

# Moderne Anwendungsbeispiele aus der Elektrophysiologie

## 8.1 Struktur-Funktionsbeziehungen von Carrier-Proteinen – 136

8.1.1  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe – 136

8.1.2  $\text{Na}^+$ -abhängiger GABA-Transporter (GAT1) – 139

## 8.2 Struktur-Funktionsbeziehungen von Ionenkanälen – 140

8.2.1 Familien der Ionenkanäle – 140

8.2.2 Familie der ATP-aktivierten Ionenkanäle – 142

8.2.3 Experimentelle Ergebnisse – 144

## 8.3 Virale Ionenkanäle – 148

8.3.1 3a-Protein von Coronaviren – 150

8.3.2 Virale Proteineinheit (Vpu) von HIV-1 – 154

8.3.3 Matrixprotein 2 (M2) des Influenza-A-Virus – 155

## 8.4 Übungsaufgaben – 157

Literatur – 157

Alle Verfahren, die wir bisher diskutiert haben, Flussmessungen, Messungen von stationären und transienten Strömen und die entsprechenden Auswertverfahren können genutzt werden, um Funktion, Regulation und Struktur-Funktionsbeziehungen zu analysieren. Solche Informationen können wir gewinnen, indem wir die Funktionen von chemisch oder genetisch modifizierten Carriern oder Kanälen charakterisieren und miteinander vergleichen. Letzteres gilt auch für natürlich auftretende Mutationen, die Ursache für verschiedene Krankheiten sein können; die mit den genannten Methoden gewonnenen Erkenntnisse sind wichtiger Bestandteil für das Verständnis und die Behandlung solcher Krankheiten.

Für viele der Transportproteine konnte die Aminosäuresequenz und die mögliche Orientierung des Proteins in der Membran ermittelt werden, oder es konnte sogar die dreidimensionale Struktur bestimmt werden. Im Folgenden wollen wir die Vorgehensweise eines Elektrophysiologen illustrieren, um Struktur, Funktion und Regulation von Membrantransport zu untersuchen, und zwar an drei Beispielen: der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (► Abschn. 8.1.1, ■ Abb. 8.1), dem Neurotransmittertransporter GAT (► Abschn. 8.1.2, ■ Abb. 8.4) und den Nukleotidrezeptoren (► Abschn. 8.2.2, ■ Abb. 8.6), die in Gegenwart von extrazellulärem ATP einen Kanal bilden.

Für das Verständnis der Wirkung chemischer Stoffe sowie die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von Krankheiten stellt die Elektrophysiologie eine leistungsfähige Methode bereit, um die Wechselwirkung solcher Substanzen mit ihren Rezeptoren zu erforschen. Als Beispiel wird dieses an viralen Ionenkanälen illustriert, die eine wichtige Rolle für die Virenreplikation spielen (► Abschn. 8.3).

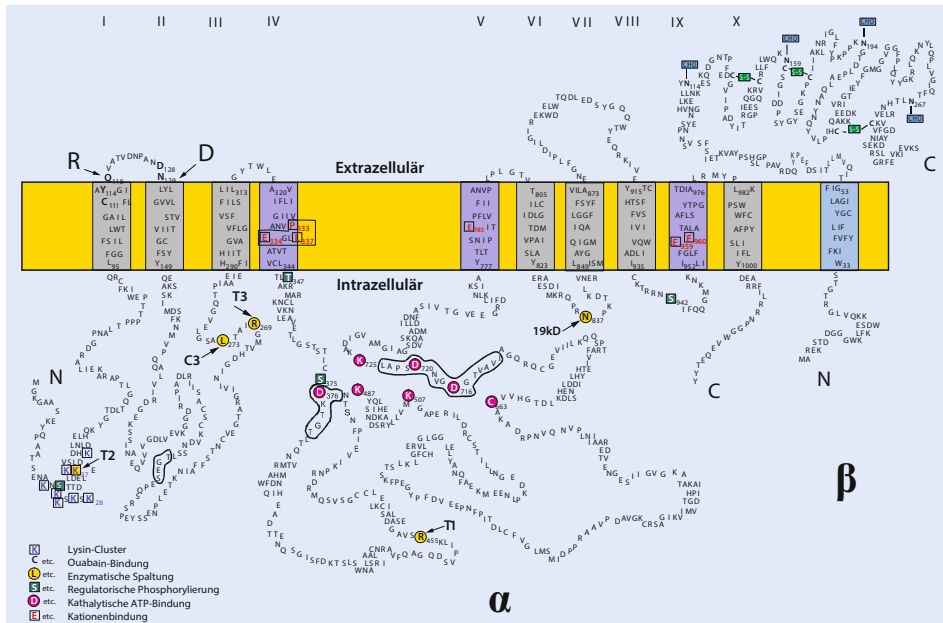
## 8.1 Struktur-Funktionsbeziehungen von Carrier-Proteinen

### 8.1.1 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -Pumpe

Die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (s. Übersichtsarbeit von (Vasilets und Schwarz 1993)) ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ -Untereinheit von ungefähr 100 kDa und einer kleineren glykosylierten  $\beta$ -Untereinheit von ungefähr 60 kDa (s. ■ Abb. 8.1). Mindestens vier Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit und drei der  $\beta$ -Untereinheit wurden bisher identifiziert, die alle eine gewebespezifische Verteilung aufweisen. Auf der  $\alpha$ -Untereinheit sind alle funktionell wichtigen Stellen lokalisiert, wie die Bindungsstelle für ATP und die Phosphorylierungsstelle, die Stellen, mit denen die transportierten Kationen wechselwirken und solche für die spezifisch inhibitorischen Herzglykoside wie z. B. Strophanthin (Ouabain) und die Bindungsstelle für Palytoxin (s. ► Abschn. 7.2).

Eine Möglichkeit, Modulationen der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität zu untersuchen, besteht darin, den elektrogenen, von der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe generierten Strom unter Voltage-Clamp zu messen. Strommessungen haben beispielsweise bestätigt, dass eine Mutation von  $\text{Q}_{118}$  (Glutamin) und  $\text{N}_{129}$  (Asparagin) in die geladenen Aminosäuren R (Arginin) bzw. D (Asparaginsäure) (■ Abb. 8.1) die ATPase unempfindlich gegenüber Ouabain macht. Die  $\beta$ -Untereinheit ist für die richtige Faltung und den korrekten Einbau des gesamten Proteins in die Membran notwendig. Die Kombination einer  $\alpha$ -Untereinheit mit verschiedenen Isoformen der  $\beta$ -Untereinheit führt zu unterschiedlichen

## 8.1 · Struktur-Funktionsbeziehungen von Carrier-Proteinen

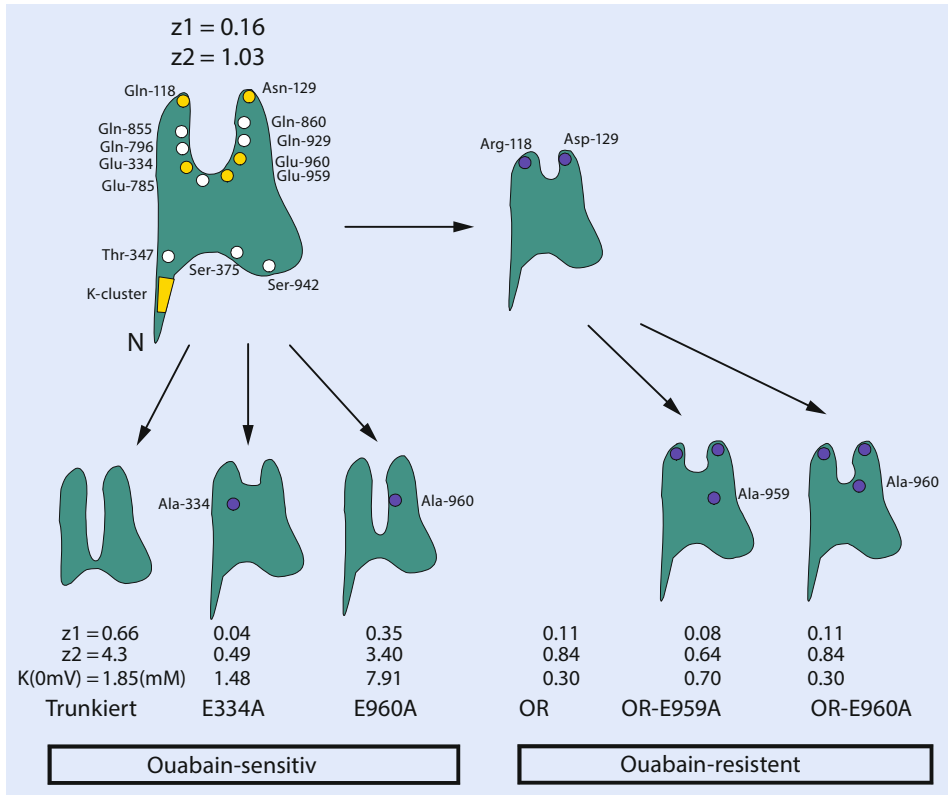


■ **Abb. 8.1** Aminosäuresequenz der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. (Basierend auf Vasilets und Schwarz 1993, mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons, 1993)

funktionellen Eigenschaften, sodass für die  $\beta$ -Untereinheit auch eine regulatorische Rolle diskutiert wurde. Außerdem wurde eine  $\gamma$ -Untereinheit identifiziert, die ebenfalls eine regulatorische Funktion zu haben scheint.

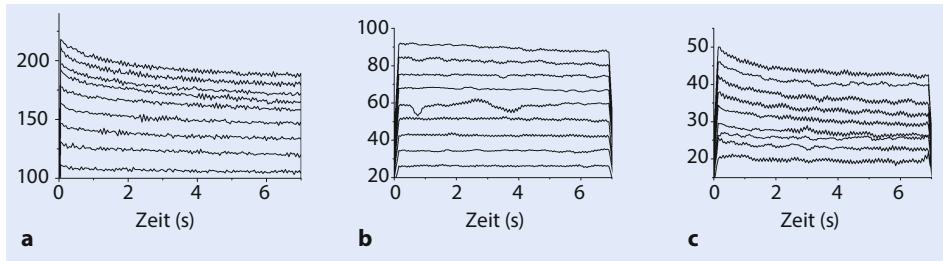
In der  $\alpha$ -Untereinheit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase sind mehrere negativ geladene Aminosäuren in transmembranen Domänen lokalisiert (■ Abb. 8.1), die an der Wechselwirkung mit den transportierten Kationen beteiligt sein könnten. Mutationen dieser Aminosäuren zu Alanin führen erwartungsgemäß zu einer Veränderung in der Länge des apparenten dielektrischen Zugangskanals, die durch die effektive Valenz  $z$  beschrieben wird (s. z. B. Glutamat 334 und 960 in ■ Abb. 8.2).

Der N-Terminus ist der Bereich mit den größten Unterschieden zwischen den verschiedenen Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheiten und kann möglicherweise für isoformenspezifische Funktionen in verschiedenen Geweben verantwortlich sein. Zumindest weisen die Pumpenisofomen unterschiedliche Strom-Spannungsabhängigkeiten auf. Mutationen in diesem Bereich (wie die Trunkierung in ■ Abb. 8.2) führen ebenfalls zu veränderten Transporteigenschaften, wozu wiederum Veränderungen in der Wechselwirkung der extrazellulären Kationen und der Bindung des extrazellulär wirkenden Ouabains gehören. Ein wichtiger regulatorischer Prozess bei vielen Membranproteinen ist die Phosphorylierung an Serinen und Threoninen (s. ■ Abb. 8.1) durch Proteinkinasen. Bei der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase ist das insbesondere das Serin im Bereich des N-Terminus mit den bereits erwähnten Konsequenzen. Es ist ein bemerkenswerter, interessanter Befund, dass der hoch flexible zytoplasmatische N-Terminus extrazelluläre Wechselwirkungen beeinflusst. Er stellt ein Beispiel für allosterische Wechselwirkungen in einer komplexen Proteinstruktur dar.



■ **Abb. 8.2** „Zaharzt-Präsentation“ der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe. (Basierend auf Schwarz und Vasilets 1996, Fig. 4, mit freundlicher Genehmigung von Wiley and Sons, 1996)

Wir haben oben beschrieben (s. ► Abschn. 7.2, ■ Abb. 7.19), dass Palytoxin (PTX) die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe in einen Kanal überführt. Während langanhaltender Voltage-Clamp-Pulse induziert Palytoxin einen Strom, der bei sehr positiven Potenzialen inaktiviert (■ Abb. 8.3a). Eine Inaktivierung bei positiven Potenzialen findet man auch bei manchen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanälen, die sich auf eine positiv geladene „Kugel“ im Bereich des N-Terminus zurückführen lässt. Die Kugel kann wie an einer Kette (*ball at a chain*) die innere Kanalöffnung spannungsabhängig verstopfen und dadurch eine einwärts verstärkende stationäre IV-Beziehung verursachen (s. z. B. auch ► Abschn. 5.2.2). Eine ähnliche Interpretation wurde auch für die PTX-modifizierte  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe vorgeschlagen. So zeigt die trunkierte Mutante diese Inaktivierung nicht mehr (■ Abb. 8.3b), aber die intrazelluläre Applikation des trunkierten N-terminalen Peptids stellt die Inaktivierung teilweise wieder her (■ Abb. 8.3c).



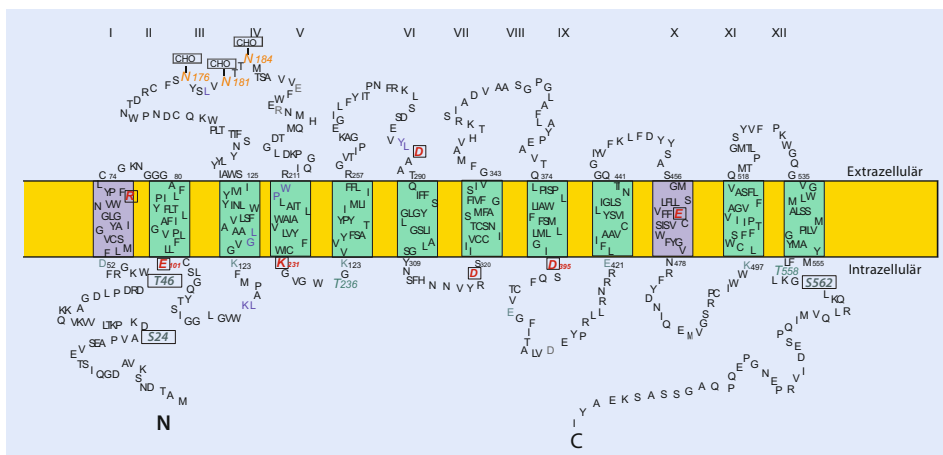
■ **Abb. 8.3** PTX-induzierte Ströme des Wildtyps der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe (a) und einer trunktierten Mutanten ohne das N-terminale Peptid (b) oder mit dem im internen Medium gelösten Peptid (c). (Nach Wu et al. 2003, Fig. 4, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier AG, 2003)

### 8.1.2 $\text{Na}^+$ -abhängiger GABA-Transporter (GAT1)

Die Aktivität von Neurotransmittertransportern spielt eine wichtige Rolle für die Beendigung einer synaptischen Signalübertragung (s. ► Abschn. 7.1.5). Insofern ist eine detaillierte Kenntnis der Struktur-Funktionsbeziehungen eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Hirnfunktionen.

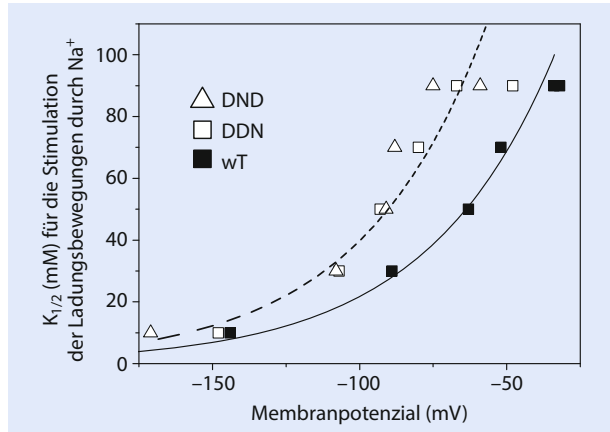
Wir hatten schon auf die wichtige Bedeutung einer regulatorischen Phosphorylierung der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe durch Proteinkinasen hingewiesen, was auch für die Neurotransmittertransporter gilt. Die Vorgehensweise für die Identifikation solcher Phosphorylierungsstellen ist die gleiche, wie wir es für die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe beschrieben haben. Mögliche Aminosäuren für die Phosphorylierung des GAT (s. ■ Abb. 8.4) werden mutiert, die Mutanten werden dann funktionell charakterisiert und die Ergebnisse mit denen für den Transporter des Wildtyps verglichen.

In jüngerer Zeit wurde auch vorgeschlagen, dass Glykosylierung an der Regulation von Transportfunktionen beteiligt sein kann. Mutation der Glykosylierungsstellen des GAT (s.  $\text{N}_{176}$ ,  $\text{N}_{181}$ ,  $\text{N}_{184}$  in ■ Abb. 8.4) führt in der Tat zu verändertem Transport. Das in



■ **Abb. 8.4** Aminosäuresequenz des GAT1 aus der Maus

**Abb. 8.5** Auswirkung der Mutation von Glykosylierungsstellen an Position 176, 181 und 184. (Nach Liu et al. 1998, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier AG, 1998)



**Abb. 8.5** dargestellte Beispiel zeigt, dass eine Mutation von zwei der drei Asparagine (N) zu Asparaginsäure (D) zu einer reduzierten Sensibilität für extrazelluläres Na<sup>+</sup> führt.

## 8.2 Struktur-Funktionsbeziehungen von Ionenkanälen

Ionenkanäle werden üblicherweise nach Unterschieden in ihren funktionellen Eigenschaften oder in ihrer molekularen Struktur klassifiziert. Dazu zählen Ionenselektivität, Unterschiede in der Regulation des *gatings*, die Anzahl der Untereinheiten, die einen Kanal bilden, Anzahl der transmembranen Domänen oder Sequenzhomologien. Ionenkanäle, die wichtige Eigenschaften gemeinsam haben, werden dabei bestimmten Familien zugeordnet. Einige dieser Ionenkanalfamilien sollen im Folgenden vorgestellt werden. Für weitergehende Informationen über Ionenkanäle möchten wir nochmals auf das Buch von Hille (2001) verweisen.

### 8.2.1 Familien der Ionenkanäle

#### Familie der spannungsaktivierten Kationenkanäle (Voltage-gated Ion Channels, VICs)

Obwohl einige Kanäle dieser Gruppe zusätzlich zur elektrischen Spannung durch Ligandenbindung kontrolliert werden, stellt die Kontrolle durch das transmembrane elektrische Feld das gemeinsame Charakteristikum dar. Funktionell charakterisierte Mitglieder sind permeabel für K<sup>+</sup>-, Na<sup>+</sup>-, oder Ca<sup>2+</sup>-Ionen (s. auch ► Abschn. 5.2). Hauptaufgabe der spannungsabhängigen Kanäle ist das Mitwirken an der Formung des Aktionspotenzials und die Beeinflussung der elektrischen Eigenschaften von biologischen Zellen.

K<sup>+</sup>-Kanäle sind in der Regel Homotetramere, wobei jede der vier Untereinheiten sechs transmembranäre Domänen aufweist (s. auch ► Abb. 6.8). Es sind mindestens zehn Typen von K<sup>+</sup>-Kanälen bekannt, die sich in ihren funktionellen Eigenschaften unterscheiden: spannungsabhängige (K<sub>a</sub>, K<sub>v</sub>, K<sub>vr</sub>, K<sub>vs</sub> und K<sub>sr</sub>), Ca<sup>2+</sup>-sensitive (BKCa, IKCa und SKCa) und ligandengesteuerte Kanäle (KM und KACH). Zusätzlich existieren tetramere Kanäle

le, deren einzelne Untereinheit nur zwei transmembrane Domänen aufweist, wobei diese den TM-Domänen 5 und 6 des TM6-Typs entsprechen (s. ■ Abb. 6.8) Man bezeichnet diese als Einwärtsgleichrichterkanäle (*inward rectifier*, Kir), da sie einwärtsgerichtete Ströme erleichtern.

Die  $\alpha$ -Untereinheiten der  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^+$ -Kanäle haben die etwa vierfache Länge verglichen mit den  $\text{K}^+$ -Kanaluntereinheiten und beinhalten vier Sequenzwiederholungen (s. ■ Abb. 6.11). Dabei ist jede dieser vier Wiederholungen homolog zur einzelnen Untereinheit eines  $\text{K}^+$ -Kanals. Es gibt fünf Typen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (L, N, P, Q und T) und mindestens sechs Typen von  $\text{Na}^+$ -Kanälen (I, II, III,  $\mu 1$ , H1 und PN3).

### Familie der ligandenaktivierten Ionenkanäle (Ligand-gated Ion Channels, LIC)

Zu dieser Gruppe gehören die ionotropen Neurotransmitterrezeptoren die z. B. durch die Bindung von Azetylcholin, Serotonin, Glycin, Glutamat oder  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA) aktiviert werden. Alle diese Rezeptoren sind Hetero- oder Homomere, die aus drei, vier oder fünf Untereinheiten aufgebaut sind. Unter diesen Rezeptoren findet man die nikotinischen Azetylcholinrezeptoren als die bei Weitem am besten charakterisierten. Azetylcholinrezeptoren sind Pentamere, die – im Falle des in der Muskulatur vorkommenden Vertreters – aus vier verschiedenen Untereinheiten in der Anordnung  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  aufgebaut sind. Kanäle der LIC-Familie sind permeabel für Kationen oder Anionen (Azetylcholinrezeptoren sind z. B. unspezifische Kationenkanäle, Glyzinrezeptoren hingegen sind permeabel für Anionen).

### Chloridkanalfamilie (ClC)

Die große Familie der Chloridkanäle besteht aus Dutzenden bereits sequenzierter Proteine, die in Bakterien, Pflanzen und Tieren nachgewiesen werden konnten. Charakteristisch für diese Familie sind 10–12 transmembranäre,  $\alpha$ -helicale Domänen und das Auftreten in der Plasmamembran als Homodimer. Während ein Mitglied der Familie, der Chloridkanal aus *Torpedo* ClC-O, scheinbar eine Doppelpore, eine pro Untereinheit, ausprägt, scheinen andere Vertreter pro Dimer nur eine Pore auszubilden. Chloridkanäle sind in eine Vielzahl von physiologischen Funktionen eingebunden. Dazu gehören z. B. die Regulation des Zellvolumens, Stabilisierung des Ruhepotenzials, Signalübertragung, transepithelialer Transport etc. Innerhalb homologer Proteingruppen existieren unterschiedliche funktionelle Eigenschaften, z. B. unterschiedliche Anionenselektivität oder voneinander abweichende Spannungsabhängigkeiten.

### Gap-Junction (connexin)-Familie

Gap-Junction-Kanäle bestehen aus einem Bündel von eng gepackten transmembranären Untereinheiten, den sogenannten Connexonen, durch die kleine Moleküle zwischen benachbarten Zellen hindurch diffundieren können. Die Connexone werden durch homo- oder heterohexamere Anordnung der Connexine gebildet. Gesteuert durch  $\text{Ca}^{2+}$  kann sich das Connexon der einen Zelle mit dem Connexon der benachbarten Zelle verbinden, sodass die Zytoplasmen der beiden Zellen über eine Pore miteinander verbunden sind. Es sind über 15 verschiedene Isoformen der Connexin-Untereinheiten bekannt. Diese variieren in ihrer Größe zwischen 25 und 60 kDa und besitzen vier transmembranäre,  $\alpha$ -helicale Domänen. Folglich beinhaltet der dodecamere, aus zwei Hexameren gebildete Kanal insgesamt die beeindruckende Zahl von 48 transmembranären Domänen.

## Familie der epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanäle (ENaC)

Die ENaC-Familie besteht aus mehr als 20 sequenzierten Proteinen und kommt ausschließlich im Tierreich vor. Es gibt spannungsunabhängige ENaC-Homologe im Gehirn, einige sind im Tastsinn involviert. Andere wiederum, die pH-abhängigen Na<sup>+</sup>-Kanäle ASIC1-3, spielen eine Rolle beim Schmerzempfinden im Zusammenhang mit Gewebeazidose. Ein weiteres Mitglied der Familie, der durch FMRF-amid aktivierte Na<sup>+</sup>-Kanal, war der erste Peptid-aktivierte Ionenkanal, der sequenziert werden konnte. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine Topologie mit zwei transmembranen Domänen, intrazellulär liegenden Termini und einer großen extrazellulär liegenden Schleife. Es wurden drei homologe ENaC-Untereinheiten identifiziert, die als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Untereinheit bezeichnet werden. Die Untereinheiten assemblieren in der Stöchiometrie  $\alpha\beta\gamma$  zu einem funktionellen heterotrimeren Kanal.


## Familie der Mechanosensitiven Ionenkanäle

Eine weitere Gruppe interessanter Ionenkanäle sind solche, die durch mechanischen Stress aktiviert werden. Bei ihnen werden mechanische Kräfte in elektrische Signale überführt (Delmas und Coste 2013; Ranade et al. 2015). Insbesondere die Applikation von mechanischem Stress mit der Patch-Clamp-Technik oder von osmotischem Stress führen zu einer laufend zunehmenden Zahl von mechanosensitiven oder Stress-aktivierten (SAC) Ionenkanälen (Nilius und Honoré 2012). Eine Klasse von mechanosensitiven Kanälen, die durch die gesamte Evolution hindurch konserviert blieb, wird durch die Piezo-Kanäle gebildet (Bagriantsev et al. 2014). Eine weitere große Klasse von Ionenkanälen, die auf physikalische Reize reagieren, wird durch die „Transient Receptor Potential“ (TRP) Kanäle gebildet (Christensen und Corey 2007).

### 8.2.2 Familie der ATP-aktivierten Ionenkanäle

Im Folgenden werden wir Strategien vorstellen, wie Elektrophysiologie genutzt werden kann, um Erkenntnisse über Struktur-Funktionsbeziehungen von Ionenkanälen zu gewinnen. Als Beispiel werden wir die ATP-aktivierten Ionenkanäle der P2X-Rezeptorfamilie verwenden.

#### Struktur und Klassifizierung der P2X-Rezeptoren

Die Gruppe der ATP-aktivierten Ionenkanäle wird der Familie der ligandenaktivierten Ionenkanäle zugeordnet und soll im Folgenden etwas detaillierter beschrieben werden. Da die Gemeinsamkeit dieser Kanäle die Aktivierung durch extrazelluläres ATP ist, werden sie auch als „Nukleotidrezeptoren“ bezeichnet. Ein anderer, oft benutzter Name ist „P2X-Rezeptoren“, früher wurde auch der Begriff „Purinozeptoren“ benutzt. Obwohl bereits 1972 (Burnstock 1972) die Hypothese aufgestellt wurde, dass ATP eine Rolle als Neurotransmitter spielen kann, dauerte es doch bis 1994 (Valera et al. 1994; Brake et al. 1994), bis die ersten beiden P2X-Isoformen P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>2</sub> aus dem Samenleiter bzw. aus Pheochromocytomzellen (PC12-Zellen) der Ratte kloniert werden konnten. Als Pheochromocytome werden Tumoren des Nebennierenmarks bezeichnet. Aus Hydropathiedarstellungen konnte man die – mittlerweile allgemein akzeptierte – Sekundärstruktur ableiten: N- und C-Termini sind intrazellulär positioniert, die zwei transmembranen Domänen sind durch eine große extrazellulär liegende Schleife verbunden (s.  Abb. 8.6).





**■ Tabelle 8.1** Vergleich der bekannten P2X-Subtypen

	P2X <sub>1</sub>	P2X <sub>2</sub>	P2X <sub>3</sub>	P2X <sub>4</sub>	P2X <sub>5</sub>	P2X <sub>6</sub>	P2X <sub>7</sub>
$\alpha\beta$ -Methylen-ATP	+	–	+	–	–	–	–
Desensibilisierung	Schnell	Langsam	Schnell	Mittel	Langsam	–	Langsam

Elektrophysiologie die Methode der Wahl zur Aufklärung ihrer funktionellen Eigenschaften dar.

Bevor wir einige elektrophysiologischen Ergebnisse für den P2X<sub>1</sub>- und P2X<sub>2</sub>-Rezeptor vorstellen, soll ein kurzer Überblick über die grundlegenden Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptorisoformen gegeben werden. Obwohl ATP an allen Isoformen als Agonist wirkt, ist  $\alpha\beta$ -Methylen-ATP, ein ATP-Derivat, nur am P2X<sub>1</sub>- und P2X<sub>3</sub>-Rezeptor als Agonist wirksam. Ein weiteres Charakteristikum der P2X-Rezeptoren ist die Desensibilisierung, ein Phänomen, das eine Verminderung des Kanalstroms in Anwesenheit des Agonisten bewirkt. Desensibilisierung kann für alle P2X-Subtypen gezeigt werden, jedoch ist die Stärke der Desensibilisierung für die einzelnen Subtypen sehr unterschiedlich ausgeprägt (s. **■ Tab. 8.1**).

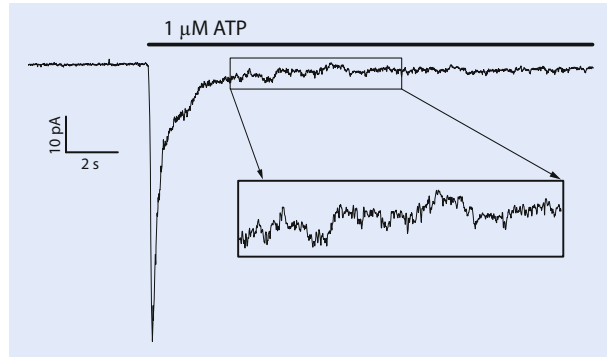
Schnelle Desensibilisierung, die innerhalb einer Sekunde zum vollständigen Verschwinden des Stromes führt, wurde für den P2X<sub>1</sub>- und P2X<sub>3</sub>-Rezeptor gezeigt. P2X<sub>4</sub>-Rezeptoren desensibilisieren langsamer und unvollständig. Die Desensibilisierung der anderen Subtypen ist sehr langsam und schwach ausgeprägt, sodass oft von nicht-desensibilisierenden Rezeptoren gesprochen wird. Eine besondere Eigenschaft der P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren ist die Ausformung einer großen Pore mit einem Durchmesser von 3–5 nm infolge einer verlängerten Anwesenheit von ATP. Ein ähnliches Verhalten, d. h. zumindest eine veränderte Ionenselektivität infolge längerer Agonistengabe, wird auch für die anderen Subtypen diskutiert.

### 8.2.3 Experimentelle Ergebnisse

Im Folgenden werden einige experimentelle Ergebnisse gezeigt werden, die sich mit den funktionellen Eigenschaften von P2X<sub>1</sub>- und P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren beschäftigen. Obwohl die Analyse von Einzelkanalaktivitäten den tiefsten Einblick in die funktionellen Eigenschaften eines Ionenkanals liefern kann, gestaltet es sich manchmal schwierig, auswertbare Einzelkanalregistrierungen zu realisieren. Wichtig in diesem Zusammenhang sind die Eigenschaften Einzelkanalleitfähigkeit, kinetisches Verhalten und Kanaldichte. Obwohl bereits für alle P2X-Subtypen Einzelkanalereignisse gemessen werden konnten, wurden quantitative Analysen bislang hauptsächlich anhand der Messung makroskopischer Ströme vorgenommen. Gründe dafür liegen in der schnellen Desensibilisierung von P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> oder der schnellen Kinetik (*flickering*) der P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren (Ding und Sachs 1999).

**■ Abb. 8.7** zeigt die Originalregistrierung eines durch P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelten Stroms in einem *outside-out*-Patch einer *Xenopus*-Oozyte. Nur am Ende der Registrierung zeigen sich Stromfluktuationen, die dem Öffnen und Schließen einzelner Kanäle zugeordnet werden können.

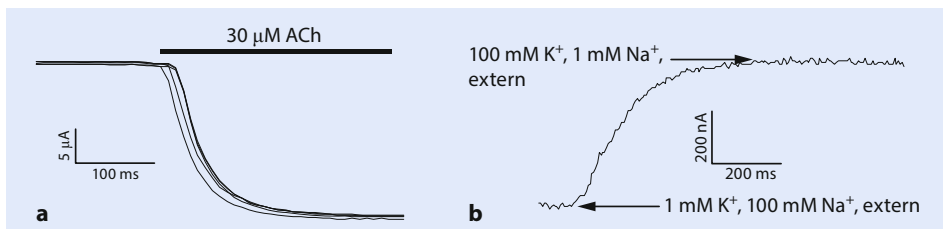
■ **Abb. 8.7** Originalregistrierung eines von  $P2X_1$ -Rezeptoren vermittelten Einwärtsstroms in einem *outside-out*-Oozytenmembran-Patch. Das Haltepotenzial betrug  $-60$  mV



Die Daten, die im Folgenden präsentiert werden, wurden alle mithilfe der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode (► Abschn. 3.5.1 Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp) an *Xenopus*-Oozyten gewonnen (► Abschn. 7.1.2). Daher repräsentieren die gezeigten Stromspuren die simultane Aktivität vieler (Millionen) einzelner Kanäle, die sich zu Stromstärken im  $\mu$ A-Bereich aufaddieren. *Xenopus*-Oozyten besitzen keine endogenen Nukleotidrezeptoren und stellen somit ein ideales Werkzeug zur Messung von exogenen Nukleotidrezeptoren nach Injektion der entsprechenden cRNA dar.

Da die  $P2X_1$ - und  $P2X_3$ -Rezeptoren innerhalb etwa einer Sekunde bereits vollständig desensibilisiert sind, ist ein schneller Lösungswechsel Grundvoraussetzung für reproduzierbare und aussagekräftige Messungen.

Aufgrund der Größe der Oozyten (Durchmesser etwa 1,2 mm) ist es nicht einfach, einen schnellen und reproduzierbaren Lösungswechsel zu verwirklichen. Trotzdem können Lösungswechsel, die in weniger als 0,5 s abgeschlossen sind (Stromanstieg von 5 bis 95 % in einer Zeit von ca. 150 ms), realisiert werden, wenn man eine sehr kleine Messkammer ( $V = 10 \mu$ l) in Verbindung mit einem hohen Lösungsdurchfluss (200  $\mu$ l/s) verwendet. Die Geschwindigkeit des Lösungswechsels kann z. B. durch die Aktivierung von exprimierten nikotinischen Azetylcholinrezeptoren quantifiziert werden, wenn man eine submaximale AzetylcholinKonzentration von 30  $\mu$ M benutzt (■ Abb. 8.8a). Eine alternative Möglichkeit besteht darin, die Stromänderung zu verfolgen, die durch die Änderung der extrazellulären Natriumkonzentration hervorgerufen wird (■ Abb. 8.8b).



■ **Abb. 8.8** Messung des Zeitverlaufs des Lösungswechsels anhand der Messung nAChR-vermittelter Ströme (a) und anhand der Messung der endogenen  $Na^+$ -Leitfähigkeit nach Änderung der extrazellulären  $Na^+$ -Konzentration (b)

Die gute Reproduzierbarkeit eines solchen optimierten Lösungswechselsystems wird in **Abb. 8.8a** offenbar, die die Stromspuren in Reaktion auf sieben aufeinander folgenden Azetylcholingaben zeigt. Die Aktivierung erfolgte dabei in einminütigen Abständen.

Obwohl die Zeitdauer des Lösungswechsels in Anbetracht der Größe der Oozyte kurz und kaum weiter zu optimieren ist, sollte man sich bewusst machen, dass die Ströme während der ersten ca. 300 ms durch den Lösungswechsel selbst geformt werden. Falls Ströme analysiert werden sollen, die im Zeitbereich zwischen 0 und 300 ms liegen, muss zu einem System gewechselt werden, das schnellere Lösungswechsel erlaubt. Dies stellt z. B. die Messung an einem zellfreien Membran-Patch dar (**► Abschn. 3.6.1** und **► Abschn. 3.6.2**), was einen Lösungswechsel bis in den Submillisekundenbereich ermöglicht.

## P2X<sub>1</sub>-Rezeptor

Wie schon angesprochen wurde, ist der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor ein schnell desensibilisierender Ionenkanal, der nach Bindung von ATP eine Pore öffnet, die für kleine Kationen permeabel ist. **Abb. 8.9** zeigt den Strom nach Aktivierung durch 1  $\mu\text{M}$  ATP nach der Erstgabe von ATP (linker Peak) und infolge wiederholter ATP-Applikationen in fünfminütigen Intervallen bei einem Haltepotenzial von  $-60$  mV.

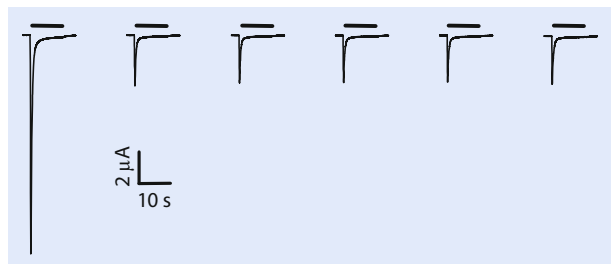
Wie in **Abb. 8.9** zu sehen ist, desensibilisieren die Rezeptoren vollständig nach Gabe von ATP. Nach jeweils 5 min in ATP-freier Lösung lässt sich ein Strom aktivieren, der etwa 25 % der Primärantwort nach erster ATP-Gabe beträgt. Die Desensibilisierung ist also nicht nur schnell und vollständig, sondern auch langanhaltend. Tatsächlich sind mehr als 30 min in ATP-freier Lösung notwendig, um die ursprüngliche Maximalantwort wiederherzustellen.

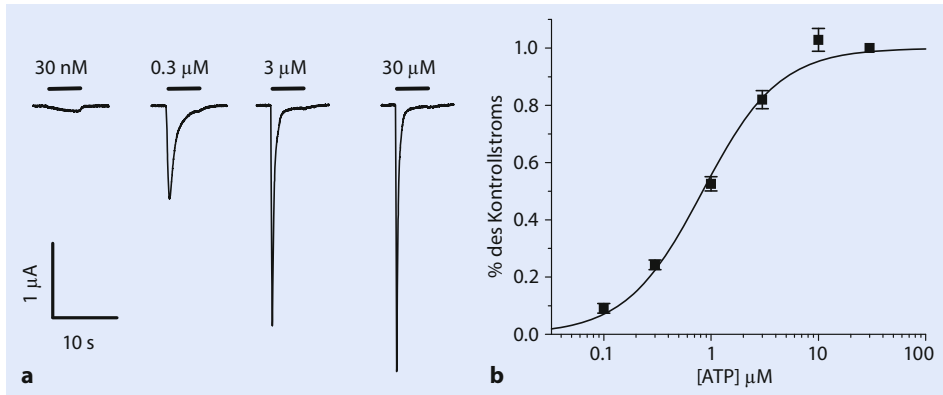
Die Größe des P2X<sub>1</sub>-Rezeptorstroms ist abhängig von der ATP-Konzentration, wobei eine halbmaximale Aktivierung mit ca. 1  $\mu\text{M}$  ATP ausgelöst werden kann. Die Agonistenkonzentration, die halbmaximale Aktivierung erzeugt, wird oft als EC<sub>50</sub>-Wert bezeichnet. **Abb. 8.10** zeigt ein typisches Experiment zur Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Werts durch die Aktivierung mittels ATP-Konzentrationen zwischen 0,03 und 30  $\mu\text{M}$ . Rechts ist die daraus gewonnene Dosiswirkungskurve des P2X<sub>1</sub>-Rezeptors für ATP gezeigt.

Da der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor nach Wechsel zu ATP-haltiger Lösung sehr schnell aktiviert, ist es interessant, die Stromsignale aus TEVC und Patch-Clamp-Messungen miteinander zu vergleichen. **Abb. 8.11** zeigt eine Stromregistrierung an einer intakten Zelle (TEVC, **Abb. 8.11a**) und von einem *outside-out*-Patch (**Abb. 8.11b**). In beiden Messungen wurden die Kanäle mit 1  $\mu\text{M}$  ATP aktiviert.

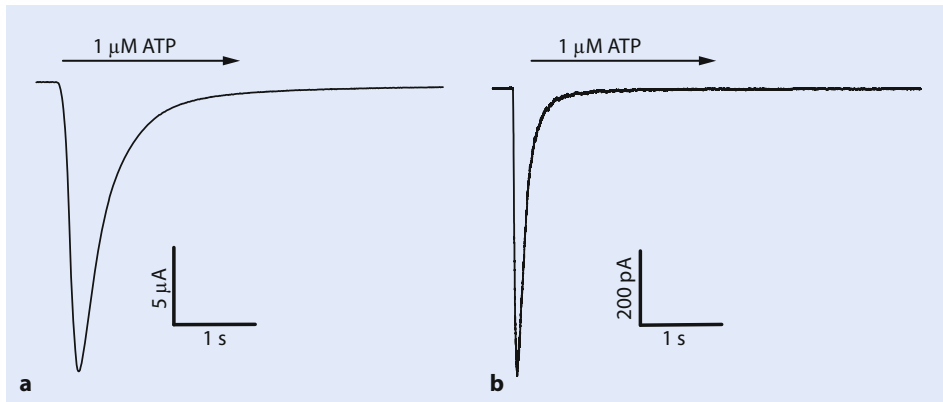
Der Vergleich zeigt, dass sowohl Anstieg als auch Abfall des Stroms im Patch-Experiment deutlich schneller erfolgen. Dieser Umstand lässt sich einfach durch den wesentlich schnelleren Lösungswechsel im Patch-Experiment erklären (ca. 2 ms im Vergleich zu

**Abb. 8.9** P2X<sub>1</sub>-Rezeptorstrome, aktiviert durch 1  $\mu\text{M}$  ATP in fünfminütigen Intervallen bei 60 mV





■ **Abb. 8.10** P2X<sub>1</sub>-Rezeptorströme bei verschiedenen ATP-Konzentrationen (a) und die entsprechende ATP-Dosis-Wirkungskurve (b; EC<sub>50</sub> = 0,6 μM) (s. ■ Abb. 8.13)



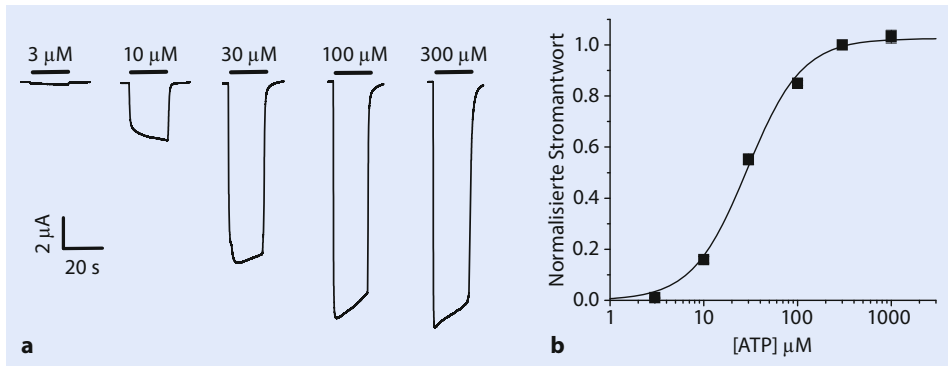
■ **Abb. 8.11** Vergleich von P2X<sub>1</sub>-Rezeptorströmen im TEVC-Experiment (a) und im *outside-out*-Makropatch (b) bei einem Haltepotenzial von -60 mV und nach Gabe von 1 μM ATP

ca. 150 ms). Trotzdem ist die Zwei-Elektroden-Methode auch zur Messung relativ schneller Rezeptorströme weitverbreitet, wobei man quantitative, kinetische Aussagen im Hinblick auf den mäßig schnellen Lösungswechsel oftmals infrage stellen müsste.

## P2X<sub>2</sub>-Rezeptor

Als Beispiel für einen nicht-desensibilisierenden Vertreter der P2X-Familie möchten wir hier den P2X<sub>2</sub>-Rezeptor vorstellen, der wie alle P2X-Rezeptoren eine intrinsische Pore öffnet, wenn ein geeigneter Agonist an ihn bindet. ■ Abb. 8.12a zeigt P2X<sub>2</sub>-Rezeptorströme bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und die entsprechende Dosiswirkungskurve (■ Abb. 8.12b) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von ungefähr 30 μM.

Nachdem wir in den letzten Abschnitten Kinetik und ATP-Abhängigkeiten ausgewählter P2X-Rezeptoren vorgestellt haben, schließen wir diesen Abschnitt mit einem weiteren Beispiel für das Zusammenwirken von Molekularbiologie und Elektrophysiologie ab. Die Kombination beider Methoden ermöglicht die Beantwortung von Fragen, die die funktionellen Konsequenzen struktureller Veränderungen des Kanalproteins betreffen.



**Abb. 8.12** P2X<sub>2</sub>-Rezeptorströme bei verschiedenen ATP-Konzentrationen (a) und die entsprechende ATP-Dosis-Wirkungskurve (b; EC<sub>50</sub> = 29 μM, Haltepotenzial = -60 mV)

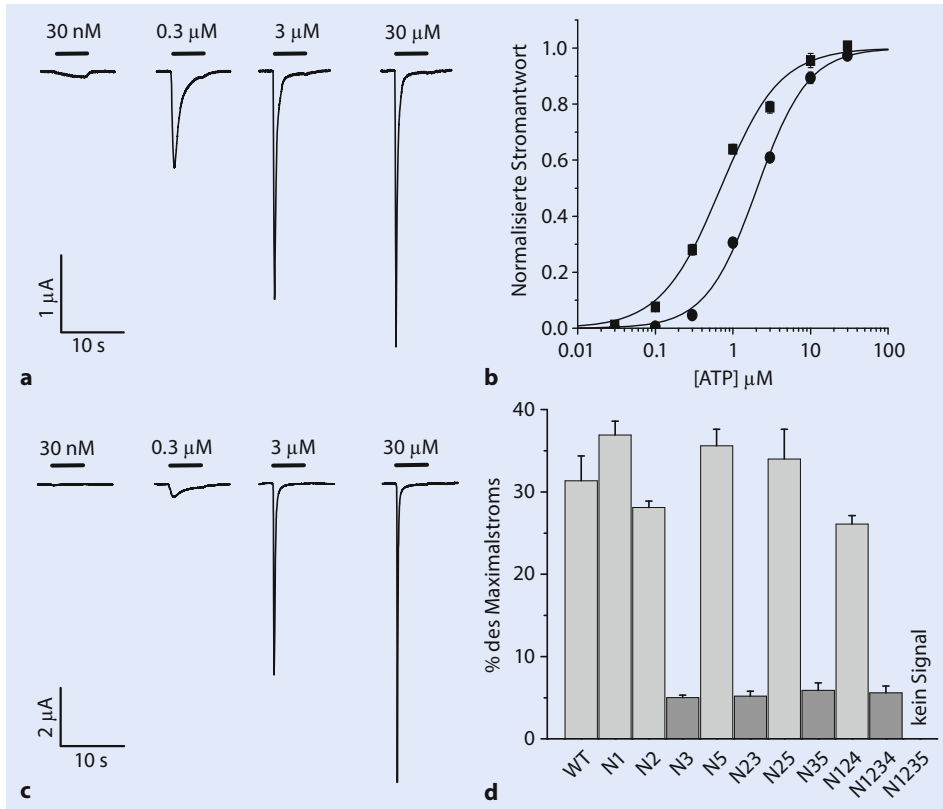
Aus der Aminosäuresequenz des P2X<sub>1</sub>-Rezeptors lässt sich die Existenz von fünf Konsensussequenzen für eine mögliche Glykosylierung ableiten, die alle auf der extrazellulär liegenden Schleife der Rezeptoruntereinheit lokalisiert sind (N1–N5, s. [Abb. 8.6](#)). Eine biochemische Analyse der in Oozyten exprimierten Rezeptoren konnte nachweisen, dass vier der fünf möglichen Glykosylierungsstellen tatsächlich glykosyliert werden. Eine Fragestellung, die mit biochemischen Methoden nicht beantwortet werden kann, ist die nach dem Einfluss des Glykosylierungszustands auf die funktionellen Eigenschaften der Rezeptoren wie z. B. ATP-Empfindlichkeit, kinetische Eigenschaften usw. Daher wurden die in ihren Glykosylierungsstellen mutierten Rezeptoruntereinheiten in *Xenopus*-Oozyten exprimiert und bezüglich ihrer ATP-Empfindlichkeit elektrophysiologisch charakterisiert.

Die elektrophysiologischen Messungen konnten zeigen, dass ein Unterbinden der Glykosylierung an der Stelle N3 zu einer etwa dreifach verminderten Empfindlichkeit für ATP führt. Alle übrigen Glykosylierungsstellen scheinen hingegen keinen Einfluss auf die ATP-Empfindlichkeit zu haben. [Abb. 8.13](#) gibt eine grafische Repräsentation dieser Ergebnisse.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Kombination aus Molekularbiologie, Biochemie und Elektrophysiologie, dass eine zunehmende Anzahl fehlender Glykosylierungsstellen zu einer Abnahme funktionell detektierbarer Rezeptoren führt (reflektiert durch abnehmende Ströme und die abnehmende Intensität der Banden auf dem SDS-Gel). Ein funktioneller Unterschied wurde jeweils nur für die Konstrukte gefunden, bei denen die dritte Glykosylierungsstelle fehlte. Diese Konstrukte zeigten den Effekt einer verminderten ATP-Sensitivität mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 2 μM im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 0,6 μM.

### 8.3 Virale Ionenkanäle

In diesem Abschnitt wollen wir aufzeigen, wie die Elektrophysiologie mit Virologie und Pharmakologie kombiniert werden kann, um Medikamente gegen virale Infektionen zu entwickeln. Als Beispiel dafür verwenden wir virale Ionenkanäle als einen möglichen Angriffsort für antivirale Medikamente. Eine interessante, vielversprechende Quelle für neue Medikamente sind Komponenten aus Kräutern der traditionellen chinesischen Medizin.



**Abb. 8.13** P2X<sub>1</sub>-Rezeptorströme des Wildtyp-Rezeptors (**a**) und des an der Glykosylierungsstelle N3 mutierten Rezeptors (**c**), jeweils durch verschiedene ATP-Konzentrationen aktiviert. In **b** sind die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven gezeigt. Das Balkendiagramm in **d** zeigt einen Vergleich der durch 0,3 μM ATP aktivierten Ströme relativ zum Maximalstrom, der mit 30 μM aktiviert werden kann. Die Abbildung demonstriert, dass alle an der Stelle N3 mutierten Rezeptoren eine verminderte ATP-Empfindlichkeit aufweisen. (Nach Rettinger et al. 2000a, Fig. 4, Copyright (2000) der American Society for Biochemistry and Molecular Biology)

Für die Entdeckung des Artemisinins aus *Artemisia annua* als ein Antimalariamedikament wurde die chinesische Wissenschaftlerin Youyou Tu (s. Tu 2011) 2015 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. In ▶ Abschn. 8.3.1 werden wir uns mit Substanzen beschäftigen, die ebenfalls aus chinesischen Kräutern extrahiert wurden.

Die Genome einer Reihe von Viren kodieren für Proteine, die in der infizierten Zelle ionenselektive Kanäle bilden können. Solche Ionenkanäle spielen eine zentrale Rolle im Lebenszyklus der Viren und stellen somit einen exponierten Angriffsort für neue antivirale Medikamente dar.

Tab. 8.2 zeigt einige Beispiele für solche Kanäle (s. auch Wang et al. 2011; Krüger und Fischer 2009; Fischer und Sansom 2002). Multi-Homomere der Proteinuntereinheiten bilden die Kanäle.

Der Lebenszyklus eines Virus beinhaltet eine Sequenz von Schritten, wobei jeder einzelne dieser Schritte Angriffsort einer antiviralen Substanz sein kann. Abb. 8.14 illustriert verschiedene Abschnitte aus dem Lebenszyklus der Coronaviren. Nachdem das Vi-

**■ Tabelle 8.2** Beispiele für Viren und deren virale Ionenkanäle, die durch Multihomomere gebildet werden. Jede Untereinheit beinhaltet ein bis drei transmembrane Segmente (TMS). In Fettdruck hervorgehobene Proteine werden detaillierter behandelt

Virenfamilie	Virus	Ionenkanal	Charakteristische Eigenschaften	Funktionelle Einheit
Coronaviridae	<b>SARS-CoV</b>	<b>3a</b>	≈ 20 pS monovalente Kationen	Tetramer (3 TMS)
Orthomyxoviridae	<b>Influenza A</b> (Schweine-Grippe)	<b>M2</b>	< fS Protonen	Tetramer (1 TMS)
	Influenza B	BM2	< fS Protonen	Tetramer (1 TMS)
Picornaviridae	Poliovirus	2B	Nicht-selektiv	Tetramer (2 TMS)
Retroviridae	<b>HIV-1</b>	<b>Vpu</b>	≈ 20 pS monovalente Kationen	Pentamer (1 TMS)
Flaviviridae	HCV (Hepatitis C)	p7	20–100 pS monovalente Kationen	Hexamer (2 TMS)

rus an die Wirtszelle gebunden ist, wird es von der Zelle inkorporiert. Es folgen das *uncoating* des viralen Genoms und die Replikationsprozesse mit Transkription und Translation; dabei wird unter anderem das virale 3a-Protein gebildet, das als Tetramer in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle einen viralen Ionenkanal bildet. Im letzten Schritt werden die neugebildeten Viren exozytotisch freigesetzt. Im Falle der Coronaviren ist für die Freisetzung die Aktivität des 3a-Kanals notwendig. Blockierung einer dieser Schritte könnte ein möglicher, erfolgversprechender Angriffsort für antivirale Substanzen sein.

Im Folgenden wollen wir zeigen, wie die Inhibierung der Funktion von solchen Ionenkanälen mit dem viralen Lebenszyklus interferiert. In **■ Tab. 8.2** sind die Kanäle, die wir hier behandeln wollen, in Fettdruck hervorgehoben.

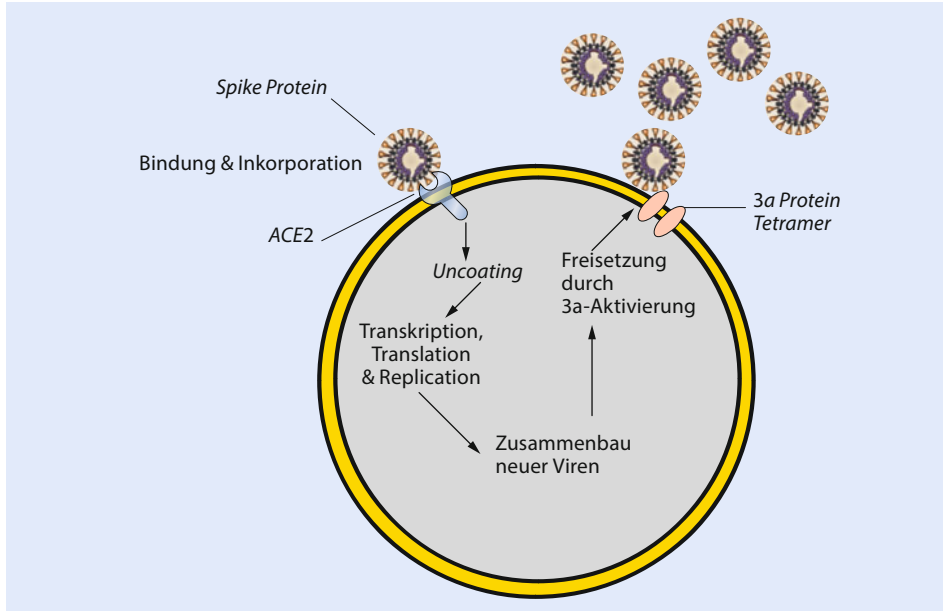
### 8.3.1 3a-Protein von Coronaviren

Für das 3a-Protein von SARS-Coronaviren (s. **■ Abb. 8.14**, **■ Abb. 8.15b**) konnte gezeigt werden (Lu et al. 2006), dass Tetramere den Ionenkanal bilden, der in die Membran der infizierten Zelle eingebaut wird (**■ Abb. 8.15a**).

Mithilfe der Patch-Clamp-Technik konnten Einzelkanalleitfähigkeiten von 20–30 pS bestimmt werden (**■ Abb. 8.16**). Die Kanäle sind selektiv für monovalente Kationen permeabel mit der höchsten Selektivität für  $K^+$ . Wenn die 3a-Kanäle aktiv sind, wird das Membranpotenzial der infizierten Zelle depolarisiert, was zu einer Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen führt. Der damit verbundene Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Aktivität begünstigt die exozytotische Freisetzung der neugebildeten Viren aus der Wirtszelle (Lu et al. 2006).

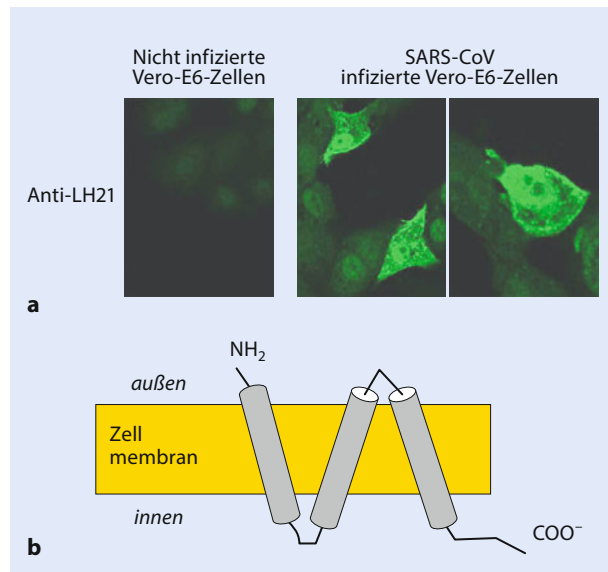
Die Voltage-Clamp-Technik ist eine einfache Methode, um die Aktivität viraler Ionenkanäle zu detektieren und deren Funktion zu analysieren. Wir können wieder die *Xenopus*-

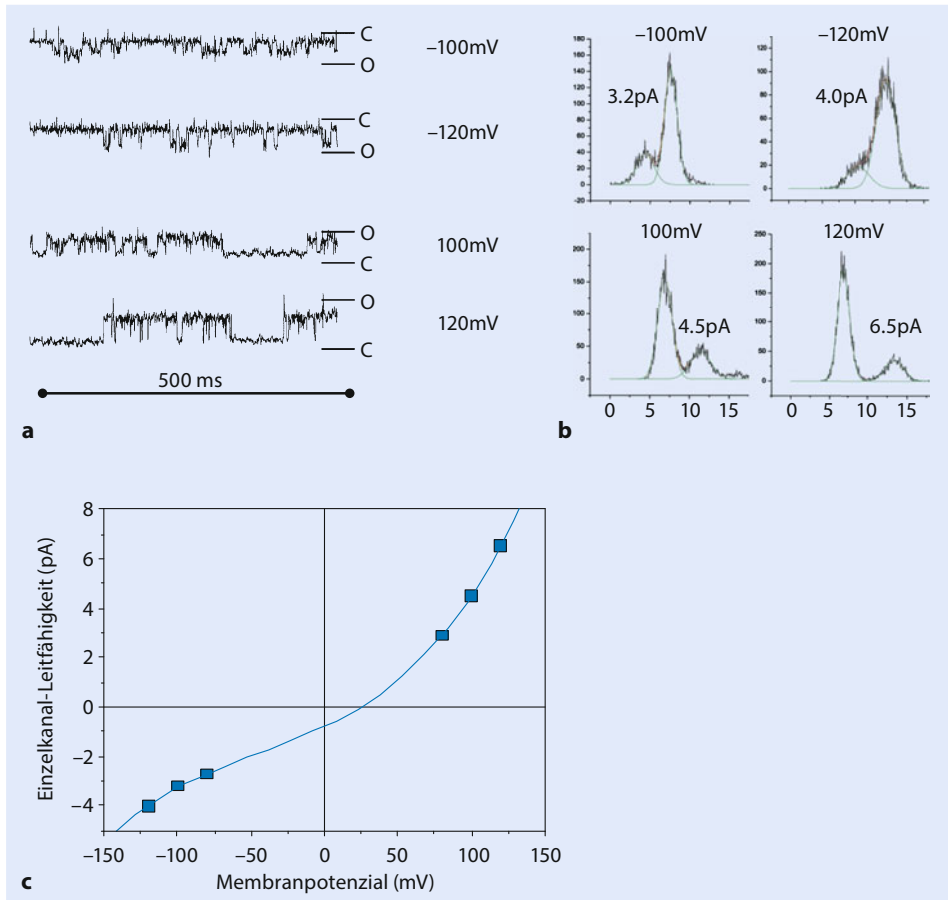




■ **Abb. 8.14** Lebenszyklus des Coronavirus SARS CoV. Der Bindung des viralen Spike-Proteins an den Angiotensine-Converting-Enzyme-2 (ACE2)-Rezeptor der Wirtszelle folgt die Aufnahme des Virus, das *uncoating* und die Transkription sowie Translation des viralen Genoms. Nach dem Zusammenbau der neuen Viren können sie durch Aktivierung der viralen 3a-Kanäle von der Wirtszelle exozytotisch abgegeben werden. (Nach Schwarz et al. 2012, Fig. 1, Copyright (2012) von Begel House)

■ **Abb. 8.15** **a** Fluoreszenzmarkierte (anti-LH21) 3a-Proteine werden an der Oberfläche von SARS-CoV infizierten Vero-E6 Zellen sichtbar. **b** Orientierung des 3a-Monomers in der Zellmembran. (Nach Lu et al. 2006, Copyright National Academy of Sciences, USA)





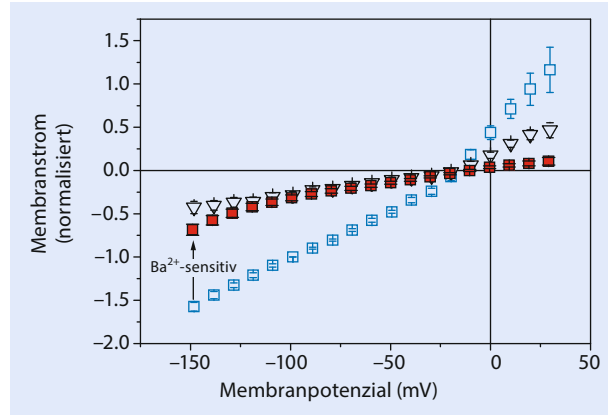
**Abb. 8.16** **a** Einzelkanalereignisse des 3a-Proteins nach Expression in *Xenopus*-Oozyten, **b** Histogramme der Stromamplituden (pA-Werte in den vier Unterabbildungen geben die jeweiligen mittleren Einzelkanalströme an), **c** Spannungsabhängigkeit der Einzelkanalströme. (Nach Schwarz et al. 2012, Fig. 3, Copyright 2012 von Begel House)

Oozyte als Modell- und Expressionssystem verwenden (s. ► Abschn. 7.1.2), um mögliche antivirale Substanzen in Bezug auf ihre Wechselwirkung mit dem 3a-Protein zu testen. Voraussetzung dafür ist ein Verfahren, mit dem die Komponente des 3a-vermittelten Stroms aus dem Gesamtstrom extrahiert werden kann. Diese Vorgehensweise ist essenziell für die Analyse bestimmter Stromkomponenten. Wir haben auf dieses Vorgehen bereits ausführlich im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Hodgkin und Huxley (1952) hingewiesen (► Abschn. 6.1). In unserem Fall führt die Injektion von cRNA in die Oozyten zu einer Zunahme des Membranstroms, die durch 10 mM  $\text{Ba}^{2+}$  im extrazellulären Medium blockiert werden kann (► Abb. 8.17).

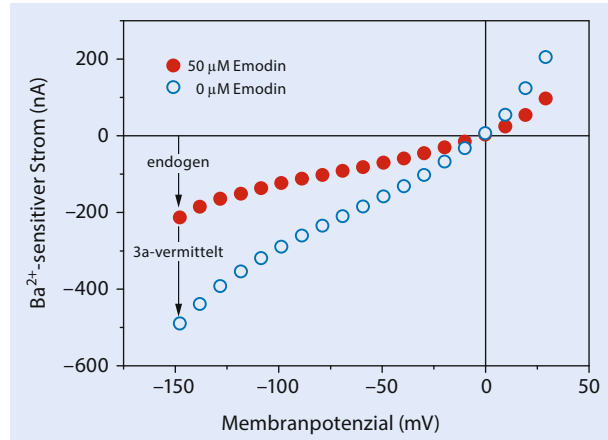
### Inhibition von 3a-vermitteltem Strom durch das Anthraquinon Emodin

Während der SARS-Epidemie im Jahr 2003 wurden zur Behandlung der Infektion neben dem Einsatz westlicher Medizin auch Extrakte chinesischer Heilkräuter verwendet.

■ **Abb. 8.17** *Offene Dreiecke* geben die Strom-Spannungsabhängigkeit in Oozyten wieder, in denen keine 3a-Proteine exprimiert sind. Die *offenen und gefüllten Quadrate* zeigen die Strom-Spannungsabhängigkeiten in Oozyten mit exprimierten 3a-Proteinen in Ab- bzw. Anwesenheit von 10 mM  $Ba^{2+}$ . (Nach Lu et al. 2006, Copyright 2006 der National Academy of Sciences, USA)



■ **Abb. 8.18** Spannungsabhängigkeit des  $Ba^{2+}$ -sensitiven Stroms in Oozyten mit exprimiertem 3a-Protein in Ab- (*offene Kreise*) und Anwesenheit (*gefüllte Kreise*) von 50  $\mu$ M Emodin, die den 3a-vermittelten Strom vollständig blockieren, aber den endogenen Anteil unbeeinflusst lassen. (Basierend auf Schwarz et al. 2011, Fig. 1 und 2, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier AG, 2011)



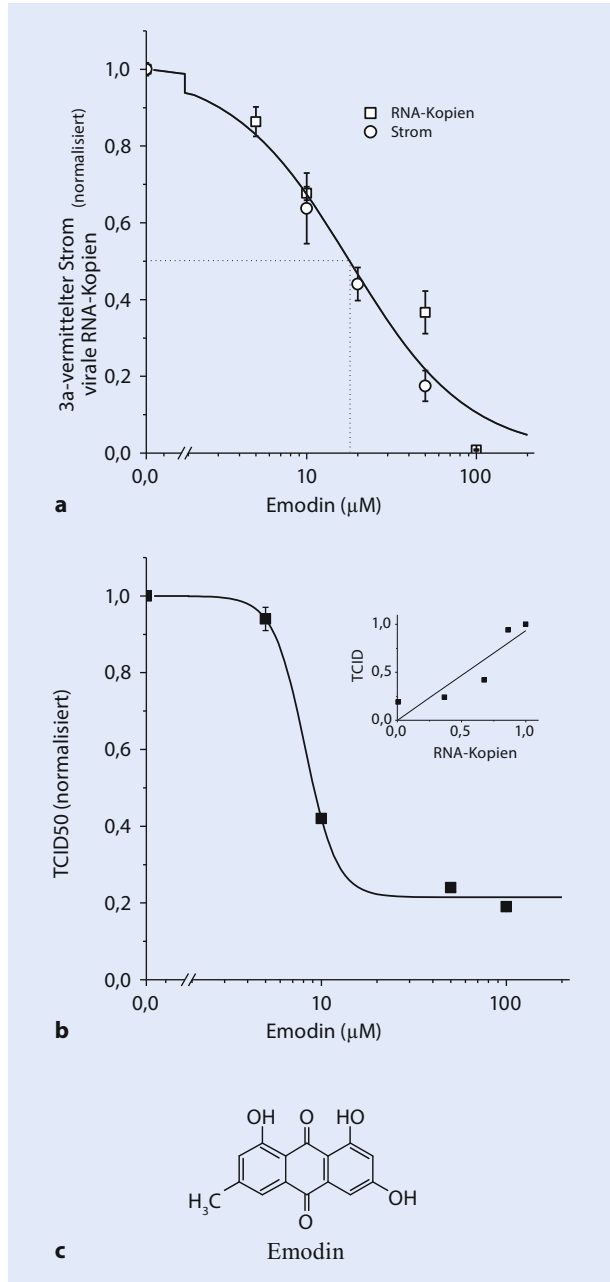
Dazu gehörten auch Extrakte von *Rhei radix* (Rhabarber), und als eine effektive Komponente wurde das Anthraquinon Emodin (1,3,8-Trihydroxy-6-methylantracen-9,10-dion, ■ Abb. 8.19c) identifiziert (Ho et al. 2007), das auch den  $Ba^{2+}$ -sensitiven Strom durch die 3a-Kanäle, aber nicht die endogene Stromkomponente blockiert (■ Abb. 8.18).

Emodin blockiert nicht nur den 3a-vermittelten Strom, sondern mit dem gleichen  $IC_{50}$ -Wert von 20  $\mu$ M auch die Zahl viraler RNA-Kopien im extrazellulären Medium von infizierten Zellen (■ Abb. 8.19a). Die Zahl der RNA-Kopien lässt sich mit dem Titer korrelieren (■ Abb. 8.19b), was darauf hinweist, dass die RNA aus intakten Viren stammt. Damit ist nachgewiesen, dass Emodin als antivirales Medikament wirken kann und sich als Basis für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Coronavireninfektionen anbietet.

### Inhibition von 3a-vermitteltem Strom durch das Kaempferolglycosid Juglanin

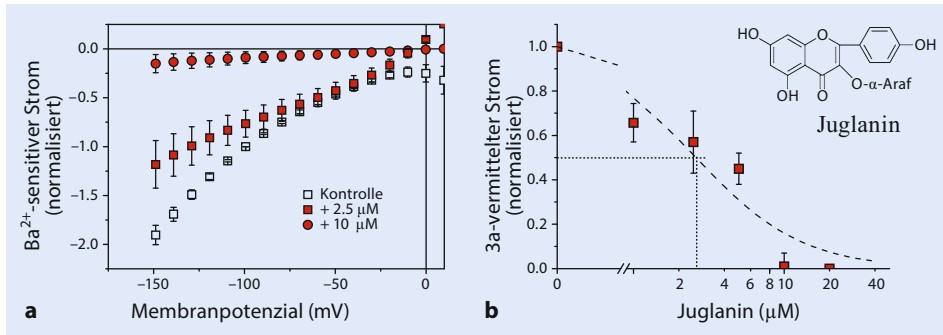
Weitere effektive pflanzliche Mittel findet man unter den Flavonoiden, insbesondere unter den Kaempferolglycosiden. Das Kaempferolglycosid Juglanin inhibiert den 3a-vermittelten Strom (■ Abb. 8.20a); es ist sogar um eine Größenordnung effektiver ( $IC_{50} \approx 2 \mu$ M) als das Emodin (s. ■ Abb. 8.19a und ■ Abb. 8.20b).

**Abb. 8.19** **a** Inhibition des 3a-vermittelten Stroms (bei 60 mV) und der extrazellulären Anzahl viraler cRNA-Kopien, sowie **b** der Titerkonzentration durch Emodin (**c**). Nebenbild in **b**: Korrelation der Titerkonzentration mit der Anzahl von cRNA-Kopien. (Basierend auf Schwarz et al. 2011, Fig. 4, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier AG 2011)

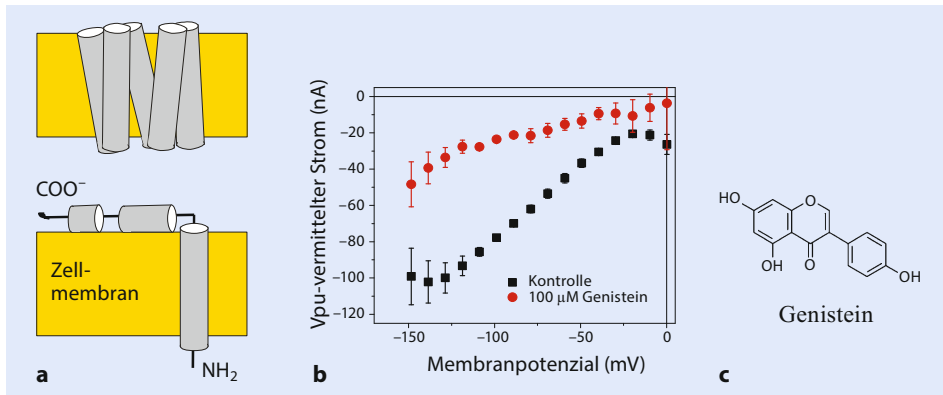


### 8.3.2 Virale Proteineinheit (Vpu) von HIV-1

Die virale Proteineinheit Vpu (Viral protein unit) des HIV-1-Virus ist ebenfalls ein Membranprotein, besitzt aber nur ein transmembranes Segment, und der Ionenkanal wird durch ein Pentamer gebildet (Abb. 8.21a).



**Abb. 8.20** **a** Spannungsabhängigkeit des 3a-vermittelten Stroms in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen des Kaempferolglycosids Juglanin (s. **b**), **b** Abhängigkeit des 3a-vermittelten Stroms bei  $-60$  mV von der Juglaninkonzentration. (Basierend auf Schwarz et al. 2014, Fig. 3, mit freundlicher Genehmigung von Thieme, 2014)

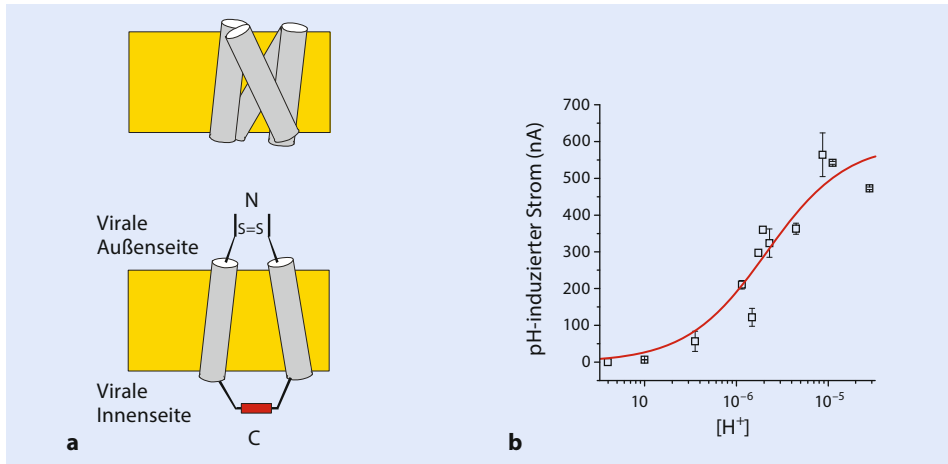


**Abb. 8.21** **a** Orientierung des Vpu-Proteins des HIV-1-Virus. Der untere Teil zeigt das Monomer in der Membran, der obere Teil die Kanalbildung durch Bildung eines Pentamers, **b** Inhibition des Vpu-vermittelten Stroms durch 100  $\mu M$  des Flavonoids Genistein **c**. (Basierend auf Sauter et al. 2014, Fig. 7, mit freundlicher Genehmigung von Thieme, 2014)

Auch hier ist eine Aktivierung des Kanals für die Virenfreisetzung notwendig (Schubert et al. 1996). Bei der Suche nach Inhibitoren dieses Vpu-Kanals wurde als antivirale Substanz unter anderem das Flavonoid Genistein vorgeschlagen. Der Vpu-vermittelte Strom konnte auch als  $Ba^{2+}$ -sensitiver Strom analysiert werden (Abb. 8.21b), der teilweise durch Genistein (Abb. 8.21c) blockiert werden kann.

### 8.3.3 Matrixprotein 2 (M2) des Influenza-A-Virus

Das Genom des Influenza-A-Virus (Schweinegrippe-Virus) kodiert ebenfalls für einen Ionenkanal. Wie das Vpu-Protein hat auch das Influenza-A-Matrixprotein M2 nur ein transmembranes Segment; der Kanal wird durch eine tetramere Struktur gebildet (Abb. 8.22a) und weist eine geringe Leitfähigkeit für Protonen auf. Mit fallendem pH-Wert nimmt



**Abb. 8.22** a Orientierung des M2-Proteins des Influenza-A-Virus: Der *untere Teil* zeigt zwei Monomere, die über ihre N- und C-Termini miteinander wechselwirken, der *untere Teil* die Kanalbildung durch ein Tetramer, b pH-Abhängigkeit des Stroms, der durch das M2-Protein in *Xenopus*-Oozyten vermittelt wird

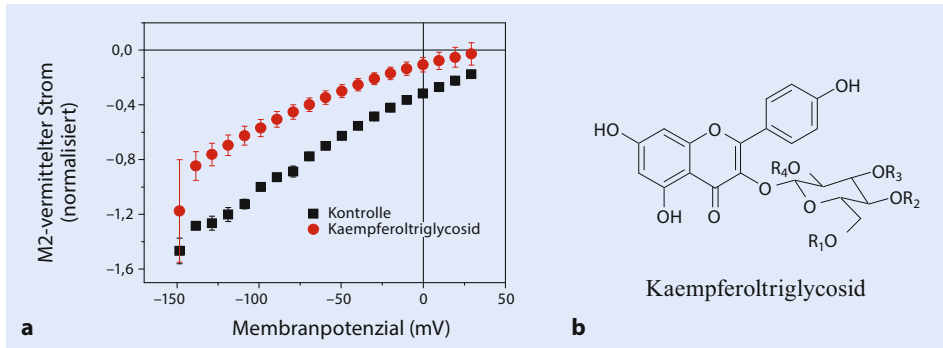
der M2-vermittelte Strom dramatisch zu (Abb. 8.22b). Die Aktivität dieses Kanals spielt ebenfalls eine essenzielle Rolle für die Virenreproduktion (s. de Clercq 2006).

Im Gegensatz zum 3a-Protein ist M2 ein integrales Protein des Virons. Es spielt eine Rolle beim *uncoating* (s. Abb. 8.14) der Viren, indem Protonen durch den M2-Kanal die Membran des Virons überqueren können. In der Vergangenheit war ein effektiver Inhibitor der M2-Funktion das Amantidin, das als wirksames Medikament bei der Behandlung von Influenza-A-Infektionen Verwendung fand. Mittlerweile sind aber sämtliche Influenza-A-Viren Amantidin-resistent geworden, und weltweit wird intensiv nach Ersatzmedikamenten gesucht.

### Inhibition von M2-vermitteltem Strom durch Kaempferoltriglycoside

Es stellt sich die Frage, ob Kaempferolglycoside auch die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Influenza-A sein können. Voltage-Clamp-Untersuchungen am M2-Kanal in *Xenopus*-Oozyten ergaben, dass ein Triglycosid effektiv den pH-sensitiven Strom inhibieren kann (Abb. 8.23).

Zusammenfassend können wir sagen, dass die Aktivität verschiedener viraler Ionenkanäle essenziell für die Virenreproduktion in den infizierten Zellen ist. Eine Inhibierung der Kanalaktivität durch chemische Substanzen wird dem Reproduktionsprozess entgegenwirken und gibt damit dem Körper mehr Zeit, sein eigenes Immunsystem aufzubauen und zu kräftigen. Die Virenkanäle sind somit mögliche Kandidaten als Angriffsort für die Entwicklung neuer Medikamente. Die Voltage-Clamp-Technik ist dabei eine einfache Methode, um chemische Substanzen in ihrer Wirkung zu testen und den Wirkungsmechanismus zu analysieren. Insbesondere die automatisierten Methoden (Kap. 4) können für das Testen einer größeren Zahl von Substanzen hilfreich sein. In diesem Abschnitt über virale Ionenkanäle haben wir an natürlich vorkommenden Substanzen gezeigt, dass Kaempferolderivate und Anthraquinone interessante Kandidaten sein können. Die Kombination von Elektrophysiologie, Molekularbiologie und Pharmakologie bildeten die Grundlage für diese Entwicklung.



**Abb. 8.23** Inhibition des M2-vermittelten Stroms (a) durch 20  $\mu\text{M}$  eines Kaempferoltriglycosids (b)

## 8.4 Übungsaufgaben

1. Welches sind die Hauptaufgaben der Na-Pumpe?
2. Welche Bedeutung haben die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit der Na-Pumpe?
3. Welche physiologische Bedeutung kommt dem P2X-Rezeptor zu?
4. Welche Rolle spielt ein Neurotransmittertransporter für physiologische und pathophysiologische Funktionen?
5. Welche Familien von Ionenkanälen kennen Sie?
6. Beschreiben Sie die Rolle, die virale Ionenkanäle bei der Virusreplikation spielen.
7. Inwiefern kann die Elektrophysiologie bei der Entwicklung antiviraler Medikamente helfen? Nennen Sie Beispiele.

## Literatur

- Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG (2014) Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem* 289:31673–31681
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371:519–523
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509–581
- Burnstock G (1999) Current status of purinergic signalling in the nervous system. *Prog Brain Res* 120:3–10
- De Clercq E (2006) Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* 5:1015–1025
- Christensen AP, Corey DP (2007) TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation. *Nat Rev Neurosci* 8:510–521
- Delmas P, Coste B (2013) Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell* 155:278–284
- Ding S, Sachs F (1999) Single channel properties of P2X<sub>2</sub> purinoceptors. *J Gen Physiol* 113:695–720
- Fischer WB, Sansom MSP (2002) Viral ion channels: structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1561:27–45
- Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*, 3. Aufl. Sinauer, Sunderland
- Ho TW, Wu SL, Chen JC, Li CC, Hsiang CY (2007) Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antivir Res* 74:92–101
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conductance and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500–544
- Krüger J, Fischer WB (2009) Assembly of viral membrane proteins. *J Chem Theory Comput* 5(2009):2503–2513

- Liu Y, Eckstein-Ludwig U, Fei J, Schwarz W (1998) Effect of mutation of glycosylation sites on the Na<sup>+</sup> dependence of steady-state and transient current generated by the neuronal GABA transporter. *Biochim Biophys Acta* 1415:246–254
- Lu W, Zheng BJ, Xu K, Schwarz W, Du LY, Wong CKL, Chen JD, Duan SM, Deubel V, Sun B (2006) Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *PNAS* 103:12540–12545
- Nicke A, Bäumer HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J* 17:3016–3028
- Nilius B, Honoré E (2012) Sensing pressure with ion channels. *Trends Neurosci* 35:477–486
- Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A (2015) Mechanically activated ion channels. *Neuron* 87:1162–1179
- Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A (2015) Mechanically activated ion channels. *Neuron* 87:1162–1179
- Rettinger J, Aschrafi A, Schmalzing G (2000aa) Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X<sub>1</sub> receptor. *J Biol Chem* 275:33542–33547
- Sauter D, Schwarz S, Wang K, Zhang RH, Sun B, Schwarz W (2014) Genistein as antiviral drug against HIV ion channel. *Planta Med* 80:682–687
- Schubert U, Ferrer-Montiel AV, Oblatt-Montal M, Henklein P, Strebel K, Montal M (1996) Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett* 398:12–18
- Schwarz W, Vasilets LA (1996) Structure-Function relationships of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumps expressed in *Xenopus* oocytes. *Cell Biol Internat* 20:67–72
- Schwarz S, Wang K, Yu W, Sun B, Schwarz W (2011) Emodin inhibits current through SARS-associated coronavirus 3a protein. *Antivir Res* 90:64–69
- Schwarz S, Sauter D, Lu W, Wang K, Sun B, Efferth T, Schwarz W (2012) Coronaviral ion channels as target for Chinese herbal medicine. *Forum Immunopathol Dis Ther* 3:1–13
- Schwarz S, Sauter D, Wang K, Zhang RH, Sun B, Karioti A, Bilia AR, Efferth T, Schwarz W (2014) Kaempferol derivatives as antiviral drugs against 3a channel protein of coronavirus. *Planta Med* 80:177–182
- Tu YY (2011) The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med* 17:1217–1220
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature* 371:516–519
- Vasilets LA, Schwarz W (1993) Structure-function relationships of cation binding in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1154:201–222
- Wang K, Xie S, Sun B (2011) Viral proteins function as ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1808:510–515
- Wu CH, Vasilets LA, Takeda K, Kawamura M, Schwarz W (2003) Functional role of the N-terminus of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit as an inactivation gate of palytoxin-induced pump channel. *Biochim Biophys Acta* 1609:55–62