

Zum aktiven Na^+ , K^+ -Transport durch die Membran tierischer Zellen^[**]

Von Wilhelm Schoner^[*]

Der Transport von Na^+ aus der Zelle und von K^+ in die Zelle entgegen einem Konzentrationsgradienten wird durch eine $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierte ATPase katalysiert. Wie die Kationen die Zellmembran durchdringen, ist bisher ungeklärt. Beim Studium der ATP-Hydrolyse durch das Enzym fand sich eine Na^+ -abhängige Phosphorylierung des Enzymproteins; zusätzlich scheint sich seine Konformation zu ändern. Bei der K^+ -abhängigen Hydrolyse des enzymgebundenen Phosphats wird wahrscheinlich die Energie für den Transport der Kationen entgegen ihrem Konzentrationsgradienten frei. Durch Umkehr des Kationen-Konzentrationsgradienten kann das Enzym ATP aus anorganischem Phosphat und ADP synthetisieren. Das Herzglykosid Strophanthin hemmt die Na^+ -Pumpe spezifisch, indem es das Enzym in einer Konformation festhält.

1. Einleitung

Lebende Zellen zeigen gewöhnlich eine unterschiedliche Verteilung der einwertigen Kationen Natrium und Kalium innerhalb und außerhalb der Zelle^[1]. Intrazellulär finden sich normalerweise hohe Kalium- und niedrige Natrium-Konzentrationen, während extrazellulär das Umgekehrte der Fall ist^[1–3]. Stirbt die Zelle ab oder wird ihr Stoffwechsel durch Zellgifte oder Unterkühlen blockiert, so gleicht sich die unterschiedliche Verteilung wieder aus^[4–7].

1.1. Wirkung von Natrium- und Kalium-Ionen auf den Stoffwechsel^[2, 3]

Kalium-Ionen steigern u. a. die Atmung in Muskulatur, Niere, Fettgewebe und Erythrocyten^[8–13], die Glykolyse und die Lipolyse^[14–19], die Proteinsynthese^[20] und die Acetylcholinsynthese^[21]. Auf die gleichen Stoffwechselprozesse üben Natrium-Ionen eine hemmende Wirkung aus.

Als Ursache der antagonistischen Effekte dieser beiden Kationen ließ sich in einigen Fällen eine aktivierende Wir-

kung von Kalium-Ionen und eine hemmende Wirkung von Natrium-Ionen auf Enzyme nachweisen^[19, 22–24]. Da die Zellmembran für beide Kationen durchlässig ist^[25, 26], muß zur Aufrechterhaltung eines Stoffwechsels in der Zelle, der von der Zusammensetzung des extrazellulären Elektrolyten weitgehend unabhängig ist, K^+ in die Zelle und Na^+ aus der Zelle gepumpt werden („ Na^+ -Pumpe“).

1.2. Physiologische Bedeutung des aktiven Na^+ , K^+ -Transportes

Die Na^+ -Pumpe schafft durch die Einstellung einer unterschiedlichen Verteilung der Natrium- und Kalium-Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle die Voraussetzungen für die Erregbarkeit von Nerv und Muskel^[27–31]. Durch einen aktiven Na^+ , K^+ -Transport – d. h. einen Transport entgegen dem Konzentrationsgradienten – wird wahrscheinlich der osmotische Druck der Zellen konstant gehalten, wie Untersuchungen am Krankheitsbild der hereditären Sphärocytose der Erythrocyten vermuten lassen^[32–34]. Der aktive Na^+ , K^+ -Transport ist auch die treibende Kraft für die Bewegung von NaCl und Wasser bei der Rückresorption des Primärharnes in den Tubuluszellen der Niere^[35, 36] sowie bei der Sekretion des Speichels und des Pankreassaftes^[37]. Weiterhin ist eine aktive Na^+ -Pumpe Voraussetzung für die Resorption von Glucose und Aminosäuren durch die Mucosazellen des Dünndarms und die Tubuluszellen der Niere (Gesamtübersichten bei ^[5, 28, 30, 34, 38–42]).

[*] Priv.-Doz. Dr. W. Schoner
Physiologisch-chemisches Institut der Universität
34 Göttingen, Humboldtallee 7

[**] Die in der vorliegenden Arbeit zitierten eigenen Untersuchungen wurden in großzügiger Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

2. Eigenschaften der Na^+ -Pumpe

Besonders an den Modellen des isoliert perfundierten Riesenaxons des Tintenfisches und des durch reversible Hämolyse^[43] beladenen Erythrocyten konnten nähere Angaben über die Eigenschaften der Na^+ -Pumpe erarbeitet werden. Wie diese Untersuchungen ergaben, wird die Energie für den Transport der Kationen entgegen dem Konzentrationsgradienten durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen^[44–52]. Die ATP-Bindungsstelle befindet sich an der Innenseite der Zellmembran; hier werden auch die Reaktionsprodukte Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat (P_i) freigesetzt^[51, 53, 54].

Der aktive Transport des Natriums in den Extrazellulärraum ist mit dem Transport von Kalium in den Intrazellulärraum gekoppelt^[44, 55–57]. Natrium-Ionen können nur an der Innenseite der Membran von der Pumpe aufgenommen werden^[58–60]; an der Außenseite der Membran wirken sie als Antagonisten der für ihren Transport erforderlichen Kalium-Ionen^[32, 60–62]. Diese Funktion der Kalium-Ionen an der Außenseite der Membran kann jedoch auch von anderen Alkalimetall-Ionen übernommen werden^[57–63].

Herzglykoside hemmen die Na^+ -Pumpe an der Außenseite der Zellmembran spezifisch^[51, 64–66], an der Innenseite zeigen sie keine Wirkung^[67].

Diese Befunde lassen sich in einem von Shaw^[55] aufgestellten kinetischen Modell des aktiven Na^+ , K^+ -Transportes zusammenfassen (Abb. 1): Na^+ wird an der Innenseite der Zellmembran an eine Trägersubstanz („Carrier“) gebunden und wandert mit dieser durch die Zellmembran. An der Außenseite der Zellmembran gibt der Carrier Na^+ ab und wird zum K^+ -Carrier. Mit dem K^+ beladen, gelangt der K^+ -Carrier an die Innenseite der Zellmembran, wo er das K^+ abgibt. Durch eine ATP-abhängige Reaktion wird der K^+ -Carrier wieder in einen Na^+ -Carrier überführt.

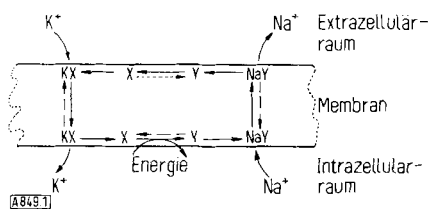


Abb. 1. Kinetisches Modell des gekoppelten gegenläufigen Transportes von Na^+ und K^+ durch die Zellmembran (nach Shaw [55]). X = Kalium-, Y = Natrium-Carrier.

In Übereinstimmung mit diesem Modell ließ sich am Riesenaxon des Tintenfisches zeigen, daß der Transport von Natrium-Ionen aus der Zelle mit der Aufnahme ebensovieler Kalium-Ionen in die Zelle verknüpft ist. Nach Baker und Shaw^[68, 69] werden pro mol hydrolysiertes ATP etwa drei Natrium-Ionen aus der Zelle und drei Kalium-Ionen in die Zelle transportiert. Jedoch fanden Garrahan und Glynn^[70] sowie Post et al.^[54, 56, 71] am menschlichen Erythrocyten nur ein Verhältnis von $3 \text{ Na}^+ / 2 \text{ K}^+$ pro mol

hydrolysiertes ATP. Offensichtlich kann der Na^+ -Transport vom K^+ -Transport partiell entkoppelt werden. Die Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, daß eine Entkoppelung bei einem niedrigen ATP/ADP- oder ATP/ P_i -Verhältnis in der Zelle eintritt^[72–74].

2.1. ATP-Synthese durch Umkehr der Na^+ -Pumpe

Die Koppelung des aktiven Na^+ -Transportes mit dem K^+ -Transport und die Abhängigkeit dieses Prozesses von der ATP-Hydrolyse läßt die Frage aufkommen, ob eine Umkehr der Na^+ -Pumpe zu einer ATP-Synthese führen kann. Diese Frage konnte an menschlichen Erythrocyten unter Zuhilfenahme des spezifischen Hemmstoffes der Na^+ -Pumpe, des Strophanthins (Ouabain), weitgehend geklärt werden: Belädt man mit der reversiblen Hämolyse-Technik^[43] Erythrocyten mit ATP, ADP, anorganischem [^{32}P]-Phosphat sowie K^+ und inkubiert diese Zellen in Ringer-Lösung, die K^+ -frei ist – jedoch Na^+ in hohen Konzentrationen enthält –, so laufen entsprechend ihren Konzentrationsgradienten K^+ aus der Zelle und Na^+ in die Zelle. Unter diesen Bedingungen läßt sich auch ein durch Strophanthin hemmbarer Einbau von radioaktivem Phosphat in ATP nachweisen^[75–82]. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Markierung des ATP mit $^{32}\text{P}_i$ über die Substratkettenphosphorylierung bei der Glykolyse zustandekommt und somit unabhängig von der Umkehr der Na^+ -Pumpe ist^[75, 76]. Als günstig für die ATP-Synthese durch Umkehr der Na^+ -Pumpe erwiesen sich steile Konzentrationsgradienten von Na^+ und K^+ sowie ein möglichst niedriges $[\text{ATP}]/([\text{ADP}] \cdot [\text{P}_i])$ -Verhältnis^[78–85]. Vorläufige stöchiometrische Untersuchungen zeigen, daß ein Molekül energiereiches Phosphat für den Efflux von zwei bis drei Kalium-Ionen gebildet wird^[77, 80]. Die intrazelluläre ATP-Synthese durch Umkehr der Na^+ -Pumpe kommt zum Erliegen, wenn die Kalium-Konzentration im Extrazellulärraum und die Natrium-Konzentration in der Zelle auf über 10 mmol/l ansteigen^[78, 79, 83].

3. ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierte ATPase und Na^+ -Pumpe

In Zellen mit einer aktiven Na^+ -Pumpe findet sich in den Zellmembranen und Mikrosomen ein ATP-hydrolysierendes Enzymsystem, das durch die gleichzeitige Anwesenheit von Natrium- und Kalium-Ionen aktiviert wird. Eine ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierte ATPase wurde 1957 erstmals von Skou^[86] in den Zellmembranen des Krabben-Nerves beschrieben. Das Enzym konnte bisher in allen Geweben nachgewiesen werden, in denen ein durch Strophanthin hemmbarer aktiver Na^+ , K^+ -Transport vorliegt^[34, 36, 38–40, 87, 88]. Wie insbesondere die Untersuchungen von Bonting et al.^[88] zeigen, enthalten alle bisher untersuchten Gewebe mit einer aktiven Na^+ -Pumpe dieses Enzym. Obwohl die Pumpaktivitäten z.T. sehr stark variieren, wird in allen Geweben ein konstantes Verhältnis Kationen-Flux/($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität bezogen auf eine Membranfläche von 1 cm^2 gefunden. Diese Befunde zeigen, daß die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierte ATPase zumindest einem Teil der Na^+ -Pumpe entspricht.

3.1. Eigenschaften der (Na⁺ + K⁺)-aktivierten ATPase

Die (Na⁺ + K⁺)-aktivierte ATPase ist ein strukturgebundenes Enzym. Versuche, das Enzym von der Zellmembran mit Proteasen^[89, 90], Phospholipase^[89, 91–93] oder durch physikalische Maßnahmen^[89] abzulösen, schlugen fehl. Es gelang jedoch, durch Behandlung der Zellmembranen mit Detergentien das Enzym in eine Pseudolösung zu überführen^[94, 95]. Eine Reinigung des Enzyms von inaktiven Begleitproteinen und einer löslichen, nur Mg²⁺-abhängigen ATPase läßt sich durch Differentialzentrifugation zur Gewinnung der Zellmembranen, Behandlung mit Salzen, Detergentien und Alterung erzielen^[34, 38, 89].

Um optimal zu wirken, benötigt die (Na⁺ + K⁺)-aktivierte ATPase die *gleichzeitige* Anwesenheit von Mg²⁺, Na⁺ und K⁺. Mit Magnesium-Ionen allein zeigt das Enzym nur eine geringe Aktivität. Die zusätzliche Anwesenheit eines der folgenden einwertigen Kationen Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Li⁺, NH₄⁺ steigert die ATP-Hydrolyse^[86]. Eine beträchtliche weitere Aktivierung wird jedoch beobachtet, wenn dem Reaktionsgemisch, das bereits Magnesium- und Kalium-Ionen enthält, Natrium-Ionen zugesetzt werden (Abb. 2). Für diese zusätzliche aktivierende Wirkung sind

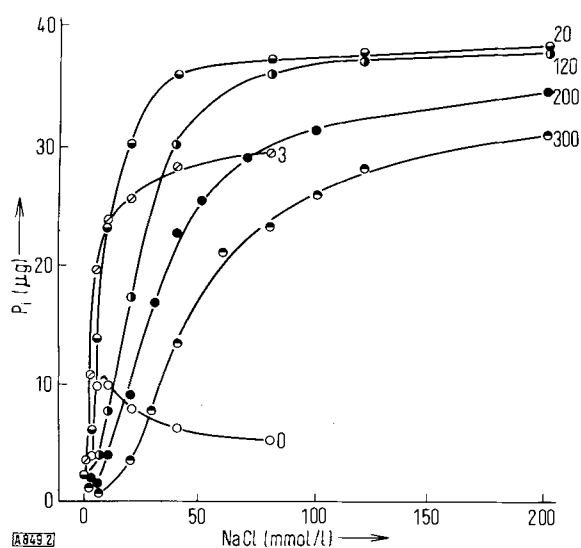


Abb. 2. Na⁺-Abhängigkeit der Aktivierung der (Na⁺ + K⁺)-aktivierten ATPase des Krabbennerve bei verschiedenen K⁺-Konzentrationen; Mg²⁺-Konzentration: 6 mmol/l (von Skou [86]). Ordinate: relative Geschwindigkeit der Phosphatfreisetzung aus ATP, angegeben als µg P_i pro Zeiteinheit. Die Zahlen an den Kurven bedeuten die K⁺-Konzentration in mmol/l.

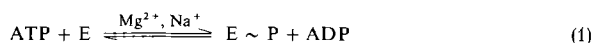
unbedingt Natrium-Ionen erforderlich; sie können durch andere einwertige Kationen nicht ersetzt werden. Kalium-Ionen können jedoch gegen andere Alkalimetall- oder Ammonium-Ionen ausgetauscht werden.

Die optimale enzymatische Aktivität der (Na⁺ + K⁺)-aktivierten ATPase wird durch das Verhältnis Na⁺/K⁺ bestimmt und gewöhnlich bei einer Konzentration von 100 mmol/l Na⁺ und 20 mmol/l K⁺ (+ 6 mmol/l Mg²⁺) erreicht (Abb. 2). Im Gegensatz zur Na⁺-Pumpe zeigt das Enzymsystem jedoch keine ausgesprochene Adenin-Spezifität^[89, 96, 97]; neben ATP werden auch andere Nucleosidtriphosphate mit geringer Geschwindigkeit (Na⁺ + K⁺)-

abhängig gespalten^[98]. Die Verwendung anderer Nucleosidtriphosphate als Energiequelle für die Na⁺-Pumpe läßt sich an den für die Transportstudien benutzten Modellen nicht sicher nachweisen; wahrscheinlich sind die Testsysteme nicht genügend empfindlich. Das membrangebundene Enzym wird ebenso wie die Na⁺-Pumpe durch Strophanthin, Oligomycin, Fluorid- und Calcium-Ionen gehemmt^[99–101]. Das Molekulargewicht der (Na⁺ + K⁺)-aktivierten ATPase konnte aus der Inaktivierung des Enzyms durch Röntgenstrahlen anhand der Trefferhäufigkeit mit 2.5·10⁵–5.0·10⁵ ermittelt werden^[102, 103].

3.2. Verlauf der ATP-Hydrolyse

Inkubiert man die (Na⁺ + K⁺)-aktivierte ATPase mit endständig markiertem [³²P]-ATP, so läßt sich ein (Mg²⁺ + Na⁺)-abhängiger Einbau von radioaktivem Phosphat in das durch Säurepräzipitation gewonnene denaturierte Enzym nachweisen^[96, 98, 104–113]. Gibt man Kalium-Ionen zum bereits in Gegenwart von Magnesium- und Natrium-Ionen phosphorylierten *nativen* Enzym, so wird die eingebaute Markierung rasch wieder abgegeben (Abb. 3). Dieser Befund spricht dafür, daß die (Na⁺ + K⁺)-aktivierte ATP-Hydrolyse in mindestens zwei Teilschritten verläuft [Gl. (1) und (2), E = Enzym]:



Die Funktion der Natrium-Ionen bei der Phosphorylierungsreaktion kann durch andere Kationen nicht übernommen werden. Die aktivierende Wirkung der Kalium-

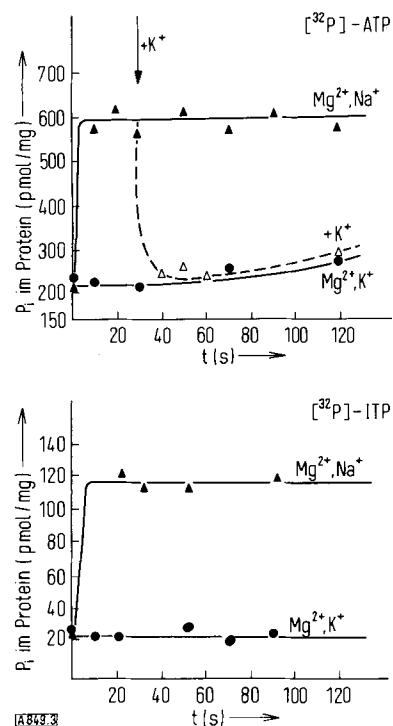


Abb. 3. Kinetik der Na⁺-abhängigen Phosphataufnahme und -abgabe der (Na⁺ + K⁺)-aktivierten ATPase bei Inkubation mit [³²P]-ATP (oben) und [³²P]-ITP (unten). 30 Sekunden nach dem Start der Phosphorylierungsreaktion (Pfeil) wurden zum nativen Enzym 5 µmol KCl gegeben (nach Schoner et al. [98]).

Ionen auf die Phosphatfreisetzung wird dagegen auch mit anderen Alkalimetall-Ionen und mit Ammonium-Ionen erreicht^[105].

Das Ausmaß der Phosphorylierung des membrangebundenen Enzymproteins wird durch die spezifische enzymatische Aktivität der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATPase-Präparation, die Na^+ -Konzentration, die Konzentrationen von Mg^{2+} und ATP sowie deren Verhältnis bestimmt^[98, 105, 110, 111]. Neben ATP können auch andere Nucleosid-triphosphate als Phosphatdonoren bei der Phosphorylierungsreaktion dienen (Abb. 3)^[87, 98, 110, 114].

Die Na^+ -abhängige Phosphorylierungsreaktion konnte bisher in allen Membranpräparationen mit einer ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATPase gefunden werden^[112, 113]. Dieser Befund ist insofern von Bedeutung, als die bisher dargestellten Präparate dieses membrangebundenen Enzyms noch relativ unrein sind. Vergleichende kinetische Untersuchungen über die Geschwindigkeit der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATP-Hydrolyse und der Na^+ -abhängigen Phosphorylierungsreaktion sind im Einklang mit der Annahme, daß die Konzentration eines phosphorylierten Zwischenproduktes die Geschwindigkeit der Phosphatfreisetzung bestimmt^[105, 108 - 110].

Entsprechend der Annahme, daß die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierte ATP-Hydrolyse aus einer Na^+ -abhängigen Phosphorylierungsreaktion [Gl. (1)] und einer K^+ -abhängigen Phosphatasereaktion [Gl. (2)] besteht, ließ sich in den Enzympräparationen eine *Na^+ -abhängige ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion* aufzeigen^[115 - 120]. Diese Reaktion wird erst sichtbar, wenn ein lösliches Enzym abgetrennt ist, das eine adenin-unspezifische, nur Mg^{2+} -abhängige ATP-ADP-Transphosphorylierung katalysiert^[118] und nicht an der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATP-Hydrolyse teilnimmt^[118]. Im Gegensatz zur Na^+ -abhängigen Phosphorylierungsreaktion und zur ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATP-Hydrolyse, die erst bei Mg^{2+} -Konzentrationen von 3 mmol/l ihre optimale Geschwindigkeit erreichen, liegt das Mg^{2+} -Optimum der Na^+ -abhängigen ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion bei nur 0.1 bis 0.2 mmol/l^[115 - 119]. Wird jedoch der zweite Teilschritt [Gl. (2)], die K^+ -abhängige Freisetzung des proteingebundenen Phosphates, durch Vorbehandlung der ATPase mit *N*-Äthylmaleinimid (NEM) oder durch Zusatz von Strophanthin oder Oligomycin unterbunden^[96, 105, 110], so verschiebt sich das Mg^{2+} -Optimum der Na^+ -abhängigen ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion nach höheren Mg^{2+} -Konzentrationen (3 mmol/l)^[104]. Gleichzeitig nimmt der [^{14}C]-Austausch zwischen ADP und ATP zu^[115, 116]. Beide Reaktionen, die Na^+ -abhängige Phosphorylierungsreaktion und die Na^+ -abhängige ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion, werden von Natrium-Ionen bei der gleichen Konzentration halbmaximal aktiviert^[116, 117]. Calcium-Ionen hemmen die Na^+ -Pumpe^[49], die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierte ATPase^[99 - 101], die Na^+ -abhängige Phosphorylierungsreaktion^[105] und die Na^+ -abhängige ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion^[115].

Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wird angenommen, daß das Na^+ -abhängige ATP-ADP-transphosphorylierende Enzym ein Teil der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATPase ist.

Zu klären wäre jedoch noch die Frage der Nucleotid-Spezifität: Im Gegensatz zur ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATP-Hydrolyse und Na^+ -abhängigen Phosphorylierungsreaktion^[87, 98, 110] ist die Na^+ -abhängige ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion adenin-spezifisch^[115, 116, 119].

Das Enzym, das die letztgenannte Reaktion katalysiert, konnte vor kurzem in Lösung gebracht werden^[121]. Dieser Befund stimmt mit der Annahme überein, daß die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierte ATPase ein Multienzym-Komplex ist, bei dem die Na^+ -abhängige Phosphorylierungsreaktion von einer anderen Enzymeinheit katalysiert wird als der K^+ -abhängige Phosphataseschritt^[122].

Ein P_i -ATP-Austausch konnte bisher mit den ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Präparaten nicht gefunden werden^[97, 115]. Er sollte jedoch nachweisbar sein, da es am Erythrocyten durch Umkehr des Konzentrationsgradienten der Natrium- und Kalium-Ionen gelang, einen durch Strophanthin hemmbaren Einbau von radioaktivem Phosphat in ATP zu zeigen^[75 - 80, 82]. Wahrscheinlich ist das bisherige Unvermögen, einen P_i -ATP-Austausch nachzuweisen, darauf zurückzuführen, daß sich bei den Enzymsuspensionen zwischen Innen- und Außenseite der Membranfragmente kein Kationen-Konzentrationsgradient aufbauen läßt.

Zwei Zustandsformen des phosphorylierten Zwischenproduktes postulierten *Fahn et al.*^[114, 115] aufgrund der unterschiedlichen Mg^{2+} -Optima der Na^+ -abhängigen ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion einerseits und der Na^+ -abhängigen Phosphorylierungsreaktion sowie der Gesamtreaktion der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATPase andererseits. Durch kinetische Untersuchungen über die Reaktionsfähigkeit des phosphorylierten Zwischenproduktes gegenüber ADP und K^+ konnten *Post et al.*^[123, 124] diese Annahme weiter stützen. Während der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATP-Hydrolyse werden demnach folgende Reaktionsschritte durchlaufen (Abb. 4)^[123]: Natrium-Ionen werden vom Enzym im Konformationszustand E1, in dem es eine hohe Affinität zum Na^+ hat, gebunden^[117]. Der Anteil des Enzyms, an den Na^+ gebunden ist, kann phosphoryliert werden (Reaktionsschritt I). Diese Reaktion entspricht der am nativen Enzym bei niedrigen Mg^{2+} -

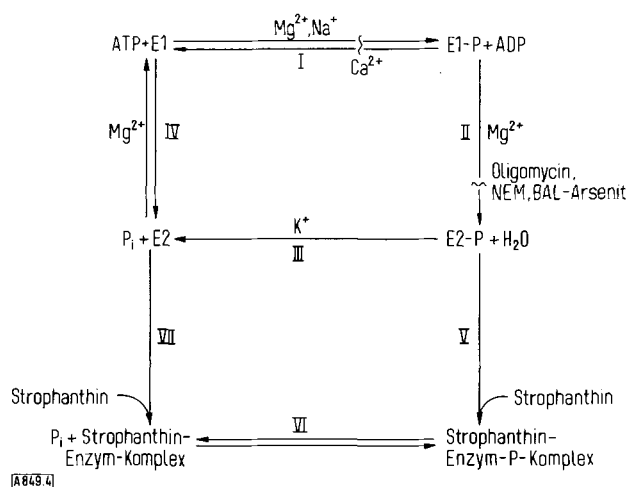


Abb. 4. Reaktionsschritte bei der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATP-Hydrolyse (als I–VII numeriert, E = Enzym). Geschlängelte Linien geben den Angriffsort von Hemmstoffen wieder. BAL-Arsenit = 2,3-Dimercaptopropanol-Arsenit in äquimolaren Mengen.

Konzentrationen (0.1 mmol/l) nachweisbaren Na^+ -abhängigen ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion^[115].

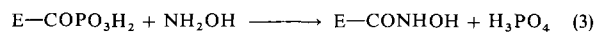
Bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen (3 mmol/l) geht das phosphorylierte Enzym aus dem Konformationszustand E1-P in den Zustand E2-P über (Schritt II). Dadurch wird die Na^+ -abhängige ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion gehemmt; das phosphorylierte Zwischenprodukt kann nicht mehr mit ADP reagieren^[115, 123]. Wird die Umwandlung von E1-P in E2-P durch Oligomycin oder durch die Inaktivierung der Gesamtreaktion mit *N*-Äthylmaleinimid (NEM) oder BAL-Arsenit gehemmt^[96, 105, 110], so ist die Na^+ -abhängige ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion beschleunigt und jetzt auch bei 3 mmol/l Mg^{2+} nachzuweisen^[116, 117]. Bei Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierten ATPase durch Oligomycin und NEM wird das Enzym auf Zugabe von K^+ nicht mehr dephosphoryliert, jedoch auf Zugabe von unmarkiertem ADP^[123, 124]. Wird das native Enzym bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen phosphoryliert und dadurch die Bildung von E2-P begünstigt, so kann allein K^+ (Schritt III), nicht aber ADP-Zusatz das Phosphat freisetzen^[123].

Das phosphorylierte Enzym scheint in Gegenwart des spezifischen Hemmstoffes Strophanthin in eine weitere Modifikation überzugehen (Schritt V): *Post et al.*^[123, 124] zeigten, daß bei der Phosphorylierung des Enzyms mit [^{32}P]-ATP in Gegenwart von Strophanthin ein phosphoryliertes Produkt entsteht, das durch Zugabe von K^+ nicht mehr hydrolysiert werden kann. Die Bildung dieser modifizierten Form des phosphorylierten Enzyms wird verhindert, wenn man die ATPase mit NEM vorbehandelt. Setzt man dem nicht-phosphorylierten Enzym Strophanthin und Magnesium-Ionen zu, so kann es nicht mehr Na^+ -abhängig mit ATP phosphoryliert werden^[123]; jedoch findet sich jetzt ein Einbau von radioaktivem Phosphat in das Enzym^[123–127], der sich am nicht mit Strophanthin behandelten Enzym nicht zeigen läßt^[105]. Alle zur Zeit verfügbaren Kriterien lassen darauf schließen, daß bei der Phosphorylierung mit anorganischem Phosphat das gleiche Enzymphosphat wie bei der Phosphorylierung mit ATP (Schritt IV) entsteht^[124, 126, 127]. Als Erklärung dieser Befunde wird die Überführung des Enzyms in einen Strophanthin-Enzym-Komplex angenommen (Schritte VI und VII).

3.3. Zur chemischen Natur des phosphorylierten Zwischenproduktes

Das aus strophanthin-behandelter ATPase durch Na^+ -abhängige Phosphorylierung mit endständig markiertem [^{32}P]-ATP und das durch Phosphorylierung mit [^{32}P]-Phosphat gewonnene Zwischenprodukt verhalten sich nach allen bisher bekannten Untersuchungsmethoden chemisch identisch^[124, 126, 127]. Beide Produkte wandern bei der Elektrophorese gleich schnell; sie werden im alkalischen Milieu und in Gegenwart von Molybdat und Hg^{2+} rasch hydrolysiert^[106, 124–128]. Es konnte ausgeschlossen werden, daß es sich bei den Intermediärprodukten um Phosphatidsäuren oder protein-gebundene Serylphosphate handelt^[128–130].

Für ein Acylphosphat als Zwischenprodukt der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierten ATPase spricht, daß das enzym-gebundene Phosphat durch Inkubation mit gereinigter Acylphosphatase oder Hydroxylamin als anorganisches Phosphat freigesetzt wird [Gl. (3)]^[106, 107, 128]:



Als Phosphatacceptorgruppe bei der Na^+ -abhängigen Phosphorylierungsreaktion mit ATP nehmen *Kahlenberg et al.* die γ -Carboxygruppe eines Glutamates an^[131, 132]: Die Autoren konnten nach Inkubation des säuredenaturierten, phosphorylierten Enzyms mit ^3H -markiertem *N*-Propylhydroxylamin ein ^3H -markiertes Peptid isolieren, das nach Verdauung mit Pronase sowie elektrophoretischer und chromatographischer Trennung ein einheitliches radioaktives Produkt ergab. Dieses radioaktive Produkt verhielt sich in fünf von sieben elektrophoretischen und chromatographischen Systemen wie authentisches Glutamyl-*N*-propylhydroxamat.

Am nativen Enzym zeigt Hydroxylamin keinerlei Wirkung auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierte ATP-Hydrolyse^[133, 134]. Dieser Befund steht im Widerspruch zur Annahme eines Acylphosphates als Intermediärprodukt. Da durch Überführung eines Acylphosphates in die Hydroxamsäure [Gl. (3)] die Phosphatacceptorgruppe irreversibel blockiert wird, sollte zumindest eine partielle Inaktivierung erwartet werden. *Chignell und Titus*^[135] konnten jedoch wahrscheinlich machen, daß das Hydroxylamin nicht an das aktive Zentrum gelangt. Wahrscheinlich verwehren ATP und Na^+ , die stets bei der Phosphorylierungsreaktion [Gl. (1)] zugegen sein müssen, dem NH_2OH den Zutritt zum Acylphosphat im aktiven Zentrum. Eine Schutzwirkung von ATP, Na^+ und K^+ konnte bei Inaktivierungsversuchen mit Dicyclohexylcarbodiimid, einer mit Carboxygruppen reagierenden Substanz, nachgewiesen werden^[136].

Neuerdings lassen thermodynamische Gründe Zweifel an der intermediären Bildung eines Acylphosphates aufkommen. Die Bildung eines Acylphosphates aus anorganischem Phosphat ist schwer vorstellbar, es sei denn, das anorganische Phosphat spalte eine energiereiche Bindung, die durch die Vorinkubation mit Strophanthin entsteht.

3.4. Beziehung zwischen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierter ATPase und K^+ -aktivierter Phosphatase

In den Membranfraktionen mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierter ATPase findet sich regelmäßig eine durch Kalium-Ionen aktivierbare Phosphatase. Das Enzym wird ebenfalls durch Strophanthin gehemmt^[136–152]. Substrate des Enzyms sind Carbamylphosphat, Acetylphosphat und *p*-Nitrophenylphosphat^[140]; K^+ kann durch andere Alkalimetall-Ionen sowie Ammonium-Ionen ersetzt werden^[137, 139]. Natrium-Ionen und Nucleosid-di- und -tri-phosphate hemmen die Enzymaktivität^[137, 138, 148]. Bei der Inkubation der Membranen mit [^{32}P]-Acetylphosphat entsteht ein phosphoryliertes Enzym, das die gleichen Eigenschaften wie das bei der Na^+ -abhängigen Phosphorylierung mit [^{32}P]-ATP gewonnene phosphorylierte Enzym

zeigt^[138, 143]. Alle diese Eigenschaften und der Nachweis des Anstieges der spezifischen Aktivität der K^+ -aktivierten Phosphatase zusammen mit der $(Na^+ + K^+)$ -aktivierten ATPase deuten darauf hin, daß die K^+ -aktivierte Phosphatase die K^+ -abhängige Teilreaktion der $(Na^+ + K^+)$ -aktivierten ATPase [Gl. (2)] katalysiert^[137, 149].

3.5. Kinetische Studien zum Prozeß der Kationen-Aktivierung

Die Untersuchungen über das Verhalten des phosphorylierten Zwischenproduktes gegenüber ADP und K^+ bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen legen die Schlußfolgerung nahe, daß die $(Na^+ + K^+)$ -aktivierte ATPase während des Kationentransportes ihre Konformation ändert. Weitere Hinweise für diese Annahme lassen sich auch aus kinetischen Untersuchungen über die Aktivierung des Enzyms durch Na^+ und K^+ gewinnen. So fanden *Squires*^[153] und *Robinson*^[154, 155] eine homotrope kooperative Wirkung beider Kationen auf das Enzym. Beide Kationen ändern mit der Variation ihrer Konzentration die Kooperativität des Enzyms und seine Affinität zum anderen Kation (Tabelle). Auch die Affinität des Enzyms für ATP wird durch die Na^+ - und K^+ -Konzentration gesteuert: Mit steigender K^+ -Konzentration nimmt die Affinität des Enzyms für ATP ab. Eine Änderung der ATP-Konzentration beeinflußt ihrerseits die für eine halbmaximale Aktivierung des Enzyms erforderlichen Konzentrationen beider Kationen^[154].

Tabelle. Änderungen der kinetischen Parameter der $(Na^+ + K^+)$ -aktivierten ATPase für Na^+ und für K^+ mit der Konzentration des anderen Kations (nach *Robinson* [155]). n = Hill-Koeffizient, $K_{0.5}$ = Kationen-Aktivierungskonstante, Rel. V_{max} = relative Maximalgeschwindigkeit.

Aktivator	NaCl (mmol/l)	KCl (mmol/l)	n	$K_{0.5}$ (mmol/l)	Rel. V_{max}
NaCl	—	0.8	1.57 ± 0.05	1.7 ± 0.3	0.69 ± 0.02
	—	2.0	1.35 ± 0.06	2.8 ± 0.6	0.91 ± 0.04
	—	10.0	1.17 ± 0.03	5.0 ± 0.7	1.03 ± 0.02
	—	30.0	1.22 ± 0.08	6.3 ± 1.3	1.08 ± 0.05
KCl	3	—	0.75 ± 0.06	0.18 ± 0.04	0.53 ± 0.04
	5	—	1.08 ± 0.11	0.15 ± 0.01	0.63 ± 0.02
	10	—	1.28 ± 0.09	0.19 ± 0.03	0.74 ± 0.05
	90	—	1.41 ± 0.04	0.75 ± 0.11	1.03 ± 0.02

Die in der Tabelle dargestellte Änderung der Aktivierungskonstanten $K_{0.5}$ – d. h. der für eine halbmaximale Aktivierung notwendigen Konzentration der Kationen – war schon bei der Erstbeschreibung des Enzyms durch *Skou*^[86] aufgefallen (vgl. Abb. 2). *Skou* nahm als Ursache dieser Verschiebung der $K_{0.5}$ -Werte eine Konkurrenz des K^+ an der Na^+ -Bindungsstelle und des Na^+ an der K^+ -Bindungsstelle an, eine Auffassung, die auch von anderen geteilt wird^[50, 86, 97, 156]. Über die Anzahl der Bindungsstellen für Na^+ und K^+ ließ sich durch kinetische Untersuchungen keine sichere Aussage machen. *Ahmed et al.*^[157] postulierten zwei Na^+ -Bindungsstellen pro K^+ -Bindungsstelle, während *Robinson*^[155] mehrere Bindungsstellen für Na^+ und K^+ annimmt, die zur gleichen Zeit oder nacheinander besetzt werden können.

3.6. Studien zum Nachweis von Na^+ - und K^+ -Bindungsstellen

Ein direkter Nachweis von Na^+ - und K^+ -Bindungsstellen am Enzym konnte bisher wegen der Unreinheit der Enzympräparationen nicht geführt werden. Bei der ATP-abhängigen Bindung von Na^+ an Rattenmikrosomen (vgl. Abschnitt 3), die *Järnefelt* und *von Stedingk*^[158] beobachteten, zeigte sich erst bei einer NaCl-Konzentration von 0.1 mol/l eine halbmaximale Sättigung des Enzyms. Die halbmaximale Aktivierung der ATP-ADP-Transphosphorylierungsreaktion durch Na^+ wird bei weit geringeren Konzentrationen erreicht^[116, 117]. Allein dieser Befund spricht gegen eine Beteiligung der von *Järnefelt* und *von Stedingk* gefundenen Na^+ -Bindungsstelle am Na^+ -Transport.

Ahmed und Judah^[159] konnten außerdem zeigen, daß die Na^+ -Bindungsfähigkeit der Mikrosomen durch EDTA weit mehr gefördert wird als durch ATP. Die Autoren schlossen daher auf eine Konkurrenz des Mg^{2+} mit dem Na^+ um die Acceptorstelle. Für eine unspezifische Bindung des Na^+ an die Zellmembranen spricht auch, daß nach Zugabe von 0.1 mol/l NaCl, KCl oder LiCl zu Mikrosomen gleiche Mengen H^+ /mg Protein abgegeben werden.

Die Phosphorylierungsversuche mit endständig markiertem [^{32}P]-ATP^[96, 98, 104–113] könnten den Eindruck aufkommen lassen, daß für die Kationen-Spezifität des Enzyms ATP erforderlich ist. Aus Hemmversuchen mit Diisopropylfluorophosphat^[160], *N*-Äthylmaleinimid (NEM)^[161] und $BeCl_2$ ^[162] muß jedoch angenommen werden, daß Na^+ und K^+ auch in Abwesenheit von ATP spezifisch mit dem Enzym reagieren^[162]. So schützt Na^+ in Abwesenheit von ATP die $(Na^+ + K^+)$ -aktivierte ATPase gegen die Inaktivierung durch $BeCl_2$, während K^+ die Inaktivierung verstärkt^[162, 163]. Die Schutz- und Inaktivierungseffekte der Kationen treten bei Konzentrationen auf, die im physiologischen Bereich liegen.

Bei eigenen Untersuchungen konnte eine pH-abhängige Änderung der Schutzwirkung von Alkalimetall-Ionen ge-

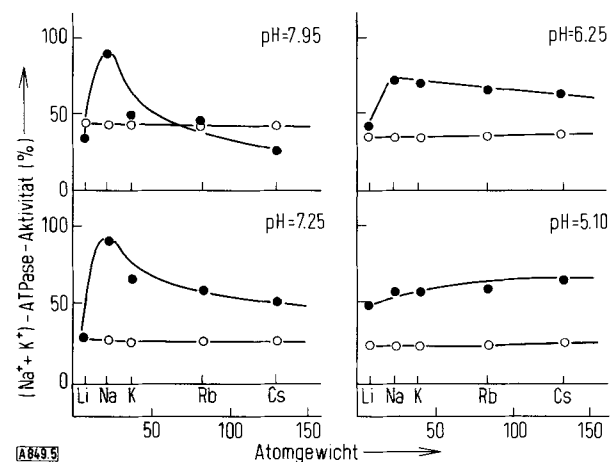


Abb. 5. Schutzwirkung von Alkalimetall-Ionen gegen die Inaktivierung der $(Na^+ + K^+)$ -aktivierten ATPase durch Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach *Schoner* [165]). Ordinate: ATPase-Aktivität nach 6 min Inkubation mit DCCD, bezogen auf Kontrolle ohne DCCD (in Prozent). ● = Kationen-Konzentration 60 mmol/l; ○ = Kontrolle ohne Kation.

gen die Inaktivierung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATPase durch Dicyclohexylcarbodiimid gefunden werden (Abb. 5)^[164, 165]. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß sich mit der Änderung der Dissoziation einer sauren Gruppe des Enzyms auch die Kationen-Spezifität ändert. Der Nachweis einer Verschiebung des pH-Optimums der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATPase mit dem Na^+/K^+ -Verhältnis im Testmedium^[165–167] steht mit dieser Annahme im Einklang.

3.7. Zur Wirkungsweise der Herzglykoside

Herzglykoside hemmen spezifisch den aktiven Na^+ , K^+ -Transport und die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierte ATPase^[66, 168]. Das Studium der Wirkungsweise dieser Hemmstoffe läßt daher weiteren Aufschluß über die Vorgänge beim Na^+ , K^+ -Transport erwarten. Die Hemmwirkung des Strophanthins tritt zeit- und temperaturabhängig ein. Der Wirkungseintritt wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von Mg^{2+} , Na^+ und ATP stark beschleunigt^[125]. Dieser Befund läßt daran denken, daß das Strophanthin mit dem phosphorylierten Enzym reagiert^[169, 170]. Im Einklang mit dieser Annahme konnte gezeigt werden, daß für die Bindung von ^3H -markierten Herzglykosiden gleichzeitig Mg^{2+} , Na^+ und ATP benötigt werden^[125, 171, 172]. Strophanthin reagiert in stöchiometrischen Mengen mit dem Enzym (ein Molekül Strophanthin pro zwei Phosphorylierungsstellen)^[125, 173].

Außer unter physiologischen Bedingungen (Schritt I in Abb. 4) kann das phosphorylierte Enzym auch durch Inkubation des Enzyms mit Strophanthin, anorganischem Phosphat und Mg^{2+} gewonnen werden (Schritte IV, VI, VII in Abb. 4)^[125–127]. Auch das derart erhaltene phosphorylierte Enzym bindet mehr [^3H]-Strophanthin als das nicht-phosphorylierte Enzym^[172].

Die Menge des unter den zuletzt genannten Bedingungen an das Enzym gebundenen [^3H]-Strophanthins nimmt in Gegenwart von Na^+ stark ab^[172], andererseits wird eine Na^+ -abhängige Steigerung der [^3H]-Strophanthin-Aufnahme in Gegenwart von Mg^{2+} und ATP beobachtet^[125, 171, 172]. Die Na^+ -abhängige Steigerung der Strophanthin-Bindung an die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierte ATPase in Gegenwart von Mg^{2+} und ATP sowie die Na^+ -abhängige Hemmung der Strophanthin-Bindung in Gegenwart von Mg^{2+} und anorganischem Phosphat (P_i) zeigen, daß „der Konformationszustand des Enzyms von besonderer Bedeutung für das Bindungsvermögen für Strophanthin ist“^[173].

Nach Tobin und Sen^[172] wird das Gleichgewicht zwischen den beiden angenommenen Konformationszuständen der ATPase – E1 und E2 – durch Mg^{2+} und P_i zugunsten von E2 verschoben (Schritt IV in Abb. 4). In dieser Form, die äquivalent mit E2-P ist, kann Strophanthin an das Enzym gebunden werden. Strophanthin hält das Enzym in der E2-Konformation fest. In dieser Konformation ist zugleich die Affinität des Na^+ zum Enzym erniedrigt. Das Gleichgewicht zwischen E1 und E2 wird in Gegenwart von Mg^{2+} und P_i dann zugunsten von E1 verschoben, wenn Na^+ in höheren Konzentrationen zugegen ist. Strophanthin kann unter diesen Bedingungen nicht gebunden werden. E1 in seiner phosphorylierten und nichtphosphorylierten Form müßte demnach Na^+ -sensitiv sein.

Der Nachweis einer spezifischen Na^+ -Schutzwirkung gegenüber der Inaktivierung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATPase durch BeCl_2 ^[162, 163] und der antagonistischen Wirkung des K^+ am nichtphosphorylierten Enzym steht mit dieser Annahme im Einklang.

3.8. Eigenschaften des enzym-gebundenen Herzglykosids

Das enzym-gebundene radioaktive Steroid tauscht seine Radioaktivität mit unmarkierten Herzglykosiden nicht aus. Es löst sich jedoch bei höheren Temperaturen und im sauren Milieu unterhalb $\text{pH} = 5$ vom Enzym und kann mit Methanol extrahiert werden^[125, 174]. Aufgrund der Extrahierbarkeit und der Beobachtung, daß die Zeit bis zum Auftreten der Hemmwirkung der Steroide im umgekehrten Verhältnis zur Anzahl der Hydroxygruppen und der Zuckersubstituenten steht, schlossen Albers et al.^[125] in Übereinstimmung mit Annahmen von Portius und Repke^[170], daß die Herzglykoside hydrophile Wechselbeziehungen mit hydrophoben Regionen des Enzyms eingehen. Dieser Annahme widersprechen jedoch Untersuchungen von Yoda und Hokin^[175], die zeigten, daß die Hemmwirkung der Aglykone der Cardenolide besser reversibel ist, als die der Glykoside.

4. Ausblick

Der Nachweis von Na^+ -spezifischen Schutzeffekten gegen inaktivierende Agentien in Abwesenheit von ATP^[162–165] zeigt an, daß am Enzym kationen-spezifische Acceptorgruppen vorhanden sind. Das phosphorylierte Zwischenprodukt scheint daher am Zustandekommen der Kationen-Spezifität nicht beteiligt zu sein, sondern dürfte vielmehr am Transport der Kationen durch die Zellmembran mitwirken. Wahrscheinlich ist mit diesem Prozeß eine Konformationsänderung des Enzyms verbunden^[114, 115, 123, 124, 171–173]. Unklar ist, ob Carrier den Transport der Kationen übernehmen. Es bleibt zu hoffen, daß die weiteren Untersuchungen über die Wirkungsweise der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierten ATPase Antwort auf diese Frage geben.

Eingegangen am 8. März 1971 [A 849]

- [1] H. B. Steinbach in M. Florkin u. H. S. Mason: Comparative Biochemistry. Academic Press, New York 1962, Bd. 4, S. 667.
- [2] H. H. Ussing in O. Eichler u. A. Fawah: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Springer, Berlin 1960, Bd. 13, S. 1.
- [3] R. P. Kerner: Cell. K. Butterworth Inc., London 1965, S. 121.
- [4] H. Passow u. E. Vielhauer, Pflügers Arch. 288, 1 (1966).
- [5] H. Passow in: Biochemie des aktiven Transportes. 12. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie. Springer, Berlin 1961, S. 55.
- [6] S. Lepke u. H. Passow, J. Gen. Physiol. 51, 3565 (1968).
- [7] W. Wilbrandt, Pflügers Arch. 243, 519 (1940).
- [8] A. H. Hegnauer, W. O. Fenn u. D. M. Cobb, J. Cell. Comp. Physiol. 4, 505 (1934).
- [9] E. J. Conway, R. P. Kerner u. J. A. Zadunaisky, J. Physiol. 155, 263 (1961).
- [10] D. M. Blond u. R. Whittam, Biochem. J. 97, 523 (1965).
- [11] D. M. Blond u. R. Whittam, Biochem. J. 92, 158 (1964).
- [12] R. Whittam, M. Ager u. J. S. Wiley, Nature 202, 1111 (1964).
- [13] N. Reed u. I. N. Fain, J. Biol. Chem. 243, 6077 (1968).
- [14] E. E. Gordon u. M. DeHartog, Biochim. Biophys. Acta 162, 220 (1968).

- [15] E. Racker u. J. Krinsky, *J. Biol. Chem.* 161, 453 (1954).
- [16] C. A. Ashford u. K. C. Dixon, *Biochem. J.* 29, 157 (1935).
- [17] G. A. Le Page, *J. Biol. Chem.* 176, 1009 (1948).
- [18] J. N. Fain, *Mol. Pharmacol.* 4, 349 (1968).
- [19] M. Lubin u. H. L. Ennis, *Biochim. Biophys. Acta* 80, 614 (1964).
- [20] S. H. Appel, L. Autilio, B. W. Festoff u. A. V. Escneta, *J. Biol. Chem.* 244, 3166 (1969).
- [21] P. J. G. Mann, M. Tennenbaum u. J. Z. Quastel, *Biochem. J.* 33, 822 (1939).
- [22] M. F. Utter, *J. Biol. Chem.* 185, 499 (1950).
- [23] H. Beinert, D. E. Green, H. Hele, H. Hift, R. W. v. Korff u. C. V. Ramakrishnan, *J. Biol. Chem.* 203, 35 (1953).
- [24] L. T. Webster, *J. Biol. Chem.* 241, 5504 (1966); 242, 1232 (1967).
- [25] J. W. Raker, J. M. Taylor, J. M. Weller u. A. B. Hastings, *J. Gen. Physiol.* 33, 691 (1950).
- [26] C. W. Shappard u. W. R. Martin, *J. Gen. Physiol.* 33, 703 (1950).
- [27] H. H. Ussing, *Physiol. Rev.* 29, 127 (1949).
- [28] E. J. Conway, *Physiol. Rev.* 37, 84 (1957).
- [29] R. W. Straub, *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* 23, 271 (1967).
- [30] A. Rothstein, *Annu. Rev. Physiol.* 30, 15 (1968).
- [31] H. J. Schatzmann, *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* 23, 260 (1967).
- [32] J. S. Wiley, *Nature* 221, 1222 (1969).
- [33] K. Nakao, S. Kurashina u. M. Nakao, *Life Sci.* 6, 595 (1967).
- [34] E. Heinz, *Annu. Rev. Physiol.* 29, 21 (1967).
- [35] E. E. Windhager, G. Wittembury, D. E. Oken, H. J. Schatzmann u. A. K. Solomon, *Amer. J. Physiol.* 197, 313 (1959).
- [36] E. Schoffeniels: *Cellular Aspects of Membrane Permeability*, Pergamon Press, Oxford 1967.
- [37] W. W. Hofmann, *Annu. Rev. Med.* 20, 101 (1969).
- [38] R. W. Albers, *Annu. Rev. Biochem.* 36, 727 (1967).
- [39] P. C. Caldwell, *Physiol. Rev.* 48, 1 (1968).
- [40] R. Whittam u. K. P. Wheeler, *Annu. Rev. Physiol.* 32, 21 (1970).
- [41] R. K. Crane in C. F. Code: *Handbook of Physiology*. Section 6, Vol. III (1968), S. 1323.
- [42] K. Ring, *Angew. Chem.* 82, 343 (1970); *Angew. Chem. internat. Edit.* 9, 345 (1970).
- [43] F. B. Straub, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 4, 235 (1953).
- [44] P. C. Caldwell, *J. Physiol.* 132, 35 P. (1956).
- [45] P. C. Caldwell, *J. Physiol.* 152, 545 (1960).
- [46] P. C. Caldwell, A. L. Hodgkin, R. D. Keynes u. T. I. Shaw, *J. Physiol.* 152, 561 (1960).
- [47] P. C. Caldwell, A. L. Hodgkin u. T. I. Shaw, *J. Physiol.* 147, 18 P. (1959).
- [48] P. C. Caldwell u. R. D. Keynes, *J. Physiol.* 137, 12 P. (1957).
- [49] J. F. Hofman, *Circulation* 26, 1201 (1962).
- [50] R. L. Post, C. R. Merrit, C. R. Kinsolving u. C. D. Albright, *J. Biol. Chem.* 235, 1796 (1960).
- [51] R. Whittam, *J. Physiol.* 140, 479 (1958).
- [52] F. J. Brinley jr. u. L. J. Mullins, *J. Gen. Physiol.* 52, 181 (1968).
- [53] H. J. Schatzmann, *Experientia* 20, 551 (1964).
- [54] A. K. Sen u. R. L. Post, *J. Biol. Chem.* 239, 345 (1964).
- [55] I. M. Glynn, *J. Physiol.* 134, 278 (1956).
- [56] R. L. Post u. P. C. Jolly, *Biochim. Biophys. Acta* 25, 119 (1957).
- [57] M. J. Maizels, *J. Physiol.* 195, 657 (1968).
- [58] I. M. Glynn, *J. Physiol.* 160, 18 P. (1962).
- [59] R. Whittam, *Biochem. J.* 84, 110 (1962).
- [60] R. Whittam u. M. Ager, *Biochim. Biophys. Acta* 65, 383 (1962).
- [61] H. J. Schatzmann, *Biochim. Biophys. Acta* 94, 89 (1968).
- [62] R. N. Priestland u. R. Whittam, *Biochem. J.* 109, 369 (1968).
- [63] R. A. Sjodin u. L. A. Beaugé, *J. Gen. Physiol.* 51, 152s (1968).
- [64] I. M. Glynn, *J. Physiol.* 136, 148 (1957).
- [65] V. Kofoed-Johnsen, *Acta Physiol. Scand.* 42, Suppl. 145, 87 (1958).
- [66] H. J. Schatzmann, *Helv. Physiol. Acta* 11, 346 (1953).
- [67] P. C. Caldwell u. R. D. Keynes, *J. Physiol.* 148, 8 P. (1959).
- [68] P. F. Baker, *J. Physiol.* 180, 383 (1965).
- [69] P. F. Baker u. T. I. Shaw, *J. Physiol.* 180, 424 (1965).
- [70] P. J. Garrahan u. I. M. Glynn, *J. Physiol.* 192, 217 (1967).
- [71] R. L. Post, C. D. Albright u. K. Dayani, *J. Gen. Physiol.* 50, 1201 (1967).
- [72] P. DeWeer, *Nature* 219, 730 (1968); 207, 1098 (1965).
- [73] P. J. Garrahan u. I. M. Glynn, *Nature* 207, 1098 (1965).
- [74] P. J. Garrahan u. I. M. Glynn, *J. Physiol.* 192, 189 (1967).
- [75] P. J. Garrahan u. I. M. Glynn, *Nature* 211, 1414 (1966).
- [76] P. J. Garrahan u. I. M. Glynn, *J. Physiol.* 192, 237 (1967).
- [77] I. M. Glynn u. V. L. Lew, *J. Physiol.* 202, 89 P. (1969).
- [78] A. F. Lant u. R. Whittam, *J. Physiol.* 197, 66 P. (1968).
- [79] A. F. Lant u. R. Whittam, *J. Physiol.* 199, 457 (1968).
- [80] I. M. Glynn u. V. L. Lew, *J. Physiol.* 207, 393 (1970).
- [81] V. L. Lew, I. M. Glynn u. J. C. Ellroy, *Nature* 225, 865 (1970).
- [82] M. Chmoulovsky, *Experientia* 26, 679 (1970).
- [83] A. F. Lant, R. N. Priestland u. R. Whittam, *J. Physiol.* 207, 291 (1970).
- [84] I. M. Glynn, V. L. Lew u. U. Lüthi, *J. Physiol.* 207, 371 (1970).
- [85] A. G. Dawson u. R. Whittam, *Biochim. Biophys. Acta* 203, 590 (1970).
- [86] J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta* 23, 394 (1957).
- [87] J. C. Skou, *Physiol. Rev.* 45, 596 (1965).
- [88] S. L. Bonting u. L. Caravaggio, *Arch. Biochem. Biophys.* 101, 37 (1963).
- [89] W. Schoner, Ch. v. Ilberg, R. Kramer u. W. Seubert, *European J. Biochem.* 1, 334 (1967).
- [90] J. Somogyi, *Biochim. Biophys. Acta* 151, 421 (1968).
- [91] T. Ohnishi u. H. Kawamura, *J. Biochem. (Tokyo)* 56, 377 (1964).
- [92] M. Tatibani, *J. Biochem. (Tokyo)* 53, 260 (1963).
- [93] H. J. Schatzmann, *Nature* 196, 677 (1962).
- [94] D. W. Towle u. H. J. Copenhaver jr., *Biochim. Biophys. Acta* 203, 124 (1970).
- [95] A. Kahlenberg, N. C. Dulak, J. F. Dixon, P. R. Galsworthy u. L. E. Hokin, *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 253 (1969).
- [96] R. Gibbs, P. M. Roddy u. E. Titus, *J. Biol. Chem.* 240, 2181 (1965).
- [97] J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta* 42, 6 (1960).
- [98] W. Schoner, R. Beusch u. R. Kramer, *European J. Biochem.* 7, 102 (1968).
- [99] F. H. Epstein u. R. Whittam, *Biochem. J.* 99, 232 (1966).
- [100] I. M. Glynn, *J. Physiol.* 169, 452 (1963).
- [101] L. J. Opit, H. Potter u. J. S. Charnock, *Biochim. Biophys. Acta* 120, 159 (1966).
- [102] N. Mizuno, K. Nagao, T. Nakao, Y. Tashima, M. Fujita u. M. Nakao, *Biochim. Biophys. Acta* 168, 311 (1968).
- [103] G. R. Kepner u. R. I. Macey, *Biochim. Biophys. Acta* 163, 188 (1968).
- [104] R. W. Albers, S. Fahn u. G. Koval, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 50, 474 (1963).
- [105] R. L. Post, A. K. Sen u. A. S. Rosenthal, *J. Biol. Chem.* 240, 1437 (1965).
- [106] K. Nagao, T. Kanazawa, N. Mizuno, Y. Tashima, T. Nakao u. M. Nakao, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 759 (1965).
- [107] L. E. Hokin, P. S. Sastry, P. R. Galsworthy u. A. Yoda, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 177 (1965).
- [108] K. Nagao, N. Mizuno, M. Fujita, T. Nakao u. M. Nakao, *Biochim. Biophys. Acta* 143, 239 (1967).
- [109] T. Kanazawa, M. Saito u. Y. Tonomura, *J. Biochem. (Tokyo)* 61, 555 (1967).
- [110] J. C. Skou u. C. Hilberg, *Biochim. Biophys. Acta* 185, 198 (1969).
- [111] J. S. Charnock u. H. A. Potter, *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 42 (1969).
- [112] H. Bader, R. L. Post u. G. H. Bond, *Biochim. Biophys. Acta* 150, 41 (1968).
- [113] R. Blostein, *J. Biol. Chem.* 243, 1957 (1968).
- [114] S. Fahn, G. J. Koval u. R. W. Albers, *J. Biol. Chem.* 243, 1993 (1968).
- [115] S. Fahn, G. J. Koval u. R. W. Albers, *J. Biol. Chem.* 241, 1882 (1966).
- [116] S. Fahn, M. R. Hurley, G. J. Koval u. R. W. Albers, *J. Biol. Chem.* 241, 1890 (1966).
- [117] G. J. Siegel u. R. W. Albers, *J. Biol. Chem.* 242, 4972 (1967).
- [118] W. L. Stahl, A. Sattin u. H. McIlwain, *Biochem. J.* 99, 404 (1966).
- [119] W. L. Stahl, *J. Neurochem.* 15, 511 (1968).
- [120] R. Blostein, *J. Biol. Chem.* 245, 270 (1970).
- [121] R. Rendi, *Biochim. Biophys. Acta* 198, 113 (1970).
- [122] C. F. Chignell u. E. Titus, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 64, 324 (1969).

- [123] R. L. Post, S. Kume, T. Tobin, B. Orcutt u. A. K. Sen, *J. Gen. Physiol.* 54, 306s (1968).
- [124] A. K. Sen, T. Tobin u. R. L. Post, *J. Biol. Chem.* 244, 6595 (1969).
- [125] R. W. Albers, G. J. Koval u. G. J. Siegel, *Mol. Pharmacol.* 4, 324 (1968).
- [126] G. J. Siegel, G. J. Koval u. R. W. Albers, *J. Biol. Chem.* 244, 3264 (1969).
- [127] G. E. Lindenmayer, A. H. Laughter u. A. Schwartz, *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 187 (1968).
- [128] H. Bader, A. K. Sen u. R. L. Post, *Biochim. Biophys. Acta* 118, 106 (1966).
- [129] I. M. Glynn, C. W. Slayman, J. Eichberg u. R. M. C. Dawson, *Biochem. J.* 94, 692 (1965).
- [130] M. R. Hokin u. L. E. Hokin, *J. Biol. Chem.* 239, 2116 (1964).
- [131] A. Kahlenberg, P. R. Galsworthy u. L. E. Hokin, *Science* 157, 434 (1967).
- [132] A. Kahlenberg, P. R. Galsworthy u. L. E. Hokin, *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 331 (1968).
- [133] W. Schoner, R. Kramer u. W. Seubert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 403 (1966).
- [134] C. F. Chignell u. E. Titus, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 56, 1620 (1966).
- [135] C. F. Chignell u. E. Titus, *Biochim. Biophys. Acta* 159, 345 (1968).
- [136] W. Schoner u. H. Schmidt, *FEBS-Lett.* 5, 285 (1969).
- [137] H. Bader u. A. K. Sen, *Biochim. Biophys. Acta* 118, 116 (1966).
- [138] G. Sachs, J. D. Rose u. B. F. Hirschowitz, *Arch. Biochem. Biophys.* 119, 277 (1967).
- [139] K. Nagai, F. Izumi u. H. Yoshida, *J. Biochem. (Tokyo)* 59, 295 (1966).
- [140] F. Izumi, K. Nagai u. H. Yoshida, *J. Biochem. (Tokyo)* 60, 533 (1966).
- [141] A. Askari, *Biochim. Biophys. Acta* 191, 198 (1969).
- [142] H. Yoshida, K. Nagai, T. Ohashi u. J. Nakagawa, *Biochim. Biophys. Acta* 171, 178 (1969).
- [143] Y. Israel u. E. Titus, *Biochim. Biophys. Acta* 139, 450 (1967).
- [144] A. Askari u. D. Koyal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 227 (1968).
- [145] W. Schoner, Habilitationsschrift, Universität Göttingen 1969.
- [146] B. Formby u. J. Clausen, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 349, 909 (1968).
- [147] J. D. Robinson, *Biochemistry* 8, 3348 (1969).
- [148] M. Fujita, T. Nakao, Y. Tashima, N. Mizuno, K. Nagao u. M. Nakao, *Biochim. Biophys. Acta* 117, 42 (1966).
- [149] J. D. Robinson, *Nature* 220, 1325 (1968).
- [150] B. Formby u. J. Clausen, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 973 (1969).
- [151] K. Nagai u. H. Yoshida, *Biochim. Biophys. Acta* 128, 410 (1966).
- [152] J. D. Robinson, *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 164 (1970).
- [153] R. F. Squires, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 27 (1965).
- [154] J. D. Robinson, *Biochemistry* 6, 3250 (1967).
- [155] J. D. Robinson, *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 17 (1970).
- [156] A. L. Green u. C. B. Taylor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 118 (1964).
- [157] K. Ahmed, J. B. Judah u. P. G. Scholefield, *Biochim. Biophys. Acta* 120, 351 (1966).
- [158] J. Järnefelt u. L.-V. von Stedingk, *Acta Physiol. Scand.* 57, 328 (1963).
- [159] K. Ahmed u. J. D. Judah, *Biochim. Biophys. Acta* 112, 58 (1966).
- [160] L. E. Hokin u. A. Yoda, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 52, 454 (1964).
- [161] J. C. Skou u. C. Hilberg, *Biochim. Biophys. Acta* 110, 359 (1965).
- [162] G. Toda, T. Hashimoto, T. Asakura u. S. Minakami, *Biochim. Biophys. Acta* 135, 570 (1967).
- [163] G. Toda, *J. Biochem. (Tokyo)* 64, 457 (1968).
- [164] W. Schoner u. H. Schmidt, *Arch. Physiol.* 319, R 89 (1970).
- [165] W. Schoner u. H. Schmidt, unveröffentlichte Versuche.
- [166] M. Fujita, K. Nagao, N. Mizuno, Y. Tashima, T. Nakao u. M. Nakao, *J. Biochem. (Tokyo)* 61, 473 (1967).
- [167] M. Fujita, K. Nagao, N. Mizuno, Y. Tashima, T. Nakao u. M. Nakao, *Biochem. J.* 106, 113 (1968).
- [168] I. M. Glynn, *Pharmacol. Rev.* 16, 381 (1964).
- [169] J. S. Charnock, A. Rosenthal u. R. L. Post, *Austral. J. Exptl. Biol.* 41, 674 (1963).
- [170] H. J. Portius u. K. Repke, *Arzneimittelforsch.* 14, 1073 (1964).
- [171] H. Matsui u. A. Schwartz, *Biochim. Biophys. Acta* 151, 655 (1968).
- [172] T. Tobin u. A. K. Sen, *Biochim. Biophys. Acta* 198, 120 (1970).
- [173] A. Schwartz, H. Matsui u. A. H. Laughter, *Science* 159, 323 (1968).
- [174] K. Repke, M. Est u. H. J. Portius, *Biochem. Pharmacol.* 14, 1785 (1965).
- [175] A. Yoda u. L. E. Hokin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 880 (1970).