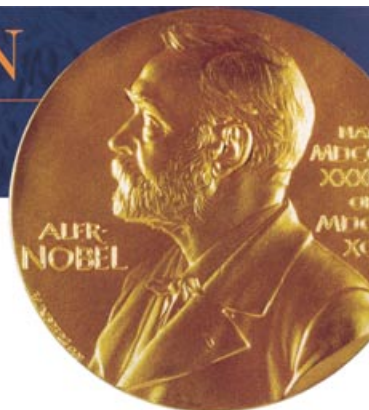


THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2003



Struktur und Funktion von Kanälen in Zellmembranen



Angewandte
Chemie

Kaliumkanäle und die atomare Basis der selektiven Ionenleitung (Nobel-Vortrag)**

Roderick MacKinnon*

Stichwörter:

Ionenkanäle · Membranen · Nobel-Vortrag · Proteinstrukturen · Strukturaufklärung

Aus dem Inhalt

Einleitung	4365
Erste Studien: die Signatursequenz des K^+-Kanals	4366
Die Struktur des Kaliumkanals KcsA und die selektive K^+-Leitung	4367
K^+- und Cl^--Selektivität beruhen auf gemeinsamen Strukturprinzipien	4371
Kann man das Öffnen und Schließen eines K^+-Kanals beobachten?	4372
Abschließende Bemerkungen	4374

Ich wurde am 19. Februar 1956 geboren, inmitten eines Schneesturms. Es ist eine dieser launigen Familiengeschichten, die meine Mutter gerne erzählt. Mein Vater hatte die Fahrt zum Hospital wohl mehrfach in Gedanken durchgespielt, aber anscheinend sah dann bei Nacht und in einem Blizzard alles ganz anders aus. Letzten Endes schafften sie es doch – und ich auch, als viertes von sieben Kindern. Als ich noch sehr jung war arbeitete mein Vater bei der Post, beschäftigte sich nebenbei aber mit Computern und wurde Programmierer an den großen IBM-Mainframesystemen. Meine Mutter arbeitete als Lehrerin in Teilzeit, kümmerte sich aber hauptsächlich zuhause um die Kinder. Wenn ich heute zurückblicke, weiß ich, dass wir nicht viel Geld hatten, seinerzeit war mir das nicht klar. Unsere Eltern schenkten uns eine glückliche Kindheit, sagten uns aber auch deutlich, was sie erwarteten: Fernsehen ist schlecht für dich, lesen ist gut für dich, und sei mir in der Schule fleißig. Es liegt an dir, was aus dir wird. Achte nur darauf, dass dir deine Arbeit gefällt, dann wirst du sie gut machen. Wir schlugen alle völlig unterschiedliche Lebenswege ein. Ich wurde der Wissenschaftler.

Ich vermute, es gab schon früh Anzeichen dafür, dass ich mein Leben lang neugierig sein würde. Bereits als kleiner Junge hatte ich die Angewohnheit, viele Fragen zu stellen: „Was passiert, wenn ...?“ war besonders beliebt. Und ich musste immer wissen wie alles funktioniert. Gerne ließ ich andere an meinen Erklärungen teilhaben, offenbar nicht ohne bisweilen zu nerven. Bei einer Gelegenheit riss meinem Vater der Geduldsfaden, und er nannte mich ein „Kompendium des nutzlosen Wissens“. Verständlich seine Last mit dem einen von sieben Kindern, das ihn in einem fort mit viel zu vielen Fragen und Antworten quälte. Der positive Effekt dieses Zwischenfalls war, dass ich „Kompendium“ im Wörterbuch nachschlug und so ein neues Wort lernte.

Wahrscheinlich gab es sogar Anzeichen, dass meine Neugierde wissenschaftlicher Natur war. Burlington, Massachusetts, war zu meiner Jugend eine ländliche Gegend, und ich liebte es, herumzustreifen und Dinge zu erkunden. Ich hatte eine Steinsammlung und las Kinderbücher über Geologie und Erdgeschichte. Ich baute kleine Vulkane aus Gips und packte

Backpulver und Essig in die Krater, um Vulkanausbrüche nachzumachen. Einmal gab es dabei einen Unfall, der meine Mutter zum Lachen brachte. Darüber war ich bitter enttäuscht, denn in so jungem Alter mochte ich die Belustigung über einen kleinen Jungen, der seiner Mutter erzählt, er habe sich soeben einen Vulkan auf den Zeh fallen lassen, gar nicht teilen! Im Sommer sammelte ich Schmetterlinge, Schildkröten, Schlangen und anderes Getier. Eines Sommers meldete mich meine Mutter in einem wissenschaftlichen Förderkurs für Grundschüler an, und ich durfte ein Mikroskop mit nach Hause nehmen. Ich untersuchte damit alles, was ich finden konnte: Mikroorganismen aus dem nahe gelegenen Teich, Blätter und Grashalme. Ich verbrachte Stunde um Stunde allein, hypnotisiert von den winzig kleinen Dingen unter dem Vergrößerungsglas. Meine wissenschaftliche Neugierde wurde auf der Highschool von sportlichen Aktivitäten zurückgedrängt. Turnen vertrug sich gut mit meiner kleinen Statur und meinem Einzelgängertum. Ich war wohl Mitglied in einer Mannschaft, aber im Grunde ist Turnen doch ein Individualsport. Du lernst eine Technik, dann eine Bewegung und dann eine Übung. Und dann perfektionierst du es durch Training, meistens allein. In Trainer Hayes hatte ich einen Lehrer, der mir den Leitgedanken von Perfektion durch Übung nahebrachte. Eigentlich war ich gar nicht mal schlecht, besonders im Bodenturnen und am Reck. Ich dachte sogar daran, das Turnen am College

[*] Prof. Dr. R. MacKinnon
Howard Hughes Medical Institute
Laboratory of Molecular Neurobiology and Biophysics
Rockefeller University
1230 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)
Fax: (+1) 212-327-7289
E-mail: mackinn@mail.rockefeller.edu

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2003. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

fortzusetzen, aber in meinem Abschlussjahr an der Highschool begann ich dann doch, mir Gedanken über meine berufliche Zukunft zu machen. Ich studierte ein Jahr an der University of Massachusetts in Boston und wechselte dann an die Brandeis University. Brandeis war eine Erfahrung, die mir die Augen öffnete. Zum ersten Mal in meinem Leben befand ich mich in einem ernsthaft intellektuellen Umfeld. Der Unterricht fand in kleinem Rahmen statt, war intensiv und anregend. Ich entdeckte meine Vorliebe – und meine Begabung – für die Naturwissenschaften. Als Hauptfach wählte ich Biochemie und als Betreuer einen jungen Assistant Professor namens Chris Miller. Ich untersuchte den Calciumtransport und lernte, die Zellmembran als eine Elektrode zu begreifen. Chris Miller hatte offensichtlich viel Spaß im Alltag, und ich erinnere mich gerne daran, wie er mich damit ansteckte. Größeren Einfluss auf mein Leben hatte in Brandeis nur eines: der Physikkurs, in dem ich meine spätere Frau Alice Lee kennenlernte, deren funkelnde Augen und scharfer Verstand meine Aufmerksamkeit auf sich zogen.

Entgegen Chris Millers Rat verlies ich die Brandeis University und wechselte in die Medizin. Ich studierte an der Tufts University School of Medicine und wechselte ans Beth Israel Hospital Boston als Arzt im Praktikum für Innere Medizin. Dort lernte ich zwar Vieles, letztlich hätte ich aber doch Chris' Rat befolgen und weiter Naturwissenschaften studieren sollen. In der Medizin wird viel auswendig gelernt, und nur wenige Probleme werden analytisch gelöst. Um den dafür zuständigen Teil meines Gehirns in Form zu halten, machte ich Mathematik-Aufgaben – und das tue ich heute noch, indem ich mir mit der Disziplin, die ich beim Turnen erlernt habe, neue mathematische Methoden aneigne und Aufgaben löse. Gegen Ende meines ärztlichen Praktikums kehrte ich zu den Naturwissenschaften zurück. Mit Jim Morgan untersuchte ich die Rolle von Calcium in der Herzmuskelkontraktion und hielt so den Kontakt zur Medizin. Ich war aber entschlossen, „richtige“ Grundlagenforschung zu betreiben, und das bedeutete, dass ich meine medizinischen Interessen aufgeben musste. Weil ich so viele Jahre in meine medizinische Ausbildung investiert hatte, fiel mir diese Entscheidung schwer: Ich hätte mir eingestehen müssen, einen großen Teil meines Lebens vergeudet zu haben. Und es gab auch praktische Bedenken: Es war an der Zeit, endlich eine feste Anstellung zu bekommen, denn über Jahre meiner Ausbildung hatte mich Alice unterstützt. Ganz zu schweigen davon, dass ich fast 30 war und, abgesehen von meinem Grundstudium an der Brandeis University, keine solide wissenschaftliche Ausbildung erworben hatte: Konnte ich denn überhaupt ein Wissenschaftler werden?



Zwei Faktoren haben meine Entscheidung maßgebend beeinflusst. In meinem ersten Jahr an der Medizinakademie verlor ich meine Schwester Elley, eine Künstlerin und gerade einmal zwei Jahre älter als ich. Die Diagnose lautete auf Leukämie – ich befand mich damals in meiner hämatologischen Famulatur und erfuhr vieles über die schreckliche Krankheit –, und sie lebte nur noch zwei Monate. Dieses entsetzliche Ereignis führte mir vor Augen, wie kostbar und zerbrechlich das Leben ist, und wie wichtig es ist, den Augenblick zu genießen und die Zeit für das zu nutzen, was man



Alice Lee, 1986. Zu dieser Zeit entschied ich mich, die Medizin für die Naturwissenschaften aufzugeben.

gerne tut. Ich stellte mir vor, dass ich eines Tages als Siebzigjähriger auf mein Leben zurückblicken würde: Dreißig würde mir als jung erscheinen – als ein Alter, in dem einem alle Möglichkeiten offenstehen. Der zweite Faktor war Alice. Sie hatte vollstes Vertrauen in mich und war überzeugt, dass ich es als Naturwissenschaftler zu etwas bringen würde, egal, ob dies weitere Einschnitte bei meinem ohnehin schon mickrigen Gehalt als Arzt im Praktikum bedeutete. Sie sagte nur: Du hast keine Wahl, wir werden es irgendwie schaffen.

Erinnerungen an die Zeit in Chris Millers Laboratorium wurden wach, sodass ich für einen Postdoc-Aufenthalt dorthin zurückkehrte. Natürlich ließ er mich wissen, dass ich gleich auf ihn hätte hören sollen. Weil ich einiges aufzuholen hatte, erlernte ich eifrig Techniken und eignete mir die Theorie an. Ich wollte es in Elektrochemie, stochastischen Prozessen, der Theorie linearer Systeme und vielen weiteren Bereichen zum Experten bringen. Ich las Bücher, löste die Übungsaufgaben, begann, den Stoff zu beherrschen und führte Experimente durch. Ich hatte Glück mit einem Kollegen, Jacques Neyton, einem Postdoc aus Frankreich. Jacques war überaus kritisch, und er brütete gerne über Problemen. Wir tauschten oft unsere Ideen aus. Wenn ich ihm eine meiner Ideen erläuterte, saß er nur da und hörte zu. Begann er dann, nach einer Weile, mit einem „Hey Roddy, ich verstehe da etwas nicht“, wusste ich schon, dass ich in Schwierigkeiten war – meine Idee taugte wahrscheinlich nichts!

Nachdem ich eine Serie von biophysikalischen Untersuchungen zu K^+ -Kanälen abgeschlossen hatte, war die Zeit reif, mich auf eine akademische Stelle zu bewerben. In den physiologischen Instituten waren in den späten Achtzigern Spezialisten im Klonen von Kanalgenen eher gefragt als Biophysiker. Peter Hess konnte aber seine Kollegen in Harvard davon überzeugen, dass meine Arbeiten erfolgversprechend waren, und mir wurde eine Stelle als Assistant Professor angeboten. In meinem Labor machten wir gute Fortschritte bei K^+ -Kanälen. Anfangs war es aufregend, aber nach einigen Jahren erkannte ich, dass die Untersuchung der Effekte von Mutationen auf die Kanalfunktion zunehmend weniger Resultate brachte. Wir hatten die Signatursequenz des K^+ -Kanals identifiziert, aber ohne Kenntnis seiner Struktur würden wir nie die chemischen Prinzipien der Ionenselektivität verstehen. An diesem Punkt entschied ich mich, die Röntgenkristallographie zu erlernen, um eines Tages einen K^+ -Kanal sichtbar zu machen. Noch in Harvard begann ich, mir Methoden zur Proteinreinigung und röntgenkristallographische Techniken anzueignen. Zunächst übte ich mit Kanaltoxinen und einem kleinen löslichen Protein, einer PDZ-Domäne. Für meine Entscheidung, die vertraute Umgebung in Harvard zu verlassen, waren zwei Gründe ausschlaggebend: Zum einen brauchte ich Fördermittel für Forschungen auf einem Gebiet, in dem ich keinerlei Erfahrung vorzuweisen hatte. Ein Startfonds, der beim Wechsel an eine neue Universität in Aus-

sicht stand, wäre zu diesem Zweck genau das Richtige. Der zweite – und weitaus wichtigere Grund – war, dass mir der Wechsel an eine andere Universität die Möglichkeit gab, vollständig in das neue Forschungsprojekt einzutauchen. Eine neue Umgebung würde mich von meinen lieb gewonnenen physiologischen Studien zu Ionenkanälen abhalten, sodass ich mich ganz den Strukturstudien zuwenden könnte. Dies war zwingend nötig, wollte ich mich doch mit der Biochemie von Membranproteinen und der Röntgenkristallographie vertraut machen und ein „Gefühl“ für Proteinstrukturen entwickeln. Der Präsident der Rockefeller University, Torsten Wiesel, hatte von meinem Forschungsvorhaben erfahren und machte mir das Angebot, an die Rockefeller University zu wechseln. Dort fand ich die ideale Umgebung, um mich auf ein schwieriges Problem zu konzentrieren. Die Entscheidung, mein erfolgreiches Laboratorium in Harvard aufzugeben, um die Struktur von K^+ -Kanälen zu erforschen, ist als riskant getadelt worden. Seinerzeit musste ich mir anhören, mein Vorhaben sei gänzlich unrealistisch. Aus meiner Sicht hatte ich aber praktisch keine Wahl, denn ich wollte die K^+ -Selektivität verstehen und wusste, dass nur die atomare Struktur Aufschluss darüber geben konnte. Lieber wollte ich beim Versuch scheitern als es gar nicht erst zu probieren! Dabei konnte ich mir zugutehalten, dass ich es gewohnt war, mich in neue Gebiete einzuarbeiten. Ich muss einräumen, dass sich nur wenige meiner damaligen Mitarbeiter an den neuen Forschungen beteiligen wollten – nur ein neuer Postdoc, Declan Doyle, war begeistert. Meine Frau Alice, die in Organischer Chemie ausgebildet war, befürchtete, dass es recht einsam um mich werden könnte und unterstützte mich im Labor. Und es war mein Glück, dass sie seither mit mir zusammengearbeitet hat. Ich habe die Erfahrung gemacht, dass die meisten Menschen keine Veränderungen mögen. Das sehe ich ganz anders: In meinen Augen stehen Veränderungen für neue Ziele und Kreativität, und sie machen das Leben erst interessant. Rückblickend waren die vergangenen acht Jahre in New York an der Rockefeller University eine persönliche Odyssee. Nach bescheidenen Anfängen – nur mit Declan, Alice und mir – wuchs die Arbeitsgruppe schon im ersten Jahr. Mehrere Postdocs schlossen sich uns an, darunter João Morais Cabral und John Imredy. Die Arbeiten mit Membranproteinen gestalteten sich erwartungsgemäß sehr schwierig. Es gab Zeiten, in denen wir schier verzweifelte, aber immer, wenn wir uns in einer Sackgasse wähnten, wurden wir durch ein verheißungsvolles Ergebnis überrascht. Unsere Härtnackigkeit und unser Einsatz zahlten sich am Ende aus. Die atomare Struktur des K^+ -Selektivitätsfilters war aufschlussreicher und schö-



Rod und Alice

ner als ich es mir hätte vorstellen können. Heute ist mein Laboratorium ein wundervoller Ort, dank der Begeisterung und der Ideen der vielen brillanten jungen Wissenschaftler, die aus allen Teilen der Welt zu mir gekommen sind. Gut zu wissen, dass sie das Gebiet der Ionenkanalforschung in eine glänzende Zukunft führen werden.

Mein Dank gilt vielen: Alice, unseren Familien – den MacKinnons und Lees – meiner akademischen Familie von Studenten, Postdocs und Kollegen, meinen Vorgesetzten, die mich stets bei meinen Projekten unterstützt haben, sowie der Rockefeller University, dem Howard Hughes Medical Institute und den National Institutes of Health für ihre Unterstützung. Ich bin dankbar für die Chance, als Naturwissenschaftler arbeiten und wenigstens einen kleinen Teil unserer Welt begreifen zu können. Und die Hoffnung, dass meine besten Ideen und Experimente noch vor mir liegen, ermutigt mich weiterzuforschen.

Einleitung

Lebende Zellen sind von der Zellmembran, einer ungefähr 40 Å dünnen Lipiddoppelschicht, umgeben. Die Zellmembran sorgt dafür, dass der Zellinhalt zusammengehalten wird, sodass die Zelle ihre lebenswichtigen Funktionen ausführen kann. Sie ist aber zugleich eine Barriere für essenzielle Zellbestandteile, einschließlich der Ionen Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cl^- . Die Barrierenwirkung auf den Ionenfluss durch die Membran lässt sich intuitiv verstehen: Das Innere der Zellmembran besteht aus einer öligen Substanz, und Ionen sind in Wasser stabiler als in Öl. Ein Ion ist in Wasser energetisch stabilisiert, weil es von einem elektrischen Feld umgeben ist, das mit benachbarten Molekülen wechselwirkt. Wasser ist eine elektrisch polarisierbare Substanz, d.h., Wassermoleküle richten sich im elektrischen Feld eines Ions so aus, dass die negativ polarisierten Sauerstoffatome hin zu Kationen zeigen und die positiv polarisierten Wasserstoffatome hin zu Anionen. Diese stabilisierenden elektrischen Wechselwirkungen sind in einer weniger polarisierbaren Substanz wie Öl weitaus schwächer. Deshalb wird sich ein Ion bevorzugt im wässrigen Bereich auf einer der beiden

Seiten einer Zellmembran aufhalten, statt in die Membran einzudringen und sie zu durchqueren. Nun kommt es aber bei zahllosen zellulären Prozessen, vom Elektrolyttransport durch das Zellgewebe bis hin zur Erzeugung elektrischer Signale in Neuronen, entscheidend darauf an, dass Ionen durch Zellmembranen fließen. Vermittelt wird dieser Ionenfluss durch spezielle Proteinkatalysatoren – Ionenkanäle – in der Zellmembran. Ionenkanäle haben drei wesentliche Eigenschaften: 1) Sie leiten Ionen schnell; 2) viele Kanäle sind hoch selektiv, d.h., nur bestimmte ionische Spezies fließen, andere hingegen nicht; 3) ihre Funktion wird durch so genannte Gating-Prozesse gesteuert, d.h., die Ionenleitung wird durch bestimmte Stimuli in der Umgebung ein- und ausgeschaltet. In Abbildung 1 sind diese Eigenschaften illustriert.

Die Geschichte der Ionenkanäle begann 1952 mit den Veröffentlichungen von Hodgkin und Huxley über die Theorie des Aktionspotentials im Riesenaxon des Tintenfischs.^[1–4] Ein elementarer Bestandteil ihrer Theorie war die veränderliche Permeabilität der Axonmembran für Na^+ - und K^+ -Ionen. Die Hodgkin-Huxley-Theorie machte keine Aussagen über den Mechanismus, mit dem sich die Permeabilität

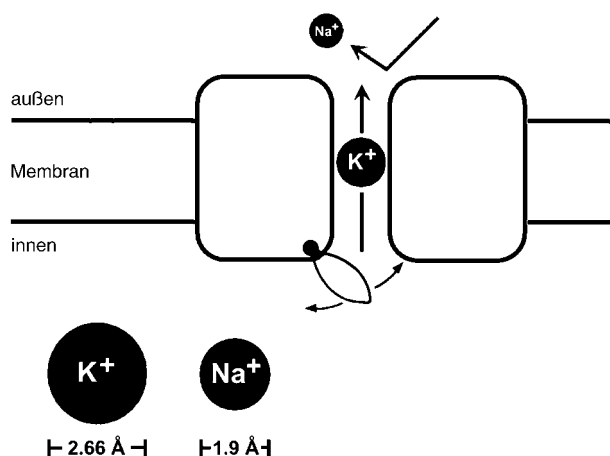


Abbildung 1. Ionenkanäle haben drei grundlegende Eigenschaften:

1) Sie leiten bestimmte Ionen mit hohen Geschwindigkeiten: Beispielsweise fließen 10^7 – 10^8 K^+ -Ionen pro Sekunde durch einen K^+ -Kanal; 2) sie sind selektiv (ein K^+ -Kanal leitet Na^+ praktisch nicht); 3) die Ionenleitung wird durch Öffnen und Schließen eines „Tors“ (Gate) ein- und ausgeschaltet. Die Konformationsänderungen beim Gating-Prozess können durch einen äußeren Stimulus wie die Bindung eines Liganden oder durch die Membranspannung ausgelöst werden. Die K^+ - und Na^+ -Ionen sind mit ihren relativen Größen dargestellt.

einer Membran ändert: Ionen konnten die Membran entweder durch Kanäle passieren oder durch einen trägervermittelten Mechanismus. In den Worten der Autoren: „*Details of the mechanism will probably not be settled for some time*“.^[1] Gerechterweise sollte man anfügen, dass die Überprüfung dieser Aussage beträchtlich zur Forschung an Ionenkanälen in den vergangenen fünfzig Jahren beigetragen hat.

Schon 1955 wurden experimentelle Belege für einen kanalvermittelten Ionenfluss erhalten. Hodgkin und Keynes hatten hierfür den gerichteten Fluss von K^+ -Ionen durch eine Axonmembran in Isotopenmarkierungsexperimenten mit $^{42}K^+$ gemessen.^[5] Sie beobachteten, dass der Fluss von K^+ -Ionen in eine Richtung durch die Membran vom Fluss in die entgegengesetzte Richtung abhing. Ihre Vermutung: „*the ions should be constrained to move in single file and ... there should, on average, be several ions in a channel at any moment*“. Im Verlauf der folgenden zwei Jahrzehnte konnten Armstrong und Hille mit elektrophysiologischen Methoden nachweisen, dass Na^+ - und K^+ -Ionen Zellmembranen durch spezielle Proteinporen – Na^+ -Kanäle und K^+ -Kanäle – durchqueren. Anhand dieser Studien entwickelten sie die Konzepte der Selektivitätsfilter für die Ionendiskriminierung und der Gates für die Regulierung des Ionenflusses.^[6–12] Mit der von Neher und Sakmann entwickelten Patch-Recording-Technik konnten dann die elektrischen Signale einzelner Ionenkanäle erfasst werden, und man fand heraus, in welcher außergewöhnlichen Vielfalt Ionenkanäle in lebenden Zellen vorkommen.^[13]

Die vergangenen zwanzig Jahre erlebten den Aufstieg der Molekularbiologie von Ionenkanälen. Mit der Fähigkeit, Aminosäuresequenzen zu manipulieren und Ionenkanäle stark zu exprimieren, ergaben sich gänzlich neue Möglichkeiten für die Analyse. Auch zunehmend bessere Techniken

zur Bestimmung von Proteinstrukturen und die Entwicklung von Synchrotronanlagen schufen neue Perspektiven. Ich war damals von der Idee fasziniert, die molekularen Grundlagen des elektrischen Systems von Lebewesen aufzuklären, und es hätte keinen günstigeren Moment geben können, in die Thematik einzusteigen.

Erste Studien: die Signatursequenz des K^+ -Kanals

Mit der Klonierung des Shaker- K^+ -Kanalgens aus *Drosophila melanogaster* durch Jan, Tanouye und Pongs wurde erstmals eine Aminosäuresequenz eines K^+ -Kanals aufgedeckt. Es folgten weitere Untersuchungen vieler Labors, in denen aufgeklärt werden sollte, welche dieser Aminosäuren die Pore, den Selektivitätsfilter und das Gate bildeten.^[14–16] In Chris Millers Laboratorium an der Brandeis University entwickelte ich einen Ansatz, um die Aminosäuresequenz der Pore zu identifizieren. Chris und ich hatten in einer Studie gezeigt, dass Charybdotoxin, ein kleines Protein aus Skorpiongift, einen K^+ -Kanal von Skelettmuskelzellen inhibiert, indem es die Pore verschließt und den Ionenfluss unterbindet.^[17] In einem jener spätabendlichen „Probieren wir mal das“-Experimente während eines Molekularbiologiekurses in Cold Spring Harbor entdeckte ich, dass das Toxin – oder das, was sich später als eine Variante des Toxins herausstellte, die bei der Präparation des Charybdotoxins entstanden war – den Shaker- K^+ -Kanal inhibiert.^[18,19] Dies bedeutete, dass ich das Toxin verwenden konnte, um die Pore zu finden, und schon bald darauf waren die ersten gezielt modifizierten Mutanten des Shaker- K^+ -Kanals mit veränderten Bindegenschaften für das Toxin identifiziert.^[20] An der Harvard Medical School, an der ich 1989 als Assistant Professor begonnen hatte, führte ich diese Experimente fort. Mit meiner kleinen Arbeitsgruppe in Harvard, bestehend aus Tatiana Abramson, Lise Heginbotham und Zhe Lu, und gelegentlich mit Gary Yellen an der Johns Hopkins University, erhielt ich einige interessante Ergebnisse zum Aufbau der K^+ -Kanäle. Es mussten Tetramere sein, in denen die vier Untereinheiten einen zentralen Ionenpfad umschließen.^[21] Dieses Ergebnis war nicht sonderlich überraschend, die Experimente und Analysen waren aber elegant, denn sie erforderten lediglich simple Messanordnungen und die Anwendung einfacher Binomialstatistik. Wir folgerten auch, dass eine Porenschleife jeder Untereinheit in den zentralen Ionenpfad hineinragt (Abbildung 2).^[22] Diese Schleife bildete die Bindungsstelle für Skorpiontoxine^[20,23,24] und für den Inhibitor Tetraethylammonium-Ion,^[25,26] den Armstrong und Hille Jahrzehnte zuvor in ihrer richtungsweisenden Analyse der K^+ -Kanäle eingesetzt hatten.^[9,27] Was mir am wichtigsten erschien war die Tatsache, dass Mutationen bestimmter Aminosäuren in der Schleife die Fähigkeit des Kanals, zwischen K^+ und Na^+ zu unterscheiden, beeinflussten.^[28,29] Derweil wurden neue K^+ -Kanalgene entdeckt, und alle hatten ein gemeinsames Merkmal: Genau die Aminosäuren, die wir als wichtig für die K^+ -Selektivität identifiziert hatten, waren konserviert (Abbildung 3). Wir benannten diese Aminosäuren als die Signatursequenz des K^+ -Kanals und entwickelten ein Modell, in dem vier Porenschleifen dadurch einen

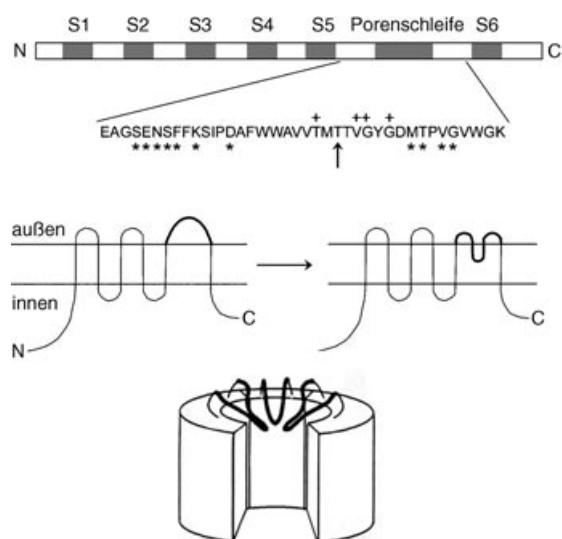


Abbildung 2. Eine der ersten Darstellungen eines tetrameren K^+ -Kanals mit einem Selektivitätsfilter aus Porenschleifen. Die Lineardarstellung der Untereinheit eines Shaker- K^+ -Kanals im oberen Teil der Abbildung zeigt schattiert die hydrophoben Segmente S1 bis S6 und den als Porenschleife bezeichneten Bereich. Darunter ist ein Teil der Aminosäuresequenz der Porenschleife des Shaker- K^+ -Kanals wiedergegeben, in dem diejenigen Aminosäuren markiert sind, die mit extrazellulären Skorpiontoxinen (*) sowie intrazellulären Tetraethylammonium-Ionen (↑) und K^+ -Ionen (+) wechselwirken. Man vermutete, dass die Porenschleife in die Membran hineinragt (Mitte) und einen Selektivitätsfilter im Zentrum der vier Untereinheiten bildet (unten).

Bakterien	2TM : TATTVGYG
Archaea	6TM : TATTVGYG
Pflanzen	6TM : TLTTVGYG
Fruchtfliege	6TM : TMTTVGYG
Wurm	6TM : TMTTVGYG
Maus	6TM : SMTTVGYG
Mensch	2TM : TQTTIGYG
Mensch	6TM : TMTTVGYG

Abbildung 3. Die Signatursequenz des K^+ -Kanals (angegeben im Einbuchstabencode für Aminosäuren) ist im Stammbaum der Lebewesen hoch konserviert. Manche K^+ -Kanäle enthalten sechs Transmembransegmente pro Untereinheit (6TM), andere nur zwei (2TM). 2TM- K^+ -Kanäle entsprechen 6TM- K^+ -Kanälen ohne die ersten vier Transmembransegmente (S1–S4 in Abbildung 2).

Selektivitätsfilter bilden, dass sie mit ihrer Signatursequenz in das Innere der Pore ragen.^[22,29]

Wenn man sich die Einzelkanalleitfähigkeit vieler K^+ -Kanäle in Zellen vergegenwärtigt, wird man schnell erkennen, wie erstaunlich diese molekularen Funktionseinheiten sind. Bei den für Zellen typischen elektrochemischen Gradienten werden K^+ -Ionen mit einer Geschwindigkeit von 10^7 bis 10^8 Ionen pro Sekunde geleitet. Dies kommt der Frequenz nahe, mit der K^+ -Ionen aus der Lösung am Poreneingang eintreffen, d. h., der Fluss der K^+ -Ionen durch die Pore ist fast so schnell wie die Diffusion zur Pore. Daraus folgt, dass die Energiebarriere im Kanal sehr niedrig sein muss – vergleichbar derjenigen für K^+ -Ionen, die durch Wasser diffundieren. Noch bemerkenswerter bei all dem ist, dass diese hohen Geschwindigkeiten mit einer hervorragenden Selektivität

einhergehen: Der K^+ -Kanal leitet K^+ , ein einwertiges Kation mit einem Pauling-Radius von 1.33 \AA , nicht aber Na^+ , ein ebenfalls einwertiges Kation mit einem Pauling-Radius von 0.95 \AA – und diese Ionenselektivität ist entscheidend für das Überleben einer Zelle. Wie sind diese hohen Transportgeschwindigkeiten und die zugleich hohe Selektivität vereinbar? Um diese Frage beantworten zu können, musste die atomare Struktur bekannt sein, die von den Aminosäuren der Signatursequenz gebildet wird, so viel war klar. Dass die Aminosäuren der Signatursequenz von K^+ -Kanälen im gesamten Stammbaum der Lebewesen von Bakterien^[30] bis hin zu höheren eukaryotischen Zellen konserviert sind, bedeutet, dass die Natur eine sehr ausgefeilte Lösung für eine schnelle und selektive K^+ -Leitung durch die Zellmembran gefunden hat. Als ich dies erkannt hatte, wurde mir klar, dass ich ein Bild von einem K^+ -Kanal und seinen Selektivitätsfilter erhalten musste.

Die Struktur des Kaliumkanals KcsA und die selektive K^+ -Leitung

Ich begann, mich mit Kristallographie zu beschäftigen. Zwar wusste ich nicht, wie ich das Geld für diese Forschungen bekommen würde – aber wo ein Wille ist, da ist auch ein Weg!

Durch einen glücklichen Umstand erläuterte ich meine Pläne dem damaligen Präsidenten der Rockefeller University, Torsten Wiesel. Er schlug mir vor, an die Rockefeller University zu kommen, da ich mich dort dem Problem besser widmen könne. Ich nahm sein Angebot an und wechselte 1996 an das dortige Howard Hughes Medical Institute. Zu Anfang waren Declan Doyle und meine Frau Alice Lee MacKinnon mit dabei, im Laufe eines Jahres kamen weitere Mitarbeiter hinzu, darunter João Morais Cabral, John Imredy, Sabine Mann und Richard Pfuetzner. Wir mussten ständig dazulernen, und was uns an Kapazität und Fertigkeiten fehlte, machten wir mit Enthusiasmus mehr als wett – es war eine ganz besondere Zeit. Zuerst wussten wir nicht, wie wir jemals genug K^+ -Kanal-Protein für eine Kristallisation erhalten sollten. Die Signatursequenz des K^+ -Kanals wurde allerdings in einer zunehmenden Zahl von prokaryotischen Genen identifiziert, was die Experimentierung in *Escherichia coli* möglich machte. Wir konzentrierten unsere Arbeiten auf den bakteriellen K^+ -Kanal KcsA aus *Streptomyces lividans*, der von Schrempf et al. entdeckt worden war.^[31] Der KcsA-Kanal hat einen einfachen Aufbau mit nur zwei Transmembransegmenten pro Untereinheit und entspricht dem Shaker- K^+ -Kanal ohne die Segmente S1–S4 (Abbildung 2). Trotz seines prokaryotischen Ursprungs hatte der KcsA-Kanal beinahe die gleiche Aminosäuresequenz wie der Shaker- K^+ -Kanal. Auch die pharmakologischen Eigenschaften, einschließlich der Inhibierung durch Skorpiontoxine, stimmten weitgehend überein.^[32] Evolutionär betrachtet war dies für uns überraschend, denn warum sollte ein Skorpion einen bakteriellen K^+ -Kanal inhibieren wollen! Andererseits war uns sofort klar, was dieser Befund in der pragmatischen Sichtweise des Proteinbiophysikers bedeutete: Der KcsA-Kanal und der Shaker- K^+ -Kanal mussten strukturell sehr ähnlich sein.

Vom KcsA-Kanal erhielten wir zwar Kristalle, diese waren aber für eine Röntgenbeugungsanalyse praktisch unbrauchbar. Nachdem wir uns eine ganze Weile abgemüht hatten, begann ich mich zu fragen, ob vielleicht ein Teil des Kanals generell ungeordnet war und so die Kristallisation störte. Glücklicherweise waren meine Nachbarn, Brian Chait und der Postdoc Steve Cohen, Experten in der Analyse löslicher Proteine durch limitierte Proteolyse und Massenspektrometrie, und ihre Technik eignete sich ausgezeichnet für Membranproteine. Wir fanden, dass der KcsA-Kanal extrem formstabil war – mit Ausnahme seines C-Terminus. Nach Entfernen der fehlgeordneten Aminosäuren am C-Terminus mit Chymotrypsin war die Kristallinität drastisch verbessert, sodass wir in der Lage waren, eine erste Struktur bei einer Auflösung von 3.2 Å zu lösen.^[33] Wir konnten die K⁺-Ionen in der Pore bei dieser Auflösung nicht eindeutig erkennen, aber meine langjährige Erfahrung mit dem K⁺-Kanal sagte mir, dass K⁺ durch Rb⁺ und Cs⁺, die eine höhere Elektronendichte aufweisen, ersetzt werden konnte. Die Rb⁺- und Cs⁺-Fourier-Differenzkarten zeigten, dass diese Ionen in der Pore aufgereiht waren – ganz so, wie Hodgkin und Keynes es sich 1955 wohl vorgestellt hatten.^[5]

Die KcsA-Struktur erklärte vieles, aber bevor ich sie beschreibe, durchbreche ich die zeitliche Abfolge, um den nächsten wichtigen Schritt in der technologischen Entwicklung zu schildern. Eine genaue Beschreibung der Koordination der Ionen im Inneren des Selektivitätsfilters erfordert eine höhere Strukturauflösung. Anhand des Ergebnisses mit 3.2-Å-Auflösung konnten wir mit unserem Wissen über die Struktur kleiner Moleküle, durch unsere chemische Intuition also, die Positionen der Carbonyl-Sauerstoffatome der

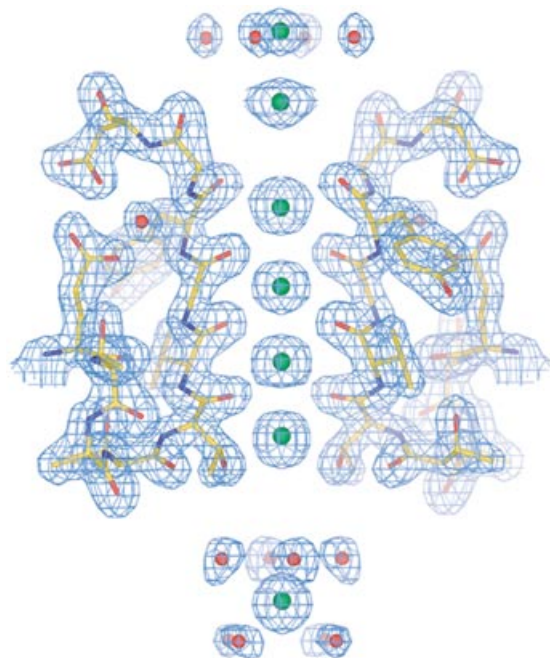


Abbildung 4. Elektronendichte ($2F_o - F_c$ konturiert mit 2σ), abgeleitet aus einer hochauflösten Struktur des KcsA-K⁺-Kanals. Dieser Bereich des Kanals enthält den Selektivitätsfilter mit K⁺-Ionen und Wassermolekülen entlang des Ionenpfades. Das verfeinerte Atommodell ist in die Elektronendichtedarstellung eingepasst. Übernommen aus Lit. [34].

Hauptkette ableiten – die Atome des Selektivitätsfilters mussten wir aber im Detail sehen. Eine hochauflöste Struktur zu erhalten, erwies sich als sehr schwierig. Nach über drei Jahren Arbeit durch João und dann Yufeng (Fenny) Zhou gelang es uns schließlich, hochwertige Kristalle durch Anbringen von monoklonalen Fab-Fragmenten an KcsA zu erzeugen. Diese Kristalle lieferten uns die Information, die wir brauchten: eine Struktur mit einer Auflösung von 2.0 Å, die die Koordination der K⁺-Ionen durch die Atome des Selektivitätsfilters erkennen ließ (Abbildung 4).^[34] Was verriet uns die Struktur des K⁺-Kanals, und warum waren die Aminosäuren der Signatursequenz konserviert?

Nicht alle Proteinstrukturen sprechen eine verständliche Sprache, der KcsA-K⁺-Kanal aber tut es. Vier Untereinheiten umfassen einen zentralen Ionenpfad durch die Membran (Abbildung 5a). Zwei der vier Untereinheiten sind in Abbildung 5b zusammen mit der Elektronendichte an den K⁺-Ionen und den Wassermolekülen entlang der Pore gezeigt. In der Membranmitte ist der Ionenpfad sehr breit; er bildet hier einen Hohlraum von ca. 10 Å Durchmesser, in dessen Zentrum sich ein hydratisiertes K⁺-Ion befindet. Jede Unter-

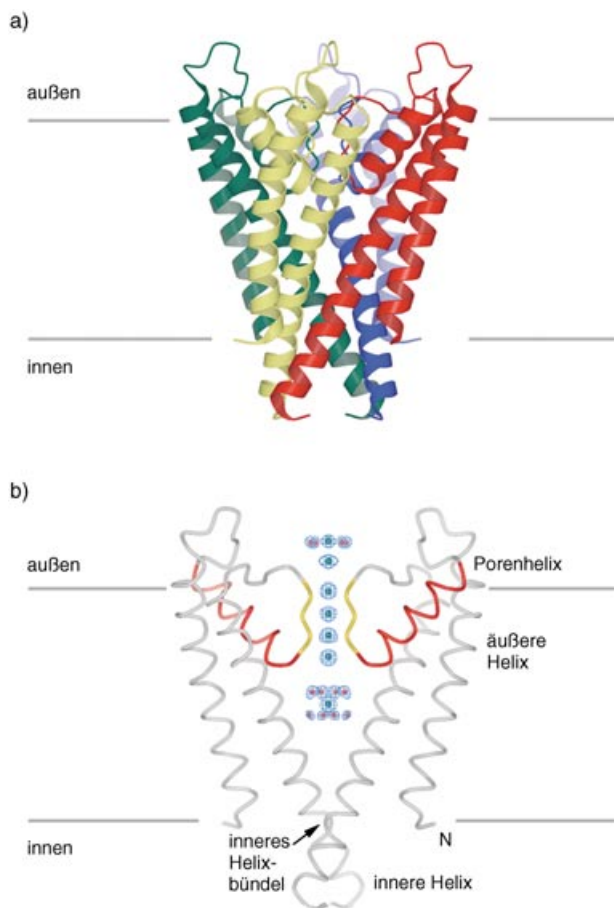


Abbildung 5. a) Bändermodell des KcsA-K⁺-Kanals. Die vier Untereinheiten sind unterschiedlich gefärbt. Der Kanal ist so abgebildet, dass sich die extrazelluläre Lösung oben befindet. b) Der KcsA-K⁺-Kanal ohne vordere und hintere Untereinheiten. Die Porenhelices sind rot, der Selektivitätsfilter gelb; die Elektronendichte entlang des Ionenpfades ist als blaues Gitternetz dargestellt. Die äußeren Helices entsprechen den Segmenten S5 bzw. S6 in Abbildung 2.

einheit richtet das C-terminale Ende einer Porenhelix (rot) hin zum Ion. Der C-Terminus einer α -Helix trägt eine negative Ladung, da sich hier Carbonyl-Sauerstoffatome befinden, die nicht an Wasserstoffbrücken der Sekundärstruktur beteiligt sind. Die Porenhelices sind deshalb so ausgerichtet, dass sie das K^+ -Ion im Hohlraum stabilisieren. Zu Beginn dieses Vortrages habe ich auf den grundsätzlichen Aspekt hingewiesen, dass die Zellmembran durch ihr hydrophobes Inneres eine Energiebarriere für den Ionenfluss bildet. In der KcsA-Struktur erkennen wir nun eine simple Logik, und elektrostatische Rechnungen stützen die Intuition:^[35] Der K^+ -Kanal verringert die dielektrische Barriere der Membran, indem er ein K^+ -Ion tief innerhalb der Membran hydratisiert und durch Ladungen am Ende der α -Helix stabilisiert.

Wie unterscheidet der K^+ -Kanal zwischen K^+ und Na^+ ? Unsere ersten Mutagenesestudien hatten ergeben, dass die Aminosäuren der Signatursequenz für diese wohl grundlegendste Funktion des K^+ -Kanals maßgeblich sind. Abbildung 6 zeigt die von der Signatursequenz gebildete Struktur –

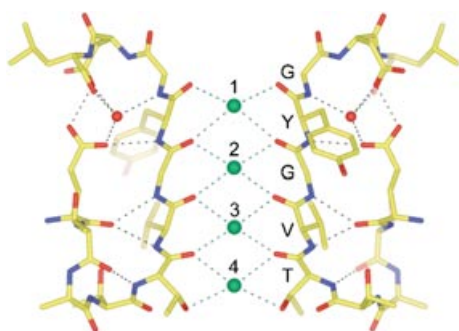


Abbildung 6. Details der Struktur des K^+ -Selektivitätsfilters (zwei Untereinheiten): Sauerstoffatome (rot) koordinieren K^+ -Ionen (grün) in den Positionen 1 bis 4 (von der extrazellulären Seite beginnend gezählt). Die Aminosäuren der Selektionssignatursequenz sind gemäß dem Einbuchstabencode bezeichnet (gelb Kohlenstoff, blau Stickstoff). Grüne und graue gestrichelte Linien markieren Sauerstoff- K^+ -Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrücken.

den Selektivitätsfilter – des auf der extrazellulären Seite liegenden Drittels des Ionenpfades. Die Glycinreste ebenso wie der Threoninrest in der Sequenz TVGYG nehmen Diederwinkel ein, die im Ramachandran-Diagramm in oder nahe der Region für linksgängige Helices liegen, wodurch die Carbonyl-Sauerstoffatome der Hauptkette in dieselbe Richtung zeigen, nämlich entlang der Ionen in der Pore. Warum diese Sequenz unter den K^+ -Kanälen so stark konserviert ist, ist einfach zu verstehen: Die alternierenden Glycinreste ermöglichen die erforderlichen Diederwinkel, das Hydroxyl-Sauerstoffatom koordiniert ein K^+ -Ion, und die Seitenketten von Valin und Tyrosin ragen in den Proteinkern um den Selektivitätsfilter hinein und geben so eine feste Geometrie vor. Das Ergebnis ist eine enge Röhre mit vier äquidistanten K^+ -Bindungsstellen, die beginnend von der extrazellulären Seite mit 1 bis 4 nummeriert werden. Jede Bindungsstelle ist ein Käfig aus acht Sauerstoffatomen an den Ecken eines Würfels oder eines quadratischen Antiprismas (Abbildung 7).

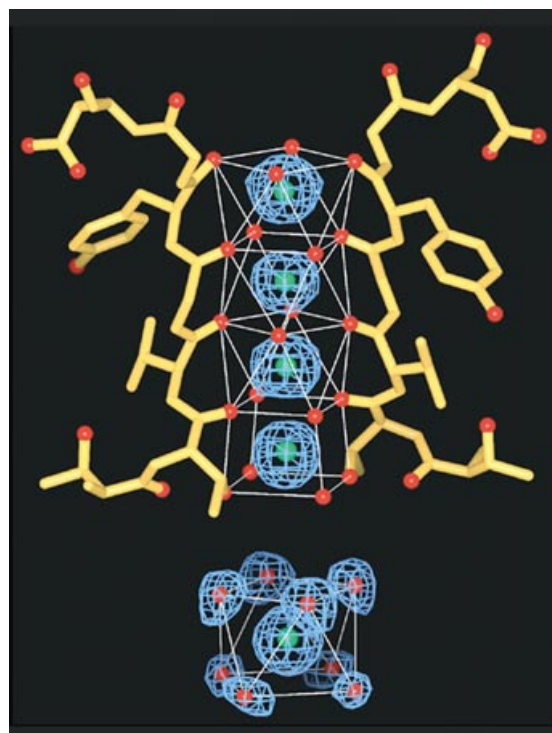


Abbildung 7. Ein K^+ -Kanal ahmt die Hydrathülle eines K^+ -Ions nach. Dargestellt sind die Elektronendichte (blaues Gitternetz) für K^+ -Ionen im Filter und für ein K^+ -Ion und Wassermoleküle im zentralen Hohlraum. Weiße Linien verdeutlichen die Koordinationsumgebung von K^+ im Selektivitätsfilter und in Wasser. Übernommen aus Lit. [34].

Die Bindungsstellen ähneln denen der einzelnen Alkalimetall-Bindungsstelle in Nonactin, einem K^+ -selektiven Antibiotikum mit fast identischen K^+ -O-Abständen.^[36,37] Das Prinzip der K^+ -Selektivität zeigt sich in einem feinen Detail der Kristallstruktur von KcsA. Die Sauerstoffatome, die die K^+ -Ionen im Selektivitätsfilter umgeben, sind fast genau wie die Wassermoleküle angeordnet, die an das hydratisierte K^+ -Ion im Hohlraum koordinieren. Dies illustriert, wie die Bindungsstellen im Filter den Energieaufwand der Dehydratisierung von K^+ ausgleichen. Das Na^+ -Ion ist offensichtlich zu klein für die K^+ -Bindungsstellen, sodass die Dehydratisierungsenergie nicht kompensiert wird.

Nachdem wir die Struktur gelöst hatten, widmeten wir uns vorrangig der Frage, wie viele Ionen gleichzeitig in den Selektivitätsfilter passen würden. Um zu verstehen, wie sich die Ionen durch den Filter bewegen, mussten wir die Stöchiometrie des Ionenleitungsprozesses kennen; das bedeutete, wir mussten wissen, wie viele Ionen den Filter besetzen können. Die vier Bindungsstellen waren klar, aber sind auch alle zur gleichen Zeit besetzt? Eine Reihe von vier K^+ -Ionen mit Abständen zwischen den Zentren von 3.3 Å erschien aus elektrostatischen Gründen unwahrscheinlich. In einem ersten Ansatz vermuteten wir, dass es eher zwei Ionen sein würden, was die mit den größeren Alkalimetallionen Rb^+ und Cs^+ beobachtete Elektronendichte besser erklären würde.^[33,38] Handfeste Beweise für die präzise Ionenzahl lieferte die hochaufgelöste Struktur mit Tl^+ .^[40] Thallium ist das beste „ K^+ -Analogon“: Es fließt durch K^+ -Kanäle, hat

einen ähnlichen Radius wie K^+ und eine ähnliche Dehydratationsenergie. Außerdem verfügt es über Merkmale, die in der Kristallographie von Vorteil sind, wie eine hohe Elektronendichte und ein anomales Signal. Ein schwerwiegender Nachteil beim Arbeiten mit Tl^+ ist die Bildung von unlöslichem $TlCl$ mit Cl^- . Fenny arbeitete peinlichst genau die experimentellen Bedingungen heraus und bestimmte, dass im Mittel zwischen zwei und zweieinhalb leitende Ionen gleichzeitig im Filter sind, entsprechend einem Besetzungsgrad von ungefähr $\frac{1}{2}$.

Wir beobachteten auch, dass die Zahl der Ionen von zwei auf eins abnimmt, wenn die Konzentration von K^+ (oder Tl^+) in der Kristallbadlösung ausreichend herabgesetzt wird (unter normales zelluläres Niveau). Verbunden damit findet eine Strukturänderung zu einer „kollabierten“ Konformation des Filters mit einer Engstelle im Mittelteil statt.^[34,40] Wie in Abbildung 8 gezeigt ist, verursacht bei Konzentrationen über 20 mM der Eintritt eines zweiten K^+ -Ions eine Strukturänderung zu einer „leitenden“ Konformation. Na^+ bewirkt selbst bei Konzentrationen von 500 mM keine solche Konformationsänderung.

Die K^+ -induzierte Konformationsänderung hat thermodynamische Konsequenzen für die Affinität der beiden K^+ -Ionen im „leitenden“ Filter. Ein Teil der Bindungsenergie des zweiten Ions muss für die Konformationsänderung aufgewendet werden, sodass im Ergebnis die beiden Ionen mit geringerer Affinität binden. Diese Aussage kann man intuitiv verstehen, wenn man bedenkt, dass die beiden Ionen der Tendenz des Filters, zu kollabieren und eines der Ionen herauszudrängen, entgegenwirken müssen, d. h., die „leitende“ Zweiionenkonformation steht unter einer gewissen Spannungsbelastung, die die Affinität für K^+ herabsetzt. Für einen Ionenkanal ist dies eine wünschenswerte Eigenschaft, da eine schwache Bindung hohe Leitungsgeschwindigkeiten begünstigt. Dasselbe Prinzip, die Hypo-

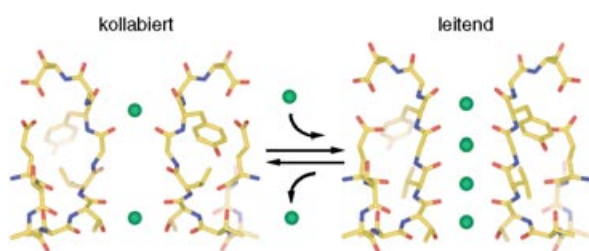


Abbildung 8. Der Selektivitätsfilter kann zwei Konformationen einnehmen. Bei niedrigen K^+ -Konzentrationen befindet sich im Mittel ein K^+ -Ion an einer der beiden Bindungsstellen nahe dem Ein- und Ausgang des Filters, der in der Mitte kollabiert ist. Bei hohen K^+ -Konzentrationen tritt ein zweites Ion in den Filter ein, der dadurch in eine leitende Konformation übergeht. Im Mittel befinden sich im leitenden Filter zwei K^+ -Ionen an vier Bindungsstellen; der Besetzungsgrad beträgt dabei ungefähr $\frac{1}{2}$.

these der induzierten Passform (induced fit), war bereits Jahrzehnten zuvor von Enzymologen formuliert worden, um die hohe Spezifität bei niedriger Substrataffinität in der Enzymkatalyse zu erklären.^[39]

Wären die beiden K^+ -Ionen statistisch im „leitenden“ Filter verteilt, so würden sie die vier Bindungsstellen in sechs möglichen Zuständen belegen. Mehrere Befunde widersprachen jedoch diesem Modell. Zum Beispiel nehmen Rb^+ und Cs^+ offenbar bevorzugt Zustände ein, bei denen der Besetzungsgrad in Position 2 niedrig ist.^[38,40] Mit K^+ fanden wir ein ungewöhnliches Dublettsignal für die Elektronendichte am extrazellulären Eingang des Selektivitätsfilters (siehe Abbildung 9).^[34] Eine Erklärung hierfür konnte sein, dass K^+ -Ionen

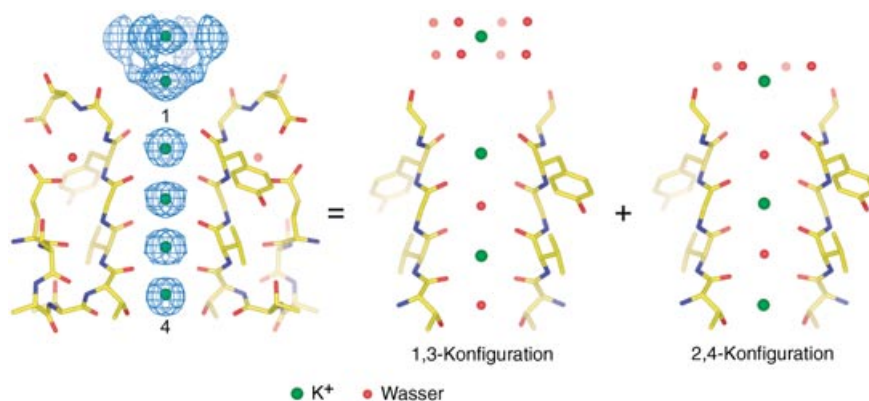


Abbildung 9. Zwei K^+ -Ionen im Selektivitätsfilter liegen vermutlich überwiegend in den beiden spezifischen Konfigurationen 1,3 und 2,4 vor. Übernommen aus Lit. [34].

aus der Lösung durch die negative Oberflächenladung des Proteins in der Nähe des Eingangs angezogen und gleichzeitig durch K^+ -Ionen im Inneren des Filters abgestoßen werden. Zwei diskrete Signale lassen auf zwei Verteilungen von Ionen im Filter schließen. Falls die K^+ -Ionen aus elektrostatischen Gründen durch ein Wassermolekül getrennt sind, wären dies die 1,3-Konfiguration (K^+ -Ionen in den Positionen 1 und 3 mit einem Wassermolekül dazwischen) und die 2,4-Konfiguration (K^+ -Ionen in den Positionen 2 und 4 mit einem Wassermolekül dazwischen). Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Mutation an der Position 4 (Threonin gegen Cystein) die Besetzung von K^+ in den Positionen 2 und 4, aber nicht in 1 und 3 beeinflusst. Dies ist ein gewichtiges Indiz für spezifische 1,3- und 2,4-Konfigurationen von K^+ -Ionen im Selektivitätsfilter.^[69]

Aus dem Befund, dass Paare von K^+ -Ionen diskrete Konfigurationen einnehmen, wurde ein Mechanismus für den Ionenfluss abgeleitet (Abbildung 10a).^[38] Demnach könnten die K^+ -Ionen zwischen den Konfigurationen 1,3 und 2,4 diffundieren (unterer Pfad), oder ein Ion könnte von einer Seite der Membran in den Filter eintreten und die lineare Anordnung aus Ionen und Wassermolekülen weiterschieben, wodurch ein K^+ -Ion auf der gegenüberliegenden Seite der Membran herausgedrängt wird (oberer Pfad). Die Bewegungen müssten konzertiert sein, da der Filter an keiner Stelle breiter ist als ein K^+ -Ion oder ein Wassermolekül. Die beiden Pfade bilden einen Kreislauf: Bei einem vollständigen Kreis-

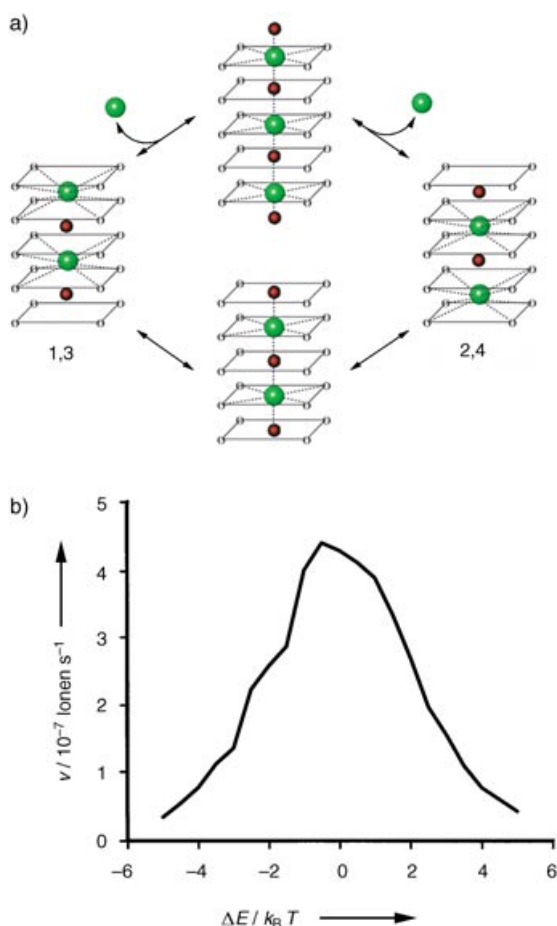


Abbildung 10. a) Kreislauf der K^+ -Leitung über die 1,3- und die 2,4-Konfiguration. Der Selektivitätsfilter ist durch fünf quadratische Ebenen von Sauerstoffatomen dargestellt. (K^+ grün, Wasser rot). b) Simulierter K^+ -Fluss im Kreislauf als Funktion der Energiedifferenz zwischen der 1,3- und 2,4-Konfiguration. Übernommen aus Lit. [38].

lauf bewegt sich jedes Ion nur um einen Teil der Gesamtstrecke durch den Filter, insgesamt wird aber eine Ladung über die gesamte Strecke verschoben. Wir würden erwarten, dass sich die beiden K^+ -Ionen, die während des gesamten Kreislaufs im Kanal vorliegen, elektrostatisch abstoßen. Zusammen mit der Konformationsänderung, die ein „leitender“ Filter bei Aufnahme des zweiten Ions eingeht, sollte die elektrostatische Abstoßung hohe Leitungsgeschwindigkeiten durch eine herabgesetzte K^+ -Affinität bewirken.

Die absoluten Geschwindigkeiten von 10^7 bis 10^8 Ionen pro Sekunde sind eine eindrucksvolle Leistung für einen selektiven Ionenkanal. Die kristallographischen Daten lassen darauf schließen, dass K^+ -Kanäle mit sehr hoher Leitfähigkeit, so wie KcsA, nahe der maximalen Geschwindigkeit arbeiten, die der Leitungsmechanismus zulässt. Alle vier Positionen im Filter weisen einen Bedeckungsgrad für K^+ von nahezu $1/2$ auf, was bedeutet, dass die 1,3- und 2,4-Konfigurationen gleich wahrscheinlich, d.h. energetisch äquivalent sind – es ist aber nicht offensichtlich, warum dies so sein sollte. Eine Simulation der Ionendiffusion im Kreislauf liefert eine mögliche Erklärung: Der maximale Fluss wird erreicht, wenn die Energiedifferenz zwischen der 1,3- und 2,4-Konfiguration null ist, weil in diesem Fall das Energieprofil des

Leitungskreislaufs am flachsten ist (Abbildung 10b). Die Energiebalance zwischen den Konfigurationen könnte deshalb das Ergebnis einer Optimierung der Leitungsgeschwindigkeit durch natürliche Selektion sein.^[38] Es ist nicht leicht, diese Aussage experimentell zu belegen, aber es ist sicher faszinierend, darüber nachzudenken.

K^+ - und Cl^- -Selektivität beruhen auf gemeinsamen Strukturprinzipien

Thema dieses Vortrages ist der K^+ -Kanal, dennoch wollen wir an dieser Stelle kurz ein Cl^- -selektives Transportprotein betrachten. Wenn wir einen K^+ -Kanal und einen Cl^- -„Kanal“ vergleichen, erkennen wir gemeinsame Strategien, mit denen die Natur die unterschiedlichen Aufgaben des Kationen- und Anionen-Transports durch die Zellmembran bewältigt. CIC-Chloridkanäle kommen in vielen unterschiedlichen Zelltypen vor und sind an einer Reihe von physiologischen Prozessen beteiligt, die einen Cl^- -Fluss durch die Membran erfordern.^[41,42] Wie bei den K^+ -Kanälen sind die Gene der CIC-Familie in Prokaryoten weit verbreitet – ein glücklicher Umstand, der die Proteinexpression und Strukturanalyse erleichtert. Gleich nachdem Raimund Dutzler sich meiner Arbeitsgruppe angeschlossen hatte, begannen er, Ernest Campbell und ich, die strukturellen Grundlagen der Cl^- -Selektivität zu erforschen. Wir bestimmten die Kristallstrukturen von zwei bakteriellen Mitgliedern der CIC- Cl^- -Kanal-familie, EcCIC aus *Escherichia coli* und StCIC aus *Salmonella typhimurium*.^[43] Neuere Studien von Miller und Accardi zur Funktion von EcCIC haben gezeigt, dass dieser Kanal in Wirklichkeit ein Cl^- -Protonen-Austauscher ist.^[44] Wir wissen gegenwärtig nicht, warum einige Mitglieder dieser Familie von Cl^- -Transportproteinen als Kanäle und andere als Austauscher fungieren, die Kristallstrukturen aber sind beeindruckend und gewähren uns Einblick in die Cl^- -Selektivität. Hinsichtlich der Architektur sind die CIC-Proteine nicht mit den K^+ -Kanälen verwandt, wenn wir aber nur die Ionenpfade betrachten, erkennen wir einige Übereinstimmungen (Abbildung 11). Wie bei den K^+ -Kanälen sind in den CIC-Proteinen α -Helices dem Ionenpfad zugewandt, allerdings ist die Anordnung umgekehrt, d.h., die positive Ladung am N-Terminus befindet sich in der Nähe von Cl^- . Dies ist einleuchtend, denn die Struktur soll ja die dielektrische Barriere für ein Cl^- -Ion herabsetzen. Wir erkennen, dass Ionen im Selektivitätsfilter des CIC-Kanals vor allem durch Atome der Proteinhauptkette koordiniert werden, wobei Amid-Stickstoffatome die Cl^- -Ionen umgeben (zur Erinnerung: K^+ -Ionen werden durch Carbonyl-Sauerstoffatome koordiniert) (Abbildung 12). Wir sehen auch, dass der K^+ - und der Cl^- -Selektivitätsfilter mehrere Bindungsstellen in geringem Abstand aufweisen und anscheinend mehr als ein Ion enthalten, vermutlich um die elektrostatische Abstoßung zwischen Ionen in der Pore zu nutzen. Ich finde diese Übereinstimmungen faszinierend – wir erfahren daraus, dass bestimmte physikalische Prinzipien, z.B. die terminalen Ladungen von α -Helices, entscheidend für die Herabsetzung der dielektrischen Barriere für Ionen in der Lipidmembran sind.

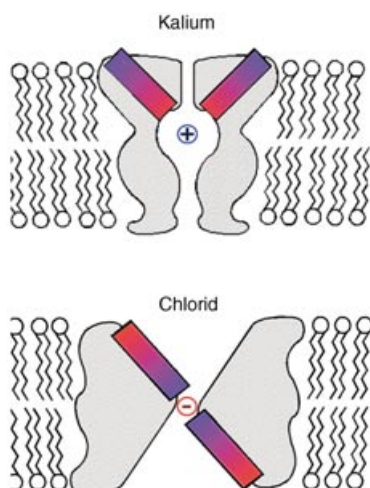


Abbildung 11. Die Architektur der K^+ -Kanäle und der $ClC-Cl^-$ -Transportproteine ist sehr verschieden, einige Merkmale stimmen aber überein. Unter anderem zeigen in beiden Fällen Ladungen am Ende von α -Helices zum Ionenpfad. Die negative Ladung am C-Terminus (rot) zeigt zum K^+ , die positive Ladung am N-Terminus (blau) zeigt zum Cl^- .

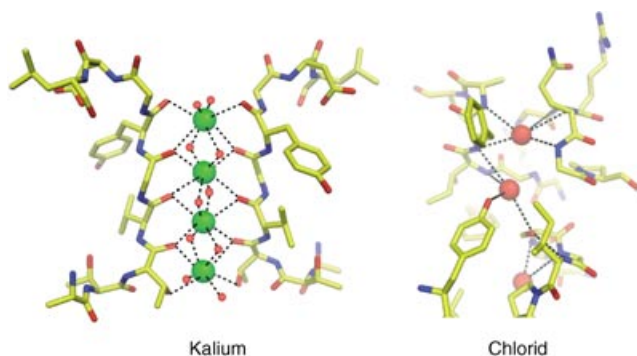


Abbildung 12. K^+ - und Cl^- -Selektivitätsfilter verwenden Atome der Hauptkette zur Koordination der Ionen: Carbonyl-Sauerstoffatome für K^+ -Ionen (grün) und Amid-Stickstoffatome für Cl^- -Ionen (rot). Beide Filter enthalten mehrere Bindungsstellen in geringem Abstand. Der abgebildete Cl^- -Selektivitätsfilter gehört zu einer ClC -Mutante, in der Glutamat durch Glutamin ersetzt wurde.^[64]

Kann man das Öffnen und Schließen eines K^+ -Kanals beobachten?

Die meisten Ionenkanäle leiten dann, wenn sie durch einen spezifischen Stimulus wie die Bindung eines Liganden oder eine Änderung der Membranspannung aktiviert werden.^[45] Die Prozesse, die eine Ionenleitung einschalten, werden als Gating bezeichnet. Die Ionenleitung ist bei weitem zu schnell, als dass große Änderungen der Proteinkonformation beteiligt sein können. Dies ist zweifellos einer der Gründe, warum uns eine einzige KcsA-Struktur so viel über Ionenselektivität und Ionenleitung verrät. Gating-Prozesse andererseits sind wesentlich langsamer und können mit großen Änderungen der Proteinstruktur einhergehen. Für eine strukturelle Beschreibung des Gating-Prozesses besteht

die Aufgabe nun darin, die Struktur eines Kanals in geöffneter (Ein) und in geschlossener Konformation (Aus) zu bestimmen.

Beim KcsA-Kaliumkanal wird der Gating-Prozess durch den intrazellulären pH-Wert und durch die Zusammensetzung der Lipidmembran gesteuert, allerdings kann ein KcsA-Kanal in einem Funktionsassay nur mit einer Wahrscheinlichkeit von wenigen Prozent im offenen Zustand angetroffen werden.^[46,47] Zunächst konnten wir nicht mit Sicherheit angeben, ob ein Gate in der Kristallstruktur offen oder geschlossen ist. In den 70er Jahren hatte Armstrong für spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle die Existenz eines Gates nahe der intrazellulären Seite der Membran vorgeschlagen. Die Grundlage dafür war die Beobachtung, dass große organische Kationen zwischen einem Selektivitätsfilter nahe der extrazellulären Seite und einem Gate nahe der intrazellulären Seite in der Pore eingeschlossen werden.^[9,48] Aufbauend auf dieser Studie kristallisierten wir KcsA mit Tetrabutylstibonium (TBA), einer Schweratomvariante eines der von Armstrong verwendeten organischen Kationen. Wir fanden, dass TBA im zentralen Hohlraum von KcsA bindet.^[49] Dies war hoch interessant, weil der Durchmesser eines TBA-Ions mit ca. 10 Å den Durchmesser der zum Hohlraum führenden Pore weit übertrifft: In KcsA ist der intrazelluläre Poreneingang durch das innere Helixbündel auf ca. 3.5 Å eingeschnürt (Abbildung 5b). Die Beobachtung eines TBA-Ions im Hohlraum hinter dem inneren Helixbündel erinnerte uns an Armstrongs klassisches Bild des Gating-Prozesses beim K^+ -Kanal. Es bedeutete, dass das innere Helixbündel als Gate fungiert und in KcsA geschlossen ist. Mutationsstudien und spektroskopische Untersuchungen in anderen Arbeitsgruppen wiesen ebenfalls darauf hin, dass das innere Helixbündel als Gate infrage kommt.^[50,51]

Youxing Jiang und ich hofften, durch Strukturaufklärung weiterer K^+ -Kanäle mehr über den Gating-Prozess in Erfahrung zu bringen. Aus Gensequenzanalysen erfuhren wir, dass viele prokaryotische K^+ -Kanäle einen langen C-Terminus enthalten, der für die von uns so benannten RCK-Domänen codiert. Wir vermuteten, dass diese Domänen die Öffnung der Pore durch Bindung eines Ions oder eines kleinen Moleküls steuern. Wir klärten die Struktur von isolierten RCK-Domänen in einem K^+ -Kanal aus *Escherichia coli* auf; allerdings waren die Strukturen wenig informativ, und wir konnten lediglich ersehen, dass sie einer Struktur am C-Terminus des eukaryotischen Ca^{2+} -gesteuerten BK-Kanals ähneln.^[52] Die gewünschten Informationen lieferte uns schließlich die Strukturaufklärung von MthK, einem vollständigen K^+ -Kanal mit RCK-Domänen, aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Abbildung 13).^[53] Die RCK-Domänen bilden einen Gating-Ring auf der intrazellulären Seite der Pore. In den Spalten zwischen den Domänen erkannten wir Anordnungen, die Bindungsstellen für zweiwertige Kationen entsprechen könnten, und die Kristalle waren in Gegenwart von Ca^{2+} gezüchtet worden. Funktionsassays zeigten uns, dass die Wahrscheinlichkeit für den offenen Zustand mit steigender Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Konzentration zunimmt, woraus wir den Schluss zogen, dass die Kristallstruktur die offene Konformation eines K^+ -Kanals darstellte.

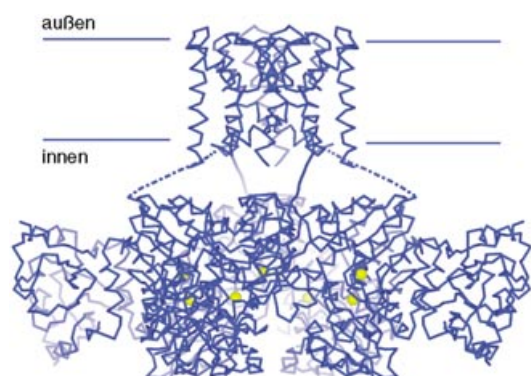


Abbildung 13. Der K⁺-Kanal MthK enthält einen intrazellulären Gating-Ring (unten), der mit der ionenleitenden Pore (oben) verbunden ist. Ca²⁺-Ionen (gelb) binden in Spalten zwischen den Domänen an den Gating-Ring. Gestrichelte Linien markieren die Verbindungen zwischen dem Gating-Ring und der Pore, die im Kristall relativ ungeordnet sind.

In unserer MthK-Struktur wird das innere Helixbündel geöffnet wie die Blende einer Kamera (Abbildung 14).^[54] Dadurch wird der von der intrazellulären Seite zum Selektivitätsfilter führende Pfad auf ungefähr 10 Å verbreitert, was erklärt, wie Armstrongs große organische Kationen den Hohlraum erreichen und den K⁺-Kanal blockieren konnten und wie K⁺-Ionen durch Diffusion in wässriger Umgebung freien Zugang zum Selektivitätsfilter erhalten. Bei einem Vergleich der Strukturen des KcsA- und des MthK-Kanals erschien es uns, als würden wir Beispiele für geschlossene und offene K⁺-Kanäle betrachten. Es war leicht vorstellbar, wie

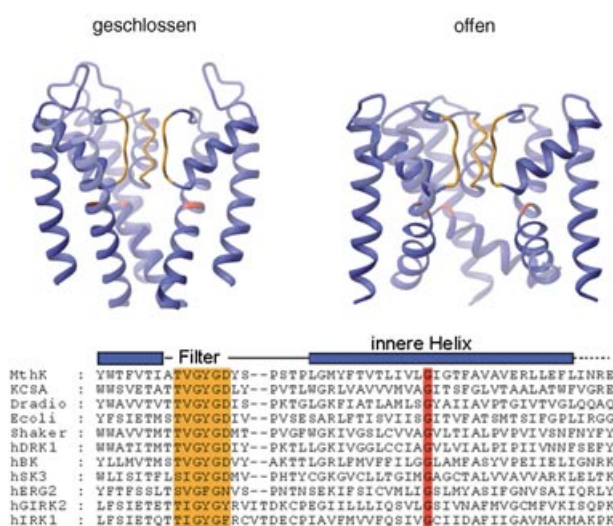


Abbildung 14. KcsA und MthK entsprechen geschlossenen und offenen K⁺-Kanälen. Drei Untereinheiten des geschlossenen KcsA-K⁺-Kanals (links) und des offenen MthK-K⁺-Kanals (rechts) sind gezeigt. Die inneren Helices von MthK sind an einem Glycin-Gelenk (rot) abgelenkt, das die Öffnung des inneren Helixbündels ermöglicht. Teile der Aminosäuresequenzen einer Auswahl von K⁺-Kanälen mit unterschiedlichen Gating-Domänen werden verglichen. Farblich abgehoben sind die Sequenzen der Selektivitätsfilter (orange) und das Glycin-Gelenk der inneren Helix (rot). Übernommen aus Lit. [54].

die Konformationsänderung der Pore vom geschlossenen in den offenen Zustand abläuft: Beim Öffnen müssten sich die inneren Helices bis etwa zur Mitte der Membran nach außen biegen, sobald ihr C-Terminus durch Konformationsänderungen im Gating-Ring von der Porenachse weg seitlich ausgeleitet wird. Die Biegung in MthK wird durch einen als Gelenk fungierenden Glycinrest in der Mitte der inneren Helix ermöglicht. Der KcsA-Kanal und viele andere K⁺-Kanäle enthalten ebenfalls einen Glycinrest an genau der gleichen Stelle, was darauf hinweist, dass diese Bewegung der inneren Helices in vielen unterschiedlichen K⁺-Kanälen ähnlich ist (Abbildung 14).

Gating-Domänen setzen einen Stimulus in das Öffnen einer Pore um. Weitere Studien sind erforderlich, um zu verstehen, wie die Freie Energie der Ca²⁺-Bindung beim MthK-Kanal in ein Öffnen der Pore umgesetzt wird. Die mechanistischen Einzelheiten des ligandengesteuerten Gating-Prozesses werden je nach Kanaltyp variieren, da Ionenkanäle, wie andere Proteine auch, ausgeprägt modular aufgebaut sind. Gensequenzanalysen zeigen, dass in unterschiedlichen K⁺-Kanälen viele unterschiedliche Domänen an die inneren Helices binden, sodass Ionen wie Ca²⁺ und Na⁺, kleine organische Moleküle und sogar Regulatorproteine den Konformationszustand der Pore steuern und den Ionenkanal öffnen und schließen können (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).^[55–58]

Grundlegend anders wirken Gating-Domänen, die das Öffnen von K⁺-, Na⁺-, Ca²⁺- und nichtselektiven Kationenkanälen durch Änderung der Membranspannung steuern. Diese als Spannungssensoren bezeichneten Domänen sind mit den äußeren Helices der Pore verknüpft und bilden strukturelle Einheiten innerhalb der Membran. Das Funktionsprinzip eines Spannungssensors beruht auf der mit einer Porenöffnung gekoppelten Bewegung von Proteinladungen durch das elektrische Feld der Membran.^[59–61] Spannungsgesteuerte Kanäle sind elektrische Schalter, vergleichbar mit Transistoren in einem elektronischen Bauelement. Ihre kristallographische Analyse ist wegen ihrer konformativen Flexibilität äußerst schwierig. Youxing Jiang und mir gelang es zusammen mit Alice Lee und Jiayun Chen, die Struktur des spannungsgesteuerten K⁺-Kanals KvAP aus der thermophilen Archaea *Aeropyrum pernix* aufzuklären (Abbildung 15).^[62,63] Im Kristall von KvAP werden die Spannungssensoren durch monoklonale Fab-Fragmente in einer nicht-nativen Konformation fixiert. Diese Beobachtung bestätigt die hohe Flexibilität des Spannungssensors, zumal Fab-Fragmente die Strukturen der relativ starren KcsA-K⁺- und CIC-Cl[−]-Kanäle, die wir sowohl mit als auch ohne Fab-Fragmente bestimmt haben, nur geringfügig beeinflussen.^[33,34,43,64] Die Spannungssensoren des KvAP-Kanals enthalten ein hydrophobes Helix-Biegung-Helix-Strukturelement mit Argininresten dicht an der Pore.^[63] Experimente mit Biotin- und Avidin-Linkern zeigen, dass sich dieses Strukturelement bei manchen Membranproteinen relativ zur Membran bewegt.^[70] Die Bestimmung weiterer Strukturen von unterschiedlichen Kanalkonformationen ist nötig, um die mechanistischen Einzelheiten des spannungsgesteuerten Gating-Prozesses besser zu verstehen. Anhand der Struktur von KvAP und zugehöriger Funktionsstudien konnte ein

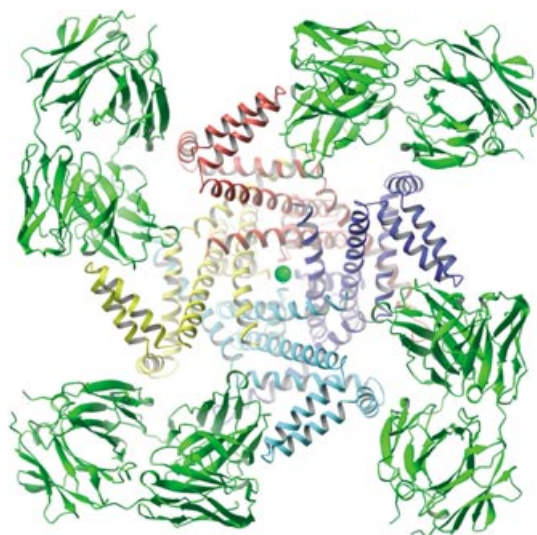


Abbildung 15: Kristallstruktur eines Komplexes des KvAP-K⁺-Kanals mit Fab-Fragmenten aus monoklonalen Antikörpern (Blick entlang der Porenachse von der intrazellulären Seite der Membran). Die α -helical-Untereinheiten sind in Blau, Gelb, Cyan und Rot dargestellt. Je ein Fab-Fragment (grün) bindet an das Helix-Biegung-Helix-Strukturelement des Spannungssensors der Untereinheiten. Übernommen aus Lit. [63].

Modell des spannungsgesteuerten Gating-Prozesses entwickelt werden, das die Bewegung der Spannungssensoren entlang der Protein-Lipid-Grenzfläche berücksichtigt, die als Folge eines Gleichgewichts zwischen hydrophoben und elektrostatischen Kräften stattfindet. Rees und Mitarbeiter am California Institute of Technology konnten die Struktur des spannungsregulierten mechanosensitiven Kanals MscS aufklären, und obwohl dieser nicht mit den herkömmlichen spannungsgesteuerten Kanälen verwandt ist, enthält er ebenfalls hydrophobe Helix-Biegung-Helix-Strukturelemente mit hin zur Lipidmembran gerichteten Argininresten.^[65] MscS und KvAP sind faszinierende Membranproteinstrukturen. Diese Proteine sind nicht zuletzt deswegen hoch interessant, weil sie nicht in die landläufige Vorstellung von Membranproteinen mit starren hydrophoben Wänden zur Lipidmembran passen.

Wir beginnen gerade erst, die Strukturprinzipien und die Steuerung des Gating-Prozesses bei Ionenkanälen zu verstehen. In elektrophysiologischen Studien wurde eine Vielzahl von Zusammenhängen zwischen zellulären biochemischen Prozessen und der Funktion von Ionenkanälen aufgedeckt.^[45] Ähnliche Ergebnisse erhält man jetzt auch aus der Strukturanalyse von Proteinen. Die β -Untereinheiten bestimmter eukaryotischer spannungsgesteuerter Kanäle sind strukturell mit Oxidoreduktasen verwandt,^[66,67] die PAS-Domänen anderer K⁺-Kanäle gehören zu einer Familie von Sensormolekülen,^[68] und eine spezialisierte Struktur an G-Protein-gekoppelten Kanälen bildet eine Bindungsstelle für die steuernden G-Protein-Untereinheiten.^[71] Hier wird das komplexe und faszinierende Wechselspiel zwischen dem Verhalten der Ionenkanäle und vielen verschiedenen Zellfunktionen immer deutlicher erkennbar.

Abschließende Bemerkungen

Ich denke, die Forschung zu Ionenkanälen hat ihre aufregendsten Momente noch vor sich. Viele wichtige Fragen gilt es zu beantworten, und wir halten die Werkzeuge dafür in Händen. Ich blicke sehr optimistisch in die Zukunft und sehe großartige Perspektiven für junge Wissenschaftler, die jetzt in die Erforschung von Ionenkanälen und anderen Membranproteinen einsteigen. Ich freue mich, dass ich einen kleinen Teil zum gegenwärtigen Kenntnisstand beitragen konnte. Selbstverständlich wäre mir das nie gelungen ohne den Einsatz und Enthusiasmus der jungen Wissenschaftler, die aus allen Teilen der Welt zu mir kamen, um die Untersuchungen an Ionenkanälen voranzutreiben (Tabelle 1). Ich danke auch der Rockefeller University, dem Howard Hughes Medical Institute und den National Institutes of Health für die Unterstützung meiner Forschung. Mein Dank gilt weiterhin den Synchrotroneinrichtungen CHESS, NSLS, ALS, APS und ESRF sowie meinem Assistenten Wendell Chin.

Eingegangen am 1. März 2004 [A662]
Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

Tabelle 1: Die Arbeitsgruppe MacKinnon von 1989 bis 2003.

Postdocs		Studenten	wissenschaftliches Personal	Kollaborationen
Laura Escobar	Francis Valiyaveetil	Lise Heginbotham	Tatiana Abramson	Gary Yellen
Zhe Lu	Xiao-dan Pfenninger-Li	Michael Root	John Lewis	Maria Garcia
Adrian Gross	Ming Zhou	Patricia Hidalgo	Alice Lee MacKinnon	Gerhard Wagner
Kenton Swartz	Ofer Yifrach	Sanjay Aggarwal	Sabine Mann	Andrzej Krezel
Chul-Seung Park	Yufeng Zhou	James Morrell	Richard Pfuetzner	Brian Chait
Rama Ranganathan	Sebastien Poget	Alexander Pico	Anling Kuo	Steve Cohen
Chinfei Chen	Motohiko Nishida	Vanessa Ruta	Minhui Long	Martine Cadene
Declan Doyle	Uta-Maria Ohndorf	Ian Berke	Amelia Kaufman	Benoit Roux
John Imredy	Steve Lockless		Ernest Campbell	Tom Muir
João Morais Cabral	Qiu-Xing Jiang		Jiayun Chen	
Youxing Jiang	Seok-Yong Lee			
Jacqueline Gulbis	Stephen Long			
Raimund Dutzler				

- [1] „A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve“: A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *117*, 500–544.
- [2] „Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*“: A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *116*, 449–472.
- [3] „The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*“: A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *116*, 473–496.
- [4] „The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*“: A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol.* **1952**, *116*, 497–506.
- [5] „The potassium permeability of a giant nerve fibre“: A. L. Hodgkin, R. D. Keynes, *J. Physiol.* **1955**, *128*, 61–88.
- [6] „Ionic channels in nerve membranes“: B. Hille, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1970**, *21*, 1–32.
- [7] „The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve“: B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **1971**, *58*, 599–619.
- [8] „Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations“: B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **1973**, *61*, 669–686.
- [9] „Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons“: C. M. Armstrong, *J. Gen. Physiol.* **1971**, *58*, 413–437.
- [10] „Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase“: C. M. Armstrong, E. Bezanilla, F. Rojas, *J. Gen. Physiol.* **1973**, *62*, 375–391.
- [11] „Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments“: C. M. Armstrong, F. Bezanilla, *J. Gen. Physiol.* **1977**, *70*, 567–590.
- [12] „Sodium channels and gating currents“: C. M. Armstrong, *Physiol. Rev.* **1981**, *61*, 645–683.
- [13] „Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres“: E. Neher, B. Sakmann, *Nature* **1976**, *260*, 799–802.
- [14] „Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*“: B. L. Tempel, D. M. Papazian, T. L. Schwarz, Y. N. Jan, L. Y. Jan, *Science* **1987**, *237*, 770–775.
- [15] „Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel“: A. Kamb, L. E. Iverson, M. A. Tanouye, *Cell* **1987**, *50*, 405–413.
- [16] „Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*“: O. Pongs, N. Kecskemethy, R. Müller, I. Krah-Jentgens, A. Baumann, H. H. Kiltz, I. Canal, S. Llamazares, A. Ferrus, *EMBO J.* **1988**, *7*, 1087–1096.
- [17] „Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channel“: R. MacKinnon, C. Miller, *J. Gen. Physiol.* **1988**, *91*, 335–349.
- [18] „Charybdotoxin block of Shaker K^+ channels suggests that different types of K^+ channels share common structural features“: R. MacKinnon, P. H. Reinhart, M. M. White, *Neuron* **1988**, *1*, 997–1001.
- [19] „Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K^+ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom“: M. L. Garcia, M. Garcia-Calvo, P. Hidalgo, A. Lee, R. MacKinnon, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6834–6839.
- [20] „Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor“: R. MacKinnon, C. Miller, *Science* **1989**, *245*, 1382–1385.
- [21] „Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel“: R. MacKinnon, *Nature* **1991**, *350*, 232–235.
- [22] „Pore loops: an emerging theme in ion channel structure“: R. MacKinnon, *Neuron* **1995**, *14*, 889–892.
- [23] „Revealing the architecture of a K^+ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor“: P. Hidalgo, R. MacKinnon, *Science* **1995**, *268*, 307–310.
- [24] „Spatial localization of the K^+ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis“: R. Ranganathan, J. H. Lewis, R. MacKinnon, *Neuron* **1996**, *16*, 131–139.
- [25] „Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K^+ channels“: R. MacKinnon, G. Yellen, *Science* **1990**, *250*, 276–279.
- [26] „Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K^+ channel“: G. Yellen, M. E. Jurman, T. Abramson, R. MacKinnon, *Science* **1991**, *251*, 939–942.
- [27] „The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier“: C. M. Armstrong, B. Hille, *J. Gen. Physiol.* **1972**, *59*, 388–400.
- [28] „A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K^+ channels“: L. Heginbotham, T. Abramson, R. MacKinnon, *Science* **1992**, *258*, 1152–1155.
- [29] „Mutations in the K^+ channel signature sequence“: L. Heginbotham, Z. Lu, T. Abramson, R. MacKinnon, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1061–1067.
- [30] „An *Escherichia coli* homologue of eukaryotic potassium channel proteins“: R. Milkman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3510–3514.
- [31] „A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*“: H. Schrempf, O. Schmidt, R. Kümmerlen, S. Hinnah, D. Müller, M. Betzler, T. Steinkamp, R. Wagner, *EMBO J.* **1995**, *14*, 5170–5178.
- [32] „Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels“: R. MacKinnon, S. L. Cohen, A. Kuo, A. Lee, B. T. Chait, *Science* **1998**, *280*, 106–109.
- [33] „The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity“: D. A. Doyle, J. H. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69–77.
- [34] „Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel–Fab complex at 2.0 Å resolution“: Y. Zhou, J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman, R. MacKinnon, *Nature* **2001**, *414*, 43–48.
- [35] „The cavity and pore helices in the KcsA K^+ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations“: B. Roux, R. MacKinnon, *Science* **1999**, *285*, 100–102.
- [36] „Die Struktur des KNCS-Komplexes von Nonactin“: M. von Dobler, J. D. Dunitz, B. T. Kilbourn, *Helv. Chim. Acta* **1969**, *52*, 2573–2583.
- [37] J. D. Dunitz, M. von Dobler, *Structural studies of ionophores and their ion-complexes in Biological aspects of inorganic chemistry* (Hrsg.: A. W. Addison, W. R. Cullen, D. Dolphin, B. R. James), Wiley, New York, **1977**, S. 113–140.
- [38] „Energetic optimization of ion conduction rate by the K^+ selectivity filter“: J. H. Morais-Cabral, Y. Zhou, R. MacKinnon, *Nature* **2001**, *414*, 37–42.
- [39] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover, **1987**.
- [40] „The occupancy of ions in the K^+ selectivity filter: Charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates“: Y. Zhou, R. MacKinnon, *J. Mol. Biol.* **2003**, *333*, 965–975.
- [41] „The ClC chloride channel family“: T. J. Jentsch, T. Friedrich, A. Schriever, H. Yamada, *Pfluegers Arch.* **1999**, *437*, 783–795.
- [42] „A decade of ClC chloride channels: structure, mechanism, and many unsettled questions“: M. Maduke, C. Miller, J. A. Mindell, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 411–438.
- [43] „X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity“: R. Dutzler, E. B. Campbell, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2002**, *415*, 287–294.

- [44] „Proton-coupled chloride transport mediated by CIC-ec1, a bacterial homologue of the CIC chloride channels“: A. Accardi, C. Miller, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 286.
- [45] B. Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Sunderland, MA, **2001**.
- [46] „pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel“: L. G. Cuello, J. G. Romero, D. M. Cortes, E. Perozo, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3229–3236.
- [47] „Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel“: L. Heginbotham, L. Kolmakova-Partensky, C. Miller, *J. Gen. Physiol.* **1998**, *111*, 741–749.
- [48] „Ionic pores, gates, and gating currents“: C. M. Armstrong, *Q. Rev. Biophys.* **1974**, *7*, 179–210.
- [49] „Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors“: M. Zhou, J. H. Morais-Cabral, S. Mann, R. MacKinnon, *Nature* **2001**, *411*, 657–661.
- [50] „Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating“: E. Perozo, D. M. Cortes, L. G. Cuello, *Science* **1999**, *285*, 73–78.
- [51] „Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications“: D. del Camino, M. Holmgren, Y. Liu, G. Yellen, *Nature* **2000**, *403*, 321–325.
- [52] „Structure of the RCK domain from the *E. coli* K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel“: Y. Jiang, A. Pico, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Neuron* **2001**, *29*, 593–601.
- [53] „Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel“: Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2002**, *417*, 515–522.
- [54] „The open pore conformation of potassium channels“: Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2002**, *417*, 523–526.
- [55] „A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus“: N. S. Atkinson, G. A. Robertson, B. Ganetzky, *Science* **1991**, *253*, 551–555.
- [56] „Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complex with Ca²⁺/calmodulin“: M. A. Schumacher, A. F. Rivard, H. P. Bachinger, J. P. Adelman, *Nature* **2001**, *410*, 1120–1124.
- [57] „The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family“: A. Yuan, C. M. Santi, A. Wei, Z. W. Wang, K. Pollak, M. Nonet, L. Kaczmarek, C. M. Crowder, L. Salkoff, *Neuron* **2003**, *37*, 765–773.
- [58] „Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel“: Y. Kubo, E. Reuveny, P. A. Slesinger, Y. N. Jan, L. Y. Jan, *Nature* **1993**, *364*, 802–806.
- [59] „Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na⁺ channels“: C. M. Armstrong, F. Bezanilla, *J. Gen. Physiol.* **1974**, *63*, 533–552.
- [60] „Voltage gating of ion channels“: F. J. Sigworth, *Q. Rev. Biophys.* **1994**, *27*, 1–40.
- [61] „The voltage sensor in voltage-dependent ion channels“: F. Bezanilla, *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 555–592.
- [62] „Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K⁺ channel“: V. Ruta, Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, R. MacKinnon, *Nature* **2003**, *422*, 180–185.
- [63] „X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel“: Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. Chait, R. MacKinnon, *Nature* **2003**, *423*, 33–41.
- [64] „Gating the selectivity filter in CIC chloride channels“: R. Dutzler, E. B. Campbell, R. MacKinnon, *Science* **2003**, *300*, 108–112.
- [65] „Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel“: R. B. Bass, P. Strop, M. Barclay, D. C. Rees, *Science* **2002**, *298*, 1582–1587.
- [66] „Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit“: J. M. Gulbis, S. Mann, R. MacKinnon, *Cell* **1999**, *97*, 943–952.
- [67] „Structure of the cytoplasmic β subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels“: J. M. Gulbis, M. Zhou, S. Mann, R. MacKinnon, *Science* **2000**, *289*, 123–127.
- [68] „Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N-terminus: a eukaryotic PAS domain“: J. H. Morais Cabral, A. Lee, S. L. Cohen, B. T. Chait, M. Li, R. MacKinnon, *Cell* **1998**, *95*, 649–655.
- [69] „A mutant KcsA K⁺ channel with altered conduction properties and selectivity filter ion distribution“: M. Zhou, R. MacKinnon, *J. Mol. Biol.* **2004**, *338*, 839–846.
- [70] „The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel“: Y. Jiang, V. Ruta, J. Chen, A. Lee, R. MacKinnon, *Nature* **2003**, *423*, 42–48.
- [71] „Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution“: M. Nishida, R. MacKinnon, *Cell* **2002**, *111*, 957–965.