1998)
"Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function."
*Am. J. Physiol.* **275,** F633-650

**Blau**, J. N. (1992)
"Migraine: theories of pathogenesis."
*Lancet* **339**, 1202-1207

**Blaustein**, M. P., Juhaszova, M., Golovina, V. A. (1998)
"The cellular mechanism of action of cardiotonic steroids: a new hypothesis."
*Clin. Exp. Hypertens.* **20**, 691-703

**Blaustein**, M. P., Juhaszova, M., Golovina, V. A., Church, P. J., Stanley, E. F. (2002)
"Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications."
*Ann. N. Y. Acad. Sci.* **976**, 356-366

**Blaw**, M. E. (1970)
"Melanodermic type leucodystrophy (adrenoleukodystrophy)."
*Handbook of clinical neurology* **10**, 128–133

**Blostein**, R., Wilczynska, A., Karlish, S. J., Argüello, J. M., Lingrel, J. B. (1997)
"Evidence that Ser775 in the alpha subunit of the Na,K-ATPase is a residue in the cation binding pocket."
*J. Biol. Chem.* **272**, 24987-24993

**Boehning**, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T., Snyder, S. H. (2003)
"Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis."
*Nat. Cell Biol.* **5**, 1051-1061

**Boes**, C. J. und Dalessio, D. J. (2008)
"The history of migraine from Hippocrates to Harold Wolff."
In: Silberstein, S.D., Lipton, R. B., Dodick, D. W. „Wolffs Headache and another head pain."
*Oxford Univy Press*, New York, 3-18

**Bonn**, M., Bakker, H. J., Rago, G., Pouzy, F., Siekierzycka, J. R., Brouwer, A. M., Bonn, D. (2009)
"Suppression of Proton Mobility by Hydrophobic Hydration."
*J. Am. Chem. Soc,* **131**, 17070-1.

**Boxenbaum**, N., Daly, S. E., Javaid, Z. Z., Lane, L. K., Blostein, R. (1998)
"Changes in steady-state conformational equilibrium resulting from cytoplasmic mutations of the Na,K-ATPase alpha-subunit."
*J. Biol. Chem.* **273**, 23086-23092

**Brashear**, A., DeLeon, D., Bressman, S. B., Thyagarajan, D., Farlow, M. R., Dobyns, W. B. (1997)
"Rapid-onset dystonia-parkinsonism in a second family."
*Neurology* **48**, 1066-1069

**Brooks-Wilson**, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J. Jr, Hayden, M. R. (1999)
"Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency."
*Nat. Genet.* **22**, 336-345

**Buch-Pedersen**, M. J., Rudashevskaya, E. L., Berner, T. S., Venema, K., Palmgren, M. G. (2006)
"Potassium as an intrinsic uncoupler of the plasma membrane $H^+$-ATPase."
*J. Biol. Chem.* **281**, 38285-38292

**Buurman**, E. T., Kim, K. T., Epstein, W. (1995)
"Genetic evidence for two sequentially occupied $K^+$ binding sites in the Kdp transport ATPase."
*J. Biol. Chem.* **270**, 6678-6685

**Cairo**, E. R., Friedrich, T., Swarts, H. G., Knoers, N. V., Bindels, R. J., Monnens, L. A., Willems, P. H., De Pont, J. J., Koenderink, J. B. (2008)
"Impaired routing of wild type FXYD2 after oligomerisation with FXYD2-G41R might explain the dominant nature of renal hypomagnesemia."
*Biochim. Biophys. Acta.* **1778**, 398-404

**Capasso**, J. M., Hoving, S., Tal, D. M., Goldshleger, R., Karlish, S. J. D. (1992)
"Extensive digestion of Na+,K(+)-ATPase by specific and nonspecific proteases with preservation of cation occlusion sites."
*J. Biol. Chem.* **267**,1150-1158

**Castro**, M. J., Stam, A. H., Lemos, C., Barros, J., Gouveia, R. G., Martins, I. P., Koenderink, J. B., Vanmolkot, K. R., Mendes, A. P., Frants, R. R., Ferrari, M. D., Sequeiros, J., Pereira-Monteiro, J. M., van den Maagdenberg, A. M. (2007)
"Recurrent ATP1A2 mutations in Portuguese families with familial hemiplegic migraine."
*J. Hum. Genet.* **52**, 990-998

**Castro**, M. J., Nunes, B., de Vries, B., Lemos, C., Vanmolkot, K. R., van den Heuvel , J. J., Temudo, T., Barros, J., Sequeiros, J., Frants, R. R., Koenderink, J. B., Pereira-Monteiro, J. M., van den Maagdenberg, A. M. (2008)
"Two novel functional mutations in the $Na^+$,$K^+$-ATPase alpha2-subunit ATP1A2 gene in patients with familial hemiplegic migraine and associated neurological phenotypes."
*Clin. Genet.* **73**, 37-43

**Cao**, Y., Aurora, S. K., Nagesh, V., Patel, S. C., Welch, K.M. (2002)
"Functional MRI-BOLD of brainstem structures during visually triggered migraine."
*Neurology* **59**, 72-78

**Cevoli**, S., Pierangeli, G., Monari, L., Valentino, M. L., 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

**Charlier**, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J., Leppert, M. (1998)
"A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family."
*Nat. Genet.* **18**, 53-55

**Chatton**, J. Y., Marquert, P., Magistretti, P. J. (2000)
"A quantitative analysis of l-glutamate-regulated $Na^+$- dynamics in mouse cortical astrocytes: implications for cellular bioenegetics."
*Eur. J. Neurosci.* **12**, 3843-3853

**Clarke**, J. M. (1910)
"On recurrent motor paralysis in migraine, with report of a family in which recurrent hemiplegia accompanied the attacks."
*Brit. Med. J*, **1**,1534-1538

**Clausen**, J. D., Vilsen, B., McIntosh, D. B., Einholm, A. P., Andersen, J. P. (2004)
"Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions."
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 2776-2781

**Colonna**, T. E., Huynh, L., Fambrough, D. M. (1997)
"Subunit interactions in the Na,K-ATPase explored with the yeast two-hybrid system."
*J. Biol. Chem.* **272**, 12366-12372

**Cornelius**, F., Mahmmoud, Y. A., Meischke, L. Cramb, G. (2005)
"Functional significance of the shark Na,K-ATPase N-terminal domain. Is the structurally variable N-Terminus involved in tissue-specific regulation by FXYD proteins?"
*Biochemistry* **44**, 13051-13062

**Copp**i, M. V. und Guidotti, G. (1997)
"Ubiquitination of Na,K-ATPase alpha1 and alpha2 subunits."
FEBS Lett. **405**, 281-284

**Crambert**, G., Hasler, U., Beggah, A. T., Yu, C., Modyanov, N. N., Horisberger, J. D., Lelièvre, L., Geering, K. (2000)
"Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes."
*J. Biol. Chem.* **275,** 1976-1986

**Crambert**, G. und Geering, K. (2003)
"FXYD proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na,K-ATPase."
*Sci. STKE* **166**, RE1

**Cuenca-León**, E., Corominas, R., Montfort, M., Artigas, J., Roig, M., Bayés, M., Cormand, B., Macaya, A. (2009)
"Familial hemiplegic migraine: linkage to chromosome 14q32 in a Spanish kindred."
*Neurogenetics* **10**, 191-198

**Crambert**, G., Schaer, D., Roy, S., Geering, K. (2004)
"New molecular determinants controlling the accessibility of ouabain to its binding site in human Na,K-ATPase alpha isoforms."
*Mol. Pharmacol.* **65**, 335-341

**Daly**, S. E., Lane, l. K., Blostein, R. (1994)
"Functional consequences of amino-terminal diversity of the catalytic subunit of the Na,K-ATPase."
*J. Biol. Chem.* **269**, 23944-23948

**Daly**, S. E., Lane, l. K., Blostein, R. (1996)
"Structure/function analysis of the amino-terminal region of the 1 and 2 subunits of Na,K-ATPase."
*J. Biol. Chem.* **271**, 23683-23689

**Danbolt**, N. C. (2001)
"Glutamate uptake"
*Prog Neurobiol* **65**, 1-105

**Davidson**, A. l. und Chen, J. (2004)
"ATP-binding Cassette Transporters in Bacteria."
*Annual Review of Biochemistry* **73**, 241-268

**Davies**, J. A., Annels, S. J., Dickie, B. G., Ellis, Y., Knott, N. J. (1995)
"A comparison between the stimulated and paroxysmal release of endogenous amino acids from rat cerebellar, striatal and hippocampal slices: a manifestation of spreading depression?"
*J Neurol Sci.* **131**, 8-14

**Dean**, M., und Annilo, T. (2005)
"Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates."
*Annual Review of Genomics and Human Genetics* **6**, 123-142

**de Carvalho-Aguiar**, P., Sweadner, K. J., Penniston, J. T., Zaremba, J., Liu, L., Caton, M., Linazasoro, G., Borg, M., Tijssen, M. A., Bressman, S. B., Dobyns, W. B., Brashear, A., Ozelius, L. J. (2004)
"Mutations in the $Na^+/K^+$ -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism."
*Neuron* **43**, 169-175

**De Fusco**, M., Marconi, R., Silvestri, L., Atorino, L., Rampoldi, L., Morgante, L., Ballabio, A., Aridon, P., Casari, G. (2003)
"Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na*/K* pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2."
*Nat. Genet.* **33**, 192-196

**Dempski**, R. E., Friedrich, T., Bamberg, E. (2005)
"The beta subunit of the $Na^+/K^+$-ATPase follows the conformational state of the holoenzyme."
*J. Gen. Physiol.* **125**, 505-520

**Denier**, C., Ducros, A., Vahedi, K., Joutel, A., Thierry, P., Ritz, A., Castelnovo, G., Deonna, T., Gérard, P., Devoize, J. L., Gayou, A., Perrouty, B., Soisson, T., Autret, A., Warter, J. M., Vighetto, A., Van Bogaert, P., Alamowitch, S., Roullet, E., Tournier-Lasserve, E. (1999)
"High prevalence of CACNA1A truncations and broader clinical spectrum in episodic ataxia type 2."
*Neurology* **52**, 1816-1821

**Denning**, G. M., Anderson, M. P., Amara, J. F., Marshall, J., Smith, A. E., Welsh, M. J. (1992)
"Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive."
*Nature* **358**, 761-764

**Deprez**, L., Weckhuysen, S., Peeters, K., Deconinck, T., Claeys, K. G., Claes, L. R., Suls, A., Van Dyck, T., Palmini, A., Matthijs, G., Van Paesschen, W., De Jonghe, P. (2008)
"Epilepsy as part of the phenotype associated with ATP1A2 mutations."
*Epilepsia* **49**, 500-508

**de Vries**, B., Freilinger, T., Vanmolkot, K. R., Koenderink, J. B., Stam, A. H., Terwindt, G. M., Babini, E., van den Boogerd, E. H., van den Heuvel, J. J., Frants, R. R., Haan, J., Pusch, M., van den Maagdenberg, A. M., Ferrari, M. D., Dichgans, M. (2007)
"Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine."
*Neurology* **69**, 2170-2176

**De Weer**, P., Rakowski, R. F., Gadsby, D. C. (1992)
"Kinetic evidence that the Na/K pump delivers $Na^+$ to the cell exterior through a high-field channel."
*Biophysical Journal* **61**:A135 (abstract)

**Dichgans**, M., Mayer, M., Uttner, I., Brüning, R., Müller-Höcker, J., Rungger, G., Ebke, M., Klockgether, T., Gasser, T. (1998)
"The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases."
*Ann. Neurol.* **44**, 731-739

**Dobyns**, W. B., Ozelius, L. J., Kramer, P. L., Brashear, A., Farlow, M. R., Perry, T. R., Walsh, L. E., Kasarskis, E. J., Butler, I. J., Breakefield, X.O. (1993)
"Rapid-onset dystonia-parkinsonism."
*Neurology* **43**, 2596-2602

**Dodick**, D. W. und Gargus, J. J. (2008)
"Why migraines strike"
*Sci. Am.* **299**, 56-63

**Drumm**, M. L., Wilkinson, D. J., Smit, L. S., Worrell, R. T., Strong, T. V., Frizzell, R. A., Dawson, D.C., Collins, F. S. (1991)
"Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in Xenopus oocytes."
*Science* **254**, 1797-1799

**Ducros**, A., Nagy, T., Alamowitch, S., Nibbio, A., Joutel, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Iba-Zizen, M. T., Julien, J., Davous, P., Goas, J. Y., Lyon-Caen, O., Dubois, B., Ducrocq, X., Salsa, F., Ragno, M., Burkhard, P., Bassetti, C., Hutchinson, M., Verin, M., Viader, F., Chapon, F., Levasseur, M., Mas, J. L., Delrieu, O., Maciazek, J., Prieur, M., Mohrenweiser, H., Bach, J. F., Bousser, M. G., Tournier-Lasserve, E. (1996)
"Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, genetic homogeneity, and mapping of the locus within a 2-cM interval."
*Am. J. Hum. Genet.* **58**, 171-181

**Ducros**, A., Joutel, A., Vahedi, K., Cecillon, M., Ferreira, A., Bernard, E., Verier, A., Echenne, B., Lopez de Munain, A., Bousser, M. G., Tournier-Lasserve, E. (1997)
"Mapping of a second locus for familial hemiplegic migraine to 1q21-q23 and evidence of further heterogeneity."
*Ann. Neurol.* **42**, 885-890

**Dumont**, J. N. (1972)
"Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals."
*J. Morphol.* **136**, 153-180

**Dürr**, K. L., Tavraz, N. N., Dempski, R. E., Bamberg, E., Friedrich, T. (2009)
"Functional Significance of E2 State Stabilization by Specific α/β-Subunit Interactions of Na,K- and H,K-ATPase."
J. Biol. Chem. **284,** 3842-3854

**Gorokhova**, S., Bibert, S., Geering, K., Heintz, N. (2007)
"A novel family of transmembrane proteins interacting with beta subunits of the Na,K-ATPase."
*Hum. Mol. Genet.* **16**, 2394-2410

**Eakle**, K. A., Kim, K. S., Kabalin, M. A., Farley, R. A. (1992)
"High-affinity ouabain binding by yeast cells expressing $Na^+$, $K^+$-ATPase alpha subunits and the gastric $H^+$, $K^+$-ATPase beta subunit."
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89,** 2834-2838

**Ebashi**, S. und Lipmann, F. (1962)
"Adenosine trisphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle."
*J. Cell Biol.* **14**, 389-400

**Eisner**, D. A., Lederer, W. J., Vaughan-Jones (1981)
"The dependence of sodium pumping and tension on intracellular sodium activity in voltage-clamped sheep Purkinje fibres."
*J. Physiol. (Lond.)* **317**, 163-187

**Fagan**, M. J. und Saier, M. H. Jr. (1994)
"P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees."
*J. Mol. Evol.* **38**, 57-99

**Farber**, S. (1945)
"Some organic digestive disturbances in early life."
*J. Mich. State. Med. Soc.* **44**, 587-594

**Fendler**, K., Grell, E., Haubs, M., Bamberg, E. (1985)
"Pump currents generated by the purified $Na^+$,$K^+$-ATPase from kidney on black lipid membranes."
*Embo J.* **4**, 3079-3085

**Feng**, J. und Lingrel, J. B. (1995)
"Functional consequences of substitutions of the carboxyl residue glutamate 779 of the Na,K-ATPase."
*Cell. Mol. Biol. Res.* **41**, 29-37

**Fernandez**, D. M., Hand, C. K., Sweeney, B. J., Parfrey, N. A. (2008)
"A novel ATP1A2 gene mutation in an Irish familial hemiplegic migraine kindred."
*Headache* **48**, 101-108

**Forbush**, B., Kaplan, J., Hoffman, J. (1978)
"Characterization of a new photoaffinity derivate of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase."
*Biochemistry* **17**, 3667-3676

**Fredrickson**, D. S., Altrocchi, P. H., Avioli, L. V., Goodman, D. S., Goodman, H. C. (1961)
"Tangier disease: combined clinical staff conference at the National Institutes of Health."
*Ann. Int. Med.* **55**, 1016-1031

**Friedrich**, T., Bamberg, E. Nagel. G. (1996)
"$Na^+$,$K^+$-ATPase pump currents in giant excised patches activated by an ATP concentration jump."
*Biophys. J.* **71**, 2486-2500

**Friedrich**, T. und Nagel. G. (1997)
"Transient currents of Na+/K(+)-ATPase in giant patches from guinea
pig cardiomyocytes induced by ATP concentration jumps or voltage pulses."
*Ann N Y Acad Sci.* **834**, 435-438

**Furuichi**, T. und Mikoshiba, K. (1995)
"Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-mediated $Ca^{2+}$ signaling in the brain."
*J. Neurochem.* **64**, 953-960

**Gadsby**, D. C. (1980)
"Activation of electrogenic $Na^+/K^+$ exchange by extracellular $K^+$ in canine cardiac Purkinje fibers."
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 4035-4039

**Gadsby**, D. C. und Cranefield, P. F. (1979)
"Direct measurement of changes in sodium pump current in canine cardiac Purkinje fibers"
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 1783-1787

**Gallanti**, A., Tonelli, A., Cardin, V., Bussone, G., Bresolin, N., Bassi, M. T. (2008)
"A novel de novo nonsense mutation in ATP1A2 associated with sporadic hemiplegic migraine and epileptic seizures."
*J. Neurol. Sci.* **273**, 123-126

**Gardner**, K., Barmada, M. M., Ptacek, L. J., Hoffman, E. P. (1997)
"A new locus for hemiplegic migraine maps to chromosome 1q31."
*Neurology* **489**, 1231-1238

**Gargus**, J. J. (2009)
"Genetic Calcium Signaling Abnormalities in the Central Nervous System: Seizzures, Migraine, and Autism."
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1151**, 133-156

**Gargus**, J. J. und Tournay, A. (2007)
"Novel mutation confirms seizure locus SCN1A is also familial hemiplegic migraine locus FHM3."
*Pediatr. Neurol.* **37**, 407-410

**Garrahan**, P. J. und Glynn, I. M. (1967)
"The stoichiometry of the sodium pump."
*J. Physiol.* **192**, 217-35

**Geering**, K., Theulaz, I., Verrey, F., Häuptle, M. T., Rossier, B. C. (1989)
"A role for the beta-subunit in the expression of functional $Na^+$-$K^+$-ATPase in *Xenopus* oocytes."
*Am. J. Physiol.* **257**, C851-858

**Geering**, K. (2001)
"The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases."
*J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 425-438

**Geering**, K. (2006)
"FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase."
*Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **290**, F241-250

**Glitsch**, H. G. (1982)
"Electrogenic Na pumping in the heart."
*Annu. Rev. Physiol.* **44**, 389-400

**Glitsch**, H. G., Pusch, H., Schumacher, T., Verdonck, F. (1982)
"An identification of the K activated Na pump current in sheep Purkinje fibres."
*Pflugers Arch.* **394**, 256-263

**Glynn**, I. M. (1985)
"The $Na^+$,$K^+$-transporting adenosine triphosphate."
*The Enzymes of Biological Membranes* **3**, 35-114

**Griffin**, J. W., Goren, E., Schaumburg, H., Engel. W. K., Loriaux, L. (1977)
"Adrenomyeloneuropathy: a probable variant of adrenoleukodystrophy. I. Clinical and endocrinologic aspects."
*Neurology* **27**, 1107-1113

**Goadsby**, P. J. (2005)
"Advances in the understanding of headache"
*Br. Med. Bull.* **73-74**, 83-92

**Goadsby**, P. J. (2006)
"Recent advances in the diagnosis and management of migraine."
*BMJ* **332**, 25-29

**Goldshleger**, R., Karlish, S. J., Rephaeli, A., Stein, W. D. (1987)
"The effect of membrane potential on the mammalian sodium-potassium pump reconstituted into phospholipid vesicles."
*J. Physiol.* **387**, 331-355

**Gottesman**, M. M. und Ambudkar, S. (2001)
"Overview: ABC transporters and human disease."
*J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 453-458

**Gursoy-Ozdemir**, Y., Qiu, J., Matsuoka, N., Bolay, H., Bermpohl, D., Jin, H., Wang, X., Rosenberg, G. A., Lo, E. H., Moskowitz, M. A. (2004)
"Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9."
*J Clin Invest.* **113**, 1447-55

**Haan**, J., Terwindt, G. M., Ophoff, R. A., Bos, P. L., Frants, R. R., Ferrari, M. D., Krommenhoek, T., Lindhout, D. L., Sandkuyl, L. A., Van Eyk, R. (1995)
"Is familial hemiplegic migraine a hereditary form of basilar migraine?"
*Cephalalgia* **15**, 477-481

**Hansen**, A. J., Quistorff, B., Gjedde, A. (1980)
"Relationship between local changes in cortical blood flow and extracellular $K^+$ during spreading depression."
*Acta Physiol Scand.* **109**, 1-6

**Hansen**, A. J. und Zeuthen, T. (1981)
"Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex."
*Acta Physiol Scand.* **113**, 437-445

**Hansen**, J. M., Thomsen, L. L., Marconi, R., Casari, G., Olesen, J., Ashina, M. (2008)
"Familial hemiplegic migraine type 2 does not share hypersensitivity to nitric oxide with common types of migraine."
*Cephalalgia* **28**, 367-375

**Harlow**, E. und Lane, D (1988)
*Antibodies* A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

**Hasselbach**, W. (1979)
"The sarcoplasmic calcium pump. A model of energy transduction in biological membranes."
*Top. Curr. Chem.* **78**, 1-56

**Hasselbach**, W. und Makinose, M. (1961)
"The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting."
*Biochem. Z.* **333**, 518-28

**Hasselbach**, W. und Oetliker, H. (1983)
"Energetics and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum calcium pump."
*Annu. Rev. Physiol.* **45**, 325-339

**Hasler**, U., Wang, X., Crambert, G., Béguin, P., Jaisser, F., Horisberger, J. D., 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**, 30826-30835

**Haupts**, U., Tittor, J., Oesterhelt, D. (1999)
"Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule."
*Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **28**, 367-399

**Herrera**, V. L., Emanuel, J. R., Ruiz-Opazo, N., Levenson, R., Nadal-Ginard, B. (1987)
"Three differentially expressed Na,K-ATPase alpha subunit isoforms: structural and functional implications."
*J. Cell. Biol.* **105**, 1855-1865

**Hershko**, A. und Ciechanover, A. (1992)
"The ubiquitin system for protein degradation."
*Annu Rev Biochem* **61**, 761–807

**Hesse**, J. E., Wieczorek, L., Altendorf, K., Reicin, A. S., Dorus, E., Epstein, W. (1984)
"Sequence homology between two membrane transport ATPases, the Kdp-ATPase of Escherichia coli and the $Ca^{2+}$-ATPase of sarcoplasmic reticulum."
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 4746-4750

**Higgins**, C. F. (2001)
"ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview"
*Research in Microbiology* **152**, 205-210

**Hilge**, M., Siegal, G., Vuister, G. W., Güntert, P., Gloor, S. M., Abrahams, J. P. (2003)
"ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase."
*Nat Struct Biol.* **10**, 468-474

**Hollenstein**, K., Dawson, R. J. P. Locher, K. P. (2007)
"Structure and mechanism of ABC transporter proteins."
*Current Opinion in Structural Biology* **17**, 412-418

**Holmgren**, M. und Rakowski, R. F. (1994)
"Pre-steady-state transient currents mediated by the Na/K pump in internally perfused *Xenopus* oocytes."
*Biophys. J.* **66**, 912-922

**Holmgren**, M., Wagg, J. Bezanilla, F., Rakowski, R. F., De Weer, P., Gadsby, D. C. (2000)
"Three distinct and sequential stepps in the release of sodium ions by the $Na^+/K^+$-ATPase"
*Nature* **403**, 898-901

**Ikeda**, K., Onaka, T., Yamakado, M. Nakai, J., Ishikawa, T. O. Taketo, M. M., Kawakami, K. (2003)
"Degeneration of the amygdale/piroform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice.
*J. Neurosci.* **23**, 4667-4676

**Inesi**, G. (1985)
"Mechanism of calcium transport."
*Annu. Rev. Physiol.* **47**, 573-601

**Inesi**, G., Sumbilla, C., Kirtley, M.E. (1990)
"Relationships of molecular structure and function in $Ca^{2+}$-transport ATPase."
*Physiol. Rev.* **70**, 749-760

**Ishii**, T., Lemas, M. V., Takeyasu, K. (1994)
"$Na^+$-, ouabain-, $Ca^{2+}$-, and thapsigargin-sensitive ATPase activity expressed in chimeras between the calcium and the sodium pump alpha subunits."
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**, 6103-6107

**Jaisser**, F., Jaunin, P., Geering, K., Rossier, B. C., Horisberger, J. D. (1994)
"Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms."
*J. Gen. Physiol.* **103**, 605-623

**James**, P. F., Grupp, I. L., Grupp, G., Woo, A. L., Askew, G. R., Croyle, M. L., walsh, R. A., Lingrel, J. B. (1999)
"Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart."
*Mol. Cell* **3**, 555-563

**Jaunin**, P., Jaisser, F., Beggah, A. T., Takeyasu, K., Mangeat, P., Rossier, B. C., Horisberger, J. D., 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**, 1751-1759

**Jen**, J. C., Klein, A., Boltshauser, E., Cartwright, M. S., Roach, E. S., Mamsa, H., Baloh, R. W. (2007)
"Prolonged hemiplegic episodes in children due to mutations in ATP1A2."
*J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **78**, 523-526

**Jencks**, W. P. (1989)
"How does a calcium pump pump calcium?"
*J. Biol. Chem.* **264**, 18855-18858

**Jewell**, E. A. und Lingrel, J. B. (1991)
"Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells."
*J. Biol. Chem.* **266**, 16925-16930

**Jørgensen**, P. L. (1975)
"Purification and characterization of $Na^+$, $K^+$-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**, P. L. (1982)
"Conformational changes in the alpha-subunit and cation transport by pure Na, K-ATPase."
*Tokai. J. Exp. Clin. Med.* **7**, Suppl: 51-60

**Jørgensen**, P. L., Andersen, J.P. (1988)
"Structural basis for E1-E2 conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins."
*J. Membr. Biol.* **103**, 95-120

**Jørgensen**, P. L., Jørgensen, J. R., Pedersen, P. A. (2001)
„Role of conserved TGDGVND-loop in $Mg^{2+}$ binding, phosphorylation, and energy transfer in Na,K-ATPase."
*J Bioenerg Biomembr*. **33**, 367-377

**Jørgensen**, J. R. und Pedersen, P. A. (2001)
"Role of phylogenetically conserved amino acids in folding of Na,K-ATPase."
*Biochemistry* **40**, 7301-7308.

**Jørgensen**, P. L., Håkansson, K. O., Karlish, S. J. (2003)
"Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions."
*Annu. Rev. Physiol.* **65**, 817-849

**Jouvenceau**, A., Eunson, L. H., Spauschus, A., Ramesh, V., Zuberi, S. M., Kullmann, D. M., Hanna, M. G. (2001)
"Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel."
*Lancet* **358**, 801-807

**Jurkat-Rott**, K., Freilinger, T., Dreier, J. P., Herzog, J., Göbel, H., Petzold, G. C., Montagna, P., Gasser, T., Lehmann-Horn, F., Dichgans, M. (2004)
"Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 $Na^+/K^+$-ATPase variants."
*Neurology* **62**, 1857-1861

**Kamsteeg**, E. J. und Deen, P. M. (2001)
"Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity."
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 683-690

**Kaunisto**, M. A., Harno, H., Vanmolkot, K. R., Gargus, J. J., Sun, G., Hämäläinen, E., Liukkonen, E., Kallela, M., van den Maagdenberg, A. M., Frants, R. R., Färkkilä, M., Palotie, A., Wessman, M. (2004)
"A novel missense ATP1A2 mutation in a Finnish family with familial hemiplegic migraine type 2."
*Neurogenetics* **5**, 141-146

**Kerem**, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L. C. (1989)
"Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis."
*Science* **245**, 1073-1080

**Kobayashi**, T., Tahara, Y., Takenaka, H., Mimura, K., Hayashi, Y. (2007)
"$Na^+$- and $K^+$-dependent oligomeric interconversion among alphabeta-protomers, diprotomers and higher oligomers in solubilized $Na^+/K^+$-ATPase."
*J. Biochem.* **142**, 157-173

**Koenderink**, J. B., Swarts, H. G., Hermsen, H. P., De Pont, J. J. (1999)
"The beta-subunits of $Na^+$,$K^+$-ATPase and gastric $H^+$,$K^+$-ATPase have a high preference for their own alpha-subunit and affect the $K^+$ affinity of these enzymes."
*J. Biol. Chem.* **274,** 11604-11610

**Koenderink**, J. B., Geibel, S., Grabsch, E., De Pont, J. J., Bamberg, E., Friedrich, T. (2003)
"Electrophysiological analysis of the mutated Na,K-ATPase cation binding pocket."
*J. Biol. Chem.* **278**, 51213-51222

**Koenderink**, J. B., Zifarrelli, G. Qiu, L. Y., Schwarz, W., De Pont, J. J., Bamberg, E., Friedrich, T. (2005)
"Na,K-ATPase mutations in familial hemiplegic migraine lead to functional inactivation."
*Biochim. Biophys. Acta* **1669**, 61-68

**Kors**, E. E., Melberg, A., Vanmolkot, K. R., Kumlien, E., Haan, J., Raininko, R., Flink, R., Ginjaar, H. B., Frants, R. R., Ferrari, M. D., van den Maagdenberg, A. M. (2004)
"Childhood epilepsy, familial hemiplegic migraine, cerebellar ataxia, and a new CACNA1A mutation."
*Neurology* **63**, 1136-1137

**Kuntzweiler**, T. A., Argüello, J. M., Lingrel, J. B. (1996)
"Asp804 and Asp808 in the transmembrane domain of the Na,K-ATPase alpha subunit are cation coordinating residues."
*J. Biol. Chem.* **271**, 29682-29687

**Kühlbrandt**, W. (2004)
"Biology, structure and mechanism of P-type ATPases."
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 282-295

**Kühne**, W. F. (1878)
*Kluge Etymologisches Wörterbuch der deutschen Sprache, 24. Auflage*

**Küster**, B., Shainskaya, A., Pu, H. X., Goldshleger, R., Blostein, R., Mann, M., Karlish, S. J. (2000)
"A new variant of the gamma subunit of renal Na,K-ATPase. Identification by mass spectrometry, antibody binding, and expression in cultured cells.
*J. Biol. Chem.* **275,** 18441-18446

**Laemmli**, U. K. (1979)
"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4."
*Nature* **227**, 680-685

**Lafaire**, A. V und Schwarz, W. (1986)
"Voltage dependence of the rheogenic $Na^+/K^+$-ATPase in the membrane of oocytes of *Xenopus* laevis.
*J. Membr. Biol.* **91**, 43-51

**Lashley**, K. S. (1941)
"Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migrane"
*Arch Neurol Psychiatry* **46**, 331-339

**Läuger**, P. (1991)
"Electrogenic Ion Pumps."
Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

**Launer**, L. J., Terwindt, G. M., Ferrari, M. D. (1999)
"The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: the GEM study."
*Neurology* **53**, 537-542

**Leao**, A. A. (1944)
"Spreading depression of activity in the cerebral cortex"
*J. Neurophysiol.* **7**, 359-390

**Lemas**, M. V., Hamrick, M., Takeyasu, K., Fambrough, D. M. (1994)
"26 amino acids of an extracellular domain of the Na,K-ATPase alpha-subunit are sufficient for assembly with the Na,K-ATPase beta-subunit."
*J. Biol. Chem.* **269**, 8255-8259

**Lee**, A. G. (2002)
"A calcium pump made visible."
*Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 547-554

**Lencesova,** L., O'Neill, A., Resneck, W. G., Bloch, R. J., Blaustein, M. P. (2004)
"Plasma membrane-cytoskeleton-endoplasmic reticulum complexes in neurons and astrocytes."
*Journal of Biological Chemistry* **279**, 2885-2893

**Lenoir**, G., Williamson, P., Holthuis, J. C. M. (2007)
"On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport."
*Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 654-661

**Li**, C., Grosdidier, A., Crambert, G., Horisberger, J. D., Michielin, O., Geering, K. (2004)
"Structural and functional interaction sites between Na,K-ATPase and FXYD proteins."
*J. Biol. Chem.* **279**, 38895-38902

**Li**, C., Capendeguy, O., Geering, K., Horisberger, J. D. (2005)
"A third $Na^+$-binding site in the sodium pump."
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**, 12706-12711

**Li**, J., Zelenin, S., Aperia, A., Aizman, O. (2006)
"Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB."
*J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1848-1857

**Linazasoro**, G., Indakoetxea, B., Ruiz, J., Van Blercom, N., Lasa, A. (2002)
"Possible sporadic rapid-onset dystonia-parkinsonism."
*Mov. Disord.* **17**, 608-609

**Lingrel**, J. B., Orlowski, J., Shull, M. M., Price, E. M. (1990)
"Molecular genetics of the Na,K-ATPase."
*Prog. Nucleic Acids Mol. Biol.* **38**, 37-89

**Liu**, H. X. und Hökfelt, T. (2002)
"The participation of galanin in pain processing at the spinakl level"
*Trends Pharmacol Sci.* **23**, 468-474

**Lutsenko**, S. und Kaplan, J. H. (1993)
"An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion."
*Biochemistry* **32**, 6737-6743

**Lutsenko**, S. und Kaplan, J. H. (1995)
"Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity."
*Biochemistry* **34**, 15607-15613

**Mao**, H., Ferguson, T. S., Cibulsky, S. M., Holmqvist, M., Ding, C., Fei, H., Levitan, I. B. (2005)
"MONaKA, a novel modulator of the plasma membrane Na,K-ATPase."
*J. Neurosci.* **25,** 7934-7943

**Marconi**, R., De Fusco, M., Aridon, P., Plewnia, K., Rossi, M., Carapelli, S., Ballabio, A., Morgante, L., Musolino, R., Epifanio, A., Micieli, G., De Michele, G., Casari, G. (2003)
"Familial hemiplegic migraine type 2 is linked to 0.9Mb region on chromosome 1q23."
*Ann. Neurol.* **53**, 376-381

**May**, A., Ophoff, R. A., Terwindt, G. M., Urban, C., van Eijk, R., Haan, J., Diener, H. C., Lindhout, D., Frants, R. R., Sandkuijl, L. A., Ferrari, M. D. (1995)
"Familial hemiplegic migraine locus on 19p13 is involved in the common forms of migraine with and without aura."
*Hum. Genet.* **96**, 604-608

**Mayevsky**, A., Doron, A., Manor, T., Meilin, S., Zarchin, N., Ouaknine, G. E. (1996)
"Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system"
*Brain Res.* **740**, 268-274

**Meier**, S., Tavraz, N. N., Dürr, K. L., Friedrich, T. (2010)
"Hyperpolarization-activated inward leakage currents caused by deletion or mutation of carbox-terminal tyrosines of the $Na^+/K^+$-ATPase α subunit."
*Journal of General Physiology* **135**, 115-134

**Meij**, I. C., Koenderink, J. B., van Bokhoven, H., Assink, K. F., Groenestege, W. T., de Pont, J. J., Bindels, R. J., Monnens, L. A., van den Heuvel, L. P., Knoers, N. V. (2000)
"Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the $Na^+$,$K^+$-ATPase gamma-subunit."
*Nat. Genet.* **26**, 265-266

**Menken**, M., Munsat, T. L., Toole, J. F. (2000)
"The global burden of disease study: implications for neurology."
*Arch. Neurol.* **57**, 418-420

**Mercer**, R. W., Biemesderfer, D., Bliss, D. P. Jr., Collins, J. H., Forbush, B. (1993)
"Molecular cloning and immunological characterization of the gamma polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase."
*J. Cell. Biol.* **121**, 579-586

**Miescher** F. (1871)
"Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen."
In: Hoppe-Seyler F; [editor]. Medizinisch-chemische Untersuchungen.
Berlin: *Verlag von August Hirschwald*, Heft **4**, 441-460

**Migeon**, B. R., Moser, H. W., Moser, A. B., Axelman, J., Sillence, D., Norum, R. A. (1981)
"Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells."
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **78**, 5066-5070

**Milner**, P. M. (1958)
"Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leão."
*Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* **10**, 705

**Mimura**, K., Tahara, Y., Shinji, N., Tokuda, E., Takenaka, H., Hayashi, Y. (2008)
"Isolation of stable (alphabeta)4-Tetraprotomer from $Na^+/K^+$-ATPase solubilized in the presence of short-chain fatty acids."
*Biochemistry* **47**, 6039-6051

**Mohler**, P. J., Schott, J. J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L. S., Haurogné, K., Kyndt, F., Ali, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H., Bennett. V. (2003)
"Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death."
*Nature* **421**, 634-639

**Mohler**, P. J., Davis, J. Q., Bennett, V. (2005)
"Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP3 receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain."
*PLoS Biol.* **3**, 423

**Møller**, J. V., Juul, B., le Maire, M. (1996)
"Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases."
*Biochim. Biophys. Acta.* **1286**, 1-51

**Møller**, J.V., Nissen, P., Sørensen, T. L., le Maire, M. (2005)
"Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase pump."
*Curr.Opin. Struct. Biol.* **15**, 387-393

**Morth**, J. P., Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sørensen, T. L., Petersen, J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Nissen, P. (2007)
"Crystal structure of the sodium-potassium pump."
*Nature* **450**, 1043-1049

**Morth**, J. P., Poulsen, H., Toustrup-Jensen, M. S., Schack, V. R., Egebjerg, J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Nissen, P. (2009)
"The structure of the $Na^+$,$K^+$-ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations."
*Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364**, 217-27

**Mosser**, J., Douar, A. M., Sarde, C. O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L., Aubourg, P. (1993)
"Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters."
*Nature* **361**, 726-730

**Mukhopadhyay**, D. und Riezman, H. (2007)
"Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling."
*Science* **315**, 201–205

**Munzer**, J. S., Daly, S. E., Jewell-Motz, E. A., Lingrel, J. B., Blostein, R. (1994)
"Tissue- and isoform-specific kinetic behavior of the Na,K-ATPase."
*J. Biol. Chem.* **269** ,16668-16676

**Nagel**, G., Hwang, T.C., Nastiuk, K.L., Nairn, A.C. and Gadsby, D.C. (1992)
"The protein kinase A-regulated cardiac $Cl^-$ channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator."
*Nature* **360**, 81-84

**Nakao**, M. und Gadsby, D. C. (1986)
"Voltage dependence of translocation by the Na/K pump."
*Nature* **323**, 628-630

**Nakao**, M. und Gadsby, D. C. (1989)
"[$Na^+$] and [$K^+$] dependence of the Na/K pump current-voltage relationship in guinea pig ventricular myocytes."
*J.Gen. Physiol.* **94**, 539-565

**Nandi,** D., Tahiliani, P., Kumar, A., Chandu, D. (2006)
"The ubiquitin-proteasome system."
*J. Biosci.* **31**, 137-155

**Nedergaard**, M. und Astrup, J. (1986)
"Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation"
*J Cereb.Blood Flow Metab* **6**, 607-615

**Nekooki-Machida**, Y., Kurosawa, M., Nukina, N. Ito, K., Oda, T., Tanaka, M. (2009)
"Disctinst conformations of in vitro and in vivo amyloids of huntingin-exon1 show different cytotoxicity"
*Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9679-9684

**Nielsen**, J. M., Pedersen, P. A., Karlish, S. J., Jorgensen, P. L. (1998)
"Importance of intramembrane carboxylic acids for occlusion of $K^+$ ions at equilibrium in renal Na,K-ATPase."
*Biochemistry* **37**, 1961-1968

**Noguchi,** S., Mishina, M., Kawamura, M., Numa, S. (1987)
"Expression of functional Na+,K+-ATPase from cloned cDNAs."
*FEBS Lett* **225**, 27-32

**Ogawa**, H. und Toyoshima, C. (2002)
"Homology modeling of the cation binding sites of $Na^+K^+$-ATPase."
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 15977-15982

**Olesen**, J. (1991)
"Cerebral and extracranial circulatory disturbances in migraine: pathophysiological implications."
*Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **3**, 1-28

**Olesen**, J., Larsen, B., Lauritzen, M. (1981)
"Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine."
*Ann Neurol.* **9,** 344-352

**Olesen**, C., Sørensen, T. L., Nielsen, R. C., Møller, J. V., Nissen, P. (2004)
"Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion."
*Science* **306**, 2251-2255

**Olesen**, C., Picard, M., Winther, A. M., Gyrup, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Møller, J. V., Nissen, P. (2007)
"The structural basis of calcium transport by the calcium pump."
*Nature* **450**, 1036-1042

**Ophoff**, R. A., Terwindt, G. M., Vergouwe, M. N., van Eijk, R., Oefner, P. J., Hoffman, S. M., Lamerdin, J. E., Mohrenweiser, H. W., Bulman, D. E., Ferrari, M., Haan, J., Lindhout, D., van Ommen, G. J., Hofker, M. H., Ferrari, M. D., Frants, R. R. (1996)
"Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the $Ca^{2+}$ channel gene CACNL1A4."
*Cell* **87**, 543-552

**Palmgren**, M. G. und Axelsen, K. B. (1998)
"Evolution of P-type ATPases."
*Biochim. Biophys Acta.* **1365**, 37-45

**Payen**, A. und Persoz, J.-F. (1833)
*Annales de chimie et de physique*

**Pestov**, N. B., Ahmad, N., Korneenko, T. V., Zhao, H., Radkov, R., Schaer, D., Roy, S., Bibert, S., Geering, K., Modyanov, N. N. (2007)
"Evolution of Na,K-ATPase beta m-subunit into a coregulator of transcription in placental mammals."
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 11215-11220

**Post**, R. L. und Jolly, P. C. (1957)
"The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane."
*Biochim. Biophys. Acta.* **25**, 118-128

**Pedersen**, P. L. (2002)
"Transport ATPases in biological systems and relationship to human disease: a brief overview."
*J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 327-332

**Pedersen**, P. L. (2005)
"Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview."
*J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 349-357

**Pedersen**, P. L. und Carafoli, E. (1987)
"Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output."
*Trends in Biochemical Sciences* **12**, 186-189

**Pedersen**, P. A., Nielsen, J. M., Rasmussen, J. H., Jørgensen, P. L. (1998)
"Contribution to $Tl^+$, $K^+$, and $Na^+$ 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**, 17818-17827

**Pihakaski-Maunsbach**, K., Vorum, H., Honoré, B., Tokonabe, S., Frøkiaer, J., Garty, H., Karlish, S. J., Maunsbach, A. B. (2006)
"Locations, abundances, and possible functions of FXYD ion transport regulators in rat renal medulla."
*Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **291**, F1033-1044

**Pittock**, S. J., Joyce, C., O'Keane, V., Hugle, B., Hardiman, M. O., Brett, F., Green, A. J., Barton, D. E., King, M. D., Webb, D. W. (2000)
"Rapid-onset dystonia-parkinsonism: a clinical and genetic analysis of a new kindred."
*Neurology* **55**, 991-995

**Post**, R. L., 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**, 6530-6540

**Post**, R. L. und Kume, S. (1973)
"Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase."
*J. Biol. Chem.* **248**, 6993-7000

**Poulsen**, L. R., López-Marqués, R. L., Palmgren, M. G. (2008)
"Flippases: still more questions than answers."
*Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3119-3125

**Price**, E. M. und Lingrel, J. B. (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**, 8400-8408

**Price**, E. M., Rice, D. A., Lingrel, J. B. (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**, 6638-6641

**Qiu**, L. Y., Krieger, E., Schaftenaar, G., Swarts, H. G., Willems, P. H., De Pont, J. J., Koenderink, J. B. (2005)
"Reconstruction of the complete ouabain-binding pocket of Na,K-ATPase in gastric H,K-ATPase by substitution of only seven amino acids."
*J. Biol. Chem.* **280**, 32349-32355

**Rajasekaran**, S. A, Palmer, L. G., Quan, K., Harper, J. F., Ball, W. J. Jr, Bander, N. H., Peralta Soler, A., Rajasekaran, A. K. (2001)
"Na,K-ATPase beta-subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility."
*Mol. Biol. Cell* **12**, 279-295

**Rajasekaran**, S. A., Palmer, L. G., Moon, S. Y., Peralta Soler, A., Apodaca, G. L., Harper, J. F., Zheng, Y., Rajasekaran, A. K. (2001)
" Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells."
*Mol. Biol. Cell* **12**, 3717-3732

**Rakowski**, R. F. (1993)
"Charge Movement by the Na/K Pump in *Xenopus* Oocytes."
*J. Gen. Physiol.* **101**, 117-144

**Rakowski**, R. F., Gadsby D. C., De Weer P. (1989)
"Stoichiometry and voltage dependence of the sodium pump in voltage-clamped, internally dialyzed squid giant axon."
*J. Gen. Physiol.* **93,** 903-941

**Rakowski**, R. F.,Vasilets, L. A., LaTona, J., Schwarz, W. (1991)
"A negative slope in the current-voltage relationship of the $Na^+/K^+$ pump in *Xenopus* oocytes produced by reduction of external $[K^+]$."
*J. Membr. Biol.* **121**, 177-187

**Rakowski**, R. F., Gadsby D. C., De Weer P. (1997)
"Voltage dependence of the Na/K pump.
*J. Memr. Biol.* **155**, 105-112

**Rasmussen**, B. K. und Olesen, J. (1992)
"Migraine with aura and migraine without aura: an epidemiological study."
*Cephalalgia* **12**, 221-228

**Reeves**, A. S., Collins, J. H., Schwartz, A. (1980)
"Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid."
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1591-1598

**Remaley**, A. T., Rust, S., Rosier, M., Knapper, C., Naudin, L., Broccardo, C., Peterson, K. M., Koch, C., Arnould, I., Prades, C., Duverger, N., Funke, H., Assman, G., Dinger, M., Dean, M., Chimini, G., Santamarina-Fojo, S., Fredrickson, D. S., Denefle, P., Brewer, H. B. Jr. (1999)
"Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred."
*Proc. Natl. Acad. Sci U S A* **96**, 12685-12690

**Riant**, F., De Fusco, M., Aridon, P., Ducros, A., Ploton, C., Marchelli, F., Maciazek, J., Bousser, M. G., Casari, G., Tournier-Lasserve, E. (2005)
"ATP1A2 mutations in 11 families with familial hemiplegic migraine."
*Hum. Mutat.* **26**, 281

**Rossi**, D. J. (2004)
"Another BOLD role for astrocytes: coupling blood flow to neural activity."
*Nature Neuroscience* **9**, 159-161

**Russell**, M. B. und Olesen, J. (1996)
"A nosographic analysis of the migraine aura in a general population."
*Brain* **119**, 355-361

**Robinson**, J. D. und Flashner, M. S. (1979)
"The ($Na^+$ + $K^+$)-activated ATPase. Enzymatic and transport properties."
*Biochim. Biophys. Acta.* **549**, 145-176

**Sachs**, G. und Munson, K. (1991)
"Mammalian phosphorylating ion-motive ATPases."
*Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 685-694

**Sagar**, A. und Rakowski, R. F. (1994)
"Access channel model for the voltage dependence of the forward-running $Na^+/K^+$ pump."
*J. Gen. Physiol.* **103**, 869-893

**Sánchez-del-Rio**, M. und Reuter, U. (2004)
"Migraine aura: new information on underlying mechanisms."
*Curr Opin Neurol* **17**, 289-293

**Schatzmann**, H. J. (1989)
"The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum."
*Annu. Rev. Physiol.* **51**, 473-485

**Scheller**, D., Heister, U., Dengler, K., Tegtmeier, F. (1991)
"Extracellular changes of aspertat and glutamate during generation and propagation of cortical spreading depression in rats"
In: Olesen, J., Cerebral blood flow in migraine, tension-type headache and cluster headache
*Raven Press*, New York

**Schmalzing**, G., Kröner, S., Schachner, M., Gloor, S. (1992)
"The adhesion molecule on glia (AMOG/beta 2) and alpha 1 subunits assemble to functional sodium pumps in *Xenopus* oocytes."
*J. Biol. Chem.* **267,** 20212-20216.

**Schneider**, J. W., Mercer, R. W., Caplan, M., Emanuel, K. J., Sweadner, K. J., Benz, E. J. Jr., Levenson R. (1985)
"Molecular cloning of rat brain Na,K-ATPase α subunit cDNA."
*Proc. NatI. Acad. Sci.* **82**, 6357-6361

**Schuurmans-Stekhoven**, F., Bonting, S. L.(1981)
„Transport adenosine triphosphatases: properties and functions."
*Physiol. Rev.* **61**, 1-76

**Scofano**, H. M. und de Meis, L. (1981)
"Ratio of hydrolysis and synthesis of ATP by the sarcoplasmic reticulum ATPase in the absence of a $Ca^{2+}$ concentration gradient."
*J. Biol. Chem.* **256**, 4282-4285

**Schwedt**, T. J. und Dodick, D. W. (2009)
"Advanced neuroimaging of migraine"
*Lancet Neurol* **8**, 560-568

**Segall**, L., Daly, S. E., Blostein, R. (2001)
"Mechanistic basic for kinetic differences between the rat $\alpha_1$-, $\alpha_2$-, and $\alpha_3$-isoforms of the $Na^+,K^+$-ATPase."
*J. Biol. Chem.* **276**, 31535-31541

**Segall**, L., Lane, L. K., Blostein, R. (2002)
"New insights into the role of the N terminus in conformational transitions of the Na,K-ATPase."
*J. Biol. Chem.* **277**, 35202-35209

**Segall**, L., Scanzano, R., Kaunisto, M. A., Wessman, M., Palotie, A., Gargus, J. J., Blostein, R. (2004)
"Kinetic alterations due to a missense mutation in the Na,K-ATPase alpha2 subunit cause familial hemiplegic migraine type 2."
*J. Biol. Chem.* **279**, 43692-43696

**Segall**, L., Mezzetti, A., Scanzano, R., Gargus, J. J., Purisima, E., Blostein, R. (2005)
"Alterations in the alpha2 isoform of Na,K-ATPase associated with familial hemiplegic migraine type 2."
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**, 11106-11111

**Shamraj**, O. I. und Lingrel, J. B. (1994)
"A putative fourth Na,K-ATPase α-subunit gene is expressed in testis."
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12952-12956

**Sharma**, M., Benharouga, M., Hu, W., Lukacs, G. L. (2001)
"Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments."
*J. Biol. Chem.* **276**, 8942-8950

**Shinoda**, T., Ogawa, H., Cornelius, F., Toyoshoma, C. (2009)
"Chrystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution"
Nature **459**, 446-451

**Shull**, G. E., Greeb, J. Lingrel, J. B. (1986)
"Molecular cloning of three distinct forms of the $Na^+,K^+$-ATPase α subunit from rat brain."
*Biochemistry* **25**, 8125-8132

**Shull**, M. M. und Lingrel, J. B. (1987)
"Multiple genes encode the human Na+,K+-ATPase catalytic subunit."
*Proc. Nat. Acad. Sci.* **84**, 4039-4043

**Silberstein** S. D. (2004)
"Migraine"
*Lancet* **363**, 381-391

**Singh**, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., McHarg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E., Leppert, M. (1998)
"A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns."
*Nat. Genet.* **18**, 25-29

**Skou**, J. C. (1957)
"The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves."
*Biochim. Biophys. Acta.* **2**, 394-401

**Skou**, J. C. (1975)
"The $(Na^+ + K^+)$-activated enzyme system and its relationship to transport of sodium and potassium."
*Q. Rev. Biophys.* **7**, 401-434

**Skou**, J. C. (1988)
"The Na,K-pump."
*Methods. Enzymol.* **156**, 1-25

**Sørensen**, T. L., Møller, J. V., Nissen, P. (2004)
"Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump."
*Science* **304**, 1672-1675

**Spadaro**, M., Ursu, S., Lehmann-Horn F., Veneziano, L., Antonini, G., Giunti, P., Frontali, M., Jurkat-Rott, K. (2004)
"A G301R $Na^+/K^+$ -ATPase mutation causes familial hemiplegic migraine type 2 with cerebellar signs."
*Neurogenetics* **5**, 177-185

**Stewart**, W. F., Shechter, A., Rasmussen, B. K. (1994)
"Migraine prevalence. A review of population-based studies."
*Neurology* **44** (Suppl 4), S17-23

**Stokes**, D. L. und Green, N. M. (2003)
"Structure and function of the calcium pump."
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 445-468

**Stovner**, L. J., Zwart, J. A., Hagen, K., Terwindt, G. M., Pascual, J. (2006)
"Epidemiology of headache in Europe."
*Eur. J. Neurol.* **13**, 333-345

**Sweadner**, K. J. (1989)
"Isozymes of the Na,K-ATPase."
*Biochem. Biophys. Acta* **988**, 185-220

**Sweadner**, K. J. und Rael, E. (2000)
"The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression."
*Genomics* **68**, 41-56

**Sweadner**, K. J., Wetzel, R. K., Arystarkhova, E. (2000)
"Genomic organization of the human FXYD2 gene encoding the gamma subunit of the Na,K-ATPase."
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279,** 196-201

**Sweadner**, K. J. und Donnet, C. (2001)
"Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the $Ca^{2+}$-ATPase of the sarcoplasmic reticulum."
*Biochem. J.* **356**, 685-704

**Swoboda**, K. J., Kanavakis, E., Xaidara, A., Johnson, J. E., Leppert, M. F., Schlesinger-Massart, M. B., Ptacek, L. J., Silver, K., Youroukos, S. (2004)
"Alternating hemiplegia of childhood or familial hemiplegic migraine? A novel ATP1A2 mutation."
*Ann. Neurol.* **55**, 884-887

**Takano**, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., Nedergaard, M. (2006)
"Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow."
*Nature Neuroscience* **9**, 260-267

**Tanford**,C. (1984)
"The sarcoplasmic reticulum calcium pump. Localization of free energy transfer to discrete steps of the reaction cycle."
*FEBS Lett.* **166**, 1-7

**Tanford**, C. (1984)
"Twenty questions concerning the reaction cycle of the sarcoplasmic reticulum calcium pump."
*CRC Crit. Rev. Biochem.* **17**, 123-151

**Tang**, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A., Williamson, P. (1996)
"A subfamily of P-type ATPases wiith aminophospholipid transporting activity."
*Science* **272**, 1495-1497

**Therien**, A. G., Nestor, N. B., Ball, W. J., Blostein, R. (1996)
"Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase."
*J. Biol. Chem.* **271**, 7104-7112

**Therien**, A. G., Karlish, S. J., Blostein, R. (1999)
"Expression and functional role of the gamma subunit of the Na, K-ATPase in mammalian cells."
*J. Biol. Chem.* **274,** 12252-12256

**Therien**, A. G. und Blostein, R. (2000)
“Mechanisms of sodium pump regulation.”
*Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **279**, C541-566

**Therien**, A. G. und Deber, C. M. (2002)
”Oligomerization of a peptide derived from the transmembrane region of the sodium pump gamma subunit: effect of the pathological mutation G41R.“
*J. Mol. Biol.* **322,** 583-590

**Thomas**, R. C. (1969)
“Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neuron during extrusion of injected sodium.”
*J. Physiol.* **201**, 495-514

**Thomsen**, L. L., Eriksen, M. K., Romer, S. F., Andersen, I., Ostergaard, E., Keiding, N., Olesen, J., Russell, M. B. (2002)
“An epidemiological survey of hemiplegic migraine.”
*Cephalalgia* **22**, 361-375

**Thomsen**, L. L. und Olesen, J. (2004)
”Sporadic hemiplegic migraine.“
*Cephalalgia* **24**, 1016-1023

**Thomsen**, L. L., Kirchmann, M., Bjornsson, A., Stefansson, H., Jensen, R. M., Fasquel, A. C., Petursson, H., Stefansson, M., Frigge, M. L., Kong, A., Gulcher, J., Stefansson, K., Olesen, J.
”The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine.“
*Brain* **130**(Pt 2), 346-356

**Thomsen**, L. L., Oestergaard, E., Bjornsson, A., Stefansson, H., Fasquel, A. C., Gulcher, J., Stefansson, K., Olesen, J. (2008)
”Screen for CACNA1A and ATP1A2 mutations in sporadic hemiplegic migraine patients.“
*Cephalalgia* **28**, 914-921

**Todt**, U., Dichgans, M., Jurkat-Rott, K., Heinze, A., Zifarelli, G., Koenderink, J. B., Goebel, I., Zumbroich, V., Stiller, A., Ramirez, A., Friedrich, T., Göbel,H., Kubisch, C. (2005)
”Rare missense variants in ATP1A2 in families with clustering of common forms of migraine.“
*Hum. Mutat.* **26**, 315-321

**Tonelli**, A., Gallanti, A., Bersano, A., Cardin, V., Ballabio, E., Airoldi, G., Redaelli, F., Candelise, L., Bresolin, N., Bassi, M. T. (2007)
”Amino acid changes in the amino terminus of the Na,K-adenosine triphosphatase alpha-2 subunit associated to familial and sporadic hemiplegic migraine.”
*Clin. Genet.* **72**, 517-523

**Toyoshima**, C. (2007)
“Ion pumping by calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum.”
*Adv. Exp. Med. Biol.* **592**, 295-303

**Toyoshima**, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H. (2000)
“Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution.”
*Nature* **405**, 647-655

**Toyoshima**, C. und Nomura, H. (2002)
”Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium.“
*Nature* **418**, 605-611

**Toyoshima**, C. und Mizutani, T. (2004)
“Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue.”
*Nature* **430**, 529-535

**Toyoshima**, C. und Inesi. G. (2004)
“Structural basis of ion pumping by $Ca^{2+}$-ATPase of the sarcoplasmic reticulum.”
*Annu. Rev. Biochem.* **73**, 269-92

**Vagin**, O., Turdikulova, S., Sachs, G. (2005)
"Recombinant addition of N-glycosylation sites to the basolateral Na,K-ATPase beta1 subunit results in its clustering in caveolae and apical sorting in HGT-1 cells."
*J. Biol. Chem.* **280**, 43159-43167

**Vagin**, O., Turdikulova, S., Sachs, G. (2006)
"The role of the beta1 subunit of the Na,K-ATPase and its glycosylation in cell-cell adhesion."
*J. Biol. Chem.* **281**, 39573-39587

**Vagin**, O., Tokhtaeva, E., Yakubov, I., Shevchenko, E., Sachs, G. (2009)
" Inverse correlation between the extent of N-glycan branching and intercellular adhesion in epithelia. Contribution of the Na,K-ATPase beta1 subunit."
*J. Biol. Chem*. **283**, 2192-2202

**Vanmolkot**, K. R., Kors, E. E., Hottenga, J. J., Terwindt, G. M., Haan, J., Hoefnagels, W. A., Black, D. F., Sandkuijl, L. A., Frants, R. R., Ferrari, M. D., van den Maagdenberg, A. M. (2003)
"Novel mutations in the $Na^+$, $K^+$-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions."
*Ann. Neurol.* **54**, 360-366

**Vanmolkot**, K. R., Kors, E. E., Turk, U., Turkdogan, D., Keyser, A., Broos, L. A., Kia, S. K., van den Heuvel, J. J., Black, D. F., Haan, J., Frants, R. R., Barone, V., Ferrari, M. D., Casari, G., Koenderink, J. B., van den Maagdenberg, A. M. (2006a)
"Two de novo mutations in the Na,K-ATPase gene ATP1A2 associated with pure familial hemiplegic migraine."
*Eur J Hum Genet.* **14**, 555-560

**Vanmolkot**, K, R., Stroink, H., Koenderink, J. B., Kors, E. E., van den Heuvel, J. J., van den Boogerd, E. H., Stam, A. H., Haan, J., De Vries, B. B., Terwindt, G. M., Frants, R. R., Ferrari, M. D., van den Maagdenberg, A. M. (2006b)
"Severe episodic neurological deficits and permanent mental retardation in a child with a novel FHM2 ATP1A2 mutation."
*Ann Neurol.* **59**, 310-314

**Vanmolkot**, K. R., Babini, E., de Vries, B., Stam, A. H., Freilinger, T., Terwindt, G. M., Norris, L., Haan, J., Frants, R. R., Ramadan, N. M., Ferrari, M. D., Pusch, M., van den Maagdenberg, A. M., Dichgans, M. (2007)
"The novel p.L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: genetic and functional studies. Mutation in brief #957. Online."
*Hum Mutat.* **28**, 522

**Vanmolkot**, K. R., Stam, A. H., Raman, A., Koenderink, J. B., de Vries, B., van den Boogerd, E. H., van Vark, J., van den Heuvel, J. J., Bajaj, N., Terwindt, G. M., Haan, J., Frants, R. R., Ferrari, M. D., van den Maagdenberg, A. M. (2007)
"First case of compound heterozygosity in Na,K-ATPase gene ATP1A2 in familial hemiplegic migraine."
*Eur J Hum Genet.* **15**, 884-888

**Vasilets**, L. A., Omay, H. S., Ohta, T., Noguchi, S., Kawamura, M., Schwarz, W. (1991)
"Stimulation of the $Na^+/K^+$ pump by external [$K^+$] is regulated by voltage-dependent gating."
*J. Biol. Chem.* **266**, 16285-16288

**Vasilets**, L. A., Ohta, T., Noguchi, S., Kawamura, M., Schwarz, W. (1993)
"Voltage-dependent inhibition of the sodium pump by external sodium: species differences and possible role of the N-terminus of the alpha-subunit."
*Eur. Biophys. J.* **21**, 433-443

**Vilsen**, B. (1995)
"Mutant Glu781-->Ala of the rat kidney $Na^+$,$K^+$-ATPase displays low cation affinity and catalyzes ATP hydrolysis at a high rate in the absence of potassium ions."
*Biochemistry* **34**, 1455-1463

**Vilsen**, B. und Andersen, J. P. (1998)
"Mutation to the glutamate in the fourth membrane segment of $Na^+$,$K^+$-ATPase and $Ca^{2+}$-ATPase affects cation binding from both sides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms."
*Biochemistry* **37**, 10961-10971

**Wallick**, E. T. und Schwartz, A. (1988)
“Interaction of cardiac glycosides with $Na^+$,$K^+$-ATPase.”
*Methods Enzymol* **156**, 201-213

**Wang**, J., Velotta, J. B., McDonough, A. A., Farley, R. A. (2001)
“All human $Na^+$-$K^+$-ATPase alpha-subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides.”
*Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1336-1343

**Wang**, S. G., Eakle, K. A., Levenson, R., Farley, R. A. (1997)
“$Na^+$-$K^+$-ATPase alpha-subunit containing Q905-V930 of gastric $H^+$-$K^+$-ATPase alpha preferentially assembles with $H^+$-$K^+$-ATPase beta.”
*Am. J. Physiol.* **272**, C923-930

**Wierbicki**, W. und Blostein, R. (1993)
“The amino-terminal segment of the catalytic subunit of kidney Na,K-ATPase regulates the potassium deocclusion pathway of the reaction cycle.”
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**, 70-74

**Woo**, A. L., James, P. F., Lingrel, J. B. (2000)
”Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase.”
*J. Biol. Chem.* **275**, 20693-20699

**Xu**, J., Cheng, T., Feng, H. T., Pavlos, N. J., Zheng, M. H. (2007)
”Structure and function of V-ATPases in osteoclasts: potential therapeutic targets for the treatment of osteolysis.”
*Histol. Histopathol.* **22**, 443-454

**Yang-Feng**, T. L., Schneider, J. W., Lindgren, V., Shull, M. M., Benz, E. J., Jr., Lingrel, J. B., Francke, U. (1988)
”Chromosomal localization of human $Na^+$,$K^+$-ATPase alpha- and beta-subunit genes.”
*Genomics* **2**,128-138

**Yaragatupalli**, S., Olivera, J. F., Gatto, C., Antigas, P. (2009)
”Altered $Na^+$ transport after an intracellular alpha-subunit deletion reveals strict external sequential release of $Na^+$ from the Na/K pump.”
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **106**, 15507-15512

**Yoshimura**, S. H. und Takeyasu, K. (2003)
“Differential Degradation of the $Na^+$/$K^+$-ATPase Subunits in the Plasma Membrane.”
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* **986**, 378-381

**Yoshimura**, S. H., Iwasaka, S., Schwarz, W., Takeyasu, K. (2008)
”Fast degradation of the auxiliary subunit of the N+/K+-ATPase in the plasma membrane of the HeLa cells.”
*Journal of Cell Science* **121**, 2159-2168

**Zarubica**, A., Trompier, D., Chimini, G. (2007)
“ABCA1, from pathology to membrane function.”
*Pflugers Arch.* **453**, 569-579

**Zhang**, S., Malmersjö, S., Li, J., Ando, H., Aizman, O., Uhlén, P., Mikoshiba, K., Aperia, A. (2006)
“Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer.”
*J. Biol. Chem.* **281**, 21954-21962

**Zhuchenko**, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., Dobyns, W. B., Subramony, S. H., Zoghbi, H. Y., Lee, C. C. (1997)
“Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel.”
*Nat Genet.* **15**, 62-69

# *Abbildungs- & Tabellenverzeichnis*

# 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen


**1.1** In die Plasmamembran integrierte $Na^+/K^+$-ATPase ---- **02**

**1.2** Topologische Anordnung der drei Unreinheiten (α, β, γ) der $Na^+/K^+$-ATPase ---- **06**

**1.3** P-Typ-ATPase-Struktur ---- **07**

**1.4** Interaktionsschnittstelle zwischen der α- und β-Untereinheit ---- **10**

**1.5** Schematische Darstellung der PlasmERosom-Region ---- **14**

**1.6** Parallele Ansicht auf die Membran mit Einblick auf zwei Kationen-Bindungsstellen ---- **17**

**1.7** Reaktionszyklus der $Na^+/K^+$-ATPase dargestellt im modifizierten Post-Albers-Schema ---- **18**

**1.8 a** Schematische Darstellung zweier Neuronen (prä- und postsynaptisch), dem dazwischen liegenden Synaptischen Spalt und einer angrenzenden Astrozyte ---- **27**

**1.8 b** Schematische Darstellung zweier Neuronen (prä- und postsynaptisch), dem dazwischen liegenden Synaptischen Spalt und einer angrenzenden Astrozyte ---- **28**

**1.9** Schematische Darstellung der $Na^+/K^+$-ATPase und den bisher im Gen *ATP1A2* humangenetisch identifizierten Mutationen ---- **30**

**1.10** Strukturelle Darstellung de $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit inklusive der FHM2- und SHM-Mutationen ---- **32**

**1.11** Schematisierte Darstellung der $Na^+/K^+$-ATPase und der im entsprechenden Gen *ATP1A2* vorkommenden Mutationen ---- **33**

---

**2.1** Weibliches Individuum der Spezies *Xenopus laevis* ---- **37**

**2.2** Oozyten eines weiblichen Krallenfrosches im Stadium V ---- **37**

**2.3** Schaltplan für eine Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) ---- **42**

**2.4** Angewendetes Spannungsprotokoll ---- **42**

**2.5** Mit verschiedenen Kalium-Konzentrationen stimulierte Pumpströme bei einem Haltepotential von -30 mV ---- **43**

**2.6** Sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Kalium wurde ein Spannungsprotokoll mit Pulsen von +60 mV bis -180 mV (in 20 mV-Schritten) durchlaufen ---- **43**

**2.7** Mit dem Programm pClamp aufgezeichnete Stromantworten, die auf die entsprechenden Spannungspulse folgten ---- **44**


---

**3.1** Sequenzvergleich zwischen dem Wildtyp-Protein und den ATP1A2-Mutationen del(K935-S940)insI, S966X und X1021R ---- **47**

**3.2** Durch Zugabe von 10 mM Kalium induzierte stationäre Pumpströme ---- **48**

**3.3** Normierte Rubidium-Aufnahme vom Wildtyp und dem Konstrukt X1021R ---- **49**

**3.4** Ouabain-sensitive Differenzströme der Messungen in Gegenwart von 10 µM und 10 mM Ouabain ---- **50**

**3.5** Repräsentativer Western Blot mit Proteinproben aus Plasmamembran- (PM) bzw. Totalmembran-Präparationen (TM) ---- **51**

**3.6** $[K^+]_{ext}$-abhängige Strom-Spannungs-Kennlinien der verschiedenen ATP1A2-Konstrukte und des WT-Proteins ---- **53**

**3.7** Spannungsabhängige $K_{0.5}$-Werte von $K^+$-stimulierten Pumpströmen ---- **54**

**3.8** Aus transienten Strömen bestimmte apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Q/V-Kurven ---- **56**

**3.9** Das Konstrukt X1021R im Vergleich zum Wildtyp ---- **57**

**3.10** Repräsentative Arrhenius-Diagramme für das WT-Protein und die ATP1A2-Mutante P979L ---- **61**

**3.11** Repräsentativer Western Blot mit Proben aus Ganzzell-Lysaten ---- **62**

**3.12** Western Blots vorläufiger Untersuchungen der proteasomalen Inhibition mittels Lactacystin ---- **63**

---

**4.1** Mit Hilfe von im Internet verfügbarer Software erstellte Vorhersagen über transmembranäre Helices und ihre Topologie ---- **68**

**4.2** Schematische Darstellung (oben) und Sequenz-Vergleich (unten) der Region TM7/TM8 der humanen $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit ---- **69**

**4.3** Strukturelle Darstellung der beiden über eine potentielle Wasserstoffbrücke (rot gestrichelt) miteinander wechselwirkenden extrazellulären Schleifen der Transmembrandomänen TM5/TM6 und TM7/TM8 ---- **70**

**4.4** T376 und die in einem Umkreis von 5 Å lokalisierten Aminosäuren mit den zugehörigen Wasserstoffbrücken-Bindungen ---- **73**

**4.5** Strukturelle Detail-Darstellung des Arg-937 und der entsprechenden Wasserstoffbrücken-Bindungen zu den beiden Tyrosinen Y1019 und Y1020 ---- **74**

**4.6** In Netzwerken von Wasserstoffbrücken-Bindungen im Zentralbereich des Proteins involvierte ATP1A2-Aminosäuren ---- **75**

**4.7** Lokalisation von R383 in der $Na^+/K^+$-ATPase-Struktur ---- **78**

**4.8** Die Faltung des Proteins Huntingtin in zwei verschiedene Amyloid-Konformationen ---- **79**

**4.9** Reaktionszyklus der $Na^+/K^+$-ATPase ---- **82**

**4.10** Wechselwirkungen des C-Terminus' der humanen $Na^+/K^+$-ATPase $\alpha_2$-Untereinheit (terminale Tyrosine Y1019 und Y1020) mit den umliegenden Aminosäuren R937 und K770 ---- **83**

---

## Tabellen

**1.1** Übersicht über die P-Typ-ATPasen ---- **02**

**1.2** Die bisher charakterisierten sieben Proteine der FXYD-Familie und ihre Verteilung im Gewebe ---- **12**

**1.3** Übersicht über die Klassifikation der Migräne einschließlich ihrer Subtypen aus der Ende 2003 erschienenen überarbeiteten Auflage der Internationalen Kopfschmerzgesellschaft (IHS) ---- **21**

**1.4** Vier Gene, die entweder direkt oder indirekt mit hemiplegischer Migräne in Verbindung stehen, einschließlich ihrer Lokalisation auf den entsprechenden Chromosomen ---- **22**

**1.5** Während der Aura- bzw. Kopfschmerzphase auftretende Symptome ---- **24**

**1.6** Bisher entdeckte FHM2- und SHM-Mutationen und ihre topologische Lokalisation ---- **31**

---

**2.1** Vom Hersteller empfohlenes Zeit- und Temperaturprotokoll für ein transversal geheiztes Graphitrohr ---- **41**

---

**3.1** Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ermittelte $K_{0.5}$-Werte für die $[K^+]$-Abhängigkeit der stationären Pumpströme in Gegenwart von 100 mM $[Na^+]_{ext}$ ---- **52**

**3.2** Aus transienten Strömen unter $Na^+/Na^+$-Austausch-Bedingungen ermittelte Eigenschaften der ATP1A2-Mutanten ---- **59**

# *Danksagung*

# 8 Danksagung

Ja, ja, Neslie und ihre Promotion!

Nach Abschluss meiner Diplomarbeit, damals an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, nahm ich mir vor, einen riesigen Bogen um die Promotion zu machen. Die Arbeit im Labor machte mir jedoch so viel Spaß, dass ich mir vorstellen konnte anstelle dessen als Technische Assistentin zu arbeiten. Gesagt, getan. So landete ich in der Arbeitsgruppe von Thomas Friedrich, die zur Abteilung „Biophysikalische Chemie“ am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main gehörte. Die Arbeit bereitete mir sehr viel Freude und recht bald bekam ich auch ein eigenes Projekt. So vergingen die Tage, Wochen und Monate. Doch während dieser Zeit summierten sich die Anfragen von Herrn Professor Ernst Bamberg, unserem Abteilungsleiter, und meines direkten Vorgesetzen Thomas Friedrich. Sie deuteten immer wieder an, dass sie es mir durchaus zutrauen, eine Promotion in Angriff zu nehmen und zu bewältigen. Und nun bin ich am Ende meiner Dissertation angelangt und stehe kurz vor dem Abschluss des Promotionsverfahrens… Allerdings gab es zwischendurch eine Phase, in der ich sehr stark an mir zweifelte und mich fragte, ob ich jemals den Doktortitel erlangen würde. Doch Thomas Friedrich als „der beste Chef der Welt“ stand stets hinter mir und hat mir zu jeder Zeit unterstützend zur Seite gestanden. Ich danke ihm für den unerschütterlichen Glauben an mich und seine Unterstützung in allen Lebenslagen.

Charlie Chaplin (1889–1977) sagte einst: „An den Scheidewegen des Lebens stehen keine Wegweiser“, doch das stimmt so nicht ganz. Denn es ist immer ein aufmerksamer Mensch da, der einem mit seinen eigenen Erfahrungen hilft, eine Entscheidung zu treffen, die einem wieder auf den richtigen Weg verhilft. Ein besonderer Dank gebührt an dieser Stelle ebenso Herrn Professor Bamberg, der mich 2004 herzlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und mir ebenfalls auf den Promotionsweg verholfen hat und nun als Gutachter das Promotionsabschlussverfahren miterleben wird..

Auf dem bisher steinigen Weg haben mich sehr viele Menschen sowohl in wissenschaftlicher Hinsicht als auch in zwischenmenschlichen Aspekten begleitet und unterstützt. Um in chronologischer Reihenfolge zu bleiben, sei zunächst meinen Frankfurter Kollegen gedankt: hierzu gehören Heidi Bergemann, die gute Seele der Abteilung „Biophysikalische Chemie“. Sie hatte stets ein offenes Ohr und stand mir jederzeit zu allen erdenklichen Themen mit Rat und Tat zur Seite: danke schön. Verena Pintschovius danke ich für die liebevolle Einarbeitung in die Tätigkeiten einer TA. Rosemarie Schmidtell und Solveigh McCormack danke ich für ihre gelegentliche Unterstützung in der Literatur-Recherche, insbesondere der medizinischen Artikel, die ich ohne die Hilfe der beiden nicht hätte erhalten können. Helga Volk danke ich herzlich für ihre kreative und farbige Unterstützung in Sachen Postergestaltung. Herr Kussius und Herr Löhmann belieferten mich stets mit Paketen, die sie für mich angenommen haben. Die Gruppenleiter Klaus Hartung, Klaus Fendler, Jürgen Rettinger, Phil Wood und die

Doktoranden, insbesondere meine *roommates* Eva Bongartz (Büro I), Taryn Kirsch (Büro I), Julia Spitz (Büro II) und Christian Bamann (Büro II) verhalfen mir zu anregenden und aufschlussreichen Gesprächen, sei es in wissenschaftlicher oder aber auch in persönlicher Hinsicht. Miriam Dörr danke ich für die unzähligen leckeren Tees, die sie uns gekocht hat.

Vom ersten Satz der Rohfassung bis zum Ende der fertigen Dissertation war es ein langer Weg und ich bin zutiefst dankbar, dass ich ihn nicht allein gehen musste, sondern mich in so wunderbarer Gesellschaft befunden habe. Aber auch die Jahre zuvor begleitete mich Katharina Dürr, die sich ebenso wie ich von Frankfurt/Main nach Berlin begeben hat, um ihre Doktorarbeit weiterzuführen. Mit ihr fühle ich mich weit über das Wissenschaftliche hinaus verbunden und unsere gemeinsamen Aktivitäten in beiden Städten sowie die gemütlichen Bürostunden in Berlin haben unsere Zeit während des Promovierens ordentlich versüßt. Dazu gehören auch die unzähligen Überraschungs-Eier und auch sonstigen Süßwaren in allen möglichen Variationen.

Neben meiner Bürofreundin Luise, gab es und gibt es nach wie vor zahlreiche liebe Menschen, die mich während meiner Promotionsphase in Berlin begleiteten. Hierzu gehören Jennifer Langbein (meine Konzertfreundin, die mich stets mit guter Musik belieferte), Jan Geißendörfer (unser Hahn im Korb und mein Seelentröster während unserer Kaffee-Sessions), Kirstin Hobiger (der größten Frau, die ich persönlich kenne, die es gut gemeistert bekommt Familie & Beruf zu vereinbaren), Wienke Lange (meine Rock'n'roll-Queen, mit der ich am liebsten das Tanzbein schwinge), Susan Meier (die „Sockenspitzenstopferin" und meine ehemalige Diplomandin, der das Thema so gut gefiel, dass sie bei uns geblieben ist, um auch zu promovieren), Ina Seuffert (meine Nachbarin, von der ich nur einen Katzensprung entfernt bin, um unzählige gemeinsame Aktionen zu starten) Monika Weß und Sabine Kussin (die beiden unermüdlichen TA's), Herr Renger (mein persönlicher Updater bezüglich meines Lieblingsvereins Mainz 05 und meinem „Baby" der $Na^+/K^+$-ATPase), Steffen Sarstedt (der einen mit allem versorgt hat, sei es Büromaterial, wie Toner und Hefter, oder News über die TU Berlin). Des Weiteren danke ich den „Hildebrandt-Jungs" David von Stetten, Steve Kaminski, Tillmann Utesch, Miguel Saggu, Khoa Ly, Fransisco Escobar und der guten Seele von Peter Hildebrandt, nämlich Marina Böttcher für die wunderbare Zeit hier im Max-Volmer-Laboratorium: DANKE! Zu dieser bunten Truppe gehören natürlich zudem Dörte Di Fiore, Heidemarie Pannier, Athina Zouni, Peter Richter und Lars Paasche.

Klemens Raithel danke ich für die erlebnisreichen sieben Jahre, die wir gemeinsam verbracht haben, und für die unterstützende Entscheidung mit mir nach Berlin zu gehen.

Zu guter Letzt gilt mein tief empfundener Dank Prof. Peter Hildebrandt dafür, dass er sich als Gutachter bereit erklärt hat und sich hierfür ein weiteres Mal mit dem „Friedrich'schen Protein", der $Na^+/K^+$-ATPase, auseinander setzen „muss".