

1. Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Die im Folgenden dargestellte Arbeit handelt von spannungs- und Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen, von den modulatorischen ζ -Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle, Kv9.1 und Kv9.3 und von SK2, einer ζ -Untereinheit spannungsunabhängiger Kaliumkanäle, die durch intrazelluläres Ca^{2+} aktiviert werden. Diese unterschiedlich aktivierten Kanäle gleichen sich in ihrer grundlegenden Funktion, der selektiven K^+ -Permeation.

Ionenkanäle bilden makromolekulare Proteintunnel durch die Zellmembranen und erlauben die selektive Passage von Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Diese Gradienten zu etablieren und aufrechtzuerhalten, erfordert ca. 30% der Energie einer Zelle (Ackerman und Clapham 1997). Die Berechnung des elektrochemischen Gradienten berücksichtigt die beiden Eigenschaften von Ionen, die ihre Bewegung beeinflussen. Zum einen sind Ionen Teilchen und als solche von Konzentrationsgradienten beeinflusst. Zum anderen sind Ionen Ladungsträger und daher dem elektrischen Feld über der Membran ausgesetzt. Verschiedene Stimuli aktivieren die unterschiedlichen Ionenkanäle, die daraufhin die Passage von ca. 100 Millionen Ionen pro Sekunde ermöglichen (Hille 2001). Diese Bewegung reicht nicht aus, die bestehenden Konzentrationsgradienten zu ändern, bedingt aber eine Änderung des Membranpotentials, die Grundlage der elektrischen Signale erregbarer Zellen ist. Die Aktivierung von Kanälen verschiebt das Membranpotential dabei in Richtung des Nernst-Potentials der entsprechenden Ionen. Das Nernst-Potential ist das Membranpotential, bei dem, bei einem gegebenen Konzentrationsgradienten, kein Strom zu beobachten ist. Es ist für die wichtigsten Ionen mit der daraus abzuleitenden Funktion der Ionenkanäle in Abb. 1.1 dargestellt. Die genau orchestrierte Aktivierung dieser Ionenkanäle generiert die Aktionspotentiale, die den kontrahierenden Muskel, das schlagende Herz und das denkende Gehirn steuern.

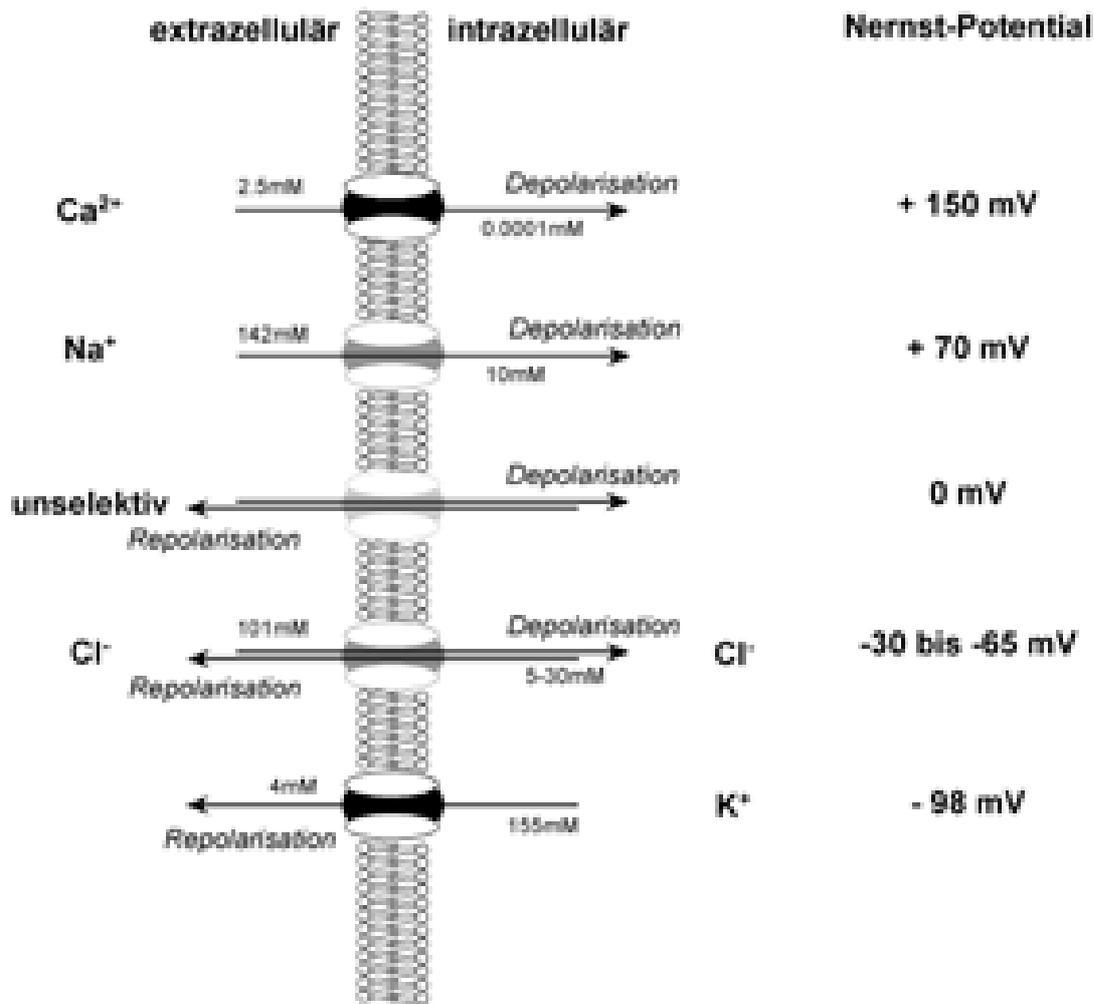


Abb. 1.1 Elektrochemische Gradienten

Nernst-Potential von Ca²⁺-, Na⁺-, unselektiven-, Cl⁻- und K⁺-Kanälen bei den angegebenen physiologischen Konzentrationsgradienten. Die Bewegung der Ionen erfolgt in Pfeilrichtung. Ihr Einfluss auf das Membranpotential ist gekennzeichnet (Depolarisation, Repolarisation). Abbildung modifiziert nach Ackerman und Clapham (1997), S. 1577.

1.2 Kaliumkanäle Selektive Permeation

Die selektive K⁺-Permeation ist eine Funktion der Pore der Kaliumkanäle. Spannungs- wie auch Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle sind Proteinkomplexe aus vier ζ-Untereinheiten mit je sechs Transmembransegmenten (S1-S6), die um eine zentral gelegene Pore angeordnet sind (Doyle *et al.* 1998; MacKinnon 1991). Die Porenregion wird von den letzten beiden Transmembransegmenten (S5-S6) und der dazwischenliegenden Porenschleife gebildet, deren N-terminaler ζ-helikaler Abschnitt (Porenhelix) den Selektivitätsfilter in Position hält (Doyle *et al.* 1998). Die gesamte Pore (Abb. 1.2) ist ca. 45 Å lang und beginnt an der intrazellulären Öffnung mit einem 18 Å langen Tunnel, der in eine wassergefüllte Höhle von 10 Å Durchmesser mündet. An diese schließt sich der 12 Å lange Selektivitätsfilter gefolgt von der 5 Å langen extrazellulären Öffnung an. Während der Tunnel und die Höhle von hydrophoben

Aminosäuren ausgekleidet sind, bilden die Carbonyl-Sauerstoffatome der Sequenz TVGYG und das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des Threonins den Selektivitätsfilter (Zhou *et al.* 2001b). Mit Eintritt in den Selektivitätsfilter werden K^+ -Ionen dehydratisiert, und durch die genannten Sauerstoffatome koordiniert. Die Anordnung der Sauerstoffatome des Selektivitätsfilters imitiert dabei die Anordnung von Wassermolekülen um K^+ -Ionen in Lösung (Zhou *et al.* 2001b). Zur effektiven Koordination anderer, auch kleinerer Ionen (z.B. Na^+), wären andere Abstände der beteiligten Sauerstoffatome nötig, so dass ihre Passage energetisch ungünstig und damit unwahrscheinlich ist. Dies ist die Grundlage der hohen Ionenselektivität der Kaliumkanäle. Die hydrophobe Oberfläche des Tunnels an der intrazellulären Öffnung und der wassergefüllten Höhle verhindert in diesem Bereich Interaktionen von K^+ mit dem Kanalprotein und ermöglicht damit die hohe Geschwindigkeit der Permeation von K^+ durch den Kanal (10 ns pro Ion). Die Plasmamembran ist eine Umgebung mit niedriger Dielektrizität, die destabilisierend auf Ionen wirkt. Kaliumkanäle haben zwei Mechanismen entwickelt, K^+ -Ionen in der Membran zu stabilisieren. Zum einen ist K^+ in der Höhle von polarisierbarem Wasser (27 H_2O -Moleküle) umgeben (Zhou *et al.* 2001b). Zum anderen sind die Porenhelices mit ihrem C-terminus zur Höhle hin orientiert und erzeugen dadurch ein stabilisierendes elektrostatisches Feld (Roux und MacKinnon 1999).

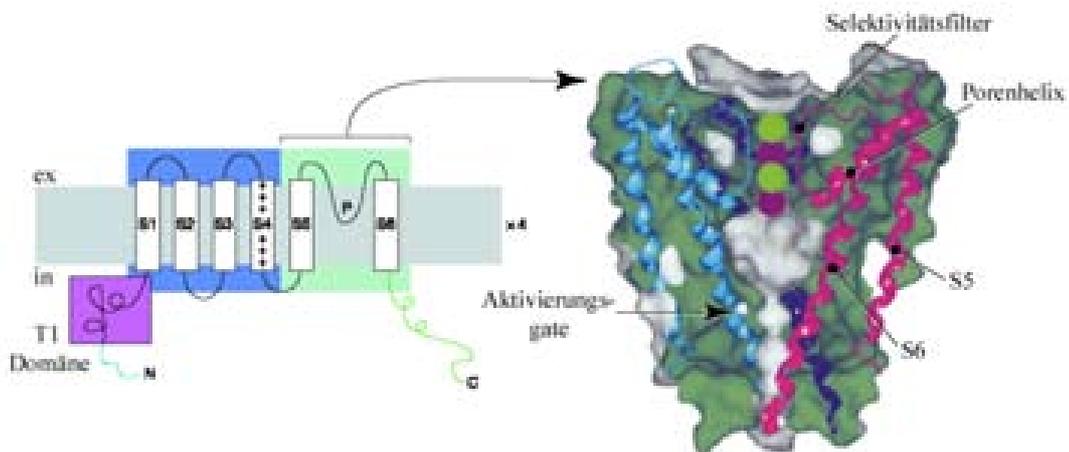


Abb. 1.2 *Kv*- Untereinheit und Porenregion

A, Schematische Darstellung einer *Kv*- Untereinheit mit sechs Transmembransegmenten (S1-S6). Die Region der T1-Domäne ist violett, die Region des Spannungssensors blau und die Porenregion türkis unterlegt.

B, Struktur der K^+ -selektiven Porenregion abgeleitet aus der Struktur des *KcsA*-Kanals aus *Streptomyces lividans*. Die wassergefüllte Höhle in der Mitte der Membran ist grau unterlegt. Zwei K^+ -Ionen im Selektivitätsfilter finden sich alternativ in Position 1 und 3 (violett) oder 2 und 4 (grün).

Abbildung modifiziert nach Yellen (2002), S. 36.

KV-KANÄLE

1.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle Molekulare Vielfalt

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) werden durch Depolarisation des Membranpotentials aktiviert und leiten einen Auswärtstrom von K^+ -Ionen, der das Membranpotential repolarisiert (Abb. 1.1). Diese Kanäle sind Proteinkomplexe aus vier ζ -Untereinheiten, von denen die erste durch Analyse der *Drosophila-melanogaster*-Mutante *Shaker* kloniert wurde (Kamb *et al.* 1987; Pongs *et al.* 1988; Tempel *et al.* 1987). *Shaker*-Fliegen zeigen eine neuromuskuläre Übererregbarkeit, die sich in rhythmischen Zuckungen der Hinterbeine unter Äthernästhesie manifestiert. Dem zugrunde liegen Mutationen in der ζ -Untereinheit eines Kaliumkanalgens, die eine Verlängerung motoneuronaler Aktionspotentiale und entsprechend eine gesteigerten Neurotransmittersekretion an der neuromuskulären Endplatte bewirken (Kamb *et al.* 1987; Pongs *et al.* 1988; Tempel *et al.* 1987). In der Folge wurden drei weitere spannungsabhängige Kaliumkanäle aus *Drosophila melanogaster* durch ihre Homologie zum *Shaker*-Gen identifiziert und *shab*, *shaw* und *shal* genannt (Butler *et al.* 1989). Die orthologen Genfamilien der Vertebraten sind Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*shab*), Kv3 (*shaw*) und Kv4 (*shal*) (Jan und Jan 1997). Mittlerweile hat die Gruppe der Kv-Kanäle der Vertebraten 12 Untergruppen (Kv1 - Kv12) mit insgesamt 39 Mitgliedern (Kv1.1-1.8, Kv2.1-2.2 usw.; s. <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/KCN.shtml>). Die Aminosäuresequenzen von Mitgliedern einer Untergruppe sind dabei definitionsgemäß zu über 50 % identisch, bei Mitgliedern unterschiedlicher Untergruppen liegt die Sequenzidentität unter 50 %.

Folgende Mechanismen steigern die funktionelle Vielfalt nativer Kv-Kanäle weit über die Zahl der Gene hinaus:

- ⚡ Mehrere Transkripte können durch alternatives Spleißen und RNA-Editierung aus einem Gen hervorgehen. **Ein Gen Mehrere Transkripte**
- ⚡ Unterschiedliche Kombinationen von ζ -Untereinheiten können einen Ionenkanal bilden **Von -Untereinheiten zu Kanälen**
- ⚡ Kaliumkanäle können mit anderen Proteine interagieren, die ihre Eigenschaften regulieren. **β -Untereinheiten**

Ein Gen Mehrere Transkripte

Alternatives Spleißen kann die biophysikalischen Eigenschaften (Pan *et al.* 2001) und die subzelluläre Verteilung spannungsabhängiger Kaliumkanäle regulieren. So existieren beispielsweise von Kv3.1 zwei in ihrem C-terminus unterschiedliche Spleißvarianten, Kv3.1a und Kv3.1b. Während Kv3.1b axonal und somatodendritisch lokalisiert ist, findet sich Kv3.1a ausschließlich in Axonen der gleichen Nervenzellen (Ozaita *et al.* 2002).

Eine weitere Möglichkeit der RNA-Modifikation ist die A-zu-I-RNA-Editierung. Bei diesem Prozess wird Adenosin zu Inosin deaminiert. Da Inosin, wie sonst Guanin, ein Basenpaar mit Cytosin bildet, entstehen Änderungen der Aminosäuresequenz. Ein gut untersuchtes Beispiel der A-zu-I-RNA-Editierung ist die GluR2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors. Hier wird auf Proteinebene ein Glutamin durch ein Arginin ersetzt. Diese editierte GluR2-Untereinheit verringert den Einzelkanalleitwert von AMPA-Rezeptoren, hemmt die Permeation von Ca^{2+} und ändert die Spannungsabhängigkeit des Ionenstroms (Higuchi *et al.* 1993; Lomeli *et al.* 1994; Sommer *et al.* 1991). Bei zwei spannungsabhängigen Kaliumkanälen des Tintenfisches (sqKv1.1 und sqKv2) fanden sich zahlreiche A-zu-I-RNA-Editierungen (Patton *et al.* 1997; Rosenthal und Bezanilla 2002). Diese wirkten sich auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und den Transport der Kanäle zur Plasmamembran aus.

Von ζ -Untereinheiten zu Kanälen

Die Tetramerisierung von ζ -Untereinheiten zu funktionellen Kv Kanälen findet im endoplasmatischen Retikulum statt (Deutsch 2002). Dieser Prozess wird von einer N-terminalen Domäne der ζ -Untereinheiten gesteuert, die wegen ihrer Bedeutung für die Tetramerisierung T1-Domäne (*First Tetramerization Domain*) genannt wird (Li M *et al.* 1992) (Kreusch *et al.* 1998). Interaktionen dieser Domänen finden bereits statt, während die Proteinketten noch an Ribosomen gebunden sind (Lu *et al.* 2001). Die dann im endoplasmatischen Retikulum vollzogene Tetramerisierung der ζ -Untereinheiten erfolgt als Dimerisierung von Dimeren (Tu und Deutsch 1999). Die Kristallstruktur der isolierten T1-Domäne zeigt eine tetramere Assoziation von T1-Monomeren (Kreusch *et al.* 1998; Minor *et al.* 2000). Jede T1-Domäne hat vier Schichten. Die N-terminale Schicht ist dem Zytoplasma zugewandt und besteht aus η -Faltblättern. In den darauffolgenden drei Schichten bilden ζ -Helices die Sekundärstruktur, wobei die C-terminale vierte Schicht der Membran und damit der intrazellulären Öffnung des Kanals zugewandt ist. Über ein in der vierten Schicht von Kv2, Kv3 und Kv4 enthaltenes Sequenzmotiv, HX₅CX₂₀CC, welches Kv1 ζ -Untereinheiten

fehlt, wird zwischen benachbarten T1-Domänen ein Zn^{2+} -Ion koordiniert (Bixby *et al.* 1999). Für Kv4.2 konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Zn^{2+} für die korrekte Faltung und Tetramerisierung der T1-Domäne notwendig ist (Jahng *et al.* 2002). Die T1-Domäne fördert die Assoziation von ζ -Untereinheiten einer Gruppe (z.B. Kv1.1 und Kv1.1 oder Kv1.2) und verhindert gleichzeitig, dass ζ -Untereinheiten unterschiedlicher Gruppen gemeinsam Ionenkanäle bilden (z.B. Kv1.1 und Kv2.1). Wird die T1-Domäne entfernt, so werden weiterhin funktionelle Kanäle gebildet (Kobertz und Miller 1999), allerdings ist die Oberflächenexpression deutlich reduziert, es zeigen sich Änderungen in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und die Spezifität der Interaktion geht verloren, so dass auch ζ -Untereinheiten unterschiedlicher Untergruppen gemeinsam Kanäle bilden (Tu *et al.* 1996). Der Effekt auf das Expressionsniveau kann durch Ersatz der T1-Domäne durch eine nicht verwandte Domäne, die tetramere Strukturen ausbildet, kompensiert werden (Zerangue *et al.* 2000).

β -Untereinheiten

Verschiedene Proteine können mit Kv Kanälen interagieren und ihre Funktion auf unterschiedliche Weise beeinflussen.

Kv-Untereinheiten

Die erste Gruppe dieser Proteine bilden Kv- η -Untereinheiten, um 40 kDa große intrazelluläre Proteine, die tetramere Komplexe ausbilden, welche mit den tetrameren T1-Domänen an deren zytoplasmatischer Seite im Verhältnis 1 : 1 interagieren. Bislang wurden 4 Kv- η -Untereinheiten in Vertebraten identifiziert (Rettig *et al.* 1994) (Kv η 1.1, Kv η 1.2, Kv η 1.3, Kv η 2.1). Kv η 1.1-1.3 gehen durch alternatives Spleißen aus einem Gen hervor (McCormack K *et al.* 1995; Morales *et al.* 1995; Rettig *et al.* 1994), Kv η 2.1 aus dem Transkript eines verwandten Gens (Rettig *et al.* 1994). Die vier bekannten η -Untereinheiten unterscheiden sich in ihrem N-terminus, auf den ein konservierter Bereich aus acht parallelen η -Faltblättern mit dazwischenliegenden α -Helices folgt (Gulbis *et al.* 1999; Gulbis *et al.* 2000). Dieser konservierte Bereich hat hohe Homologie zur Familie der Aldo-Ketoreduktasen (McCormack T und McCormack K 1994) und wurde mit einem $NADP^+$ pro η -Untereinheit kokristallisiert (Gulbis *et al.* 1999; Gulbis *et al.* 2000). Es ist bislang unklar, ob Kv- η -Untereinheiten enzymatische Aktivität besitzen und, wenn ja, welches ihre Substrate sind. Neben dieser möglichen enzymatischen Funktion steigern η -Untereinheiten die Expression

von Kv-Kanälen an der Zelloberfläche und verändern zum Teil ihre biophysikalischen Eigenschaften. In *Drosophila melanogaster* wurde anhand der Mutante *Hyperkinetic* eine η -Untereinheit mit 48 % Sequenzidentität zu Kv η 2.1 identifiziert (Chouinard *et al.* 1995). Der Phänotyp dieser Mutante entsprach dem der *Shaker*-Mutante (s.o.).

KChAP

Ein weiteres intrazelluläres Protein, welches Kv-Kanäle reguliert, ist KChAP (K⁺ Channel Associated Protein) (Wible *et al.* 1998). KChAP interagiert mit verschiedenen Kv-Kanälen im endoplasmatischen Retikulum und fördert deren korrekte Prozessierung, steigert damit die Zahl der Kv-Kanäle in der Zellmembran, ohne diese selber zu erreichen. KChAP verbleibt im endoplasmatischen Retikulum und funktioniert somit als Chaperon (Kuryshv *et al.* 2000).

KChIP

Vier KChIP-Gene (K⁺ Channel Interacting Protein) wurden bislang bei Säugetieren identifiziert (KChIP1-4) (An *et al.* 2000; Morohashi *et al.* 2002). Sie kodieren Proteine von 216 As (KChIP1), 252 As (KChIP2) 256 As (KChIP3) und 216 As (KChIP4a) bzw. 250 As (KChIP4b) Länge. Während diese Proteine sich an ihrem N-terminus unterscheiden, sind ihre C-terminalen 185 As weitgehend identisch und bilden 4 Ca²⁺-bindende EF-Domänen. KChIP-Proteine sind mit Kv4- ζ -Untereinheiten assoziiert. Sie steigern deren Oberflächenexpression und beeinflussen Ca²⁺-abhängig ihre biophysikalische Eigenschaften (An *et al.* 2000). KChIP 3 wurde bereits als Calsenilin (Buxbaum *et al.* 1998), welches die für die Pathogenese des Morbus Alzheimer wichtigen Preseniline bindet und als DREAM (Downstream Regulatory Element Antagonistic Modulator), ein Transkriptions-Repressor, der in der Regulierung der Schmerzwahrnehmung eine Rolle spielt, beschrieben (Carrion *et al.* 1999). Letzteres scheint die wichtigste Funktion von KChIP3 zu sein, da DREAM-knockout-Mäuse (DREAM^{-/-}) eine deutlich reduzierte Schmerzwahrnehmung, hingegen völlig unauffällige K⁺-Ströme zeigen (Cheng *et al.* 2002). Dagegen fehlen bei KChIP2-knockout-Mäusen (KChIP2^{-/-}) die entsprechenden K⁺-Ströme, wie zum Beispiel der kardiale I_{to}-Strom, was zu einem gehäuften Auftreten ventrikulärer Tachykardien führt (Kuo *et al.* 2001). KChIPs sind damit ein Beispiel dafür, dass die verschiedenen Mitglieder einer Proteinfamilie sehr unterschiedliche Funktionen haben können.

KCNE

KCNE- η -Untereinheiten (KCNE 1-4) sind im Gegensatz zu den bislang beschriebenen η -Untereinheiten Transmembranproteine mit einer Transmembrandomäne, extrazellulärem N- und intrazellulärem C-terminus. KCNEs interagieren mit KCNQ- (Kv7) und HERG- ζ -Untereinheiten (*Human Ether-a-gogo Related Gene*, Kv11.1) (Attali *et al.* 1993; Goldstein und Miller 1991) und beeinflussen deren Oberflächenexpression und biophysikalische Eigenschaften. Komplexe aus KCNQ1 und KCNE1 (minK, IsK) vermitteln den kardialen I_{Ks} -Strom (Sanguinetti *et al.* 1996), HERG und KCNE2 den kardialen I_{Kr} -Strom (Abbott *et al.* 1999). I_{Ks} und I_{Kr} sind wesentlich an der Repolarisation kardialer Aktionspotentiale beteiligt. Mutationen in allen genannten Komponenten der entsprechenden Kanäle wurden mit verschiedenen LQT-Syndromen (*Long QT Syndrome*, LQTS) in Verbindung gebracht (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott 1999). LQTS sind eine Gruppe angeborener Herzrhythmusstörungen, die mit einer verlängerten QT Zeit einhergehen und Patienten durch das Auftreten von Kammerflimmern vom Torsades-de-pointes-Typ gefährden (Viskin 1999).

1.4 Kv Kanäle – Gating

Spannungsabhängige Kaliumkanäle können offen, geschlossen oder inaktiviert sein. Die Übergänge zwischen diesen Zuständen nennt man *Gating*.

1.4.1 Aktivierung

Kv-Kanäle benötigen für die spannungsabhängige Aktivierung einen Spannungssensor, der Änderungen des Membranpotentials in eine Bewegung umsetzt, die den Kanal öffnet und schließt. Die Region, in welcher der Kanal seinen Passageweg öffnet und schließt, wird Aktivierungsgate genannt.

Aktivierungsgate

Kv-Kanäle öffnen und schließen durch eine Bewegung der distalen, intrazellulären Hälfte des S6-Segments. Ein konserviertes Glycin und ein Prolin-X-Prolin (PXP) Motiv bilden ein Scharnier (del Camino und Yellen 2001; Jiang *et al.* 2002), über das beim Öffnen die distale Hälfte der S6-Helix nach außen gebogen wird und die intrazelluläre Öffnung der Kv-Kanäle für hydratisierte K^+ -Ionen passierbar wird (Abb. 1.3) (Jiang *et al.* 2002).

Spannungssensor

Ein einfacher biologische Spannungssensor ist eine Ladung innerhalb der Membran, die in Abhängigkeit vom Membranpotential zwischen innerer und äußerer Oberfläche bewegt wird. Insgesamt benötigt man, um die Spannungsabhängigkeit der K^+ -Ströme zu erklären, 12 solcher elementaren Ladungen pro Kaliumkanal. Messungen der Ströme, die durch die Bewegung dieser Ladungen entstehen, sogenannte *Gating*-Ströme, bestätigten diese Vorhersage und zeigten, dass pro Kaliumkanal 12 - 14 elementare Ladungen, also 3 - 3,5 pro -Untereinheit, durch das gesamte elektrische Feld der Membran bewegt werden (Bezanilla 2000). Das S4-Segment der Kv- -Untereinheiten ist Träger dieser Ladungen und enthält 4 - 7 positive geladene As (Arginin > Lysin), getrennt durch je zwei hydrophobe. Aufgrund der Kristallstruktur eines spannungsabhängigen bakteriellen Kaliumkanals (KvAP) wurde vorgeschlagen, dass die S4-Helix zusammen mit dem distalen Teil des S3-Segments (S3b) ein sogenanntes Spannungssensor-Paddel bildet, das vom Kanalprotein weggehend horizontal in der Membran liegt und sich in Abhängigkeit vom elektrischen Feld durch diese bewegen kann (Jiang *et al.* 2003b) (Abb. 1.3).

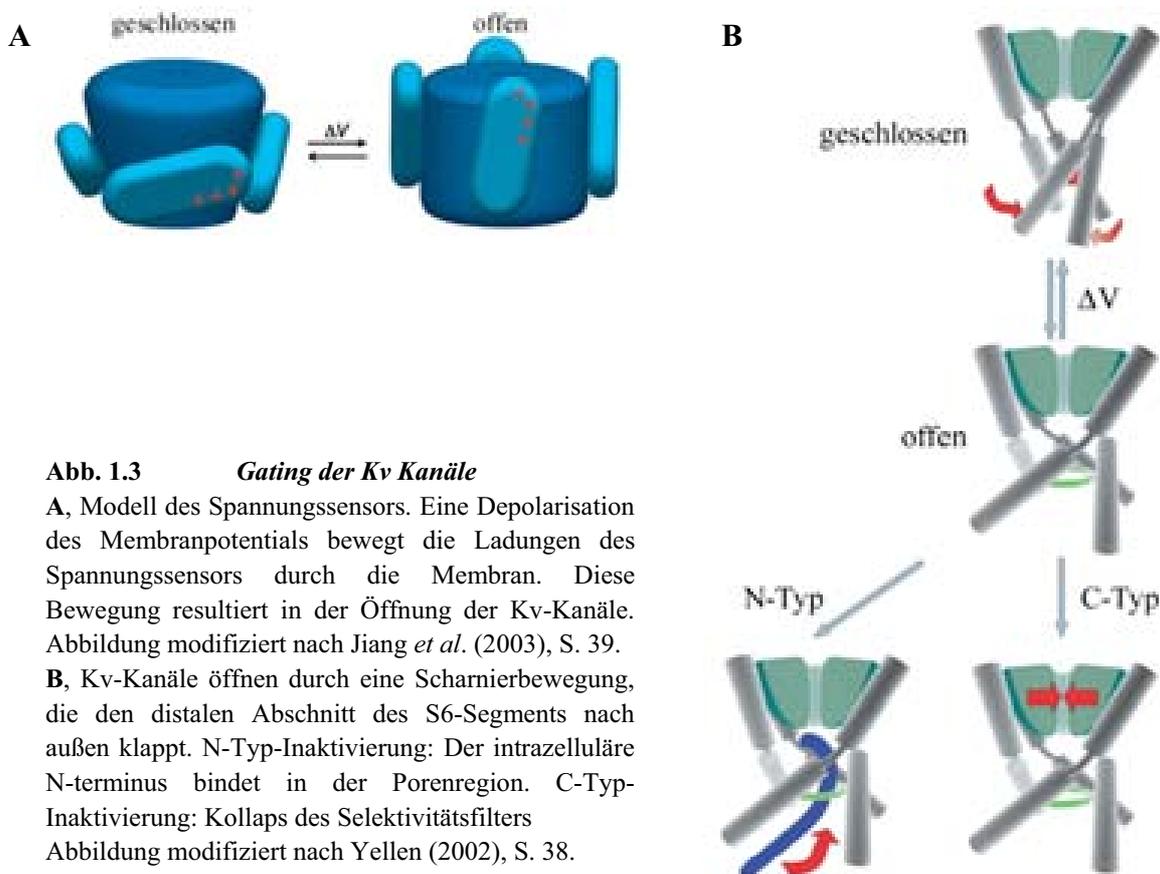


Abb. 1.3 *Gating der Kv Kanäle*

A, Modell des Spannungssensors. Eine Depolarisation des Membranpotentials bewegt die Ladungen des Spannungssensors durch die Membran. Diese Bewegung resultiert in der Öffnung der Kv-Kanäle. Abbildung modifiziert nach Jiang *et al.* (2003), S. 39.

B, Kv-Kanäle öffnen durch eine Scharnierbewegung, die den distalen Abschnitt des S6-Segments nach außen klappt. N-Typ-Inaktivierung: Der intrazelluläre N-terminus bindet in der Porenregion. C-Typ-Inaktivierung: Kollaps des Selektivitätsfilters
Abbildung modifiziert nach Yellen (2002), S. 38.