

Na⁺,K⁺-pumpen vedbliver at overraske

Professortiltrædelsesforelæsning

Professor Bente Vilsen

Aarhus Universitet, Institut for Fysiologi og Biofysik

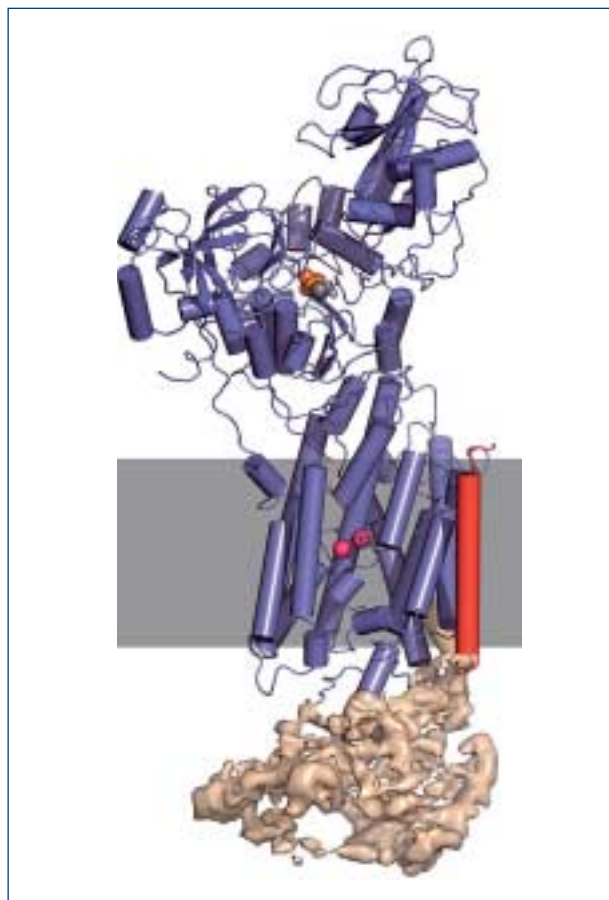
Na⁺,K⁺-pumpen (Na⁺,K⁺-ATPase) er en membranbundet »nanomotor«, der transporterer tre Na⁺-ioner ud og to K⁺-ioner ind i cellen for hvert ATP-molekyle, der spaltes som energikilde. Den aktive iontransport, som udføres af Na⁺,K⁺-ATPasen, udgør grundlaget for en række uundværlige celle- og vævsfunktioner. Således er koncentrationsgradienterne for Na⁺ og K⁺ skabt af Na⁺,K⁺-ATPasen nødvendige for elektrisk signalering via aktionspotentialer i nerver og muskler, ligesom det også er velkendt, at Na⁺-gradienten driver sekundær aktiv transport af en række andre ioner (bl.a. Ca²⁺, H⁺, I⁻ og fosfat), neurotransmittere og aminosyrer (bl.a. serotonin, dopamin og glutamat), sukkerstoffer og lægemidler. I nyrens epitelceller er Na⁺,K⁺-ATPasen den drivende kraft for den Na⁺-reabsorption, der bestemmer hele organismens Na⁺-homøostase og dermed blodtrykket. Aktiviteten af Na⁺,K⁺-pumpen reguleres foruden af Na⁺- og K⁺-koncentrationerne af en række hormoner og hæmmes af hjerteglykosider (digitalis). Desuden er Na⁺,K⁺-pumpen i de senere år blevet tillagt en rolle som receptor i forbindelse med signaleringskaskader, der er uafhængige af transportaktiviteten.

Den 13. december 2007 markerede Nature 50-året for *Jens Chr. Skous* første publikation om Na⁺,K⁺-ATPasen [1] og 10-året for hans modtagelse af nobelprisen ved at pryde forsiden med molekülstrukturen af Na⁺,K⁺-ATPase-proteinet beskrevet i en artikel inde i bladet af forskere ved Institut for Fysiologi og Biofysik og Molekylærbiologisk Institut ved Aarhus Universitet [2]. Selv om Na⁺,K⁺-ATPasen har været udforsket i fem årtier, er der stadigvæk utrolig meget, vi ikke forstår, og det, at vi nu kender proteinstrukturen (**Figur 1**), er et betydeligt fremskridt, der åbner nye muligheder for indsigt i Na⁺,K⁺-ATPasens mekanisme, regulering og betydning for sygdom.

Vores viden om Na⁺,K⁺-ATPasen har udviklet sig trinvist, først med *Skous* opdagelse af den Na⁺- og K⁺-aktiverede ATPase-aktivitet efterfulgt af beskrivelsen af enzymcyklus (Post-Albers-skemaet) med forekomsten af et såkaldt okkluderet intermediat, hvorfra K⁺-ionerne ikke kan dissociere uden en forudgående konformationsændring i proteinet, og i 1980'erne bestemmelse af aminosyresekvensen ved cDNA-kloning. De molekylærbiologiske teknikker muliggjorde også undersøgelse af de enkelte aminosyrers funktionelle betydning ved mutationsanalyse (*site-directed mutagenesis*). Ved

overekspression af mutant-cDNA i cellekultur efterfulgt af funktionelle undersøgelser af mutantenzymet [3] blev det muligt at identificere en række aminosyrer, der er afgørende for binding af Na⁺- og K⁺-ioner og for de konformationsændringer, der finder sted i Na⁺,K⁺-ATPase-proteinet i forbindelse med transportprocessen.

Det første hint om pumpens dimensioner fik man allerede for ca. 30 år siden baseret på elektronmikroskopi af membranfragmenter [4]. Både dengang og nu var forudsætningen for strukturanalysen, at man fra nyrens ydre medulla kunne opnå en meget ren præparation af Na⁺,K⁺-ATPasen [5]. At det nu endelig er lykkedes at komme til at »se« pumpemolekylets



Figur 1. Molekülstrukturen af Na⁺,K⁺-pumpen beskrevet i [2]. Billedet er fremstillet på grundlag af atomkoordinater deponeret i Protein Data Bank med koden 3B8E. α -kæden er vist i blå, β -kæden i lysebrun og γ -kæden i rød. De to kaliumioner er vist som lilla kugler. Fosfatanalogen i det katalytiske site er orange. Pumpens transmembrane områder svarende til $\alpha\beta\gamma$ -kæderne er placeret på en grå baggrund, der angiver membranen.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

bestanddele svarende til en opløsning så høj som 3,5 Å [2] skyldes, at det har været muligt at definere omstændigheder, hvorunder detergentekstraheret oprenset pumpeprotein holder sig nativt i ugevis og krystalliserer, så der kan udføres røntgendiffraktionsundersøgelser på præparatet. Principperne er bl.a. baseret på erfaring indhentet i studier, hvor det blev påvist, at K⁺-ionerne forbliver bundet i en stabilt okkluderet form efter detergentekstraktion [6].

Na⁺,K⁺-pumpe-proteinet er opbygget af en såkaldt α -kæde (blå i Figur 1), der indeholder bindingsstederne for ioner og ATP, og en β -kæde (lysebrun i Figur 1), der stabiliserer α -kæden og guider den ud til plasmamembranen, samt en γ -kæde, der tilhører familien af FXYD-proteiner, som i de senere år har vist sig at være vigtige for den vævsspecifikke regulering af Na⁺,K⁺-pumperne (rød i Figur 1). Det katalytiske sted, der er repræsenteret ved fosfatanalogen MgF₄⁻² (orange i Figur 1), er lokaliseret i det cytoplasmatiske område af α -kæden. Strukturen afslører endvidere, at de to okkluderede K⁺-ioner er bundet tæt ved hinanden i en hulhed midt i α -kædens membranområde (pinkfarvede kugler i Figur 1). α -kæden har ti transmembrane helices M1-M10, hvoraf M4, M5 og M6 er direkte involveret i bindingen af K⁺-ionerne via aminosyresidekæder, der tidligere i mutationsstudier er påvist at være vigtige for K⁺-interaktionen. α -helix-strukturen er brudt i midten af M4 og M6, hvorved der opstår plads til ionerne. Når proteinstrukturen sammenholdes med resultaterne af mutationsstudier [7], er det muligt at nå til en forståelse af den mekanisme, hvorved indgangen til K⁺-okklusionshulen lukkes, når K⁺ bindes fra den ekstracellulære side, idet det ser ud til, at en glutamatsidekæde i M4 virker som et *gate*, der stabiliseres i den lukkede form ved interaktion med en leucinsidekæde i M1.

En overraskende detalje i strukturen er placeringen af den C-terminale ende af α -kæden (»halen«) i en lomme mellem β -kæden og de transmembrane segmenter M5, M7, M8 og M10 af α -kæden, hvor den danner hydrogenbindinger med M5, der er involveret i Na⁺-binding [3]. Denne tilsyneladende strategiske placering førte til, at den C-terminale hales betydning blev undersøgt ved genteknologisk at fjerne halen og studere de funktionelle virkninger heraf [2]. Forsøgene viste, at Na⁺-bindingen er betydelig påvirket i den haleløse pumpe (bindingsaffiniteten nedsat så meget som 26 gange). Dette peger på, at halen har en hidtil ukendt rolle i reguleringen af Na⁺-transporten, som måske styres af signaler, der påvirker halens position, såsom ændringer i membranpotentiale, proteinkinase A-medieret fosforylering af en nærliggende serin OH-gruppe, og/eller interaktion med FXYD-proteiner. Disse resultater sammenholdt med tidligere mutationsanalyser i M5, M6, M8 og M9 førte også til en hypotese for, hvor den tredje Na⁺-ion er bundet. De to øvrige af de tre Na⁺-ioner, der transporteres i en pumpecyklus, er sandsynligvis bundet på de samme steder som K⁺-ionerne i en konsekutiv transportmekanisme, hvor de transporteres ud af cellen, før K⁺-optages [2].

Et andet forholdsvis nyt aspekt af Na⁺,K⁺-pumpen er dens forbindelse til dominant arvelige neurologiske sygdomme. Der findes i det humane genom fire forskellige Na⁺,K⁺-ATPase-gener, der koder for forskellige α -kæde-isoformer med høj aminosyresekvenshomologi, og to af disse, $\alpha 2$ og $\alpha 3$, findes udtrykt i hjernen. Mutationer i $\alpha 2$ -genet er årsag til den arvelige migrænesubtype *familial hemiplegic migraine* (FHM) type 2 (OMIM 602481), som i nogle tilfælde er kombineret med epileptiske anfald [8]. Mutationer i $\alpha 3$ -genet forårsager den arvelige form for parkinsonisme *familial rapid-onset dystonia parkinsonism* (FRDP) (OMIM 128235) [9]. Der er på nuværende tidspunkt fundet mere end 30 forskellige $\alpha 2$ -mutationer hos FHM-patienter, mens antallet af kendte FRDP-mutationer er noget mindre. For begge sygdomme kan den dominante arvegang forklares ved haploinsufficiens, dvs. at den mængde normalt fungerende Na⁺,K⁺-ATPase, der udtrykkes som følge af tilstedeværelsen af et normalt allel sammen med det muterede allel, ikke er tilstrækkelig til at sikre en normal funktion. Det er dog også muligt, at der forekommer dominant negativ påvirkning fra de muterede proteiner.

De patofysiologiske mekanismer, der ligger til grund for udviklingen af henholdsvis FHM og FRDP er uopklarede. Da $\alpha 2$ -isoformen udtrykkes i gliaceller, er der til forståelse af forbindelsen mellem Na⁺,K⁺-ATPase og FHM blevet fremsat den hypotese, at FHM er associeret med en svækket *clearance* af hjernens K⁺-indhold via nedsat gliacellefunktion. Neuronernes excitabilitet stiger, hvis den ekstracellulære K⁺-koncentration øges, og membranen derved depolariseres. I princippet kan denne situation opstå, hvis den maksimale Na⁺,K⁺-pumpe-aktivitet i gliaceller reduceres på grund af nedsat enzymekspression eller nedsat katalytisk omsætningshastighed. Dette ville ramme både Na⁺- og K⁺-transport, mens en specifik virkning på K⁺ kunne være en følge af påvirkning af K⁺-affiniteten uden samtidig nedsættelse af den maksimale Na⁺,K⁺-pumpe-aktivitet. En anden mulighed er, at FHM opstår som følge af en ændret intracellulær Na⁺-koncentration og deraf følgende ændring i den intracellulære Ca²⁺-koncentration via Na⁺/Ca²⁺-*exchange*-systemet med konsekvenser for de signaleringskaskader, der udløses af Ca²⁺.

Der mangler i øjeblikket overbevisende hypoteser for mekanismen bag FRDP. $\alpha 3$ -isoformen udtrykkes i neuronale celler. Flere af FRDP-mutationerne er fundet at reducere Na⁺-affiniteten på cytoplasmasiden, nogle direkte via en påvirkning af den Na⁺-bundne form af enzymet og andre indirekte via en ændring af konformationslægeøgten mellem den Na⁺- og den K⁺-bundne form [10]. Man kan derfor forestille sig, at den intracellulære Na⁺-koncentration er steget i de neuronale celler, hvor mutanten udtrykkes. Spørgsmålet er, om denne funktionsændring repræsenterer en generel mekanisme for FRDP, således at andre FRDP-mutationer også må forventes at påvirke Na⁺-affiniteten. Ændringer i den intracellulære Na⁺-koncentration kan som beskrevet ovenfor medføre se-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

kundære ændringer i Ca^{2+} -koncentrationen. Derudover kan man også forestille sig, at den Na^+ -gradient-drevne optagelse af neurotransmitter (f.eks. dopamin) er påvirket. Et vigtigt fremtidigt mål for forskningen inden for dette område er at kortlægge sygdomsmutationernes virkninger både på det molekylære niveau med udgangspunkt i den nu kendte struktur af Na^+, K^+ -pumpen og funktionelt i cellekultur og i dyremodeler, hvor mutationerne indføres transgent.

Korrespondance: Bente Vilsen, Institut for Fysiologi og Biofysik, Aarhus Universitet, DK-8000 Århus C. E-mail: bv@fi.au.dk

Antaget: 17. marts 2008

Interessekonflikter: Ingen

Artiklen er skrevet på basis af forfatterens professortiltrædelsesforelæsning for at belyse aktive frontlinjeforskningsområder i Danmark.

Litteratur

1. Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 1957;1000:439-46.
2. Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 2007;450:1043-50.
3. Vilsen B. Mutant Glu781Ala 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* 1995;34:1455-63.
4. Skrivers E, Maunsbach AB, Jørgensen PL. Formation of two-dimensional crystals in pure membrane-bound Na^+, K^+ -ATPase. *FEBS Lett* 1981;131:219-22.
5. Jørgensen PL. Purification and characterization of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. III. Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by SDS. *Biochim Biophys Acta* 1974;356:36-52.
6. Vilsen B, Andersen JP, Petersen J et al. Occlusion of $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ in membrane-bound and soluble protomeric $\alpha\beta$ -units of $\text{Na}, \text{K}\text{-ATPase}$. *J Biol Chem* 1987;262:10511-7.
7. Einholm AP, Andersen JP, Vilsen B. Importance of Leu⁹⁹ in transmembrane segment M1 of the Na^+, K^+ -ATPase in the binding and occlusion of K^+ . *J Biol Chem* 2007;282:23854-66.
8. De Fusco M, Marconi R, Silvestri L et al. Haploinsufficiency of *ATP1A2* encoding the Na^+/K^+ pump $\alpha 2$ subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 2003;33:192-6.
9. De Carvalho Aguiar P, Sweadner KJ, Penniston JT et al. Mutations in the Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 3$ gene *ATP1A3* are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron* 2004;43:169-75.
10. Rodacker V, Toustrup-Jensen M, Vilsen B. Mutations Phe⁷⁸⁵Leu and Thr⁹¹⁸Met in Na^+, K^+ -ATPase, associated with familial rapid-onset dystonia parkinsonism, interfere with Na^+ interaction by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 2006;281:18539-48.

Indlæringskurver – vildledning eller vejledning?

Stud.med. Lars Peter Holst Andersen,
reservelæge Ismail Gögenur & professor Jacob Rosenberg

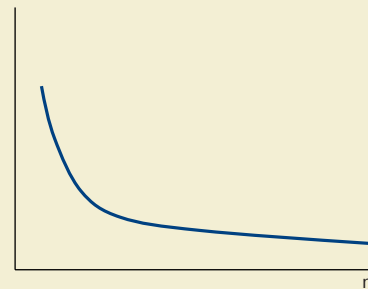
Gentofte Hospital, Kirurgisk Gastroenterologisk Afdeling D

Begrænsede resurser, fortravlet arbejdsdag, fokus på patient-sikkerhed og komplekse psykomotoriske færdigheder stiller krav til en optimal indlæringsproces ved indlæringen af nye teknikker og procedurer. Indlæringskurver angiver erfaringens betydning for et bestemt udfald og anvendes som et objektivi mål for udviklingen af lægens færdigheder [1]. Indlæring er en kompleks proces, som kun er delvist forstået, men menes at være bestemt af innate egenskaber, omgivelser og vedvarende udfordring af egne færdigheder [2].

Dette sammenspil mellem omgivelser og individ beskrives ved læringskurvens forløb, som netop af denne grund kan antage adskillige former [2]. Et eksempel er det negativt accelererede indlæringsforløb med en kurve, som består af to faser: en tidlig fase med stejl hældning, hvor hver ny gentagelse bevirker betydelig forbedring af udfaldet, og en senere fladere del af kurven, hvor den øgede erfaring giver en mindre forbedring af den udførte opgave (Figur 1). Til sidst vil kurven flade ud, og ved dette plateau defineres et teoretisk indlæringsstoppunkt, hvor den øgede erfaring ikke medfører forbedrede operationsresultater. Andre eksempler er kurver med positivt

accelereret forløb, som f.eks. kunne vise den gradvise forbedring i antallet af udførte opgaver på tid hos testpersonen i et simulatortræningsforløb, og en S-formet kurve med flere accelererede indlæringsforløb, f.eks. som følge af konstruktiv feedback. Færdigheder skal vedvarende vedligeholdes, i modsat fald ses en negativ læringsituation, hvor læringskurven ikke følger tidligere performance. Omvendt vil »eksperten« ikke være underlagt den sene flade del af indlæringskurven, men vil være i stand til »lineært« at forbedre sine færdigheder [2]. Det skal dog nævnes, at en negativ indlæringsituation ikke må forveksles med negativ indlæring, som i denne

Komplikationsrate,
operationstid,
indlæggelsesdage
osv.



Figur 1. Eksempel på en negativt accelereret indlæringskurve. På Y-aksen ses eksempler på forskellige effektparametre. n = antal operationer.