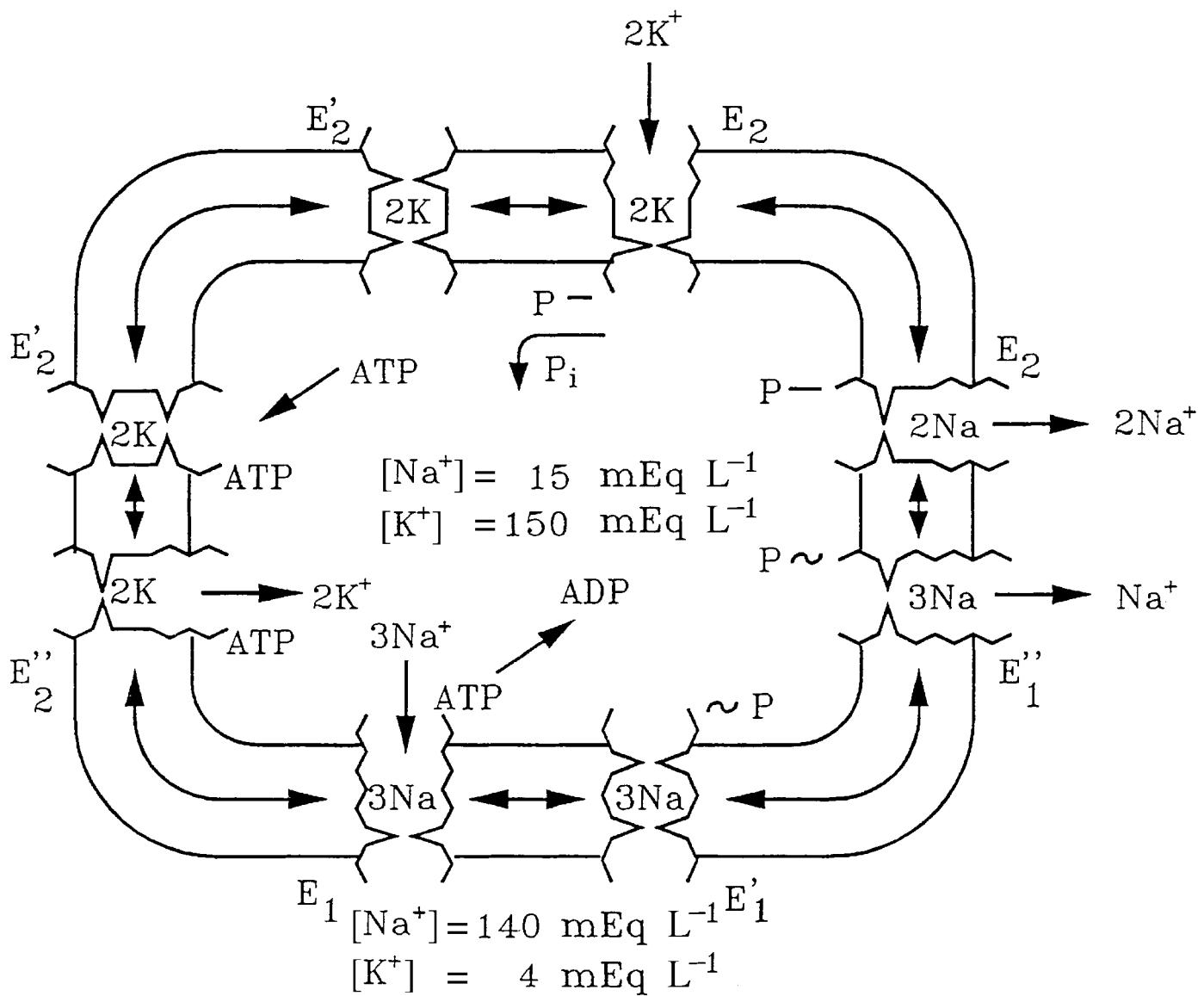


Das  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -Transportsystem der Zelle, die  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -Pumpe, besteht aus einer Carriereinheit im Innern der Membran und einer ATP-bindenden Einheit auf der cytoplasmatischen Membranseite. Der Carrier liegt in zwei Konformationen vor:  $E_1$  ist die für  $\text{Na}^+$  und  $E_2$  die für  $\text{K}^+$  hochaffine Form.



Die Carriereinheit hat zwei „Tore“, das sind Energiebarrieren, durch die der Zugang zur Kanalseite und zur cytoplasmatischen Seite geöffnet oder verschlossen werden kann. Für jedes zu ADP und anorganischem Phosphat  $P_i$  hydrolysierte ATP-Substratmolekül werden drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle heraus und zwei  $\text{K}^+$ -Ionen hinein gepumpt, wobei 70–85 % der Freien Energie aus der ATP-Hydrolyse verbraucht werden.

# Die Identifizierung der Natrium-Kalium-Pumpe (Nobel-Vortrag)\*\*

Jens C. Skou\*

*Looking for the answer*

*You hunt it,  
you catch it.  
You fool yourself;  
the answer,  
is always,  
a step ahead.*

J.C.S.

## 1. Einleitung

Die Zellmembran trennt die Zelle von dem sie umgebenden Medium. Im Jahre 1925 gelang es Gorter und Grendel,<sup>[1]</sup> die Lipide aus roten Blutkörperchen zu extrahieren, als monomolekulare Schicht auf einer Wasseroberfläche zu verteilen und die eingenommene Fläche zu messen. Diese entsprach etwa der doppelten Oberfläche der extrahierten roten Blutkörperchen. Sie schlugen daraufhin vor, daß die Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht besteht, wobei die geladenen Kopfgruppen der Phospholipide zur Wasserphase auf beiden Seiten der Membran weisen und sich die Kohlenwasserstoffketten in der Mitte der Membran treffen. Die Membran ist etwa 40 Å dick und somit viel zu klein, um unter dem Mikroskop sichtbar zu sein.

Die Oberflächenspannung einer Invertebraten-Zelle und anderer Zellen ist jedoch wesentlich niedriger, als für eine Wasser-Lipid-Granzfläche zu erwarten wäre. Deshalb schlugen Danelli und Davson 1935<sup>[2]</sup> die Existenz einer adsorbierter Proteinschicht auf jeder Seite der Lipiddoppelschicht vor. Zusätzlich postulierten sie eine Schicht nicht orientierter Lipide in der Mitte der Doppelschicht.

Im Cytoplasma befinden sich Proteine, für die die Zellmembran impermeabel ist. Im pH-Milieu der Zelle tragen sie negative Ladungen, die in der Zelle von K<sup>+</sup> neutralisiert werden, welches intrazellulär in einer Konzentration von etwa

150 Milli-Äquivalenten pro Liter (mEqL<sup>-1</sup>), extrazellulär dagegen nur in einer Konzentration von 4 mEqL<sup>-1</sup> vorliegt. Diese unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen beruhen auf dem Donnan-Effekt der Proteine und auf der Durchlässigkeit der Membran für K<sup>+</sup>. Der Donnan-Effekt ist für den osmotischen Druck verantwortlich, der in der Zelle höher als außerhalb ist; da die Membran für Wasser durchlässig ist, würde Wasser in die Zelle hineinfließen und – da die Lipiddoppelschicht dem hydrostatischen Druck nicht standhalten könnte – würde die Zelle anschwellen und platzen.

Dem höheren osmotischen Druck in der Zelle ist die hohe extrazelluläre Konzentration an Na<sup>+</sup> von 140 mEqL<sup>-1</sup> gegenübergestellt. Die intrazelluläre Natriumkonzentration ist mit 10–20 mEqL<sup>-1</sup> sehr niedrig. Es ist schwer zu verstehen, wie diese auf den beiden Seiten der Membran so unterschiedlichen Natriumkonzentrationen aufrechterhalten werden können. Es gibt zwei mögliche Erklärungen:

Erstens könnte im Gleichgewicht die Membran für Na<sup>+</sup> durchlässig sein. Diese Ansicht wurde von Conway, einem irischen Biochemiker aus Dublin vertreten. Boyle und Conway publizierten 1941 eine Arbeit, in der sie zeigten, daß für Muskelfasern, die sich in Lösungen mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen befanden, die auf der Grundlage dieser Annahme errechneten intrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentrationen mit den gemessenen übereinstimmten.<sup>[3]</sup> Aber es gab dabei zwei Probleme: Erstens stimmte dies nur für höhere Konzentrationen, aber nicht für die normalen physiologischen K<sup>+</sup>-Konzentrationen; zweitens mußte eine Undurchlässigkeit für Natrium vorausgesetzt werden. Wie konnte dann aber erklärt werden, daß Natrium auch in der Zelle vorliegt, wenn auch in sehr niedrigen Konzentrationen? Conway konnte diese Fragen nicht beantworten.

Eine andere Erklärung wäre, daß die Membran für Na<sup>+</sup> durchlässig ist und daß sekretorische, energieabhängige Vorgänge in der Zelle stattfinden, die den ständigen Einstrom von Na<sup>+</sup> kompensieren und somit einen Gleichgewichtszustand aufrechterhalten. Diese Ansicht wurde von R. B. Dean in einer 1941 veröffentlichten Arbeit mit dem Titel: „Theories of Electrolyte Equilibrium in Muscle“ vertreten.<sup>[4]</sup> Er nahm Bezug auf Untersuchungen von L. A. Heppel (1939, 1940), L. A. Heppel und C. L. A. Schmidt (1938) sowie H. B. Steinbach (1940)<sup>[4]</sup> an Muskelfasern, die ergeben hatten, daß – im Unterschied zu der von Conway vertretenen Meinung – die Membran von Muskelfasern für Na<sup>+</sup> durchlässig ist. Dean schloß daraus: „the muscle can actively move potassium and

[\*] Prof. Dr. med. J. C. Skou  
Århus University, Nordre Ringgade  
Ole Worms Allé 185, DK-8000 Århus (Dänemark)  
Fax: (+45) 8612-9599

[\*\*] Copyright® The Nobel Foundation 1998. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

sodium against concentration gradients [...] this requires work. Therefore there must be some sort of a pump possibly located in the fiber membrane, which can pump out sodium or, what is equivalent, pump in potassium.“

In den nächsten zehn Jahren konnte, unterstützt durch die Einführung radioaktiver Isotope von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ,<sup>[5]</sup> nicht nur an Muskelfasern, sondern auch an roten Blutkörperchen, Nervenzellen und Froschhaut gezeigt werden, daß die Membran sowohl für  $\text{Na}^+$  als auch für  $\text{K}^+$  permeabel ist (siehe hierzu den ausführlichen Übersichtsartikel von Ussing<sup>[6]</sup>). Es mußte also einen energieabhängigen Ausstrom von  $\text{Na}^+$  geben.

Trotzdem blieb Conway bei seiner Meinung über die Impermeabilität der Membran für Natrium und gab nur zögernd nach. Er glaubte, daß es eine gewisse Permeabilität für Natrium und daher auch die Notwendigkeit für eine Pumpe gab, blieb aber dabei, daß die geringe Permeabilität für  $\text{Na}^+$  die Hauptursache für den Konzentrationsgradienten sein müßte. Seiner Meinung nach wäre es eine Energieverschwendug, eine  $\text{Na}^+$ -permeable Membran zu haben und dann Energie aufzuwenden, um  $\text{Na}^+$  aus der Zelle hinauszupumpen. 1946 hatte Krogh<sup>[7]</sup> in einer Croonian-Vorlesung mit dem Titel „The active and passive exchange of inorganic ions through the surface of living cells and through living membranes generally“ die Ansicht Conways über die  $\text{Na}^+$ -Impermeabilität kritisiert. Krogh verkündete: „The power of active transport of ions is of a common occurrence both in the vegetable and the animal kingdom and is possibly a general characteristic of the protoplasmic surface membrane.“ Conway antwortete im selben Jahre in der Zeitschrift *Nature*:<sup>[8]</sup> „Krogh [...] considers the apparent impermeability to sodium as due to an active extrusion, sodium ions entering the (muscle) fibers as fast, if indeed not faster, than potassium. The following may then be considered: the minimal energy required for extrusion of sodium ions from the normal frog's sartorius if sodium enters as fast as potassium“. Eine Berechnung ergab, daß der Energiebedarf etwa doppelt so hoch war wie der für den Ruhemetabolismus des Muskels. Ussing<sup>[9]</sup> kam zum selben Ergebnis, aber er erklärte das scheinbare Problem. Nur ein Teil des gemessenen  $\text{Na}^+$ -Flusses beruht auf einem aktiven Transport von  $\text{Na}^+$ , der andere Teil ergibt sich aus einem Austausch von  $\text{Na}^+$  von der einen Seite der Membran gegen  $\text{Na}^+$  von der anderen Seite, also ein  $\text{Na}-\text{Na}$ -Austausch, der energetisch neutral ist und keinen Netto-

Fluß von  $\text{Na}^+$  über die Membran hinweg zur Folge hat. Die zur Verfügung stehende Energie wäre mehr als ausreichend. Conways Bedenken waren aber insofern relevant, als mit dem damals zur Verfügung stehenden Wissen über Membranfunktionen ein aktiver Transport energetisch sehr aufwendig schien, um das osmotische Problem der Zelle zu lösen.

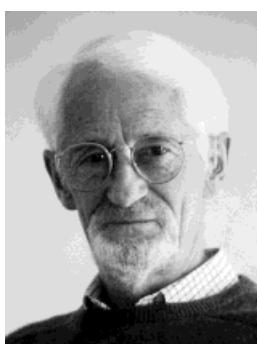
In den vierziger Jahren und in der ersten Hälfte der fünfziger Jahre entwickelte sich das Konzept des aktiven Transports.<sup>[6]</sup> Er war definiert als Transport gegen einen elektrochemischen Gradienten.<sup>[10]</sup> Es konnte gezeigt werden, daß der aktive  $\text{Na}^+$ -Ausstrom an eine  $\text{K}^+$ -Einstrom gekoppelt ist, also eine Pumpe existiert und das Substrat für diesen Transport aus energiereichen Phosphatestern besteht.<sup>[11]</sup>

Welcher Art ist aber diese Pumpe? Mit der damals zur Verfügung stehenden Information konnte vorausgesehen werden, daß die Pumpe ein membrangebundenes Protein mit enzymatischer Aktivität ist, das ATP als Substrat verwendet und durch  $\text{Na}^+$  auf der cytoplasmatischen Seite und  $\text{K}^+$  auf der extrazellulären Seite aktiviert wird. Aber niemand folgte diesem Gedankengang. Ein Grund mag darin liegen, daß die Membran nach dem Modell von Danielli und Davson aus einer Lipiddoppelschicht besteht, in der für membran-durchspannende Proteine kein Platz war. Man nahm sogar an, daß Proteine in der Doppelschicht die Zellmembran destabilisieren würden. Man vermutete die Proteine an der Grenzfläche zwischen den Lipiden und Wasser auf den beiden Seiten der Membran.

## 2. Der Weg zur Natrium-Pumpe<sup>[12, 13]</sup>

Mein wissenschaftliches Interesse war gefesselt vom Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika. Ich war am Institut für Physiologie der Universität Århus angestellt und bearbeitete dieses Thema im Rahmen meiner Dissertation. 1953 hatte ich eine Versuchsreihe beendet und publizierte die Ergebnisse im Jahre 1954 auf Dänisch.<sup>[14]</sup> Die Arbeit wurde von der Fakultät angenommen, um dann von mir zur Erlangung des Doktorgrades verteidigt zu werden. Außerdem wurden die Arbeiten in sechs Mitteilungen auf Englisch veröffentlicht.<sup>[15]</sup>

Ich erhielt meinen medizinischen Abschluß im Sommer 1944 und begann meine Assistenzarztzeit in der Abteilung für Innere Medizin im Krankenhaus von Hjørring, einer Stadt im



Jens C. Skou wurde 1918 in Lemvig (Dänemark) geboren. Er studierte Medizin an der Universität von Kopenhagen und promovierte 1954 an der Universität von Århus. Hier wurde er 1963 zum Professor und Leiter des physiologischen Instituts und 1977 zum Professor am Institut für Biophysik ernannt, wo er bis 1988 tätig war. Er wurde mit mehreren Preisen und Ehrungen ausgezeichnet und erhielt 1997 den Nobel-Preis für Chemie.

nördlichen Teil des Landes. Nach sechs Monaten dort wechselte ich in die Chirurgie, die mich zunehmend interessierte und wo ich ein weiteres Jahr nach meiner Assistenzarztzeit verbrachte. Wir hatten keinen Narkosearzt und, um die unangenehme Ethernekrose zu vermeiden, benutzten wir hauptsächlich Spinal- und Lokalanästhetika. Aus der Pharmakologie kannte ich die Theorie von Meyer-Overton,<sup>[16, 17]</sup> wonach eine Korrelation zwischen der Lipidlöslichkeit von Allgemeinanästhetika und deren anästhetischer Wirksamkeit bestand. Allgemeinanästhetika sind unpolare Substanzen, während Lokalanästhetika schwache Basen sind, die bei physiologischem pH-Wert als Mischung aus geladenen und ungeladenen Molekülen vorliegen. Ich fragte mich, welche der beiden Komponenten wohl die anästhetische Komponente ist und ob es eine Korrelation ähnlich der bei den Allgemeinanästhetika auch bei Lokalanästhetika gibt. Ich beschloß, dieses Thema zu bearbeiten. Nach den zwei Jahren am Krankenhaus von Hjørring bekam ich eine Stelle am Orthopädischen Krankenhaus in Århus, und 1947 wechselte ich an das Institut für Medizinische Physiologie der Universität Århus.

Die Universität von Århus war erst 19 Jahre vorher gegründet worden und daher noch recht jung. Es gab ein Institut für Anatomie, für Biochemie und für Physiologie in der medizinischen Fakultät, die aber erst 1957 fertiggestellt wurde. Dieses waren die einzigen biologischen Institute auf dem Campus, und das wissenschaftliche Umfeld war dementsprechend dürfzig, da auch nur wenig oder gar kein Kontakt zur wissenschaftlichen Welt bestand. Wir waren drei junge Doktoren an der Seite von Professor Søren L. Ørskov, die an ihrer Dissertation arbeiteten, hatten alle keine wissenschaftlichen Erfahrungen, aber Ørskov war sehr hilfreich, geduldig und ließ uns viel Zeit. Etwa 140 Medizinstudenten pro Jahr mußten unterrichtet werden, so daß viel Zeit für die Lehre aufgewendet wurde. Wenn die Studenten die Prüfung in Physiologie bestanden hatten, gingen sie an die Medizinische Fakultät in Kopenhagen, um dort weiter zu studieren.

Ich benutzte den intakten Ischiasnerv aus dem Froschbein, um die blockierende Wirkung von fünf Lokalanästhetika, die alle schwache Basen waren, zu testen und nahm zusätzlich Butanol als Beispiel für ein unpolares blockierendes Agens. Nach Entfernung der Hülle um den Nerven waren die einzelnen Nervenfasern gut zugänglich. Ich maß die für eine Blockierung erforderliche Konzentration als Funktion der Zeit und konnte daraus die entsprechende Mindestkonzentration bei unendlicher Expositionsduer bestimmen. Die nötigen Konzentrationen schwankten zwischen dem stärksten und dem schwächsten Anästhetika um den Faktor 1:920 (mit Butanol 1:13 500). Die Reihenfolge der anästhetischen Potenz und der Lipidlöslichkeit waren gleich, aber die quantitative Korrelation war schlecht, d.h., Lokalanästhetika folgten nicht der Regel von Meyer-Overton für Allgemeinanästhetika.

Ich suchte nach einem anderen Testobjekt. Da die Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht besteht, beschloß ich, eine monomolekulare Lipidschicht auf einer Krebs-Ringer-Wasserphase als Modell für eine Wasser-Zellmembran-Grenzfläche zu verwenden. Dieser Gedanke kam mir nach der Lektüre von Arbeiten von Langmuir über monomolekulare Lipidschichten auf einer Wasserphase in „The Physics

and Chemistry of Surfaces“ von N. K. Adam. Auch hatte Schulmann kapillar aktive Agentien in die Wasserphase unter einer Monoschicht gegeben und beobachtet, daß sie in die Monoschicht eindrangen.<sup>[18]</sup>

In einem Langmuir-Trog kann die Fläche einer Monoschicht als Funktion des Druckes gemessen werden, den die Monoschicht auf eine schwimmenden Barriere ausübt, die sie von der reinen Wasserphase trennt. Für meine ersten Experimente benutzte ich eine monomolekulare Schicht aus Stearinäure. Bei einer gegebenen Fläche pro Molekül, d.h. auch einem bestimmten Oberflächendruck, erhöhte sich dieser Druck nach Gabe von Lokalanästhetika zur Wasserphase. Das bedeutete, daß das Lokalanästhetikum in die Monoschicht eindrang. Der Druck erhöhte sich mit der Konzentration. Es bestand eine gewisse Korrelation zwischen anästhetischer Wirksamkeit und der Druckerhöhung, die aber quantitativ nicht deutlich genug war. Eine einigermaßen gute Korrelation lag jedoch bei Monoschichten aus Lipiden vor, die aus dem Ischiasnerv eines Frosches extrahiert worden waren. Die Reihenfolge der Konzentrationen, die nötig waren, um den Druck zu erhöhen, korrelierte mit der Reihenfolge der anästhetischen Wirksamkeit. Die für eine Blockierung erforderlichen Mindestkonzentrationen der fünf Lokalanästhetika, die wie erwähnt um den Faktor 1:920 schwankten, bewirkten bei gegebener Fläche eine Druckerhöhung in der Monoschicht in der gleichen Größenordnung; sie variierten um den Faktor 1:3.2. Auch die Auswirkung einer pH-Wert-Änderung auf die Wirksamkeit der Lokalanästhetika korrelierte gut mit dem Einfluß auf die Druckerhöhung bei gegebenen Fläche.

Die Anstiegsphase eines Nervenimpulses, die Depolarisation, beruht auf einer vorübergehenden Permeabilitätsverhöhung der Membran für Na<sup>+</sup>.<sup>[19]</sup> Der Grund dafür auf molekularer Basis war unbekannt, aber es schien unwahrscheinlich, daß Lipide daran beteiligt waren. Ich vermutete, daß Proteine in der Membran für die Permeabilitätsverhöhung verantwortlich waren. Meine Versuche mit den Monoschichten deuteten darauf hin, daß durch das Eindringen der Lokalanästhetika in den Lipidteil der Nervenmembran die Membranproteine ihre Konformation nicht ändern konnten und so die Permeabilitätsverhöhung für Na<sup>+</sup> resultierte.

Um diese Hypothese zu testen, wollte ich untersuchen, ob Druck in der Monoschicht die enzymatische Aktivität eines Proteins in der Monoschicht beeinflussen kann, was ein Hinweis auf den Einfluß von Druck auf die Konformation wäre. Falls eine Wirkung zu beobachten war, wollte ich eine monomolekulare Schicht aus einer Mischung von Lipiden und dem Enzym herstellen und untersuchen, ob durch Eindringen eines Lokalanästhetikums in die Monoschicht die enzymatische Aktivität beeinflußt wird. Dazu benötigte ich ein Enzym mit hoher Aktivität, welches mit der Membranfunktion in Zusammenhang stand. Ein Kandidat war die Acetylcholinesterase, die aus einem Zitteral durch Professor Nachmansohn an der Columbia University in New York isoliert worden war. Ein weiterer Vorteil war, daß mit der Wahl dieses Enzyms ein Besuch in New York verbunden war.

Der Professor für Physiologie in Kopenhagen, Einar Lundsgaard, war ein enger Freund von David Nachmansohn und stellte mich ihm vor. Ich hatte vor, den August in New

York zu verbringen, dann Ende August und Anfang September am 19th International Congress of Physiology in Montreal teilzunehmen und im September nach New York zurückzukehren (und nicht wie, in Lit. [12, 13] erwähnt, im Juli oder August). Dieser Zeitplan hätte gut in meinen Lehrplan gepaßt. Nachmanson wollte jedoch bis September nicht in New York sein, da er den Sommer an der Marine Biological Station in Woods Hole verbringen wollte, und schlug vor, ihn dort im August zu treffen. Im September wollte er nach New York zurückkehren. Ich stimmte zu, obwohl ich nicht wußte, was ich in Woods Hole machen sollte; dort gab es keinen Zitteraal.

Während des Sommers kamen Wissenschaftler aus der ganzen Welt nach Woods Hole, die sich für die Funktion des Nervensystems interessierten und das Riesenaxon des Tintenfisches als Testobjekt benutzten. Für mich, der ich aus einer jungen Universität kam, war es, als käme ich von einem anderen Planeten. Der Ort sprudelte nur so vor wissenschaftlicher Aktivität. Ich erkannte, daß Wissenschaft eine ernste Sache ist und nicht nur ein vorübergehendes Hobby für junge Doktoren, die eine Dissertation schreiben, um sich für eine Karriere im klinischen Bereich zu qualifizieren, und darüber hinaus, daß es hier Konkurrenz und Wettbewerb gab. Ich hörte mir Vorträge an, traf Leute, deren Namen ich aus den Lehrbüchern und aus der Literatur kannte, und verbrachte viel Zeit in den Laboratorien, wo ich die Experimente verfolgte und einiges lernte.

Zwischendurch las ich auch und fand in einer Veröffentlichung Nachmansohns, daß B. Libet<sup>[20]</sup> 1948 gezeigt hatte, daß ein ATP-hydrolysierendes Enzym in der Nervenscheide des Riesenaxons aus Tintenfisch vorkommt, also eine ATPase. Angesichts der Tatsache, daß ATP die Energiequelle der Zellen ist, fragte ich mich, worin die Funktion einer ATPase in der Membran einer Nervenzelle besteht. Da es in der Membran saß, hielt ich es für ein Lipoprotein und glaubte nun, das richtige Enzym für meine Monoschicht-Experimente gefunden zu haben. Ich beschloß, dieses Enzym zuhause zu suchen.

An der Columbia University isolierte ich im September Acetylcholinesterase aus dem Zitteraal, und zurück in Århus setzte ich dann meine Monoschicht-Experimente fort. Ich hatte in Århus keinen Zugang zu Riesenaxonen, aber beschloß, nach möglichen Membran-ATPasen in Nerven von Krabben zu suchen, weil diese ähnlich wie das Riesenaxon keine Myelinscheide haben. Im Jahre 1954 bestellte ich bei einem Fischer südlich von Århus einige Krabben und begann, den Ischiasnerv aus deren Beinen zu isolieren. Die Nerven wurden homogenisiert und die Membranstücke durch Zentrifugieren isoliert.

Die Experimente ergaben, daß in den Membranstücken eine  $Mg^{2+}$ -aktivierte ATP-hydrolysierende Enzymaktivität vorkam. Der Zusatz von  $Na^+$  neben  $Mg^{2+}$  erhöhte diese Aktivität etwas.  $K^+$  hatte keinen Einfluß in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  (Abb. 1). Die Aktivität variierte jedoch von Experiment zu Experiment.  $Ca^{2+}$  konnte als Ursache dieser Variabilität ausgeschlossen werden. Nachdem ich den November und Dezember zu keiner Lösung gekommen war, gab ich auf und fuhr in die Weihnachtsferien. Im Juni des folgenden Jahres nahm ich die Experimente wieder auf, konnte aber immer

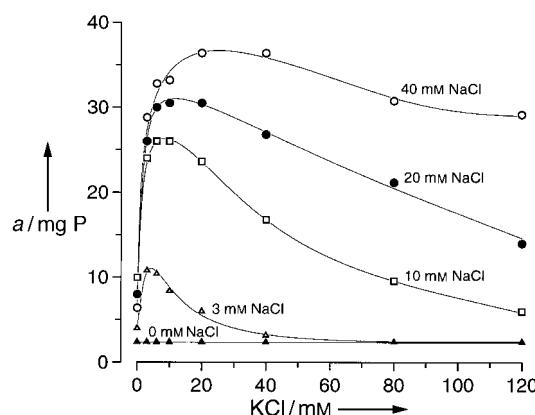


Abb. 1. Der Einfluß von  $Na^+$  und  $K^+$  in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  auf die Hydrolyse von ATP durch Membranfraktionen, die aus den Nerven der Krabbe *Carcinus maenas* isoliert worden waren. Die Testlösung enthielt 30 mM Histidin-HCl-Puffer (pH 7.2), 3 mM ATP, 6 mM  $Mg^{2+}$  sowie  $Na^+$  (0 (▲), 3 (△), 10 (□), 20 (●) und 40 mM (○)) und  $K^+$ . Die Aktivität  $a$  ist als Menge [ $\mu$ g] an anorganischem Phosphat angegeben, das aus ATP in 30 min bei 36 °C durch Hydrolyse freigesetzt wurde (mit Genehmigung aus Lit. [27]).

noch keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen. Dann fuhr ich in die Sommerferien. Im August stellte ich das  $Na^+$ - und das  $K^+$ -Salz von ATP her und fand zu meiner Überraschung, daß die Aktivität mit dem  $K^+$ -Salz höher lag als mit dem  $Na^+$ -Salz. Das konnte nicht am ATP liegen, aber an der Wirkung von  $K^+$ , die sich von der von  $Na^+$  unterschied. Warum aber war das in dieser Versuchsreihe und nicht in den früheren gemessen worden, bei denen  $K^+$  in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  keine Wirkung gezeigt hatte. Die Antwort war, daß in den Versuchen mit dem  $K^+$ -Salz von ATP auch  $Na^+$  im Medium vorhanden war. Das Enzym benötigte also beide Kationen. Ich begann sofort eine systematische Untersuchung des kombinierten Einflusses dieser beiden Kationen.

Abbildung 1 zeigt, daß  $K^+$  in Gegenwart von  $Na^+$  zwei Wirkungen hat: Es aktiviert das Enzym abhängig von der  $Na^+$ -Konzentration. Die  $K^+$ -Affinität für die aktivierende Wirkung ist hoch. Bei höheren Konzentrationen nimmt der aktivierende Effekt von  $K^+$  ab und die scheinbare  $K^+$ -Affinität nimmt mit zunehmender  $Na^+$ -Konzentration ab. Bei 3 mM  $Na^+$  inhibiert  $K^+$  nicht nur seine eigene Aktivierung, sondern auch die geringe Aktivierung durch  $Na^+$ . Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß es zwei wichtige Stellen im Enzym gibt: Für die eine ist  $Na^+$  zur Aktivierung nötig, und die andere wird durch  $K^+$  aktiviert, wenn  $Na^+$  an erstere gebunden hat. In höheren Konzentrationen konkurriert  $K^+$  mit  $Na^+$  an der  $Na^+$ -Bindungsstelle und vermindert die Aktivität, indem es  $Na^+$  verdrängt.

Jetzt verstand ich endlich den Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse. Da  $Na^+$  nur einen geringen und  $K^+$  gar keinen Einfluß auf die Aktivität hatte, hatte mich nicht interessiert, ob  $Na^+$  oder  $K^+$  im Medium war. Ich erhielt ATP als unlösliches Bariumsalz, das in lösliches  $Na^+$ - oder  $K^+$ -Salz umgewandelt wurde. Ich benutzte mal das eine, mal das andere, und anstatt die Nerven in Glucose zu homogenisieren, verwendete ich zwischendurch auch eine 0.58 M KCl-Lösung. Ich kam nie auf die Idee, daß es eine kombinierte Wirkung von  $Na^+$  und  $K^+$  geben könnte.

Worin also bestand die physiologische Funktion dieses Enzyms? Ich war an der Wirkung von Lokalanästhetika auf die Nervenleitung interessiert, und mein erster Gedanke war, daß es sich um einen Na<sup>+</sup>-Kanal handeln könnte, der sich für den Einstrom von Na<sup>+</sup> öffnet und zu einem Nervenimpuls führt. Bald darauf aber verwarf ich diese Idee, da die Öffnung des Kanals von der Spannung und nicht von ATP abhängig ist. Eine andere Möglichkeit bestand darin, daß es die Natrium-Pumpe oder ein Teil davon war. Ich wußte sehr wenig über den aktiven Transport von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> und suchte daher in der Literatur das Substrat für den aktiven Transport in Nerven. Ich hatte nur begrenzten Zugang zur Literatur, so daß ich nur einige wenige Veröffentlichungen über den aktiven Transport lesen konnte. Trotzdem fand ich, daß A. L. Hodgkin und R. D. Keynes<sup>[21]</sup> gezeigt hatten, daß der aktive Transport von Natrium vermindert ist, wenn Riesenaxone mit Dinitrophenol, Cyanid oder Azid vergiftet werden; das gab zu der Vermutung Anlaß, daß energiereiche Phosphatester das Substrat sein könnten. Und da ATP ein energiereicher Phosphatester ist, hielt ich es für das wahrscheinlichste Substrat.

Es gab allerdings zwei Veröffentlichungen, die ich nicht gelesen hatte. Eine war von G. Gardos<sup>[22]</sup> aus Budapest im Jahre 1954 in einem ungarischen Journal publiziert worden, zu dem ich keinen Zugang hatte, und war auch nicht von Hodgkin und Keynes zitiert worden. Hier zeigte Gardos, daß ATP für die aktive Aufnahme von K<sup>+</sup> in rote Blutkörperchen nötig war. Die andere Veröffentlichung war von Hodgkin und Keynes<sup>[23]</sup> aus dem Jahre 1956, in der sie berichteten, daß die Injektion von ATP in ein mit Cyanid vergiftetes Riesenaxon zu keiner deutlichen Erholung des aktiven Na<sup>+</sup>-Ausstroms führte. Glücklicherweise bekam ich diese Publikation nicht zu Gesicht, bevor ich meine Arbeit über das Enzym in Krabbenerven publizierte. 1957 wurde das Experiment von Caldwell und Keynes<sup>[24]</sup> wiederholt, die damit bewiesen, daß ATP das Substrat für den aktiven Transport war.

In einer Diskussion nach einem Beitrag von R. D. Keynes über „Electrolytes and Nerve Activity“<sup>[25]</sup> bei einem internationalen Symposium über Neurochemie in Århus im Jahre 1956 stellte ich meine Ergebnisse mit der ATPase aus Krabbenerven vor.<sup>[26]</sup> Im selben Jahr noch schrieb ich die Publikation und schlug aufgrund der Eigenschaften der Wirkung der Kationen und aufgrund der Tatsache, daß ATP ein Substrat ist, vor, daß das Enzym am aktiven Transport von Na<sup>+</sup> über die Zellmembran hinweg beteiligt ist. Ich erwog das Wort Pumpe für den Titel, aber es erschien mir zu provokativ und so wurde daraus: „The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves“. So verwundert es nicht, daß nur wenige bemerkten, daß dieses Enzym etwas mit dem aktiven Transport von Na<sup>+</sup> zu tun hatte. Die Arbeit wurde 1957 publiziert.<sup>[27]</sup>

Da ich nur wenig über aktiven Transport wußte, war mir die Bedeutung meiner Beobachtungen an den Krabbenerven nicht bewußt. Neben den Experimenten an Krabbenerven arbeitete ich weiter an den Monoschichten mit der Acetylcholinesterase. 1958 präsentierte ich einen Beitrag beim 4th International Congress of Biochemistry in Wien mit dem Titel „The Influence of the Degree of Unfolding and the Orienta-

tion of the Side Chains on the Activity of a Surface Spread Enzyme“.

Ein wichtiges Experiment hatte ich noch nicht durchgeführt. Das erkannte ich, als ich Robert Post auf der Tagung traf. Ich kannte Robert von Woods Hole, wo wir einige Zeit im selben Labor gearbeitet hatten, und ich hatte ihn und seine Frau Elizabeth in ihrem Auto von Woods Hole zum International Congress for Physiology in Montreal gefahren. Er erzählte mir, daß er seither am aktiven Transport von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> in roten Blutkörperchen arbeitete und gezeigt hatte, daß das Verhältnis zwischen dem Na<sup>+</sup>-Transport aus der Zelle heraus und dem K<sup>+</sup>-Transport in die Zelle hinein bei 3:2 lag.<sup>[28]</sup>

Ich erzählte ihm von dem Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-aktivierten Enzym aus Krabbenerven und daß es Teil der Natrium-Pumpe zu sein schien. Seine Reaktion zeigte mir, daß diese Beobachtung wichtiger als Oberflächenenzyme sein könnte. „Wird es durch Ouabain gehemmt?“ fragte er. „Was ist Ouabain?“ antwortete ich. Er erzählte mir, daß Schatzmann 1954 in der Schweiz gezeigt hatte, daß Herzglycoside, von denen Ouabain das wasserlöslichste ist, den aktiven Transport in roten Blutkörperchen spezifisch hemmen.<sup>[29]</sup> Als Robert Post nach der Konferenz nach Århus kam, hatte ich die Antort. Das Enzym wurde durch Ouabain inhibiert, auch wenn das Enzym aus Krabbenerven wesentlich weniger empfindlich war als das aus roten Blutkörperchen. Dieses Resultat überzeugte Robert, daß das Enzym am aktiven Transport beteiligt sein mußte. Ich hatte gelernt, daß rote Blutkörperchen das klassische Versuchsobjekt für den aktiven Transport waren und begann, nach dem Enzym in diesen Zellen zu suchen. Robert fragte mich, ob er mit diesen Versuchen nach seiner Rückkehr in die USA fortfahren könnte. Ich hatte – anders als er – keine Erfahrung mit diesen Zellen und so stimmte ich zu, arbeitete weiter mit dem Enzym aus Krabbenerven<sup>[30]</sup> und suchte es auch in anderen Geweben.<sup>[31]</sup>

Im Jahre 1959, nachdem ich meinen ersten Beitrag über das Krabbenerven-Enzym auf dem 21th International Congress for Physiology in Buenos Aires vorgestellt hatte, kam Professor Hodgkin, der einen großen Namen in der Neurophysiologie hatte und an der berühmten Universität von Cambridge lehrte, zu mir und lud mich zum Lunch ein, um mehr über das Enzym zu erfahren. Sein Interesse gab mir Anlaß zu der Vermutung, daß meine Beobachtungen von Bedeutung waren.

Rückblickend war das Experiment zur Identifizierung der Pumpe sehr einfach. Man muß nur die Membran aufbrechen, um Zugang zur Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle innen und zur K<sup>+</sup>-Bindungsstelle außen zu erhalten, ATP hinzufügen und auf den kombinierten Einfluß von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> hin testen. Eigentlich hätte dieses Experiment jemand durchführen sollen, der auf dem Gebiet des aktiven Transports arbeitete. Ich fühlte mich wie ein Eindringling in ein fremdes Gebiet.

Es war allerdings auch viel Glück im Spiel. Erstens, daß Nachmansohn mich nach Woods Hole eingeladen hatte, wo ich die Riesenaxone und die Beobachtungen von Libet kennenlernte, zweitens, daß ich mich ausgehend von den Monoschicht-Experimenten für Membranproteine, vor allem für Lipoproteine, interessiert hatte und daher auch von den Befunden Libets Notiz nahm, und schließlich, daß ich mich

für Krabbennerven als Versuchsstoffe entschieden hatte. Ich erfuhr erst später, daß beim Homogenisieren der meisten anderen Gewebe die Membranstücke Vesikel bilden; diese müssen durch Behandlung mit Detergents aufgebrochen werden, um beide Seiten der Membran freizulegen und den kombinierten Effekt von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  beobachten zu können. Das traf auf Membranen von Krabbennerven nicht zu.

Von diesem Zeitpunkt an zog mich die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase fort von meinen Monoschicht-Experimenten. Ich führte die geplanten Versuche über die Wirkung von Lokalanästhetika auf Monoschichten aus Lipiden und Proteinen nie durch. Und ich benutzte die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nie für Monoschicht-Experimente, zum einen, weil man erst 1980 das Enzym in wasserlöslicher stabiler Form aus einer Membran extrahieren konnte, und zum anderen, weil dies nur durch die Verwendung von Detergents möglich war.<sup>[32]</sup> Das Detergent wäre ein Problem gewesen, aber ich hatte das Interesse an den Monoschichten verloren.

1960 publizierte Robert Post seine Versuche mit den roten Blutkörperchen in einer Arbeit mit dem Titel „Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocytes“.<sup>[33]</sup> Er zeigte überzeugend, daß es auch in roten Blutkörperchen eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -aktivierte ATPase gibt und daß der Einfluß der Kationen auf die Aktivität des Enzyms mit dem Einfluß auf den Kationentransport korreliert. Robert Post war auf dem Gebiet des Transports bekannt, und seine Publikation hatte einen besseren Titel als meine und erregte mehr Aufmerksamkeit.

In den folgenden Jahren wurde in zahlreichen Publikationen gezeigt, daß das Enzym in vielen unterschiedlichen Geweben vorhanden und daß es am aktiven Transport beteiligt ist.<sup>[34]</sup> Bis zum Jahre 1965 lagen viele Belege vor, und ich konnte in einem Übersichtsartikel die Anforderungen zusammentragen, die an ein Enzymsystem gestellt werden, das am aktiven Transport über eine Membran beteiligt ist:

1. Das Enzymsystem befindet sich in der Zellmembran.
2. Auf der cytoplasmatischen Seite ist die Affinität für  $\text{Na}^+$  höher als die für  $\text{K}^+$ .
3. Das Enzymsystem hat auf der extrazellulären Seite für  $\text{K}^+$  eine höhere Affinität als für  $\text{Na}^+$ .
4. Das Enzymsystem weist enzymatische Aktivität auf und katalysiert die ATP-Hydrolyse.
5. Die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse hängt sowohl vom cytoplasmatischen  $\text{Na}^+$  als auch vom extrazellulären  $\text{K}^+$  ab.
6. Das Enzymsystem tritt in allen Zellen mit gekoppeltem aktiven  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Transport auf.
7. Der Einfluß von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  auf den Transport in intakten Zellen korreliert quantitativ mit der Aktivität des isolierten Enzyms.
8. Das Enzym wird durch Herzglycoside gehemmt, und der hemmende Effekt auf den Fluß der Kationen korreliert mit dem hemmenden Effekt auf das isolierte Enzymsystem.<sup>[34]</sup>

Das Enzym wurde  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -aktivierte ATPase oder  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase genannt.

### 3. Die $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase als Energiewandler

Kehren wir zu den Energieberechnungen Conways zurück. Er hatte insofern recht, als daß – selbst wenn die Zellmembran für  $\text{Na}^+$  durchlässig und somit eine energiebenötigende Pumpe erforderlich ist – die Grundpermeabilität der Zellmembran für  $\text{Na}^+$  niedrig sein muß, damit die Aufrechterhaltung des  $\text{Na}^+$ -Gradienten energetisch nicht zu aufwendig für die Zelle wird. Doch welchen Sinn hat es, daß die Membran für Natrium permeabel ist, dann aber 10–60 % der Energie des Zellmetabolismus dafür verbraucht werden, um  $\text{Na}^+$  aus der Zelle hinaus und  $\text{K}^+$  hineinzuschleusen?

1. Wie schon erwähnt, wird dadurch das osmotische Problem gelöst, das durch die impermeablen Protein-Anionen im Cytoplasma entsteht.

2. Daneben werden die von der Pumpe aufrechterhaltenen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Gradienten als Quelle für Energie benutzt, die ein Membranpotential aufbaut. Die Zellmembran ist für  $\text{K}^+$  permeabler als für  $\text{Na}^+$ , weshalb  $\text{K}^+$  schneller aus der Zelle herausfließt, als  $\text{Na}^+$  hinein. Es entsteht ein Diffusionspotential über die Membran hinweg: Das Innere ist negativ geladen, wodurch der  $\text{K}^+$ -Ausstrom verlangsamt und der  $\text{Na}^+$ -Einstrom beschleunigt wird, bis das Potential einen Wert von etwa  $-70 \text{ mV}$  erreicht hat; bei diesem Wert sind die Geschwindigkeiten der beiden Kationenflüsse gleich groß, und ein Gleichgewicht (steady state) ist erreicht. Auf dem Membranpotential basiert die Funktion aller erregbaren Gewebe. Der Nervenimpuls beinhaltet eine Depolarisation der Membran durch einen vorübergehenden Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Permeabilität mit einem Einstrom von  $\text{Na}^+$  und eine anschließende Repolarisation durch den Ausstrom von  $\text{K}^+$ .<sup>[35]</sup> Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ - und einem Erniedrigung der  $\text{K}^+$ -Konzentration, was durch die Pumpe kompensiert werden muß.

3. Die Energie aus den Konzentrationsgradienten wird für den Transport anderer Substanzen in die Zelle hinein und aus ihr heraus genutzt (Abb. 2). In der Zellmembran gibt es einige

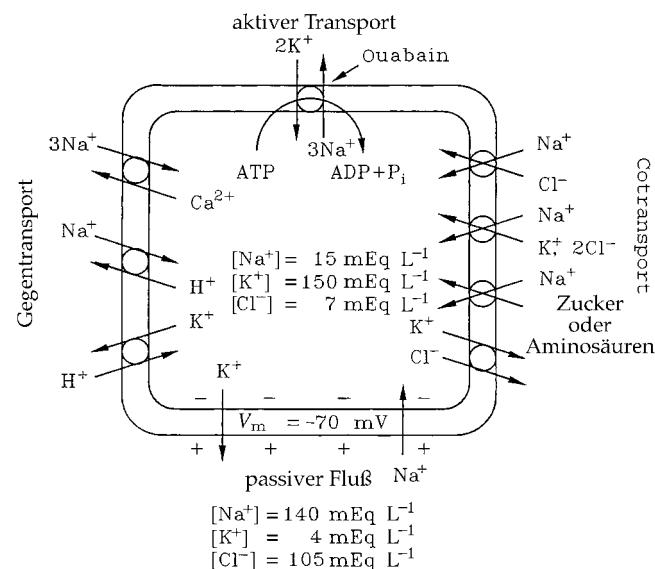


Abb. 2. Der Transport durch die Zellmembran. Erklärungen siehe Text (mit Genehmigung aus Lit. [73]).

Proteinmoleküle, die als Co- oder Gegentransporter (Sym- bzw. Antiport) fungieren.<sup>[36]</sup> So transportieren Cotransporter, die den  $\text{Na}^+$ -Gradienten nutzen, Glucose<sup>[37]</sup> oder Aminosäuren<sup>[38]</sup> in die Zelle hinein, so daß deren Konzentration in der Zelle größer wird als die außerhalb, und ein  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , ein  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ - und ein  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter dürften an der Regulation des Zellvolumens beteiligt sein.<sup>[39]</sup> Darüber hinaus gibt es einen  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Gegentransporter, der für die Regelung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wichtig ist,<sup>[40]</sup> einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Gegentransporter zur Regulation des intrazellulären pH-Wertes und noch viele andere.

4. Die Energie aus den Konzentrationsgradienten wird weiterhin für den transepithelialen Transport im Darmschleimhaut, in der Niere und in sekretorischen Drüsen genutzt.

Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe wirkt also als Energiewandler, die chemische Energie aus der Hydrolyse von ATP bezieht und in eine andere Energieform, einen Konzentrationsgradienten, umwandelt, der für den Austausch von Substanzen über die Zellmembran hinweg benötigt wird. Dieser Vorgang wird sekundärer aktiver Transport genannt, während der Transport, der direkt von der Energie aus einer chemischen Reaktion abhängt, wie der aktive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Transport, als primärer aktiver Transport bezeichnet wird. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist somit ein Schlüsselenzym für den Austausch von Substanzen über die Zellmembran hinweg.

Wo aber befand sich die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase innerhalb der Membran? Das Transportsystem, ein Protein, mußte Zugang zu beiden Seiten der Membran haben. Wie schon erwähnt, gibt es in der Lipiddoppelschicht des Membranmodells von Danielli und Davson keinen Platz für Proteine. Das gleiche trifft für das Einheitsmodell von Robertson aus dem Jahre 1959 zu.<sup>[41]</sup> Die Einheitsmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit asymmetrisch angeordneten Proteinen auf beiden Seiten der Membran, aber ohne membrandurchspannende Proteine. Erst 1972 wurde ein brauchbares Modell von Singer und Nicolson entwickelt.<sup>[42]</sup> In ihrem Flüssig-Mosaik-Membranmodell gibt es, mit ihrem unpolaren Teil in der Doppelschicht eingebettete, globuläre Proteine, die mit ihren polaren Anteilen den beiden Seiten der Doppelschicht zugewandt sind. Sie sind innerhalb der Membran lateral beweglich, zeigen aber keine Tranversaldiffusion (Flip-Flop). Sie bilden die Transportwege für hydrophile Substanzen durch die Membran.

Weitere Ionentransportpumpen konnten in den folgenden Jahren in Säugerzellen identifiziert werden. Es wurde eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum von Muskeln gefunden, die für den Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Muskelzelle heraus verantwortlich ist.<sup>[43]</sup> Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus roten Blutkörperchen, die  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle heraus transportiert,<sup>[44]</sup> sowie eine  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase aus Magenschleimhaut, die intrazelluläres  $\text{H}^+$  gegen  $\text{K}^+$  austauscht und so Magensäure produziert.<sup>[45]</sup> Sie alle haben mit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gemeinsam, daß sie bei der Reaktion mit ATP phosphoryliert werden, und werden deshalb P-Typ-ATPasen genannt. P-Typ-ATPasen wurden auch in Bakterien und Pilzen identifiziert.<sup>[46]</sup>

In den Jahren nach der Identifizierung der Natrium-Kalium-Pumpe beteiligten sich viele Forscher aus vielen

Ländern an der Aufklärung der Struktur des Enzyms und der Reaktionsschritte dieses Transportsystems. Ich kann hier nicht alle erwähnen, aber alle Interessierten seien hingewiesen auf den ausführlichen Übersichtsartikel von I. Glynn aus dem Jahre 1985,<sup>[11]</sup> auf die Berichte der internationalen Kongresse über  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die jedes dritte Jahr und zuletzt 1996 abgehalten wurden,<sup>[47]</sup> auf neueste Übersichten<sup>[48–50]</sup> und auf ein neues Buch von J. D. Robinson: „Moving Questions. A History of Membrane Transport and Bioenergetics“.<sup>[46]</sup>

Noch eine Frage möchte ich, ohne ins Detail zu gehen, anschneiden: Wie ist unsere gegenwärtige Sicht des enzymatischen Kationentransportes?

#### 4. Ein Modell für die Transportreaktion

Das Modell in Abbildung 3 basiert auf dem Albers-Post-Schema, einem Reaktionsschema, bei dem das System nacheinander mit den Kationen reagiert, die Reaktion mit ATP in Gegenwart von  $\text{Na}^+$  zu einer Phosphorylierung führt und die darauf folgende Reaktion mit  $\text{K}^+$  zu einer Dephosphorylierung.

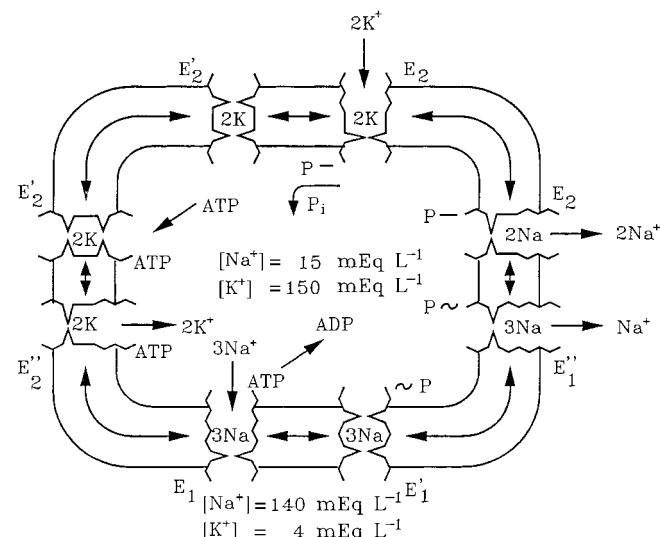


Abb. 3. Der aktive Transport. Erklärungen siehe Text (mit Genehmigung aus Lit. [73]).

Das Transportsystem besteht aus einer Carriereinheit im Innern der Membran und einer ATP-bindenden Einheit auf der cytoplasmatischen Membranseite (Abb. 3). Der Carrier liegt direkt neben einem schmalen Kanal, der sich über die Hälfte oder zwei Drittel der Membran erstreckt und sich zur extrazellulären Seite der Membran hin öffnet<sup>[57, 58]</sup> (in Abb. 3 ist vom Kanal nur die Öffnung nach außen gezeigt). Der Carrier liegt in zwei Konformationen vor:<sup>[51–56, 59–65]</sup>  $E_1$  ist die für Natrium und  $E_2$  die für Kalium hochaffine Form. Jede dieser beiden Konformere kann phosphoryliert<sup>[51–56]</sup> oder nicht phosphoryliert vorliegen,<sup>[59–65]</sup> und zu jedem Hauptkonformer gibt es Subkonformere, die in Abbildung 3 mit einem oder zwei Strichen gekennzeichnet sind. Die Carriereinheit hat

zwei „Tore“, Energiebarrieren, die den Zugang zur Kanalseite und zur cytoplasmatischen Seite öffnen oder schließen können.

In diesem Modell sind, wenn das System in der Konformation  $E_1$  vorliegt und das Tor zur cytoplasmatischen Seite geöffnet und das zur Kanalseite geschlossen ist, drei  $\text{Na}^+$ -Ionen gebunden, zwei davon in Form eines neutralen Komplexes und das dritte als Ion. Das System ist katalytisch aktiv. Die Affinität für ATP ist hoch (der scheinbare  $K_D$ -Wert liegt bei etwa  $0.1 \mu\text{m}$ <sup>[59, 60]</sup>), und mit gebundenem ATP liegt das Enzym phosphoryliert vor<sup>[51–56, 66, 67]</sup> und damit in einer ADP-sensitiven Form mit einer energiereichen Phosphatbindung ( $E'_1 \sim P$ ) vor. Dabei wird die Öffnung zur cytoplasmatischen Seite geschlossen. Die drei  $\text{Na}^+$ -Ionen sind in der Carrier-einheit eingeschlossen.<sup>[68]</sup> Die folgenden zwei Schritte sind Konformationsänderungen und Umlagerungen der Phosphat-bindung von einer energiereichen Bindung ( $E'_1 \sim P$ ) zu einer energiearmen ( $E_2 \sim P$ ),<sup>[51–56, 66, 67]</sup> wodurch ein  $\text{Na}^+$ -Ion aus der  $E'_1 \sim P$ -Bindung<sup>[67]</sup> auf die extrazelluläre Seite der Membran entlassen wird. Durch den Übergang zur  $E_2 \sim P$ -Form wird das Tor für die zwei verbliebenen  $\text{Na}^+$ -Ionen geöffnet, und die Affinität für  $\text{Na}^+$  nimmt ab und die für  $\text{K}^+$  steigt an. Dadurch werden zwei  $\text{Na}^+$ - gegen zwei  $\text{K}^+$ -Ionen aus dem extrazellulären Medium ausgetauscht ( $E_2 \sim P \cdot 2\text{Na} \rightarrow E_2 \sim P \cdot (2\text{K})$ ). Das System  $E_2 \sim P \cdot 2\text{K}$  wird dephosphoryliert, das extrazelluläre Tor schließt sich und die beiden  $\text{K}^+$ -Ionen sind eingeschlossen ( $E'_2 \cdot (2\text{K})$ ).<sup>[69, 70]</sup> Das auf der cytoplasmatischen Seite an  $E'_2 \cdot (2\text{K})$  mit geringer Affinität gebundene ATP (der scheinbare  $K_D$ -Wert beträgt etwa  $0.1 \text{ mm}$ ) erhöht die Geschwindigkeit, mit der sich das cytoplasmatische Tor öffnet, und erniedrigt die Affinität für  $\text{K}^+$  ( $E'_2 \cdot (2\text{K}) \cdot \text{ATP} \rightarrow E''_2 \cdot 2\text{K} \cdot \text{ATP}$ ).<sup>[69]</sup> Die beiden  $\text{K}^+$ -Ionen werden gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus dem Cytoplasma ausgetauscht, und der Kreis schließt sich.

Das Transportsystem ist eine sehr effiziente Pumpe. Es pumpst für jedes zu ADP und  $P_i$  hydrolysierte ATP-Molekül drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle heraus und zwei  $\text{K}^+$ -Ionen hinein und verbraucht dabei 70–85 % der Freien Energie aus der ATP-Hydrolyse.<sup>[50]</sup> Bei den normalen intra- und extrazellulären  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen liegt die Aktivität der Pumpe bei 10–15 % ihrer maximal erreichbaren Aktivität, d.h., die Pumpe hat große Reserven. Bei  $37^\circ\text{C}$  und pH 7.4 katalysiert ein Enzymmolekül etwa 160 Umsetzungen pro Sekunde.

Bei diesem Transport wird eine positive Ladung nach außen verschoben, der Transport ist also elektrogen. Aber wegen der hohen Permeabilität für  $\text{Cl}^-$  steigt das Membranpotential nur um wenige mV. Jede der beiden Konformere  $E_1$  und  $E_2$  scheint zwei negativ geladene Bindungsstellen zu haben, an denen die positiven Ladungen der Kationen neutralisiert werden; wie erwähnt, bindet das  $E_1$ -Konformer ein drittes  $\text{Na}^+$ -Ion in ionischer Form.<sup>[71, 72]</sup>

Um den Transport von Kationen gegen einen elektrochemischen Gradienten an eine chemische Reaktion, die Hydrolyse von ATP zu koppeln, müssen die einzelnen Schritte der katalytischen Reaktion und der Translokationsreaktion sehr eng aneinander gekoppelt sein. Die Veränderung der Affinitäten, das Öffnen und Schließen der Tore sind an einen schrittweisen ATP-Abbau durch Phosphorylierung mit einer energiereichen  $E_1 \sim P$ -Bindung unter Bildung einer energie-

armen  $E_2 \sim P$ -Bindung und schließlich eine Dephosphorylierung gebunden. Die Translokation zerfällt daher in einzelne Schritte, in denen lokale Gradienten gebildet werden, denen entsprechend die Ionen gegen den Gesamtgradienten transportiert werden.

Das Modell ist eine Arbeitshypothese, die einen großen Teil der experimentellen Befunde erklären kann. Aber einige Beobachtungen passen nicht in das Modell. Auch wenn wir viel über die Struktur wissen, bleiben viele Fragen, besonders auf molekularer Ebene, unbeantwortet: Welcher Art sind die Tore, wo und welcher Art sind die Bindungsstellen für die Kationen, wie unterscheidet das System zwischen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  usw.

## 5. Schlußfolgerung

Es mag enttäuschen, daß die 30 Jahre Arbeit seit der Entdeckung, daß die membrangebundene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe identisch ist, noch zu keinem Verständnis der molekularen Grundlage des Transportes geführt haben. Wenn man aber bedenkt, daß 1320 Aminosäuren in einem Volumen von  $60 \times 60 \times 100 \text{ \AA}^3$  zu einer effizienten Maschinerie organisiert sind, die die chemische Energie aus der Hydrolyse von ATP in Arbeit umwandeln und damit Kationen gegen einen elektrochemischen Gradienten transportieren kann und die zwischen so eng verwandten Kationen wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  unterscheiden kann, so verwundert es nicht, daß der Fortschritt recht langsam ist.

Vor 30 Jahren schien es unmöglich, das Enzym zu reinigen oder gar in Lösung zu bringen und in Liposomen zu rekonstituieren. Niemand wagte davon zu träumen, die Sequenz des Enzyms zu kennen, und trotzdem konnte dies und vieles andere mehr erreicht werden.

Eingegangen am 17. April 1998 [A278]  
Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Wien

**Stichwörter:** ATP • Ionentransport • Membranen • Natrium-Kalium-Pumpe • Nobel-Aufsätze

- [1] E. Gorter, F. Grendel, *J. Exp. Med.* **1925**, *41*, 439.
- [2] J. F. Danielli, H. Davson, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1935**, *5*, 495.
- [3] P. J. Boyle, E. F. Conway, *J. Physiol.* **1941**, *100*, 1.
- [4] R. B. Dean, *Biol. Symp.* **1941**, *3*, 331.
- [5] G. Hevesy, *Enzymologia* **1938**, *5*, 138.
- [6] H. H. Ussing, *Physiol. Rev.* **1949**, *29*, 129.
- [7] A. Krogh, *Proc. R. Soc. London B* **1946**, *133*, 140.
- [8] E. J. Conway, *Nature* **1946**, *157*, 715.
- [9] H. H. Ussing, *Nature* **1947**, *160*, 262.
- [10] T. Rosenberg, *Acta Chem. Scand.* **1948**, *2*, 14.
- [11] I. M. Glynn in *The Enzymes of Biological Membranes*, Vol. 3 (Hrsg.: A. N. Martonosi), New York, Plenum **1985**, S. 28.
- [12] J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1000*, 435.
- [13] J. C. Skou in *Membrane Transport: People and Ideas* (Hrsg.: D. Tosteson), American Physiological Society **1989**, S. 155.
- [14] „Lokalanestetika“: J. C. Skou, Dissertation, Universitetsforlaget Aarhus, **1954**.
- [15] J. C. Skou, *J. Pharm. Pharmacol.* **1961**, *13*, 204.
- [16] H. H. Meyer, *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1899**, *42*, 109.

- [17] E. Overton, *Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie*, Jena, Fischer, **1901**.
- [18] N. K. Adam, *The Physics and Chemistry of Surfaces*, London, Oxford University Press, **1941**.
- [19] A. L. Hodgkin, B. Katz, *J. Physiol. (London)* **1949**, *108*, 37.
- [20] B. Libet, *Fed. Proc.* **1948**, *7*, 72.
- [21] A. L. Hodgkin, R. D. Keynes, *J. Physiol. (London)* **1955**, *128*, 28.
- [22] G. Gardos, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **1954**, *6*, 191.
- [23] A. L. Hodgkin, R. D. Keynes, *J. Physiol. (London)* **1956**, *131*, 592.
- [24] P. C. Caldwell, R. D. Keynes, *J. Physiol. (London)* **1957**, *137*, 12P.
- [25] R. D. Keynes in *Metabolism of the Nervous System* (Hrsg.: D. Richter), Pergamon, London, **1957**, S. 159.
- [26] J. C. Skou in *Metabolism of the Nervous System* (Hrsg.: D. Richter), Pergamon, London, **1957**, S. 173.
- [27] J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *23*, 394.
- [28] R. L. Post, P. Jolly, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *25*, 118.
- [29] H. J. Schatzmann, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* **1953**, *11*, 346.
- [30] J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *42*, 6.
- [31] J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, *58*, 314.
- [32] M. Esmann, J. C. Skou, C. Christiansen, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *567*, 410.
- [33] R. L. Post, C. R. Merritt, C. R. Kinsolving, C. D. Albright, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1796.
- [34] J. C. Skou, *Physiol. Rev.* **1965**, *45*, 596.
- [35] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol. (London)* **1952**, *116*, 449.
- [36] P. Mitchell, *Biochem. Soc. Symp.* **1963**, *22*, 142.
- [37] R. K. Crane, *Comp. Biochem.* **1983**, *35*, 43.
- [38] H. Kromphardt, H. Grobecker, K. Ring, E. Heinz, *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *74*, 549.
- [39] E. K. Hoffmann, L. O. Simonsen, *Physiol. Rev.* **1989**, *69*, 315.
- [40] B. J. R. Pitts, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6232.
- [41] J. D. Robertson, *Biochem. Soc. Symp.* **1959**, *16*, 3.
- [42] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720.
- [43] W. Hasselbach, M. Makinose, *Biochem. Z.* **1961**, *333*, 518.
- [44] H. J. Schatzmann, *Experientia* **1966**, *22*, 364.
- [45] B. Stewart, B. Wallmark, G. Sachs, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 2682.
- [46] J. D. Robinson, *Moving Questions. A history of Membrane Transport and Bioenergetics*, American Physiological Society, NY **1997**.
- [47] *Na/K-ATPase and Related Transport ATPases: Structure, Mechanism and Regulation*, Vol. 834 (Hrsg.: L. A. Beaugé, D. C. Gadsby, P. J. Garrahan), Annals New York Academy Science, New York, **1997**.
- [48] P. L. Jørgensen in *Molecular Aspects of Transport Proteins* (Hrsg.: J. J. H. M. M. De Pont), Elsevier Service Publisher, **1992**, S. 1.
- [49] I. M. Glynn, *J. Physiol. (London)* **1993**, *462*, 1.
- [50] F. Cornelius, *Biomembranes* **1996**, *5*, 133.
- [51] R. W. Albers, *Annu. Rev. Biochem.* **1967**, *36*, 727.
- [52] R. W. Albers, S. Fahn, G. J. Koval, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1963**, *50*, 474.
- [53] S. Fahn, G. J. Koval, R. W. Albers, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 1993.
- [54] R. L. Post, S. Kume, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 6993.
- [55] R. L. Post, S. Kume, T. Tobin, B. Orcutt, A. K. Sen, *J. Gen. Physiol.* **1969**, *54*, 306S.
- [56] R. L. Post, A. K. Sen, A. S. Rosenthal, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 1437.
- [57] P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *552*, 143.
- [58] D. C. Gadsby, R. F. Rakowsky, P. De Weer, *Science* **1993**, *260*, 100.
- [59] J. G. Nørby, J. Jensen, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *233*, 104.
- [60] C. Hegyvary, R. L. Post, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 5234.
- [61] P. L. Jørgensen, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *401*, 399.
- [62] S. J. D. Karlsh, D. W. Yates, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *527*, 115.
- [63] S. J. D. Karlsh, D. W. Yates, I. M. Glynn, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *525*, 252.
- [64] J. C. Skou, M. Esmann, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *647*, 232.
- [65] S. J. D. Karlsh, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1980**, *12*, 111.
- [66] J. G. Nørby, I. Klodos, N. O. Christiansen, *J. Gen. Physiol.* **1983**, *82*, 725.
- [67] S. Yoda, A. Yoda, *J. Biol. Chem.* **1986**, *26*, 1147.
- [68] I. M. Glynn, Y. Hara, D. E. Richards, *J. Physiol. (London)* **1984**, *351*, 531.
- [69] R. L. Post, C. Hegyvary, S. Kume, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 6530.
- [70] L. A. Beaugé, I. M. Glynn, *Nature* **1979**, *280*, 510.
- [71] M. Nakao, D. C. Gadsby, *Nature* **1986**, *323*, 628.
- [72] R. Goldschleger, S. J. D. Karlsh, A. Raphaeli, W. D. Stein, *J. Physiol. (London)* **1987**, *387*, 331.
- [73] J. C. Skou, *News Physiol. Sci.* **1992**, *7*, 95.