

Kaliumkanäle: symmetrisch, selektiv und sensitiv

Dirk Trauner*

Stichwörter:

Ionenkanäle · Membranen · Neurobiologie · Proteinstrukturen · Strukturaufklärung

Kaliumkanäle kommen in praktisch jeder eukaryotischen und prokaryotischen Zelle vor. Ihre Fähigkeit, Kaliumionen durch biologische Membranen zu leiten und damit das Membranpotential zu steuern, bildet die Grundlage für elementare zelluläre Funktionen wie Erregbarkeit, Proliferation, Sekretion und Volumenregulation. In höheren Organismen erfüllen Kaliumkanäle viele wichtige physiologische Aufgaben, angefangen bei der Ausbreitung der Aktionspotentiale bis zu den komplexen Funktionen zentraler Nervensysteme. Kaliumkanäle sind mit jedem Herzschlag, jeder Empfindung, jedem Gedanken verknüpft, und ihre Bedeutung lässt sich nicht hoch genug einschätzen.^[1]

Einigen Gifttieren ist die Bedeutung der Kaliumkanäle ebenfalls aufgefallen.^[2] Die Toxine der Grünen Mamba, der Tarantel oder des Gelben Skorpions („Death Stalker Scorpion“), um nur einige wenige zu nennen, enthalten Peptide, die Kaliumkanäle blockieren und deren Funktion behindern – eine äußerst raffinierte Strategie, wenn ein Beutetier oder ein Feind so schnell wie möglich getötet oder zumindest gelähmt werden soll. Die Toxine wirken sehr schnell (es müssen keine Zellmembranen überwunden werden!) und legen vitale Komponenten des Nervensystems mit großer Zuverlässigkeit lahm. In der Neurobiologie haben sich Kaliumkanaltoxine als Sonden zur Untersuchung der

Struktur und Funktion von Kanälen bewährt. Aus solchen Studien ergaben sich erste Hinweise zur extrazellulären Oberfläche der Kanäle und deren ausgeprägte strukturelle Konservierung.^[3]

Das Ausmaß, zu dem die Grundstruktur der Kaliumkanäle konserviert ist, ist tatsächlich erstaunlich. So ähnelt z.B. KvAP, ein spannungsgesteuerter Kaliumkanal eines am Grund des Japanischen Meeres bei 96 °C lebenden Archaeabakteriums, den eukaryotischen Kv-Kanälen, die das Transmembranpotential von T-Lymphozyten und Neuronen steuern.^[4] Toxine, die die Rote Chilenische Vogelspinne zum Blockieren von Kv-Kanälen bildet (und um Arbeitern auf chilenischen Rosenfeldern schmerzhafte Bisse zuzufügen), wirken auch gegen KvAP! Vermutlich sind Kaliumkanäle lange entstanden, bevor sie ihre heutige Hauptfunktion im Nervensystem einnahmen. Diese hohe strukturelle Konservierung von Kaliumkanälen und ihre Beteiligung an einem breiten Spektrum von physiologischen Prozessen ist ein Beispiel dafür, wie die Evolution den „großen Sprung nach vorn“ vollzieht: Indem sie existierende funktionelle Einheiten übernimmt, modifiziert und kombiniert, um sie neuen Aufgaben zuzuführen.

Wie die meisten Ionenkanäle, haben Kaliumkanäle zwei grundlegende funktionelle Eigenschaften: 1) die Fähigkeit, Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten selektiv zu leiten (z.B. Kalium- in Gegenwart von Natriumionen), und 2) diesen Prozess mithilfe von „Schleusentoren“ (Gates) zu steuern. Je nach Kanaltyp kann das Haupt-Gate entweder durch Änderung des Membranpotentials geöffnet und geschlossen werden (Spannungssteuerung, „voltage-gating“) oder durch Bindung von niedermolekularen Liganden, anderen Pro-

teinen oder anderen Ionen (Ligandensteuerung, „ligand-gating“). Einige Kanäle verfügen zusätzlich über „Inaktivierungs-Gates“, die sich nach der Öffnung des Spannungs- oder Liganden-Gates langsam schließen.

Diese funktionellen Eigenschaften wurden seit Ende der 90er Jahre durch Roderick MacKinnon und Mitarbeiter mithilfe zunehmend komplexer und aussagefähiger Kristallstrukturanalysen untersucht, womit die Funktion von Kaliumkanälen im Wesentlichen aufgeklärt wurde. Diese bahnbrechenden Ergebnisse wurden mit dem diesjährigen Nobelpreis für Chemie belohnt – nur fünf Jahre nach der Veröffentlichung der ersten Struktur!

Der Nobelpreis 2003 wurde für „Entdeckungen bezüglich der Kanäle in Zellmembranen“ verliehen und ging zu gleichen Teilen an MacKinnon (Rockefeller University, New York) und Peter Agre (Johns Hopkins University, Baltimore). Agre gelang 1988 die Identifizierung von Wasserkanälen (Aquaporinen). Diese sind imstande, Wassermoleküle durch Lipidmembranen zu leiten und dabei den pH-Gradienten aufrechtzuerhalten – keine leichte Aufgabe in Anbetracht der Eigenschaft von Protonen, durch „Hopping“ entlang Wasser-Netzwerken wandern zu können. Funktionell und strukturell haben die Aquaporine wenig mit Kaliumkanälen gemein, sind aber von ebenso großer physiologischer Bedeutung.

Die erste Kristallstruktur aus MacKinnons Labor zeigte den relativ einfachen bakteriellen Kaliumkanal KcsA mit einer Auflösung von 3.2 Å (Abbildung 1).^[5] Die Publikation sorgte für einige Wirbel – hatte man bis dahin doch angenommen, die Kristallisation und Strukturaufklärung von Ionenkanälen sei ein Ding der Unmöglichkeit!

[*] Prof. Dr. D. Trauner
Center for New Directions in
Organic Synthesis
Department of Chemistry
University of California, Berkeley
Berkeley, CA 94720 (USA)
Fax: (+1) 510-643-9480
E-mail: trauner@cchem.berkeley.edu

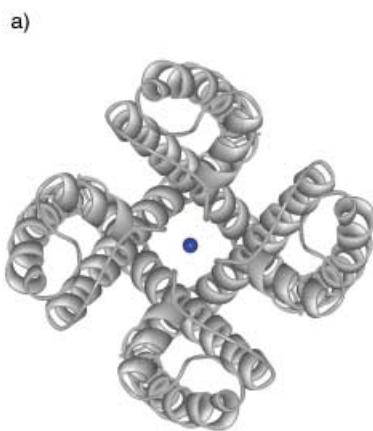
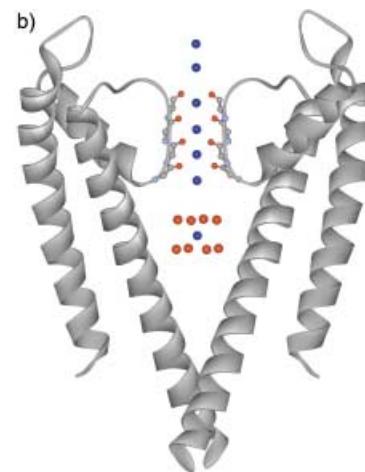


Abbildung 1. Kristallstruktur von KcsA: a) Ansicht von der extrazellulären Seite; b) Seitenansicht. Nur zwei der vier Untereinheiten sind gezeigt. Blau: Kaliumionen, rot: Carbonylgruppen des Selektivitätsfilters und Wassermoleküle.

KcsA enthält nur zwei Transmembranhelices pro Untereinheit (Abbildung 1b), im Unterschied zu den komplexeren eukaryotischen Kanälen, denen üblicherweise sechs Helices zugeschrieben werden. Wie aus Abbildung 1a hervorgeht, bilden vier Untereinheiten die zentrale Pore, die im Wesentlichen aus einem engen „Selektivitätsfilter“ und einer größeren Kapazität besteht. Diese tetramere Quartärstruktur findet sich bei allen Kaliumkanälen. Der Selektivitätsfilter besteht aus den Carbonyleinheiten des Peptidrückgrats, wobei die meisten Aminosäurereste des Filters aus der hochkonservierten TXXTXGYG-Signatursequenz stammen. Im tetrameren Zustand ähneln diese Carbonylgruppen einem Stapel von Kronenethern und stabilisieren die Kaliumionen, die zur Diffusion durch die Pore ihre Hydrathülle abgestreift haben. Offenbar ist dieser Prozess für das Kaliumion energetisch günstiger als für das kleinere Natriumion, was die mehr als zehntausendfache Selektivität zugunsten von Kaliumionen erklärt. Die Komplexierung durch die Carbonylgruppen ist andererseits schwach genug, dass die Kaliumionen mit einer Geschwindigkeit nahe der Diffusionsgrenze durch die Pore wandern.

Eine zweite, höher aufgelöste Struktur von KcsA (2 Å) klärte einige der Fragen und anfänglichen Zweifel und bot eine genauere Vorstellung davon, wie Kaliumionen den Selektivitätsfilter



Genom von *Methanobacterium thermoautotrophicum* identifiziert wurde, wurde in Gegenwart von Ca^{2+} exprimiert und in der offenen Form kristallisiert. Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 3.3 Å gelöst (Abbildung 2). MthK ist ein ligandengesteuerter Kanal, der sich in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration öffnet und schließt. Die intrazelluläre Calcium-sensitive Domäne ist mit dem C-Terminus des Transmembranteils verbunden, der den eigentlichen Kanal bildet. Im tetrameren Zustand bilden die intrazellulären Domänen einen Gating-Ring, der sich durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen wie der Verschluss einer Kamera erweitert.

Anhand dieser Kristallstruktur und parallel durchgeführter Sequenzvergleiche identifizierten MacKinnon et al. einen hochkonservierten Glycin-Rest, der sich in der Mitte der porennächsten Transmembranhelix (S6-Helix) befindet (Abbildung 2a). Laut MacKinnons Gating-Modell wirkt dieses Glycin wie ein Scharnier: Wenn sich der Kanal öffnet, knickt der untere Teil der S6-Helix nach außen, also vom Zentrum der Pore weg, und bildet eine Öffnung auf der extrazellulären Seite des Kanals. Im geschlossenen Zustand bilden die vier S6-Helices der Untereinheiten ein enges Bündel, das mit einem „invertierten Tipi“ verglichen wurde. Dementsprechend repräsentiert die KcsA-Struktur (Abbildung 1) den geschlossenen Zustand.

In MthK ist die verschlussartige Erweiterung des Gating-Rings mit der Knickbewegung der vier inneren Helices mechanisch gekoppelt. Leider sind

passieren.^[6] Außerdem ergaben sich weitere Hinweise darauf, wie die Ionen in der Mitte der Membran stabilisiert werden. In der Kristallstruktur fand sich sogar ein Kaliumion im zentralen Hohlraum mitsamt seiner inneren Hydrathülle aus acht quadratisch-antiprismatisch koordinierten Wassermolekülen (Abbildung 1b). Bemerkenswert bei diesen Studien war der Einsatz von Antikörpern, die zur Stabilisierung des Kristallgitters mit dem Kanalprotein cokristallisiert wurden. Diese experimentelle Strategie wurde auch bei späteren Strukturaufklärungen angewendet.

Mit der nächsten Strukturanalyse gelang der MacKinnon-Gruppe die Aufklärung des Gating-Mechanismus, d. h. des Öffnens und Schließens der Kaliumkanäle.^[7] Der MthK-Kanal, der im

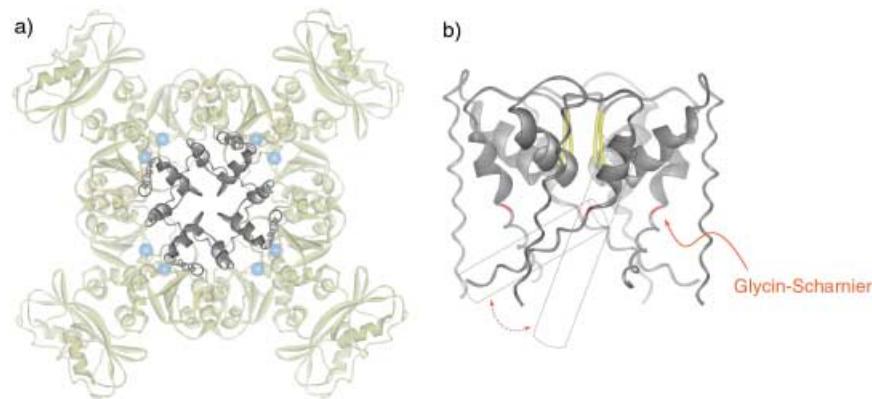


Abbildung 2. Kristallstruktur von MthK: a) Ansicht von der extrazellulären Seite (grau: Transmembrandomäne, graugrün: Gating-Ring, blau: Calciumionen); b) Seitenansicht der Transmembrandomäne mit angedeuteter Knickbewegung der S6-Helix (rot: Glycin-Scharnier).

die Aminosäuren, die den Gating-Ring mit dem Transmembranteil des Kanals verbinden, in der Kristallstruktur ungeordnet, sodass einige Details des Gating-Mechanismus nicht völlig geklärt sind. Der für MthK vorgeschlagene Gating-Mechanismus scheint aber generell für alle Kaliumkanäle, auch für spannungsgesteuerte, zu gelten (siehe unten). Flexible Domänen eines Kanals können mit dem unteren Teil der S6-Helix allosterisch verbunden sein und so das Öffnen und Schließen des Kanals bewirken.

In einer kürzlich publizierten Arbeit beschrieben MacKinnon et al. die Struktur eines kompletten spannungssensitiven Kanals.^[8] Laut Hydrophobie-Analysen haben Kanäle dieses Typs sechs Transmembranhelices pro Untereinheit (S1–S6), im Unterschied zu ihren einfacheren Verwandten KcsA und MthK mit nur zwei Helices. Das vierte Segment, S4, enthält typischerweise vier bis sieben positiv geladene Aminosäuren, meist Arginine, deren Wirkung als „Spannungssensor“ schon lange vermutet wurde. Wenn die Membran depolarisiert wird, d.h. wenn die extrazelluläre Seite im Verhältnis negativer wird, bewegt sich der Spannungssensor in Richtung der extrazellulären Oberfläche. Diese Bewegung ist mechanisch mit dem Öffnen der Pore gekoppelt.

Nachdem viele Versuche mit bekannten spannungsgesteuerten Kanälen aufgrund der inhärenten Flexibilität der Proteine fehlgeschlagen waren, führten zwei experimentelle Strategien zum Durchbruch. Zum einen wurde ein Kanal aus einem ungewöhnlichen Organismus ausgewählt; der spannungssensitive Kanal KvAP wurde durch Sequenzvergleich im Genom von *Aeropyrum pernix* identifiziert, einem thermophilen Archaeabakterium, das in der Nähe heißer Tiefseequellen vorkommt. Genetische und elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass KvAP sich wie ein spannungssensitiver Kanal verhält und den bereits erwähnten eukaryotischen Kv-Kanälen stark ähnelt. Die Idee war, dass ein Kanal, der an natürliche Umgebungsbedingungen von 96 °C angepasst ist, bei Raumtemperatur weniger flexibel und damit besser kristallierbar sein sollte. Um den Kanal weiter zu stabilisieren und hydrophile Kontak-

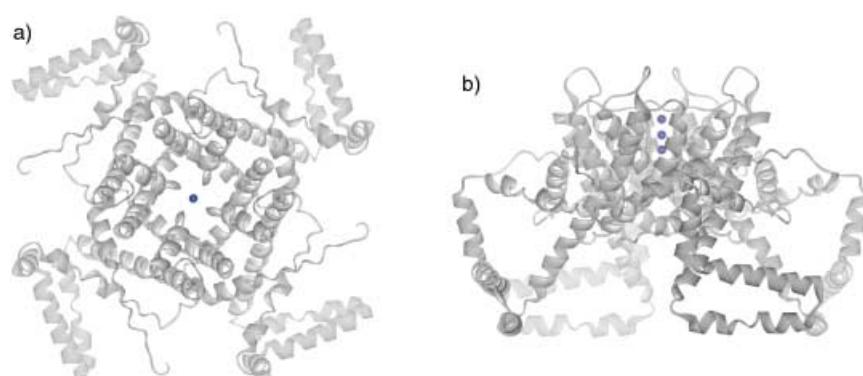


Abbildung 3. Kristallstruktur von KvAP: a) Ansicht von der extrazellulären Seite; b) Seitenansicht.

te für das Kristallgitter bereitzustellen, wurden zum anderen Antikörper gezüchtet und im Komplex mit dem Kanalprotein kristallisiert.

Die mit einer Auflösung von 3.2 Å erhaltene Kristallstruktur von KvAP sorgte für einige Überraschungen (Abbildung 3). Während die porennahen Transmembranhelices, S5 und S6, die übliche Struktur aufwiesen und der offenen MthK-Struktur entsprachen, zeigten die übrigen vier „Transmembransegmente“ nicht die erwartete Orientierung senkrecht zur (imaginären) Zellmembran. Tatsächlich fanden sich S3 und S4 nicht einmal in einer Region, die der Membran entspricht, und S1 und S2 waren nahezu parallel zur Membran orientiert. Die Frage war nun, wie mit dieser Struktur, die sicher keine physiologisch relevante Konformation repräsentierte, eine Spannungssensitivität erklärt werden konnte.

Anhand einer unabhängigen Kristallstruktur des S1-S4-Segments und einer Serie von ausgefeilten biochemischen Experimenten schlug MacKinnon ein verfeinertes Modell des Spannungssensors vor (Abbildung 4). Demnach

bilden S4 und Teile von S3 ein „Spannungspaddel“, das nicht in das Protein eingebettet ist, sondern sich an der Peripherie in Kontakt mit der Membran befindet. Bei der Depolarisation bewegen sich die vier Paddel des tetrameren Kanals durch die Membran und sind danach von der extrazellulären Seite teilweise zugänglich. Die delokalisierten positiven Ladungen der Arginine könnten diese Bewegung durch die lipophile Membran energetisch praktikabel machen. Auffallenderweise sind positiv geladene Lysine nur selten im Spannungssensor zu finden. Wie bereits erwähnt, ist diese Bewegung mit dem Abknicken von S6 und dem Öffnen der Pore mechanisch gekoppelt.

Diese Interpretation löste eine beherzte Debatte aus, denn über viele Jahre angesammelte Indizien hatten zuvor zu einem „Standardmodell“ des Spannungssensors geführt. Demnach sind die positiv geladenen Reste von S4 im Kern des Proteins eingebettet, vermeiden somit den direkten Kontakt mit den Membranlipiden, und bewegen sich mit der Änderung des Membranpotentials auf und ab. Diese Bewegung

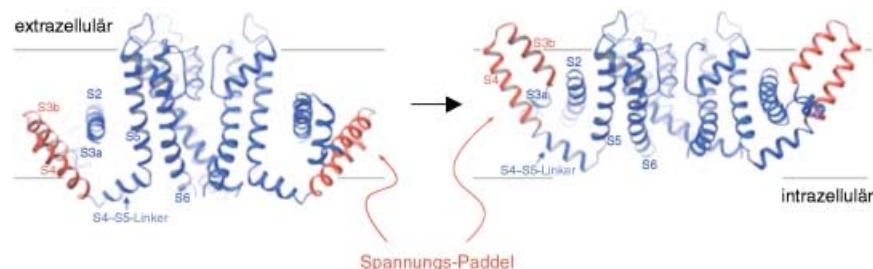


Abbildung 4. MacKinnon-Modell für das Spannungs-Gating: Das Spannungspaddel schwingt bei der Depolarisation der Zelle nach außen. Wiedergabe nach Lit. [8b].

würde gewissermaßen senkrecht zur Zellmembran stattfinden. Es wird spannend sein, ob das neue Spannungspaddel-Modell mit den früheren biophysikalischen Experimenten (die im Übrigen mit anderen spannungsgesteuerten Kanälen durchgeführt wurden)^[9] in Einklang zu bringen ist.

Obwohl die grundlegenden strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Kaliumkanälen nun im Wesentlichen umrissen sind, bleiben viele Fragen offen: Wie ist die S1-S6-Domäne in den offenen und geschlossenen Zuständen der spannungssensitiven Kanäle gefaltet? Wie bewegt sich der Spannungssensor durch die Membran? Wie sehen die energetischen Details dieser Prozesse aus? Wie ist diese Bewegung an das Öffnen und Schließen des Gate gekoppelt? Wie funktionieren die Inaktivierungs-Gates? Welche Rolle spielt die Beta-Untereinheit, die mit einigen Kaliumkanälen assoziiert ist?

Vielleicht ließen sich all diese Fragen durch Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Shaker-Kanals beantworten. Shaker ist der archetypische Kaliumkanal und das Muster für spannungsgesteuerte Kanäle der Kv-Klasse im menschlichen Genom. (Die Benennung Shaker leitet sich von dem Zittern der Beine bei einem *Drosophila-melanogaster*-Phänotyp unter Ether-

Narkose ab.) Shaker ist der erste Kaliumkanal, der je geklont wurde, eine Leistung, mit der die Grundlage für alle oben beschriebenen Strukturaufklärungen geschaffen wurde.^[10] Es handelt sich um einen spannungsgesteuerten Kanal, dessen Charakteristika denen von KvAP stark ähneln. Er wird bei längerer Öffnung inaktiviert.

Trotz anhaltender Forschungen konnte die Kristallstruktur des Shaker-Kanals bislang nicht gelöst werden. Jedoch lässt sich durch Kombination einiger Elemente bisher gelöster Kristallstrukturen ein funktionelles Modell von Shaker entwerfen. Die meisten dieser Komponenten stammen erneut aus den Arbeiten von MacKinnon (Abbildung 5). Der Selektivitätsfilter von Shaker und verwandten Kv-Kanälen enthält die charakteristische TXXTXGYG-Sequenz und ähnelt wahrscheinlich stark den entsprechenden Regionen der vier bisher bekannten Kaliumkanalstrukturen.^[3-8,11] Das Gate wird vom unteren Teil der Transmembranhelix S6 gebildet, die beim Öffnen am Glycin-Scharnier abknickt. Es ist durchaus möglich, dass der Spannungssensor aus einem Spannungspaddel besteht, dessen Bewegung mechanisch mit dem Gate gekoppelt ist. Am N-Terminus von S1 setzt sich das Protein mit einem Verbindungsstück (Konnektor

fort, dessen dreidimensionale Struktur zurzeit noch unbekannt ist. Dieser Konnektor verbindet S1 mit der Tetramerisierungsdomäne (T1-Domäne), einer Region, die früher als essenziell für die Selbstorganisation der Kaliumkanäle galt. Schließlich befindet sich am N-Terminus der T1-Domäne (und des gesamten Kanalproteins) eine flexible Schleife und eine wohldefinierte kurze Sequenz (zusammen als Kugel-Kette bezeichnet). Diese Domäne ist für die schnelle Inaktivierung der offenen Kanäle zuständig. Gemäß dem Kugel-Kette-Inaktivierungsmechanismus, der auf einen Vorschlag von Armstrong zurückgeht, fädelt sich die N-terminale Peptidsequenz von der intrazellulären Seite in die offene Pore, vermutlich durch Öffnungen zwischen den Verbindungsstücken, und verstopft den Kanal.^[1]

Bestimmte Kv-Kanäle sind mit einer Beta-Untereinheit assoziiert, von der gezeigt wurde, dass sie an die T1-Domäne bindet. Die Struktur der an das T1-Tetramer gebundenen Beta-Untereinheit wurde ebenfalls durch Röntgenstrukturanalyse gelöst,^[12] was unser Modell eines spannungsgesteuerten Kanals vervollständigt. Überraschenderweise wurde in der Beta-Untereinheit eine Bindungsstelle für NADPH/H⁺ gefunden, deren funktionelle Bedeutung noch ungeklärt ist. Es lässt sich spekulieren, ob eine direkte Verbindung zwischen dem Redox-Zustand einer Zelle und ihrem Transmembranpotential existiert.

Zweifellos werden die von MacKinnon und Mitarbeitern vorgestellten Kristallstrukturen der Entwicklung von Wirkstoffen gegen Kanalkrankheiten (Channelopathien) zugute kommen. Kaliumkanäle sind mit mehreren Krankheitsbildern ursächlich verbunden, z.B. der episodischen Ataxie, Formen der Epilepsie, Herzrhythmusstörungen und Diabetes. Weiter spielt der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.3 eine entscheidende Rolle in der Aktivierung menschlicher T-Lymphozyten. Verbindungen, die diesen Kanal selektiv blockieren, bewirken die Depolarisation der Zelle und verhindern die Zellteilung. Der resultierende immun-suppressive Effekt könnte bei Organtransplantationen oder gegen Autoimmunkrankheiten von großem Nutzen sein.

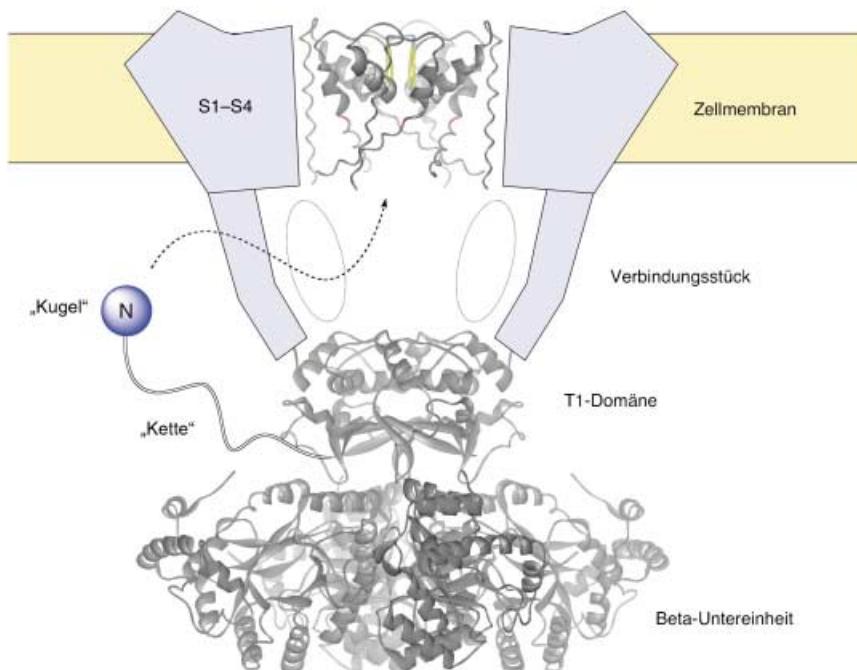


Abbildung 5. Modell eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals.

Mit ihrer ansprechenden Vierfachsymmetrie, ihren relativ unkomplizierten Faltungsmustern und ihren faszinierenden funktionellen Eigenschaften sind Kaliumkanäle für die Chemie wie für die Biologie gleichermaßen interessant. Sie sind ein Musterbeispiel für den selbstorganisierten Aufbau einfacher Komponenten zu Supramolekülen mit hochkomplexer Funktion. Die von MacKinnon erbrachten Ergebnisse werden sich auch auf Gebiete jenseits der Neurobiologie und Medizin auswirken, z.B. auf die Supramolekulare Chemie, Molekulare Erkennung,^[13] Nanotechnologie und Materialwissenschaften. Im Grunde sind Kaliumkanäle nichts anderes als Feldeffekttransistoren im Nanometer-Maßstab, Funktionseinheiten also, die ihre Leitfähigkeit mit dem angelegten elektromagnetischen Feld ändern. Verglichen mit anderen „Molekularen Maschinen“, z.B. ATPasen, Transportern oder Ionenpumpen, ist ihre Struktur und Funktionsweise nun gut bekannt, weshalb sie sich als Ausgangspunkt für weitere Entwicklungen anbieten.

Mehr als fünfzig Jahre nachdem Hodgkin und Huxley (Nobelpreis 1963) ihre Existenz postulierten und fünfundzwanzig Jahre nachdem Neher und Sakmann (Nobelpreis 1991) eine Methode zu ihrem direkten Nachweis

vorstellten, sind Kaliumkanäle nun im Detail aufgeklärt – und erneut wurden die Forschungen mit dem Nobelpreis belohnt. Vieles von dem, was beim Studium der Kaliumkanäle zu lernen war, wird sich auch auf verwandte Transmembranproteine, z.B. Natrium- und Calciumkanäle, anwenden lassen – vielleicht sogar auf Ionenkanäle im Allgemeinen. Mit einem verfeinerten Verständnis der Struktur und Funktion von Ionenkanälen wird sich die Neurobiologie weiter hin zu einer „echten“ Molekularwissenschaft entwickeln. Die Chancen stehen gut, dass bald auch andere Schlüsselbausteine, insbesonders G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Ionenpumpen, aufgeklärt werden, was die Position der molekularen Neurobiologie als eine wissenschaftliche Spitzendisziplin des 21. Jahrhunderts festigen wird.

-
- [1] a) B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3. Aufl., Sinauer, Sunderland, **2001**; b) F. M. Ashcroft, *Ion Channels and Disease*, Academic Press, San Diego, **2000**; c) C. A. Hübner, T. J. Jentsch, *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2435; d) G. Yellen, *Nature* **2002**, *419*, 35.
- [2] M. L. Garcia, Y. D. Gao, O. B. McManus, G. J. Kaczorowski, *Toxicon* **2001**, *39*, 739.

- [3] R. MacKinnon, S. L. Cohen, A. Kuo, A. Lee, B. T. Chait, *Science* **1998**, *280*, 106.
- [4] Y. X. Jiang, V. Ruta, J. Y. Chen, A. Lee, R. MacKinnon, *Nature* **2003**, *423*, 42.
- [5] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. L. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69.
- [6] Y. F. Zhou, J. H. Moraes-Cabral, A. Kaufman, R. MacKinnon, *Nature* **2001**, *414*, 43.
- [7] a) Y. X. Jiang, A. Lee, J. Y. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2002**, *417*, 515; b) Y. X. Jiang, A. Lee, J. Y. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2002**, *417*, 523.
- [8] a) Y. X. Jiang, A. Lee, J. Y. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2003**, *423*, 33; b) Y. X. Jiang, V. Ruta, J. Y. Chen, A. Lee, R. MacKinnon, *Nature* **2003**, *423*, 42.
- [9] a) B. E. Cohen, M. Grabe, L. Y. Jan, *Neuron* **2003**, *39*, 395; b) C. Miller, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 422.
- [10] D. M. Papazian, T. L. Schwarz, B. L. Tempel, Y. N. Jan, L. Y. Jan, *Science* **1987**, *237*, 749.
- [11] A. L. Kuo, J. M. Gulbis, J. F. Antcliff, T. Rahman, E. D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F. M. Ashcroft, T. Ezaki, D. A. Doyle, *Science* **2003**, *300*, 1922.
- [12] J. M. Gulbis, M. Zhou, S. Mann, R. MacKinnon, *Science* **2000**, *289*, 123.
- [13] S. N. Gradl, J. P. Felix, E. Y. Isacoff, M. L. Garcia, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12668.