

Die Kristallstruktur des Kaliumkanals: eine neue Ära in der Chemie der biologischen Signalübertragung

Dennis A. Dougherty* und Henry A. Lester

An den integralen Proteinen des Nervensystems wie Ionenkanälen, Neurorezeptoren und Transportproteinen für Neurotransmitter finden einige der beeindruckendsten chemischen Vorgänge in lebenden Systemen statt. Es handelt sich um die Moleküle des Denkens, des Erinnerns und der Wahrnehmung von Sinneseindrücken, und eigentlich wissen wir eine ganze Menge über sie. So ermöglicht die außergewöhnliche Empfindlichkeit der Patch-clamp-Technik die Charakterisierung eines Ionenkanals, wenn dieser nur alle 20 min für eine Dauer von 0.1 ms geöffnet ist – ein dynamischer Bereich von 10^7 s. Außerdem wurden Hunderte von Untersuchungen mit der Technik der ortsspezifischen Mutagenese durchgeführt, die zu interessanten Funktionsänderungen führten, aus denen man auf die Rolle individueller Aminosäureseitenketten in Ionenkanal-Proteinen schließen konnte. Aus der Sicht des Chemikers wissen wir allerdings noch wenig über Einzelheiten der Strukturen, die der Funktion der Ionenkanäle zugrunde liegen. Die Begründung hierfür ist einfach: Hochauflösende Methoden zur Strukturaufklärung wie die Röntgenstrukturanalyse und die NMR-Spektroskopie sind bei integralen Membranproteinen bestens eingeschränkt einsetzbar. Daher ist die Veröffentlichung der Kristallstruktur eines Kaliumkanals bei einer Auflösung von 3.2 Å von Rod MacKinnon et al.^[1] von der Rockefeller University ein Meilenstein, vielleicht sogar ein Wendepunkt in der molekularen Neurobiologie.

Kaliumkanäle spielen eine zentrale Rolle für das Funktionieren nahezu jeder lebenden Zelle. Indem sie im Nervensystem das Aktionspotential modulieren und das Ruhepotential der Membran festlegen, steuern sie die Frequenz der

Nervenimpulse. Im Herz-Kreislauf-System regulieren Kaliumkanäle Dauer und Frequenz des Herzschlags. An anderer Stelle kontrollieren sie den Durchtritt von Wasser und Salzen durch die Membranen von Niere, Luftröhre und Darm. Dabei leisten sie in chemischer Hinsicht bemerkenswertes. Kaliumkanäle weisen eine äußerst hohe Selektivität auf – etwa 10000:1 für K^+ gegenüber Na^+ , trotz der minimalen Strukturunterschiede zwischen diesen beiden Ionen (Ionenradien: 1.33 bzw. 0.95 Å). Gleichzeitig halten die Kaliumkanäle einen gewaltigen Ionenfluß aufrecht – in einigen Fällen fließen ca. 10^8 Ionen pro Sekunde durch einen einzelnen offenen Kanal. Die Chemiker setzen im allgemeinen hohe Selektivität mit fester Bindung gleich, aber ganz offensichtlich hat die Natur einen Weg gefunden, das eine ohne das andere zu erreichen.

In wenig mehr als einem Jahrzehnt sind wir von nahezu vollständiger Unkenntnis der molekularen Architektur der Kaliumkanäle zu einer hochauflösten Struktur fortgeschritten. Der erste Durchbruch war die Klonierung des Shaker-Kanals (so genannt nach einer *Drosophila*-Mutante, deren Beine zu zittern beginnen, wenn die Fliege Diethylether-Dämpfen ausgesetzt ist) in drei Labors.^[2] Es folgte eine Flut von Aktivitäten, um wichtige Strukturelemente zu definieren, die 1990 zum „wunderbaren Jahr der K^+ -Kanäle“^[3] machte. Der nächste wichtige Schritt war die Entdeckung,^[4] daß man die Kaliumkanäle in zwei unterschiedliche Familien einteilen kann: in die spannungsabhängigen Kanäle K_v (wozu auch der Shaker-Kanal gehört) und die einwärts-gleichrichtenden Kanäle K_{ir} (Abb. 1). Wie die Namen schon andeuten, öffnen oder schließen sich die zur ersten Familie gehörenden Kanäle als Reaktion auf Änderungen des zellulären Membranpotentials, während die Kanäle der zweiten Familie nur einen Kaliumfluß ins Zellinnere gegen das natürliche Konzentrationsgefälle zulassen – eine weitere bemerkenswerte chemische Eigenschaft. Im Hinblick auf die Struktur sind die K_{ir} -Kanäle kleiner und bestehen aus zwei Transmembrandomänen, die durch einen Poren(P)-Bereich verbunden sind. Die K_v -Kanäle haben vier zusätzliche Transmembrandomänen, darunter eine (S4), bei der jeder dritte Rest positiv geladen ist und die als Spannungssensor wirkt. In beiden Fällen ist der funktionsfähige Kanal ein Tetramer der in Abbildung 1 gezeigten Proteine.

Der Weg zu einer hochauflösten Struktur begann mit einem anderen Fortschritt bei der Klonierung. 1995 berichteten Schrempf et al.^[5] über die Identifizierung, Klonierung

[*] Prof. D. A. Dougherty
Division of Chemistry and Chemical Engineering
California Institute of Technology
Pasadena, CA 91125 (USA)
Fax: (+1) 626-564-9297
E-mail: dad@igor.caltech.edu

Prof. H. A. Lester
Division of Biology
California Institute of Technology
Pasadena, CA 91125 (USA)

[**] Wir danken den Professoren Doug Rees (California Institute of Technology), Chris Miller (Brandeis University) und Rod MacKinnon (Rockefeller University) für hilfreiche Diskussionen. Unsere eigenen Arbeiten über Kaliumkanäle und verwandte Proteine wurden von den National Institutes of Health (NS-34407 und GM 29836) gefördert.

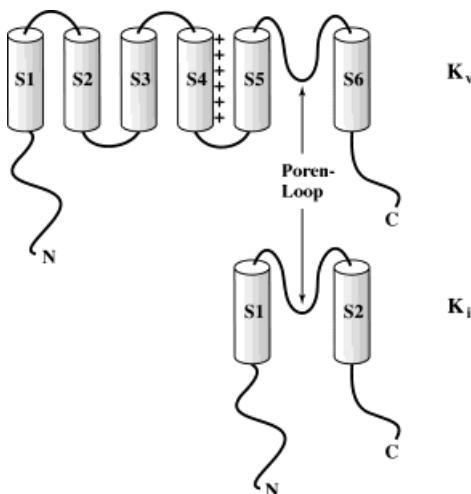


Abb. 1. Vorhergesagte Topologien der beiden Kaliumkanal-Familien anhand von Sequenzanalysen und biochemischen Untersuchungen. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_v) wie der Shaker-Kanal haben sechs Transmembrandomänen, während die einwärts-gleichrichtenden Kanäle (K_{ir} ; $i = \text{inward-rectifier}$) lediglich zwei solcher Domänen aufweisen. Bei beiden Familien sind der N- und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert. Proteine beider Familien enthalten einen Poren(P)-Loop – eine konservierte Sequenz, die wahrscheinlich einen großen Teil des Kanals ausmacht und die das Selektivitätsfilter enthält. Der hier beschriebene KcsA-Kanal weist die Topologie eines K_{ir} -Kanals auf.

und Charakterisierung eines Kaliumkanals aus dem Bakterium *Streptomyces lividans*. Dieses Ergebnis wurde erst durch die intensiven Bemühungen auf dem Gebiet der Sequenzierung kleiner Genome ermöglicht. Bakterien sind zwar keine Neurone – dennoch waren sich alle Forscher einig, daß dieser bakterielle Kanal den Kaliumkanälen eukaryontischer Zellen so weit ähnelte, daß er die wichtigsten Strukturelemente mit ihnen gemeinsam hatte. Außerdem war er ziemlich robust und ließ sich leicht in künstlichen Membranen rekonstituieren. Weil es sich um einen bakteriellen Kanal handelt, konnte eine der größten Hürden für die Strukturbestimmung überwunden werden: große Mengen an Material zu gewinnen. Denn tatsächlich ließ sich der K^+ -Kanal von *S. lividans*, mittlerweile als KcsA bekannt, in *E. coli* überexprimieren. Das Rennen um die Strukturlösung hatte begonnen!

Aber auch mit ausreichenden Mengen an Protein war die Strukturaufklärung eine Herausforderung. Die Kristalle sind strahlungsempfindlich, sie beugen die Röntgenstrahlen anisotrop, und viele ortsspezifische Mutanten waren notwendig, um Schweratomderivate der Proteinkristalle zu erhalten. Schließlich wurde durch Synchrotronmessungen an der Cornell High Energy Synchrotron Source eine brauchbare Struktur erhalten. Zunächst muß darauf hingewiesen werden, daß eine Auflösung von 3.2 Å nach den heutigen Standards in der Kristallographie von Makromolekülen nicht besonders hoch ist. Der Verlauf des Proteinkristalls ist deutlich erkennbar, einzelne Carbonylgruppen beispielsweise sind aber nicht zu sehen. Die Positionen der Seitenketten können grob ausgemacht werden, allerdings ohne dabei viele Details zu erkennen. Dennoch kann man aus dieser Struktur viel lernen.

Topologisch gesehen gehört KcsA mit zwei Transmembrandomänen zur K_{ir} -Familie. Die Struktur zeigt, daß sie

einen hohen α -Helix-Anteil aufweisen (Abb. 2). Die insgesamt acht Helices (zwei von jeder Untereinheit) sind um die zentrale Pore herum angeordnet und dabei leicht verdreht und geknickt, so daß sie sich wie eine Blüte oder ein

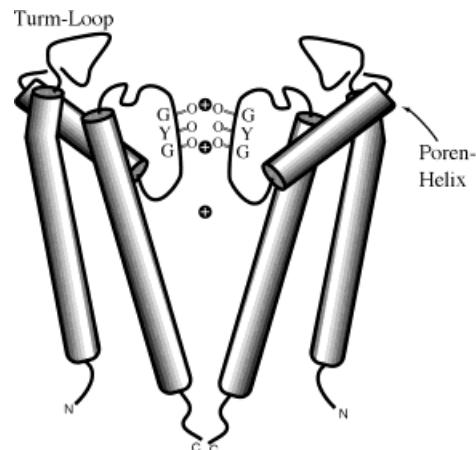


Abb. 2. Schematische Darstellung der Struktur des K^+ -Kanals. Zwei der vier Untereinheiten sind gezeigt, die beiden anderen liegen über und unter der Papierebene. Beginnend am intrazellulär lokalisierten N-Terminus enthält jede Untereinheit eine α -Helix mit einem leichten Knick am oberen Ende; den „Turm“-Loop, der Toxinbindungsstellen enthält; die Poren-Helix; den Gly-Tyr-Gly(GYG)-Loop und eine lange C-terminale Helix. Weiterhin sind drei Kationen ungefähr an den Positionen gezeigt, wo sie auch im Kristall lokalisiert wurden. Zwei befinden sich im GYG-Selektivitätsfilter, während das dritte Ion im darunter liegenden wassergefüllten Hohlraum nahe der Mitte der Transmembranregion ist. Einige intrazelluläre Reste (22 N-terminale und 39 C-terminale) sind nicht sichtbar, entweder weil die Struktur an diesen Stellen ungeordnet ist oder weil sie zuvor proteolytisch entfernt wurden (dies trifft für 32 C-terminale Aminosäuren zu). (Mit Veränderungen aus Lit.[1] übernommen.)

umgedrehtes Indianerzelt zur extrazellulären Seite des Kanals hin öffnen. Weil noch so wenige hochauflöste Strukturen von integralen Membranproteinen bekannt sind,^[6] erweitert jede neue Struktur erheblich unser Wissen darüber, wie Proteine sich zusammenlagern und in eine Membran eingebettet werden. Transmembranhelices kommen häufig vor, doch sind auch Faltblattstrukturen bekannt. Wie andere Membranproteine hat auch KcsA zwei Gürtel aus aromatischen Aminosäuren in der Nähe der Membran-Wasser-Grenzfläche. Glücklicherweise ist die Struktur im Einklang mit vielen Schlüssefolgerungen aus biochemischen und Mutationse-Untersuchungen. Beispielsweise befinden sich Aminosäuren, die an der Blockade des Kanals durch von ins Zellinnere gegebene Reagentien beteiligt sind, auf der intrazellulären Seite des Kanals; solche, die die Blockade des Kanals von außen beeinflussen, befinden sich an dessen Außenseite. Einige der letztgenannten gehören zu gut charakterisierten Bereichen in der „Turm“-Region, die mit Toxinen wie Agitoxin 2 oder Charybdotoxin eine Wechselwirkung eingehen. Der kritische Punkt ist jedoch die Pore: Wie wird die Ionenselektivität erreicht?

Die Antwort läßt sich klar aus der Struktur ableiten. Der P-Loop aller K^+ -Kanäle enthält die hochkonservierte „Signaturesequenz“ Thr-Xxx-Thr-Xxx-Gly-Tyr-Gly.^[7] Diese Sequenz, und davon besonders der Abschnitt Gly-Tyr-Gly, spielt eine Schlüsselrolle bei der Ionenselektivität. Für deren

Mechanismus wurden zwei Modelle vorgeschlagen. Im einen, das zuerst von MacKinnon^[8] entwickelt und durch Arbeiten von einem von uns^[9] gestützt wurde, wird eine Kation- π -Elektronen-Wechselwirkung zwischen den durchtretenden Ionen und dem aromatischen Ring des Tyr aus dem konservierten Sequenzabschnitt Gly-Tyr-Gly postuliert. Im anderen Modell geht man nach einem traditionelleren Mechanismus davon aus, daß die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen des Peptidrückgrats das Selektivitätsfilter bilden.^[7] Bei den Kaliumkanälen hat die Tradition die Oberhand behalten.

Die P-Region bildet einen Loop, der zunächst aus einer kleinen Helix, der „Poren-Helix“, und dann aus einem Turn (Schleife) mit dem entscheidenden Sequenzabschnitt Gly-Tyr-Gly besteht (Abb. 2). Es ist sicher, daß die Seitenkette von Tyr von der Kanalöffnung weggerichtet ist und daher keine Kation- π -Elektronen-Wechselwirkungen bei der Ionenbindung eingehen kann. Obwohl einzelne Atome des Rückgrats nicht unterschieden werden können, gehen die Autoren davon aus, daß die Carbonyl-Sauerstoffatome ins Innere der Pore gerichtet sind. Offensichtlich sind je drei aufeinanderfolgende Carbonylgruppen von jeder Untereinheit nach innen gerichtet und bilden so Ringe von Sauerstoffatomen, die als Kationenbindungsstellen fungieren. Die Analogie zu Kronenethern springt sofort ins Auge, allerdings mit dem Unterschied, daß es sich hier um Amid-Sauerstoffatome handelt, die ein stärker negatives elektrostatisches Potential als Ether-Sauerstoffatome haben. Indem man die Kristalle mit Rb⁺-Ionen tränkte (für die die meisten K⁺-Kanäle in meßbarem Umfang durchlässig sind) und dann die Unterschiede in der Elektronendichte bestimmte, konnte man einzelne Ionen in der P-Region identifizieren.

Wie wird mit einer solchen Anordnung nun eine selektive Pore gebildet? Die Autoren schlagen vor, daß der Rest des Proteins die Carbonylgruppen der Gly-Tyr-Gly-Sequenz präzise in der für die Bindung von K⁺-Ionen richtigen Position fixiert, gleichzeitig aber verhindert, daß dieses Strukturelement sich so umordnet, daß günstige Wechselwirkungen mit Na⁺-Ionen möglich werden – eine beeindruckende Leistung für ein tetramerisches, in eine Membran eingebettetes Protein. Der hochkonservierte Tyrosinrest spielt eine Schlüsselrolle beim Aufbau des molekularen Gerüsts. Er bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Trp in der Poren-Helix und geht eine günstige van-der-Waals-Wechselwirkung (vielleicht eine Kante-auf-Fläche-Wechselwirkung der beiden aromatischen Ringe?) mit einem anderen Trp in der Poren-Helix einer benachbarten Untereinheit ein. Vervielfältigt durch die vierfache Symmetrie der Struktur entsteht durch diese Anordnung eine ausgedehnte Fläche aromatischer Aminosäuren, die eine „Lage von Sprungfedern“ bilden, die die Carbonyl-Sauerstoffatome präzise in der richtigen Position halten. Diese äußerst wichtigen Trp-Reste sind bei allen Mitgliedern der K_v-Familie konserviert. Ein interessanter Nebenaspekt der KcsA-Struktur ist der, daß das Protein wie ein K_{ir}-Kanal zwar nur zwei Transmembrandomänen hat (Abb. 1), daß die Sequenz der P-Region aber eine viel höhere Homologie zur entsprechenden K_v-Sequenz aufweist; die Struktur im Bereich der Pore ist also vermutlich eher für die Familie der K_v-Kanäle von Bedeutung. Es sollte allerdings

daran erinnert werden, daß bei einer Auflösung von 3.2 Å ein Modell, das eine genaue Positionierung von Strukturelementen enthält, spekulativ bleiben muß. Trotzdem ist dies der erste Versuch, mit chemischen Modellvorstellungen neue Erkenntnisse über die bisher nur rudimentär verstandenen Strukturprinzipien zu gewinnen, die der Kanalfunktion zugrunde liegen, und dies wird sicherlich viele weitere Versuche anregen.

Interessanterweise liegt der engste Teil des Kanals, das Selektivitätsfilter, am extrazellulären Ende des Kanals. Viele hatten für die Pore die Form einer Sanduhr erwartet, mit der Verengung in der Mitte des Kanals. Ein Kaliumion genau in der Mitte des Kanals, dem am stärksten hydrophoben Teil der Membran, befindet sich in einer Umgebung mit sehr niedriger Dielektrizitätskonstante, eine sehr ungünstige Situation für ein Ion. Doch auch für dieses Problem hat die Natur eine elegante Lösung gefunden. Direkt unterhalb des Selektivitätsfilters öffnet sich der Kanal und bildet einen wasser gefüllten Hohlraum mit relativ hydrophoben Wänden. Ein dort befindliches Ion (Abb. 2) wird vom gesamten Wasser des Hohlraums solvatisiert. Außerdem weisen die vier Poren-Helices genau in Richtung des Hohlraums. Jede Helix ist so angeordnet, daß ihr C-Terminus, der ein nennenswertes negatives elektrostatisches Potenzial aufweist („Helix-Dipol“), zum wassergefüllten Hohlraum hinzeigt. Es wird angenommen, daß mit dieser Anordnung ein solvatisiertes Ion im Hohlraum zusätzlich stabilisiert werden kann.

Nun haben wir eine selektive Bindungsstelle, doch wie wird der hohe Fluß erreicht? Wie bereits erwähnt enthält das Selektivitätsfilter mehr als ein Ion. Dies bestätigt die allgemeine Ansicht, die auf Messungen von Ionenströmen und von Strömen radioaktiver Tracer über Jahrzehnte beruhen, daß Kaliumkanäle Poren sind, die viele Ionen enthalten.^[10] Man stellt sich den Ionenfluß so vor, daß erst ein Ion bindet, dann ein zweites an einer benachbarten Bindungsstelle. Die Bindung des zweiten Ions destabilisiert die erste elektrostatisch – gleiche Ladungen stoßen sich ab! Dadurch wird das erste Ion aus dem Selektivitätsfilter herausgedrängt, das zweite Ion nimmt seinen Platz ein, und ein neues Ion kommt in den Kanal. Der gesamte Prozeß wird durch die hohe Konzentration von K⁺-Ionen in physiologischen Lösungen angetrieben. Daß auch im Kristall mehrere Ionen den Kanal gleichzeitig besetzen, ist eine schöne Bestätigung einer entscheidenden Schlußfolgerung, die aus Funktionsuntersuchungen abgeleitet wurde.

Wie geht es nun weiter mit der Forschung an K⁺-Kanälen? Sicherlich würde eine höheraufgelöste Struktur weitere Informationen mit höherer Zuverlässigkeit liefern, und wahrscheinlich wird eine solche in absehbarer Zeit verfügbar sein. Es wird auch interessant und wichtig sein festzustellen, in welchem Ausmaß sich die Motive der KcsA-Struktur in den Strukturen anderer Ionenkanäle wiederholen, sowohl in denen der K_v-Familie als auch in denen von weiter entfernten Verwandten wie Na⁺-, Ca²⁺- und ligandengesteuerten Ionenkanälen. Beziiglich der K_v-Familie sollte sich die kürzlich von Choe et al.^[11] publizierte Kristallstruktur als hilfreich erweisen. Diese Forscher lösten die Struktur des *löslichen Fragments* des Shaker-Kanals, das als Tetramerisierungsdomäne (T1) bekannt ist, bei einer Auflösung von 1.55 Å. Diese

Region liegt am N-Terminus des Proteins innerhalb des intrazellulären Abschnitts, der der S1-Domäne vorangestellt ist (Abb. 1). Untersucht wurde ein 87 Aminosäuren langes Fragment des Proteins, das bemerkenswerterweise im Kristall eine tetramere Struktur mit exakter vierfacher Symmetrie und einer großen Pore in der Mitte hat! Diese große Pore ist vermutlich die intrazelluläre Vorkammer des Kanals. Zweifellos werden die Molekül-Modellierer sich intensiv bemühen, die Struktur der Tetramerisierungsdomäne mit der KcsA-Struktur zu fusionieren in der Hoffnung, die möglichen Positionen der Domänen S1–S4 bestimmen zu können.

Auch die Frage, durch welchen Mechanismus die kritische Positionierung der Carbonylgruppen im Selektivitätsfilter erreicht wird, wird weiterer Forschung bedürfen. Wie erwähnt sind die entscheidenden Trp-Reste in allen Kv-Kanälen konserviert (es sei nochmals darauf hingewiesen, daß die Sequenz des Poren-Bereichs von KcsA Kv-ähnlich ist). In Kv-Kanälen sind diese Trp-Reste allerdings generell durch Leu und Phe ersetzt. Dies erfordert unterschiedliche Wechselwirkungen zum Tyr aus dem Gly-Tyr-Gly-Sequenzabschnitt, vor allem deshalb, weil die vorgeschlagene Trp⋯⋯Tyr-Wasserstoffbrückenbindung nicht mehr gebildet werden kann. Offensichtlich hat die Natur zwei Möglichkeiten dafür gefunden, die erforderliche Positionierung der Gly-Tyr-Gly-Carbonylgruppen sicherzustellen. Schließlich gibt es noch die dynamischen Aspekte der Kanalfunktion, insbesondere die durch Spannungsänderungen oder Ligandenbindung induzierten Phänomene beim Öffnen und Schließen der Kanäle. Dies alles sind Fragen, die mit der statischen Kristallographie nur schwer angegangen werden können. Trotzdem ist ganz klar, daß MacKinnons Ergebnisse einen riesigen Sprung bei der Erfor-

schung der Ionenkanäle bedeuten, der alle weiteren Untersuchungen beeinflussen wird.^[12]

Stichwörter: Ionenkanäle • Kristallstrukturanalyse • Membranproteine • Proteinstrukturen • Signaltransduktion

- [1] D. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69–77.
- [2] A. Baumann, I. Krah-Jentgens, R. Müller, F. Müller-Holtkamp, R. Seidel, N. Kecskemethy, J. Casal, A. Ferrus, O. Pongs, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3419–3429; A. Kamb, L. E. Iverson, M. A. Tanouye, *Cell* **1987**, *50*, 405–413; D. M. Papazian, T. L. Schwarz, B. L. Tempel, Y. N. Jan, L. Y. Jan, *Science* **1987**, *237*, 749–753.
- [3] C. Miller, *Science* **1991**, *252*, 1092–1096.
- [4] K. Ho, C. Nichols, G. Lederer, J. Lytton, P. M. Vassilev, M. V. Kanazirska, S. C. Hebert, *Nature* **1993**, *362*, 31–38; Y. Kubo, T. J. Baldwin, Y. N. Jan, L. Y. Jan, *Nature* **1993**, *362*, 127–133.
- [5] H. Schrempf, O. Schmidt, R. Kümmelen, S. Hinnah, D. Müller, M. Betzler, T. Steinkamp, R. Wagner, *EMBO J.* **1995**, *14*, 5170–5178.
- [6] D. Rees, A. J. Chirino, K.-H. Kim, H. Komiya in *Membrane Protein Structure* (Hrsg.: S. H. White), Oxford University Press, New York, **1994**, S. 1–26.
- [7] L. Heginbotham, Z. Lu, T. Abramson, R. MacKinnon, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1061–1067.
- [8] L. Heginbotham, R. MacKinnon, *Neuron* **1992**, *8*, 483–491.
- [9] R. A. Kumpf, D. A. Dougherty, *Science* **1993**, *261*, 1708–1710.
- [10] H. A. Lester, D. A. Dougherty, *J. Gen. Physiol.* **1998**, *111*, 181–183.
- [11] A. Kreusch, P. J. Pfaffinger, C. F. Stevens, S. Choe, *Nature* **1998**, *392*, 945–948.
- [12] Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen ist ein am Computer berechnetes Modell für den KcsA- und den Shaker-Kv-Kanal veröffentlicht worden, das mit der Kristallstruktur ausgezeichnet übereinstimmt: S. R. Durell, Y. Hao, H. R. Guy, *J. Struct. Biol.* **1998**, *121*, 263–284.