

# 1. Einleitung

## 1.1 Molekulare Diversität der Kaliumkanäle

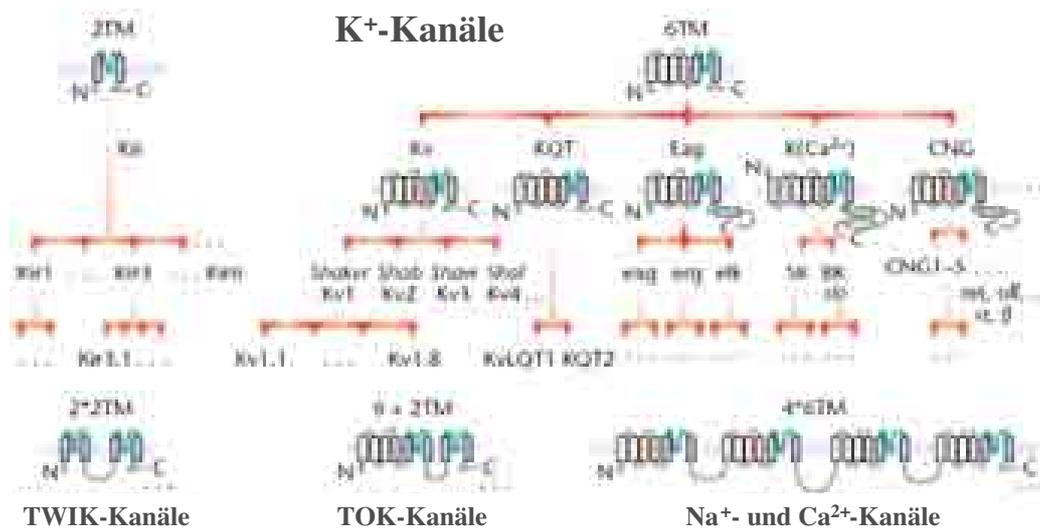
Kaliumkanäle ( $K^+$ -Kanäle) sind tetramere, in biologische Membranen eingebettete Makromoleküle und bilden die größte Gruppe von Ionenkanälen (Chandy und Gutman 1995, Coetzee *et al.* 1999). Sie haben eine Schlüsselfunktion bei der zellulären Erregbarkeit inne, sind in verschiedene Signaltransduktionskaskaden eingebunden und an einer Vielzahl physiologischer Funktionen beteiligt. So regulieren  $K^+$ -Kanäle die Ausschüttung von Neurotransmittern, die neuronale Erregbarkeit, die Sekretion von Insulin, den epithelialen Transport von Elektrolyten und die Kontraktion der Muskelzellen (Hille 1992).

In den Zellmembranen aller Organismen wie auch in einigen Viren konnten funktionsfähige  $K^+$ -Kanäle identifiziert werden (Sansom 1998, Plugge *et al.* 2000, Gazzarrini *et al.* 2003, Mehmel *et al.* 2003). Mehr als 100 verschiedene Subtypen wurden bislang kloniert (Chandy und Gutman 1995, Jan und Jan 1997, Miller 2000, Shieh *et al.* 2000) und weitere putative Kaliumkanalgene wurden durch Genomprojekte (Wei *et al.* 1996) und *EST*-Datenbanken (*expressed sequence tags*) identifiziert (Salkoff und Jegla 1995).

$K^+$ -Kanäle können anhand der Topologie ihrer porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten in drei große Gruppen eingeteilt werden (Abb. 1-1). So unterscheidet man zwischen Kanälen mit sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und einer zwischen S5 und S6 lokalisierten Porenregion (6TM/P), einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen ( $K_{ir}$ , *inward rectifier*) mit nur zwei membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices und einer dazwischenliegenden Porenregion (2TM/P-Kanäle) und Kaliumkanälen mit jeweils vier Transmembrandomänen und zwei Porenregionen (4TM/2P). In dieser dritten Gruppe werden die Leckstromkanäle der TWIK-, TREK-, TASK- und TRAAK-Familien zusammengefasst. Sie sind an der Regulierung des Ruhepotentials beteiligt und stellen eine Besonderheit dar, indem sie vermutlich als Dimere und nicht als Tetramere assemblieren, um einen Kanal zu formen (Coetzee *et al.* 1999).

Zu den 6TM/P- $K^+$ -Kanälen gehören die spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle, namentlich  $K_v$ - und KCNQ-Kanäle, sowie die der EAG-Familie und die  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanäle. Diese werden aufgrund ihres Einzelkanalwertes in drei Untergruppen unterteilt: da sind zum einen die SK-Kanäle (*small conductance  $K^+$ -channel*) mit einer geringen, sowie die IK-Kanäle (*intermediate conductance  $K^+$ -channel*), mit einer mittleren und BK-Kanäle (*big conductance  $K^+$ -channel*) mit einer großen Leitfähigkeit. Letztere nehmen eine

Sonderstellung ein, da sie die sowohl spannungs- als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig sind und eine weitere Transmembrandomäne besitzen (S0), sodass ihr N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist. Des Weiteren verfügt BK über einen 800 Aminosäuren langen C-Terminus, der weitere hydrophobe Domänen aufweist (S 7 bis S10).



**Abb. 1-1: Überblick über die Genfamilie der Kaliumkanal-bildendenden  $\alpha$ -Untereinheiten und verwandter Proteine**

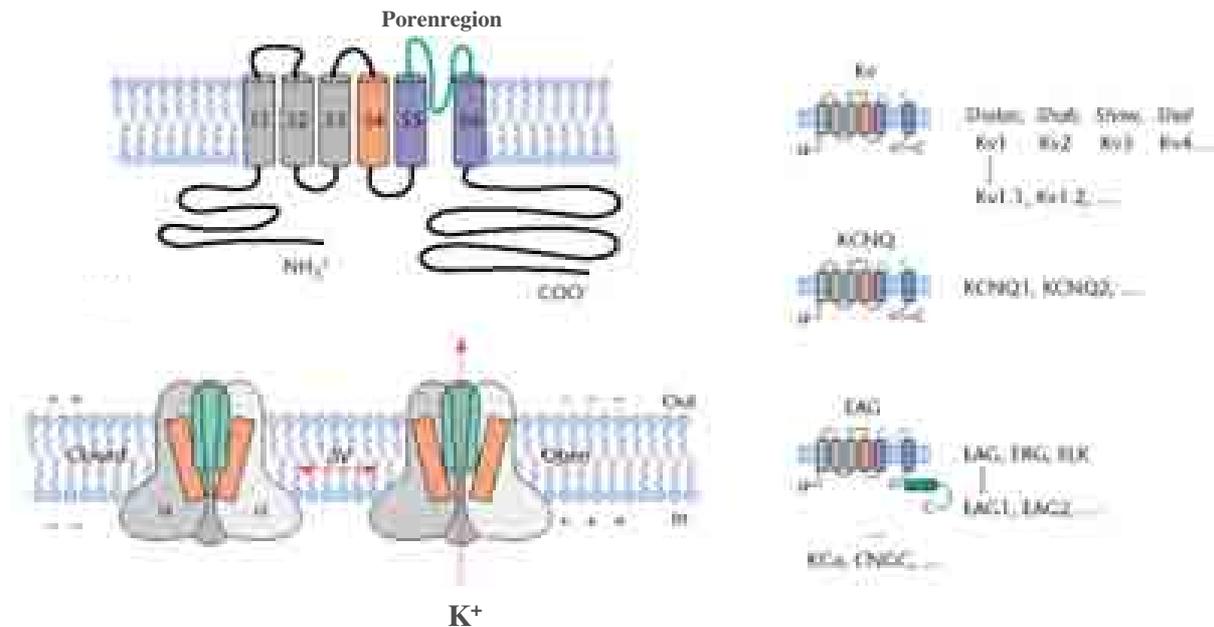
Basierend auf Kaliumkanälen mit 2 bzw. 6 Transmembransegmenten (2TM und 6TM) haben sich im Laufe der Evolution mittels Genduplikation und alternativem Spleißen andere kanalformende Proteine entwickelt: 2\*2TM (TWIK-Kanäle), 6+2TM (TOK-Kanäle) und 4\*6TM (Natrium und Calcium-Kanäle). (modifiziert nach Wei *et al.* 1996)

## 1.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_V$ -Kanäle) bilden zusammen mit Natriumkanälen die funktionelle Basis für die Erzeugung und Ausbreitung von Aktionspotentialen in erregbaren Zellen und werden bei der Depolarisation des Membranpotentials aktiviert (Abb. 1-2). Sie stellen die heterogenste Gruppe unter den spannungsabhängigen Ionenkanälen dar (Chandy und Gutman 1995, Coetzee *et al.* 1999, Heinemann und Hehl 2001).

Bei genetischen Experimenten an der Taufliege *Drosophila melanogaster* wurden verschiedene Loci identifiziert, in denen Mutationen zu einer neuromuskulären Übererregbarkeit führen (Kaplan und Trout 1969, Ikeda und Kaplan 1970, Wu *et al.* 1978, Ganetzky und Wu 1986). Diese manifestiert sich in abnormen Schüttelbewegungen der Hinterbeine unter Etheranästhesie [*Shaker (Sh)*, *ether-à-go-go (eag)*, *slowpoke (slo)* und

*hyperkinetic (Hk)*] bzw. temperaturabhängiger Paralyse [*seizure (sei)*, *slo*, *Hk*]. Die elektrophysiologische Charakterisierung dieser Mutanten zeigte einerseits veränderte (*Sh*) oder spontane (*eag*, *Hk*) Aktionspotentiale in Motoneuronen und reduzierte anormale  $K^+$ -Ströme in den Muskeln (*sh*, *eag*, *Hk*, *slo*). Durch Mutationen im *eag*-Locus werden alle im Muskel der Fliegenlarve identifizierten  $K^+$ -Ströme verändert (Zhong und Wu 1991).



**Abb. 1-2: α-Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle**

Vereinfachtes topologisches Modell einer  $K_V$ - $\alpha$ -Untereinheit (links oben); sechs putative Transmembransegmente (S1-S6) formen die *core*-Region des Kanals, S4 agiert dabei als Spannungssensor und der Linker zwischen S5 und S6 ist Teil der Pore und des Selektivitätsfilter. Ein Schnitt durch einen solchen  $K_V$ -Kanal (links unten) zeigt die Anordnung der vier  $\alpha$ -Untereinheiten zueinander, sowie die Translokation des Spannungssensors (rot) und das Öffnen der Pore (grün) infolge einer Depolarisation der Membran.

Auf der rechten Seite sind die drei Familien der spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle dargestellt: die klassischen  $K_V$ -Kanäle, sowie die KCNQ- und EAG-Familie. (modifiziert nach Heinemann und Hehl 2001)

Das erste Kaliumkanal-Gen, das molekularbiologisch charakterisiert wurde, ist das für einen spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanal kodierende *Shaker*-Gen (Kamb et al. 1987, Papazian et al. 1987, Pongs et al. 1988). Weitere verwandte Gene aus *Drosophila* konnten in den nachfolgenden Jahren kloniert und charakterisiert werden. Auf diese Weise wurden *Shaker* (*Sh*, *Shab*, *Shaw*, *Shal*; Butler et al. 1989 und 1990) und *eag* (*eag*; Brüggemann et al. 1993, Warmke et al. 1991; *erg*; Titus et al. 1997; *elk*; Warmke und Ganetzky 1994) zu Genfamilien erweitert und schließlich auch homologe Gene in Vertebraten identifiziert. Die orthologen Genfamilien der Vertebraten sind  $K_{V1}$  (*Shaker*),  $K_{V2}$  (*Shab*),  $K_{V3}$  (*Shaw*) und  $K_{V4}$  (*Shal*).

Auch *eag* (Warmke *et al.* 1991), *slo* (Atkinson *et al.* 1991) und *seizure* (Titus *et al.* 1997) kodieren für Kaliumkanalproteine; der *Hk*-Genlocus dagegen kodiert für eine akzessorische K<sup>+</sup>-Kanal-Untereinheit (Chouinard *et al.* 1995).

Durch verschiedene Mechanismen, wie z. B. alternatives Spleißen (Lees-Miller *et al.* 1997, Nakamura *et al.* 1998), RNA-Editierung (Patton *et al.* 1997, Hoopengardner *et al.* 2003), und posttranslationale Modifikationen, Heteromultimerisierung und Interaktionen mit regulatorischen Proteinen, wird die funktionelle Vielfalt nativer K<sub>V</sub>-Kanäle weit über die Zahl der bekannten Gene hinaus gesteigert.

### **1.3 Strukturmerkmale spannungsabhängiger Kaliumkanäle**

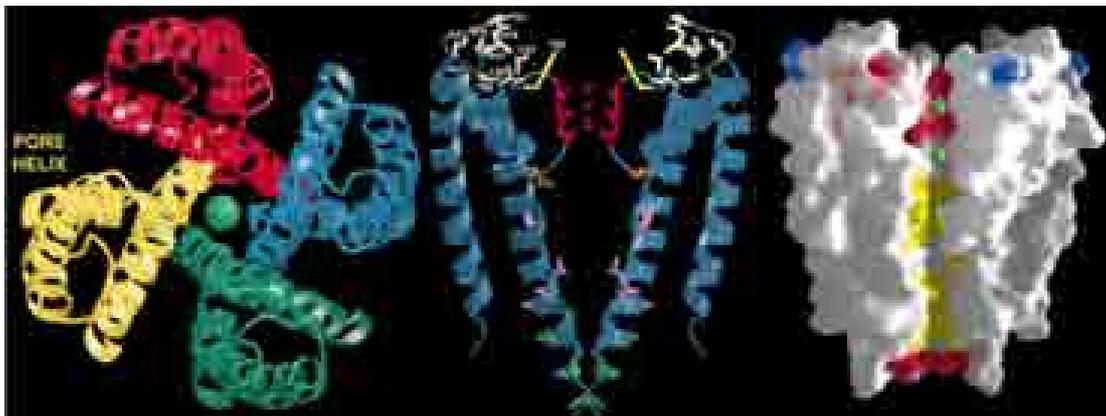
Ein prototypischer Kaliumkanal besteht aus vier porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheiten, die miteinander assemblieren, um einen funktionellen Ionenkanal auszubilden.

Alle  $\alpha$ -Untereinheiten der spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle weisen eine ähnliche Struktur auf. Zu diesen gemeinsamen Strukturparametern gehören sechs hydrophobe Segmente, die die Transmembrandomänen (S1-S6) ausbilden, sowie ein weiteres hydrophobes Segment (H5), zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion, welches einen wesentlichen Anteil der Pore und des Selektivitätsfilters formt (Kirsch *et al.* 1992). In der S4-Domäne ist der Spannungssensor dieser Kanäle lokalisiert, der durch eine Abfolge von positiv geladenen Aminosäuren, die jeweils durch zwei hydrophobe Aminosäuren voneinander getrennt sind ([K/R]XX<sub>n</sub>), gekennzeichnet ist (Papazian *et al.* 1991, Logothetis *et al.* 1992). Der Amino- und der Carboxyterminus sind bei den meisten spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen intrazellulär lokalisiert. Weitere Ionenkanäle, die diese Strukturmerkmale aufweisen sind u. a. die CNG-Kanäle (Kaupp *et al.* 1989) sowie die Pflanzenkanäle AKT1 (Sentenac *et al.* 1992) und KAT1 (Anderson *et al.* 1992).

Die Tetramerisierung der  $\alpha$ -Untereinheiten erfolgt im endoplasmatischen Retikulum als Dimerisierung von Dimeren, noch während die entstehende Proteinkette an Ribosomen gebunden ist (Tu und Deutsch 1999, Lu *et al.* 2001, Deutsch 2002, Kosolapov und Deutsch 2003). Eine Proteindomäne, die für diese Multimerisierung mit verantwortlich ist, befindet sich bei den Proteinen der K<sub>V</sub>-Familie im cytoplasmatischen Aminoterminus (Li *et al.* 1992, Shen *et al.* 1993). Diese sog. T1-Domäne (*first tetramerization domain*) bestimmt die Spezifität der Multimerisierung, ist aber keine zwingende Voraussetzung für die Ausbildung eines funktionellen Kanals. K<sub>V</sub>-Kanälen der KCNQ-Familie fehlt diese aminoternale Tetramerisierungsdomäne. Sie assemblieren

entweder durch die Assoziation mit akzessorischen Untereinheiten (z. B. KCNQ1 mit MinK) oder durch die Ausbildung von Heteromeren (KCNQ2/4 mit KCNQ3); dabei spielt eine carboxyterminal lokalisierte Domäne (*sid*, *subunit interaction domain*; Schwake *et al.* 2003) eine entscheidende Rolle. Auch die Mitglieder der EAG-Familie lagern sich unter Beteiligung einer carboxyterminalen Domäne (*CAD*, *carboxy-terminal assembly domain* bzw. *TCC*, *tetramerising coiled-coil*) zu einem funktionsfähigen Kanal zusammen (Ludwig *et al.* 1997, Jenke *et al.* 2003).

1998 wurde die erste Kristallstruktur eines vom Bakterium *Streptomyces lividans* stammenden Kaliumkanals (KcsA), mit einer Auflösung von 3,2 Å publiziert (Doyle *et al.* 1998). Auf der Grundlage dieser Struktur und einer vielfältigen Anzahl anderer biologischer Daten konnten die strukturellen Merkmale anderer Kaliumkanäle und insbesondere die der Ionenkanalpore besser verstanden werden. Jede der vier  $\alpha$ -Untereinheiten trägt zur Ausbildung der Pore bei, indem ihre Polypeptidketten von der extrazellulären Seite der Membran aus die Pore durchqueren. Innerhalb der Pore findet sich ein hochkonserviertes Sequenzmotiv (GYGD), für die Kalium-Selektivität des Kanals verantwortlich ist (Abb. 1-3).



**Abb. 1-3: Strukturdaten des bakteriellen K<sup>+</sup>-Kanals KcsA von *Streptomyces lividans***

Aufsicht auf ein KcsA-Tetramer (links), die vier Untereinheiten sind dabei verschiedenfarbig dargestellt. Ein seitlicher Blick auf zwei dieser KcsA-Untereinheiten (Mitte) zeigt die Signatursequenz (GYG) der Kaliumkanäle, die den Selektivitätsfilter formt (rot). Auf der rechten Seite ist die molekulare Oberflächenstruktur des KcsA-Kanal und die Kontur der Pore mitsamt dreier K<sup>+</sup>-Ionen (grün) gezeigt. (modifiziert nach Doyle *et al.* 1998)