



Als Rod MacKinnon am Neujahrstag 1998 erwachte, fürchtete er, dass alles nur ein Traum gewesen sein könnte. Bis spät in die Nacht hatte er an der Synchrotron-Strahlungsquelle der Cornell-Universität in Ithaka (NY) Daten aufgenommen, um die Struktur eines Kaliumkanals aus der Zellmembran zu ermitteln – einer Art Schleuse für geladene Teilchen. Seine Kollegen waren nach Hause gegangen, und er hatte alleine weitergearbeitet. Mitternacht war vorüber, und mit jeder Neuberechnung der Daten gewann das Bild des Kanals auf seinem Computerschirm an Schärfe. Schließlich begannen sich die Umrisse einzelner Kaliumionen abzuzeichnen, aufgereiht wie die Spielkugeln eines Flipper-Automaten

hatten viele Kollegen die Erfolgsaussichten von MacKinnons Vorhaben, die Struktur von Ionenkanälen zu enthüllen, stark bezweifelt. Es galt als extrem schwierig, tierische oder pflanzliche Membranproteine für **Röntgenstruktur-Untersuchungen** zu kristallisieren (siehe Kasten S. 4). Gewohnt, sich einzeln in eine Lipidschicht einzubetten, zeigen Membranproteine nämlich wenig Neigung, sich mit ihresgleichen zu einem Kristall zusammenzulagern. Warum kam der Amerikaner zum Erfolg, wo andere gescheitert waren? Zunächst wählte MacKinnon für seine Arbeiten einen Ionenkanal, der aus einem sehr wärmeliebenden (hyperthermophilen) Bakterium stammt. Die Proteine solcher

Spannung auf allen Kanälen – Wie Ionen durch die Zellmembran schlüpfen

– genauso, wie es Alan Hodgkin fast fünfzig Jahre zuvor prophezeit hatte: „*Ions must be constrained to move in a single file, and there should on average, be several ions in the channel at any moment*“. MacKinnon war total aus dem Häuschen...

FESTGESETZT: EIN MOLEKÜL IN HANDSCHELLEN

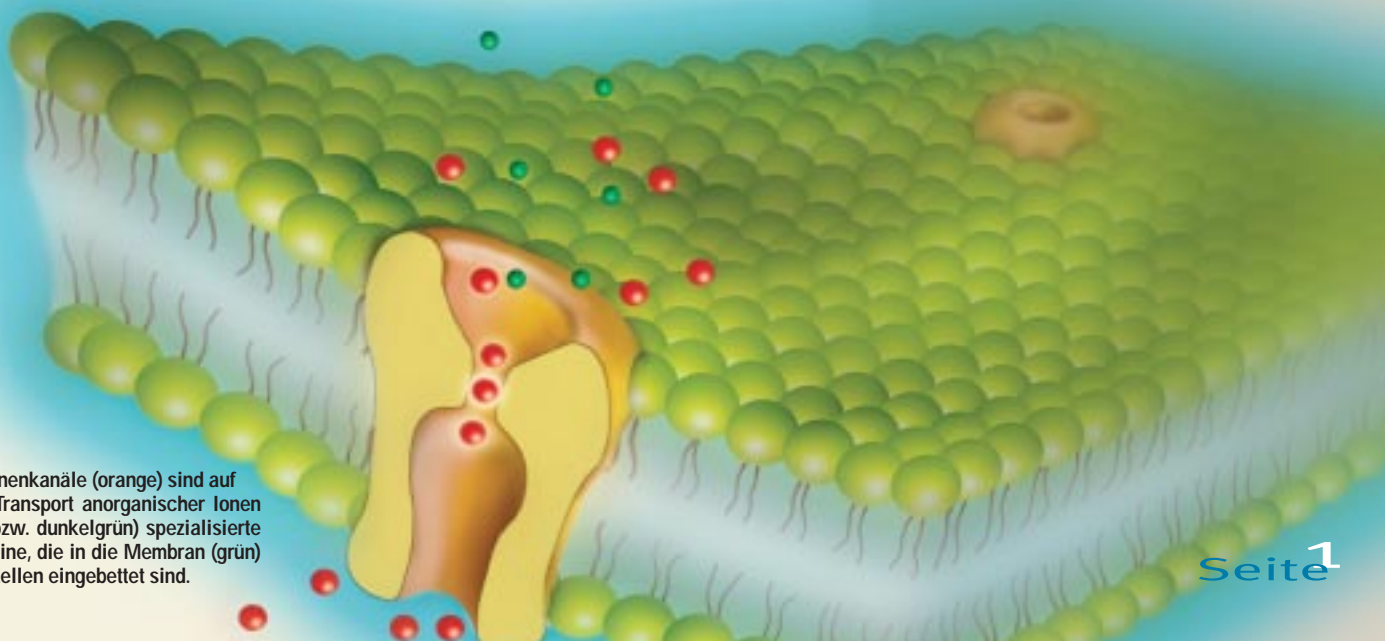
Es war kein Traum. Tatsächlich hatte Rod MacKinnon eine wissenschaftliche Glanztat vollbracht, die ihm fünf Jahre später den Nobelpreis für Chemie einbringen sollte. Dabei

Organismen erlangen die für ihre Funktion notwendige Beweglichkeit erst bei hohen Temperaturen, im Bereich um 20°C sind sie sehr viel starrer als entwicklungsgeschichtlich verwandte Moleküle anderer Organismen. Sie lassen sich daher etwas einfacher in eine gemeinsame Form bringen. Diesen ersten Kristallen fehlte aber immer noch die notwendige exakte innere Ordnung. Die Forscher mussten daher zu einem weiteren Trick greifen: Um das Proteinmolekül endgültig festzusetzen, entwickelten sie einen **monoklonalen Antikörper**, der sich mit einer speziellen Bindungsstelle genau an jene



A

► Ionenkanäle (orange) sind auf den Transport anorganischer Ionen (rot bzw. dunkelgrün) spezialisierte Proteine, die in die Membran (grün) von Zellen eingebettet sind.



→ Region des Kanalproteins heftet, in der offenbar die größte Beweglichkeit herrscht. Auf die unspezifischen Teile des Antikörpers konnten die Forscher im weiteren verzichten – für ihre Kristallisationsexperimente nutzten sie lediglich das spezifische Teilstück, das so genannte Fab-Fragment. Die damit hergestellten Kristalle lieferten dann die Röntgenbeugungsdaten, aus denen sich jene hoch aufgelöste Struktur des Ionenkanals ableiten ließ, die im Mai 1998 die Titelseite der renommierten Fachzeitschrift *Nature* zierte.

Das war nahezu ein halbes Jahrhundert nachdem Alan Hodgkin, Andrew Huxley und Bernhard Katz in Großbritannien **Aktionspotenziale** am Riesenaxon des Tintenfisches untersucht hatten. Ihre Messungen bestätigten das so genannte Membrankonzept: Danach basieren alle bekannten elektrischen Signale – Aktionspotenziale, synaptische Signale und Rezeptorpotenziale – auf Änderungen in der **Membranpermeabilität**, also der Durchlässigkeit der Membran für Ionen. Um die bei einem Aktionspotenzial auftretenden Änderungen in der Leitfähigkeit der Membran formal beschreiben zu können, entwickelten Hodgkin und Huxley die Vorstellung von spannungsgeregelten Ionenkanälen. Dafür erhielten die beiden Physiologen aus Cambridge 1963 den Nobelpreis für Medizin. Die Bezeichnung Natriumkanal und Kaliumkanal wurde seither vielfach benutzt, obwohl es keinen direkten Beweis für die Existenz solcher Kanäle auf der Basis biologischer Präparationen gab.

Im Falle künstlicher Membranen war das anders. Diese „black lipid membranes“ dienten seit Ende der 1960er Jahre als experimentelles Modellsystem und ähnelten in vielerlei Hinsicht der **Lipidmembran** lebender Zellen. Die Membranen stellten sehr gute Isolatoren dar; aber versetzt mit Antibiotika oder Proteinen wurden sie elektrisch leitfähig. Weil der hindurch fließende Strom sich stufenartig änderte, vermuteten die Wissenschaftler, dass einzelne Proteinmoleküle Kanäle durch die künstliche Membran bilden, wobei die Stufen dem Öffnen und Schließen dieser Kanäle entsprechen. Ähnliche Untersuchungen an biologischen Membranen ließen sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchführen. Die Methoden zur Messung elektrischer Ströme an lebenden Zellen lieferten ein Hintergrundrauschen, das zwar nur zehn Milliardstel Ampere (100 pA) betrug, damit aber immer noch hundert Mal größer war, als die an den künstlichen Membranen beobachteten **Einzelkanalströme**. Also mussten die Forscher über neue Messmethoden nachdenken.



Am Max-Planck-Institut in München taten das Anfang der 1970er Jahre Erwin Neher und Bert Sakmann. Die Messgeräte würden, so die Überlegung der beiden Wissenschaftler, nur dann mit der gewünschten Empfindlichkeit ansprechen, wenn es gelänge, aus der Zellmembran ein sehr kleines Areal zu isolieren (einen Membranfleck oder „patch“). Dazu benutzten sie eine mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllte Glaspipette, die sie auf eine enzymatisch gereinigte Muskelfaser aufsetzten – in der Hoffnung auf diese Weise einige wenige Ionenkanäle von der übrigen Membran isolieren zu können und damit ein klares Messsignal zu erhalten. Es erwies sich allerdings als äußerst schwierig, eine dichte Verbindung zwischen der Glaspipette und der Membran herzustellen. Die beiden Max-Planck-Forscher kämpften mit Lecks, durch welche die Flüssigkeiten außerhalb und innerhalb der Pipette in Kontakt gerieten. Also optimierten sie die Pipettenspitze und reinigten die Zelloberfläche noch sorgsamer.

LAUSCHANGRIFF AUF DIE ZELLMEMBRAN

1976 wurden ihre Mühen endlich belohnt: Erstmals konnten die Wissenschaftler an der neuromuskulären Synapse, der Kontaktstelle zwischen Nervenfaser und Muskelzelle, Ströme durch einzelne Kanäle beobachten. Diese ersten Messungen bestätigten viele ältere Annahmen über Einzelkanalströme – insbesondere die Vermutung, dass die elektrischen Signale in Pulsen stets gleicher Amplitude (Stromgröße), aber von unterschiedlicher Dauer auftreten. Einige Jahre später entdeckten Neher und Sakmann durch Zufall, dass sich der elektrische Widerstand der Signalquelle um mehrere Zehnerpotenzen auf mehr als eine Milliarde Ohm ($G\Omega$) erhöhen ließ, wenn man in der Glaspipette einen kleinen Unterdruck erzeugte und so den Membranfleck leicht ansaugte. Damit wurde das Hintergrundrauschen noch geringer, und die Forscher konnten nun auch Ionenkanäle anderer Synapsen-Typen untersuchen. Für diese mittlerweile zum



◀ Durch einen halboffenen Käfig (kleines Bild oben) wird die Messapparatur im Labor vor elektrisch störenden Einflüssen abgeschirmt. Detailbild (links) von der Mess- und Haltepipette unter dem Mikroskopobjektiv bei einer Patch-Clamp-Messung. (Fotos: Wolfgang Filser)

Standard in den elektrophysiologischen Forschungslabors zählende Methode, die „Patch-Clamp-Technik“, bekamen die beiden Deutschen 1991 den Nobelpreis für Medizin (Abb. B).

EIN PASSGENAUER TUNNEL FÜR IONEN

Auch Nobelpreisträger Rod MacKinnon hatte zunächst mit der Patch-Clamp-Technik versucht, die Eigenschaften von Ionenkanälen zu erforschen. Dazu veränderte er Schlüsselstellen des Kanals mit gentechnischen Methoden – er tauschte also bestimmte Aminosäuren aus – und prüfte anschließend, wie sich das auf die Kanaleigenschaften (z. B. die Leitfähigkeit) auswirkte. Auf diese Weise konnte er grundsätzliche Aussagen zur Struktur des von ihm untersuchten bakteriellen Kaliumkanals treffen: Demnach besteht diese Ionenschleuse aus vier Untereinheiten, die die Zellmembran durchspannen und sich dabei um eine zentrale Pore gruppieren. MacKinnon konnte genau zeigen, welche der Aminosäuren die Selektivität des Kanals festlegen – ihn also nur für Kaliumionen, nicht aber für andere Ladungsträger durchlässig machen. Zu ähnlichen Einsichten war man zuvor schon beim Studium von Natrium leitenden Kanälen gelangt. Doch alle diese Ergebnisse warfen neue Fragen auf, die sich mit molekularbiologischen und elektrophysiologischen Methoden alleine nicht beantworten ließen. Wie waren die Untereinheiten räumlich angeordnet? Und wie war es möglich, dass diese Kanäle einerseits hochselektiv waren, andererseits aber enorme Durchflussraten erlaubten? So werden Kaliumionen hundert Mal besser geleitet als die kleineren Natriumionen (pro Millisekunde strömen etwa 10.000 Kaliumionen durch die Membran).

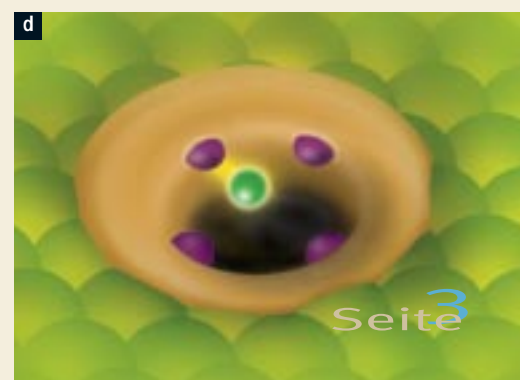
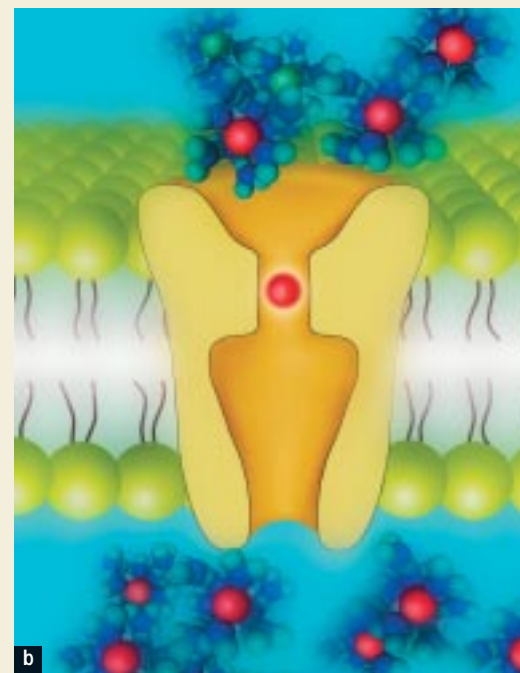
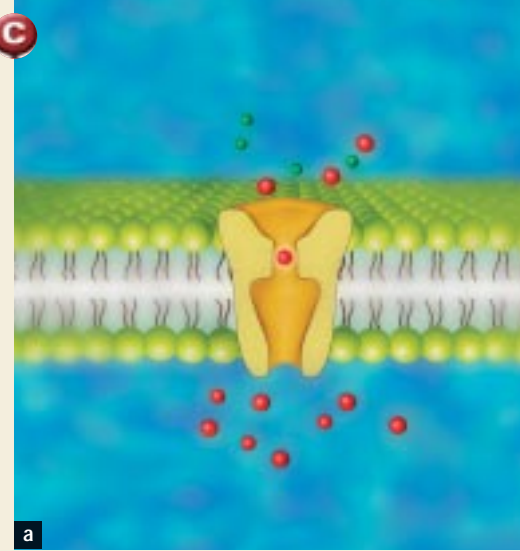
Um diese Fragen zu klären, begann MacKinnon sich mit **Kristallographie** zu beschäftigen – Voraussetzung für Röntgenstruktur-Untersuchungen. Seine daraus resultierenden Arbeiten enthüllten schließlich die molekulare Basis dieses Phänomens, über das sich die Forscher jahrzehntelang den Kopf zerbrochen hatten: Die Kanalpore muss räumlich eng genug sein, um durchfließende Ionen in engen Kontakt zu den Wänden des Kanals zu bringen, sodass nur Ionen einer bestimmten Größe und Ladung hindurch passen. Um nacheinander diese engste Stelle des Kanals – den **Selektivitäts-**

filter – durchqueren zu können, müssen die Ionen nahezu alle gebundenen Wassermoleküle abstreifen. Das tun sie nur sehr ungern, denn diese Hydrathülle bedingt für das Ion einen thermodynamisch sehr günstigen Zustand. Aber die Natur zeigt sich einfallreich: Die Kanal bildenden Polypeptidketten kleiden nämlich mit ihren Sauerstoffatomen die Innenwand des tunnelähnlichen Selektivitätsfilters aus. Sauerstoffatome sind stark elektronegativer, d. h. sie ziehen Elektronen von anderen Atomen an und laden sich dabei negativ auf. Kaliumionen sind positiv und werden daher von den negativ geladenen Sauerstoffatomen angezogen. Der Tunnel imitiert also quasi die „Umarmung“ der Ionen durch die Wassermoleküle. Und das erklärt, warum sich das Kalium so bereitwillig „entkleidet“, um in dehydratisierter Form in die Kanalpore einzutreten. Damit diese **elektrostatische Anziehung** funktioniert, dürfen die Entfernungen zwischen Sauerstoffatomen und positivem Ion allerdings nicht zu groß sein. Beim Kaliumkanal sind die Sauerstoffatome passgenau angeordnet, um ein Kaliumion unterzubringen. Vom kleineren Natriumion liegen die Atome dagegen zu weit entfernt – ein energetischer Nachteil. Das Ion bleibt ausgeschlossen, da es den Energieaufwand nicht ausgleichen kann, der mit dem Verlust der Wassermoleküle beim Eintritt in die Kanalpore verbunden wäre (Abb. C).

SCHLÜSSELMOLEKÜLE IM ZELLGESCHEHEN

Ionenkanäle spielen eine universelle Rolle im „Nachrichtenwesen“ eines Organismus:

- ▶ (a) Ein in die Zellmembran eingebetteter Ionenkanal im Querschnitt. Ionenkanäle können die Ladungsträger in beide Richtungen transportieren. Die Kanalpore stellt den Selektivitätsfilter dar – hier entscheidet sich, welches Ion durchgelassen wird und welches nicht.
- ▶ (b) Ionen sind in einen Komplex von Wassermolekülen eingebunden. Für den Ionenfluss durch die Kanalpore muss diese Hydrathülle entfernt werden, da der Porendurchmesser nur wenig größer ist als das transportierte Ion.
- ▶ (c) Die Sauerstoffatome (lila) des Selektivitätsfilters bilden für das eintretende Kaliumion (rot) eine Umgebung, die jener außerhalb des Filters ähnelt. So können die Kaliumionen ohne erkennbaren Widerstand aus ihrer Hydrathülle schlüpfen.
- ▶ (d) Das kleinere Natriumion (dunkelgrün) passt nicht genau zwischen die Anordnung der Sauerstoffatome des Filters. Die elektrostatischen Anziehungskräfte (gelb) reichen nicht aus, und die Ionen bleiben daher in der wässrigen Umgebung außerhalb des Kanals.



→ Ihre Aufgaben reichen von der elektrischen Signalverarbeitung im Gehirn bis zu lang-samen Prozessen wie der Salz-Rückgewinnung in der Niere. Wie viele unterschiedliche Ionenkanäle es im menschlichen Körper gibt, hat die Sequenzierung des Human-genoms eindrucksvoll belegt. Dabei stellen Kaliumkanäle unter den Ionenkanälen wahrscheinlich die größte Proteinfamilie. Sie finden sich in den Membranen der meisten Zelltypen – ein Hinweis auf ihre entscheidende Rolle bei der Weiterleitung von Signalen. Ihre am besten bekannte Funktion ist die Regulation des Membranpotenzials in Nervenzellen, d.h. der Aufbau und die Aufrechterhaltung einer Spannungsdifferenz zwischen dem Inneren und Äußeren einer Zelle. Es gibt sie aber auch in nicht-erregbaren Zellen. Die so genannten ATP-abhängigen Kaliumkanäle beispielsweise finden sich in den meisten Organen und sind mit zahlreichen Stoffwechselforgängen verknüpft – wie der Insulinausschüttung, der Steuerung des Muskeltonus der Blutgefäße oder der körpereigenen Antworten auf Herzinfarkt und Schlaganfall. Das Verständnis der Funktion von Ionenkanälen ist daher außerordentlich wichtig für die Beantwortung medizinischer Fragen.

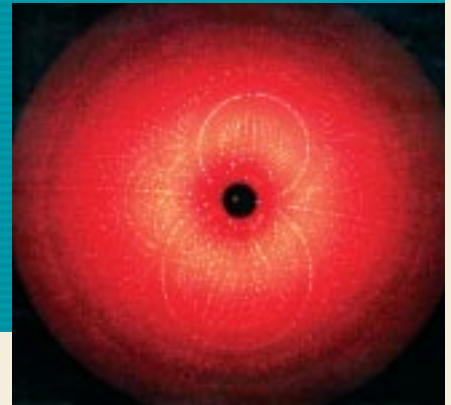
EIN DEPLAZIERTER KALIUMKANAL UND DIE FOLGEN

Anfang der 1990er Jahre nahmen Walter Stühmer und seine Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen einen Kaliumkanal unter die Lupe, der die originelle Bezeichnung „Ether-à-go-go“, kurz EAG, trägt. Bei Mutanten der Taufliege *Drosophila* führt der Ausfall dieses Kanals dazu, dass sich die kleinen Fliegen unter Einfluss des Betäubungsmittels Ether rhythmisch bewegen – daher der Name. Entdeckt hatten diesen Kanal amerikanische Forscher schon 1969. Zwanzig Jahre später lieferten Sequenzuntersuchungen erste Hinweise, dass es sich bei EAG um einen Kaliumkanal handelt. Analoge Gene bzw. Proteine wurden danach bei Ratten und schließlich auch beim Menschen nachgewiesen. Bei diesen Säugern wird die genetisch festgelegte Bauanleitung für den Kanal normalerweise nur in Nervenzellen des Gehirns ausgeführt, d.h. nur hier wird das entsprechende Protein auch tatsächlich hergestellt.

Die Göttinger Max-Planck-Forscher untersuchten Zellen, die kein EAG1-Gen be-

LICHT AUF PROTEINKRISTALLE

Um die dreidimensionale Struktur von Molekülen zu ermitteln, benutzen Forscher die so genannte Röntgen-Kristallstrukturanalyse. Bei dieser Technik wird ein enger, gebündelter Röntgenstrahl auf eine Probe von reinem Protein gelenkt. Die meisten Röntgenstrahlen passieren die Probe ungehindert, ein kleiner Anteil jedoch wird von den Atomen in der Probe gestreut. Handelt es sich bei der Probe um einen streng geordneten Kristall, so verstärken sich die gestreuten Wellen an einigen Punkten gegenseitig und erscheinen dann auf einem geeigneten Röntgenstrahldetektor jeweils als Beugungsfleck. Die Lage und Intensität dieser Beugungsflecken enthält Informationen über die Positionen der Atome im Kristall. Aus dem vollständigen Röntgenbeugungsmuster (s. Bild) können die Forscher eine komplexe dreidimensionale Karte der Elektronendichteverteilung ableiten. Ist die Aminosäuresequenz des Proteins bekannt, so lässt sich mithilfe des Computers ein Atommodell berechnen. Dabei sucht der Computer nach der bestmöglichen Übereinstimmung zwischen der Proteinsequenz und der Elektronendichteverteilung. Die Zuverlässigkeit des Modells hängt von der Auflösung der ursprünglichen kristallographischen Daten ab: Eine Auflösung von 0,5 Nanometer ergibt eine schwach auflösende Karte des Polypeptidgerüsts; 0,15 Nanometer erlaubt dagegen eine zuverlässige Zuordnung der Nicht-Wasserstoffatome im Molekül.



saßen, und veränderten sie genetisch so, dass sie das EAG1-Protein bilden konnten. Die manipulierten Zellen wuchsen nicht nur schneller, sondern sie begannen, sich auch unabhängig von Wachstumsfaktoren zu teilen. Indem die Wissenschaftler diese Zellen Mäusen mit Immundefekt einimpften, konnten sie bei den Tieren sogar die Bildung einzelner Tumore auslösen. Offenbar greift das EAG1-Protein, wenn es irrtümlicherweise in Geweben außerhalb des Gehirns gebildet wird, in die Zellteilung ein: Der Kanal wird zu einem potenziellen **Onkogen**, das heißt er kann Krebs auslösen. Diese Befunde machten die Göttinger hellhörig, und so begannen sie, verschiedene Zelllinien aus Tumorgewebe von Menschen zu überprüfen. Tatsächlich fanden sie das EAG1-Protein in den unterschiedlichsten Tumorzellen, unter anderem in Lunge, Leber, Schilddrüse, Magen und Bauchspeicheldrüse. Daraus schlossen die Wissenschaftler, dass das Auftreten von EAG1 in Geweben außerhalb des Gehirns ein Hinweis auf Krebs sein kann. Der Kaliumkanal könnte sich somit als Markerprotein für die Krebsdiagnose anbieten.

Doch auch für die Krebstherapie weckt das EAG1-Protein Hoffnungen: Indem man den Kanal gezielt „verstopft“, lässt sich womöglich die Teilungsrate von Tumorzellen und damit das Wachstum von Tumoren reduzieren. Im Experiment stellten die

Biologen fest, dass der funktionierende Ionenkanal Voraussetzung für das Tumorzellwachstum ist. Die Max-Planck-Forscher suchen deshalb nach einem Wirkstoff, der den Kanal ausschaltet – und haben inzwischen eine Substanz ausfindig gemacht, die den Kanal schon bei nanomolaren Konzentrationen blockiert. Dieser Wirkstoff, wenn er sich therapeutisch einsetzen ließe, hätte den Vorteil, dass kaum Nebenwirkungen zu erwarten sind – denn an seinem angestammten Ort, im Zentralen Nervensystem, ist das EAG1-Protein durch die so genannte Blut-Hirn-Schranke abgeschottet.

Schlagwörter: Röntgenstruktur-Untersuchungen, monoklonale Antikörper, Aktionspotenzial, Membranpermeabilität, Lipidmembran, Einzelkanalströme, Patch-Clamp-Methode, Kristallographie, Selektivitätsfilter, elektrostatische Anziehung, Onkogen

Leseempfehlung: Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts und Walter, *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2003

Internet: <http://www.hhmi.org/biointeractive/neuroscience/vlab.html>
http://pb010.anes.ucla.edu/KHTML/K_chan.htm

DIE „MAX“-REIHE

auch unter www.max-reihe.mpg.de

BIOMAX, GEOMAX und TECHMAX erscheinen jeweils zweimal im Jahr und berichten über aktuelle Forschungsergebnisse aus den Max-Planck-Instituten vor allem für Lehrer und Schüler. Weitere Exemplare können unter folgender Adresse kostenlos bestellt werden: