

Jens Christian Skou og Na,K-ATPasen

AF FLEMMING CORNELIUS

I oktober 1997 modtog Jens Christian Skou (f. 1918) Nobelprisen i kemi ved en ceremoni i Stockholm (Figur 1). Årsagen skal søges 40 år tilbage i 1957, hvor han i tidskriftet *Biochimica et Biophysica Acta* [1] publicerede opdagelsen og karakteriseringen af Na,K-ATPasen som ansvarlig for den aktive transport af Na⁺ og K⁺ i cellen. Publiceringen af Skous opdagelse vakte ikke umiddelbart synderlig opmærksomhed i den videnskabelige verden, men i dag ved vi, at Na,K-ATPasen er af livsvigtig betydning for dyrecellens overlevelse.

JENS CHRISTIAN SKOU FÅR NOBELPRISEN

Som mange store opdagelser brød opdagelsen af Na,K-ATPasen med den gængse opfattelse af mekanismen for iontransport over cellemembraner. Hidtil havde man haft den overbevisning, at cellemembranen var opbygget som et bimolekylært lipidlag med proteiner udelukkende begrænset til overfladen af de polære phospholipidmolekyler, den såkaldte Danielli-Davson model (1935), som senere udbyggedes af Robertsons *unit membrane model* i 1966. Så længe efter Skous opdagelse mente man ikke, at proteiner kunne række gennem cellemembranens lipidlag. Det var



Figur 1. Jens Christian Skou får Nobelprisen.

Jens Christian Skou (til venstre) får overrakt Nobelprisen af Kong Carl XVI Gustaf (til højre) for Det Kongelige Svenske Videnskabernes Akademi.

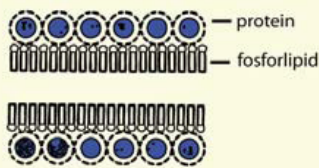
Copyright © Pica Pressfoto AB 1997, S-105 17 Stockholm, Sweden. Foto: Anders Wiklund

først i 1972, at Singer og Nicolson publicerede deres *Fluid mosaik membran model*, hvor de viste, at de såkaldte integrale membranproteiner krydser lipidbilaget, se Figur 2. Skous postulat var, at et protein i cellemembranen sørgede for den vektorielle transport af ioner over cellemembranen, og at energien hertil tilvejebringes ved en hydrolyse af den højenergetiske phosphatester ATP. Proteinet fungerer derved både som et transportprotein, der fysisk flytter ionerne, og som et

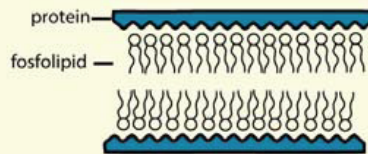
enzym, der spalter ATP. Heraf benævnelser af proteinet som enten *Na-pumpen* eller Na,K-ATPasen. Faktisk besøgte Skou i slutningen af 50'erne Robertson og fortalte om sin opdagelse, men Robertsons kommentar var blot, at han ikke kunne se protein inde i membranen i mikroskopet.

Da Det Medicinske Fakultet ved Aarhus Universitet erfarede, at Nobelprisen for 1997 i kemi ville tilfalde professor ved Biofysisk Institut, Jens Christian Skou, og at Nobelkomiteen ville meddele Skou dette ved en telefonopringning til Instituttet, havde dekanen for det Medicinske Fakultet, Arvid B. Maunsbach, og Torben Clausen, professor i Fysiologi, stort besvær med at holde Skou inde på sit kontor med en undskyldning om, at de ville diskutere sammensætningen af et bedømmelsesudvalg. Lidt før kl. 3 kunne de ikke længere holde på Skou, der meget gerne skulle drikke te med sin kone, Ellen Margrethe. Da Skou og dekanen ivrigt diskuterende nåede ud på parkeringspladsen foran Instituttet og blev mødt af et bud med en kæmpe buket blomster fra professor Anita Aperia, Karolinska Institutet, Stockholm, som havde forbindelse til Nobelkomiteen, begyndte der at gå en prås op for Skou, og Arvid fik ham overtalt til at vende tilbage til sit kontor for at afvente telefonopringningen. Dér havde

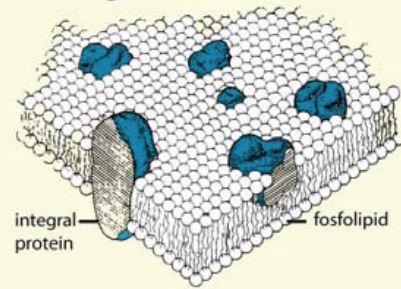
a. Danielli and Davson 1935



b. Robertson 1966



c. Singer and Nicolson 1972



Figur 2. Membranmodeller.

De fremherskende membranmodeller fra Danielli and Davson (1935), over Robertsons unit membrane (1966), til Singer og Nicolson's fluid-mosaik membrane (1972). Først i 1972 erkendte man, at protein måtte spænde tværs over membranen, noget Skou anså som en forudsætning for den aktive transport af Na^+ og K^+ allerede i 1957.

telefonen netop ringet, og da jeg, som have holdt vagt på kontoret i mellemtiden, tog telefonen, spurgte en herre på svensk, om professor Skou var at træffe. Så da Skou vendte tilbage, kunne jeg række telefonen videre til Skou, der noget betuttet modtog beskeden med ordene: "Ku' I da ikke have givet den til en yngre person?". Vestjysk beskedenhed!

Betydningen af Skous opdagelse er vidtrækkende for vores forståelse af, hvordan basale mekanismer på det cellulære niveau er grundlaget for dyrelivets opståen og opretholdelse. Dyrecellen har nemlig et vitalt problem: da cellemembranen ikke kan modstå et overtryk i cellen, men samtidig er fyldt med makromolekyler, der er impermeable og som ved fysiologisk pH er negativt ladede, vil de permeable ioner tendere mod en såkaldt Donnan-ligevægt. Dette betyder, at der opstår et overskud af molekyler inde i cellen i forhold til ekstracellulært, og vand træn-

ger som følge af osmose ind i cellen, der svulmer og sprænges. Planteceller og bakterier overlever ved uden på cellemembranen at have en tyk cellevæg af cellulose, der kan modstå det overtryk, der skabes, men hvordan overlever dyrecellen? Man vidste i 40'erne, at dyrecellen overlever denne osmotiske udfordring ved at have en lav intracellulær Na^+ -koncentration, og især den irske fysiolog Conway støttede den teori, at dyrecellens plasmamembran var impermeabel for Na^+ . Den anden teori fremførtes af R.B. Dean, der i 1941 konkluderede: "the muscle can actively move potassium and 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". Store danske fysiologer som August Krogh og Hans H. Ussing støttede Deans koncept om aktiv

transport, og i slutningen af 40'erne vandt teorien om aktiv iontransport overhånd. Skou havde med sin opdagelse af Na,K-ATPase fundet den molekylære baggrund for Deans hypotese om den aktive Na^+-K^+ -transport. Den længevarende disput om årsagen til opretholdelsen af den lave Na^+ -koncentration i dyrecellen havde endelig fundet sin fysiologiske forklaring, men herom senere.

PÅ VEJ MOD OPDAGELSEN AF Na,K-ATPase

Jens Christian Skou blev født 1918 i Lemvig og valgte efter gymnasiet lidt tilfældigt at studere til læge. Dette foregik dengang alene ved Københavns Universitet, og i 1944 tog han sin medicinske embedseksamen. Hans drøm var at gøre karriere som kirurg, en interesse han fik under sin ansættelse på Hjørring Sygehus 1944-46. Her fik han tillige interessen i virkemåden af lokalbedøvende stoffer som

emne for en disputats. I 1947 stoppede han i klinikken og fik ansættelse som amanuensis ved Fysiologisk Institut, Aarhus Universitet, i den hensigt at færdiggøre undersøgelserne og skrive sin disputats om lokal-anæstetika. Fysiologisk Institut var på det tidspunkt i sin spæde begyndelse med få ansatte, stor undervisningsbyrde og uden det store inspirerende videnskabelige miljø. Skous eksperimentelle tilgang var at undersøge, hvordan lokal-anæstetika indvirkede på overfladetrykket af lipidmonolag. Han havde læst om Langmuirs undersøgelser af monolag af lipider spredt på en vandoverflade og brugte hans forsøgsopstilling til måling af overfladetrykket, når han tilsatte forskellige lokal-anæstetika til vandfasen. Han fandt, at lokal-anæstetika øgede overfladetrykket i lipidmonolaget, idet de vandrede op i lipidlaget, når de blev tilsat til vandfasen, og at denne stigning i overfladetrykket var positivt korreleret med den anæstetiske effekt. I 1954 forsvarede han med held sin disputats *Lokal-anæstetika* for den medicinske doktorgrad.

I 1952 havde to engelske fysiologer, Hodgkin og Huxley (Nobelpris i fysiologi 1963), publiceret deres undersøgelser af ionstrømme over kæmpeaxoner fra blæksprutter. De beskrev heri 3 forskellige komponenter af ion-strømme, som de benævnte Na^+ -, K^+ -, og lækstrømme. Under depolariseringen af nervecellemembranen, der udløser nerveimpulsen, øges Na^+ -strømmen ind i ner-

vecellen. Dette var før man kendte eksistensen af de membranproteiner, vi i dag kender som *ionkanaler*, dvs. membranproteiner, der virker som makromolekylære porer for de vandopløselige ioner. Skou mente ikke, at lokal-anæstetikas virkemåde kunne være på selve lipiderne, men måtte skyldes en påvirkning af konformationen af proteiner i nervemembranen, som påvirkede Na^+ -permeabiliteten. Han søgte derfor efter lipidopløselige proteiner med stor aktivitet, som han kunne tilsætte sine lipidmonolag for at se, om lokal-anæstetika ændrede proteinerne's aktivitet.

Han anså acetylcholinesterase som en god mulighed. Han udvirkede et besøg hos professor Nachmansohn, Columbia University, New York, som fremstillede acetylcholinesterase fra elektriske ål. Om sommeren var han imidlertid på den marinbiologiske station i Woods Hole nær Boston, så Skou besøgte ham dér for senere at lære fremstillingen af acetylcholinesterase i New York. I Woods Hole fandt Skou det internationale videnskabelige miljø, han savnede ved Fysiologisk Institut, men hvad skulle han lave der? Tilfældigt læste han en artikel, der beskrev tilstedeværelsen af en Mg -ATPase, et ATP-spaltende enzym, i kæmpeaxoner fra blæksprutter og tænkte, om denne kunne bruges i hans monolageksperimenter. I New York lærte han at præparere acetylcholinesterase. Problemet var imidlertid, at der ingen

kæmpeaxoner fra blæksprutter var i Aarhus. I stedet besluttede han at forsøge med nerver fra ben af krabber, der i lighed med kæmpeaxoner er umyelinerede. En ulempe var dog de meget tynde nervetråde fra krabben; hvor kæmpeaxonet har en diameter op til 1 mm, er krabbenerven sytråds-tynd. Så der skulle masser af krabber til for at få nok protein til at kunne måle en eventuel ATPase-aktivitet. Den første udfordring var, hvordan man skulle aflive alle de krabber efter præpareringen. Løsningen blev kogning. Måske havde han spist de berømte hummere i Boston, men nu spredte sig en stank på Institutet, som ikke gjorde Skou populær. Efter udpræparering af nerverne fra krabbens ben, blev vævet homogeniseret og membranfragmenterne isoleret ved differentialcentrifugering. Her var heldet med Skou, skulle det senere vise sig, for når man præparerer membranfragmenter fra mange andre væv, dannes små membranvesikler, hvor den ene side af systemet (intracellulære eller ekstracellulære) derfor ikke er eksponeret til mediet. Skou kunne nu påvise, at membranfragmenterne isoleret fra krabbenerver indeholdt en Mg^{2+} -aktiveret ATPase (altså kunne hydrolysere ATP), og han kunne måle den frigjorte mængde uorganiske phosphat. Målingerne var imidlertid meget ureproducerbare, nogle gange fik han en stor aktivitet, andre gange en lille aktivitet, når han målte på den samme mængde membranmateriale.

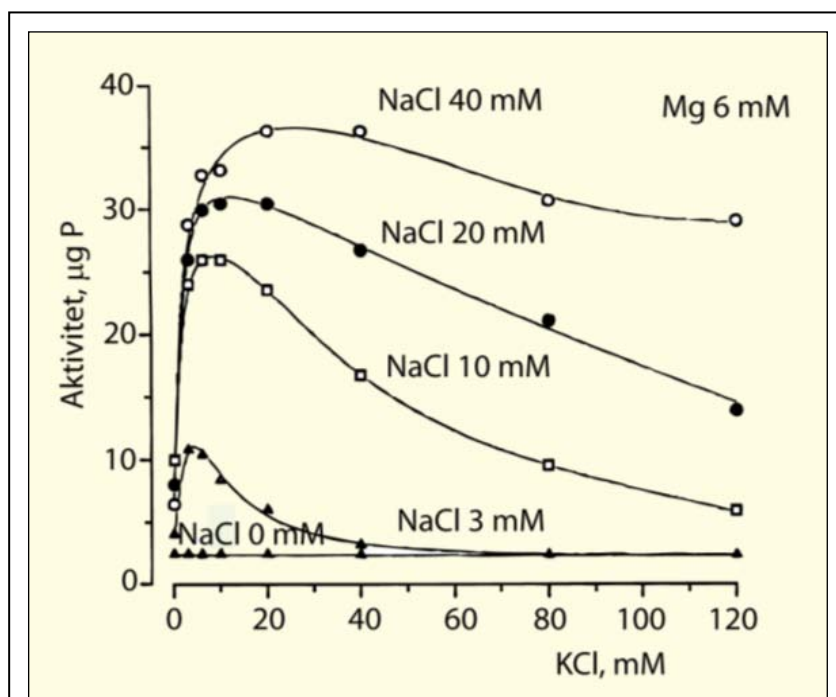
Forskere er af natur nysgerrige, Skou er det i udpræget grad. Han ville finde årsagen og kæmpede med problemet i mange måneder. Til sidst fandt han årsagen. Det ATP, han benyttede, var et uopløseligt bariumsalt, som han omdannede til enten et K^+ -salt eller et Na^+ -salt af ATP, der var vandopløselige, en forskel han anså for at være uden betydning. Når han havde membranerne i en Na^+ -holdig opløsning, fik han en større aktivitet med K^+ -saltet af ATP end med Na^+ -saltet. Han konkluderede, at enzymet behøvede en kombination af Na^+ og K^+ for at kunne aktiveres. Skou startede nu en systematisk undersøgelse af denne kombinerede kationeffekt, og resultaterne publicerede han i 1957 i en artikel under titlen *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves* [1]. Heri foreslår Skou, at enzymet måtte være involveret i den aktive transport af Na^+ over cellemembranen. En mere provokerende titel, hvor ord som aktiv transport, Na,K-ATPase eller Na^+ -pumpe havde indgået, ville nok have skabt større opmærksomhed.

Figur 3 er reproduceret fra Skous originale 1957-artikel. Her ses, at uden Na^+ i mediet sker der ingen aktivering af aktiviteten med K^+ (nederste vandrette kurve), men med øget Na^+ -koncentration fås en større og større K^+ -aktivering. Ved højere K^+ -koncentrationer hæmmes enzymet. Skou var en nybegynder indenfor feltet af aktiv transport og var ikke helt

opmærksom på vigtigheden af sin opdagelse. F.eks. vidste han ikke, at hjerteglycosidet ouabain var vist at være en specifik hæmmer af aktiv transport [2], men det vidste Robert Post fra Vanderbilt University, Nashville, som arbejdede med aktiv transport i røde blodlegemer, og som havde vist, at transportstøkiometrien for Na^+ -transporten ud af cellen og K^+ -transporten ind i cellen var 3 til 2 [3]. Efter et møde med Post, telefonerede Skou hjem til laboratoriet og bad laboranten skaffe ouabain og prøve effekten på krabbenner. Det hæmmede! Fra da af var Skous forskning centret om Na,K-ATPasen, og han begyndte at bruge pattedyrpræparater såsom svinenyrer

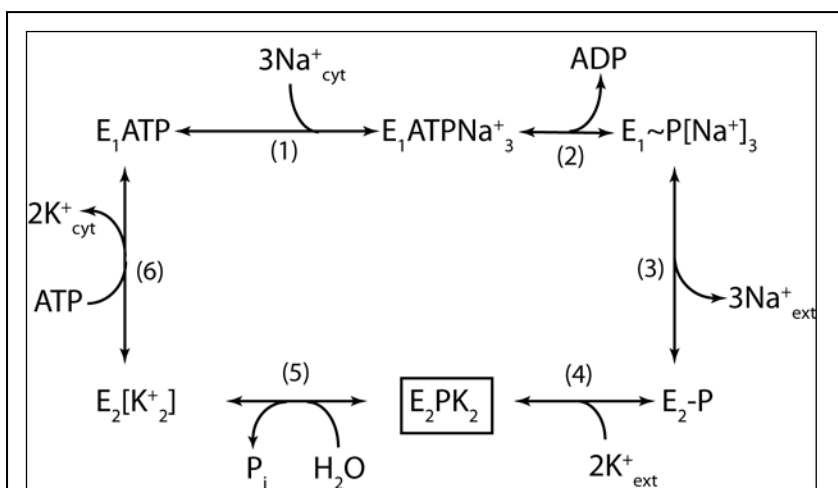
eller oksehjerner til at isolere og karakterisere enzymet. Ude i verden var der også en stigende interesse for forskning i "Skous enzym", og efterhånden begyndte der at tegne sig et mere klart billede af, at Na-pumpen, der er ansvarlig for den aktive Na^+ -transport i cellen, er et enzym – en kation-aktiveret Na,K-ATPase [4].

Skou havde søgt efter et protein, der åbnede for Na^+ -transporten i forbindelse med nerveledning, og som kunne forklare effekten af lokalnæstetika, men opdagede i stedet Na,K-ATPasen. Som det så ofte er sket i videnskabens historie, får man et andet resultat end forventet – og ofte meget mere interessant, hvis man har øje for det og lidt held. Og det



Figur 3. Den kombinerede effekt af Na^+ og K^+ på hydrolyseaktiviteten i membranfragmenter fra krabbenner.

ATPase-aktiviteten måles som funktion af K^+ -koncentrationen i tilstedeværelse af 6 mM Mg^{2+} og stigende koncentration af Na^+ .



Figur 4. Albers-Post reaktionscyklus for Na,K-ATPasen.

Se beskrivelse i teksten. Den indrammede intermediære er den enzymkonformation, hvor kristalstrukturen kendes (se Figur 6).

havde Skou. Nysgerrighed, stædighed og masser af tid til at gruble er vigtige forudsætninger.

TIDEN EFTER OPDAGELSEN AF Na,K-ATPasen

I 1960'erne var der stor aktivitet inden for Na,K-ATPasefeltet, som domineredes af kinetiske undersøgelser af Na,K-ATPase-mekanismen. Et mantra var dengang, at sådanne undersøgelser skulle udføres på så rent et Na,K-ATPasepræparat som muligt. En stor del af forskningen gik derfor med at oprense enzym fra forskellige kilder, mest nyrer og hjerne, men senere også fra saltkirtler fra pighaj. Alle disse væv er karakteriseret ved en høj grad af aktiv Na⁺-, K⁺-transport, så her har naturen allerede delvist oprenset enzymet. Det blev også muligt vha. forskellige detergenter selektivt at ekstrahere Na,K-ATPasen

fra membranfasen og bevare det i aktiv tilstand som et vandopløst enzym. Det var ofte mere "højere fransk kogekunst" end egentlig fysisk-kemisk erkendelse, der prægede de forskellige metoder. Den mest udbredte og anerkendte præparation, der anvendes i dag, blev udviklet af P.L. Jørgensen, mens han var på Fysiologisk Institut sammen med Skou [5].

Skous opdagelse havde inspireret mange grupper i udlandet, som R. L. Post på Vanderbilt University, I. M. Glynn i Cambridge, J. F. Hoffman på Yale, og D. C. Tosteson på Harvard, hvoraf de to sidstnævnte blev nære venner med Skou. Efterhånden var der også opstået en stor gruppe i Aarhus, selvfølgelig især på Fysiologisk Institut, hvor Jens Chr. Skou blev professor i 1963. Det skema for den enzymatiske reaktion, der i dag er universelt accepteret, blev udformet på grundlag af

resultater opnået af R. L. Post og R. W. Albers på National Institutes of Health, og kaldes derfor Albers-Post reaktions-skemaet [6, 7], se Figur 4.

Enzymet eksisterer i to hovedkonformationer, en E₁- og en E₂-form. I E₁-formen har kationer adgang til ionbindingsstederne fra cytoplasmasiden og har en højere affinitet for Na⁺ end for K⁺. I tilstedeværelse af ATP, bundet til enzymet med høj affinitet, bindes 3 Na⁺-ioner fra cytoplasmasiden (trin 1), og enzymet phosphoryleres (trin 2), hvorved Na⁺-ionerne okkluderes i en transient phospho-form, E₁~P[Na⁺]₃. Na⁺-ionerne er nu afskåret fra de ydre og indre vandfaser og bundet inde i enzymets transmembrane del.

Ved phosphoryleringen overføres den terminale phosphatgruppe fra ATP til en aspartylgruppe i enzymet (D376 i human Na,K-ATPase). En spontan konformationsændring til en phospho-grundform E₂-P (trin 3) bevirker, at adgangen alene til den ekstracellulære side åbnes og affiniteten for K⁺ bliver højere end for Na⁺. Na⁺ frigøres derved til ekstracellulærfasen, hvorefter 2 K⁺-ioner bindes til ionbindingsstederne fra ekstracellulærsiden, E₂PK₂ (trin 4). Bindingen af K⁺ medfører, at enzymet dephosphoryleres, og K⁺-ionerne okkluderes i E₂[K⁺]₂ (trin 5). Deokkluderingen af K⁺, hvor der alene åbnes for adgang til cytoplasmasiden, er en meget langsom proces i reaktionen, men accelereres kraftigt ved en lavaffin binding af

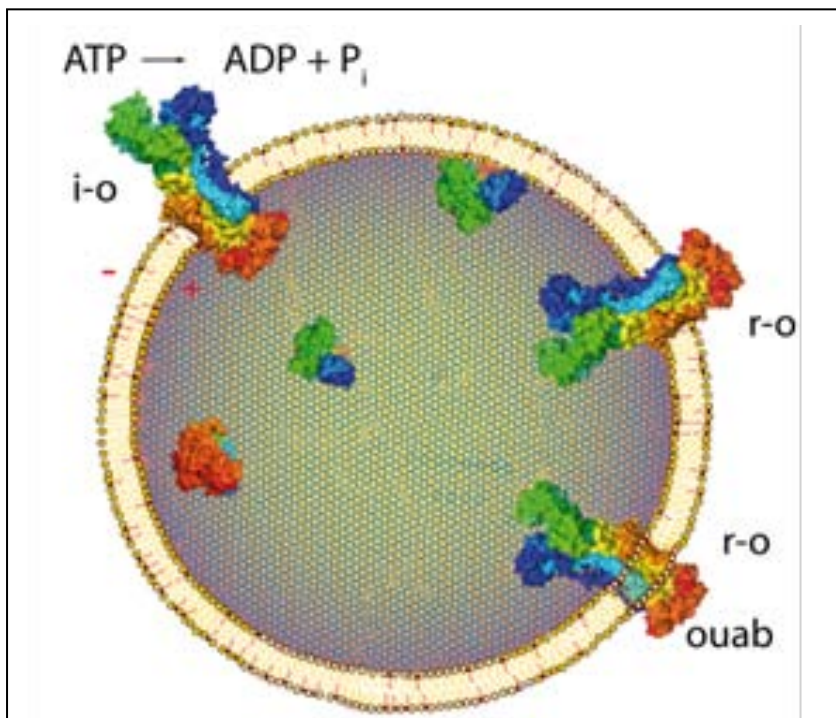
ATP, der medfører en konformationsændring til en E_1 -form (trin 6). De 2 K^+ -ioner frigøres til cytoplasmatisiden og reaktionscyklus er sluttet. Nettoresultatet er altså en transport af 3 Na^+ -ioner ud af cellen og 2 K^+ -ioner ind i cellen under hydrolyse af 1 ATP-molekyle. I steady state har dyrecellen en lav cytoplasmatisk Na^+ -koncentration og en høj K^+ -koncentration; det omvendte gælder i ekstracellulærfasen. Celler har et hvile-membranpotential, der er negativt til indersiden. Når Na^+ transporter

tes ud af cellen, sker det derfor op ad både den kemiske og den elektriske gradient, definitionen på en aktiv transport. K^+ transporten sker opad den kemiske gradient, men nedad den elektriske. Netto koster også K^+ transporten ind i cellen energi, men K^+ er meget nær elektrokemisk ligevægt.

I 1977 blev Skou kaldet til et professorat i Biofysik ved Det Medicinske Fakultet og blev fritaget for sine undervisningsforpligtigelser, så han kunne hellige sig studiet af Na,K-ATPase. Det blev begyndel-

sen på et langt samarbejde mellem Skou og mig. Et af de projekter, der optog Skou dengang, var, at det i 1971 var lykkedes Goldin og Hokin at rekonstituere Na,K-ATPase i lipidvesikler og vise, at enzymets hydrolytiske aktivitet er koblet til en aktiv transport af Na^+ og K^+ : Na,K-ATPase og Na-pumpen er een og samme molekylære enhed. Skou var imidlertid utilfreds med, at kun ca. 10 % af den hydrolytiske aktivitet overlevede rekonstruktionen og foreslog, at vi skulle forbedre metoden. Efter to år lykkedes det os at rekonstituere enzymet fra hjertkirtler i lipidvesikler uden tab af aktivitet, og vi kunne måle en transportstøkiometri på nær 3 Na^+ for hvert ATP spaltet [8]. En af de store fordele ved hjertenzymet er, at det er meget stabilt i detergentopløst tilstand, da rekonstruktionen indebærer, at lipider og enzym, hver især opløst i detergent, blandes, hvorefter detergentet fjernes ved adsorption til styrenpartikler, mens lipidvesikler med indbygget Na,K-ATPase spontant dannes, se Figur 5.

En af fordelene ved at benytte rekonstitueret Na,K-ATPase er, at transportegenskaberne kan studeres vha. isotoper, men også at enzymets egenskaber på de to sider af membranen kan undersøges separat. F.eks. kunne Na^+ -affiniteten på cytoplasmatisiden måles, hvad der kun indirekte kan opnås med enzymet i membranfragmenter eller efter opløsning i detergent, hvor enzymets to sider



Figur 5. Proteoliposom, lipidvesikel med rekonstituerede Na,K-ATPaser. Nogle vender som i cellen, right-side out (r-o), hvor bindingsstedet for ouabain (ouab) er eksponeret, andre vender modsat, inside-out (i-o). De sidstnævnte kan aktiveres af ATP i mediet, hvorved Na^+ transporteres ind i liposomet, mens K^+ transporteres ud – modsat i cellen. Den elektrogene iontransport medfører en nettotransport af positive ladninger indad, hvorved der dannes et membranpotential på flere hundrede mV over liposomet med indersiden positiv. Liposomet er ca. 100 nm i diameter.

begge er eksponerede til mediet. Vi kunne også måle pumpens elektrogene egenskaber, der er konsekvensen af den ulige transportstøkiometri med $3 \text{ Na}^+ : 2 \text{ K}^+$.

Rekonstrueringsteknikken er ideel til at studere interaktionen mellem lipid og enzym, idet vi kan fremstille liposomerne med forskellige sammensætning af phospholipider og kolesterol. Det er karakteristisk for dyreceller, at cellemembranen indeholder store mængder kolesterol, op til 50 molprocent, og det var interessant, da vi opdagede, at netop kolesterol havde en stor effekt på enzymaktiviteten af Na,K-ATPase. Senere, da vi havde krystalstrukturen, kunne vi se hvorfor, se nedenfor.

STATUS I DAG

Et af de store gennembrud inden for Na,K-ATPase-forskningen var, da aminosyresekvensen af proteinet blev kendt. Det var tidligt erkendt ud fra cellebiologiske analyser, at Na,K-ATPase bestod af en katalytisk enhed (α -enheden), hvoraf der i dag kendes 4 isoformer, med en molar masse på ca. 100 kDa, hvor ATP-hydrolysen og bindingen og transporten af kationerne foregår, og en mindre glycosyleret enhed (β -enheden med 3 isoformer) på ca. 55 kDa, som var nødvendig for bevarelsen af aktiviteten af Na,K-ATPase, og som forankrer enzymet i plasmamembranen. En tredje mindre enhed (~8 kDa), kaldet γ -enheden, er specifikt associeret med Na,K-ATPase og har

vist sig at tilhøre en familie af små regulatoriske proteiner, de såkaldte FXYD-proteiner [9]. I 1985 blev aminosyresekvensen af den katalytiske enhed publiceret [10] og året efter sekvensen af den associerede β -enhed [11]. Sekvensen af α -enheden indeholdt lidt over 1000 aminosyrer, mens β -enheden bestod af ca. 350 aminosyrer. Der var hektisk aktivitet i alle forskningsmiljøerne for at finde ud af, hvordan sekvenserne kunne forklare funktionen. Der blev gættet på hvilke aminosyrer, der dannede ionbindingsstederne, hvilke(n) der blev phosphoryleret osv.

Snart efter fulgte et andet molekylærbiologisk gennembrud. Det blev muligt at indføre mutationer i sekvensen og måle, hvordan det påvirkede funktionen. Men hvilke aminosyrer skulle man vælge at mutere? Uden en struktur kunne man ikke vide, hvilke aminosyrer i sekvensen, der rumligt var associerede. Forskergruppen på Biofysisk Institut var ikke involveret i de molekylærbiologiske teknikker, men en gruppe på Fysiologisk Institut med Jens P. Andersen og Bente Vilsen blev snart anerkendt på området. Skou fulgte ivrigt med i udviklingen, og strukturelle modeller blev heftigt diskuteret.

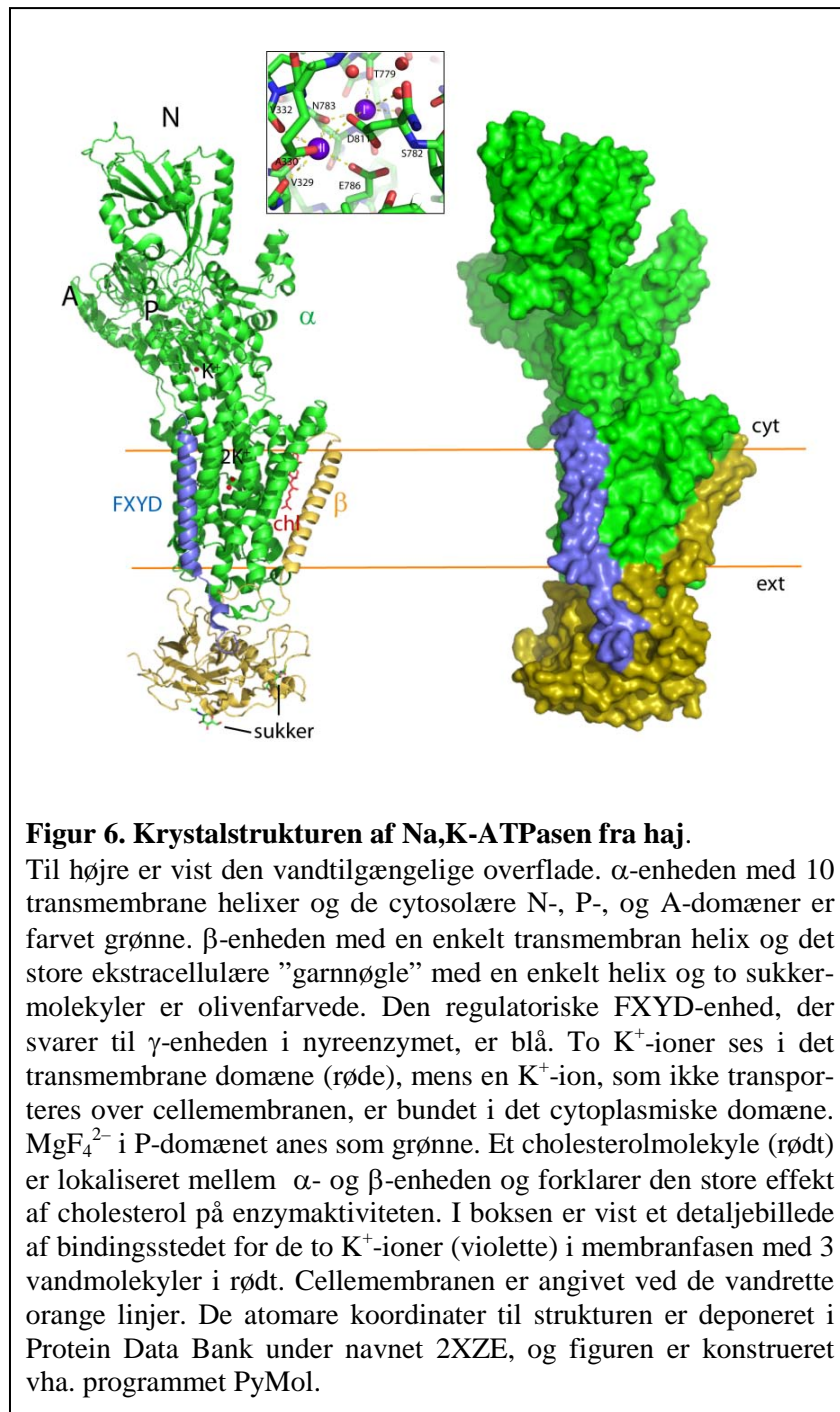
Tildelingen af Nobelprisen betød et væld af rejser og foredragsaktivitet for Skou. Ingen institution, der viste interesse, var for lille. Måske var hans kommentar til Nobeludvalget, da de ringede, ikke skudt helt ved siden af. Skou selv udtryk-

te dog, at han var glad for, at prisen først kom sent i hans karriere, for det lægger et enormt pres på den udvalgte, og alle udsagn må vejes på en guldvægt. I 1988, da Skou blev 70, trak han sig tilbage, men han beholdt sit kontor på Biofysisk Institut, og i de efterfølgende år, helt indtil han blev 85, så vi ham ofte komme cyklende til Instituttet. Skou havde fået børnebørn og indså, at der var andre værdier i livet end forskning. Fluefiskeri blev til lige det store hit!

Den strukturelle udvikling lå ikke stille. Todimensionale krystaller gav et indtryk af strukturen, men opløsningen var endnu for lille til, at man kunne erkende strukturer på det atomare niveau, selv om store domæner kunne erkendes. Vi drømte alle om at lave 3D-krystaller. I 1999 havde Chikashi Toyoshima, Tokyo Universitet, overrasket alle ved på Na,K-ATPase-mødet i Sapporo, Japan, at præsentere den molekylære struktur af Ca-ATPase, en nær slægtning til Na,K-ATPase [12]. Her defineres for første gang strukturen af de forskellige funktionelle proteindomæner: de 10 transmembrane helixer i det transmembrane domæne med ionbindingsstederne, N-domænet, hvor ATP bindes, P-domænet, hvor phosphoryleringen sker, og A-domænet, der er af betydning for at transformere ændringerne i de cytoplasmatiske domæner til det transmembrane domæne. Efterhånden er de fleste konformationer i Ca-ATPasens reaktion

tionscyklus krystalliseret, og det er overraskende at se, hvor store strukturelle ændringer der sker under reaktionscyklus. Når man tænker på, at reaktionscyklus gentages mellem 10-100 gange i sekundet, og der i hver celle er mange tusind ATPaser, er situationen virkelig dynamisk på det molekulære plan, noget man ikke tænker over, når man ser de enkelte krystalstrukturer i "snapshot".

I 2007, 50 år efter Skous opdagelse af Na,K-ATPasen, kom så den første 3D-krystalstruktur af enzymet i $E_2 \cdot P \cdot Rb_2$ -konformationen fra svinenyrer. Enzymet var oprenset og stabiliseret vha. phosphatanalogen MgF_4^{2-} og Rb^+ i K^+ bindingsstedet. Opløsningen på 3,5 Å efterlader nogen usikkerhed i strukturbestemmelsen, bl.a. i orienteringen af aminosyre-sidegrupper i ionbindingsstedet, der koordinerer de 2 Rb^+ -ioner, men viser tydeligt den overordnede struktur med en α -enhet med 10 transmembrane segmenter, en β -enhet, hvor dog kun den transmembrane del af strukturen er løst, og γ -enheden, hvoraf også kun den transmembrane del af strukturen er løst, associeret næsten udelukkende med helix 9 i α -enheden [13]. Halvandet år efter kom så strukturen af Na,K-ATPasen fra hajkirtler i den samme $E_2 \cdot P \cdot K_2$ konformation, men med en noget højere opløsning på 2,4 Å, og hvor strukturen af den store og komplicerede ekstracellulære domæne af β -enheden samt af FXYD er løst [14], se Figur 6. Ved denne høje opløsning ses



koordineringen af de 2 K^+ -ioner og associerede vandmolekyler i bindingsstedet tydeligt, ligesom MgF_4^{2-} ses i phosphoryleringsstedet. Sammenlignet med den tilsvarende struktur af Ca-ATPase forklarer strukturen, hvorfor Ca-ATPasen benytter H^+ som

modion til Ca^{2+} transporten, mens Na,K-ATPasen benytter K^+ som modion til Na^+ transporten, selv om ionbindingsstederne i de to ATPaser er forbavsende ens (se boks i Figur 6). Forskellen beror på, at Na,K-ATPasen har en β -enhet associeret, hvorimod Ca-

ATPasen mangler en sådan. β -enheden stabiliserer den delvise udfoldning af den 5. og 7. transmembrane helix i Na,K-ATPasen, hvorved koordineringen af de noget større K^+ -ioner i forhold til H^+ muliggøres. Ca-ATPasen kan ikke binde K^+ -ioner, delvist fordi den ingen β -enhed har. Vi fandt endvidere et kolesterolmolekyle her, der afskærmer den delvist udfoldede 7. transmembrane helix, hvilket forklarer den store effekt, vi fandt af kolesterol på enzymaktiviteten i det rekonstituerede enzym. Vi venter nu spændt på, at andre konformationer af Na,K-ATPasen bliver krystalliseret i lighed med, hvad der kendes fra Ca-ATPasen.

Det var naturligvis med stor glæde, at Skou erfarede, at krystalstrukturen af Na,K-ATPasen endelig var opklaret, og at nogle af resultaterne kom fra hans egen gruppe. Skou har gennem hele sin lange karriere været levende optaget af at lave modeller, der kunne forklare hans og andres resultater. I de senere år skete dette vha. avancerede computermodeller, som han snart lærte at beherske og ændre. Formålet var selvfølgelig, at forudsige hvilke konsekvenser, det havde på funktionen af enzymet, når forskellige parametre ændredes. Drømmen var at skabe en model, der kunne forklare samtlige eksperimentelle observationer. Han arbejder stadig på denne "allemodellens moder". I sin modellering af pumpe-funktionen er Skou især optaget af, om reaktionen er konsekutiv, hvor Na^+ -

ionen frigøres, før K^+ -ionen bindes, eller simultan, hvor Na^+ - og K^+ -ionerne bindes samtidig i bindingsstedet. Han har altid været tiltrukket af den sidste model [15]. Set ud fra denne synsvinkel var han en smule skuffet, da vi fandt, at der tilsyneladende ikke er plads til simultan binding af Na^+ og K^+ i de publicerede krystalstrukturer.

SKOUS OPDAGELSE AF Na,K-ATPasen I PERSPEKTIV

Inspireret af Skous opdagelse af Na,K-ATPasen, fulgte opdagelser af flere andre ATPaser: Ca-ATPaser fra sarcoplasmatiske reticulum og plasmamembranen, H,K-ATPasen fra mave og tarm, som er en nær fætter til Na,K-ATPasen, H-ATPasen især fra planter, ATPaser, der transporterer tunge metaller som kobber, og flere andre. Hvis man søger i PubMed på ATPaser, får man henvisning til flere end 17.000 publikationer. Tilsammen udgør denne gruppe af ATPaser de såkaldte P-type-ATPaser, fordi de alle under reaktionscyklus phosphoryleres ved hydrolysen af ATP. Efterhånden som deres funktion blev klarlagt, kunne man se, hvilken enorm betydning disse transportproteiner spiller for dyrefysiologien. Faktisk bruger cellen i gennemsnit 30 % af sin metaboliske energi for at holde Na,K-pumperne kørende. Defekte Na,K-ATPaser, der ikke fungerer, kendes ikke i levende celler, så aktive Na-pumper er af vital betydning for opretholdel-

se af livet. Af samme årsag har den farmakologiske interesse i Na-pumpen været begrænset. En undtagelse er den traditionelle behandling af hjertesvigt og arytmier, hvor man i mange år har anvendt hjerteglycosider såsom digoxin og digitoxin. Behandlingen virker, fordi hjerteglycosidet hæmmer Na,K-ATPasen i hjertemusklernerne, hvorved Na^+ -koncentrationen i cellen stiger. Dette begrænser Ca^{2+} -transporten ud af cellen via $3Na^+/Ca^{2+}$ -countertransporteren, som fører til en forøget Ca^{2+} -optagelse i sarcoplasmatiske reticulum via aktivering af Ca-ATPasen, hvorved Ca^{2+} -frigørelsen øges under excitation-kontraktionskoblingen, således at hjertets kontraktilitet øges (den inotropiske effekt). Planten Fingerbøl, *Digitalis purpurea*, der indeholder hjerteglycosider, blev anvendt i folkemedicinen allerede i middelalderen.

Som tidligere omtalt er Na-pumpen involveret i volumenreguleringen af dyrecellen ved at etablere osmotisk balance, så cellen ikke lyserer på grund af indtrængende vand. Derudover opretholder Na-pumpen steady state-gradienterne for Na^+ (lav intracellulær / høj ekstracellulær) og K^+ (høj intracellulær / lav ekstracellulær) over cellemembranen. Opretholdelsen af disse gradienter er baggrunden for generering af cellens hvilemembranpotential, et diffusionspotential, der opstår pga. cellemembranens meget mindre permeabilitet for Na^+ end for K^+ . Gradienterne er også nødvendige for udløsning af

nerveimpulsen, hvorunder Na^+ strømmer ind i cellen og K^+ ud af cellen gennem spændingsafhængige kanaler – ioner, som Na,K-ATPasen efterfølgende pumper tilbage. Endvidere udnyttes den frie energi i disse iongradienter til sekundær aktiv transport af blandt andet aminosyrer, sukkerstoffer og ioner over cellemembranen. Endelig er Na,K-ATPasen meget vigtig for den transepittele transport i nyrer, tarm og sekretoriske kirtler. I menneskets nyrer er Na,K-ATPasen således ansvarlig for resorptionen af Na^+ fra urinen tilbage til blodet, og op til 80 % af nyrenes metaboliske energi medgår hertil.

Nye og spændende felter indenfor Na,K-ATPase-forskningen er opdagelsen af, at Na,K-ATPasen bortset fra et transportprotein også kan have en receptorfunktion, hvor meget små koncentrationer af et endogent digoxin-lignende stof er signalstoffet [16]. Endvidere er der flere resultater, der tyder på, at pumpen med nogle af dens isoformer er involveret i hypertension [17], i visse neurologiske sygdomme [18, 19], og at hjerteglycosider forøger overlevelseshraten for patienter med visse kræftformer [20]. Endelig er et helt nyt kapitel i Na,K-ATPasens historie ved at blive oprullet, nemlig den fysiologiske regulering af pumpen via de såkaldte FXYD-proteiner [9] og via oxidativ

signaler [21]. Det er utroligt, at Jens Christian Skou, der er 92 år, stadig ivrigt følger feltets udvikling. Som Skou sagde til mig en dag: ”Flemming, hvis jeg nogensinde dør, så husk...”. ”Du mener, når du dør” svarede jeg. ”Nåh ja, ha ha”. Typisk Skou!

Om forfatteren

Flemming Cornelius, Ph.D., dr. scient., er lektor ved Institut for Biomedicin, Aarhus Universitet.

fc@biophys.au.dk

Referencer

1. Skou, J.C.: "The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves", *Biochim. Biophys. Acta* **23** (1957) 394–401.
2. Schatzmann, H.J.: "Hertzglycoside als hemmstoffe für den aktiven kalium- und natriumtransport durch die erythrocytenmembran", *Helv. Pharmacol. Acta.* **11** (1953) 346–354.
3. Post, R.L. and Jolly, P.: "The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane", *Biochim. Biophys. Acta.* **25** (1957) 118–128.
4. Skou, J.C.: "Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane", *Physiol. Rev.* **45** (1965) 596–617.
5. Jørgensen, P.L.: "Isolation and characterization of the components of the sodium pump", *Quart. Rev. Biophys.* **7** (1975) 239–274.
6. Albers, R.W.: "Biochemical aspects of active transport", *Annu. Rev. Biochem.* **36** (1967) 727–756.
7. Post, R.L., Hegyvary, C., and Kume, S.: "Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase", *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 6530–6540.
8. Cornelius, F. and Skou, J.C.: "Reconstitution of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ into phospho-

lipid vesicles with full recovery of its specific activity", *Biochim. Biophys. Acta.* **772** (1984) 357–373.

9. Cornelius, F. and Mahmmoud, Y.A.: "Functional modulation of the sodium pump: The regulatory proteins "Fixit", *News Physiol. Sci.* **18** (2003) 119–124.
 10. Shull, G.E., Schwartz, A. and Lingrel, J.B.: "Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ deduced from a complementary DNA", *Nature* **316** (1985) 691–695.
 11. Shull, G.E., Lane, L.K. and Lingrel, J.B.: "Amino-acid sequence of the β -subunit of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ deduced from a cDNA", *Nature* **321** (1986) 429–431.
 12. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H.: "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution", *Nature* **405** (2000) 647–655.
 13. Morth, J.P. *et al.*: "Crystal structure of the sodium-potassium pump", *Nature* **450** (2007) 1043–1049.
 14. Shinoda, T., Ogawa, H. Cornelius, F., and Toyoshima, C.: "Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution", *Nature* **459** (2009) 446–450.
 15. Skou, J.C.: "Considerations on the reaction mechanism of the Na,K-ATPase" i *The Sodium Pump. 4th International Conference on Na,K-ATPase*. I. Glynn and C. Elory (red.), The Company of Biologists Ltd., 1985, pp. 475–588.
 16. Li, Z. and Xie, Z.: "The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotoxic steroid-activated protein kinase cascade", *Pflüegers Arch.* **457** (2009) 635–644.
 17. Blaustein M.P., Hamlyn J.M.: "Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: endogenous ouabain, the Na^+ pump, the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and TRPC proteins", *Biochim. Biophys. Acta.* **1802** (2010) 1219–1229.
 18. de Carvalho Aguiar, P. *et al.*: "Mutations in the $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ alpha 3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism", *Neuron* **43** (2004) 169–175.
 19. De Fusco, M. *et al.*: "Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na^+/K^+ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2", *Nat. Genet.* **33** (2003) 192–196.
 20. Prassas, I. and Diamandis, E.P.: "Novel therapeutic applications of cardiac glycosides", *Nat. Rev. Drug Discov.* **7** (2008) 926–935.
 21. Figtree, G.A. *et al.*: "Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na^+/K^+ pump regulation", *Circ. Res.* **105** (2010) 185–93.
-