

2. Grundlagen

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit den Grundlagen dieser Arbeit. Dabei werden die Grundlagen zu Struktur und Eigenschaften der hier verwendeten Proteinen Cx26 (Abschnitt 2.1 bis 2.5) und KcsA (Abschnitt 0 bis 2.8) geliefert.

2.1 Connexine

Benachbarte Zellen sind in der Lage, Kanäle auszubilden, die den interzellulären Stoffaustausch ermöglichen. Die als Gap Junctions (GJ) bezeichneten Kanäle bestehen im Falle von Chordatieren aus so genannten Connexonen. Dabei handelt es sich um einen Komplex aus sechs Zellwandproteinen, die als Connexine bezeichnet werden. Als Hexamere bilden diese in der Zellmembran einen funktionellen Halbkanal aus, welcher in der Lage ist, mit einem Halbkanal einer anderen Zelle GJ auszubilden. Connexine zeichnen sich durch vier hydrophobe Transmembrandomänen aus, welche zwei extrazelluläre und einen intrazellulären Loop aufweisen. C- und N-Terminus finden sich intrazellulär.^[6]

Die extrazellulären Loops spielen dabei eine wesentliche Rolle beim Erkennen und Andocken zweier Halbkanäle. Jeder Loop weist drei Cystein-Reste auf, welche das Ausbilden von Disulfidbrücken zwischen den Loops zweier Connexone ermöglicht. Neben homomeren Connexonen, welche aus sechs identischen Connexinen aufgebaut sind, besteht auch die Möglichkeit zur Ausbildung heteromerer Connexone, welche aus unterschiedlichen Connexinen zusammengesetzt sind. Ebenfalls ist es möglich, dass heteromere Kanäle ausgebildet werden. Dies ermöglicht eine selektive Durchlässigkeit für bestimmte Moleküle. Connexine spielen unter anderem eine Rolle bei Erb- und Hauterkrankungen, welche durch genetische Punktmutationen hervorgerufen werden.^[4]

Der prinzipielle Aufbau eines Connexons und die Möglichkeiten zur homomeren und heteromeren Connexon- und Kanalbildung sind schematisch in Abbildung 1 zu sehen.

Die Steuerung (Öffnen/Schließen) der Kanäle erfolgt entweder spannungsgesteuert oder über Ca^{2+} -Bindung, pH-Wert, Phosphorylierung oder Temperatur.^[9] Eine Nomenklatur der Connexine erfolgt mittels ihrer Molekülmasse, so verbirgt sich hinter dem Namen „Connexin26“ eine Molekülmasse von 26 kDa. Insgesamt sind im menschlichen Organismus einundzwanzig unterschiedliche Connexine vorhanden, welche Molekülmassen im Bereich von 23 bis 62 kDa aufweisen. Diese tauchen in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich stark gehäuft auf, zudem ist es möglich, dass ein Zelltyp unterschiedliche Connexine aufweist. So zum Beispiel zeigen Keratozyten neben Cx26, welches das häufigste Connexin dieses Zelltyps darstellt, auch Cx30, Cx30.0, Cx31 und Cx43 auf.^[3,4]

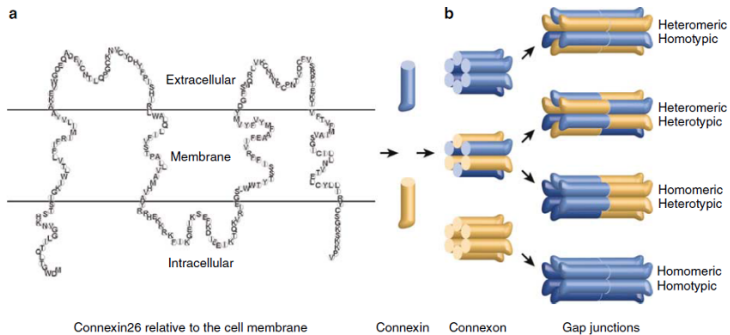


Abbildung 1: a: Relative Lage des Cx26-Monomers zur Zellmembran. b: Schematische Darstellung der möglichen Ausbildungsformen homogomerer bzw. heterogomerer Connexone und Kanäle.^[4]

Zusätzlich zur Unterscheidung auf Grundlage der Molekülmasse werden Connexine bezüglich der Länge ihres C-terminalen Endes unterschieden. So bezeichnet man Connexine mit einem langen C-Terminus als α -Connexine (z.B. Cx45, Cx43 und Cx40), β -Connexine hingegen weisen einen kurzen C-Terminus auf, so zum Beispiel Cx31, Cx31.3 oder Cx26. Jedes Connexin weist dabei spezifische Eigenschaften bezüglich seiner Permeabilität und Selektivität auf. Verglichen zu Cx43 weist Cx26 z.B. eine begrenzte Porenweite auf.^[6]

2.2 Lebenszyklus von Connexinen

Der Lebenszyklus der Connexine in der Zelle kann in drei Phasen unterteilt werden (siehe Abbildung 2). In einem ersten Schritt erfolgt die Oligomerisierung von sechs Connexin-Untereinheiten zu einem Connexon im endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. dem Golgi-Apparat. Ein Transport der Connexone zur Zellmembran erfolgt vesikulär über die Mikrotubuli des Zytoskeletts. Eine Ausnahme stellen Cx26 und Cx30 dar, deren Transportmechanismus bis dato noch unaufgeklärt ist.

Bis zum Ankoppeln an ein anderes Connexon bleiben die an der Zellwand ausgebildeten Kanäle verschlossen. Eine Kanalbildung kann dabei nur innerhalb der eigenen Connexin-Untereinheit erfolgen, so bilden α -Connexine keine Kanäle mit β -Connexinen aus und umgekehrt. Der Prozess des Connexon-Aufbaus und Transport zur

Zellmembran erfolgt kontinuierlich, Gap-Junctions werden kontinuierlich erneuert, entsprechend erfolgt ein kontinuierlicher Abbau der Connexone, welche nach Transport in das Zellinnere via Autophagozytose, proteosomale oder mittels Ubiquitin abgebaut werden. Interzelluläre Kanäle weisen nur eine geringe Lebensdauer auf, die Halbwertszeit beträgt wenige Stunden.^[4,6,7]

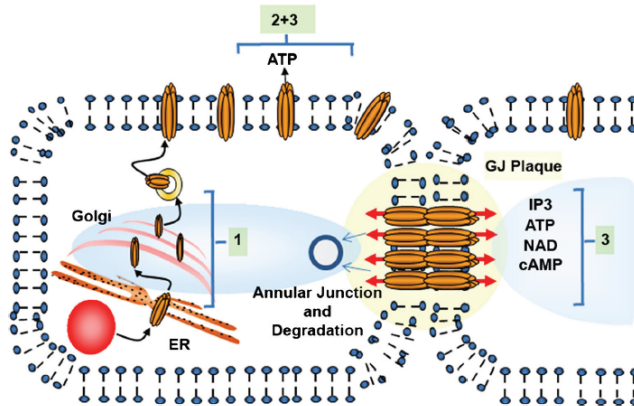


Abbildung 2: Lebenszyklus von Connexinen in der Zelle von der Bildung im ER, über den Transport zur Zellmembran und dem Ausbilden von GJ bis zur Degradation.^[6]

2.3 Connexin 26

Connexin 26 zählt zu den β -Connexinen und weist entsprechend seines Namens eine Atommasse von 26 kDa auf. Im Menschen findet es sich zu großen Anteilen in der Cochlea, Leber, Haut und in der Plazenta. Zudem findet es sich in Haarfollikeln und in Schweißdrüsen. In der Epidermis findet sich Cx26 ausschließlich palmoplantar (Handflächen und Fußsohlen). Cx26 ist in der Lage, heteromere Kanäle mit Cx30 und Cx32 auszubilden. Die Eigenschaft, heteromere Kanäle auszubilden erlaubt den interzellulären Austausch einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle, zudem kann eine Selektivität der Kanäle für bestimmte Moleküle geschaffen werden. So konnte zum Beispiel beobachtet werden, dass ein Cx26/Cx32 heteromerer Kanal die Passage von cGMP gegenüber cAMP begünstigt, während eine homomere Cx32-Kanal für cGMP und cAMP zu gleichen Anteilen durchlässig ist.^[4] Kodiert wird Cx26 im Gen GJB2, welches sich auf dem Chromosom 13q12.11 findet.

Unterschiedliche Erkrankungen konnten mit der Mutation von Cx26 in Verbindung gebracht werden. So gelten als Hauptgrund für symptomfreie Taubheit oder dem erblich bedingten Keratitis-Ichthyosis-Taubheitssyndrom Cx26-Punktmutationen.^[7]

Sämtliche heterozygote Punktmutationen von GJB2 konnten mit Taubheit und Änderung in der Epidermis in Verbindung gebracht werden.

Derartige Mutationen können zur Folge haben, dass entweder das mutierte Protein in der Zelle verbleibt und die Zellmembran nicht erreicht oder es zur Ausbildung undichter Kanäle kommt.

Zudem gilt eine Überexpression von Cx26 als Kennzeichen für Schuppenflechte und chronische nicht-heilende Wunden. Eine Mutation am Cx26 Ser17 (Ser17Phe) hat schwere Infekti-

onen und ein erhöhtes Risiko für Plattenepithelkarzinome, vor allem in der Zunge, zur Folge.^[6,7]

2.4 Struktur humaner Cx26-Kanäle

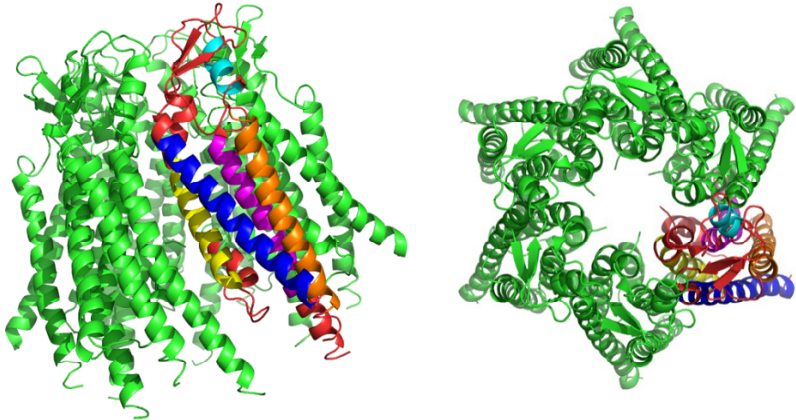


Abbildung 3: Struktureller Aufbau eines Cx26-Halbkanals. Links- Ansicht von der Seite; rechts – Ansicht von oben (extrazellulär). Farblich hervorgehoben – monomere Untereinheit. Gelb – TM1; violett – TM2; orange – TM3; blau – TM4; cyan – Parahelikaler Loop. (Erstellt mit PyMOL, pdb-Code: 2ZW3)

In Zellmembranen liegen Connexine als hexamere Connexone vor. Abbildung 3 zeigt schematisch die Struktur eines Cx26-Kanals. Zu erkennen ist, dass das Connexon eine hexagonale Struktur aufweist. In der Ansicht, die den Kanal von oben zeigt (Abbildung 3 rechts) zeigt sich, dass der N-Terminus in den Kanal hereinragt.

Die Transmembrandomänen (TM) weisen eine Länge von 38 Å auf, die intrazelluläre Region des Kanals hat im offenen Zustand einen Durchmesser von 92 Å, während der Durchmesser der extrazellulären Region 51 Å beträgt. Entsprechend wird der Durchmesser der Pore kleiner (intrazellulär: 40 Å, extrazellulär: 25 Å). Die Pore wird von dem N-terminalen Ende der TM1 gebildet, TM2 liegt etwas versetzt hinter TM1. TM1 und TM2 sind umgeben von den TM3 und 4, welche Kontakt zur Lipidphase haben. TM 1 endet in einem kurzen, extrazellulären, parahelikalen Loop^[10]. Die extrazellulären Loops (EL) 1 und 2 weisen je antiparallele β -Faltblätter auf.^[9]

2.5 Einfluss der Interaktion von K188 und E47 auf die Kanalfunktionalität von Cx26

Die Aminosäure (AS) Lysin spielt bei der Strukturbildung von Proteinen eine wesentliche Rolle. Die ϵ -Aminogruppe der Seitenkette weist einen pKs von 10,8^[11] auf, sodass diese beinahe

unter sämtlichen Bedingungen protoniert vorliegt. Dadurch ist Lysin in der Lage, ähnlich wie Arginin, mit negativ geladenen Aminosäuren Salzbrücken auszubilden, z.B. mit Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Aufgrund der Möglichkeit, Salzbrücken auszubilden finden sich Lysine häufig in Positionen, die relevant für die Aktivität von Proteinen sind, so z.B. in Bindungsstellen.^[12]

Aufgrund seiner positiven Ladung spielt Lysin, neben Arginin eine wesentliche Rolle in der Aktivität von Membranproteinen und der Interaktion mit der Zellmembran. So erfolgt die Sensorik des Membranpotentials in Membranproteinen über Lysine und Arginine.^[13]

Im Cx26 findet sich am Ende von TM4 Lys188, welches mit den Aminosäuren Asp46; Glu47; Arg75; Arg184; Asp42; Glu187 und Ser72 Bestandteil eines untereinheitenübergreifenden elektrostatischen Netzwerks ist, welches die jeweiligen Untereinheiten des hexameren Connexons miteinander verbindet und den Spannungssensor für das Loop-Gating darstellt. Zusätzlich wird angenommen, dass durch multiple schwache elektrostatische Wechselwirkungen dieses Netzwerks der offene Zustand des Kanals stabilisiert wird. Des Weiteren wird angenommen, dass eine Störung des elektrostatischen Netzwerks eine Beeinflussung der durch dieses Netzwerk bedingten Stabilisierung des Kanals zur Folge haben könnte. Die Interaktionen innerhalb des Netzwerks, u.a. auch die Interaktion von Lys188 mit Asp46, kann z.B. schon mit schwachen thermischen Energien gelöst werden.^[10]

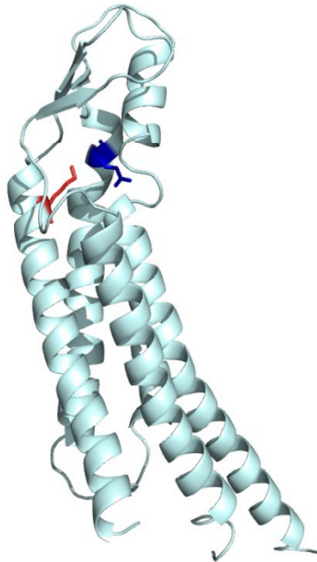


Abbildung 4: Cx26-Protomer. Rot – Lys188; blau – Glu47. (Erstellt mit PyMol; pdb-Code: 2ZW3)

Kürzlich wurde ein Mechanismus beschrieben, der eine Transmembrandomänen-übergreifende Interaktion innerhalb dieses Netzwerks belegt^[1]. Hierbei wird eine Konformationsänderung vom geschlossenen hin zum offenen Kanal in Abhängigkeit von an- bzw. abwesendem Ca^{2+} vermittelt. Beteiligt an der Interaktion sind die Aminosäuren Lys188 und Glu47, welches sich im parahelikalen Loop befindet und zusammen mit Gly45 und Glu42 die Ca^{2+} -Bindestelle von Cx26 bildet. Abbildung 4 zeigt die Positionen von Lys188 und Glu47 in einem Cx26-Protomer.

Kommt es zur Abwesenheit von Ca^{2+} , so rotiert Glu47 in einem Winkel von 90° und entfernt sich 7 Å von der Ca^{2+} -Koordinationskonformation.

Dabei bildet die Carboxylgruppe von Glu47 eine Salzbrücke mit der ϵ -Aminogruppe von Lys188 (siehe Abbildung 5). In Abwesenheit von Ca^{2+} kommt es zudem, unter anderem bedingt durch die beschriebene Interaktion, zu mäßigen Konformationsänderungen im Protein.^[1]

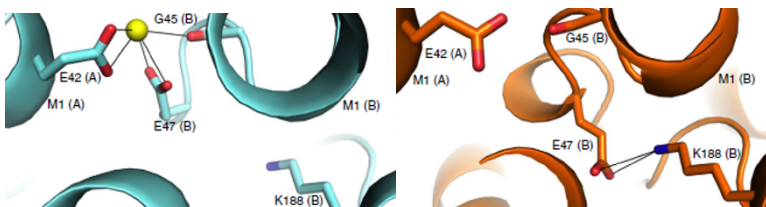


Abbildung 5: K188-E47-Interaktion im Cx26-Halbkanal. Links- E47 in der Ca^{2+} -gebundenen Form. Rechts - E47 in der Ca^{2+} -ungebundenen Form, 90° verdreht.^[1]

2.6 KcsA

Bei dem Kaliumkanal KcsA handelt es sich um einen Ionenkanal, welcher im Bakterium *Streptomyces lividans* erstmals identifiziert worden ist^[14]. Komplementationsexperimente belegen, dass es seine Aufgabe ist, selektiv den K^+ -Transport durch die Zellmembran zu ermöglichen^[15]. Dadurch können physiologische Prozesse, wie zum Beispiel Signaltransduktion oder Osmoregulation ermöglicht werden^[14]. Bekanntheit erlangte der Kanal dadurch, dass er den ersten Ionenkanal darstellt, dessen Struktur 1998 von *Roderick MacKinnon* hochaufgelöst ($3,2 \text{ \AA}$) ermittelt wurde und seitdem als Modell für den kalium-selektiven Transport dient^[16,17].

Kaliumkanäle finden sich in Viren, Ein- und Mehrzellern^[18]. Sie ermöglichen, selektiv eine große Menge Kalium in die Zelle zu transportieren, dabei sind sie in der Lage, sich durch externe Signale zu öffnen^[19]. Strukturell weisen Kaliumkanäle einige Gemeinsamkeiten auf, Unterschiede finden sich dabei im Gating der Kanäle, so gibt es z.B. spannungsgesteuerte oder Ca-aktivierbare Kaliumkanäle. Zudem unterscheiden sich Kaliumkanäle in ihrer Selekti-

vität für andere monovalente Kationen^[18]. Für KcsA konnte beobachtet werden, dass dieser pH-gesteuert funktioniert und bei pH-Werten unterhalb von etwa pH 5 bis 5,5 aktiv ist^[18,20]. Verantwortlich für das Gating ist beim KcsA eine zytoplasmatische Domäne am C-Terminus. Diese besteht überwiegend aus geladenen AS. *Hirano et al.* zeigten durch Punktmutationen, dass durch Mutation der AS Glu146 (Glu146Gln) die pH-Abhängigkeit der Kanalaktivität bis pH 7 aufgehoben werden konnte.^[21]

2.7 Struktur von KcsA

Als tetrameres Membranprotein weist KcsA eine Molmasse von 68 kDa auf^[19]. Der KcsA-Kanal besteht dabei aus vier identischen Untereinheiten, welche jeweils eine Molmasse von 17 kDa aufweisen und je aus zwei α -helikalen Domänen und einer so genannten „Poren-Helix“ (PH), welche ins Zentrum des Kanals ragt, bestehen. Diese vier Untereinheiten bilden den konisch angeordneten Kanal. C- und N-Terminus finden sich intrazellulär. Insgesamt weist die Pore eine Länge von 45 Å und der transmembranäre Bereich eine Länge von 34 Å auf.^[16] Abbildung 6 zeigt den strukturellen Aufbau des KcsA-Kanals, zu erkennen sind TM 1 und 2 sowie die PH. Essentiell für die Funktionalität des Kanals und die Selektivität für Kalium ist der Selektivitätsfilter (SF). Typischerweise weisen Kaliumkanäle eine mindestens 10.000-fache Selektivität für Kalium gegenüber Natrium auf.^[16]

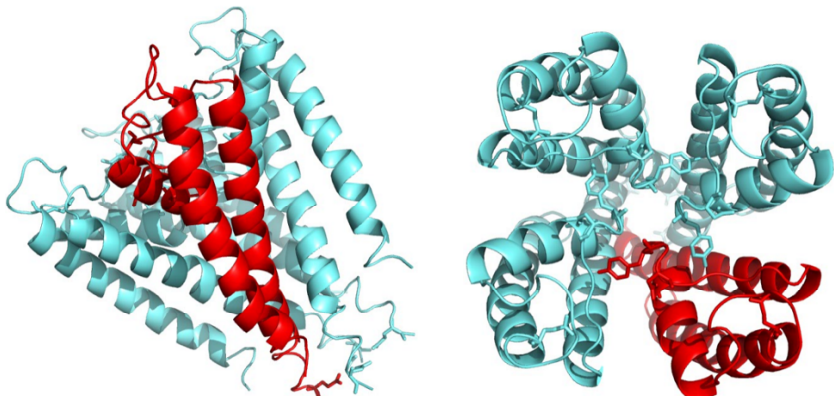


Abbildung 6: Struktureller Aufbau eines tetrameren KcsA-Kanals. Links- Seitenansicht; Rechts- Ansicht von oben (extrazellulär). Farblich hervorgehoben – Ein Protomer des KcsA. (Erstellt mit PyMOL, pdb-Code: 1bl8)

Um diese Selektivität zu gewährleisten, weisen sämtliche bekannte Kaliumkanäle einen SF auf. Dabei handelt es sich um eine Sequenz von sechs Aminosäuren, welche in beinahe allen bekannten Kaliumkanälen, mit leichten Variationen in der AS-Sequenz, zu finden ist. In KcsA handelt es sich dabei um die Sequenz TTVGYG und findet sich am Ende der Poren-Helix (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8).^[18]

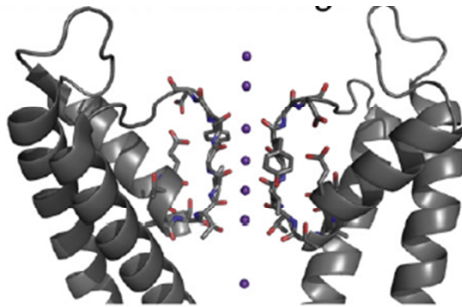


Abbildung 7: Selektivitätsfilter von KcsA bei hoher Kalium-Konzentration. Die Abbildung zeigt die Seitenansicht von zwei gegenüberliegenden Protomeren.^[18]

2.8 Selektivitätsfilter und die Rolle von Glu71 für die KcsA-Kanalaktivität

Eine wesentliche Rolle bei der Selektivität für K^+ im KcsA spielt die Interaktion zwischen Glu71, Trp67 und Asp80, welche sich nahe des SF finden (siehe Abbildung 8). Diese Interaktion garantiert sowohl die Selektivität für K^+ als auch die Inaktivierung des Kanals in Abwesenheit von Kalium.^[18,22] Es konnte beobachtet werden, dass die Nebenketten-Interaktion zwischen Glu71 und Asp80 zur Destabilisierung der offenen, leitenden Form des Kanals führt, sobald die AS in naher Position zueinander geraten.

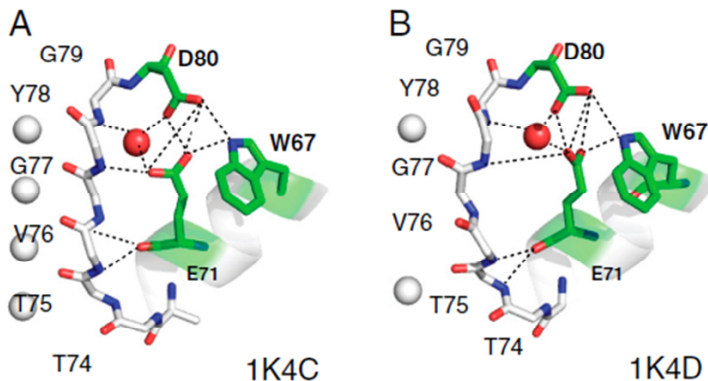


Abbildung 8: Selektivitätsfilter von KcsA. Links - Im leitenden Zustand (hohe K-Konzentration); rechts - im kollabierten Zustand (geringe Kalium-Konzentration). Die Abbildung zeigt jeweils nur die monomere Struktur.^[23]

Dies ist in Abwesenheit von K^+ der Fall. Eine bekannte Punktmutation, welche die Selektivität des Kanals aufhebt und Resistent gegen Inaktivierung ist, ist Glu71Ala. So konnte beobachtet werden, dass der Kanal in Anwesenheit geringer K^+ -Konzentrationen ($0,2 \mu M$) und bei niedrigem pH (3,5) durch die Mutation den leitfähigen Zustand aufrecht erhalten konnte.^[23]

Bioanalytische Struktur-Funktionsmessungen an
Ionenkanälen

Entwicklung optischer Analysemethoden an
punktmutierten KcsA und Connexin 26

Schmidt, D.

2017, XIII, 66 S. 42 Abb., 10 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-658-19144-3