

**Nachweis und Modellierung des Gatingmechanismus
beim anomalen TI^+/K^+ -Molfraktionseffekt im Vergleich zu
spontanen Stromänderungen in Na^+/K^+ -Lösung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Afshin Farokhi

Kiel, Juni 2002

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel von mir eingesetzt worden sind.

Desweiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder ganz noch zum Teil bei einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat.

Kiel, den 30.05.02

.....

Referent: Prof. U. P. Hansen.....
Korreferent: Prof. G. Pfister.....
Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.02.....
Zum Druck genehmigt: Kiel, den.....

.....

Der Dekan

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	1
2 Biologische Grundlagen	4
2.1 Aufbau der Pflanzenzelle und biologische Membran.....	4
2.2 Membran-Transport-Klassifizierung	6
2.3 Kanäle und Carrier.....	7
2.4 Aufbau eines Ionenkanals	8
2.5 <i>Chara corallina</i>	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Der K ⁺ -Kanal in <i>Chara Corallina</i>	13
3.1.1 Anzucht der Algen.....	14
3.2 Patch-Clamp-Technik	14
3.2.1 Patchkonfigurationen.....	16
3.3 Messaufbau	17
3.3.1 Elektronik des Aufbaus und Datenerfassung.....	19
3.3.2 Erdelektrode	20
3.4 Das Patchen.....	21
4 Mathematische Analysemethoden	23
4.1 Markov-Modelle	23
4.2 Bestimmung von Kanalzahl, Niveaus und Standardabweichung	24
4.3 Rekonstruktion der Zeitreihe mit dem Hinkley-Detektor.....	27
4.4 Dwell-Time-Analyse.....	30
4.5 Direkter-Zeitreihen-Fit.....	33
4.6 Simulation der Zeitreihe	35
4.7 Besetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen Zustände des Markov-Modells.	36

5 Rauschreduktion und Ziehen der Pipetten.....	37
5.1 Rauschquellen.....	37
5.1.1 Pipettenrauschen.....	37
5.1.1.1 Eintauchtiefe.....	38
5.1.1.2 Dielektrizitätskonstante.....	39
5.1.1.3 Wanddicke.....	39
5.2 Bearbeiten und Ziehen der Pipetten.....	39
5.2.1 Pipetten aus Borosilikatglas.....	40
5.2.2 Pipetten aus Quarz-Glas.....	41
6 Der anomale Molfraktionseffekt (AMFE)	44
6.1 Bisherige Messergebnisse	44
6.1.1 Ergebnisse von Hagiwara.....	45
6.1.2 Ergebnisse von Draber.....	45
6.1.3 Ergebnisse von Albertsen.....	47
6.1.4 Ergebnisse von Keunecke	48
6.1.5 Ergebnisse der Diplomarbeit.....	50
7 Modelle für die Beschreibung der Transportvorgänge in Membrankanälen.....	53
7.1 Multi-Ion-Single-File-Modell von Hille-Schwarz.....	53
7.2 Das enzymkinetische lazy-state-Modell.....	55
7.3 Wechselwirkungsmodell von Wu.....	56
7.4 Veränderung der Leitfähigkeit durch schnelles Schalten.....	58
8 Statistische Analyse der Strom-Spannungskurven beim AMFE	59
8.1 Versuchsdurchführung.....	59
8.2 Bestimmung der Lage des Minimums für die weitere Analyse.....	60
8.3 Strom-Spannungskurven bei K^+ -Lösung und im Minimum der AMFE.....	61
8.4 Theorien für oder gegen das Hille-Schwarz-Modell.....	62
8.5 Permeation oder Gating?.....	63
8.5.1 Darstellung der Messdaten.....	65
8.5.1.1 Zeitreihen.....	65
8.5.1.2 Amplitudenhistogramme.....	67
8.6 Überprüfen der Hypothese, ob der AMFE ein Gating-Effekt ist.....	69
8.6.1 Die Vorgehensweise.....	69

9 Untersuchung des Markov-Modells durch eine Mehr-Kanal-Dwell-Time-Analyse	72
9.1 Durchführung der Analyse.....	72
9.2 Berechnung der Ratenkonstanten.....	72
9.3 Erzeugung von Zeitreihen aus den berechneten Ratenkonstanten.....	75
9.4 Fehlerursachen der Dwell-Time-Analyse	76
9.5 Forderung nach besseren Verfahren	78
10 Berechnung der Ratenkonstanten durch einen direkten Fit	79
10.1 Analyse der Messdaten	79
10.2 Überwindung der Grenzen des Dwell-Time-Fits.....	79
10.3 Untersuchung unterschiedlicher 5-Zustandsmodelle	80
10.4 Markov-Prozess und dessen Gatingverhalten in K^+ -Lösung und in Mischlösung.....	82
10.5 Zuverlässigkeit des Direkten-Zeitreihen -Fits	84
10.6 Neuere Arbeiten im Widerspruch zu Permeationsmodellen.....	87
11 Gating-Modelle für den anomalen Molfraktionseffekt des Einzelkanalstroms	91
11.1 Liganden-Modell und "Foot-in-the-Door"-Modell	91
11.2 Liganden-Bindung: Allgemeine Eigenschaften der ersten drei Modelle.....	94
11.2.1 Modell 1: Direkter Einfluss der Ionenbindung auf das Gating:	
Ionenbindung und scheinbarer Einzelkanalstrom.....	96
11.2.1.1 Erzeugung des AMFE des scheinbaren Einzelkanalstroms	98
11.2.1.2 Abhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeit	99
11.2.1.3 Anpassung der AMFE-Kurve durch Leitfähigkeitszustände.....	100
11.2.1.4 Zeitliches Verhalten.....	101
11.2.1.5 Versuchsdurchführung bei 25 mM K^+ -Lösung.....	106
11.2.1.6 Ratenkonstanten bei 25 mM K^+ - und 250 mM Tl^+ -Lösung.....	107
11.2.2 Modell 2: Nichtlinearer Effekt der Ionenbindung auf das Gating	109
11.2.3 Modell 3: Modulation des Gatings durch Ionenbindung	112
11.2.3.1 Struktur des aggregierten Markov-Modells	112
11.2.3.2 Scheinbarer und reduzierter Einzelkanalstrom beim AMFE.....	113
11.2.3.3 Modulation der Ratenkonstanten des Markov-Modells durch Konformationsänderungen des Kanalproteins	115
11.3 Foot-in-the-door-Modelle	117
11.3.1 Modell 4: Direkte Wirkung auf die Besetzung	117
11.3.2 Modell 5: Modulationseffekt der Besetzung.....	117

12 Na⁺-Effekt auf den K⁺-Kanal	119
12.1 Messmethoden und Analyse.....	120
12.2 Strom-Spannungs-Charakteristiken des K ⁺ -Kanals in Na ⁺ -Lösung.....	120
12.2.1 Nachfiltern der gemessenen Zeitreihen.....	121
12.3 Bestimmung der Ratenkonstanten durch einen direkten Fit der Zeitreihen.	122
12.4 Wirkung der Na ⁺ -Konzentration auf den K ⁺ -Kanal und sein Kooperativitätsverhalten	123
12.4.1 Getrennte kinetische Untersuchung der Bereiche B _K und B _{Na}	125
12.5 Strukturuntersuchungen als Erklärung für den beobachteten Na ⁺ -Effekt....	129
12.5.1 Untersuchungen in Bezug auf den Na ⁺ -Effekt bei <i>Chara</i>	132
13 Diskussion	134
13.1 Verweildauer der Zustände	135
13.2 Alternative Modelle zur Erklärung des Gatingmechanismus beim AMFE .	136
13.3 Selektivitätsänderungen durch thermische Vibrationen.....	137
13.4 Gates im K ⁺ -Kanal und ihre Beeinflussung	137
13.5 Auswirkung der Ratenkonstanten der Ionenbindung auf die Ratenkonstanten des Modells	138
13.6 Wirkung der permeierenden Ionen auf das Gatingverhalten	139
13.7 Kooperative Änderung der Selektivität bei Anwesenheit von Na ⁺ -Lösung	140
14 Fazit und Ausblick	143
15 Zusammenfassung	146
Literaturverzeichnis	150
Danksagung	166

1. Einleitung

Diese Arbeit gehört in den Rahmen jener Arbeiten, deren Ziel es ist, mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen an einzelnen Ionenkanälen (Patch-Clamp-Technik) die Funktionsweise des Membrantransports und dessen Mechanismus bei verschiedenen Ionen mit unterschiedlichen Modellen zu verstehen. Bevor ein Modell für den Mechanismus des Transports bei unterschiedlichen Ionen vorgeschlagen wird, muss zuerst die Grundfrage jedes Modells beantwortet werden: Wird der Transport der verschiedenen Ionen durch einen Permeations- oder Gatingmechanismus verursacht? Beim Permeationsmechanismus ändert sich der mittlere zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Ionen, beim Gating-Effekt ist der mittlere zeitliche Abstand der Ionen konstant, der aber durch Pausen der Inaktivierung unterbrochen wird.

Diese Fragestellung soll zunächst für den anomalen Molfraktionseffekt (AMFE) untersucht werden. Darunter ist das Phänomen zu verstehen, dass in der Mischlösung von unterschiedlichen Ionen (K^+ und Tl^+) der Einzelkanalstrom kleiner ist als in reiner Lösung. Dieser Effekt wurde bisher durch das Hille-Schwarz-Modell (1978), ein Permeationsmodell, beschrieben. Bei diesem Modell werden im Kanal zwei Bindungsstellen vorausgesetzt, bei denen die gebundenen Ionen durch elektrostatische Wechselwirkung mit einem weiteren Ion freigesetzt werden.

Draber *et al.* (1991) waren die ersten, die den AMFE am Einzelkanalstrom von *Chara* nachwiesen. Sie fanden dabei, dass das Hille-Schwarz-Modell den AMFE nur in einem bestimmten Bereich der an der Membran angelegten Spannung erklären kann. Dies stand im Widerspruch zu den experimentellen Daten, die besagten, dass der Effekt für den gesamten Spannungsbereich beobachtet wurde. Die Autoren formulierten damals ein Lazy-State-Modell, bei dem das Kanalprotein in einen inaktiven Übergang übergeht (Hansen *et al.*, 1983). Solche Übergänge zwischen aktiven und inaktiven Zuständen des Kanals können nur dann zu einer Reduktion des gemessenen Stroms führen, wenn Mittelungsprozesse beteiligt sind. Bei einer Einzelkanalmessung können Mittelungsprozesse nicht im Ensemblebereich, sondern nur im Zeitbereich durchgeführt werden. Diese Überlegungen führten zur Forderung, das Zeitaufhebungsvermögen soweit zu erhöhen, dass das postulierte schnelle Schalten sichtbar wird.

Um die Zeitauflösung zu erhöhen, genügt es nicht, die Abtastrate der Datenerfassung zu erhöhen, denn mit der Bandbreite wächst das Rauschen. Deshalb richtete sich das Interesse erstens auf die Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses. Dies geschah zum einen durch Wahl eines Objektes mit großen Einzelkanalströmen (der K^+ -Kanal in *Chara* war allerdings schon optimal), durch sorgfältigen elektronischen Aufbau und Verbesserung der Messpipetten, in der vorliegenden Arbeit besonders die Benutzung von Quarzglas. Zum anderen wurden verbesserte Analyseverfahren entwickelt, der Hinkley-Detektor zur Sprungerkennung (Schultze und Draber, 1993), die Mehrkanal-Dwell-Time-Analyse (Blunck *et al.*, 1998) und der Mehrkanal-Direkte-Zeitreihen-Fit auf der Grundlage eines Hidden-Markov-Modells (Albertsen und Hansen, 1994).

Ein erster Erfolg ergab sich beim Cs^+ -Block des K^+ Kanals. Durch Erhöhung der Aufnahmezeiten von 5 kHz auf 200 kHz bei der Datenerfassungsanlage von Albertsen (1992) war es möglich, bei einer Abtastrate von 100 kHz die Mittelung über schnelles Schalten (Gating, Wechsel von aktiven zu inaktiven Zuständen) im Anti-Aliasingfilter als Ursache für die vorher mit 5kHz-Filtern gemessene Stromreduzierung nachzuweisen (Draber und Hansen, 1994). Damit gelang der direkte Nachweis, dass der Cs^+ -Block durch einen Gatingmechanismus erzeugt wird.

Dies bildete die Grundlage für die Arbeiten von Albertsen (1994) und später Keunecke (1995), das schnelle Schalten beim AMFE nachzuweisen. Es wurden aber nur indirekte Hinweise (z.B. Verschwinden der schnellen Zeitkonstante in der Mischlösung) bei den Untersuchungen festgestellt.

Da aber ein direkter Nachweis für schnelles Schalten fehlte, versuchte Keunecke (1995) noch ein letztes Mal, den AMFE durch ein alternatives Permeationsmodell, das Wu-Modell (1991, 1992), zu erklären. Das Prinzip des Wu-Modells ist dem Hille-Schwarz-Modell in gewisser Weise ähnlich. Das Wu-Modell besitzt aber nur eine einzige Bindungsstelle, wobei das gebundene Ion durch die kinetische Energie eines weiteren Ions aus der Bindungsstelle freigesetzt wird. Ähnlich wie beim Hille-Schwarz-Modell (1978) konnte der AMFE nur für einen begrenzten Spannungsbereich erklärt werden.

In der Diplomarbeit (Farokhi, 1998) wurde die durch den Erfolg beim Cs^+ -Block (Draber and Hansen, 1994) motivierte Suche nach dem schnellen Schalten beim AMFE wieder aufgenommen. Keunecke (1995) reduzierte das Rauschen durch innere Beschichtung der Pipette mit Sigmacote und durch Hochziehen des Patches bis an die Wasseroberfläche. Es wurde gehofft, durch Abkühlung auf 7 °C die Schaltprozesse so verlangsamen zu können, dass sie der Analyse zugänglich würden (Farokhi, 1998). Allerdings könnte das auch zur Erniedrigung des Einzelkanalstroms und damit des Signal-Rauschverhältnisses führen. Eine starke Motivation ging von dem Befund aus, dass bei 7 °C die Unterschiede in den Einzelkanalströmen für die reine Lösung und die Mischlösung verschwanden. So schien es wieder sinnvoll zu untersuchen, ob beim AMFE schnelles Schalten vorliegt.

Dies war die Ausgangssituation zu Beginn der vorliegenden Arbeit. Anhand obiger Fragestellungen werden die Zeitreihen, die mit einer Abtastrate von 100 kHz (Filter 25 kHz) aufgenommen wurden, mit verschiedenen Methoden untersucht, um herauszufinden, ob der AMFE aus einem Gating-Effekt oder einem Effekt aufgrund der Veränderung der Leitfähigkeit des Offen-Zustands (Permeationseffekt) resultiert. Dabei wurden zwei unterschiedliche Analyseverfahren (Dwell-Time-Analyse, Direkter-Zeitreehen-Fit) auf die Daten angewendet und somit die beiden Verfahren miteinander verglichen.

Da die grundlegende Fragestellung hiermit beantwortet werden konnte (der AMFE ist ein Gating Effekt), wurden alle bisherigen Modelle über den AMFE ungültig. Hieraus ergab sich die Notwendigkeit, Modelle zu entwickeln, die die den AMFE erzeugende Modifikation des Gatings in K^+/Tl^+ Mischung erklären und damit sowohl die gemessene Stromreduzierung als auch den Einfluß auf die Ratenkonstanten vorhersagen können.

In dieser Arbeit werden fünf Modelle vorgeschlagen, um die Änderung des Gatings in Abhängigkeit vom Tl^+/K^+ -Verhältnis zu erklären. Drei Modelle gehen von einem Kanal mit vier identischen Untereinheiten mit allosterischen Bindungsstellen für K^+ oder Tl^+ aus (Liganden-Modell). Die Anregung für solche Modelle kam aus den verschiedenen Arbeiten (Rosenmund *et al.*, 1998; Ruiz und Karpen, 1999; Moss und Magleby, 2001), bei denen eine Änderung des Gatings durch Liganden-Bindung beobachtet wurde. Die drei Liganden-Modelle besitzen folgende Eigenschaften:

1. Direkter Einfluss der Ionenbindung auf das Gating.
2. Nichtlinearer Effekt der Ionenbindung auf das Gating.
3. Modulation der Ratenkonstanten des Markov-Modells durch Konformationsänderungen des Kanalproteins.

Die beiden weiteren Modelle basieren auf dem Prinzip eines „Foot-in-the-door-Modells“, das besagt, dass der Kanal mit Ionen innerhalb der Pore nicht inaktiviert werden kann (Kiss *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001). Die Charakteristik ist:

4. Direkte Wirkung auf die Besetzung
5. Modulationseffekt der Besetzung

Das Foot-in-the-door-Prinzip wurde anhand des Na^+ -Effekts beim K^+ -Kanal weiter diskutiert. Dabei wird sich zeigen, dass sich der Durchmesser des Selektivitätsfilters vom Kanal durch das Foot-in-the-door-Prinzip ändert und bei einer Verkleinerung des Durchmessers die Na^+ -Ionen den K^+ -Kanal passieren.

Ein weiteres Resultat dieser Untersuchungen wird sein, dass das bereits bei Draber *et al.* (1993) beschriebene Kooperativitätsverhalten auch hier auftritt

2 Biologische Grundlagen

Elektrophysiologische Messungen an einzelnen Ionenkanälen (Patch-Clamp-Messungen, Abschnitt 3.2) dienen zwei Zielen: Zum einen soll die Funktionsweise der, in allen Zellen vorhandenen, Transportproteine besser verstanden werden, zum anderen wird versucht, ihre physiologische Bedeutung für die Zellen und den gesamten Organismus aufzuklären. Daher wird im folgenden eine Einführung in den Aufbau einer Zelle und deren Membrantransporter gegeben.

2.1 Aufbau der Pflanzenzelle und biologische Membran

Die Zelle ist die kleinste noch selbständig lebensfähige Einheit. Im Inneren enthält die Pflanzenzelle (Abb. 2.1) verschiedene Organellen, durch die die Zelle in Bereiche mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt wird. Die größte Organelle ist die Vakuole, die etwa 80% des gesamten Zellvolumens einnimmt. Das nächstgrößte Kompartiment wird durch die Chloroplasten gebildet, in denen die Photosynthese stattfindet. Der Rest der Pflanzenzelle verteilt sich hauptsächlich auf die Mitochondrien (verantwortlich für die Zellatmung, die Bereitstellung von ATP und die Synthese von Stoffwechselprodukten im TCA-Zyklus; Nelson und Cox, 2001), Peroxisomen (Aufbereitung von Stoffwechselprodukten aus der Photorespiration und lokaler Abbau von Sauerstoffradikalen; Heldt, 1999), den Zellkern (enthält die Erbinformation) und das Cytosol (Medium zwischen den verschiedenen Organellen). Das Endoplasmatische Reticulum (ER) und der Golgi-Apparat dienen der Synthese von Proteinen.

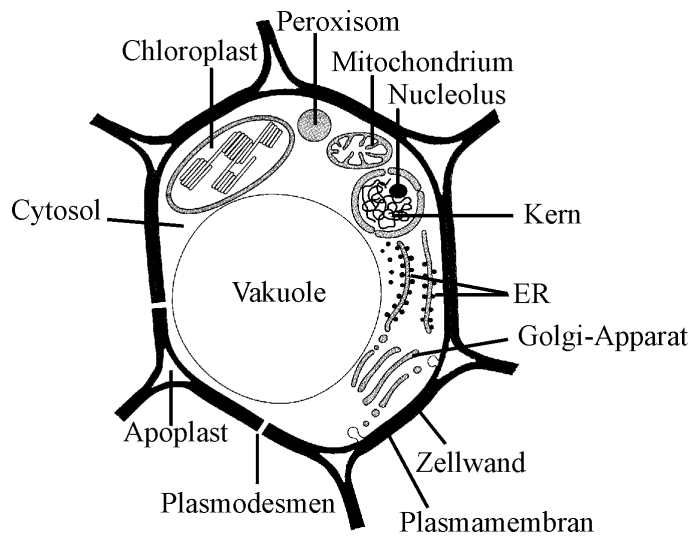


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung einer Pflanzenzelle (Heldt, 1999).

Der für die vorliegende Arbeit wichtigste Zellbestandteil sind Membranen (Abb. 2.2) aus Lipiden. Sie grenzen nicht nur Protoplasten nach außen ab, sondern umschließen auch die Zellorganellen im Protoplasten. Die Lipide bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe mit einem lipophilen Schwanzteil aus zwei langen Kohlenwasserstoffketten. Die Lipidketten stellen sich zueinander parallel und bilden so eine Lipidschicht. Zur Bildung der Membran lagern sich zwei Monolayer zusammen, so dass sich eine „sandwich“-artige Doppelschicht von 4-5 nm Dicke, ein sogenannter Bilayer, ausbildet. Zellkern, Plastiden (Chloroplasten, für die Photosynthese, Leukoplasten, als Stärke-speicherung und Chromoplasten, beschränken sich auf die Farbgebung von Früchten und manchen Blüten) und Mitochondrien sind vom Cytosol durch eine Doppelmembran abgegrenzt, die aus zwei Elementarmembranen besteht. Damit wird die Regel erfüllt, dass auf der einen Seite der Membran eine cytosolische, auf der anderen eine lumenale (wässrige) Phase zu finden ist. Bei pflanzlichen Zellen wird die äußere Zellwand als Plasmalemma bezeichnet, die innere Membran, die die zentrale Vakuole vom Cytoplasma abgrenzt, als Tonoplast. Bei tierischen Zellen fehlen im Gegensatz zu den pflanzlichen Zellen die Zellulose-Zellwand, die Vakuole sowie der Chloroplast.

Transportstudien (wie z. B. Ionentransport) finden fast ausschließlich am Plasmalemma und am Tonoplasten statt. Zwischen den Lipidmolekülen sind verschiedene Transportmoleküle eingelagert, mit deren Hilfe der Stoffaustausch über die Membran stattfindet (Abb. 2.2). Diese Transporter sind dafür verantwortlich, dass nur bestimmte Stoffe die Membran passieren können. Sie stellen also hochselektive Permeabilitätsschranken dar.

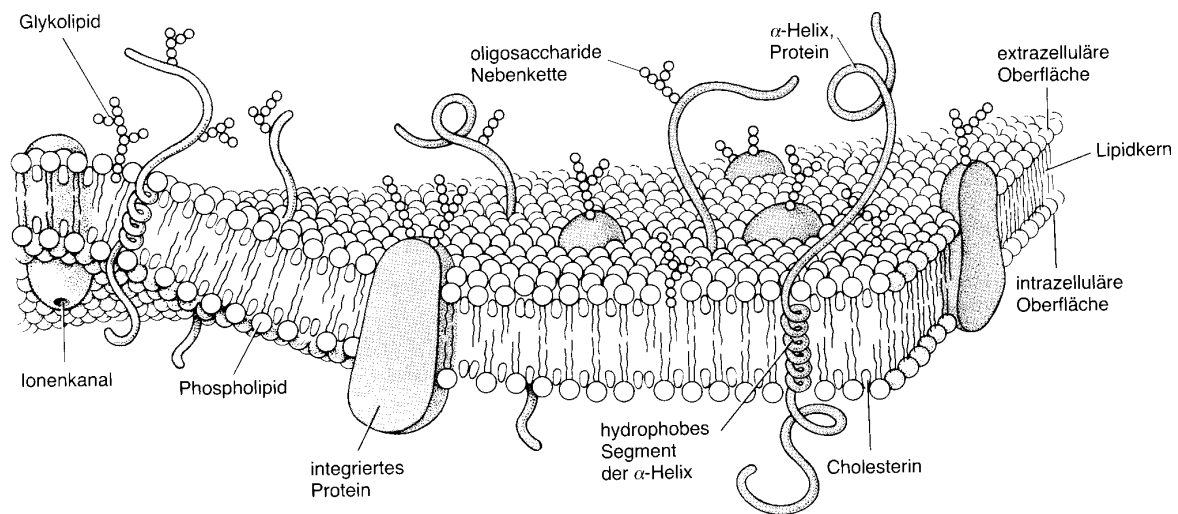


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einer biologischen Membran. In der Lipiddoppelschicht sind Proteine eingelagert, die entweder die Membran ganz durchqueren, oder teils in der Außen- oder Innenschicht fixiert sind (Singer und Nicolson, 1972).

2.2 Membran-Transport-Klassifizierung

Ionentransportprozesse können in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die sich durch die Energiequellen für den Transport unterscheiden (Maathuis und Sanders, 1992).

a) Passiver Transporter: Er ermöglicht den Transport von Ionen entlang eines Gradienten. Die Triebkraft ist die Potentialdifferenz plus Nernstspannung des Ions (Abschnitt 2.3).

b) Pumpen: Sie können unter Aufwendung chemisch gespeicherter Energie Ionen gegen Konzentrations- oder Potentialgradienten transportieren (Abb. 2.3). Bei der Hydrolyse von ATP in ADP wird eine Energie von ca. 450 meV pro Molekül frei, die für den Transport durch die Membran benutzt wird (Hansen *et al.*, 1981; Bowman und Bowman, 1986; Serrano, 1988).

c) Cotransporter: Sie transportieren eine Ionenart passiv durch die Membran, wobei die gewonnene Energie für den Transport anderer Ionen verwendet wird. Der Transport beider Ionenarten in die gleiche Richtung wird als Symport bezeichnet, in entgegengesetzter Richtung als Antiport (Abb. 2.3, Sanders *et al.*, 1984; Sanders, 1988). Der Gradient für das antreibende Ion wird meist durch Pumpen erzeugt.

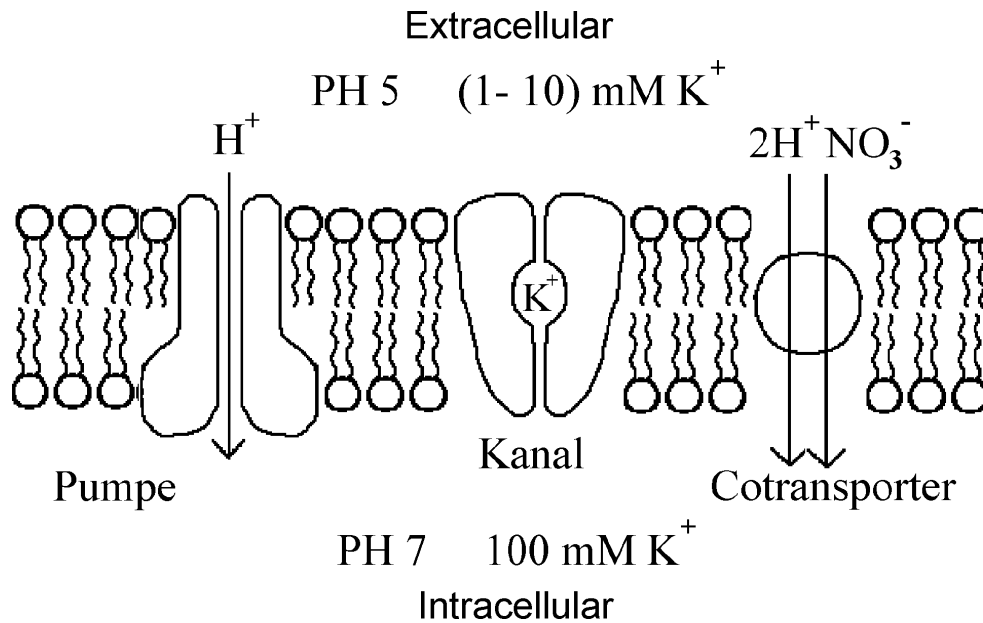


Abbildung 2.3: Die drei unterschiedlichen Arten des Transportprozesses durch eine biologische Membran. Die Pumpe (aktive Transporter) transportiert H^+ -Ionen entgegen dem pH Gradienten. Der Kanal (passiver Transporter) lässt K^+ -Ionen hindurch diffundieren. Der Cotransport verbindet den NO_3^- Transport mit dem Transport von zwei H^+ -Ionen (Symport).

2.3 Kanäle und Carrier

Neben der bereits besprochenen Energieversorgung (Abschnitt 2.2) werden Transporter nach dem Mechanismus klassifiziert. Dabei gibt es zwei Modelle für die Beschreibung der Transportmoleküle: Kanal und Carrier (Abb. 2.4).

Kanäle sind Transportproteine, die die ganze Membran durchdringen und eine hydrophile Pore ausbilden, durch die Ionen oder Moleküle (z. B. Wasser: Murata *et al.*, 2000 oder Peptide: Lankat-Buttgereit und Tampé, 2002) wandern können (Abb. 2.4A). Sie haben sehr hohe Transportraten bis 10^9 Ionen/s (z.B. beim Wasserkanal).

Carrier sind lipidlösliche Moleküle, die sich innerhalb der Membran frei bewegen und die Ionen dabei im Huckepackprinzip von einer Seite der Membran auf die andere schleusen (Abb. 2.4B). Sie erreichen Transportraten von 10^2 bis 10^4 Molekülen oder Ionen pro Sekunde (Läuger, 1980).

Carrier sind auf molekularer Ebene noch nicht als intrinsische Membranproteine gefunden worden. Deshalb werden viele Transporter, die früher als Carrier bezeichnet wurden, heutzutage als Kanäle betrachtet (Galli *et al.*, 1995; Conejero, 1997). Die niedrigen Transportraten dieser Kanäle für Pumpen oder Cotransport lassen sich durch die notwendige Kopplung an die ATP-Umwandlung oder an die Bewegung eines

anderen Ions erklären, die eine Verminderung der Transportrate um den Faktor 10^4 bis 10^5 verursachen (Hansen *et al.*, 1981). Carrier sind bisher nur bei biologischen Kampfstoffen wie Valinomycin, die Pilze gegen Bakterien verwenden, nachgewiesen worden (Benz und Läuger, 1976). In Pflanzen gibt es Carrier im Plastoquinon, in der Tylakoidmembran der Chloroplasten und im Ubiquinon in den Mitochondrien.

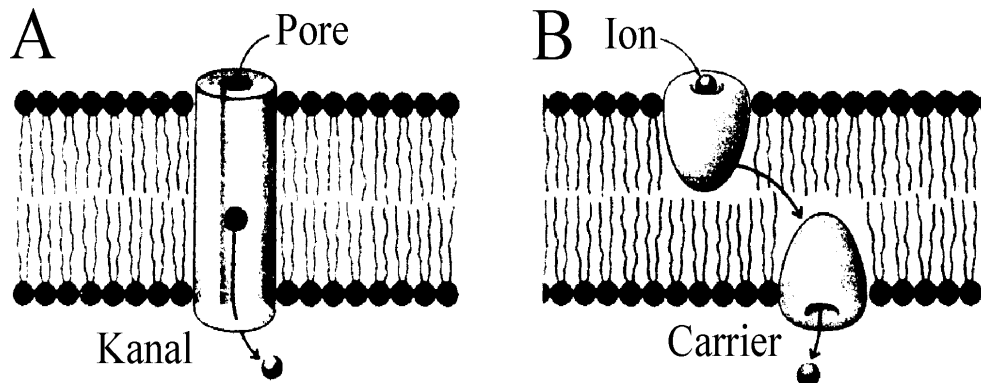


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines (A) Kanal- und eines (B) Carrier-Transportproteins (Stryer, 1996).

2.4 Aufbau eines Ionenkanals

Kanäle können als wassergefüllte Poren betrachtet werden, die die Lipiddoppelschicht überbrücken (Abb. 2.4A). Ionenkanäle haben eine hohe Transportkapazität. Ihre Transportrate liegt im Bereich von 10^6 bis 10^8 Ionen pro Sekunde durch die Membran (Läuger, 1980). Der Ionenfluss der Ionenkanäle ist so hoch, dass es möglich ist, die Transportleistung eines einzelnen Kanals als elektrische Leitfähigkeit zu messen. Der Kanal kann sich öffnen und schließen, was mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik beobachtet werden kann (Abschnitt 3.2). Die Öffnung vieler Ionenkanäle wird durch das elektrische Membranpotential, das an der betreffenden Membran anliegt, gesteuert (Catterall, 1992; Durell und Guy, 1998; Glauner *et al.*, 1999; Hedrich *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1989; Pongs, 1992). Kooperativität (Öffnung benachbarter Kanäle, Draber *et al.*, 1993), Aktivierung durch Botenstoffe (Assmann und Romano, 1998; Esser *et al.*, 1997), Ionenkonzentration eines aktivierenden Ions (Blatt und Gradmann, 1997) oder stimulierende Wirkungen äußerer Reize (z.B. Licht, Vanselow und Hansen, 1989) können ebenfalls das Schaltverhalten der Kanäle beeinflussen.

Es gibt in Pflanzen hochselektive Kationkanäle für H^+ , K^+ und Ca^{2+} und entsprechend selektive Anionkanäle für Cl^- . Von vielen Kanalproteinen wurden in letzter Zeit die

Aminosäuren-Sequenzen mit Hilfe biochemischer Methoden ermittelt. Der hier verwendete Kanal aus *Chara corallina* (Abschnitt 2.5) ist allerdings bis heute nicht kloniert. Der BK (big K⁺ (maxi-K) Kanal) ist dem *Chara*-Kanal am ähnlichsten (Tester, 1988). Beide Kanaltypen haben einen hohen Einzelkanalstrom, ein ähnliches Schaltverhalten und die gleiche Ca²⁺-Empfindlichkeit (Abschnitt 3.1).

Der Arbeitsgruppe MacKinnon von der Rockefeller Universität in New York ist es gelungen, die dreidimensionale Struktur des K⁺-Kanals KcsA aus dem Bakterium *Streptomyces lividans* mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufzuklären (Doyle *et al.*, 1998, Abb. 2.7). Voraussetzung dafür ist, aus dem Protein geordnete Kristalle herzustellen. Die Aufnahmen erreichten eine Auflösung von 3.2 Å. Inzwischen konnte die Auflösung auf 2 Å verbessert werden, so dass die Ionen im Kanal und die sie begleitenden Wassermoleküle sichtbar wurden (Zhou *et al.*, 2001; Abschnitt 10.6).

Der KcsA-Kanal weist im Gegensatz zum spannungsabhängigen K⁺-Kanal (K_V) (Abb. 2.5A) wie dem *Shaker*-Kanal, der aus vier Untereinheiten zu je sechs Segmenten (Helices S1-S6) besteht, lediglich vier Untereinheiten mit je zwei solcher Segmente auf. Damit gehört er zur K_{ir}-Familie (einwärts-gleichrichtende Kanäle, Abb. 2.5B) (Ho *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1993). Die Segmente durchziehen die Membran als α-Helices und werden durch lineare Aminosäuresequenzen miteinander verbunden (Abb. 2.5). Das S4-Segment beim K_V ist positiv geladen und wirkt als Spannungssensor. In älteren Modellen wurde davon ausgegangen, dass sich die S4-Helix in der Membran im elektrischen Feld verschieben kann. Dadurch könnte der Kanal geöffnet oder geschlossen werden (Miller, 1991; Jan und Jan, 1992; Guy und Durell, 1994; Larsson *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass dadurch die Membranspannung energetisch zu wenig genutzt wird. Durch Punktmutationen der vier Ladungen auf den S4-Helices, durch die sie pH-empfindlich gemacht oder mit Farbstoff markiert werden konnten, wurde der Nachweis erbracht, dass eine Drehbewegung zwischen zwei in das Protein reichenden Wasserspalten vorliegt (Bezanilla, 2000). Glauner *et al.* (1999) verfeinerten das Bild, indem sie auch eine axiale Komponente nachwiesen, wodurch sich eine Schraubbewegung ergab. Durch die Drehung werden die Ladungen besser genutzt, so dass sich aus den 16 Festladungen auf den Helices die 13 aus Gating-Strömen ermittelten effektiven Ladungen ergaben. Weitere Mechanismen zum Öffnen und Schließen des Kanals hängen mit den N-Termini zusammen, die zu Bällen ausgeformt sind. Sie können den Eingang des Kanals verschließen ("Ball and Chain", Antz *et al.*, 1997).

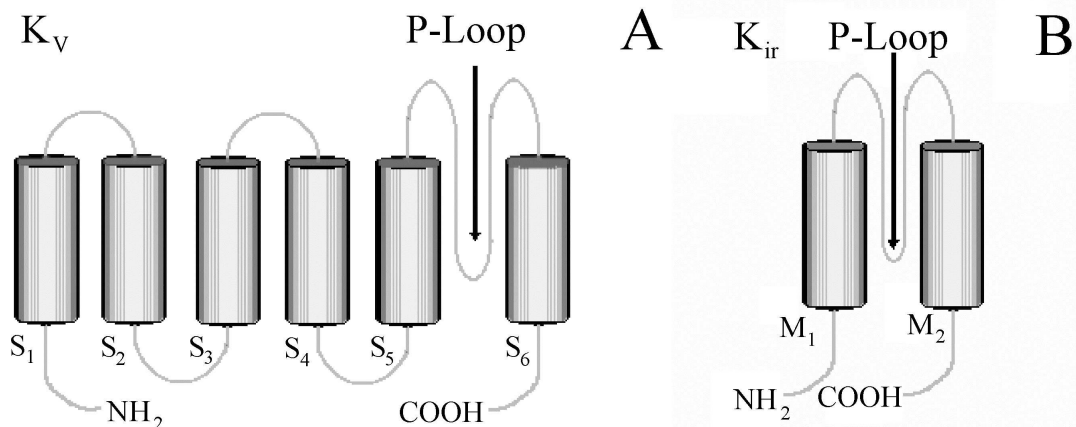


Abbildung 2.5: Die Untereinheiten zweier Kaliumkanal-Familien entdeckt anhand von Sequenzanalysen. (A) Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_V), wie der *Shaker*-Kanal, haben sechs Transmembransegmente (S_i), während die einwärts-gleichrichtenden Kanäle (K_{ir} , $ir = \text{inward-rectifier}$), wie der *KcsA*-Kanal, lediglich zwei dieser Segmente (M_i) aufweisen (B). Bei beiden sind der N- und C-Terminus intrazellulär lokalisiert. Beide enthalten einen Poren(P)-Loop, der den Selektivitätsfilter enthält. Vier Untereinheiten erzeugen einen Kanal (Abb. 2.6).

Proteine beider Familien enthalten einen Poren(P)-Loop (Abb. 2.5), der die Selektivitätsfilter des Kanals bildet. Im spannungsabhängigen K^+ -Kanal verbindet der P-Loop die $S5$ - und $S6$ -Segmente brückenartig miteinander (Catterall, 1988; Miller, 1991). Beim *KcsA*-Kanal verbindet der P-Loop die beiden Segmente $TM1$ und $TM2$ miteinander. Die M_1 und M_2 Segmente entsprechen den $S5$ und $S6$ und die Sequenz der P-Region beim *KcsA*-Kanal ist sehr ähnlich zur K_V -Sequenz (Abb. 2.5). Daher ist die Strukturanalyse auch für die K_V -Kanäle von Bedeutung.



Abbildung 2.6: Anblick des *KcsA*-Kanals von oben. Es sind die vier Untereinheiten mit jeweils zwei Segmenten zu erkennen. In der Mitte der Pore sind die Kationen dargestellt, die die Pore durchqueren (Doyle *et al.*, 1998).

Jeder Membrankanal ist aus vier solcher Untereinheiten aufgebaut (Abb. 2.6) (MacKinnon, 1991; Doyle *et al.*, 1998). Im Inneren der Pore befindet sich ein wassergefüllter Kanal, der den Selektivitätsfilter enthält. Dieser Selektivitätsfilter ist aus den PLoops der vier Untereinheiten gebildet. Der entscheidende, hoch konservierte Sequenzabschnitt besteht aus G-Y-G (Glycin-Tyrosin-Glycin) (Abb. 2.7 links), der in allen K^+ -Kanälen enthalten ist (Heginbotham *et al.*, 1994). Die Carbonyl-Sauerstoffatome dieser drei aufeinanderfolgenden Carbonylgruppen jeder Untereinheit sind nach innen gerichtet und bilden einen Ring von Sauerstoffatomen, die als Kationenbindungsstellen fungieren. Die Pore dieses Filters ist so klein, dass die K^+ -Ionen ihre Hydrathülle abstreifen müssen, um hindurch zu gelangen. Um diesen hohen Energiebedarf zu kompensieren, agieren die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen als "Wasserersatz" für die K^+ -Ionen. Durch nachfolgende K^+ -Ionen werden die in der Pore gebundenen K^+ -Ionen zur anderen Seite des Filters herausgedrängt (Abb. 2.7, rechts).

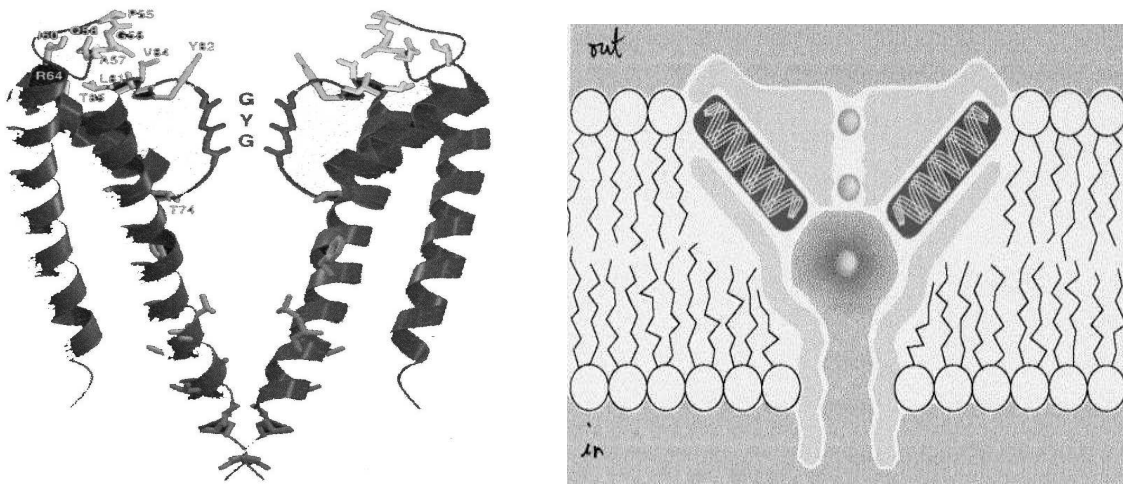


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines KcsA-Kanals aus dem Bakterium *Streptomyces lividans* bestehend aus viermal zwei Segmenten. (A) Zwei der vier Untereinheiten sind hier dargestellt. Der entscheidende Bereich ist der GYG-Selektivitätsfilter. Die Ionen müssen hier ihre Hydrathülle abstreifen, um durch den Selektivitätsfilter zu gelangen. (B) Es sind drei Kationen dargestellt, wobei zwei sich im GYG-Selektivitätsfilter befinden, während das dritte Ion im darunterliegenden wassergefüllten Hohlraum lokalisiert ist. Die beiden schräg liegenden Helices sollen der Röhre des Selektivitätsfilters und dem Hohlraum Stabilität verleihen (Doyle *et al.*, 1998).

Die Kaliumkanäle weisen trotz der minimalen Strukturunterschiede zwischen den beiden Ionen (Ionenradien: 1.33 bzw. 0.95 Å) eine hohe Selektivität für K^+ -Ionen gegenüber Na^+ -Ionen auf (etwa 10000:1). Normalerweise hängen hohe Selektivitätsunterschiede mit festen Bindungen zusammen. Dadurch kann aber der hohe Ionenfluss von bis zu 10^8 Ionen pro Sekunde durch einen einzelnen Offenkanal nicht erklärt werden. Da die Na^+ -

Ionen kleiner sind als die K^+ -Ionen, sind sie nicht in der Lage, mit dem Ring der Sauerstoffatome der Carbonylgruppen in Wechselwirkung zu treten. Sie können daher ihre Hydrathülle nicht abstreifen. Der Weg durch den Filter ist dadurch gesperrt. Die Starrheit der Pore impliziert, dass der Ionenradius genau stimmen muss, damit die Ionen durch den Filter gelangen können.

Der Hohlraum in der Mitte (cavity) (Abb. 2.7, rechts) und der innere Kanal sind mit hydrophoben Molekülen ausgekleidet. Somit wird eine Wechselwirkung der Ionen mit der Wand vermieden. Dadurch erhöht sich der Ionenfluss durch den Kanal. Die Methoden, mit denen die Ionenflüsse durch den Kanal gemessen und ausgewertet werden können, werden in den nächsten Kapiteln näher erläutert.

2.5 *Chara corallina*

Für die Experimente wurde die Grünalge *Chara corallina* verwendet. *Chara corallina* ist eine Süßwasseralge aus der Familie der *Characeen*. Diese gehört zu der Abteilung der grünen Algen (Weberling und Schwantes, 1981). Sie bevorzugen kühle, stehende und saubere Gewässer. Die armleuchterartigen Verzweigungen der Axial- und Internodialzellen (Abb. 2.8) sind für diese Gattung charakteristisch und führten zu dem Namen *Characeae* (Arملهuchteralgen). Die Internodialzellen, die eine Länge von bis zu 10 cm und einen Durchmesser von bis zu 1.2 mm haben, sind für die elektrophysiologische Untersuchung von Bedeutung. Die Internodialzelle besteht hauptsächlich aus der Vakuole, die vom Tonoplasten begrenzt ist. Das Protoplasma besteht aus äußerem Ektoplasma und innerem Endoplasma. Die Chloroplasten schwimmen nicht wie bei anderen Pflanzen frei umher, sondern liegen in Reihen geordnet in Ektoplasma fest. Alle übrigen Zellorganellen, wie Kerne, Mitochondrien usw., schwimmen frei im Endoplasma. Die Gründe, weshalb diese Pflanze als Versuchsobjekt gewählt wurde, werden in Abschnitt 3.1 ausführlich diskutiert.

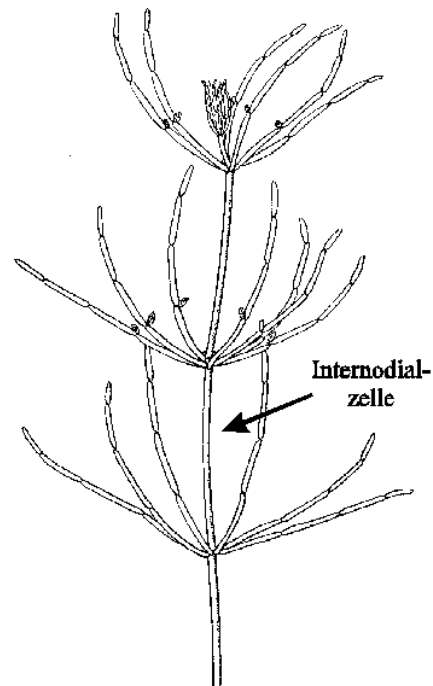


Abbildung 2.8: *Chara corallina*.

3 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden das biologische Objekt und die Messmethoden näher vorgestellt, mit denen die im vorherigen Kapitel dargestellten Transportstudien an Kanälen durchgeführt wurden.

3.1 Der K^+ -Kanal in *Chara Corallina*

Die Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrundeliegen, wurden an K^+ -Kanal in *Chara Corallina* (Abschnitt 3.1) durchgeführt. Dieser liefert hohe Einzelkanalströme liefert, was sich positiv auf das Signal-Rauschverhältnis auswirkt, das die bestimmende Größe für das zeitliche Auflösungsvermögen ist (Schultze und Draber, 1993). Wenn man bei pflanzlichen Objekten im Vergleich mit den tierischen Zellen konkurrenzfähig sein möchte, kommt nur der K^+ -Kanal im Plasmotropfen von *Chara corallina* in Frage. Plasmalemma-Präparate, wie z. B. von Mais-Bündelscheidenzellen, sind zwar für Fragen der Pflanzenernährung sehr interessant (Keunecke *et al.*, 1997; Keunecke, 2000; Keunecke und Hansen, 2000), können jedoch bei biophysikalischen Untersuchungen zum Transportmechanismus aufgrund des schlechten Signal-Rauschverhältnisses keine wichtige Rolle spielen.

Aus *Chara* lassen sich sehr leicht Protoplasttropfen isolieren. Sie bilden sich am Boden einer Petrischale, wenn eine *Charazelle* aufgeschnitten wird und das Cytoplasma ausströmt. Die hierbei entstehenden Tropfen sind von einer Tonoplastenmembran umgeben (Lühring, 1986, Sakano und Tazawa, 1986), in der der zu untersuchende Kanal zu finden ist.

Somit werden die Untersuchungen dieser Arbeit in der Tonoplastenmembran der Grünalge *Chara corallina* durchgeführt. Von dieser Algenart wurden aber bislang noch keine K^+ -Kanäle exprimiert, da dies bei mehrkernigen Zellen wie bei denen der Armleuchteralgen schwierig ist. Daher gibt es auch keine gesicherten Erkenntnisse über die molekulare Struktur und somit über die Selektivitätsmechanismen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den K^+ -Kanälen von *Chara corallina* um Maxi-K-Kanäle handelt, die auch unter dem Namen BK-Kanal bekannt sind (Moss und Magleby, 2001). Diese Annahme ist in erster Linie in der hohen Leitfähigkeit der Einzelkanäle und der pharmakologischen Empfindlichkeit begründet (Tester, 1988). Aufgrund dieser Ähnlichkeit und weil dies das vorherrschende Grundmuster für K^+ -Kanäle ist, wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass der dominierende K^+ -Kanal in *Chara corallina* aus vier identischen Untereinheiten (4-Segmenten) besteht.

3.1.1 Anzucht der Algen

Chara wird im Labor in APW (Artificial Pond Water, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.1 mM NaCl, 1.0 mM KCl) bei Zimmertemperatur in Kunststoffwannen (ca. 60 l) unter Kunstlicht (60 W Glühlampe, tägliche Beleuchtung von 8⁰⁰ – 18⁰⁰ Uhr) kultiviert. Als Bodensubstrat wird zu gleichen Teilen ein autoklaviertes Gemisch aus Buchenlaubmulch und torfiger Blumentopferde verwendet. Wichtig ist, dass zum Autoklavieren nicht der große neue Autoklav im ZBM (5050 ELVC, Tuttnauer Systec) verwendet wird, sondern der kleine Autoklav (Webecke und Co, Bad-Schwartau). Während der langen Abkühlungsphase von 3h bilden sich beim großen Autoklaven Zucker, die in der Wanne wahrscheinlich durch Bakterienwachstum zu trübem Wasser führen und die Algen sterben lassen.

Das Bodensubstrat (ca. 10 cm dick) wird dann mit gewaschenem scharfen Bausand (ca. 2 cm dick) abgedeckt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Danach wird die Grünalge *Chara corallina* eingepflanzt. Jede Kultur wird alle drei bis vier Monate neu angesetzt.

Die Pflanzen der Familie der *Characeen* bevorzugen nährstoffarmes Wasser. Somit sind zu ihrer Versorgung mit Nährstoffen aus dem Boden herausdiffundierende Stoffe völlig ausreichend.

3.2 Patch-Clamp-Technik

Die Technik der Patch-Clamp-Messungen wurde von Neher und Sakman (1976) entwickelt. Dabei wird der Strom durch eine wenige μm^2 große Fläche (patch) der Membran mit nur wenigen Kanälen gemessen, an die eine vorgegebene Spannung (voltage-clamp) angelegt wird. Der gemessene Strom liegt in der Größenordnung einiger Picoampere. Um einen sehr kleinen Abschnitt der Zellmembran (patch) elektrisch von seiner Umgebung zu isolieren, muss eine sehr dichte Verbindung zwischen der Zellmembran und dem Rand einer Glaspipette geschaffen werden. Die

Pipette als Messelektrode wird auf die Zelloberfläche aufgesetzt. Ein leichter Unterdruck bewirkt, dass die Membran etwas in die Pipette hineingezogen wird. Der Abstand zwischen den Lipiden der Membran und dem Glas beträgt dabei weniger als 1 nm (Corey und Stevens, 1983). Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Ca^+ -Brücken und Van der Waals-Kräfte sind verantwortlich für die Dichte des Seals (Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran, Corey und Stevens, 1983; Ophasi und Webb, 1994). Liegt der Kriechwiderstand zwischen Glas und Membran im Bereich einiger Gigaohm (um die 10 $\text{G}\Omega$), wird diese Versiegelung als Gigaseal bezeichnet. So können keine „Leckströme“ zwischen Pipette und Membran fließen. Nachdem sich ein solches Gigaseal gebildet hat, kann der Strom für verschiedene Spannungen über der Membran mit einem Patch-Clamp-Verstärker gemessen (voltage clamp, Abb. 3.1) oder bei festem Strom die Spannung bestimmt werden (current clamp).

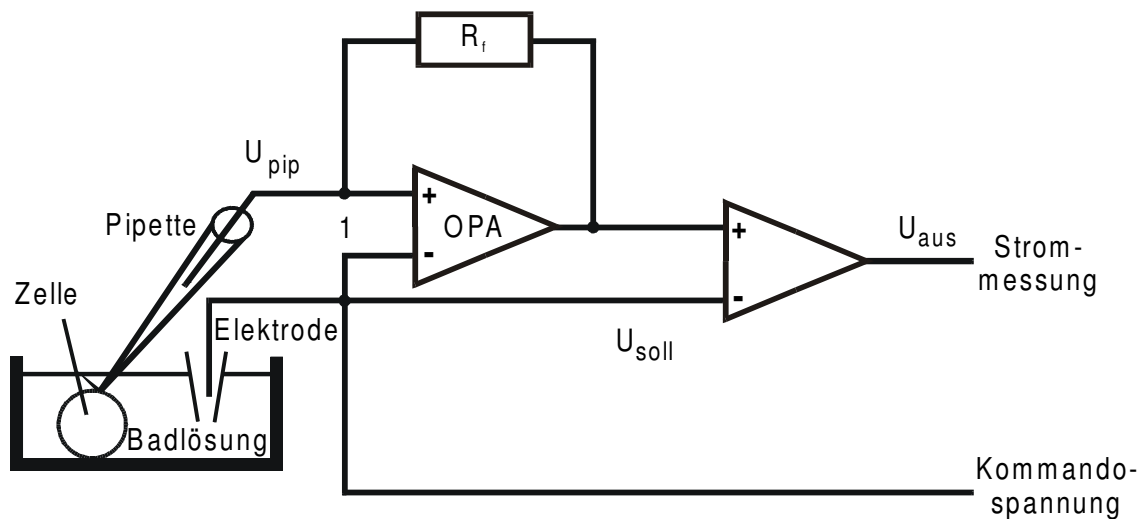


Abbildung 3.1: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers.

In Abb. 3.1 ist ein vereinfachtes Schaltbild eines Patchverstärkers dargestellt. Der Operationsverstärker (OPA) wirkt als Stromspannungswandler, aber gleichzeitig auch als Rückverstärker zur Einstellung der Membranspannung an Punkt 1. Letzteres geschieht dadurch, dass der OP die Spannung am Eingang auf Null regelt und damit $U_{\text{pip}}=U_{\text{soll}}$ einstellt. Der für diese Rückkopplung notwendige Strom ist gleich dem Pipettenstrom (als Strom durch den Patch) und kann als Spannungsabfall am Widerstand R_f gemessen werden. Da die Spannung am Punkt 1 nicht auf Null liegt, muss dieser Wert vom Ausgang des OPA im nachfolgenden Verstärker abgezogen werden. Es gibt auch Patch-Clamp-Verstärker, die anstelle des Rückkopplungswiderstands R_f einen Kondensator verwenden (Dagan 3900 A Patch-Clamp-Verstärker, Numberger und

Draguhn, 1996). Die Schaltung arbeitet sehr ähnlich, nur dass sich hier eine Spannung an dem Kondensator aufbaut, der in bestimmten Abständen entladen werden muss (Abschnitt 3.3.1). Der wesentliche Vorteil beim integrierenden Patch-Clamp-Verstärker liegt somit im geringeren Rauschen.

3.2.1 Patchkonfigurationen

Es gibt vier wichtige unterschiedliche Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik (Abb. 3.2):

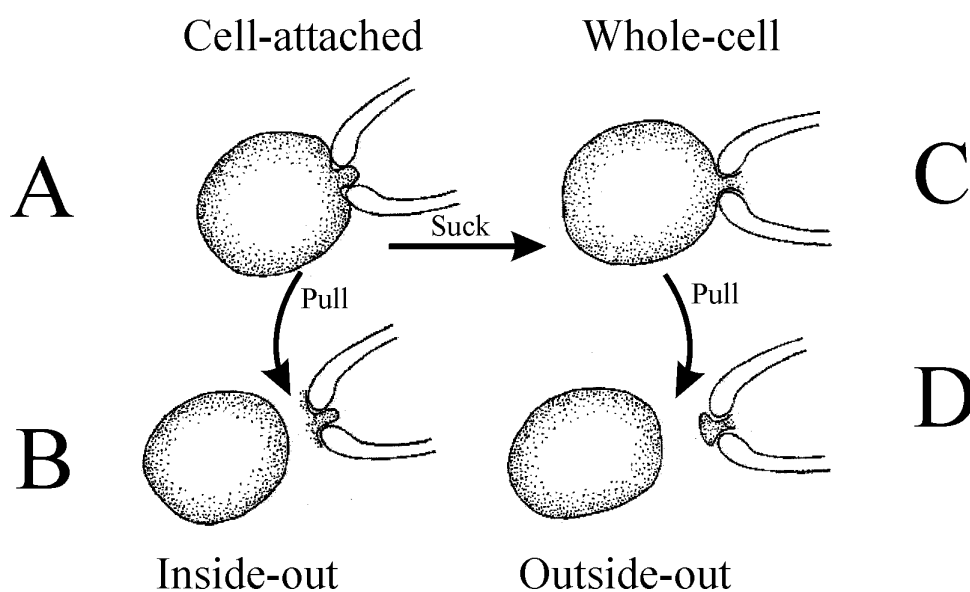


Abbildung 3.2: Die vier unterschiedlichen Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik (Hille, 1992).

a) Cell-Attached: Die Pipette wird auf die Membran gesetzt, ohne dass die Verbindung zur Gesamtzelle abreißt. Der große Vorteil liegt darin, dass die Zelle während der Messung intakt bleibt, so dass die Funktion des Ionenkanals unter physiologischen Bedingungen untersucht werden kann. Der Nachteil dieser Konfiguration besteht darin, dass die Membranspannung am Patch unbekannt ist, da sich die Spannung auf die Serienschaltung von Patch und Restmembran aufteilt. Die Spannung über der Restmembran (Ruhepotential der Zelle) kann nur geschätzt werden. Diese Technik gibt auch keine genaueren Informationen über die Ionenzusammensetzung im Inneren der intakten Zelle, deren Konzentration nicht variiert werden kann. Weiterhin kann die Eintauchtiefe nicht verringert werden, wodurch das Rauschen nicht weiter reduziert werden kann (Keunecke, 1995; Farokhi *et al.*, 2000; Abb. 5.1).

b) Excised / Inside-Out: Durch das ruckartige Wegbewegen der Pipette bei der cell-attached-Konfiguration kann, ohne dass dadurch die hohe Abdichtung des Patches verloren geht, der Patch aus der Zelloberfläche herausgerissen werden. Bei dieser Konfiguration liegt der Patch mit der cytosolischen Seite der Membran (inside) in der Messlösung (out). Dadurch ist es möglich, die Funktion des Ionenkanals unter genau definierten Bedingungen zu untersuchen. Als weiterer Vorteil dieser Konfiguration ergibt sich die genaue Kenntnis des Membranpotentials sowie die Wählbarkeit der Lösungen auf beiden Seiten der Membran. Die Eintauchtiefe lässt sich genau kontrollieren. Der Nachteil liegt darin, dass sich die Kanäle nicht mehr in ihrer natürlichen Umgebung befinden.

c) Whole-Cell: Bei dieser Konfiguration wird aus einer cell-attached-Konfiguration die Membran unter der Pipette entweder durch mechanisches Saugen oder durch einen hochfrequenten Wechsellspannungspuls (2000 mV, 1-200 ms) aufgerissen, so dass eine direkte Verbindung zwischen Pipettenlösung und Cytosol geschaffen wird. Es findet ein schneller Austausch zwischen den Lösungen der Pipette und der Zelle statt, bei dem sich die Pipettenlösung wegen des größeren Volumens nach kurzer Zeit in der Zelle ausbreitet. Bei dieser Methode kann der Strom über die gesamte Zellmembran gemessen werden. Dies ist der klassischen Technik mit Einstichelektroden äquivalent und wird angewendet, wenn die Zelle zu klein für die Einstichelektrode ist. Auch ist die Belastung für die Zelle geringer.

d) Excised / Outside-Out: Outside-out ist eine weitere Art des excised-patches. Die Vorgehensweise ist wie beim inside-out, sie entsteht aber aus der whole-cell-Konfiguration. Ob die inside-out- oder die outside-out-Konfiguration gewählt wird, ist abhängig von dem Wunsch, welche Seite der Membran in Verbindung zur Badlösung gebracht werden soll. Durch diese Konfiguration ist es möglich, an der selben Zelle zuerst whole-cell und dann outside-out zu untersuchen.

3.3 Messaufbau

Der Versuchsaufbau ist eine Weiterentwicklung von Albertsen (1992), Draber (1994), Blunck (1996) und Sutter (1996). Der gesamte Messplatz wurde so angelegt, dass Ströme im Bereich einiger pA möglichst störungsfrei gemessen werden können und das Gigaseal möglichst lange auch bei höheren Haltespannungen gehalten werden kann. Die Störungen können dabei elektromagnetischer oder mechanischer Natur sein.

Daher befindet sich der Aufbau in einem Faraday-Käfig, weil die Messungen sehr empfindlich gegenüber Störsignalen sind (Abb. 3.3). Ein Charakteristikum der Patch-Clamp-Technik ist die extreme Empfindlichkeit des Strom-Spannungswandlers mit einer hohen Bandbreite (100 kHz), mit dessen Hilfe kleine elektrische Ströme gemessen

werden können. Diese kleinen Signale werden leicht vom elektrischen Hintergrundrauschen (bis zu einigen pA) überlagert. Es wird versucht, das Signal-Rauschverhältnis zu optimieren. Eine der wesentlichen Störquellen ist die Einstreuung des elektromagnetischen Wechselfeldes (öffentliches Spannungsnetz). Diese Störung wird durch den Faraday-Käfig (Abb. 3.3) stark reduziert. Die Geräte innerhalb des Käfigs (wie z.B. Oszilloskop oder Verstärker) werden mit Gleichstrom ($\pm 15\text{ V}$) betrieben. Die Netzgeräte dafür stehen außerhalb des Käfigs (links in Abb. 3.3). Jedes einzelne Gerät sowie der gesamte Versuchsaufbau werden an einer zentralen Stelle geerdet. Alle Leitungen, die eine Verbindung vom Innenraum zum Außenraum des Faraday-Käfigs haben, werden abgeschirmt und die dazugehörigen Geräte geerdet. Der Pipettenhalter für die Patch-Elektrode war direkt auf einem externen Gehäuse befestigt, das die Vorverstärkerstufe enthielt, um den Weg des Originalsignals bis zur ersten Verstärkerstufe möglichst klein zu halten. Für den Übergang vom Elektrolyt zur Elektronik wurden chlorierte Silberelektroden (Ag/AgCl, im Bad und in der Pipette) verwendet, da sie nicht polarisierbar sind.

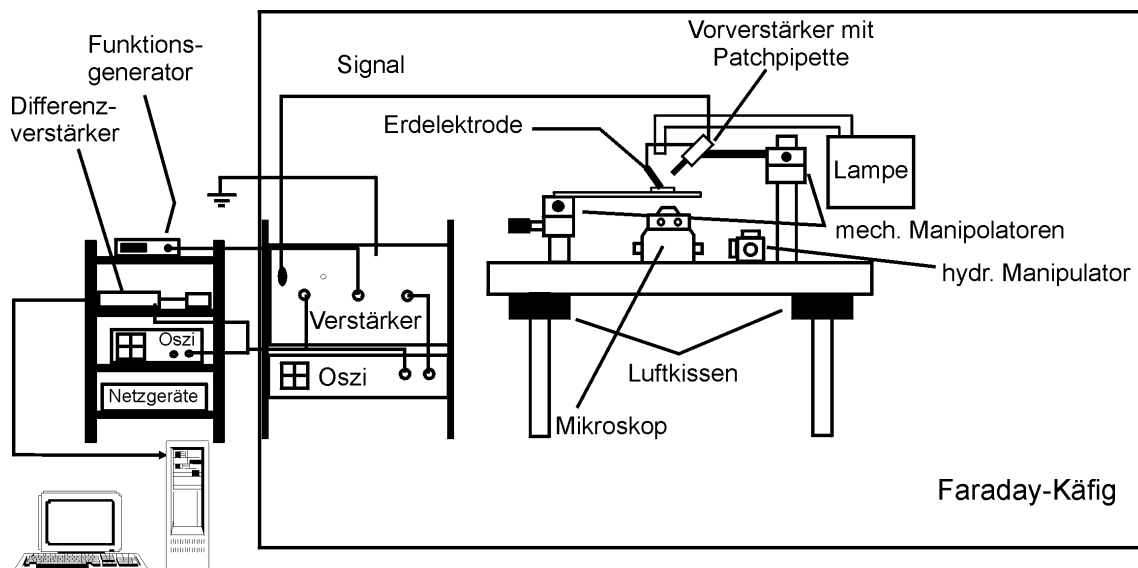


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes. Die Netzgeräte befinden sich außerhalb des Faraday-Käfigs, damit keine Störungen auftreten. Um mechanische Störungen abzuschirmen, steht der Messaufbau auf einem luftgelagerten Tisch.

Um den Versuchsaufbau vor mechanischen Erschütterungen von außen (z. B. Schritte oder Schließen von Türen) abzuschirmen, stehen das inverse Mikroskop (Zeiss ID02) und der Messaufbau auf einem luftgelagerten Tisch (Mitte in Abb. 3.3). Sehr niederfrequente Schwingungen werden zusätzlich durch eine extrem schwere Tischplatte gedämpft. Jegliche Stöße mit der Messapparatur sollten während einer Messung vermieden werden.

Die Plexiglaspetrischale ($\varnothing = 30$ mm), in der sich die Vesikel in der Badlösung befinden, liegt auf einem Objektisch, der an einer Säule befestigt ist. Diese Vesikel, die gepatcht werden sollen, haften am Glasboden. Durch die Haftung rollen sie beim Andocken der Patchelektrode nicht weg. Der Objektisch kann mit einem mechanischen Manipulator (Abb. 3.3) in zwei Dimensionen (vorwärts-rückwärts, rechts-links) bewegt werden. Der Pipettenhalter mit seinem Vorverstärker (Abb. 3.3) ist auf einem dreidimensionalen hydraulischen Manipulator (Micro Control, Frankreich) befestigt. Für die grobe Positionierung des Pipettenmanipulators steht ein dreidimensionaler mechanischer Manipulator zur Verfügung, weil der hydraulische Manipulator aufgrund seiner hohen Genauigkeit für das Aufsetzen der Pipette auf die Membran einen zu engen Einstellbereich hat.

Über einen Schlauch an der Pipettenhalterung konnte Druck auf die Flüssigkeit in der Pipette ausgeübt werden. Der Schlauch war über einen Drei-Wege-Hahn entweder mit einer Schlauchschleife, in der eine Wassersäule zum Erzeugen eines Überdrucks stand, verbunden oder mit einem Mundstück, über das durch Ansaugen ein Unterdruck erzeugt werden konnte.

Damit im Sommer die Erhöhung der Raumtemperatur die Messungen nicht beeinflusst, wurde ein Klimagerät (Pinguino, DeLonghi, Treviso, Italien) in die Türöffnung gestellt. Das Bilden des Gigaseals bei *Chara* wird bei hohen Temperaturen immer schwieriger. Durch das Klimagerät ergab sich die Möglichkeit, auch an warmen Sommertagen zu messen.

3.3.1 Elektronik des Aufbaus und Datenerfassung

Für die Messung stand zuerst eines der Standardgeräte, der L/M -EPC7 (List, Darmstadt) mit einer Bandbreite von 100 kHz und einem Rückkopplungswiderstand R_f von 10 G Ω , und später ein integrierender Patch-Clamp-Verstärker (Dagan 3900 A, USA) mit einer Bandbreite von 250 kHz zur Verfügung. Die Schaltungen der Verstärker sind einander ähnlich. Die Spannung baut sich statt an einem Rückkopplungswiderstand am Kondensator auf, der aber in gewissen zeitlichen Abständen entladen werden muss. Der Nachteil dieser Entladung ist, dass die gemessenen Zeitreihen bei der folgenden Analyse, wie dem Direkten-Zeitreehen-Fit (Abschnitt 4.5), nicht gefittet werden können. Der Vorteil liegt im geringeren Rauschen. Um die Messungen für den Direkten-Zeitreehen-Fit trotz der Entladungspeaks auswertbar zu machen, müssen die Abtastwerte vorher in einem weiteren Programm ab einem gewissen Schwellenwert, der den Start des Fits nicht zulässt, abgeschnitten werden. Der Schwellenwert ist eine variable Größe und bei jeder Messung verschieden. Es wurde normalerweise ein Wert ausgewählt, der etwas unterhalb des gesamten Schaltprozesses liegt. Der eigentliche Schalt-

prozess wurde durch das Abschneiden einiger Abtastpunkte nicht beeinflusst. Es wurden somit nur die Werte abgeschnitten, die durch die Entladung des Kondensators zustande gekommen sind.

Das Anlegen der Spannung beim Dagan-Verstärker unterscheidet sich auch vom Anlegen bei anderen Verstärkern wie z. B. dem EPC7. Die Sollspannung wird hierbei an die Badelektrode gelegt, und die Pipettenspitze wird auf Null gehalten. Somit unterscheiden sich die Werte der Haltespannung im Vorzeichen. Zusätzlich zur angelegten Membranspannung kann an beiden Verstärkertypen eine Offsetspannung addiert werden. Die Offsetspannung kann zum Kompensieren der auftretenden Kontaktspannungen, die zwischen den Übergängen der Elektroden und Elektrolyten entstehen können, verwendet werden. Als externe Spannung wurde ein Rechtecksignal zum Überprüfen des Sealwiderstands angelegt.

Als Anti-Aliasingfilter für die Datenerfassung dient ein 4-poliger Besselfilter. Die Filterfrequenz betrug bei diesen Messungen 25 kHz. Bessere Rauschreduzierung in späteren Messungen ermöglicht die Erhöhung der Grenzfrequenz auf 50 kHz. Das Ausgangssignal des Besselfilters wird dann an einen digitalen Signal-Prozessor (DSP) weitergeleitet (Dalanco, Spry, USA). Dieses Board kann das Signal bis zu 200 kHz abtasten (Albertsen, 1992). Es war bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen beim 25 kHz Filter auf 100 kHz und beim 50 kHz Filter auf 200 kHz eingestellt. Dadurch kommt es nicht zu einem Verstoß gegen das Abtasttheorem.

Die Daten werden per Knopfdruck durch das Aufnahmeprogramm „Sample“, das den DSP ansteuert, am seriellen Eingang eines PCs gestartet (Albertsen, 1992). Es werden bei verschiedenen Spannungen Aufnahmen gemacht. Die Dauer jeder Aufnahme beträgt 20 Sekunden. Je länger die Messzeit ist, desto kleiner ist die Streuung, aber desto kleiner wird auch die Wahrscheinlichkeit, dass das Gigaseal bestehen bleibt, besonders bei hoher Haltespannung. In dem Aufnahmeprogramm werden die Samplefrequenz und die Länge des Messfiles dokumentiert. Dabei werden auch einige Einstellungen des Verstärkers wie Gain und Filterfrequenz abgefragt.

3.3.2 Erdelektrode

Die Erdelektrode besteht aus einer Glaspipette von ca. 5 mm Durchmesser oben und ca. 2 mm Durchmesser der Spitze, in der sich ein nicht-polarisierbarer Ag/AgCl-Draht befindet, der von einer Elektrolytlösung umgeben ist. Hierfür wird meistens die Lösung benutzt, die auch das Bad der Messzelle enthält (z. B. 250 mM KNO_3 , 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). Die Elektrodenlösung darf aber keinen Einfluss auf die Lösung in die Petrischale haben, besonders bei unterschiedlichen Lösungen. Deshalb wird die Elektrolytlösung mit 3% Agar-Agar bei der Füllung der Elektrode unter Rühren (Magnetrührer) aufgeköcht. Das Agar-Agar unterbindet den Ausfluss der Lösung aus der

Erdelektrode. Die gekochte Lösung wird in eine Pasteurpipette gegeben und abgekühlt. Ein angebohrter Stopfen wird soweit wie möglich in das Pipettenende geschoben. Es wird darauf geachtet, dass sich keine Luftbläschen bilden, damit durchgehende Leitung gewährleistet ist. Sie wird über Nacht gekühlt, und am nächsten Tag wird ein chlorierter Silberdraht (Ag/AgCl; $\varnothing = 1\text{mm}$) bis zur Hälfte in die Pasteurpipette gesetzt. Die Chlorierung führt dazu, dass der Draht nicht polarisierbar wird. Die Pipettenelektrode wird in Kapitel 5 ausführlich erklärt.

3.4 Das Patchen

Aus einem Anzuchtbecken werden einige Internodialzellen von *Chara corallina* entnommen, und die Radialzellen werden von den Internodialzellen entfernt. Die Internodialzellen der Alge werden dann für die Vorbereitung des Versuchs, nachdem sie 10 Minuten getrocknet sind, aufgeschnitten, und der Zellinhalt wird vorsichtig in der Lösung der Petrischale ausgedrückt. Es bilden sich Vesikel (Tröpfchen), die am Boden der Petrischale haften. Je kleiner die Krümmung der Vesikeloberfläche ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Bildung des Gigaseals. Da die Vesikel einen Durchmesser um die $50\ \mu\text{m}$ haben, wird ein invertierendes Mikroskop (Zeiss ID02) mit einem Objektiv von $5\times$, $10\times$ und $20\times$ verwendet.

Die Messpipette wird mit der gewünschten Lösung bis zur Hälfte gefüllt. Obwohl die Lösung aufgrund der Kapillarkräfte bis in die Pipettenspitze kriecht, ist es wichtig, mit der Injektionsnadel möglichst tief in die Pipette zu injizieren. Dabei muss darauf geachtet werden, dass sich an der Pipettenspitze keine Luftblasen bilden, die zu einer Unterbrechung des elektrischen Leitungsweges führen. Daher wurden die Spritzen mit einer MicroFil-Nadel (MF34G, World Precision Instruments, Inc.) mit einem Innendurchmesser von $0.1\ \text{mm}$ gefüllt. Damit wurden die Pipetten besonders in der Spitze, wo der Innendurchmesser sehr eng ist (besonders bei Quarzpipetten, Abschnitt 5.2.2), besser befüllt als mit herkömmlichen Nadeln.

Danach wird die Pipette auf den Halter gesteckt und in die Lösung getaucht. Mit dem Mund wird, bevor die Pipette in die Lösung eingetaucht wird, über den seitlich angebrachten Schlauch ein Überdruck erzeugt. Durch diesen Überdruck wird der Schmutz am Pipettenmund weggeblasen, so dass die Pipettenspitze beim Durchfahren der Lösung nicht durch herumschwimmende Tropfentrümmer verunreinigt wird. Bei eingetauchter Pipette wird der Offsetstrom im Verstärker (Abschnitt 3.3.1) auf Null kompensiert. Kriechströme (Salzbrücken) am Pipettenhalter führen zum Offset, die nicht kompensierbar sind. Diese müssen durch intensives Spülen des Pipettenhalters mit destilliertem Wasser und extremer Trocknung (Pressluft) entfernt werden. Diffusions-

spannungen an der Erdelektrode rühren von Verschmutzungen her und sollten zum Erneuern der Elektrode führen.

Wenn sich der Offset ausgleichen lässt, folgt das Anlegen einer Rechteckspannung für die Kontrolle des Sealvorganges. Der von ihr erzeugte Strom wird kleiner, wenn das Seal die Pipette verschließt. Die Pipette wird mit Hilfe des Mikromanipulators in die Nähe des Vesikels gebracht. Sie wird schräg bis senkrecht von oben auf das Vesikel zubewegt. Kurz vor Berührung der Membran wird ein Unterdruck erzeugt, so dass das Vesikel an die Pipette herangezogen wird. Am Oszillographen wird beobachtet, dass bei Sealbildung der rechteckige Pipettenstrom zusammenschrumpft. Bei einem hieraus ermittelten Widerstand im Giga-Ohm-Bereich ist die Verbindung zwischen dem Glasrand der Pipettenöffnung und der Membran fest. Es wird von einem Gigaseal gesprochen. Die Pipette wird dann ruckartig zurückbewegt, und es bildet sich ein „Excised-Patch (Inside-Out)“ (Abschnitt 3.2.1). Das am Pipettenmund klebende Membranstück (Patch) wird dabei aus der Zelle herausgerissen. Danach wird der Patch dicht unter die Oberfläche gebracht und somit das Rauschen reduziert (Keunecke, 1995; Farokhi *et al.*, 2000; Abb. 5.1). Dann wird die Aufnahme durch den Rechner außerhalb des Faraday-Käfigs über eine Fernbedienung von innen gestartet. Vorher wird noch die Empfindlichkeit des Verstärkers auf 100 mV/pA erhöht. Die Messungen werden dann bei verschiedenen Haltespannungen vorgenommen.

Bei den hier vorgestellten Messungen ergeben sich große Datenmengen, die mit Hilfe mathematischer Methoden ausgewertet werden. Diese werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

4 Mathematische Analysemethoden

Für die Beschreibung der Funktionsweise von Kanälen werden mathematische und physikalische Modelle angewendet, die den Mechanismus des Transportes der Ionen durch den Kanal erklären.

4.1 Markov-Modelle

Das Hauptmodell für die Beschreibung dieser Transportvorgänge sind Markov-Modelle. Markov-Modelle sind formale Gating-Modelle, die das Schaltverhalten der Kanäle durch Übergänge zwischen diskreten offenen und geschlossenen Zuständen beschreiben (Colquhoun und Hawkes, 1977, 1981, 1982, 1987, 1990; Korn und Horn, 1988; Ball und Samson, 1988; Ball und Rice, 1992). Ziel der Analyse ist die Ermittlung der Anzahl von „open“ und „closed“ Zuständen, ihrer Anordnung zueinander und die Bestimmung der Ratenkonstanten k_{ij} (Übergangswahrscheinlichkeit von Zustand i in Zustand j).

Haben mehrere Zustände eines Modells gleiche Symbole (nicht unterscheidbare Zustände) wird es als Hidden-Markov-Modell bezeichnet (Chung *et al.*, 1990, 1991, 1998; Klein *et al.*, 1997; Yeo *et al.*, 1988; Fredkin und Rice, 1992).

Für eine stochastische Betrachtung der Schaltvorgänge der Kanäle auf der Grundlage eines Markov-Modells gibt es zwei einfache Voraussetzungen. Eine der Voraussetzungen besteht darin, dass das System kein Gedächtnis hat. Das bedeutet, dass ein Übergang von einem Zustand in einen anderen nicht von vorherigen Übergängen abhängt. Die andere Voraussetzung ist, dass die Ratenkonstanten k_{ij} nicht von der Besetzung der Zustände abhängig sind (Linearität des Systems, Colquhoun und Hawkes, 1977).

Das zeitliche Verhalten dieses Modells wird durch ein System von Differentialgleichungen erster Ordnung beschrieben, das durch eine Exponentialfunktion gelöst wird.

$$\frac{dR(t)}{dt} = K \cdot R(t) \quad (4.1)$$

Die Elemente des Vektors $R(t)$ sind die Besetzungswahrscheinlichkeiten jedes einzelnen Zustandes. Die Matrix K bildet sich aus den Ratenkonstanten k_{ij} . Die k_{ij} sind auf eine unendlich kurze Zeit normiert. p_{ij} sind Übergangswahrscheinlichkeiten, die auf eine endliche Zeit normiert sind. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Übergangswahrscheinlichkeiten ist durch folgende Gleichung gegeben (Albertsen und Hansen, 1994).

$$\frac{dP(t)}{dt} = P(t) \cdot K \quad (4.2a)$$

$$P(t) = e^{Kt} \quad (4.2b)$$

Für die Beschreibung der Aufenthaltszeiten in einem Zustand des Markov-Modells wird eine Summe von Exponentialfunktionen benötigt (Colquhoun und Hawkes, 1977, Blunck *et al.*, 1998). Wenn mehrere Zeitkonstanten vorkommen, existieren mehrere Zustände, die voneinander unabhängig sind.

Mit Hilfe dieses Markov-Modells können stochastische Betrachtungen über das Schaltverhalten der Kanäle gemacht werden. Daher beruht die weitere Analyse auf Markov-Modellen.

4.2 Bestimmung von Kanalzahl, Niveaus und Standardabweichung

Die Auswertung einer Zeitreihe beginnt mit der Festlegung von Stromniveaus, der Anzahl der Kanäle und dem Signal-Rausch-Verhältnis. Im folgenden wird ihre Bestimmung beschrieben. Der erste Ansatz erfolgt visuell auf dem Bildschirm durch Positionieren von Linien in der Mitte der Niveaus der Zeitreihen. Eine Kontrolle ergibt sich durch den Fit der Amplitudenhistogramme mit einer Summe von Gauß-Funktionen. Dabei muss die Anzahl der Niveaus vorgegeben werden. Die Analyse des Schaltverhaltens (Gating-Analyse) folgt darauf unter Benutzung der in der Arbeitsgruppe entwickelten Computerprogramme „day“ (Draber, 1994; Kirst, 1997; Radomski, 2000) und „downhill“ (Albertsen 1994, Albertsen und Hansen 1994).

In Abbildung 4.1 ist eine Zeitreihe der Grünalge *Chara corallina* in K^+ -haltiger Lösung dargestellt. Die Zeitreihe wurde bei einer Haltespannung von -80 mV aufgenommen. Es können sechs unterschiedliche Niveaus erkannt werden. Das obere Niveau ist das Nullniveau, bei dem alle Kanäle geschlossen sind. Diese Zeitreihe besteht aus fünf gleichartigen Kanälen mit je einem Einzelkanalstrom von -15.1 pA. Das Schalten aller

Kanäle ist deutlich sichtbar. Es ist auch erkennbar, dass die Kanäle für längere Zeit geschlossen bleiben, oder sich in einem der offenen Zustände aufhalten. Das Verweilen auf den offenen Niveaus wird durch kurze Geschlossenzustände (Gaps) einer der fünf Kanäle unterbrochen. Dieses Schaltverhalten wird als Burst bezeichnet. Einige Bursts sind teilweise nicht gut erkennbar, und die Gaps erreichen das Nullniveau nicht mehr. Dieses Verhalten deutet auf schnelles Schalten hin, in dem die Offenereignisse nur für kurze Zeit existieren. Aber durch längere Aufenthaltszeiten, die im Schwanz der Verteilungsfunktionen der Verweildauern in den unterschiedlichen Zuständen auftreten, können die unterschiedlichen Niveaus gut erkannt werden.

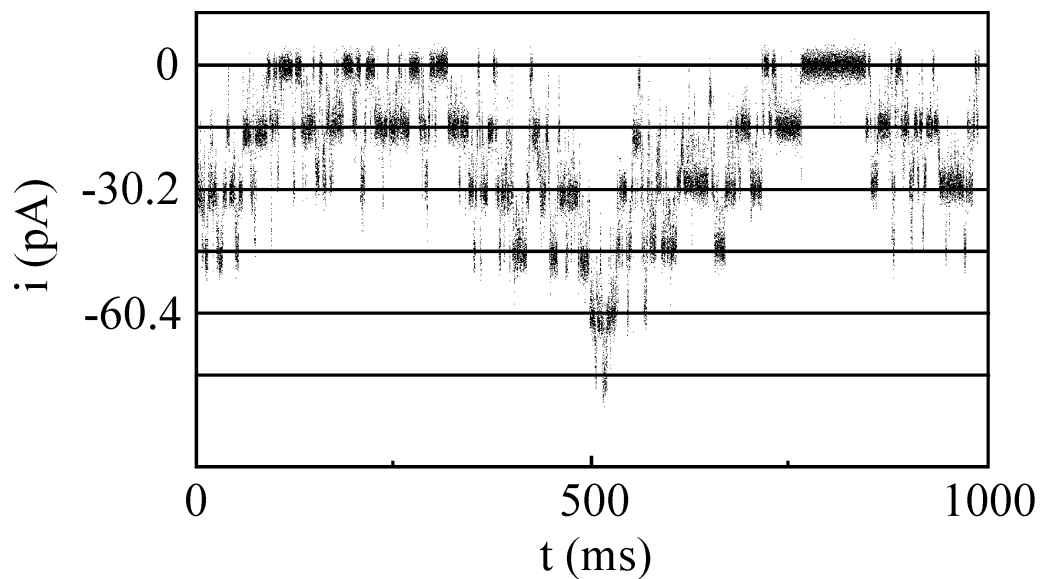


Abbildung 4.1 : Typischer Zeitverlauf der Einzelkanalströme von fünf Kanälen in einer Lösung mit K^+ -Ionen bei Raumtemperatur und $V_{\text{hold}} = -80$ mV. Der Strom wurde mit 200 kHz abgetastet und mit 50 kHz gefiltert. Die Konzentration beträgt 200 mM KNO_3 . Das Schaltverhalten der fünf Kanäle zwischen den unterschiedlichen Niveaus ist gut erkennbar. Die Linien verlaufen durch die Mitte der einzelnen Niveaus.

Die klassische Methode zur Bestimmung des Rauschens geht von der Darstellung der Zeitreihe als Amplitudenhistogramm aus. Zur Erstellung eines Amplitudenhistogramms werden in einem bestimmten Zeitintervall die Messwerte, die im Bereich von k bis $k+\Delta k$ liegen, gezählt. Deren Anzahl wird dann über k aufgetragen. Das Rauschen ergibt sich aus der Breite der Verteilung (Abb. 4.2).

Im Amplitudenhistogramm können die Niveaus auch durch einen Fitalgorithmus auf der Grundlage der folgenden Gleichung ermittelt werden.

$$f(y_k) = \sum_{s=1}^m c_s \exp\left(-\frac{(Y_s - y_k)^2}{2\sigma_s^2}\right) \quad (4.3)$$

$f(y_k)$ Amplitudenhistogramm
 S Zustand
 Y_s Stromniveau
 y_k Strom zur Zeit k
 σ_s Standardabweichung
 c_s Amplitude
 sind.

Hierzu muss aber die Anzahl m der Kanäle bekannt sein. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass sich der Fit bei schlechten Startwerten verläuft. Daher beginnt die Analyse mit der ersten Methode (Fit-by-Eye).

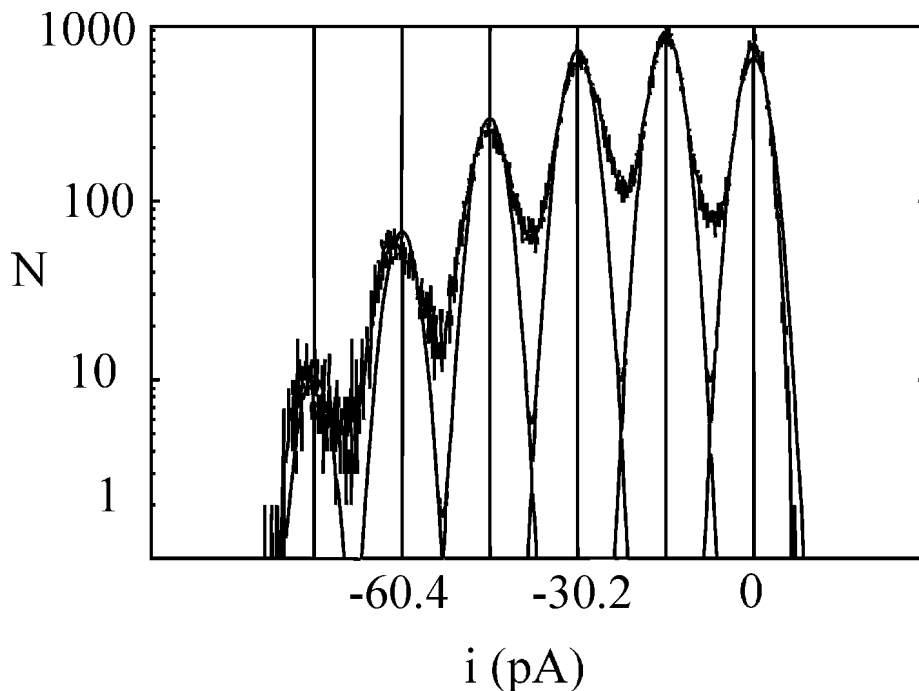


Abbildung 4.2: Amplitudenverteilung der Zeitreihe aus Abb. 4.1, die durch Gaußverteilungen (Gleichung 4.3) angenähert ist. Die senkrechten Linien verlaufen durch die einzelnen Stromniveaus.

Beim Fit-by-Eye wird von der Möglichkeit des Programms „day“ ausgegangen, mit den Cursorstasten unter visueller Kontrolle Linien durch die vermeintlichen Stromniveaus zu legen (Abb. 4.1). Da das menschliche Gehirn über eine exzellente Bilderkennungssoftware verfügt, ist die hiermit erreichte Genauigkeit der Niveaubestimmung bereits sehr gut (Rießner *et al.*, 2002).

Diese Niveau-Werten (Y_s in Gleichung 4.3) werden dann ins Amplitudenhistogramm übertragen. Hier kann ebenfalls mit den Cursortasten die Lage und Breite der Gaußfunktionen verändert werden und erreicht im allgemeinen bereits in kurzer Zeit einen guten Fit. Danach wird überprüft, ob durch einen Fit des Amplitudenhistogramms mit diesen Startwerten die Näherung weiter verbessert werden kann. Als Fitstrategie kommt der Simplex (entwickelt von Nedler und Mead, 1965; als Programm dargestellt von Caceci und Cacheris, 1984) zum Einsatz. Die Nachkorrektur durch das Fitten ist zumeist sehr gering.

Nachdem die Niveaus, ihre Anzahl und die Standardabweichung bestimmt worden sind, wird die Gating-Analyse der Zeitreihe durch einen Hinkley Detektor 8. Ordnung, der für die Sprungerkennung benutzt wird (Abschnitt 4.3, Schultze und Draber, 1993; Hansen *et al.*, 1995), durchgeführt. Das ergibt die idealisierte Zeitreihe (Abb. 4.3), die für die Erstellung der Verweildauerhistogramme (Abb. 4.5) benötigt wird.

4.3 Rekonstruktion der Zeitreihe mit dem Hinkley-Detektor

Um die biophysikalischen Mechanismen des Schaltverhaltens eines Kanals mit Markov-Modellen (Abschnitt 4.1) beschreiben zu können, muss mit Hilfe eines Algorithmus aus der verrauschten Zeitreihe des Stroms durch die Membran (Abb. 4.1) eine ideale Zeitreihe (ohne Rauschen, Abb. 4.3) möglichst fehlerfrei rekonstruiert werden.

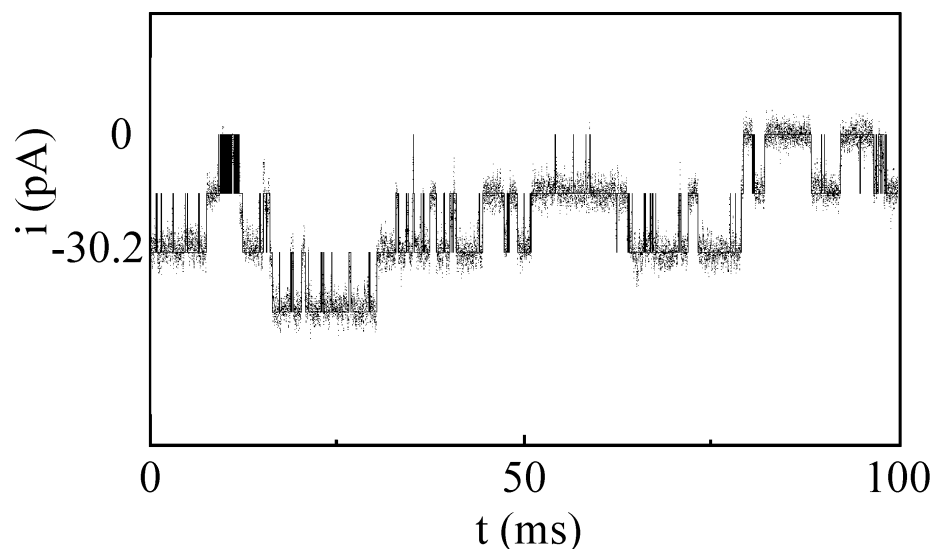


Abbildung 4.3: Ein Ausschnitt aus der verrauschten Zeitreihe mit drei Kanälen (Abb. 4.1), die mit dem Hinkley-Sprungdetektor idealisiert wurde.

Der am häufigsten verwendete Algorithmus benutzt ein Tiefpassfilter mit nachfolgendem Schwellenwertdetektor, der für die Detektion eines Sprungs auf die halbe

Sprunghöhe eingestellt ist. Schultze und Draber (1993) führten den Hinkley-Detektor (Page, 1954, 1955; Hinkley, 1971) erster und höherer Ordnung mit einem besseren Auflösungsvermögen in die Patch-Clamp-Analyse ein.

Der Hinkley-Detektor benötigt für die Detektion eines Sprungs zwischen zwei Niveaus wie alle anderen Detektoren die Anzahl und die Lage der Stromniveaus (Abschnitt 4.2). Der Algorithmus des Hinkley-Detektors funktioniert so, dass aus den Messpunkten der Zeitreihe z_t ein Testwert g_t berechnet wird, der aus der Summe der vorherigen Testwerte $g_{(t-1)}$ und der Differenz des Messwertes vom Absprungniveau e_t sowie dem Mittelwert p der Niveaus i und j entsteht und schließlich diesen Testwert mit einer Schranke λ vergleicht (Schwellenwertdetektor) (Abb. 4.4). Negative Testwerte werden auf Null gesetzt. In dem Falle werden alle vorhergehenden Werte nicht mehr berücksichtigt. Der Detektor bleibt immer „wach“, und es treten keine unnötigen Verzögerungen der Sprungdetektion auf.

$$g_t^\pm = \max \begin{cases} g_{t-1}^\pm + (\pm e_t - p) \\ 0 \end{cases} \quad (4.4)$$

wobei

$$g_0 = 0$$

$$p = (\mu_1 - \mu_0) / 2$$

μ_0 : Absprungniveau

μ_1 : Zielniveau

$$e_t = z_t - \mu_0$$

\pm : Sprung nach oben (+) bzw nach unten (-)

sind.

Ohne Rauschen gilt vor dem Sprung $z_t = \mu_0$ ($e_t = 0$). Daraus folgt, dass $g_t = 0$. Nach einem Sprung ist $z_t = \mu_1$, und g_t steigt linear mit einer Steigung von $(\mu_1 - \mu_0) / 2$ an. Die Schranke λ wird bei einer Zeitauflösung t_{res} erreicht, und es gilt dann:

$$\lambda = \frac{\mu_1 - \mu_0}{2} t_{res} \quad (4.5)$$

λ bestimmt die Empfindlichkeit des Detektors, und alle Ereignisse, die länger als t_{res} dauern, werden detektiert.

Bei falscher Wahl der Auflösung kann der Detektor eine Änderung des Testwertes, die durch das Rauschen verursacht wurde, fälschlich als ein Ereignis interpretieren (false alarms). Bei einer Anpassung von λ an das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) wurde gezeigt, dass der Fehler (false alarms) für

$$t_{res} = \text{colorconst} \frac{T}{SNR} \quad (4.6)$$

unter der Schranke $1:10^4$ bleibt (Schultze und Draber, 1993).

wobei

T Abtastperiode
 colorconst Eine Konstante, die von der Farbe des Rauschens abhängig ist (weiß: 22,
 blau: 32)

sind.

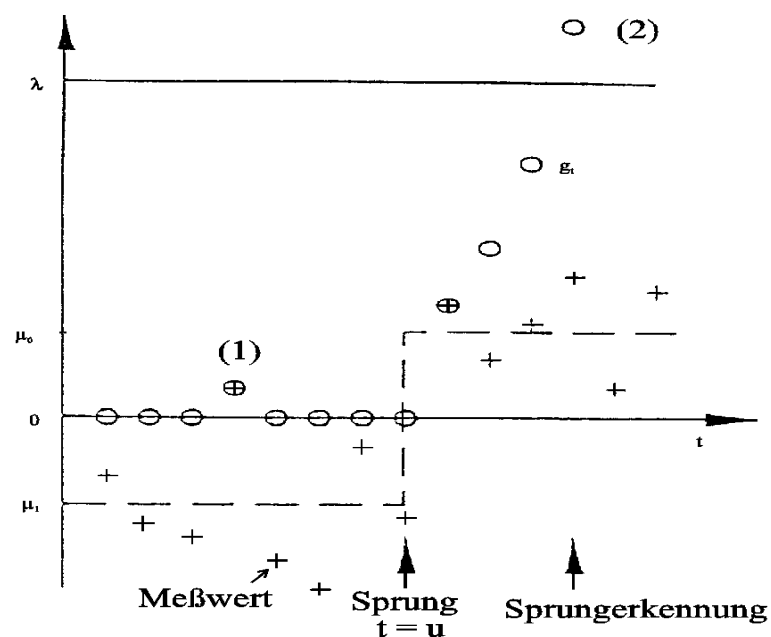


Abbildung 4.4: Erkennung eines Sprungs aus einer verrauschten Zeitreihe $z_t (+)$ mit Hilfe des Hinkley-Detektors. Wenn der Testwert die Schwelle λ erreicht (2), wird ein Sprung detektiert. Nach dem Sprung wird die Sprungzeit auf den letzten Wert, an dem der Testwert Null betrug, festgelegt. Die gestrichelte Linie ist die ideale Zeitreihe. Die Wahl $\mu_0 + \mu_1 = 0$ ist keine Voraussetzung des Algorithmus.

Der Sprungzeitpunkt ist der letzte Zeitpunkt, an dem $g_t = 0$ ist. Nach dem Sprung wird der Testwert wieder auf Null gesetzt, und der Detektor wird für die Detektion der nächsten Sprünge eingestellt. Bei einem Niveau, in dem Sprünge nach oben und nach unten möglich sind, werden zwei parallel laufende Detektoren, die gleichzeitig nach oben und nach unten schauen, benötigt.

Beim Higher-Order-Hinkley-Detektor wird anstelle der einfachen Ordnung des Algorithmus eine höhere Ordnung benutzt. Diese unterdrückt die hochfrequenten

Rauschanteile stärker als bei der ersten Ordnung des Algorithmus. Der Testwert der höheren Ordnung lässt sich berechnen als

$$g_t^i = \max \begin{cases} g_{t-1}^i + Tg_t^{(1)} & \text{für } g_t^{(1)} \geq 0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (4.7)$$

g_t^i Testwert i-ter Ordnung.

Bei einer Überschreitung des Testwertes g^i über die Schranke λ wird ein Sprung erkannt. Die Testwerte werden alle wie beim Hinkley-Detektor erster Ordnung gleich Null gesetzt, wenn $g^i < 0$ ist. Das Prinzip des Higher-Order-Hinkley-Detektors entspricht dem des ursprünglichen Hinkley-Detektors.

Die schnellen Schaltereignisse werden allerdings bei dieser Detektion nicht erkannt. Diese sogenannten Missed-Events führen auch zur Verfälschung der langen Schaltereignisse. Hierfür gibt es Missed-Events-Korrekturen (Crouzy und Sigworth, 1990; Draber und Schultze, 1994). In Kapitel 9 wird gezeigt, dass die erreichbaren Verbesserungen dieses mathematisch aufwendigen Verfahrens sehr gering sind.

Aus der durch den Hinkley-Detektor idealisierten Zeitreihe werden die Dwell-Time-Histogramme erhalten, mit deren Hilfe die Anzahl der Leitfähigkeitszustände eines Kanals (Anzahl der Symbole des Markov-Modells) gewonnen wird (Abschnitt 4.4).

4.4 Dwell-Time-Analyse

Die Dwell-Time-Verteilung gibt die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Aufenthaltszeit in den verschiedenen Stromniveaus wieder. Zuerst muss die gemessene Zeitreihe einen Sprungdetektor (Abschnitt 4.3) durchlaufen. Aus der idealisierten Zeitreihe wird die Anzahl der gefundenen Verweildauern zwischen t und $t+\Delta t$ und pro Stromniveau zu Histogrammen zusammengestellt. Das Dwell-Time-Histogramm gibt somit an, wie häufig die Verweildauer zwischen t und $t+\Delta t$ auftrat. Die Dwell-Time-Histogramme, die der Sprungdetektor ausgibt, sind in 500 "Bins" (Abszissenbereiche Δt) eingeteilt. Um das statistische Gewicht im Bereich der längeren Ereignisse zugunsten derer bei kurzen Zeiten zu reduzieren, werden die Daten in exponentiell wachsenden Zeitintervallen gemittelt. Die Anzahl der Bins reduziert sich damit auf 50.

Nach Colquhoun *et al.* (1996) bewirken die Missed-Events, dass die Dwell-Time-Histogramme mit einer Funktion $t^n \exp(-t/\tau)$ gefittet werden müssen. Dadurch ergibt sich ein ansteigender Teil in den Dwell-Time-Histogrammen. Colquhoun *et al.* (1996) haben gezeigt, dass τ gut zu bestimmen ist, wenn die ersten Werte am ansteigenden Ast

weggelassen werden. Dies gibt einen groben Anhaltspunkt für den Bereich, in dem die Zeitkonstanten noch einigermaßen gut bestimmt werden können.

Der Sprungdetektor ist das kritische Element in dieser Analyse. Die Analyse der Histogramme wird außerdem ungenau, wenn nicht genügend Daten zur Verfügung stehen (Schrotrauschen, Schottky, 1922).

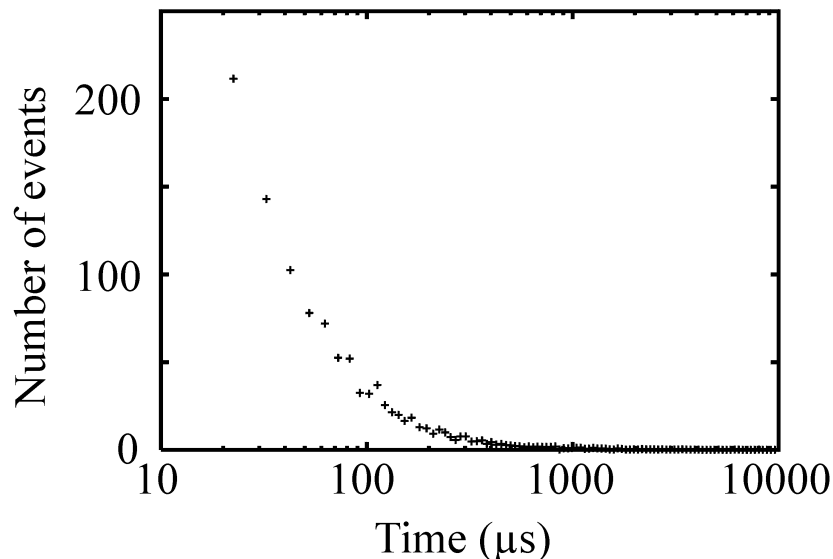


Abbildung 4.5: Dwell-Time-Histogramm des geschlossenen Niveaus der Zeitreihe aus Abb. 4.1.

Blunck (1996, Blunck *et al.*, 1998) modifizierte die Theorie der Auswertung von Dwell-Time-Histogrammen von Kijima und Kijima (1987a,b) derart, dass eine Mehrkanalanalyse einfacher wurde. Hierbei werden die Dwell-Time-Histogramme mit Summen von e-Funktionen gefittet, wie es aus der Theorie der Markov-Prozesse folgt (Abschnitt 4.1). Eine der wichtigsten Fragen ist die Auswahl des „richtigen“ Modells. Die Anzahl der Zustände des Markovmodells ist abhängig von der Anzahl der Exponentialfunktionen, die für das Fitten der Dwell-Time-Histogramme benötigt werden.

Während in der Literatur allgemein die Ermittlung der Zeitkonstanten τ_i und der Amplitudenfaktoren d_i das Ende der Analyse darstellen, geht der Target-Fit weiter. Das Ziel der Analysen sind die Ratenkonstanten k_{ij} .

Die Mehr-Kanal-Mehr-Zustands-Dwell-Time-Analyse als Target-Fit (Blunck *et al.*, 1998) wurde durchgeführt, indem die einzelnen Kanäle zu einem Macro-Kanal zusammengefügt wurden. Im Falle des 2-Kanal-5-Zustands-Modells (A-O-G-C-Z, wobei A und O die Offen- und G, C und Z die Geschlossen-Zustände repräsentieren) werden die 25 Zustände des Macro-Kanals durch alle Kombinationen von zwei Kanälen [S1, S2]

erzeugt, wobei S1 und S2 die Zustände A, O, G, C oder Z bedeuten. Die Übergangsraten des Macro-Kanals κ_{rs} werden aus den Übergangsraten k_{ij} des Einzelkanal-Modells berechnet

$$\kappa_{rs} = b_i^{(r)} \cdot k_{ij} \quad (4.8a)$$

$$-\kappa_{rr} = \sum_{\substack{s=1 \\ s \neq r}}^B \kappa_{rs} = \sum_{i=1}^Q \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^Q b_i^{(r)} \cdot k_{ij} \quad (4.8b)$$

wobei $b_i^{(r)}$ die Komponenten eines Vektors darstellen, die beschreiben, ob Übergänge vom Macro-Zustand r mit den Einzelkanal-Ratenkonstanten k_{ij} möglich sind oder nicht. Q ist die Anzahl der Zustände des Einzelkanals.

O. B. d. A. $y_m(t)$ für die Verweildauer im Strom-Niveau Y_m ist

$$y_m(t) = \sum_{i=1}^{B_m} d_i^{(m)} \exp(\lambda_i^{(m)} t) \quad (4.9)$$

$$d_i^{(m)} = 2 S_m \sum_{r \in Y_m} R_r^{(m)}(\infty) v_r^{(m,i)} \cdot \left(\sum_{r \in Y_m} \sum_{s \notin Y_m} \kappa_{rs} \right)^2 / f_{tr}^{(m)} \quad (4.10)$$

wobei

- m Index des Macro-Zustands-Niveaus,
 - r und s Indices der Macro-Zustände,
 - d_i Amplituden-Faktoren,
 - $\lambda_i^{(m)}$ Eigenwerte,
 - $v_r^{(m,i)}$ Eigenvektoren der Übergangsmatrix,
 - B_m Anzahl der b-Vektoren im Bezug zum Macro-Zustand Y_m
 - $R_r^{(m)}$ Steady-State-Besetzung,
 - S_m Skalierungsfaktor,
 - $f_{tr}^{(m)}$ Durchschnittliche Übergangsfrequenz des Macro-Zustand-Niveaus m
- sind.

Der Target-Fit hat mehrere Vorteile gegenüber dem allgemeinen Zeitkonstantenfit. Die Berechnung der Ratenkonstanten aus den Zeitkonstanten und Amplitudenfaktoren ist sehr kompliziert und mitunter ungenau, auch wenn Jackson (1997) einen neuen Algorithmus dafür vorgeschlagen hat. Noch wichtiger ist, dass die Dwell-Time-Verteilungen für alle Niveaus in einer Mehrkanalaufzeichnung gleichzeitig gefittet werden müssen. Das ermöglicht nur der Targetfit, weil die Beziehung zwischen den Zeitkonstanten der

einzelnen Niveaus sehr komplex ist, und dieser Zusammenhang schwerlich in den Fitalgorithmus eingebracht werden kann.

4.5 Direkte-Zeitreihen-Fit

Alternativ dazu wurde das kinetische Verhalten durch einen direkten Fit der Zeitreihen analysiert, der den Ein-Schritt-Vorhersage-Algorithmus von Baum *et al.* (1970) verwendet. Diese Gleichungen wurden von Chung *et al.* (1990) und Chung und Gage (1998) angewandt, um die Leitfähigkeitsniveaus wiederherzustellen und zu identifizieren. Sie schätzten die Übergangswahrscheinlichkeiten p_{ij} mit Hilfe des Baum-Welch Algorithmus. Um jedoch die Ratenkonstanten k_{ij} der Zustandsübergänge zu schätzen, nutzten Fredkin und Rice (1992) nur den Vorhersage-Schritt in Vorwärtsrichtung. Diese Näherung wurde von Albertsen und Hansen (1994) für die Mehr-Zustands-Mehr-Kanal-Analyse ausgeweitet.

Der Vorhersageschritt in Vorwärtsrichtung ergibt die Variable in Vorwärtsrichtung des Baum-Welch-Algorithmus:

$$a_k(s) = \sum_{r=1}^n a_{k-1}(r) p_{rs} f_s(y_k) \quad (4.11)$$

wobei $a_{k-1}(s)$ die Wahrscheinlichkeit ist, dass der Macro-Kanal zur Zeit $(k-1)\Delta t$ im Zustand s ist. n ist die Anzahl der verschiedenen Niveaus gleicher Leitfähigkeit. Dabei sind beim 2-Kanal-5-Zustandsmodell die Macro-Kanal-Zustände $r, s = [AA, AO, AG, AC, AZ, OA \text{ etc.}]$ wie in der obigen Dwell-Time-Analyse.

p_{rs} ist die Übergangswahrscheinlichkeit, dass das System vom Zeitpunkt $(k-1)\Delta t$ zum Zeitpunkt $k\Delta t$ vom Zustand r in den Zustand s wechselt. Die Übergangswahrscheinlichkeiten (p_{rs}) berechnen sich für das Abtast-Intervall Δt aus den Macro-Kanal-Ratenkonstanten κ_{rs} .

Für kurze Zeitintervalle Δt gilt:

$$p_{rs} = \kappa_{rs} \Delta t \quad (4.12)$$

ansonsten muss mit einer Exponentialfunktion (Kolmogorov-Gleichung ($P = \exp(K\Delta t)$)) gerechnet werden (Albertsen und Hansen, 1994).

Die Wahrscheinlichkeit $a_k(i)$, das System zum Zeitpunkt k im Zustand i zu finden, ist gleich der Summe der Wahrscheinlichkeiten, dass von einem Zustand j in den Zustand i gewechselt wurde.

Das Amplitudenhistogramm $f(y_k)$ wird in Einzelhistogramme aufgespalten (Abb. 4.2, Gleichung 4.13). Dabei ist f_s ein Teilamplitudenhistogramm, das zum Stromniveau Y_s

gehört. Es gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, dass der Zustand s (der zu den Macro-Zuständen s gehört, die den gleichen Strom Y_s verursachen) den Strom y_k verursachen kann, der zur Zeit k gemessen wird. Hierbei wird f_s erhalten, indem das gemessene Amplitudenhistogramm $f(y_k)$ entsprechend Gleichung 4.3 mit einer Summe von Gauß-Funktionen gefittet wird:

$$f(y_k) = \sum_{s=1}^t f_s(y_k) = \sum_{s=1}^t c_s \exp\left(-\frac{(Y_s - y_k)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (4.13)$$

wobei die Standardabweichung (σ) gleich für alle Niveaus Y_s ist, wenn es aus überlagertem Rauschen entsteht. t ist die Anzahl der Niveaus.

Folgende Normierungsbedingung gilt für $f_i(y)$ mit m_i als Anzahl der Zustände gleicher Leitfähigkeit. Da die Ausgangswerte diskret sind, wird eine endliche Summe verwendet mit y_{\max} , das von der Auflösung des Datenerfassungssystems abhängig ist (in unserem Fall, $y_{\max} = 4095$ entsprechend einem 12 bit A/D Konverter).

$$m_i \sum_{y=0}^{y_{\max}} f_s(y) = 1 \quad s \in \{1, 2, \dots, n\} \quad (4.14)$$

Die Likelihood L , die sich aus der gesamten Zeitreihe ergibt, lautet:

$$L = \prod_{k=1}^N \sum_{s=1}^n \sum_{r=1}^n a_{k-1}(r) p_{rs} f_s(y_k) \quad (4.15)$$

Der höchste Wert von L ergibt sich, wenn der gemessene Strom y_k mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ($f_s(y_k)$) dem Zustand zugeordnet wird, der durch den Term ($a_{k-1}(r) p_{rs}$) mit der höchsten Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurde. Ein Downhill-Simplex-Algorithmus (Press *et al.*, 1987) wird verwendet, um die gesetzten Einzelkanal-Ratenkonstanten k_{ij} zu finden, die die größte Wahrscheinlichkeit ergeben. Obwohl in Gleichung 4.15 p_{rs} verwendet wird, werden die Einzelkanal-Ratenkonstanten k_{ij} ausgewertet, da in jedem Iterationsschritt der Fitroutine der Simplex-Algorithmus einen Satz von k_{ij} des einzelnen Kanals vorschlägt. κ_{rs} und p_{rs} werden mit Hilfe von Gleichung 4.8a,b (Blunck *et al.*, 1998) und der bereits erwähnten Kolmogorov-Gleichung ($P = \exp(K\Delta t)$; Albertsen und Hansen, 1994; Albertsen, 1994) berechnet, wobei P und K jeweils die Matrizen von p_{rs} und κ_{rs} sind.

Welcher Wert für $a_0(s)$ gewählt wird, hat bei langen Zeitreihen keinen großen Einfluss auf die Likelihood (Chung *et al.*, 1991).

Selbst bei neueren PCs ist die Rechenzeit dieser Fitroutine nicht zu vernachlässigen. Daher muss beim Direkten-Zeitreeihen-Fit die Anzahl der benötigten Rechenschritte linear mit der Anzahl der Datenpunkte steigen. Der Prädiktionsschritt (Gleichung 4.11) nimmt daher jeweils nur auf den vorherigen Zeitpunkt Bezug.

4.6 Simulation der Zeitreihe

Die Simulationen der Zeitreihen der Hidden-Markov-Modelle wurden mit dem Algorithmus von Rießner (1994) durchgeführt, der bei Blunck *et al.* (1998) beschrieben ist. Das Programm wurde von Woelk (2000) erweitert.

Zwei Zufallsgeneratoren wurden eingesetzt: einer, um die Zeit t des Sprungs zu erkennen (abhängig von der Ratenkonstanten k_{ij}) und einer für den Zielzustand des nächsten Sprungs.

Die Verteilung der Wahrscheinlichkeit $y_m(t)$ für die Aufenthaltslänge t eines Zustandes ist gegeben durch:

$$y_m(t) = d^{(m)} \exp(\lambda^{(m)} t) \quad \text{mit} \quad -k_{ii} = \lambda_i = \sum_{i \neq j} k_{ij} \quad (4.16)$$

Um die Zeit t des Sprungs zu bestimmen, wird in Gleichung 4.16 die erste Zufallszahl für $y_m(t)$ eingesetzt und nach t aufgelöst. Um den Zielzustand des nächsten Sprungs zu bestimmen, wird das Intervall $[0;1]$ in Abschnitte der Länge k_{ij}/λ_i unterteilt. Als Zielzustand wird derjenige ausgewählt, in dessen Bereich die zweite Zufallszahl fallen wird. Nach dem Sprung startet der Algorithmus mit zwei neu gewählten Zufallszahlen von Neuem.

Die Wirkung des Antialiasing-Filters wurde wie folgt eingebaut: die Antwort eines vierpoligen Bessel-Filters mit einer Grenzfrequenz von 50 oder 25 kHz wurde im Rechner gespeichert. Jedes Mal, wenn der Zufallsgenerator einen Sprung verursachte, wurde die Antwort des Filters aus dem Speicher entnommen und zum existierenden Zeitverlauf hinzugefügt. Dies führt zu einer Summe von zeitlich verzögerten Sprungantworten des Filters. Alte Antworten, die auf unter ein Bit abgeklungen waren, wurden abgebrochen, um den Summationsbereich nicht zu sehr wachsen zu lassen. Diese Werte werden dann mit einem angegebenen Ruhestrom addiert.

Rauschen wurde überlagert, indem die Werte eines gespeicherten Rauschens, das mit demselben Antialiasing-Filter aufgenommen oder vom Programm „makenoise“ (Rießner, 1994) erzeugt wurde, übernommen wurden. Das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) $(I/\sigma)^2$ ist frei wählbar.

Die simulierte Zeitreihe wird dann in einem binären File abgelegt, der dem Format eines gemessenen Datenfiles entspricht.

4.7 Bestimmung der Besetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen Zustände des Markov-Modells

Wenn $p_i(t)$ den Besetzungszustand, der durch einen Vektor $P(t)$ zusammengefasst wird, bezeichnet und die Übergangsratenkonstanten als Matrix K mit den Elementen k_{ij} dargestellt werden, so ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz für die Flüsse in und aus den Zuständen die folgende Differentialgleichung:

$$\frac{dP(t)}{dt} = P(t) \cdot K \quad (4.17)$$

Für die Berechnung der Steady-State-Verteilung $p_i(\infty)$ im i -ten Zustand wird vorausgesetzt, dass die Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeiten Null ist. Aus der Differentialgleichung (4.17) wird mit dieser Voraussetzung das folgende Bestimmungssystem erhalten:

$$(p_1(\infty), p_2(\infty), \dots) \cdot K = 0 \quad (4.18)$$

Das Argument ∞ bedeutet stationäre Zustände. Außerdem gilt, dass die Summe über alle Besetzungswahrscheinlichkeiten gleich eins sein muss:

$$\sum_i p_i(\infty) = 1 \quad (4.19)$$

Mit Hilfe der Gleichungen 4.18 und 4.19 wird ein lineares Gleichungssystem erzeugt, welches für die Bestimmungen der Besetzungswahrscheinlichkeiten angewendet wird.

Oben dargestellte mathematische Methoden dienen zur Analyse der Messdaten. Ein Problem, das allerdings jede mathematische Analyse erschwert, ist das Rauschen. Auf seine Entstehung und die unterschiedlichen Möglichkeiten der Verminderung wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

5 Rauschreduktion und Ziehen der Pipetten

5.1 Rauschquellen

Das Signal-Rauschverhältnis ist entscheidend für das zeitliche Auflösungsvermögen der Messungen. Es gibt unterschiedliche Rauschquellen, die die Auflösung der Messungen verschlechtern. Deshalb wird versucht, das Rauschen der Messanordnung zu minimieren. Um das Hintergrundrauschen zu reduzieren, muss eine sehr dichte Verbindung zwischen Zellmembran und dem Rand der Pipette entstehen. Das bedeutet je besser das Seal ist, desto kleiner ist das Hintergrundrauschen.

Es dürfen auch keine Fremdsignale das Stromsignal beeinflussen. Die Fremdsignale werden weitgehend durch den Aufbau im Faraday-Käfig beseitigt.

5.1.1 Pipettenrauschen

Die Hauptquelle des Rauschens ist das Pipettenrauschen. Es ist eine Folge des Spannungsrauschens des Vorverstärkers. Am Verstärker wird ein Spannungssollwert angelegt (Abb. 3.1), der aufgrund der Gate-Source-Strecken der beiden Eingangstransistoren des Differenzverstärkers rauscht. Dieses Spannungsrauschen wird entsprechend dem Rückkopplungsfaktor aus Messwiderstand R_f und Pipettenkapazität C_p , also $R_f \parallel j\omega C_p$ verstärkt (Abschnitt 3.2 und 3.3.1). Wie stark das Rauschen durch den Vorverstärker verstärkt wird, hängt damit hauptsächlich von der Kapazität der Pipette ab (Sigworth, 1983), und zwar des Teils, der durch die Badlösung nach der Beschichtung benetzt wird. Haak (2000) ermittelte daher das Stromrauschen in Abhängigkeit von der Kapazität. Für eine Kapazität von $C > 4$ pA wird ein kapazitätsabhängiges Störsignal verursacht. Die Aufgabe besteht darin, dieses kapazitätsabhängige Störsignal zu verringern.

Die Kapazität der Pipette wird näherungsweise als Zylinderkondensator beschrieben:

$$C_{\text{Pipette}} = \epsilon \cdot \epsilon_0 \cdot \frac{2 \cdot \pi \cdot l}{\ln \frac{d_{\text{au\ss en}}}{d_{\text{innen}}}} \quad (5.1)$$

wobei

ϵ_0 elektrische Feldkonstante ($8.85 \cdot 10^{-12}$ As/Vm)

ϵ Dielektrizitätskonstante

l Eintauchtiefe der Pipette

d Durchmesser der Pipette

sind.

Es gibt insgesamt drei Möglichkeiten, die Kapazität der Pipette zu reduzieren: die Eintauchtiefe klein zu halten, das Verhältnis von Außen- zu Innendurchmesser zu vergrößern oder eine kleinere Dielektrizitätskonstante zu erreichen.

5.1.1.1 Eintauchtiefe

Das Rauschen kann um den Faktor 2.2 (± 0.5) reduziert werden, wenn die Pipette mit dem Excised Patch (Inside-Out; Abschnitt 3.2.1) nahe der Oberfläche der Lösung gehalten wird ($20 \mu\text{m}$, Abb. 5.1; Keunecke, 1995; Farokhi *et al.*, 2000).

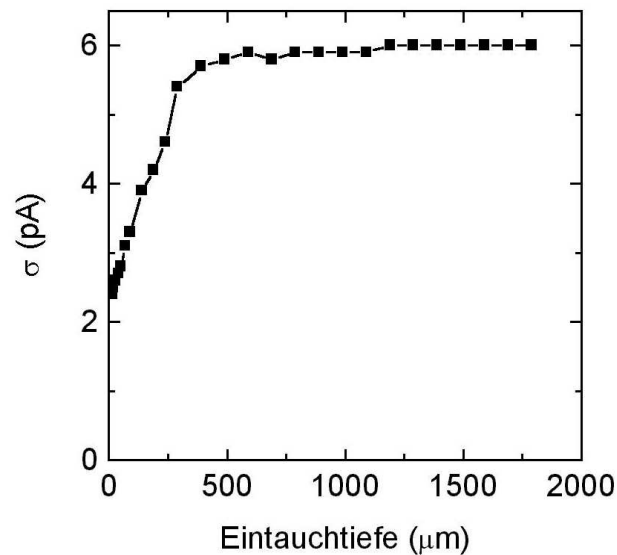


Abbildung 5.1: Rauschen des Stroms (σ) in Abhängigkeit von der Eintauchtiefe der Pipette. Es handelt sich um einen Excised Patch mit einem Seal-Widerstand von $5 \text{ G}\Omega$. Bei dieser Messung wurde der Dagan 3900A Verstärker verwendet, mit einer Abtastrate von 200 kHz und einem vierpoligen Besselfilter von 50 kHz (Keunecke, 1995; Farokhi *et al.*, 2000).

5.1.1.2 Dielektrizitätskonstante

Die Gläser für Pipetten werden je nach Höhe des Schmelzpunktes in sogenannte weiche Gläser (unter 700 °C, Sodagläser), mittelharte Gläser (700 bis 850 °C, Borosilikatgläser) oder harte Gläser (ab 900 °C, Aluminiumsilikatgläser) unterteilt. Alternativ dazu können auch Quarz-Glas (1580 °C) Elektroden verwendet werden. Sie zeichnen sich bei Messungen durch ein geringeres Rauschen aus. Dies liegt an ihrer elektrischen Charakteristik (geringere Dielektrizitätskonstante von 3.8) und ihrer hydrophoben Oberfläche (Dudel *et al.*, 2000).

Zum Ziehen der Pipetten werden Pipettenziehgeräte (Puller) verwendet. Für normales Glas können konventionelle Geräte genutzt werden, die mit einer elektrischen Heizung (Heizspule) ausgerüstet sind. Diese erreichen jedoch den Schmelzpunkt von Quarz-Glas nicht. Daher wird für Quarz-Glas Knallgas verwendet, dessen Gasdruck kontrolliert werden kann. Das Pipettenziehgerät, mit dem gearbeitet wurde, ist ein DMZ Quarz Ziehgerät (Zeitz Instruments, München; Parzefall *et al.*, 1998; Dudel *et al.*, 2000; Abschnitt 5.2.2).

Es gibt auch Pipettenziehgeräte, die mit Laser-Licht arbeiten (P2000, Sutter Instruments, Novato, Calif., USA). Da aber Laser-Licht kaum von Quarz-Glas absorbiert wird, ist das Heizen nicht sehr effektiv. Es können daher nur Pipetten bis zu einem Außendurchmesser (d_o) von 1.5 mm gezogen werden.

5.1.1.3 Wanddicke

Die relative Wanddicke der Pipette (das Verhältnis von Außen- zu Innendurchmesser d_o/d_i) ist umgekehrt proportional zur Kapazität. Damit wird das aufgenommene Rauschen bei einer dickeren Wandstärke der Glaspipetten (d_o von 2 mm und d_i von 1 mm, Heraeus, Hanau) minimiert. Mit dem DMZ Quarz Ziehgerät wird aus den Glasrohren mit der relativen Wanddicke (d_o/d_i) von 2 eine Erhöhung der relativen Wanddicke an der Spitze um den Faktor 3 bis 5 erzeugt (Abb. 5.3). Mit Laserpullern ist es nicht möglich, während des Zugvorganges die Spitze der Elektroden zu dicken Wandstärken zu formen. Wenn Spitzen mit einer dickeren Wandstärke produziert werden, kann nach Angaben des Herstellers auf das Beschichten und die Oberflächenbehandlung der Pipetten verzichtet werden.

5.2 Bearbeiten und Ziehen der Pipetten

Die Glasröhrchen, die hier verwendet wurden, waren entweder aus Borosilikat-Glas (Hilgenberg, Malsfeld) oder Quarz-Glas (Heraeus, Hanau). Der Ziehvorgang dieser

beiden Pipettenarten unterscheidet sich deutlich. Soll beim Ziehen eine gute Reproduzierbarkeit der Pipetten erreicht werden, kann zur Messung Borosilikatglas eingesetzt werden. Soll aber das Rauschen weiter minimiert werden, wird ein Quarz-Glas Puller verwendet. Es wird jedoch eine weniger gute Reproduzierbarkeit bei der Herstellung dieser Elektroden in Kauf genommen (Abschnitt 5.2.2).

5.2.1 Pipetten aus Borosilikatglas

Die Elektroden wurden aus Borosilikat-Glas ($d_o = 1.5 \text{ mm}$ und $d_i = 1 \text{ mm}$) hergestellt. Sie wurden intern mit Sigmacot (Sigma, Deisenhofen) mit einer Spritze beschichtet. Diese Behandlung schirmt die Oberflächenladung ab, wodurch das Rauschen vermindert wird (Keunecke, 1995). Zur Verdampfung des nicht gebundenen Sigmacot werden anschließend die Glasröhrchen zwei Tage lang getrocknet. Dies geschieht unter einem Abzug, da Sigmacot giftig ist.

Die Pipetten werden anschließend mit Hilfe eines L/M-3P-A-Pullers (List, Darmstadt) gezogen. Dieser Ziehvorgang wird in zwei Stufen mit unterschiedlicher Temperatureinstellung durchgeführt. Der Grund für das zweistufige Ziehen der Pipette ist, dass dadurch der kleine Öffnungsradius der Pipettenspitze stumpf wird, damit die Membran beim Aufsetzen der Pipette nicht durchstoßen wird.

Das Glasröhrchen wird in die Ziehvorrichtung eingespannt und mit einem Gewicht belastet. Die Mitte des Glasröhrchens umgibt eine Heizspule mit einstellbarem Heizstrom. Hier schmilzt das Glas und wird durch das Gewicht in die Länge gezogen. Das Ziehen wird durch einen Spacer während der ersten Stufe festgelegt. Mittels einer weiteren Spacereinstellung wird das Glasröhrchen auf die Glühwendel zentriert und zum Schmelzen gebracht. Nach der zweiten Stufe wird das Glasröhrchen abgerissen, und es entstehen zwei Pipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von etwa $1 \mu\text{m}$.

Die Pipetten werden anschließend poliert, um durch die dadurch entstandene glattere Oberfläche eine bessere Haftung zwischen Pipette und Membran zu erreichen, was die Lebensdauer des Patches verlängert. Die Pipettenspitze wird dazu an einen mit Glas beschichteten, glühenden Draht unter einem Mikroskop gehalten. Die Glasbeschichtung verhindert, dass Ionen, die die Pipettenspitze verschmutzen, emittiert werden.

Colquhoun und Sakmann (1985) haben das Rauschen mit Sylgardbeschichtung reduziert. Dadurch werden die Kapazität und die kriechenden Ströme der Salzlösung an der Oberfläche der Elektroden verringert. Um Verschmutzungen der inneren Wand mit Salzlösung zu vermeiden, wird der obere Teil der Elektrode mit Paraffin oder Silicon-Öl beschichtet. Das Beschichten der Elektroden ist zeitaufwendig.

Auf der Außenseite wurden die Pipetten nicht mit Sylgard (Dow Corning, Midland, MI) beschichtet, da dies hinderlich dabei gewesen wäre, den Patch nahe an die Oberfläche

der Badlösung zu bringen. Die oben beschriebene Innenbeschichtung mit Sigmacot war erfolgreicher (Keunecke, 1995).

5.2.2 Pipetten aus Quarz-Glas

Die Funktionsweise des DMZ Quarz-Glas Ziehgeräts ist schematisch in Abb. 5.2 dargestellt. Die Heizung (H), die Zugkraft (F) und die Ausdehnung der Quarz-Glas-Kapillare (s) sind als Funktionen der Zeit aufgetragen. Das Quarz-Glas wird in vier Zügen (drei Vorzüge P(A) und ein Endzug P(B)) gezogen. In Abb. 5.2 sind nur einer der drei Vorzüge und der letzte Zug dargestellt.

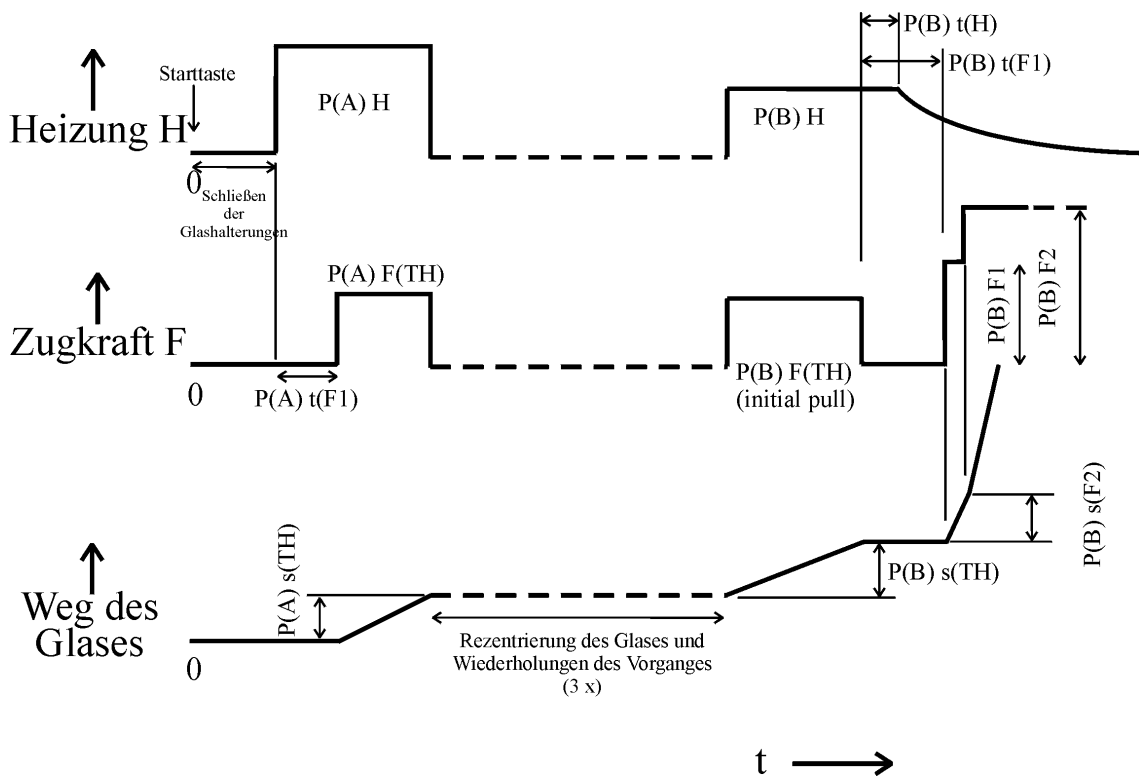


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Zugablaufs beim Knallgas Ziehgerät. Es sind nur einer der drei Vorzüge (P(A)) und der letzte Zug (P(B)) abgebildet. Die Heizung (H), die Zugkraft (F) und die Ausdehnung der Quarz-Glas-Kapillare (s) sind als Funktionen der Zeit dargestellt.

Im folgenden wird der Ziehvorgang beschrieben:

Nach Betätigung der Starttaste wird das Glas automatisch festgeklemmt. Der Brenner-Block bewegt sich in einer Position ober- und unterhalb des Quarz-Glases. Das Gas

fließt dann durch ein Ventil, das mit einem Drucksensor kombiniert ist. Bei Fehlfunktionen schließt das Ventil. Das Sauerstoff-Wasserstoffgasgemisch wird durch Wasserelektrolyse in einem Generator (Hydromat-5000, Vetter Apparatebau, Königsbach-Stein) erzeugt. Der Gasgenerator ist mit dem Gaseinlass des Ziehgeräts verbunden. Zwischen dem Ziehgerät und dem Generator befindet sich ein weiteres Ventil, das geschlossen wird, wenn Störungen auftreten oder der Gasdruck, der mit einem Drucksensor gemessen wird, am Eingang unter den Betriebsbereich fällt.

Bei ausreichendem Gasdruck wird die Heizung P(A)H gezündet. Während das Glas schmilzt, wird die Zugstange durch eine Bremse bis zum Zeitpunkt P(A)t(F1) festgehalten. Dadurch entsteht an der Schmelzstelle eine dickere Glaswand, und der innere Durchmesser der Pipette (d_i) wird leicht eingeengt. Erst danach wird die Bremse gelöst und gleichzeitig die Zugkraft P(A)F(TH) gestartet. Erst wenn das Glas um die Strecke P(A)s(TH) gedehnt ist, werden Heizung und Zugkraft ausgeschaltet. Das Glas wird von einem linearen Motor zurückgestellt, so dass die Einbuchtung zur Heizung zentriert wird. Dieser Vorgang wird dreimal bei gleichen Einstellungen durchgeführt.

Die drei ersten Züge gestalten die Spitze der Elektrode. Damit wächst das Verhältnis von Außen- zu Innendurchmesser (d_o/d_i) im engen Bereich des Rohrs. Die Endform der Elektrode ist jedoch abhängig vom letzten Zug. Die Form der Spitze der Elektroden ist wichtig für die Reduzierung der Kapazität und des Rauschens (Levis und Rae, 1998).

Im nun folgenden letzten Zug P(B) wird das Glas getrennt. Während die Heizung P(B)H zündet, startet zur gleichen Zeit die Zugkraft P(B)F(TH). Das Glas wird ausgedehnt, bis die Distanz P(B)s(TH) erreicht wird. Die Zugkraft P(B)F(TH) wird ausgeschaltet, und gleichzeitig starten zwei Delays, nämlich P(B)t(H) und P(B)t(F1). Nach der Zeit P(B)t(H) wird die Heizung ausgeschaltet und fährt zurück. Die Pipette kühlt sich ab (zum besseren Verständnis wurde in Abb. 5.2 die Heizungslinie an dieser Stelle als e-Funktion gezeichnet). Nach der Zeit P(B)t(F1), wenn das Glas etwas abgekühlt ist, startet der erste Hauptzug P(B)F1, bis das Glas um die Strecke P(B)s(F2) ausgedehnt wird. Dann setzt der zweite Hauptzug ein.

Die Verzögerungszeit P(B)t(F1) ohne Zug bei fallender Heiztemperatur ist entscheidend für die Qualität der Spitzen. Bei steigender Verzögerungszeit (P(B)t(F1)) oder bei niedrigerem Gasdruck (P(B)H) wird die Wand an der Spitze dicker und die Spitzöffnung breiter. Andererseits kann es dazu kommen, dass sich die Elektroden nicht trennen. Am Ende werden die Elektroden losgeklemmt und herausgenommen. Sie werden auf die gewünschte Länge gekürzt und sind dann bereit für Patch-Clamping.

Es ist nicht einfach, dickwandige Elektroden mit geeigneter Öffnung herzustellen, da das Ziehen dieser Elektrodenart von vielen Parametern des Pullers abhängt. Die Einstellung dieser Parameter ändert sich mit den momentanen Umgebungseinflüssen im Puller und im Raum. Daher ist die Reproduzierbarkeit bei der Herstellung dieser Elektroden weniger gut. Das Pipettenrauschen wird jedoch dadurch bis zu 30%

reduziert, so dass auf das Beschichten und die Oberflächenbehandlung der Pipetten verzichtet werden kann. In Abb. 5.3 ist die Form der Spitze und die Wanddicke der Pipette, die mit dem DMZ Quarz Ziehgerät gezogen wurde, dargestellt.

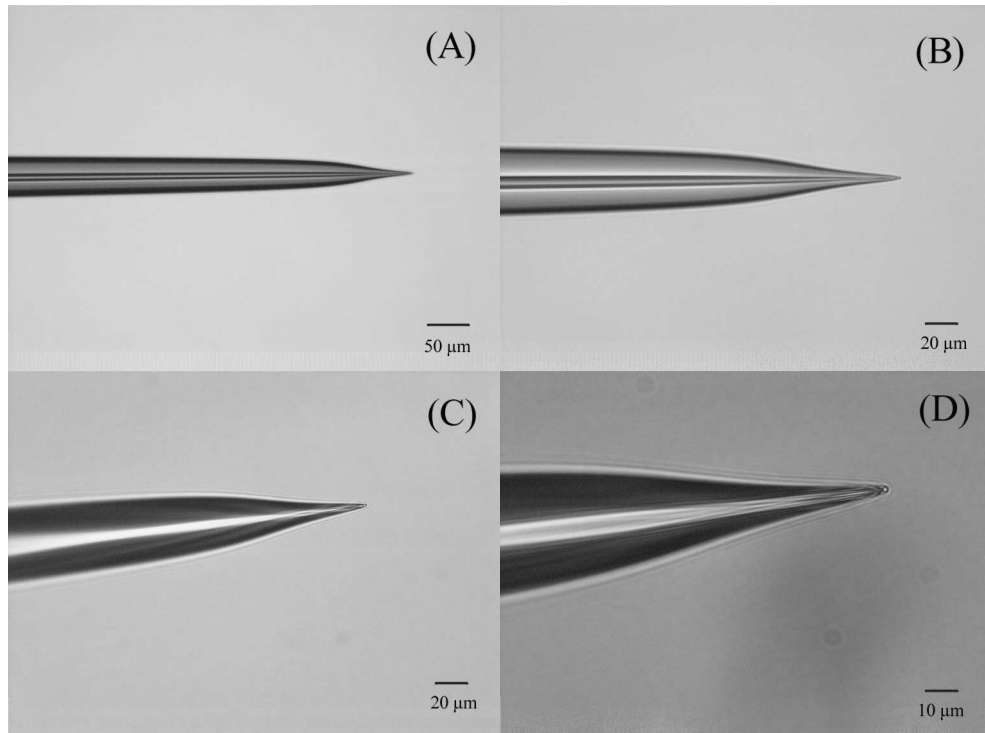


Abbildung 5.3: Gezogene Quarz-Glas Elektroden mit dem DMZ Quarz Ziehgerät. Die Aufnahmen zeigen die Pipettenform und ihre Wanddicke. Sie wurden mit einem Mikroskop mit 100 (A), 200 (B,C) und 400 (D) facher Vergrößerung digital fotografiert. In C und D sind die relative Wanddicke der Elektroden an der Spitze gut erkennbar.

Für beide Pipettenarten (Borosilikat-Glas und Quarz-Glas) muss versucht werden, jegliche Staublagerung auf der Spitze der Pipetten zu vermeiden, da sie dadurch unbrauchbar werden. Aus diesem Grund wurden sie in einem geschlossenen Kasten aufbewahrt.

Für die Herstellung der Ag/AgCl-Elektroden wurden Silberdrahtelektroden ($\varnothing=0.5\text{mm}$) in einer galvanischen Zelle mit 1 M NaCl-Lösung bei 1.5 V für 20 min chloriert. Die Chlorierung führt dazu, dass der Draht nicht polarisierbar wird.

Mit den in den obigen Kapiteln dargestellten Mess- und mathematischen Methoden soll das in der Kanalforschung bekannte und ungeklärte Phänomen des anomalen Molfraktionseffekts näher untersucht werden.

6 Der anomale Molfraktionseffekt (AMFE)

Unter dem anomalen Molfraktionseffekt (AMFE) wird folgendes Phänomen verstanden: Die Kanalleitfähigkeit durchläuft als Funktion des Verhältnisses der Konzentration von zwei Ionenarten ein Minimum, wobei die Gesamtkonzentration konstant gehalten wird (Hille, 1992). Die Besonderheit besteht darin, dass der Strom in diesem Extremum einer Mischung aus bestimmten Ionen kleiner ist als in den reinen Lösungen (Abb. 6.1).

Das Verhalten des anomalen Molfraktionseffekts ist immer als ein Beispiel für mehrfache Ionenbindungsstellen und starke Ion-Ion-Wechselwirkungen in der Pore (Abschnitt 7.1 und 7.3) angeführt worden. Welche Modelle bis jetzt für die Erklärung des AMFE angewendet wurden, wird erst im nächsten Kapitel ausführlich erläutert.

6.1 Bisherige Messergebnisse

Der anomale Molfraktionseffekt wurde sowohl bei tierischen als auch bei pflanzlichen Membranen beobachtet. Er tritt bei Pflanzenkanälen in Tl^+/K^+ -Lösungen (Tester, 1988; Draber *et al.*, 1991) oder in tierischen Kanälen (Hagiwara *et al.*, 1977; Wagoner und Oxford, 1987) in K^+/Rb^+ - oder NH_4^+/Rb^+ -Lösungen (Eisenmann *et al.*, 1986), im Ca^{2+} -Kanal (Ca^{2+}/Ba^{2+} : Friel und Tsien, 1989; Hess und Tsien, 1984) oder im Cl^- -Kanal (Cl^-/SCN^- : Dietrich und Hedrich, 1998; Tabcharani *et al.*, 1993) auf.

Im folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse über den AMFE (in erster Linie bei pflanzlichen Zellen und bei einer Mischung von K^+ und Tl^+) vorgestellt.

6.1.1 Ergebnisse von Hagiwara

Der AMFE an Eizellen des Seesterns *Mediastera aequalis* bei externem Lösungswechsel wurde von Hagiwara *et al.* (1977) beobachtet. Bei diesen Versuchen bestand die Lösung aus einer Mischung von K^+ und Tl^+ mit einer Gesamtkonzentration von 25 mM. Das

Minimum der Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Konzentration, die sich bei verschiedenen Spannungen verschiebt, ist bei der reinen K^+ -Konzentration dichter als bei der Tl^+ -Konzentration (Abb. 6.1).

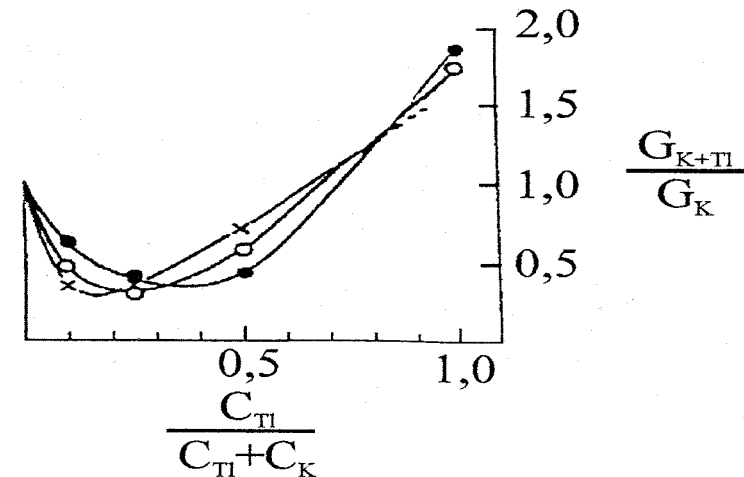


Abbildung 6.1: Membranleitfähigkeit an Eizellen des Seesterns *Mediastera aequalis* in einer Mischlösung von K^+ - und Tl^+ -Ionen. Der Tl^+ -Anteil (C_{Tl}) im Verhältnis zur Gesamtkonzentration ($C_{Tl} + C_K$) variiert zwischen 0 und 1. Die Leitfähigkeit (G) geht durch das Minimum (Hagiwara *et al.*, 1977).

Hagiwara *et al.* (1977) erklärten den AMFE mit Hilfe eines Modells mit zwei Bindestellen (Hille und Schwarz, 1978, Abschnitt 7.1), weshalb der AMFE als Beweis für das Multi-Ion-Porenmodell gesehen wurde.

6.1.2 Ergebnisse von Draber

Der AMFE an cytoplasmatischen Tropfen der Alge *Nitella* wurde von Draber *et al.* (1991) untersucht. Die Versuche (Draber, 1990) wurden in der Cell-Attached Konfiguration (Abschnitt 3.2.1) bei einer Mischung aus K^+ und Tl^+ im Bad und in der Pipette durchgeführt (die Gesamtkonzentration betrug 150 mM).

In Abb. 6.2 ist die Abhängigkeit des Einzelkanalstroms vom $Tl^+/(Tl^+ + K^+)$ -Verhältnis dargestellt. Es stellte sich die Frage, ob der AMFE auf schnelles Schalten (Gating, Abschnitt 7.4, 8.5 und Kapitel 10) oder auf einen Permeationsmechanismus z. B. in einem Multi-Ion-Poren-Modell (Abschnitt 7.1) zurückzuführen ist. Schnelles Schalten würde für das enzymkinetische Modell mit „lazy-state“ sprechen (Abschnitt 7.2) und einen Effekt der Öffnungswahrscheinlichkeiten beinhalten. Aufgrund der damals

verwendeten Filterfrequenz von 1 kHz konnte diese Frage jedoch nicht eindeutig beantwortet werden.

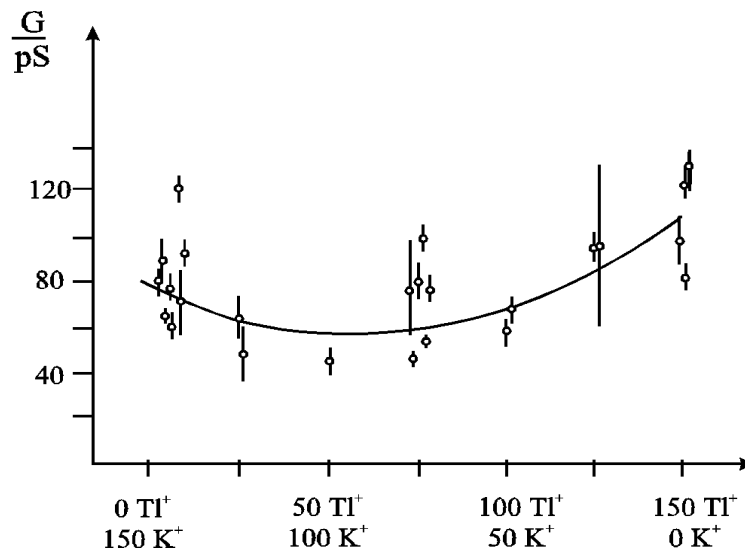


Abbildung 6.2: Der anomale Molfraktionseffekt an der Grünalge *Nitella flexilis* bei Draber (1990).

Es ergaben sich jedoch folgende Hinweise auf einen Gating-Mechanismus (Abschnitt 8.5):

Die Strom-Spannungskurven (Abb. 6.3) zeigen ein „Drehverhalten“. Dies beinhaltet, dass der Strom der gemischten Lösung in allen Spannungsbereichen unter dem der reinen Lösungen liegt. Mit Hilfe des Multi-Ion-Poren-Modells konnte dieser Effekt nicht erklärt werden, da es den AMFE nur innerhalb eines begrenzten Spannungsbereichs beschreiben konnte (Schultze, 1990; Draber *et al.*, 1991). Daher versuchten Draber *et al.* (1991), das Drehverhalten mit Hilfe des enzymkinetischen Modells mit „lazy-state“ (Hansen *et al.*, 1981, 1983; Abschnitt 7.2) zu beschreiben.

Das Problem hierbei ist, dass ein Nichtnachweis des schnellen Schaltens nicht den Schluss auf die Nichtexistenz zulässt, weil das Schalten schneller als die Nachweisgrenze der jeweiligen Messung sein könnte. Als Hypothese lag zugrunde, dass der Detektor dem Einzelereignis nicht mehr folgen kann, und folglich die Verminderung der Leitfähigkeit in der gemischten Lösung auf das Mitteln über unentdecktes schnelles Schalten zurückzuführen ist (Abschnitt 7.4). Es bestand die Möglichkeit, dass bei einer Filterfrequenz von 1 kHz dieses hypothetische Schalten nicht beobachtet werden kann.

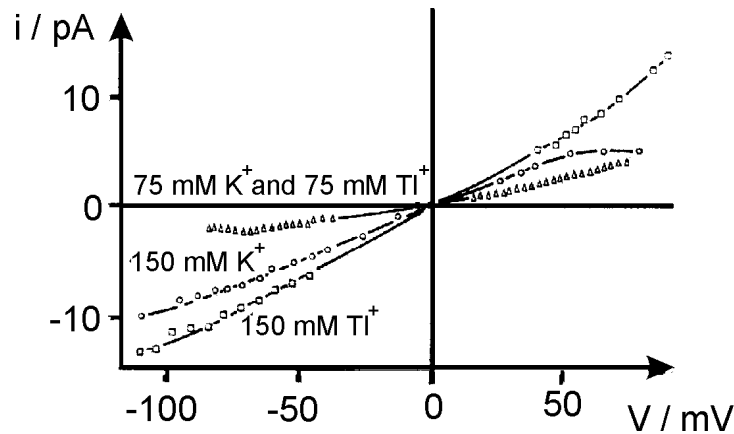


Abbildung 6.3: Effekt von Tl^+ auf die Strom-Spannungskurven (Draber *et al.*, 1991). Die Kreise stellen die Spannungsabhängigkeit des K^+ -Einzelkanalstroms ohne Tl^+ in der Lösung dar. Die Dreiecke zeigen die Strom-Spannungskurve bei einer Tl^+ -Konzentration von 75 mM. Die Quadrate zeigen die Strom-Spannungskurve bei reiner Tl^+ -Konzentration. Der Strom der gemischten Lösung ist in allen Spannungsbereichen unter dem der einzelnen Lösungen.

6.1.3 Ergebnisse von Albertsen

Eine Möglichkeit, das hypothetische schnelle Schalten zu finden, besteht in der Erhöhung des zeitlichen Auflösungsvermögens. Albertsen (1994) führte Untersuchungen an *Chara Corallina* mit K^+/Tl^+ -Lösungen bei einer Gesamtkonzentration von 150 mM durch (Abb. 6.4). Die Messungen erfolgten an Excised-Patches bei einem einseitigen Lösungsaustausch im Bad. Die Filterfrequenz betrug 20 kHz bei einer Abtastfrequenz von 100 kHz.

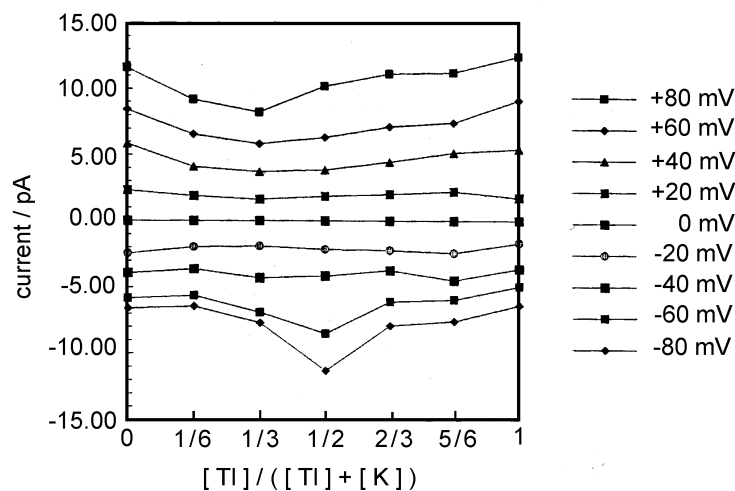


Abbildung 6.4: AMFE gemessen von Albertsen (1994) an *Chara Corallina*

Trotz des erhöhten zeitlichen Auflösungsvermögens trat weiterhin eine Reduzierung des scheinbaren Einzelkanalstromes auf (Abb. 6.4). Für negative Spannungen wurde ein Maximum im Betrag des Einzelkanalstroms beobachtet, welches allerdings durch andere Untersuchungen (z.B. Keunecke, 1995) nicht bestätigt werden konnte.

Zusätzlich traten bei den Messungen von Albertsen Sublevel auf. Das sind Unterleitfähigkeitsstufen, bei denen der Kanal leitet, ohne das volle Stromniveau zu erreichen. Bei den Untersuchungen von Albertsen (1994) stand jedoch nicht der AMFE im Vordergrund des Interesses, sondern die Entwicklung eines Verfahrens des Direkten-Zeitreihen-Fits mit Hilfe von Hidden-Markov-Modellen (Albertsen und Hansen, 1994; Abschnitt 4.5). Aus diesem Grund sind nur wenige Messungen zum AMFE durchgeführt worden, was dazu führte, dass die Untersuchungen mit hohem Zeitauflösungsvermögen von Keunecke (1995) wiederholt wurden.

6.1.4 Ergebnisse von Keunecke

Die Versuchsbedingungen von Keunecke (1995) waren denen von Albertsen (1994) ähnlich. Die Messungen wurden an *Chara Corallina* mit einem einseitigen Lösungsaustausch im Bad durchgeführt. Um an einem Patch alle Konzentrationen einer Messreihe durchmessen zu können, wurde der Lösungsaustausch mit einer Spülung durchgeführt. Die Gesamtkonzentration betrug wie bei Draber (1990) und Albertsen (1994) 150 mM. Um das hypothetische schnelle Schalten zu erkennen, war die Filterfrequenz mit 50 kHz bei einer Abtastrate von 200 kHz größer als diejenige bei Draber (1990) und Albertsen (1994).

Trotz dieser hohen Zeitauflösung wurde der AMFE wieder im scheinbaren Einzelkanalstrom gemessen (Abb. 6.5), wobei das Minimum der Leitfähigkeit bei 5 bis 10 mM TI^+ -Konzentration lag und bei höheren Spannungswerten stärker ausgeprägt war. Trotz einseitiger TI^+ -Gabe fand Keunecke (1995) den AMFE für positive und negative Spannungen (Abschnitt 8.3). Die Lage der minimalen Leitfähigkeit war spannungsunabhängig (Abb. 6.5A). Die Strom-Spannungskurve für das TI^+ / K^+ -Gemisch liegt betragsmäßig sowohl unterhalb der reinen TI^+ -Kurve als auch unter der reinen K^+ -Kurve (Abb. 6.5B).

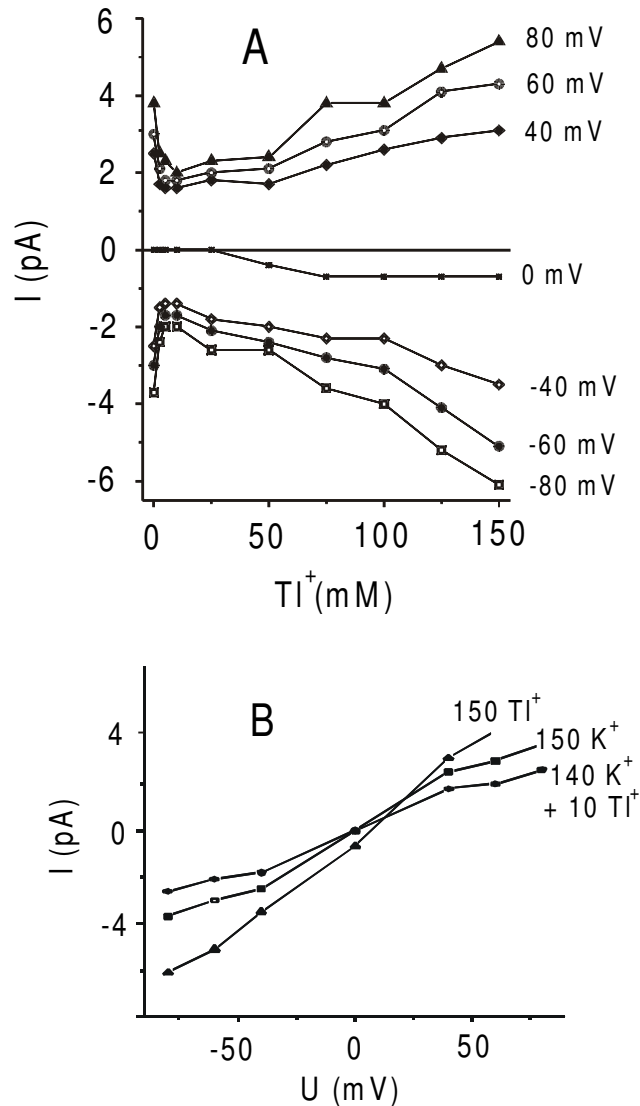


Abbildung 6.5: A) Der anomale Molfraktionseffekt an der Grünalge *Chara Corallina* bei verschiedenen Spannungen (Keunecke, 1995). Tl^+ wurde im Bereich von 0 bis 150 mM variiert. Die Messungen zeigen eine Symmetrie bzgl. der Nulllinie. Die Lage des Minimums bleibt im Bereich von 10 mM Tl^+ -Konzentration für verschiedene Spannungen erhalten.

B) Strom-Spannungskurven für verschiedene Tl^+ -Konzentrationen (0 mM Tl^+ , 10 mM Tl^+ , 150 mM Tl^+) (Keunecke, 1995). Der Strom der gemischten Lösung liegt in allen Spannungsbereichen unter dem der einzelnen Lösungen.

Keunecke (1995) versuchte, für die Klärung des AMFE den Ansatz des Wu-Modells (Wu, 1991, 1992) zu verwenden (Abschnitt 7.3). Mit Hilfe des Wu-Modells konnte die Konzentrationsabhängigkeit jedoch nur für positive Spannungen gefittet werden (Abb. 6.6). Bei positiver Spannung und geringer Tl^+ -Konzentration fiel der Einzelkanalstrom und das Minimum lag bei den Messungen sehr dicht an der reinen K^+ -Konzentration. Das bedeutet, dass bei Zugabe von geringeren Mengen des blockierten Ions der Effekt der

Stromreduzierung am größten ist. Bei negativer Spannung stimmten die Fitergebnisse nicht mit den Messwerten überein (Abb. 6.6).

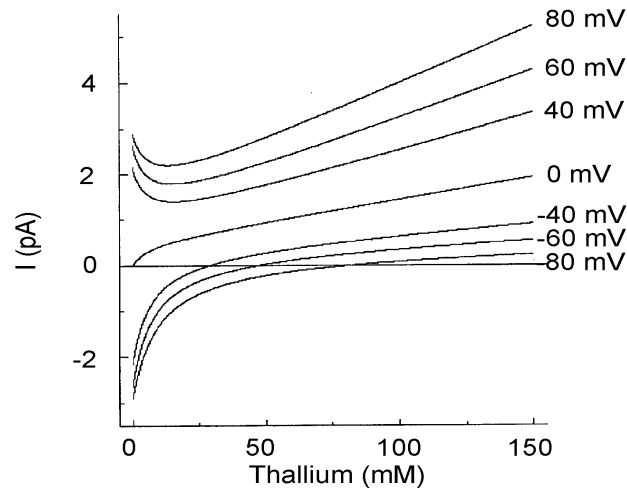


Abbildung 6.6: Kurvenverlauf des Wu-Modells für unterschiedliche Spannungen. Für negative Spannungen zeigen die berechneten Kurven keinen AMFE mehr (Keunecke, 1995).

In der Daten von Keunecke (1995) wurden für reine K^+ - und Tl^+ -Konzentrationen je eine schnelle und langsame Zeitkonstante ermittelt. Die schnelle Zeitkonstante war in der Mischlösung aus K^+ - und Tl^+ -Ionen verschwunden. Es bestand die Möglichkeit, dass die schnelle Zeitkonstante nicht im Bereich der zeitlichen Auflösung des Detektors lag. Dieser Hinweis des Verschwindens der schnellen Zeitkonstanten bei der Mischlösung gab den Ausschlag, die Suche zu intensivieren, ob beim AMFE nicht doch unentdecktes schnelles Schalten vorliegt.

6.1.5 Ergebnisse der Diplomarbeit

Eine Möglichkeit, Schaltprozesse zu verlangsamen, besteht in einer Verringerung der Umgebungstemperatur. So wurde versucht, mit Hilfe der Abkühlung den Nachweis für die Beteiligung unentdeckten schnellen Schaltens zu erbringen. Diese Methode wurde bereits beim Na^+ -Block des K^+ -Kanals in *Chara* (Blunck, 1996; Hansen *et al.*, 1997) durchgeführt. Es traten zwei Effekte auf: 1. Bei Normaltemperatur fehlt im Dwell-Time Histogramm die schnelle Zeitkonstante beim Na^+ Block (Blunck, 1996). Sie taucht bei tiefen Temperaturen wieder auf. 2. Die Einzelkanalströme mit und ohne Zweition konvergierten bei tieferen Temperaturen sowohl beim Na^+ Block (Blunck, 1996; Hansen *et al.*, 1997) als auch beim AMFE (Farokhi, 1998). Dieses Verhalten wurde dabei als ein

Hinweis auf die Mitwirkung schnellen Schaltens beim Na^+ -Block betrachtet. Aus diesem Grund wurden Messungen bei 7°C auch für den AMFE durchgeführt.

Der Vergleich von Abb. 6.7 und Abb. 8.2 macht deutlich, dass durch Temperatursenkung der Einzelkanalstrom bei reinem Kalium sowohl für positive als auch für negative Spannungen sinkt. Dies stimmt mit den Messungen von Blunck (1996) sowie von Zanello und Barrantes (1994) überein und entspricht der Erwartung, dass alle Prozesse mit höherer Temperatur schneller ablaufen.

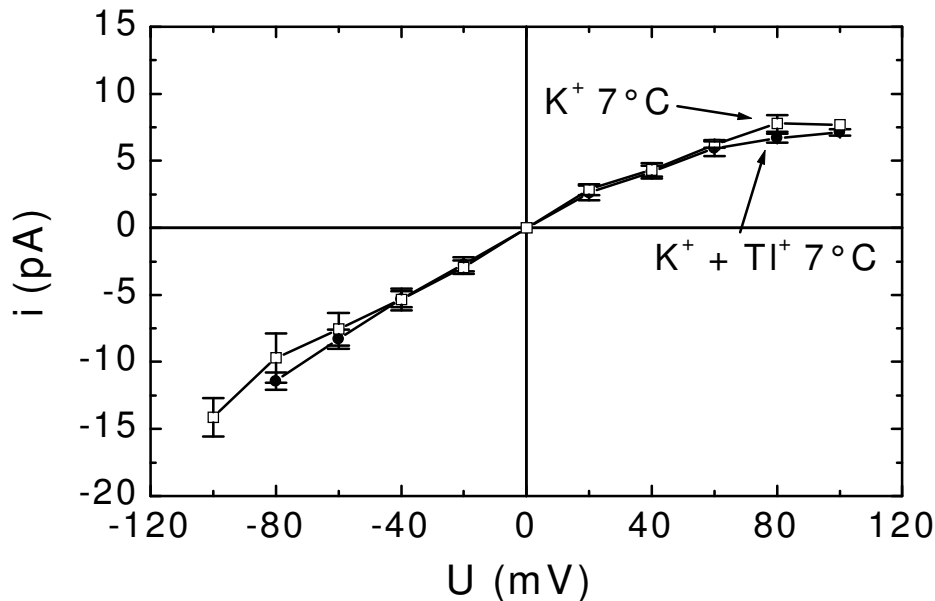


Abbildung 6.7: Effekt von TI^+ auf die IV-Kurven bei einer Temperatur von 7°C . Die Quadrate stellen die Spannungsabhängigkeit des K^+ -Kanalstroms ohne TI^+ (250 mM KNO_3) in der Lösung dar. Die Kreise zeigen die Strom-Spannungskurve bei einer TI^+ -Konzentration von 20 mM (230 mM KNO_3 und 20 mM TlNO_3). Die Strom-Spannungskurven konvergieren bei den unterschiedlichen Lösungen mit und ohne TI^+ -Konzentration.

Bei den Messungen in der Lösung mit TI^+ verringert sich der Strom auch mit der Temperatursenkung (Abb. 6.7), allerdings mit dem Unterschied, dass die Stromänderung kleiner ist als bei reinem Kalium. Das Entscheidende in Abb. 6.7 ist, dass die Strom-Spannungskurven mit und ohne TI^+ bei geringer Temperatur zusammenfallen.

Die Argumentation dabei ist, dass die Wirkung des Anti-Aliasingfilters zu einem kleineren gemessenen Stromniveau führt, wenn der Kanal schnell öffnet und schließt. Dem Ausgang des Filters gelingt es nicht, das volle Niveau zu erreichen, bevor der Kanal seinen Zustand ändert. Diese so gemessene Reduzierung des Einzelkanalstroms ist dadurch nur eine scheinbare und ihr Auftreten ist eine Frage der zeitlichen Auflösung.

Die Temperaturabhängigkeit des gemessenen (scheinbaren) Einzelkanalstroms in Gegenwart von TI^+ wird somit durch zwei gegenläufige Effekte bestimmt: Die Temperaturreduzierung kann zu einer Verlangsamung der Schaltprozesse führen, so dass die Reduzierung des Einzelkanalstroms durch schnelles Schalten zum Teil aufgehoben wird, während die Temperatur selbst wie in den Messungen mit reinem K^+ den wahren Einzelkanalstrom senkt. So kann es vorkommen, dass sich der scheinbare Einzelkanalstrom mit der Temperatursenkung weniger ändert. Es folgt, dass die Strom-Spannungskurven mit und ohne TI^+ bei tiefen Temperaturen nicht mehr unterschieden werden, wie aus Abb. 6.7 deutlich wird. Ob diese Erklärung zutrifft, wird in den folgenden kinetischen Analysen (Kapitel 8, 9 und 10) überprüft. Vorher aber werden die unterschiedlichen Modelle, die bisher als Erklärung für den AMFE dienten und in diesem Kapitel bereits teilweise erwähnt wurden, genauer vorgestellt.

7 Modelle für die Beschreibung der Transportvorgänge in Membrankanälen

Für die Beschreibung der Funktionsweise von Kanälen werden mathematische und physikalische Modelle angewendet, die den Mechanismus des Transportes der Ionen durch den Kanal erklären. Hier gilt das besondere Interesse den Modellen, die die mechanische Erklärung des AMFE zum Ziel haben. Die Grundfrage, die auch das Hauptinteresse dieser Arbeit ist, ob der AMFE ein Gating- oder Permeationsmodell ist, wird im nächsten Kapitel ausführlich erörtert.

7.1 Multi-Ion-Single-File-Modell von Hille-Schwarz

Das Multi-Ion-Single-File-Modell wurde von Hille und Schwarz (1978) vorgeschlagen und weiter modifiziert (Urban und Hladky, 1979). Bei diesem Permeationsmodell (Abschnitt 8.5) wird der Kanal als Pore betrachtet.

Es wird angenommen, dass mehrere Energiebarrieren im Kanal existieren (Abb. 7.1), so dass sich zwei Ionen gleichzeitig im Kanal befinden dürfen (Multi-Ion), aber einander nicht passieren können (Single-File). Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass mehrere Zustände gleichzeitig besetzt sind. Die Energiebarriere für den Wechsel von Bindungsstelle zu angrenzendem Außenmedium ist höher als die zwischen den beiden Bindungsstellen (Abb. 7.1). Die Ionen innerhalb des Kanals zeigen eine gegenseitige Abstoßung.

Der AMFE entsteht durch Wechselwirkungen zwischen den besetzten Zuständen. Wichtig ist, dass das Ti^+ -Ion für das Eintreten in den Kanal eine kleinere Barriere überwinden muss.

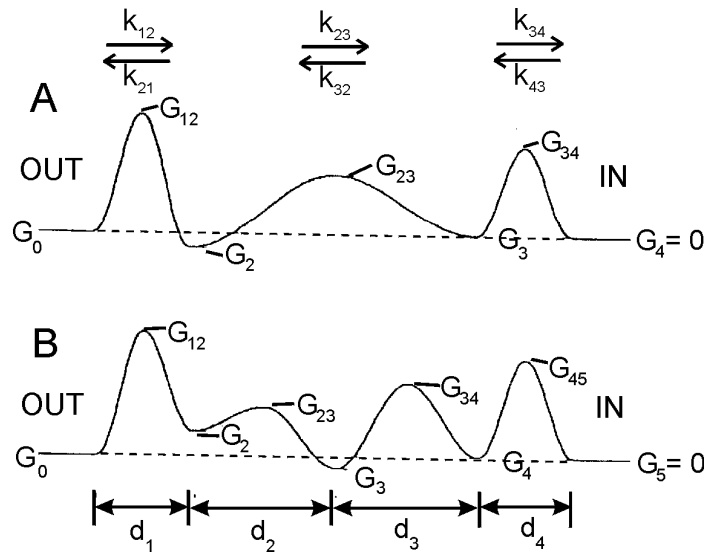


Abbildung 7.1: Energieprofil (G) eines Kaliumkanals im Multi-Ion-Single-File-Modell (Hille und Schwarz, 1978). Es gibt mehrere Bindungsstellen (im oberen Profil 2 und im unteren 3 Bindungsstellen), die jeweils von einem Ion besetzt werden können. d_i : Abstände der Bindungsstellen in der Pore.

Es wird zum Beispiel angenommen, dass ein K^+ -Ion eine Bindungsstelle im Kanal besetzt. Dieses K^+ -Ion kann für eine längere Zeit dort verweilen, weil die Energiebarriere nach außen hoch ist. Es bewegt sich erst dann nach außen, wenn ein weiteres Ion in den Kanal springt und mit dem ersten in elektrische Wechselwirkung tritt. Handelt es sich bei diesem zweiten Ion um ein Tl^+ -Ion, so wird im Hille-Schwarz Modell angenommen, dass es aus dem Kanal herausgeworfen wird, anstatt dass es das K^+ -Ion nach außen drückt. Wenn das zweite Ion ein K^+ -Ion ist, wird die Wahrscheinlichkeit für das erste K^+ -Ion, den Kanal zu verlassen, unter symmetrischen Bedingungen höher sein.

Wenn nur Tl^+ -Ionen vorhanden sind, liegt wieder ein symmetrischer Fall wie bei reiner K^+ -Lösung vor. Der Strom kann sogar etwas höher sein, weil die niedrigeren Energiebarrieren eine höhere Einsprungrate ermöglichen.

Vereinfacht ausgedrückt besagt das Hille-Schwarz-Modell, dass sich bei gleicher Bindungsenergie die Ionen leichter verdrängen als bei unterschiedlichen Bindungsenergien. Das wäre eine mögliche Ursache, weshalb bei einer Mischung von Ionen in der Lösung der Strom des Kanals abnimmt.

Lange wurden die Ergebnisse von Baukowitz und Yellen (1996) als Beweis für die Multi-Ion Pore angesehen, weil ein einziges K^+ -Ion erst nach langer Zeit aus der Pore kommt, wenn dem zweiten der Zutritt verweigert wird. Heute ergibt sich nach Untersuchungen von Zhou *et al.* (2001) mit Röntgenstrahlbeugungen ein anderes Bild: mit nur einem K^+ Ion bricht die Struktur der Pore zusammen. Weiter wird im Abschnitt 10.6

gezeigt, dass es auch keine tiefen Energieminima und keine gegenseitige Abstoßung der Ionen im Kanal gibt.

Ein wichtiges Argument gegen das Multi-Ion-Single-File-Modell brachten Draber *et al.* (1991). Sie beobachteten eine symmetrische Drehung der Stromspannungskurven in Abhängigkeit von der TI^+/K^+ -Mischung (Abb. 6.3) und zeigten, dass das Hille-Schwarz-Modell (1978) einen verminderten Strom in Mischlösungen nur für einen begrenzten Spannungsbereich darstellen kann. Draber *et al.* (1991) schlugen statt dessen ein enzymkinetisches Gating-Modell (Hansen *et al.*, 1983) mit nur einer Energiebarriere, aber einem lazy-state vor.

7.2 Das enzymkinetische lazy-state-Modell

In diesem Gating-Modell (Abschnitt 8.5) wird der Kanal als ein großes Molekül, das wie ein Enzym mit den Ionen reagiert, betrachtet (Läuger, 1980, 1985; Hansen *et al.*, 1981; Eisenberg 1990). Gating, also Ein- und Ausschalten des Transports, wird durch einen sogenannten lazy-state (Hansen *et al.*, 1983) eingeführt.

Der lazy-state, den Draber *et al.* (1991) für den K^+ -Kanal in *Nitella flexilis* eingeführt haben, wird durch eine weitere Bindungsstelle für das K^+ -Ion kontrolliert (rechte Delle am Kanalsymbol, z.B. beim Zustand "4" in Abb. 7.2). Wenn das K^+ -Ion an diese Bindungsstelle bindet (Übergang 4-5 in Abb. 7.2), erhöht sich die Selektivität in K^+ -Lösung. K^+ -Ionen werden weiterhin transportiert (Zyklus 3-8-9-3 in Abb. 7.2), doch TI^+ -Ionen überführen den Kanal in den lazy-state 7. Wenn der Kontroll-Zustand nicht besetzt ist (Zustände 1 bis 6 in Abb. 7.2), können TI^+ - und K^+ -Ionen gleichermaßen transportiert werden.

Nach diesem Modell wird erwartet, dass die Wahrscheinlichkeit für den Durchgang der Ionen durch den Kanal abnimmt, wenn die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals in einer Mischlösung aus K^+ - und TI^+ -Ionen im Verhältnis zu einer reinen Lösung aus K^+ -Ionen untersucht wird.

Der Einzelkanalstrom sollte dann unabhängig von der K^+/TI^+ -Mischung sein. Diese Eigenschaft des Modells wurde jedoch durch die Messungen von Draber *et al.* (1991) nicht bestätigt. Zunächst scheint, dass deshalb dieses Modell nicht richtig sein kann. Doch es besteht die Möglichkeit, dass die Übergänge 3-7 in Abb. 7.2 so schnell sind, dass sie aufgrund der beschränkten zeitlichen Auflösung nicht erkannt werden. Dann wäre die gemessene Reduzierung des Einzelkanalstromes nur eine scheinbare, da sie durch die Mittelung im Detektorfilter über einen konstanten, aber schnell schaltenden Einzelkanal entstanden sein könnte. Ein weiteres Modell, mit dessen Hilfe versucht wurde, den AMFE zu erklären, ist das Wu-Modell.

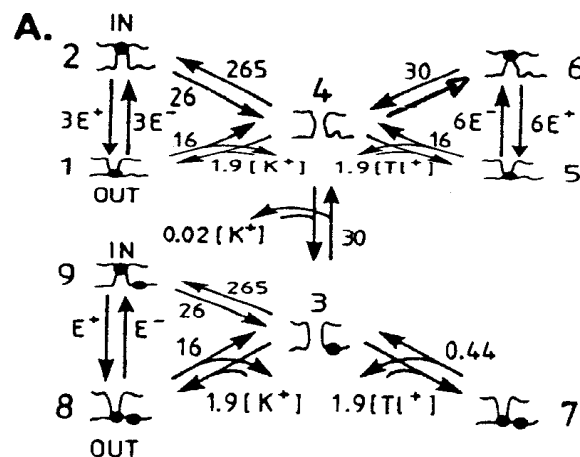


Abbildung 7.2: Das enzymkinetische lazy-state-Modell für den AMFE mit den von Draber *et al.* (1991) ermittelten Ratenkonstanten für den Transport von K⁺ oder TI⁺. Es gibt eine allosterische Bindestelle für das K⁺-Ionen (Delle am Kanalschema von Zustand 4). Ist diese Bindestelle nicht besetzt, können sowohl K⁺- als auch TI⁺-Ionen transportiert werden (4-1-2 bzw. 4-5-6). Bei einer Besetzung der allosterischen Bindestelle mit K⁺ und der Transportbindestelle mit TI⁺ geht der Kanal in den Zustand 7 (lazy-state). TI⁺ kann nicht transportiert werden. Der K⁺-Transport geht dagegen im Zyklus 3-9-8 weiter. Die Ratenkonstanten sind in Einheiten von 10⁷ s⁻¹ gegeben.

7.3 Wechselwirkungsmodell von Wu

Das Wechselwirkungsmodell von Wu (1991, 1992) ist ein Permeationsmodell (Abschnitt 8.5) und geht von einem Selektivitätsfilter aus, das mit verschiedenen Ionen unterschiedlich wechselwirkt. Dabei gelten für das Modell folgende Voraussetzungen:

Der Selektivitätsfilter liegt in der Pore mit nur einer Bindestelle, die aus symmetrisch geordneten Carbonylgruppen (C und O) besteht (Abb. 7.3). Ein Teil der Wassermoleküle wird von den Ionen während des Eintritts in den Kanal getrennt, und das Ion bindet an eine Carbonylgruppe. Wenn ein weiteres Ion (B) in den Kanal kommt, tritt es in Coulombwechselwirkung mit dem gebundenen Ion (A) (Abb. 7.3). Das zweite Ion überträgt die kinetische Energie im Stoß auf das gebundene Ion. Nach den Stoßgesetzen erhält man den Energieübertrag zwischen den Ionen:

$$E_B = c \frac{m_A m_B}{(m_A + m_B)^2} E_{0A} \quad (7.1)$$

wobei

m_A und m_B Massen von Ion (A) und Ion (B)

c Konstante (Wu, 1991; 1992)

E_B Übertragungsenergie zwischen Ion (A) und Ion (B)

E_{0A} Anfangsenergie von Ion (A)

sind.

Bei gleicher Masse ist die übertragene Energie am größten, womit auch die Wahrscheinlichkeit, dass E_B größer als die Bindungsenergie ist, zunimmt. Das gebundene Ion kann somit aus dem Selektivitätsfilter herausgeschlagen werden. Bei einer großen Abweichung des Verhältnisses der Massen von eins nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass die Energiebarriere nicht mehr überwunden werden kann, und ein Block entsteht. Das bedeutet, dass der Stromfluss sehr stark abhängig von den Ionen ist, die miteinander in Wechselwirkung treten. Bei unterschiedlichen Ionen nimmt somit die Wahrscheinlichkeit des Stromflusses ab im Vergleich zu dem bei gleicher Ionenart.

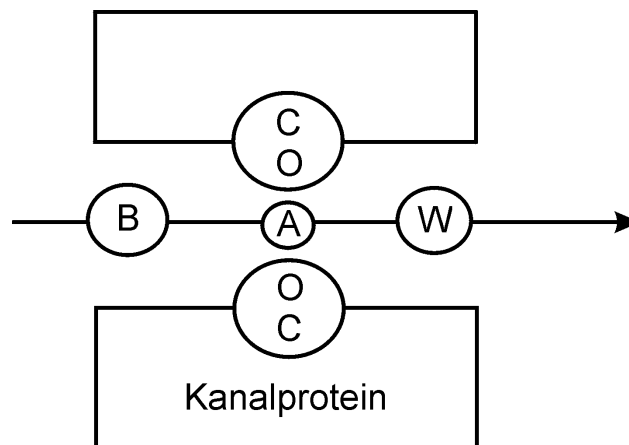


Abbildung 7.3: Wechselwirkungsmodell von Wu (nach Wu, 1991). C: Kohlenstoff der Carbonylgruppe; O: Sauerstoff der Carbonylgruppe; A: Ion, gebunden an den Selektivfilter; B: Ein weiteres Ion gelangt in den Kanal, welches mit Ion A in Wechselwirkung tritt; W: Wassermoleküle, die mit Ion A in Wechselwirkung treten.

Dieser Wirkungsmechanismus ist dem des Hille-Schwarz-Modells nicht unähnlich. Auch dort ist die Verdrängung durch ein zweites Ion für den Transport notwendig. Hier ist es die Übertragung kinetischer Energie, dort die elektrostatische Abstoßung im Kanal mit zwei Bindungsstellen. Der AMFE entsteht in beiden Fällen aus der kleineren Verdrängungswahrscheinlichkeit bei ungleichen Ionen.

7.4 Veränderung der Leitfähigkeit durch schnelles Schalten

Permeations- und Gating-Modelle (Hansen *et al.*, 1997; Townsend und Horn, 1999; Abschnitt 8.5) behandeln ganz unterschiedliche Phänomene. Die Entscheidung, welche Art der Modelle angewendet werden muss, kann schwierig werden, wenn in der Untersuchung „schnelles Schalten“ (Flickern) auftritt. Unzureichendes Auflösungsvermögen führt dann zu Informationsverlust.

Der Effekt des schnellen Schaltens wird durch Betrachtung der Antwort des Verstärkers bei Kanalöffnungen mit unterschiedlichen Längen (Abb. 7.4) illustriert. Die Daten werden in äquidistanten Zeiten abgetastet. Bei langsamen Ereignissen (links in Abb. 7.4) erreicht der Großteil der Abtastpunkte den korrekten Wert des Einzelkanalstroms. Es werden auch die Dauer und die Anzahl der Ereignisse richtig erkannt. Wenn die Länge eines Ereignisses kürzer wird, nehmen mehr und mehr Abtastpunkte Werte an, die tiefer liegen.

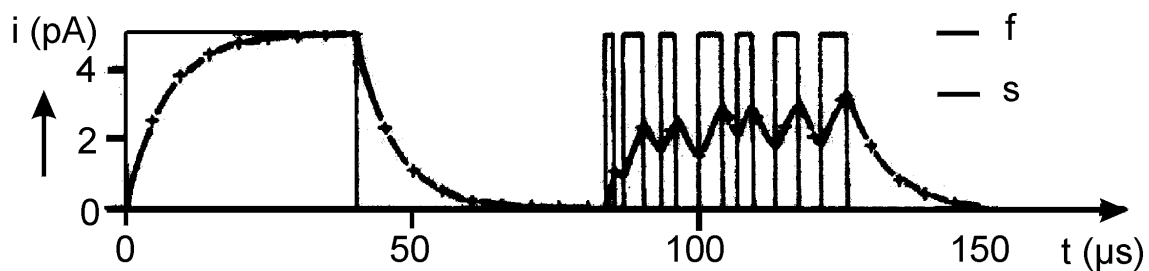


Abbildung 7.4: Darstellung der Reduzierung des Einzelkanalstroms verursacht durch schnelles Schalten. Die Kreuze sind die Abtastwerte. „f“ kennzeichnet das volle Niveau und „s“ die scheinbare niedrigere Leitfähigkeit (Hansen *et al.*, 1997).

Im Falle schnellen Flickerns (rechts in Abb. 7.4) genügt die Auflösung des Detektors nicht mehr, um das volle Stromniveau zu erreichen. Es erscheint ein scheinbarer Unter-niveaustrom mit einem Wert, der vom Verhältnis der Offen- und Geschlossenzeiten abhängig ist. Es wird ein scheinbarer Einzelkanalstrom mit einer kleineren Amplitude erhalten. Permeations- und Gating-Modelle können bei dieser Auflösung nicht mehr unterschieden werden. Bei einer nicht ausreichenden Auflösung können beide Modelle zu einer Reduzierung des Einzelkanalstroms führen. Ob für den AMFE ein Permeations- oder Gating-Modell zutrifft, soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

8 Statistische Analyse der Strom-Spannungskurven beim anomalen Molfraktionseffekt (AMFE) in *Chara*

Aus den Ergebnissen vorheriger Arbeiten (Kapitel 6) kann vermutet werden, dass die Ursache des AMFE schnelles Schalten ist. Durch die weitere Analyse soll überprüft werden, ob sich diese Vermutung bestätigen lässt.

8.1 Versuchsdurchführung

Die Vesikel, die sich in der Messlösung am Boden der Petrischale bilden (Abschnitt 3.3 und 3.4), können direkt zum Patchen verwendet werden. Folgende Lösungen wurden verwendet: Bad und Pipette: 250 mM KNO_3 + 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ oder 230 mM KNO_3 + 20 mM TINO_3 + 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Je nach Bedarf werden entweder gleiche oder unterschiedliche Lösungen im Bad und in der Pipette verwendet.

Als erstes wird der Nullstrom mit Hilfe der Offset Kompensation im Patchverstärker reguliert. Nachdem sich das Gigaseal gebildet hat (Abschnitt 3.2 und 3.4), werden die unterschiedlichen Haltespannungen zuerst von 0 bis -100 mV und danach von 0 bis 100 mV in 20 mV Schritten angelegt. Nach jeder angelegten Haltespannung wird nach einer kurzen Adaptationszeit 20 s lang gemessen, damit sich der Kanal im Steady-State aufhält. Sind alle Spannungen gemessen worden, wird entweder versucht, im zweiten Durchlauf mit einer anderen Reihenfolge der Haltespannungen zu messen, um zu sehen, ob sich die Ergebnisse des ersten Durchlaufs bestätigen lassen, oder es wird versucht, bei größeren Haltespannungen weitere Messungen durchzuführen. Dies funktionierte nicht bei jeder Messung, da sich die Güte des Gigaseals normalerweise durch die angelegten Haltespannungen verschlechterte.

8.2 Bestimmung der Lage des Minimums für die weitere Analyse

Für den Nachweis des schnellen Schaltens beim AMFE ist die Lage des Minimums von entscheidender Bedeutung. Abb. 8.1 zeigt den AMFE. Die Experimente, die in Abb. 8.1 dargestellt sind, wurden mit $[TlNO_3] + [KNO_3] = 150 \text{ mM}$ und $5 \text{ mM Ca(NO}_3)_2$ durchgeführt. Messungen in Lösungen mit unterschiedlichen Tl^+/K^+ -Verhältnissen am K^+ -Kanal in Excised Patches von Tonoplasten der Alge *Chara* ergaben, dass das Minimum des scheinbaren Einzelkanalstroms bei ca. 5-10 mM Tl^+ auftritt. Der Einzelkanalstrom nimmt mit relativ wachsender Tl^+ -Konzentration bis zu diesem Minimum ab (Kapitel 6). Wenn das Verhältnis von Tl^+ zu K^+ weiterhin wächst, steigt der Einzelkanalstrom wieder (Kapitel 6).

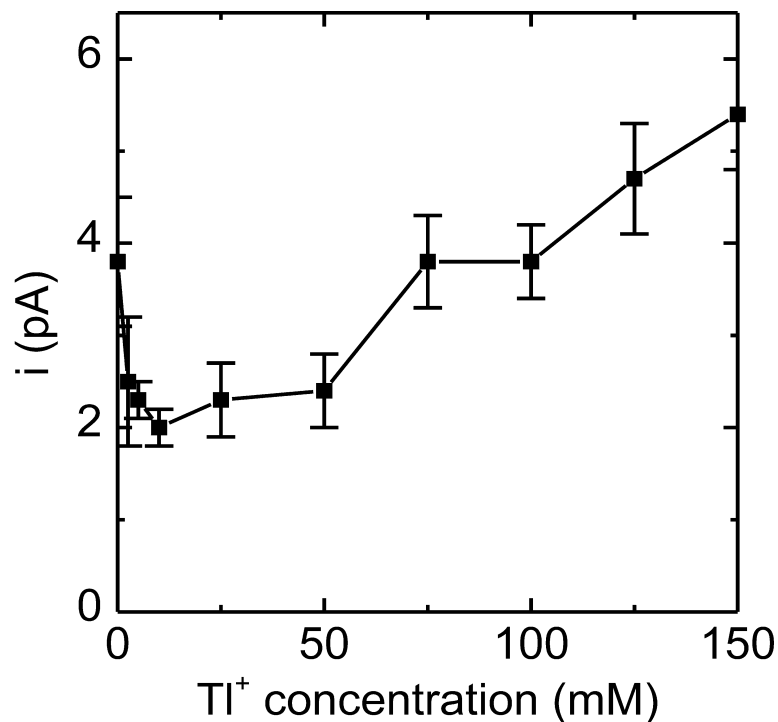


Abbildung 8.1: Scheinbarer Einzelkanalstrom in Inside-Out-Patches von *Chara*-Tropfen in Abhängigkeit von der Tl^+ -Konzentration (bei einer Gesamtkonzentration von $[Tl^+] + [K^+] = 150 \text{ mM}$). Die Membranspannung betrug $+80 \text{ mV}$ (Badlösung = cytosolische Seite). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier bis sieben Messungen (Die Messung der Einzelkanalströme wurden von Keunecke (1995) ohne Normierung übernommen).

8.3 Vergleich der Strom-Spannungskurven bei reiner K^+ -Lösung und im Minimum der AMFE-Kurve

Der Vergleich von Abb. 8.1 und Abb. 8.2 (oder Abb. 11.9) zeigt, dass die Gesamtkationen-Konzentration nicht ausschlaggebend für das Auftreten des AMFE ist. Der AMFE wurde auch bei einer Gesamt-Konzentration von $[TiNO_3] + [KNO_3] = 250$ mM beobachtet. Der AMFE tritt hier bei einer Lösung von 20 mM Ti^+ und 230 mM K^+ als ein Minimum des scheinbaren Einzelkanal-Stroms auf. Durch die Benutzung der höheren Ionenkonzentration verbessert sich das Signal-Rauschverhältnis, wodurch eine höhere zeitliche Auflösung erreicht werden kann.

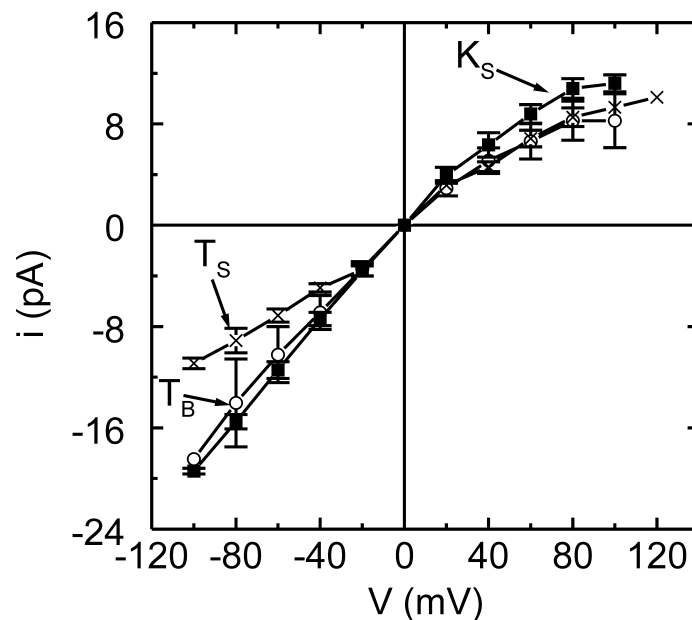


Abbildung 8.2: Seitenabhängigkeit des AMFE. Strom-Spannungskurven, die in $[Ti^+] + [K^+] = 250$ mM und 5 mM $Ca(NO_3)_2$ bei Zimmertemperatur in einer symmetrischen K^+ -Lösung (K_S , gefüllte Quadrate) mit einer asymmetrischen Ti^+ -Lösung (20 mM Ti^+ in der Badlösung = cytosolische Seite, T_B , offene Kreise) und einer symmetrischen Ti^+ -Lösung (20 mM Ti^+ auf jeder Seite, T_S , Kreuze) aufgenommen wurden.

Der AMFE ist asymmetrisch bezüglich der Membranspannung. Wenn sich Ti^+ in der Badlösung befindet, tritt der AMFE bei positiven Spannungen (in der Badlösung) auf. Dies lässt darauf schließen, dass ein AMFE dann auftritt, wenn der Strom Ti^+ -Ionen in die Pore zieht (offene Kreise bei positiven Spannungen in Abb. 8.2). Einen AMFE bei positiven und negativen Spannungen erhält man nur, wenn sich Ti^+ auf beiden Seiten der Membran befindet (Kreuze in Abb. 8.2). Sun *et al.* (1996) schlossen aus ähnlichen Befunden beim Na^+ -Block, dass die Na^+ -Bindungsstelle von beiden Seiten erreichbar ist.

Nach Doyle *et al.* (1998) ist der Selektivitätsfilter ein für das falsche Ion nicht passierbarer Schlauch. Dafür zeigten sie jedoch, dass modifizierende Bindungsstellen auf beiden Seiten vorkommen. Diese Ergebnisse von Abb. 8.2 stehen im Gegensatz zu vorangegangenen Messungen von Keunecke (Keunecke, 1995; Hansen *et al.*, 1997; Abschnitt 6.1.4) und wahrscheinlich auch zu den Messungen von Draber *et al.* (1991) (Abschnitt 6.1.2) am gleichen Kanal. Draber *et al.* (1991) hatten in der Cell-Attached-Konfiguration gemessen, wobei die Membranspannung am Patch unbekannt ist. Es wurden auch keine genaueren Informationen über die Ionenzusammensetzung im Inneren der intakten Zelle erhalten (Abschnitt 3.2.1). Die Filterfrequenz betrug nur 1 kHz. Da aber der AMFE für den gesamten Spannungsbereich gemessen wurde, spricht es für einen symmetrischen AMFE. Die Ursachen für diese symmetrischen Effekte sind aber unbekannt, da sie ausschließlich in diesen frühen Untersuchungen beobachtet wurden.

8.4 Theorien für oder gegen das Hille-Schwarz-Modell

Verschiedene Theorien des Kanal-Transports haben versucht, den AMFE zu erklären. Es wurde vor allem angenommen, dass der AMFE ein Hauptargument für das Hille-Schwarz-Modell (Hille und Schwarz, 1978) mit zwei Bindungsstellen im Kanal darstellt. Die elektrostatische Abstoßungskraft eines zweiten Ions ist nötig, um ein Ion aus der Bindungsstelle zu befreien. Dieses Modell, das von vielen Arbeitsgruppen übernommen wurde (z. B. Ciani *et al.*, 1978), wurde durch etliche Befunde untermauert. So zeigten z. B. Baukowitz und Yellen (1996), dass die Wahrscheinlichkeit, den Kanal zu verlassen, stark abnahm, wenn kein zweites Ion zur Verfügung stand.

Trotzdem muss die bisherige Interpretation dieser Ergebnisse auf der Grundlage eines starren Energieprofils mit tiefen Minima (Bindungsstellen) und die Notwendigkeit einer Annahme von mehreren Bindungsstellen für den AMFE in Frage gestellt werden, auch wenn Doyle *et al.* (1998) mit Röntgenstrukturanalyse zeigten, dass sich die Ionen im KcsA-Kanal an mindestens zwei Stellen bevorzugt aufhalten (Abschnitt 2.4). Die neueren Modelle gehen von Konformationsänderungen im Kanalprotein aus. Der erste Hinweis dafür ergab sich aus der Beobachtung von Pietrobon *et al.* (1988), dass der protonierte Zustand einer Gruppe auf der externen Kanal-Seite durch ein permeierendes Kation destabilisiert wird. Sie nahmen an, dass Konformationsänderungen des Dihydropyridin-sensitiven (L-Typ) Ca^{2+} -Kanals, die durch ein permeierendes Ion verursacht wurden, vom nachfolgenden Ion bemerkt werden können. Die Probleme der Permeations-Modelle wurden auch von Pallotta und Wagoner (1992) diskutiert. Sie kamen zu der Aussage, dass das Modell mit mehreren Bindungsstellen ein Problem darstellt.

Alternative Modelle, die die Annahme von mehreren Bindungsstellen vermieden, wurden von Wu (1991, 1992; Abschnitt 7.3) und Nonner *et al.* (1998) vorgeschlagen. Im

Wu-Modell ist die kinetische Energie des sich nähernden zweiten Ions notwendig, um das Ion von einer einzigen Bindungsstelle freizusetzen. Ähnlich zum Hille-Schwarz-Modell funktioniert die wechselseitige Freisetzung aus der Bindungsstelle am besten, wenn beide Ionen gleich sind. Die Hypothese von Nonner *et al.* (1998) beruht auf einer Kontinuumstheorie, bei der gezeigt wird, dass sogar eine normale Feldtheorie wie Poisson-Nernst-Planck, die nicht auf diskreten Strukturen wie Kanälen basiert, einen AMFE erzeugen kann. Dies hat jedoch kaum Aussagekraft für Kanäle, die hochstrukturiert und damit nicht als Kontinuum beschreibbar sind.

8.5 Permeation oder Gating?

Eine Frage ist jedoch noch wichtiger als die nach dem richtigen Modell (Kapitel 7): Ist der AMFE ein Gating- oder ein Permeationseffekt (Hansen *et al.*, 1997; Townsend und Horn, 1999)? Permeation und Gating sind zwei fundamentale biophysikalische Eigenschaften des Ionenkanals. Sinkt der mittlere Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Ionen (Leitfähigkeit des Offenzustands), weil das Ion länger für den Durchtritt benötigt, wird von einem Permeationseffekt gesprochen (Abb. 8.3A). Bleibt der mittlere Abstand der permeierenden Ionen konstant, unterbrochen durch Pausen der Inaktivität, handelt es sich um Gating (Abb. 8.3B). Dies ist messtechnisch schwer zu unterscheiden, wenn die Schaltfrequenz des Gatings über der Auflösungsgrenze der Messapparatur liegt, um die Unterbrechungen des Ionen-Flusses aufzulösen (Hansen *et al.*, 1997).

Die Untersuchungen am AMFE von Keunecke (1995) ergaben durch das Verschwinden der schnellen Zeitkonstanten in den Dwell-Time-Histogrammen im Bereich des Minimums der AMFE-Kurve starke Hinweise auf Gating (Abschnitt 6.1.4). Dies wurde damals so gedeutet, dass die Zeitkonstante aus dem Zeitfenster der Analyse verschwindet.

Weitere Hinweise ergaben sich aus der Diplomarbeit (Farokhi, 1998, Abschnitt 6.1.5), bei der versucht wurde, die Schaltprozesse mit Hilfe von Abkühlung zu verlangsamen. Die Strom-Spannungskurven mit TI^+ (230 mM KNO_3 und 20 mM TINO_3) und ohne TI^+ (250 mM KNO_3) fielen bei geringer Temperatur (7°C) zusammen. Die Temperaturabhängigkeit des gemessenen (scheinbaren) Einzelkanalstroms in Gegenwart von TI^+ wird somit durch zwei gegenläufige Effekte bestimmt: Die bessere Auflösung bei Temperaturreduzierung kann dazu führen, dass die schaltbedingte Reduzierung des Einzelkanalstroms zum Teil aufgehoben wird, während die Temperatur selbst wie in den Messungen mit reinem K^+ den wahren Einzelkanalstrom senkt. So kann es vorkommen, dass sich der scheinbare Einzelkanalstrom mit der Temperatursenkung weniger ändert. Daraus folgt, dass sich die Strom-Spannungskurven mit und ohne TI^+ bei tiefen Temperaturen nicht mehr unterscheiden. Es gelang jedoch nicht, dieses schnelle Schalten in der Mischlösung beim AMFE aufzulösen.

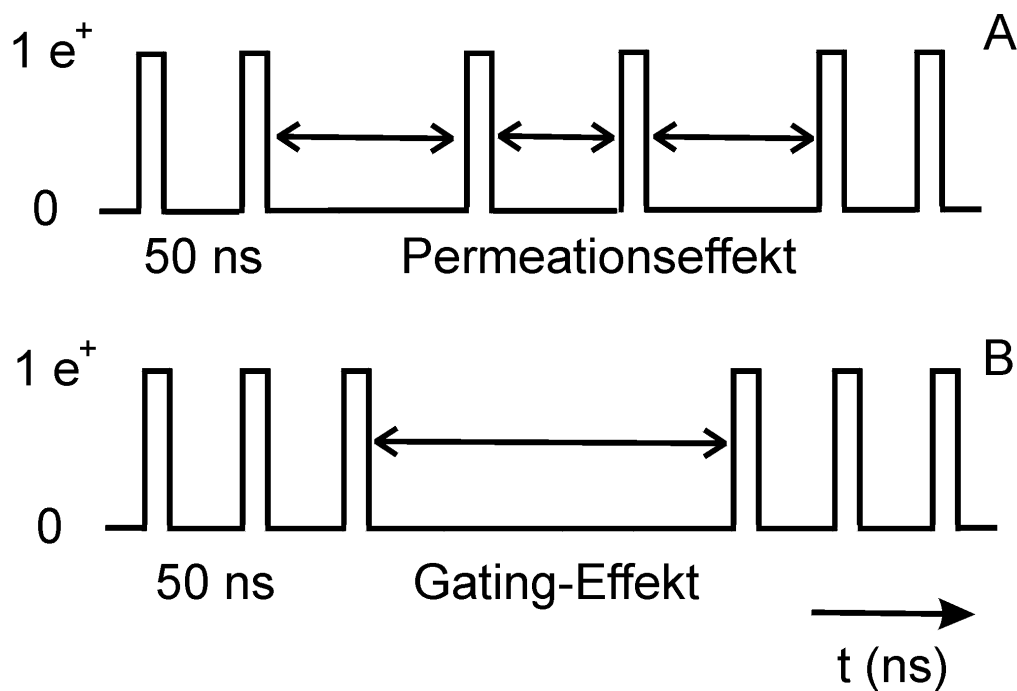


Abbildung 8.3: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs eines Ions durch den Kanal beim Permeations- (A) und Gating-Effekt (B). Der mittlere zeitliche Abstand zwischen zwei Ionen ist 50 ns. (A) Beim Permeationseffekt ändert sich der mittlere Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Ionen, (B) beim Gating-Effekt ist der mittlere Abstand der Ionen konstant, es tritt aber Inaktivierung auf, die eine Pause für die durchgehenden Ionen verursachen kann.

Diese Frage ist auch beim Block von Ionenkanälen durch (andere) Ionen (z.B. Na^+ -Block, Kapitel 12) aktuell. Als gelöst ist diese Frage beim Block des K^+ -Kanals durch Cs^+ zu betrachten. Erste Messungen mit Filtern von 5 kHz zeigten im Bereich negativer Spannungen bei Anwesenheit von Cs^+ eine negative Steigung der Strom-Spannungskennlinien (Draber und Hansen, 1994). Nach einem indirekten Hinweis aus Betaverteilungen (Klieber und Gradmann, 1993) gelang es, durch Erhöhung der Abtastfrequenz auf 100 kHz (Draber und Hansen, 1994) das schnelle Schalten aufgrund von Cs^+ direkt in der Zeitreihe zu zeigen (keine Abnahme des Einzelkanalstroms) und auch die Spannungs- und Cs^+ -Konzentrations-Abhängigkeit des Überganges in den schnellen Closed-Zustand darzustellen. Dies lieferte auch einen Widerspruch zum Woodhull Modell (1973) und lenkte die Aufmerksamkeit auf spannungsinduzierte Verformungen des Proteins als Alternativerklärung. Die Ergebnisse mit Cs^+ führten zur Fragestellung, ob schnelles Schalten auch eine entscheidende Rolle beim AMFE spielt.

Die Wirkung der Bindung eines permeierenden Ions in der Porenregion auf das Gating spiegelt sich in vielen Arbeiten wieder (z.B. Townsend und Horn, 1999). Was auffällt, ist, dass aus "makroskopischen" Ergebnissen (Offenwahrscheinlichkeit über Spannung,

Whole-Cell-Strom-Spannungskurven) auf die Wirkung von Mutationen und Besetzungen einzelner Bindungsstellen auf das Gating geschlossen wird. Es fehlt dabei meistens die "mikroskopische" Analyse, die in dieser Arbeit durchgeführt werden soll, nämlich der experimentelle Nachweis des Einflusses auf das Gating. Diese würde aus der Abhängigkeit der Ratenkonstanten der vermuteten Aktivierungs- und Deaktivierungsprozesse von den Konzentrationen der beteiligten Ionen direkt aus den Einzelkanaldaten erhalten werden.

8.5.1 Darstellung der Messdaten

Die Messdaten werden auf zwei verschiedene Arten, wie in Abschnitt 4.2 ausführlich erklärt, dargestellt. Es handelt sich hierbei um die Darstellung von Zeitreihen bzw. Amplitudenhistogrammen.

8.5.1.1 Zeitreihen

Die folgenden Messungen wurden bei einer Gesamt-Konzentration von $[Tl^+] + [K^+] = 250 \text{ mM}$ und $[Ca^{2+}] = 5 \text{ mM}$ durchgeführt, wie es in Abb. 8.2 dargestellt ist. Die höhere Gesamt-Konzentration (im Vergleich zu den Messungen in Abb. 8.1) stellte sich als nützlich heraus, um das Signal-Rauschverhältnis (höhere Einzelkanalströme) zu verbessern, das ausschlaggebend für die zeitliche Auflösung ist. Abb. 8.4 zeigt zwei Messungen, bei denen der Strom an einer Excised-Patch-Konfiguration (inside-out) mit zwei Kanälen bei einer Abtastrate von 100 kHz und einem vierpoligen Anti-Aliasing-Filter von 25 kHz bestimmt wurde.

Die Einzelkanalströme werden hier mit Hilfe von Hilfslinien durch die Stufen in der Originalzeitreihe bestimmt (Fit-by-Eye; Abb. 4.1; Abschnitt 4.2). Es ist auch möglich, mit dem Cursor Bereiche auszuwählen, in denen die Nulllinie und die einzelnen Stromniveaus gut erkennbar sind. In der Literatur werden die Niveaus häufig durch Fitten von Amplitudenhistogrammen mit einer Summe von Gaussfunktionen bestimmt (Abb. 4.2; Gleichung 4.3). Doch der Fit-by-Eye ist dem Gauss-Fit weit überlegen und erreicht ungefähr die gleiche Qualität wie das von Rießner (1998) und Woelk (2000) entwickelte Verfahren zur automatischen Level Detection (Rießner *et al.*, 2002).

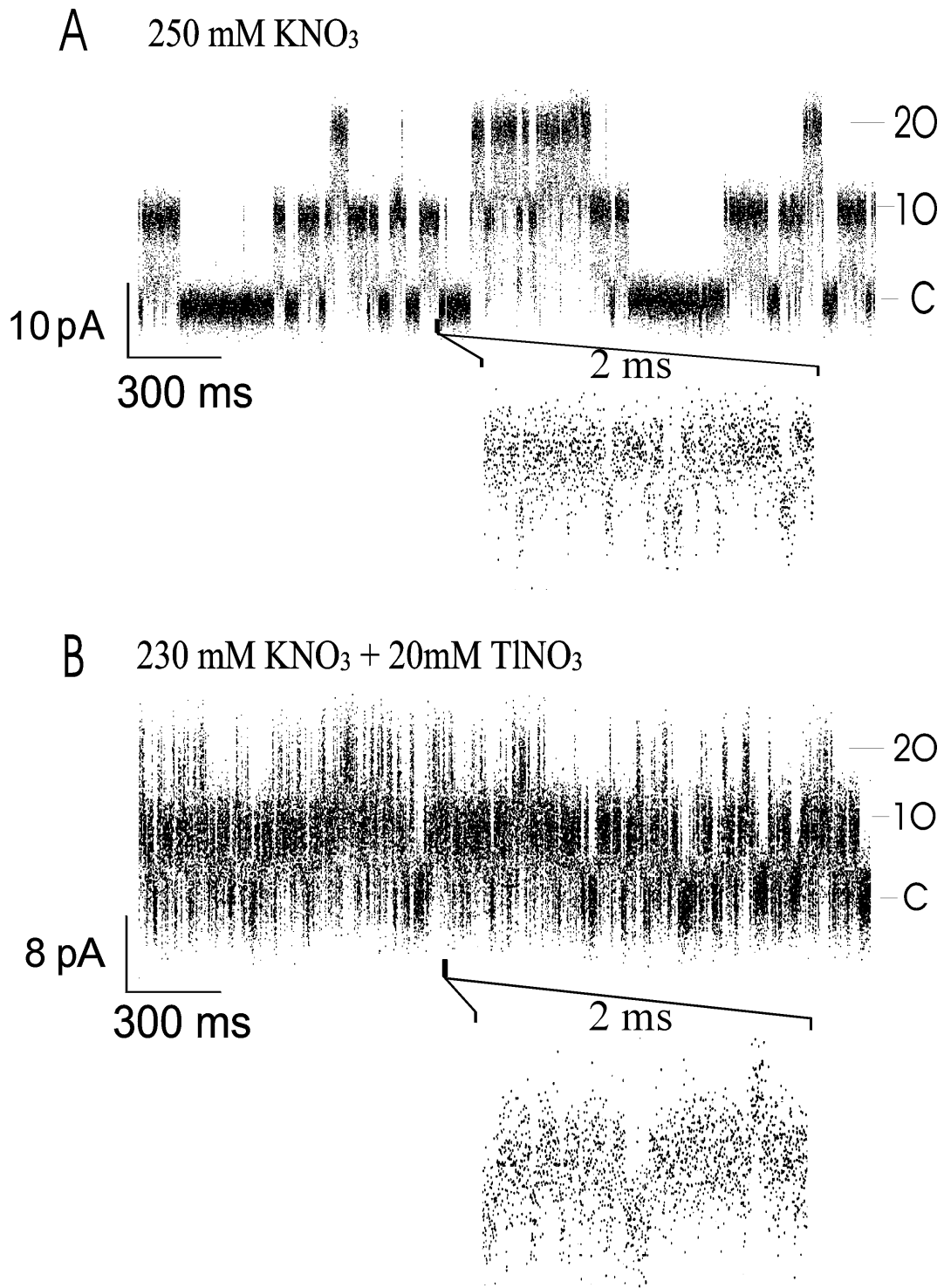


Abbildung 8.4: Zeitreihe des Stromes (250 000 Datenpunkte), die von Vesikeln von *Chara* in (A) 250 mM KNO₃ + 5 mM Ca(NO₃)₂ und in (B) 230 mM KNO₃ + 20 mM TiNO₃ + 5 mM Ca(NO₃)₂ aufgenommen wurden. C, 10 und 20 auf der rechten Seite stellen die Stromniveaus dar (C = geschlossen, 10 = ein Kanal geöffnet, 20 = zwei Kanäle geöffnet). Die Membranspannung betrug +100 mV. Die Länge der gespreizten Abschnitte ist 2 ms.

Auf einer Zeitskala im Sekundenbereich können die Stromniveaus, die der Höhe der Sprünge von einem Niveau zum anderen entsprechen, leicht in der Messung bei 250 mM KNO_3 identifiziert werden (Abb. 8.4A). Wenn TI^+ zugefügt wurde, trat stärkeres Rauschen auf. Ein Filter im Bereich von 1 kHz würde jedoch klare Stromniveaus ergeben. Weiterhin kann in Abb. 8.4B beobachtet werden, dass die Übergänge in kürzeren Zeitabschnitten und häufiger (Burst) auftreten als in reiner K^+ -Lösung (Abb. 8.4A). Die Offenzustände werden viel häufiger von sehr kurzen Geschlossenenzuständen (Gaps) eines der beiden Kanäle unterbrochen. Diese gespreizte Darstellung (die jeden einzelnen Punkt bei einer Abtastrate von 100 kHz zeigt; Ausschnitte von 2 ms in Abb. 8.4A und B) verdeutlicht die Probleme, die überwunden werden müssen, wenn der Einzelkanalstrom von Kanälen mit schnellem Schalten bestimmt werden soll.

8.5.1.2 Amplitudenhistogramme

Das Standardverfahren ist die Erzeugung von Amplitudenhistogrammen (Abschnitt 4.2) wie das in Abb. 8.5 dargestellte, und das Fitten dieser Amplitudenhistogramme mit einer Summe von Gauß-Funktionen, um den scheinbaren Einzelkanalstrom zu erhalten (Gleichung 4.3). Zum einen wirkt es als Kontrolle der nach Abb. 8.4 bestimmten Einzelkanalströme, zum anderen soll dadurch die Standardabweichung σ des Stromes bestimmt werden. Diese Größe ist entscheidend für die Analyse der kinetischen Eigenschaften des Kanals (Abschnitte 4.4 und 4.5). Die Auswertungen wurden bei verschiedenen Spannungen durchgeführt und liefern damit die Spannungsabhängigkeit der Einzelkanalströme zum Aufstellen einer Strom-Spannungskurve (Abb. 8.2). Das Vorzeichen des elektrischen Stroms wird wie folgt definiert: Ein positiver Strom fließt vom Cytoplasma zur Vakuolen-Seite des Tonoplasten (Bertl *et al.*, 1992).

Wenn schnelles Schalten (Ratenkonstanten höher als die Abknick-Frequenz des Filters) involviert ist, werden die Gauß-Funktionen in Beta-Verteilungen umgewandelt (FitzHugh, 1983; Yellen, 1984). In Extremfällen wird die Beteiligung der Beta-Verteilungen deutlich durch starke Abweichungen der Kurvenform von der Gaußschen Form (Asymmetrie). Sie wurden z. B. von Klieber und Gradmann (1993) für den Nachweis schnellen Schaltens im Cs^+ -Block verwendet, bevor Draber und Hansen (1994) die schnellen Ratenkonstanten direkt ermittelten.

Schnelles Schalten, das nicht so weit von der Filter-Frequenz entfernt liegt, würde sich jedoch in einer Verbreiterung der Gauß-Funktionen ohne eine sichtbare Abweichung von der Kurvenform bemerkbar machen. Ein solcher Effekt ist in Abb. 8.5 angedeutet.

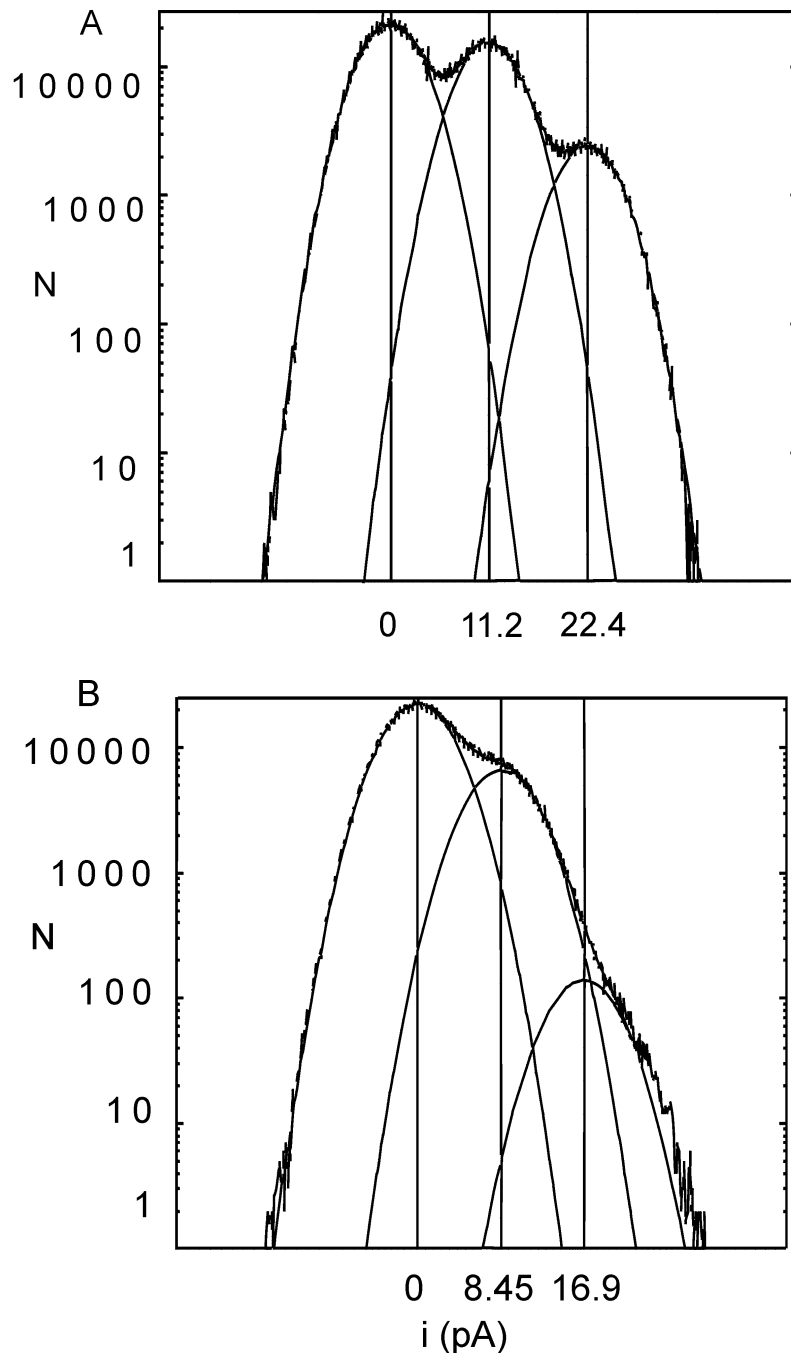


Abbildung 8.5: Amplitudenhistogramme von Zeitreihen, die bei einer Spannung von +100 mV in (A) 250 mM KNO_3 + 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und in (B) 230 mM KNO_3 + 20 mM TINO_3 + 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ gemessen wurden. Die Daten sind verschiedenen Patches entnommen. Die Abtastrate betrug 100 kHz mit einem vierpoligen Besselfilter von 25 kHz. $2 \cdot 10^6$ Abtastpunkte, N = Frequenz pro bin (0.06 pA). Die durchgezogenen Linien stellen den Fit durch eine Summe von Gauß-Funktionen und die aufgespaltenen Amplitudenhistogramme pro Niveau dar. Die Standardabweichung σ betrug (A) 3.42 pA und (B) 4.47 pA. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen σ von offenen und geschlossenen Niveaus wurde nicht beobachtet.

Die Amplitudenhistogramme ohne und mit TI^+ können mit Gauß-Funktionen gefittet werden, sie sind allerdings bei den Daten mit TI^+ breiter (Abb. 8.5B). Diese Verbreiterung wirkt sich nicht nur auf die Standardabweichung σ des Stroms des offenen Kanals, sondern auch auf das Geschlossen-Niveau aus, da die Verweildauer im Geschlossen-Niveau während des schnellen Flickerns sehr kurz ist. Dies kann an der Nulllinie in Abb. 8.4B gesehen werden (und wird in Tabelle 10.2 offensichtlich werden). Die Verbreiterung ($\sigma = 3.42$ pA ohne und $\sigma = 4.47$ pA mit TI^+ in Abb. 8.5) lässt vermuten, dass schnelles Schalten die Ursache für die Abnahme des Einzelkanalstroms in den Abbildungen 8.2-5 ist.

8.6 Überprüfen der Hypothese, ob der AMFE ein Gating-Effekt ist

Im folgenden soll untersucht werden, ob der AMFE durch schnelle Übergangsraten der zum Kanal gehörenden Markov-Modelle bestätigt werden kann.

8.6.1 Die Vorgehensweise

Der Zusammenhang zwischen den Übergangsraten (k_{CO} , k_{OC}) und dem mittleren Strom i für ein einfaches C-O Modell bei einem Kanal im Steady-State (d.h. der Kanalstrom im zeitlichen Mittel ist konstant) lautet (Farokhi, 1998):

$$i \propto \frac{k_{CO}}{k_{CO} + k_{OC}} \quad (8.1)$$

Die Formel stellt einen direkten Zusammenhang zwischen den Übergangsraten und dem Stromniveau bei dem Zustandsmodell C-O und einem Einzelkanal im Falle unentdeckten schnellen Schaltens her. Reale Messungen haben aber mehr als einen Kanal und meistens mehr Zustände als das C-O Modell. Dies gestaltet die kinetische Untersuchung eines realen Kanals sehr schwierig.

Es gibt keine einfache Theorie, die beschreibt, wie der Filter des Messaufbaus den tatsächlichen Einzelkanalstrom zum scheinbaren Einzelkanalstrom verändert, der sich durch die Auswertung des Amplitudenhistogramms ergibt. Zu diesem Zweck musste die Theorie der Beta-Verteilungen auf Mehr-Kanal-Mehr-Zustandsmessungen ausgeweitet werden. Da diese aber nur für Filter erster Ordnung zur Verfügung (Rießner, 1998) steht, wurden Simulationen durchgeführt (Abschnitt 4.6). Ein Markov-Modell (Ab-

schnitt 4.1), von dem nachgewiesen wurde, dass es dasselbe kinetische Verhalten aufweist wie der biologische Kanal, wurde verwendet, um eine Zeitreihe zu erzeugen. Diese Zeitreihe wird mit dem gleichen Rauschen überlagert, das sich auch bei den Messungen ergab. Das Rauschen wurde bei einem Gigaseal mit einer Haltespannung von 0 mV, bei der keine Schaltprozesse auftreten, aufgenommen. Dann wurde die sich dabei ergebende Aufnahme auf dieselbe Art untersucht wie die echten Daten, um den scheinbaren Einzelkanalstrom zu bestimmen. Da in einer Simulation der "wahre" Einzelkanalstrom (i_{sim}) bekannt ist, kann quantitativ, durch einen Vergleich mit dem wahren Strom die Wirkung des Filterns auf den scheinbaren Einzelkanalstrom (i_{fit}) eingeschätzt werden. Der Einzelkanal-Strom i_{sim} ist derjenige Strom, der in den Simulationen verwendet wurde. Der scheinbare Einzelkanal-Strom der simulierten Zeitreihe (i_{fit}) wurde interaktiv durch einen Fit-by-Eye und einen Gauß-Fit, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, bestimmt.

Ein schwierigeres Problem ist es, das Markov-Modell des echten Kanals und seine Ratenkonstanten zu erhalten. Es gibt zwei verschiedene Fragestellungen bei der Analyse mit Markov-Modellen. Die phänomenologischen Modelle werden aus den beobachteten Zeitreihen hergeleitet. Es wird das kleinste Modell ausgewählt, das die Eigenschaften der Zeitreihe noch wiedergeben kann. Die molekularbiologischen Modelle gehen von einer Vorstellung aus, wie die Einheiten der Kanalproteine zusammenarbeiten, und es wird verglichen, ob die Modellvorhersagen und die gemessenen Zeitreihen zusammenpassen (Abschnitt 10.3; Kapitel 11).

Für die hier vorliegende Fragestellung (Gating oder Permeation beim AMFE) ist es aber nicht notwendig, das wahre Modell zu finden. Es genügt, ein Modell zu finden, das Zeitreihen erzeugt, die dieselben kinetischen Eigenschaften besitzen wie der biologische Kanal, obwohl es ein willkommener Nebeneffekt wäre, wenn das ausgewählte Modell nahe an das wahre des Kanals kommen würde. Wichtig ist, dass die statistischen Eigenschaften der Zeitreihe richtig beschrieben werden.

Die eindimensionalen Histogramme beinhalten aber leider keine Information über die Korrelation zwischen zwei benachbarten Ereignissen. 2-dimensionale Dwell-Time Histogramme (Song und Magleby, 1994; Colquhoun *et al.*, 1996; Moss *et al.*, 1999; Radomski, 2000) könnten daher zur Modellunterscheidung herangezogen werden. Die Schwierigkeit bei der Verwendung 2-dimensionaler Dwell-Time-Histogramme besteht darin, dass sie auf 1-Kanal-Aufzeichnungen beschränkt sind, die extrem selten sind. Es müssen außerdem genügend Ereignisse bei einer Einzelkanalmessung auftreten, um ähnliche Modelle voneinander unterscheiden zu können.

In Kapitel 9 wird gezeigt werden, dass die allgemein verwendete Dwell-Time-Analyse (Blunck *et al.*, 1998; Abschnitt 4.4) bei den TI^+ -Daten scheitert. Stattdessen erreicht jedoch ein direkter Fit der Zeitreihen (Fredkin und Rice, 1992; Albertsen und Hansen,

1994; Klein *et al.*, 1997; Abschnitt 4.5) das für den hier vorliegenden Zweck notwendige Auflösungsvermögen.

9 Untersuchung des Markov-Modells und dessen Ratenkonstanten durch eine Mehr-Kanal-Mehr-Zustands-Dwell-Time-Analyse

Die erste Methode, die Fragestellung zu untersuchen, ob es sich beim AMFE um einen Gating- oder Permeationseffekt handelt, ist die Mehr-Kanal-Mehr-Zustands-Dwell-Time-Analyse.

9.1 Durchführung der Analyse

Die hier angewendeten Analysen werden an den identischen Zeitreihen, die in Kapitel 8 verwendet wurden, durchgeführt. Die aufgezeichneten Zeitreihen werden mit der in Abschnitt 4.4 beschriebenen Dwell-Time-Analyse untersucht.

9.2 Berechnung der Ratenkonstanten

Die "rauschfreien" Zeitreihen wurden aus den gemessenen Aufnahmen mit Hilfe eines Hinkley-Detektors vierter Ordnung (Schultze und Draber, 1993; Hansen *et al.*, 1995; Abschnitt 4.3) rekonstruiert, dessen zeitliche Auflösung von 20-60 μs (K^+) und 70-140 μs (TI^+/K^+) automatisch, entsprechend einem Signal-Rauschverhältnis von $i/\sigma = 3.5-2.4$ (K^+) und 2.2-1.5 (TI^+/K^+) gewählt wurde. Dann wurden die Mehr-Kanal-Dwell-Time-Histogramme erzeugt (Abb. 9.1, Abschnitt 4.4). Das Schaltverhalten selbst wird mit Hilfe der Ratenkonstanten der Übergänge zwischen den Zuständen des Kanals direkt beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit interessiert die Änderung der Ratenkonstanten bei den unterschiedlichen Lösungen.

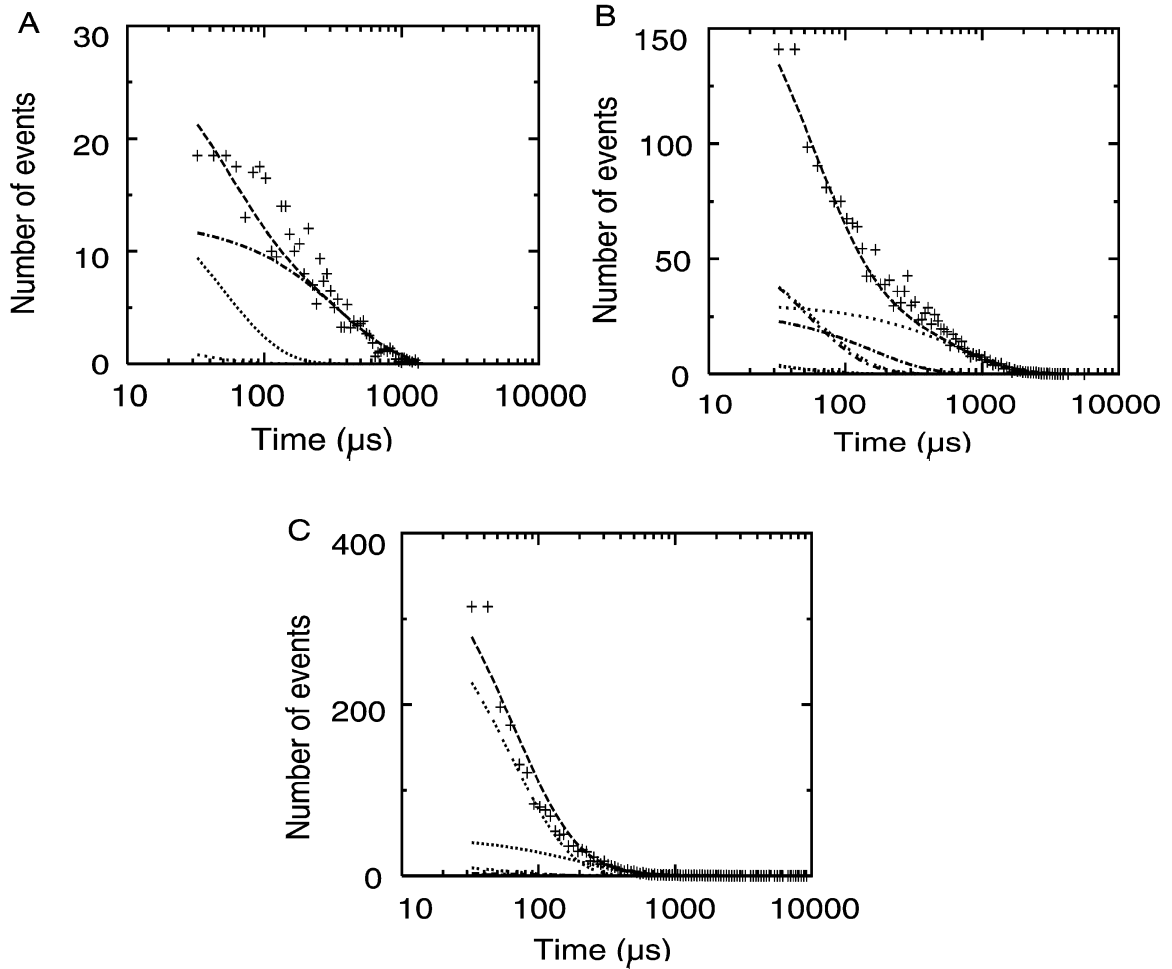


Abbildung 9.1: Mehr-Kanal-Target-Fit einer 2-Kanal-Aufnahme (20 s , $2 \cdot 10^6$ Datenpunkte) gefittet mit dem A-O-G-C-Z-Modell. Es sind dargestellt: (A) Niveau 2, (B) Niveau 1 und (C) Niveau 0. Die Linien neben den Datenpunkten (+) zeigen die einzelnen Exponentialfunktionen von Gleichung 4.9. Die gestichelte Linie (----) ist die Summe der einzelnen Exponentialfunktionen. Die logarithmische Zeitachse beinhaltet nicht, dass das Histogramm in logarithmische Bins eingeteilt ist. Die Einheit auf der y-Achse stellt die Anzahl der Ereignisse/ $40\ \mu\text{s}$ für alle Datenpunkte dar, obwohl die Mittelung in exponentiell wachsenden Intervallen erfolgte.

In Abschnitt 10.3 wird gezeigt werden, dass fünf unterschiedliche 5-Zustandsmodelle kinetisch identisch sind. Es ist für die Berechnung des mittleren Stroms nicht unbedingt notwendig, das "wahre" Modell aus einer Klasse kinetisch äquivalenter Modelle zu bestimmen. Eines dieser Modelle, das lineare A-O-G-C-Z-Modell (A und O: Offen-Zustände mit derselben Leitfähigkeit; G, C und Z: Geschlossen-Zustände), wurde für einen Target-Fit der Mehr-Kanal-Dwell-Time-Histogramme benutzt (Abb. 9.1; Abschnitt 4.3). Ein Target-Fit (Blunck *et al.*, 1998), der auf den Gleichungen 4.8 bis 4.10 basiert, wird verwendet, da er direkt die Ratenkonstanten des ausgewählten Markov-Modells liefert. Fits mit Modellen mit weniger als fünf Zuständen konnten die

Datenpunkte nicht wiedergeben (Farokhi, 1998). Die Fits weichen dann von den Messdaten ab. Die Anzahl der Offen- und Geschlossenzustände werden bei Mehr-Kanal-Niveaus in erster Näherung aus dem Offen-Dwell-Time-Histogramm (bei dem alle Kanäle offen sind) und Geschlossen-Dwell-Time-Histogramm durch Fit der Exponentialfunktionen bestimmt (Farokhi, 1998). In der Diplomarbeit (Farokhi, 1998) wurden vor allem die Modelle C-O-C und O-O-C-C-C miteinander verglichen. Die theoretische Kurve wurde besser für das 5-Zustandsmodell an die Messdaten angepasst als für das 3-Zustandsmodell. Die Messdaten haben eine deutlich geringere Abweichung von der Fitfunktion bei einem 5-Zustandsmodell. Der Fehler macht sich meistens in den Diagrammen mit mehreren offenen Kanalzuständen bemerkbar, da weniger Daten zur Verfügung stehen und modellbedingte Abweichungen kaum ins statistische Gewicht fallen. Die unteren Niveaus passen sich im allgemeinen besser an. Die Modelltestung geschah sowohl an K^+ -Daten als auch an K^+/TI^+ -Daten.

Lühring (1999), der mit dem Programm „Day“ (Blunck *et al.*, 1998) Daten zum pH-Effekt in *Chara* auswertete, fand, dass das O-O-C-C-C Modell ebenfalls die besten Fits ergab. Das O-O-C-C-C Modell wurde auch für den Kalium-Kanal in der Roggen-Wurzel angenommen (White, 1996). Allerdings haben die Autoren keine Target-Fits durchgeführt. Die Anzahl der Offen- und Geschlossen-Zustände wurde aus dem Zeitkonstantenfit ermittelt, die Anordnung wurde geraten (persönliche Mitteilung) und die Ratenkonstanten wurden z. T. aus den Verhältnissen der Verweildauern in den Zuständen geschätzt. Die neuesten Untersuchungen von Zheng *et al.* (2001) zeigen auch, dass ein lineares Markov-Modell (C-C-S-S-O, C geschlossen, S Unterniveau und O offen) ausreichend für ihre Analyse ist und dass größere Modelle keine Änderung der Likelihood ergeben. Aus diesem Grund haben sie sich auf dieses lineare 5-Zustandsmodell beschränkt. Ihre Ratenkonstanten sind in der Größenordnung der Ratenkonstanten aus dem Direkten-Zeitreeihen-Fit, die bei diesen Untersuchungen bestimmt worden sind (Abb. 10.1). So wird für die weitere Untersuchung der Ratenkonstanten mit 5-Zustandsmodellen gearbeitet.

Um die Beiträge der einzelnen Komponenten in der Summe von Gleichung 4.9 darzustellen, sind entsprechenden Exponentialfunktionen in Abb. 9.1 eingezeichnet, die als Linien neben den Datenpunkten abgebildet sind. Ihre Anzahl (3 für Niveau 2, 6 für Niveau 1 und 6 für Niveau 0, teilweise nicht sichtbar, da die Komponenten zusammenfallen oder die Amplitudenfaktoren sehr klein sind) ist höher als diejenige, die für eine Ein-Kanal-Aufnahme eines 5-Zustandsmodells erwartet wird. Dies zeigt, dass die Beziehung zwischen Zeitkonstanten und Ratenkonstanten eines Markov-Modells in der Mehr-Kanal-Analyse sehr komplex ist (Blunck *et al.*, 1998; Abschnitt 4.4). Das ist der Grund, warum die Amplitudenfaktoren und die Zeitkonstanten dieser verschiedenen Komponenten nicht dargestellt sind, da sie im Gegensatz zu den Ratenkonstanten keine einfach zu interpretierende Bedeutung haben (Blunck *et al.*, 1998). Stattdessen zeigt

Tabelle 9.1 die gemittelten Ratenkonstanten des A-O-G-C-Z-Modells, die sich durch das Fitten von 7 bzw. 4 experimentellen Dwell-Time-Histogrammen ohne bzw. mit TI^+ ergaben.

Ratenkonstanten	K^+ -Lösung	$\text{K}^+ + \text{TI}^+$ -Lösung
k_{AO}	$8\,100 \pm 3100$	$7\,400 \pm 3400$
k_{OA}	$10\,000 \pm 2300$	$11\,000 \pm 4700$
k_{OG}	$6\,000 \pm 3400$	$7\,100 \pm 4000$
k_{GO}	$9\,200 \pm 2200$	$7\,500 \pm 3300$
k_{GC}	$5\,400 \pm 3300$	$5\,800 \pm 3300$
k_{CG}	$1\,700 \pm 1200$	$2\,400 \pm 1300$
k_{CZ}	$2\,300 \pm 1300$	$1\,700 \pm 900$
k_{ZC}	300 ± 200	300 ± 200
$i_{\text{fit}} / i_{\text{sim}}$	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00

Tabelle 9.1: Gemittelte Ratenkonstanten aus 4 bzw. 7 Messungen an verschiedenen Patches, die in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von 20 mM TI^+ bei 80-100 mV aufgenommen und durch Dwell-Time-Analyse mit Hilfe der Gleichungen 4.8 bis 4.10 erhalten wurden. Die oberen acht Zeilen zeigen den Mittelwert \pm SD. Die letzte Zeile stellt die Reduktion des Offen-Kanal-Stroms $i_{\text{fit}}/i_{\text{sim}}$ in einer Zeitreihe dar, die mit den Durchschnittswerten der Ratenkonstanten und einem Offen-Kanal-Strom i_{sim} simuliert wurde.

9.3 Erzeugung von Zeitreihen aus den berechneten Ratenkonstanten

Der Einfluss von Gating auf den scheinbaren Einzelkanalstrom wurde mit Hilfe von Simulationen untersucht (Abschnitt 4.6). Die gemittelten TI^+ -Daten in Tabelle 9.1 wurden verwendet, um die Zeitreihen des Kanals zu simulieren, wie es in Abschnitt 4.6 beschrieben ist. Der Offen-Kanal-Strom (i_{sim}) wurde für K^+ und TI^+/K^+ auf 11.2 pA gesetzt, mit Rauschen von 3.42 pA überlagert und mit einem vierpoligen Besselfilter (25 kHz wie auch in den Messungen) gefiltert. Die Amplitudenhistogramme, die sich aus den simulierten Zeitreihen ergaben, wurden mit einer Summe von Gauß-Funktionen gefittet (Gleichung 4.3), um zusätzlich zu den scheinbaren Einzelkanalströmen i_{fit} auch das Rauschen zu bestimmen. Die letzte Zeile in Tabelle 9.1 gibt die Reduktion $i_{\text{fit}}/i_{\text{sim}}$ wieder, die durch das Gating bewirkt wird. Nach dieser Art von Analyse scheint das

durch TI^+ hervorgerufene Gating keine Reduktion des scheinbaren Einzelkanalstroms zu verursachen, da sich für beide Fälle i_{fit} von i_{sim} nicht unterscheidet. Die Frage, die sich nun stellt, lautet: Wird die Stromreduktion durch etwas anderes verursacht oder ist die Auflösung der Ratenkonstanten nicht ausreichend?

9.4 Fehlerursachen der Dwell-Time-Analyse

Die Dwell-Time-Analyse kann durch viele Einschränkungen beeinträchtigt werden (Blunck *et al.*, 1998). Ein wichtiger Punkt ist der Bedarf an einer Sprungerkennung, um die rauschfreie Zeitreihe rekonstruieren zu können. Hierin liegt die Ursache des Missed-Events-Problems (Roux und Sauv e, 1985; Yeo *et al.*, 1988; Draber und Schultze, 1994; Colquhoun *et al.*, 1996). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die wahren Ratenkonstanten des echten Kanals bei schnellen Übergängen noch viel schneller sind als die aus dem Dwell-Time-Fit berechneten. Aber auch die langsamen Ratenkonstanten werden durch Missed-Events verfälscht. Wenn schnelle Übergänge zwischen den langsamen Übergängen nicht erkannt werden, werden die langsamen Schaltvorgänge länger erfasst und führen zu starken Verfälschungen im niederfrequenten Bereich (Yeo *et al.*, 1988).

Es gibt zahlreiche Versuche, auf mathematischem Wege das Versagen der experimentellen Aufzeichnungen zu kompensieren. Hierbei gibt es retrospektive Korrekturen (Crouzy und Sigworth, 1990; Draber und Schultze, 1994), die die berechneten Zeitkonstanten nachträglich korrigieren, oder Ansätze, die eine Missed-Events-Korrektur durch eine sogenannte Survivorfunktion von vornherein einführen (Ball und Samson, 1989; Hawkes *et al.*, 1992; Colquhoun *et al.*, 1996). Die folgenden Untersuchungen zeigen, dass diese mathematisch aufwendigen Verfahren, die zudem für Mehrkanalaufzeichnungen zumindest bei der retrospektiven Korrektur noch nicht beherrscht werden, die Zeitauflösung nicht erhöhen können.

Da die schnellen Ratenkonstanten die Ursache für die Stromreduzierung beim AMFE sein können, wird untersucht, in wieweit die Auflösung dieser Übergänge mit Hilfe der Dwell-Time-Analyse überhaupt möglich ist. Dass die Auflösung tatsächlich nicht ausreichend für die schnellen Ratenkonstanten ist, wird durch folgende Simulationen gezeigt, die auf den gemittelten TI^+ -Daten in Tabelle 9.1 basieren. Um die Auswirkung von Missed-Events zu untersuchen, wurden Simulationen, wie sie in Abschnitt 4.6 beschrieben sind, für das 5-Zustandsmarkovmodell A-O-G-C-Z durchgeführt, um Zeitreihen mit verschiedenen Werten für die Ratenkonstanten der direkten Offen-Geschlossen-Übergänge (k_{GO} und k_{OG}) zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurden die Werte von k_{GO} und k_{OG} durch einen gemeinsamen Faktor (um die Steady-State-Besetzungswahrscheinlichkeiten beizubehalten) von 0.5-40 verändert. Die Zeitreihen, die

sich durch diese Simulationen ergeben, wurden mit derselben Dwell-Time-Analyse ausgewertet wie die gemessenen Zeitreihen. Die Ratenkonstanten, die sich aus dieser Analyse (k_{fit}) ergaben, wurden mit denen verglichen, die für die Simulationen (k_{sim}) verwendet wurden (Abb. 9.2).

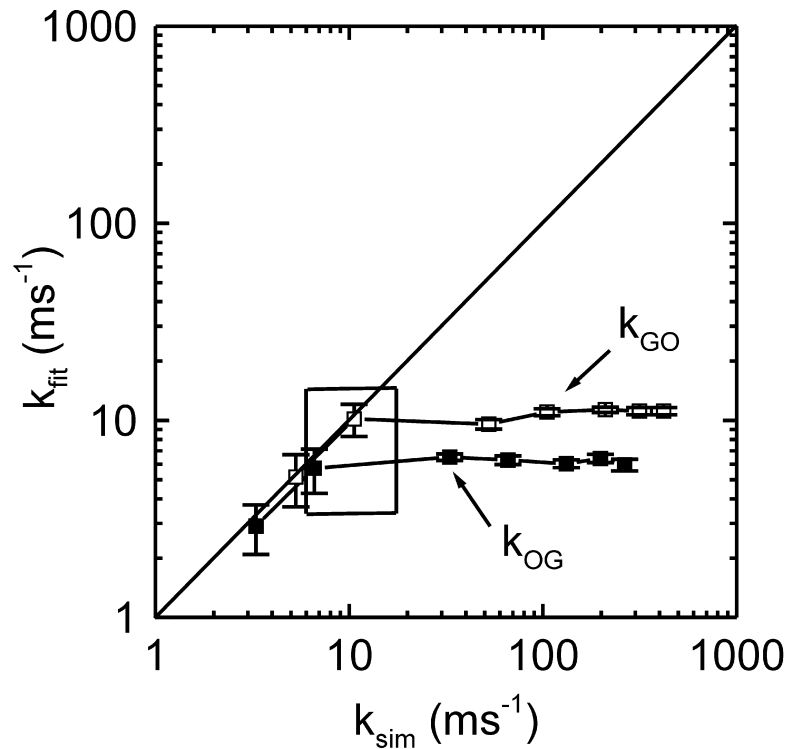


Abbildung 9.2: Überprüfung des zeitlichen Auflösungsvermögens der Dwell-Time-Analyse. Die Simulationen von Zeitreihen (20 s, $2 \cdot 10^6$ Datenpunkte) basieren auf den gemittelten Daten in Tabelle 9.1. Allerdings wurden k_{GO} und k_{OG} durch einen gemeinsamen Faktor von 0.5-40 verändert. k_{sim} auf der Abszisse stellt die Werte von k_{GO} und k_{OG} dar, die für die Simulation der Zeitreihen verwendet wurden. k_{fit} sind die Werte von k_{GO} und k_{OG} , die sich aus der Dwell-Time-Analyse (Gleichungen 4.8 bis 4.10) der simulierten Daten ergaben. Im Rechteck befinden sich die Werte, die aus den gemessenen Zeitreihen erhalten wurden.

Abb- 9.2 verdeutlicht die Probleme der Dwell-Time-Analyse. Für kleine Ratenkonstanten ergibt sich eine gute Koinkidenz mit der ($k_{\text{fit}} = k_{\text{sim}}$)-Linie. Korrekte Werte der Ratenkonstanten wurden bis zu solchen Werten detektiert, die sich aus den gemessenen Daten (Rechteck in Abb. 9.2) ergaben. Höhere simulierte Ratenkonstanten verursachten jedoch bei den berechneten keine weitere Zunahme. Das Verhältnis zwischen k_{GO} und k_{OG} (parallele, horizontale Linien in Abb. 9.2) bleibt konstant, da die Verhältnisse auf die Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände bezogen sind, die mit größerer Zuverlässigkeit bestimmt werden können als die Absolutwerte der Ratenkonstanten. Das Abflachen der Kurven in Abb. 9.2 beinhaltet eine zweite Aussage: Es ist nicht möglich,

eine rückwärtsgerichtete Missed-Events-Korrektur (Crouzy und Sigworth, 1990; Draber und Schultze, 1994) durchzuführen, da der Algorithmus der Korrektur für alle wahren Ratenkonstanten, die oberhalb der Auflösungsgrenze liegen, von identischen Werten aus starten würde. Dadurch ist es nicht möglich, bei schnellen Ratenkonstanten eine Aussage zu treffen, wo man sich auf der Abszisse befindet (Abb. 9.2). Die gefitteten Ratenkonstanten werden ab einer Größe von 10 ms^{-1} nicht mehr voneinander unterschieden. Es gibt also bei einer Rückrechnung kein Unterscheidungsmerkmal, das die wahre Lage der Ratenkonstanten feststellen könnte. Diese Größe ist von der Auflösung des Hinkley-Detektors abhängig (Abschnitt 4.3). Die Ursache dafür liegt an der Konstruktion von Sprungdetektoren. Damit dieser Sprungdetektor nicht auf jeden Zufallsimpuls aus dem Rauschen reagiert, muss das Signal durch ein Filter geglättet werden (Mittelung im Zeitbereich) (Abschnitt 4.3, Schultze und Draber, 1993). Durch die Mittelung im Zeitbereich können kurze Öffnungen oder Schließungen des Kanals übersehen werden. Damit ist die Frage nach dem Gating wieder offen.

9.5 Forderung nach besseren Verfahren

Die Dwell-Time-Analyse scheiterte auch bei alternativen Modellen. Daher werden weitere Berechnungen, die auf der Dwell-Time-Analyse basieren, nicht dargestellt. Die Ursache des Scheiterns der Dwell-Time-Analyse liegt, wie oben erwähnt, an der geringeren Auflösung des Sprungdetektors, da die verrauschte Zeitreihe in eine idealisierte Zeitreihe umgewandelt werden muss. Deshalb sollte ein Verfahren verwendet werden, in dem kein Sprungdetektor benötigt wird. Aus diesem Grund wird sich die weitere Analyse auf den leistungsfähigeren, wie aus dem nächsten Kapitel hervorgehen wird, direkten Fit der Zeitreihen konzentrieren.

10 Berechnung der Ratenkonstanten durch einen direkten Fit der gemessenen Zeitreihen: Gating am Rande der zeitlichen Auflösung

Die zweite und, wie sich herausstellen wird, effektivere Methode, mit der es möglich ist, die noch unbeantwortete Fragestellung - Gating- oder Permeationsmodell – (Abschnitt 8.5) beim AMFE zu untersuchen, ist der direkte Fit der Zeitreihen.

10.1 Analyse der Messdaten

Die hier angewendeten Analysen wurden an den identischen Zeitreihen, die in Kapitel 8 verwendet wurden, durchgeführt. Die aufgezeichneten Zeitreihen wurden mit dem in Abschnitt 4.5 beschriebenen direkten Fit der Zeitreihen untersucht.

10.2 Überwindung der Grenzen des Dwell-Time-Fits

Eine Näherung, die weniger anfällig auf das Missed-Events-Problem (Draber und Schultze, 1994) reagiert, ist der direkte Fit der Zeitreihen (direkter HMM-Zeitreihenfit, HMM = Hidden Markov Model, Fredkin und Rice 1992; Albertsen 1994; Albertsen und Hansen 1994; Klein *et al.*, 1997; Sundermann und Zagotta, 1999a, b; Zheng *et al.*, 2001), wie er in den Gleichungen 4.11 bis 4.15 (Abschnitt 4.5) beschrieben ist. Allerdings nimmt der direkte Fit einer Messung von 20 Sekunden ($2 \cdot 10^6$ Datenpunkte) auf einem 500 MHz-Pentium II für eine einzige Zeitreihe mit einem O-O-C-C-C-Modell und zwei Kanälen bis zu zwei Tage in Anspruch. Diese lange Rechenzeit reduziert die Anzahl der geeigneten Messungen auf die vier, die im folgenden näher untersucht werden. Qin *et al.* (1996) schlugen einen Algorithmus vor, der sehr viel schneller zum Ziel kommt als das Verfahren von Albertsen und Hansen (1994). Dieser Algorithmus kann jedoch nur für rauschfreie Zeitreihen angewandt werden. Damit muss wieder ein Sprungzeitendetektor

eingesetzt werden, und alle diesbezüglichen Vorteile des direkten HMM-Zeitreihenfits gehen verloren, auch wenn die Autoren eine Missed-Events-Korrektur angeben.

10.3 Untersuchung unterschiedlicher 5-Zustandsmodelle

In einem ersten Ansatz wurden verschiedene 5-Zustandsmodelle verwendet. Tabelle 10.1 zeigt die Ergebnisse, die sich mit Hilfe der Analyse des direkten HMM-Fits einer 2-Kanal-Messung in reiner K^+ - und in Mischlösung ($K^+ + Tl^+$) bei +80 mV ergaben. Die vier linearen Modelle und das eine verzweigte Modell führten zu ungefähr gleichen Likelihoods (Gleichung 4.15). Obwohl der Unterschied zwischen den Likelihoods der verschiedenen Modelle geringfügig größer war als die Schwankungen, die sich beim wiederholten Fit eines Modells ergaben, wird angenommen, dass es nicht möglich ist, eines dieser Modelle auszuschließen, besonders, da die Ordnung der Modelle, die durch ihre Likelihoods gegeben ist, unterschiedlich für die K^+ -Daten und die Daten der Mischlösung ausfällt. Eine strenge Überprüfung der möglichen kinetischen Gleichwertigkeit würde die Berechnung von vielen Messungen erfordern. Es waren jedoch schon mit den Berechnungen, deren Ergebnisse in Tabelle 10.1 dargestellt sind, zwei PCs einen Monat lang ausgelastet.

Interessanter ist das Verhältnis i_{fit}/i_{sim} . Es beträgt ca. 1% ohne Tl^+ und nimmt nach Zugabe von Tl^+ bei den meisten Modellen um ca. 25% ab. Dies liegt in der Größenordnung der beobachteten Stromreduktion durch den AMFE. Tatsächlich ist für die Untersuchungen hier nicht wichtig, welches das richtige Modell ist, da alle Modelle dieselbe Tl^+ -induzierte Abnahme des Einzelkanalstroms ergaben. Die Ausnahme bildete das O-C-C-C-O-Modell, bei dem die Reduktion geringer, aber dennoch signifikant ausfiel.

Da es nicht möglich ist, das richtige Modell herauszufinden, wird für die Analyse der anderen Daten nur eines dieser Modelle verwendet, das A-O-G-C-Z-Modell. Es weist eine nicht signifikant höhere Likelihood für Tl^+ - und K^+ -Daten auf und war bei der Dwell-Time-Analyse auch am besten fitbar.

5-Zustandsmodell	$-\log(L)$	$i_{\text{fit}} / i_{\text{sim}}$
Bad: 250 mM KNO ₃ + 5 mM Ca(NO ₃) ₂		
$ \begin{array}{cccc} 4800 & 32500 & 10200 & 260 \\ A \rightleftharpoons O & \rightleftharpoons G & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons Z \\ 29900 & 47100 & 5200 & 20 \end{array} $	7641300 ± 10	0.99 ± 0.01
$ \begin{array}{cccc} 7000 & 120500 & 36500 & 50 \\ G \rightleftharpoons A & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons O & \rightleftharpoons Z \\ 87200 & 28300 & 2900 & 10 \end{array} $	7641616 ± 14	0.97 ± 0.00
$ \begin{array}{cccc} 46500 & 8400 & 900 & 2900 \\ G \rightleftharpoons A & \rightleftharpoons O & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons Z \\ 12000 & 2800 & 3700 & 15 \end{array} $	7642302 ± 663	0.98 ± 0.01
O		
$ \begin{array}{ccc} & 750 \updownarrow 760 & \\ 4400 & 11600 & 190 \\ A \rightleftharpoons G & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons Z \\ 48500 & 3900 & 10 \end{array} $	7643552 ± 6	0.98 ± 0.01
$ \begin{array}{cccc} 100000 & 15400 & 30 & 13800 \\ A \rightleftharpoons G & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons Z & \rightleftharpoons O \\ 1200 & 750 & 700 & 2600 \end{array} $	7645980 ± 612	0.99 ± 0.00
Bad: 230 mM K(NO ₃) + 20 mM TINO ₃ + 5 mM Ca(NO ₃) ₂		
$ \begin{array}{cccc} 600 & 75000 & 600 & 200 \\ A \rightleftharpoons O & \rightleftharpoons G & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons Z \\ 100 & 112000 & 400 & 20 \end{array} $	7473386 ± 80	0.76 ± 0.02
$ \begin{array}{cccc} 67300 & 9700 & 1300 & 240 \\ G \rightleftharpoons A & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons O & \rightleftharpoons Z \\ 103000 & 122000 & 1000 & 20 \end{array} $	7475053 ± 259	0.76 ± 0.02
$ \begin{array}{cccc} 100000 & 800 & 3150 & 230 \\ G \rightleftharpoons A & \rightleftharpoons O & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons Z \\ 76300 & 4500 & 850 & 15 \end{array} $	7474252 ± 80	0.79 ± 0.02
O		
$ \begin{array}{ccc} & 2200 \updownarrow 270 & \\ 89600 & 710 & 280 \\ A \rightleftharpoons G & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons Z \\ 63800 & 950 & 20 \end{array} $	7473631 ± 40	0.77 ± 0.04
$ \begin{array}{cccc} 100600 & 240 & 2000 & 240 \\ A \rightleftharpoons G & \rightleftharpoons C & \rightleftharpoons Z & \rightleftharpoons O \\ 37900 & 20 & 22300 & 250 \end{array} $	7477061 ± 45	0.90 ± 0.02

Tabelle 10.1: Überprüfung der verschiedenen 5-Zustandsmodelle. Die Zeitreihen, die bei +80 mV mit und ohne Tl⁺ gemessen wurden, wurden mit den dargestellten Modellen unter Verwendung der Gleichungen 4.11 bis 4.15 gefittet. Die Lösung in der Pipette betrug immer 250 mM KNO₃ + 5 mM Ca(NO₃)₂, die Zusammensetzung der Badlösung ist in den jeweiligen Überschriften angegeben. Die Abweichungen ergaben sich dadurch, dass für die Fits verschiedene Startwerte verwendet wurden (3-4 Fits pro Modell).

10.4 Markov-Prozess und dessen Gatingverhalten in reiner K^+ -Lösung und in Mischlösung

Abb. 10.1 zeigt die Ratenkonstanten, die sich bei Membranspannungen von +100, +80, -80 und -100 mV in 250 mM K^+ und in 20 mM Tl^+ + 230 mM K^+ ergaben. Die wichtigste Aussage besteht darin, dass die Wahrscheinlichkeit, sich im langlebigen Offen-Zustand A zu befinden, bei allen Messungen in Anwesenheit von Tl^+ abnimmt. Die Wahrscheinlichkeit, sich im kurzlebigen Offenzustand (O) oder im kurzlebigen Geschlossen-Zustand (G) zu befinden, nimmt zu. Das ist weniger offensichtlich bei -80 mV, da es sich um einen sehr aktiven Kanal handelte. Dennoch ergaben auch Simulationen mit Ratenkonstanten dieses aktiven Kanals in Anwesenheit von Tl^+ eine Abnahme des scheinbaren Einzelkanalstroms (Tabelle 10.2). Die Betrachtung der Ratenkonstanten in Abb. 10.1 deutet an, dass der AMFE durch eine starke Abnahme des Verhältnisses k_{OA}/k_{OG} verursacht wird, das den Kanal dazu veranlasst, häufiger in den Zustand G zu springen. Die Erfahrung hat gezeigt, dass im Fitalgorithmus die Abschätzung der Verhältnisse der Ratenkonstanten zuverlässiger ist als die Abschätzung der Absolutwerte derselben, da sich die Verhältnisse auf die Besetzungswahrscheinlichkeit beziehen (im Falle von A: 2-3% in Anwesenheit von Tl^+ verglichen mit ca. 20% ohne Tl^+ , Abb. 10.1). Besetzungswahrscheinlichkeiten werden normalerweise ziemlich genau durch die Fits wiedergegeben (Blunck *et al.*, 1998). Die Messungen bei positiven Spannungen zeigen eine Zunahme der Ratenkonstanten des O-G-Übergangs in Anwesenheit von Tl^+ . Dies ist bei negativen Spannungen weniger offensichtlich. Daher scheinen die niedrigere Besetzungswahrscheinlichkeit von A und die höheren Besetzungswahrscheinlichkeiten von O und G der Hauptgrund des schnellen Flickerns in Anwesenheit von Tl^+ zu sein. Dieses Charakteristikum konnte nicht mit Hilfe der Dwell-Time-Fits aufgezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass folgendes Prinzip zugrunde liegt: Wenn sich der Kanal im Zustand O (offen) befindet, hat er für den nächsten Übergang zwei Möglichkeiten: A (offen) oder G (geschlossen). Bei einer größeren Wahrscheinlichkeit des Übergangs in den Zustand A im Verhältnis zum Übergang in den G-Zustand (wie bei reiner K^+ -Lösung) bleibt der Kanal länger im offenen Zustand. Damit wird der volle Wert des Einzelkanalstroms erreicht. Wenn sich aber die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in den G-Zustand erhöht (wie bei einer gemischten K^+ -und Tl^+ -Lösung), wird der offene Kanal bei einer höheren Ratenkonstanten k_{GO} schwieriger erlangt. Wenn sich der Kanal nun im G-Zustand aufhält, kann er in den C- oder wieder zurück in den O-Zustand übergehen. Bei einer größeren Wahrscheinlichkeit des Übergangs in den O-Zustand und einer schnellen Ratenkonstanten k_{GO} entsteht das Flickern (Abb. 8.4B), das für die Stromreduktion in der gemischten Lösung verantwortlich ist. Die entscheidende Größe für die Stromreduktion ist das Verhältnis k_{OA} zu k_{OG} . Je kleiner dieses Verhältnis

ist, desto größer ist die Stromreduktion. Bei einem Übergang des Kanals vom G- in den C- oder dann sogar in den Z-Zustand bleibt der Kanal für eine längere Zeit geschlossen. Für beide Lösungen hat der Zustand Z eine hohe Besetzungswahrscheinlichkeit.

+100 mV	K ⁺	-100 mV
18 15 3 7 57		18 2 1 2 77
5700 14800 9900 170		2500 37900 11400 960
$A \rightleftharpoons O \rightleftharpoons G \rightleftharpoons C \rightleftharpoons Z$		$A \rightleftharpoons O \rightleftharpoons G \rightleftharpoons C \rightleftharpoons Z$
6800 69900 4500 20		34500 40200 8900 20
+80 mV	K ⁺	-80 mV
23 4 3 5 65		11 1 1 1 86
4800 32500 10200 260		2400 67700 2800 650
$A \rightleftharpoons O \rightleftharpoons G \rightleftharpoons C \rightleftharpoons Z$		$A \rightleftharpoons O \rightleftharpoons G \rightleftharpoons C \rightleftharpoons Z$
29900 47100 5200 20		60500 33500 1900 10
+100 mV	K ⁺ + Tl ⁺	-100 mV
2 8 6 4 80		3 4 8 14 71
1600 68000 900 400		2600 56700 7000 300
$A \rightleftharpoons O \rightleftharpoons G \rightleftharpoons C \rightleftharpoons Z$		$A \rightleftharpoons O \rightleftharpoons G \rightleftharpoons C \rightleftharpoons Z$
400 87000 1400 20		1400 28700 4200 60
+80 mV	K ⁺ + Tl ⁺	-80 mV
1 8 5 8 78		9 22 16 14 39
600 75000 600 200		1400 46700 3400 340
$A \rightleftharpoons O \rightleftharpoons G \rightleftharpoons C \rightleftharpoons Z$		$A \rightleftharpoons O \rightleftharpoons G \rightleftharpoons C \rightleftharpoons Z$
100 112000 400 20		600 63200 3800 160

Abbildung 10.1: Modelle und Einzel-Kanal-Ratenkonstanten (s^{-1}), die sich aus dem direkten Fit von Zeitreihen (20 s, $2 \cdot 10^6$ Datenpunkte) bei +100 und +80 mV (linke Spalte) und bei -100 und -80 mV (rechte Spalte) in 250 mM KNO₃ und in 20 mM TlNO₃ + 230 mM KNO₃ (+ 5 mM Ca(NO₃)₂ in allen Fällen) ergaben. Die Zahlen über den Zuständen geben die Besetzungswahrscheinlichkeit in Prozent der gesamten Zeit des 20 s-Intervalls an.

Die Verweildauern, die sich aus den Daten in Abb. 10.1 ergeben, können aus den k_{ij} mit Hilfe der Gleichungen 4.9 und 4.10 für einen Kanal berechnet werden. Sie sind in Tabelle 10.2 abgebildet. Das Hauptmerkmal, das bei allen Messungen auffällt, besteht darin, dass sich der Wert der schnellen Zeitkonstanten nicht signifikant ändert. Stattdessen tritt eine ca. 10-fache Zunahme der Amplitudenfaktoren sowohl der schnellen Komponente d_O des offenen Dwell-Time-Histogramms als auch von d_G des geschlossenen Dwell-Time-Histogramms auf. Das bedeutet, dass das zunehmende Auftreten von

Ereignissen mit kurzen Zeitkonstanten die Ursache für das schnelle Flickern ist, das zur Reduktion des scheinbaren Einzelkanalstroms in Anwesenheit von TI^+ führt.

	K^+ +80 mV		K^+ +100 mV		K^+ + TI^+ +80 mV		K^+ + TI^+ +100 mV	
	d	$\tau / \mu\text{s}$	d	$\tau / \mu\text{s}$	d	$\tau / \mu\text{s}$	D	$\tau / \mu\text{s}$
A	275	800	690	560	1.4	3450	17	1170
O	5980	30	5810	84	88100	30	88500	30
G	10280	35	30680	25	149360	20	116270	20
C	145	550	240	490	3.5	3145	20	1060
Z	0.05	104030	0.04	104330	0.04	133940	0.04	118200
$i_{\text{fit}} / i_{\text{sim}}$	0.99		0.99		0.76		0.75	
	K^+ -80 mV		K^+ -100 mV		K^+ + TI^+ -80 mV		K^+ + TI^+ -100 mV	
	d	$\tau / \mu\text{s}$	d	$\tau / \mu\text{s}$	d	$\tau / \mu\text{s}$	d	$\tau / \mu\text{s}$
A	40	1530	65	1550	10	1450	33	790
O	3390	15	3180	25	25700	40	27600	35
G	2020	55	3800	35	34730	30	13700	55
C	10	835	205	265	115	500	390	560
Z	0.01	274500	0.05	113900	0.85	13730	0.45	36350
$i_{\text{fit}} / i_{\text{sim}}$	0.99		0.98		0.86		0.87	

Tabelle 10.2: Zeitkonstanten τ (die inversen Eigenwerte λ) und die Amplitudenfaktoren d (Gleichung 4.10), die für die Einzelkanal-Messungen aus den Daten in Abb. 10.1 unter Verwendung der Gleichungen 4.8 bis 4.10 berechnet wurden. Die jeweils letzte Zeile zeigt die Reduktion des Einzelkanalstroms $i_{\text{fit}}/i_{\text{sim}}$ in einer Zeitreihe, die mit den gemittelten Werten der Ratenkonstanten und einem Einzelkanalstrom i_{sim} simuliert wurden.

10.5 Überprüfung der Zuverlässigkeit des Direkten-Zeitreihen-Fits und dessen Überlegenheit gegenüber der Dwell-Time-Analyse

Die Frage die sich nun stellt, lautet: Wie genau wurden die Ratenkonstanten mit Hilfe des Direkten-Zeitreihen-Fits gefittet? Aus diesem Grund wurde wiederum die Zuverlässigkeit der Berechnungen durch Simulationen überprüft, wie es bereits in Abb. 9.2 durchgeführt wurde. Es wurden wieder Zeitreihen mit dem 5-Zustandsmarkovmodell A-O-G-C-Z simuliert (Abschnitt 4.6), und die Ratenkonstanten k_{GO} und k_{OG} durch einen gemeinsamen Faktor von 0.5-40 verändert (Abschnitt 9.4). Die simulierten Zeitreihen wurden mit dem Direkten-Zeitreihen-Fit ausgewertet. Die Ratenkonstanten der Hin-

und Rückreaktion von O und G, die sich aus dieser Analyse (k_{fit}) ergaben, wurden mit denen verglichen, die für die Simulationen (k_{sim}) verwendet wurden (Abb. 10.2).

Abb. 10.2 zeigt, dass das zeitliche Auflösungsvermögen sehr viel weiter reicht als bei der Dwell-Time-Analyse (Abb. 9.2). Es zeigt, dass eine Erhöhung der Ratenkonstanten, die in den Simulationen verwendet werden, auch in schnelleren Ratenkonstanten, die sich durch die Fits ergeben, resultiert. Bis zu 50 ms^{-1} liegen die gefitteten Ratenkonstanten fast auf der Diagonalen, die den wahren Werten entspricht. Es tritt ab einer Ratenkonstanten von 50 ms^{-1} jedoch eine Verkleinerung der Ratenkonstanten auf: Die gefitteten Ratenkonstanten sind ein bisschen langsamer als die wahren (unterhalb der $k_{\text{fit}} = k_{\text{sim}}$ -Linie). Das Anwachsen der Kurve in Abb. 10.2 steht im Widerspruch zum Dwell-Time-Fit (Abb. 9.2). Das wichtigste Ergebnis besteht darin, dass sich die Daten im Rechteck immer noch auf dem ansteigenden Ast befinden, d.h. schnellere wahre Ratenkonstanten führen zu schnelleren berechneten Ratenkonstanten. Dies eröffnet die Möglichkeit, mit Hilfe von Simulationen die wahren Ratenkonstanten zu finden. Das bedeutet, dass diejenigen Ratenkonstanten wahr sind, die folgende Bedingung erfüllen. Sie werden in das Simulationsprogramm eingesetzt. Die daraus resultierende Zeitreihe wird genauso wie reale Daten gefittet. Dies ergibt neue (meistens kleinere) Ratenkonstanten. Wenn diese neuen Ratenkonstanten identisch mit den aus den realen Daten gewonnenen sind, dann waren die zur Simulation verwendeten die wahren Ratenkonstanten. Diese Ergebnisse wurden durch die Arbeit von Harlfinger (2000) bestätigt, der ein einfaches C-O-Markov-Modell bei unterschiedlichen Ratenkonstanten und Signal/Rauschverhältnissen mit Hilfe des Direkten-Zeitreeihen-Fits untersuchte.

Dass der direkte HMM-Fit über die durch den Filter gesetzte Grenze hinausblicken kann, liegt daran, dass der Prädiktionsalgorithmus vorhersagt, in welchem Zustand der Kanal nach der Zeit Δt sein wird. Diese Vorhersage bezieht sich nur auf den Kanal und ist unabhängig vom Versuchsaufbau. Sie ist also stets richtig. Der Filter kommt dann zum Tragen, wenn diese Vorhersage mit dem gemessenen Strom verglichen wird. Dazu muss das gesamte Amplitudenhistogramm in Einzelhistogramme pro Niveau aufgespalten werden. Hier spielt der Filter wieder eine Rolle. Schnelles Schalten kann zu Fehlern führen, wenn das Amplitudenhistogramm nicht mehr durch Summen von Gaußhügeln beschreibbar ist, sondern Beta-Verteilungen (Rießner, 1998; Harlfinger, 2000) notwendig werden. Die Fehler führen zu einer Verkleinerung der gefitteten Ratenkonstanten im Vergleich zu den „wahren“ Ratenkonstanten. Bei den *Chara*-Daten ergab das schnelle Schalten jedoch nur eine Verbreiterung der Gaußhügel in Gegenwart von TI^+ . So etwas wird allerdings vom verwendeten Amplitudenhistogramm-Aufspaltungsprogramm korrekt behandelt. Damit ist die Auswertung auch für Schaltfrequenzen des Kanals oberhalb der Filterfrequenz mathematisch korrekt.

Diese Analysen zeigen, dass die schnellen Ratenkonstanten durch Auswertung des Direkten-Zeitreeihen-Fits (Albertsen und Hansen, 1994) eine deutlich bessere Auflösung

ergeben als bei der Dwell-Time-Analyse. Der Vorteil beim Direkten-Zeitreehen-Fit ist die Vermeidung eines Sprungdetektors (Hinkleydetektor). Dies ist für die bessere Auflösung verantwortlich. Die Dwell-Time-Histogramme, die mit dem Target-Fit (Colquhoun *et al.*, 1996; Kijima und Kijima 1987a,b; Blunck *et al.*, 1998) ausgewertet wurden, sind nur für langsame Ratenkonstanten geeignet, da die Auswertung mit deutlich weniger Zeitaufwand verbunden ist. Daher werden alle weiteren Analyseverfahren ausschließlich mit dem Direkten-Zeitreehen-Fit durchgeführt.

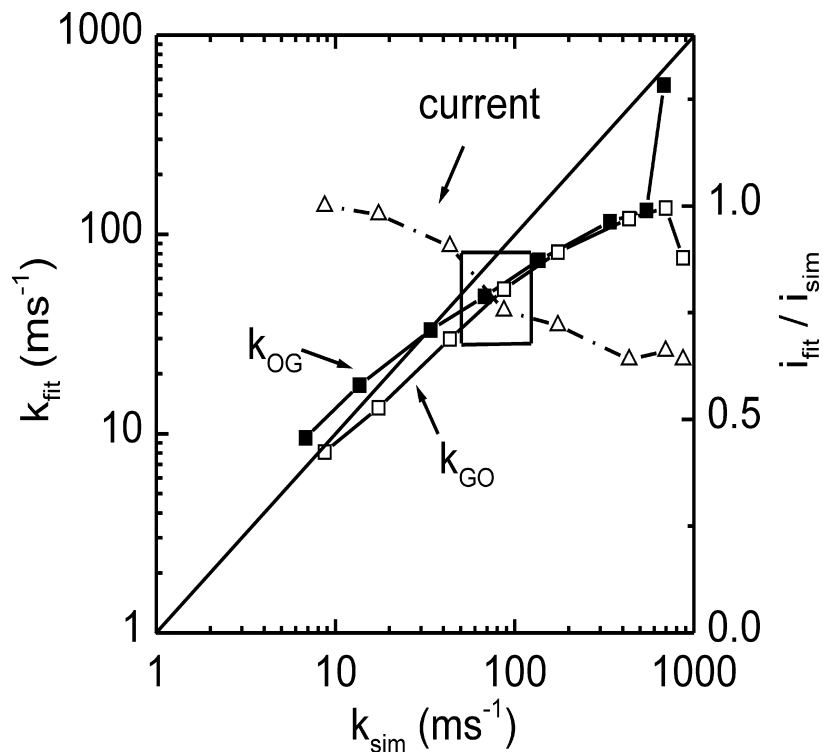


Abbildung 10.2: Überprüfung des direkten Fits der Zeitreihen durch simulierte Zeitreihen (k_{fit}). Die Ratenkonstanten für die Hin- und Rückreaktion des Offen- zum Geschlossenzustands (O-G), die aus den gemessenen Zeitreihen (20 s, $2 \cdot 10^6$ Datenpunkte, +100 mV, 20 mM TI^+ + 230 mM K^+) berechnet wurden, sind durch das Rechteck gekennzeichnet. Für die anderen Datenpunkte wurden k_{GO} und k_{OG} durch einen gemeinsamen Faktor von 0.1 bis 10 (k_{sim}) verändert, während die anderen Ratenkonstanten diejenigen der gemessenen Daten sind. Die Kurve, die mit „Strom“ bezeichnet ist, stellt den scheinbaren Einzelkanalstrom $i_{\text{fit}}/i_{\text{sim}}$ dar, der durch die simulierte Zeitreihe (20 s, $2 \cdot 10^6$ Datenpunkte) bestimmt wurde.

Im Hinblick auf den AMFE ist die wichtigste Kurve in Abb. 10.2 diejenige, die mit "Strom" bezeichnet ist. Sie zeigt den scheinbaren Einzelkanalstrom, der sich aus der Berechnung der simulierten Zeitreihe ergibt. Die Reduktion von ca. 25%, die sich aus der simulierten Zeitreihe ergibt, passt zur beobachteten Reduktion durch den AMFE in

den Abb. 8.1, 8.2 und 11.9. Die Abnahme des Stroms, die sich bei solchen Simulationen ergab, ist für alle Messungen in Tabelle 10.2 dargestellt. Im Falle der K^+ -Daten betrug die Reduktion des Stroms ca. 1%. Dies deutet an, dass die Abnahme durch schnelles Schalten charakteristisch für die AMFE-Daten ist. In Anwesenheit von Tl^+ ergaben sich Werte von 13-25%, die mit den Werten in den Abb. 10.1 und 10.2 korrespondieren. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nicht aufgelöstes schnelles Schalten wahrscheinlich der Grund für die Abnahme des scheinbaren Einzelkanalstroms beim Tl^+/K^+ -AMFE in *Chara* ist.

10.6 Neuere Arbeiten im Widerspruch zu Permeationsmodellen

Die neuesten Untersuchungen von Bernèche und Roux (2001) zeigen, dass eine Grundannahme des Hille-Schwarz-Modells (Abschnitt 7.1 und 8.4), die Energiebarrieren, für das Entstehen des AMFE in Frage gestellt werden muss. Es wurden durch Molecular-Dynamics-Simulationen anhand der Grundlage der Röntgen-Struktur-Analyse des KcsA K^+ -Kanals (Doyle *et al.*, 1998; Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001) die Bindungsenergien der K^+ -Ionen in der Pore bestimmt. In diesem Modell werden drei K^+ -Ionen betrachtet, von denen sich zwei in der Pore befinden und eines im Hohlraum. Um das Problem der Darstellung der Abhängigkeit von drei Koordinaten zu lösen, werden in den Abbildungen eine echte Koordinate und eine Schwerpunktskoordinate verwendet. Die Schwerpunktskoordinate befindet sich zwischen den beiden K^+ -Ionen in der Pore (Z_{12} links in Abb. 10.3), da zwischen den beiden K^+ -Ionen in der Pore ein fester Abstand besteht. Links in Abb. 10.3 ist die zweite Koordinate die Lage des Hohlraum-Ions. Rechts in Abb. 10.3 hat das Hohlraum-Ion die Pore betreten, und das äußere Ion verlässt die Pore. Deshalb wird eine neue Schwerpunktskoordinate Z_{23} gewählt. Die Bindungsenergie wird als Farbe über diesen beiden Koordinaten aufgetragen, wobei eine Farbstufe 1 kcal mol^{-1} entspricht. Wenn der Verlauf des Weges von Zustand (a) in Zustand (e) oder (f) betrachtet wird, wird deutlich, dass sich die Bindungsenergie nur unwesentlich ändert. Das bedeutet, dass Energiebarrieren, wie im Hille-Schwarz-Modell gefordert, beim Durchtritt eines K^+ -Ions durch die Pore nicht auftauchen. Damit widerlegt dieses Ergebnis die erste Grundannahme des Hille-Schwarz-Modells.

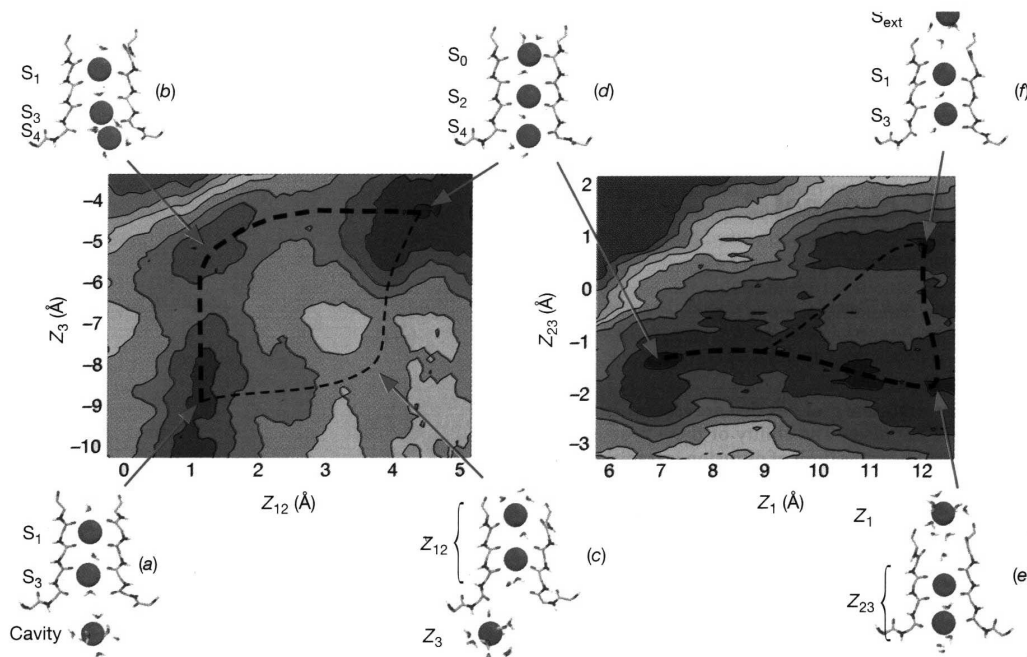


Abbildung 10.3: Darstellung der freien Energien der leitenden Ionen berechnet mit Hilfe von Molecular-Dynamics-Simulationen. Jede Farbstufe entspricht einem Energieunterschied von 1 kcal mol^{-1} . Die Position der Ionen Z_1 , Z_2 und Z_3 (die Nummern beginnen beim äußersten Ion) ist relativ zum Zentrum des KcsA-Selektivitätsfilters. Z_{ij} ist die Schwerpunktskoordinate der Ionen i und j . Der Energieweg (dargestellt als die dickere der beiden gepunkteten Linien) folgt der Konfiguration a-b-d-f. Dieser Weg ist ein spontaner Übergang, der durch eine Molecular-Dynamics-Simulation beobachtet wurde. Ein zweiter Weg (dargestellt durch die dünnere Linie), der der Konfiguration a-c-d-f folgt, ist ebenfalls möglich (Bernèche und Roux, 2001).

Die Untersuchungen von Morais-Cabral *et al.* (2001) und Zhou *et al.* (2001) durch kristallografische Röntgen-Struktur-Analyse des KcsA K^+ -Kanals widerlegen auch die zweite Annahme des Hille-Schwarz-Modells: die gegenseitige Abstoßung der Ionen. Die dort erreichte hohe Auflösung, bei Zhou *et al.* (2001) 2 \AA , durch Kristallisation der KcsA Kanäle zusammen mit Fab aus dem Immunoglobulin (Nelson und Cox, 2001) zur Erzeugung sehr gut geordneter Kristalle, führte zur Bestimmung der Ionenverteilung innerhalb des Selektivitätsfilters des Kanals. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass die beiden K^+ -Ionen im Selektivitätsfilter voneinander durch ein Wassermolekül getrennt werden. Der Transport der Ionen beruht auf dem Durchlaufen zweier verschiedener Konfigurationen: K^+ -Wasser- K^+ -Wasser (1,3 Konfiguration) und Wasser- K^+ -Wasser- K^+ (2,4 Konfiguration), bis ein drittes Ion eintritt, und das Ion an der Gegenseite der Reihe ersetzt (Abb. 10.4A). Das K^+ -Ion steht innerhalb des Selektivitätsfilters entweder in Wechselwirkung mit acht Sauerstoffen aus der Carbonylgruppe (Koordinationszahl 8, Abb. 10.4B rechts, Konfiguration 1,3 und 2,4) oder mit je vier

Sauerstoffen aus der Carbonylgruppe und zwei Wassermolekülen entlang der Reihe (Koordinationszahl 6, Abb. 10.4B links, die Zustände zwischen den Konfigurationen 1,3 und 2,4 (Abb. 10.4A)). Der Energieunterschied zwischen den 1,3 und 2,4 Konfigurationen ist fast Null. Dies führt zu einer maximalen Leitfähigkeit, in der der Durchtritt eines K^+ -Ions nur 10 ns dauert. Das bedeutet aber auch, dass eine direkte Ion-Ion-Wechselwirkung zwischen den K^+ -Ionen nicht möglich ist, da bei beiden Konfigurationen ein Wassermolekül zwischen den Ionen vorhanden ist.

Auch diese Ergebnisse zeigen, dass für den K^+ -Kanal die Voraussetzungen des Hille-Schwarz-Modells nicht erfüllt werden können, da weder eine direkte Wechselwirkung zwischen den K^+ -Ionen noch ein Energieunterschied zwischen den Konfigurationen vorhanden ist.

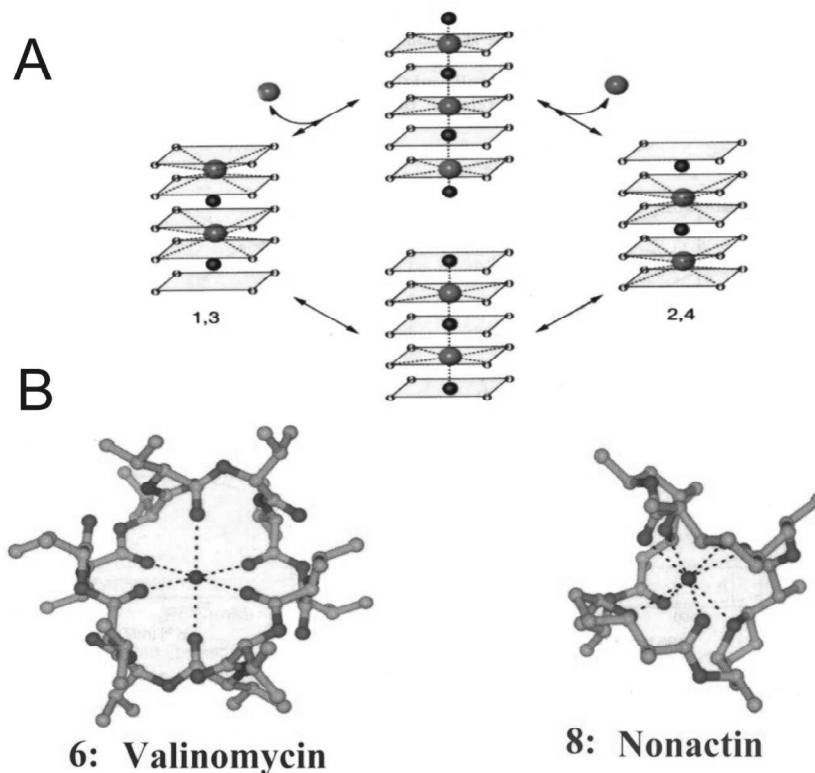


Abbildung 10.4: Der biologisch wichtige Durchlaufzyklus für K^+ -Ionen durch den Selektivitätsfilter eines KcsA Kanals. (A) Der Selektivitätsfilter wird in fünf Reihen von vier auf gleicher Ebene gesetzten Sauerstoffatomen (weiß) mit K^+ -Ionen (grün) und Wassermolekülen (rot) dargestellt. Die K^+ -Ionen wechselwirken mit acht Sauerstoffatomen der Carbonylgruppe bei der 1,3 und 2,4 Konfiguration. Durch die Bewegung entlang des Selektivitätsfilters werden die K^+ -Ionen von sechs Sauerstoffatomen eingeschlossen, von denen zwei von den dazwischen gekommenen Wassermolekülen sind. (B) Die Atomstruktur der K^+ -Selektivität der Antibiotiken Nonactin (rechts) und Valinomycin (links) zeigen die Wechselwirkung von je acht oder sechs Sauerstoffatomen (Morais-Cabral *et al.*, 2001).

Obige Ergebnisse bestätigen die Resultate der Untersuchungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Sie zeigen, dass der AMFE nicht mit einem Permeationsmodell wie Hille-Schwarz (1978; Abschnitt 7.1) oder Wu (1991, 1992; Abschnitt 7.3), die eine Energiebarriere und Ion-Ion-Wechselwirkung fordern, erklärt werden kann. So können nur Gatingeffekte die Ursache für die Entstehung des anomalen Molfraktionseffekts sein. Das schnelle Schalten, das in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, ist ein Gatingeffekt. Diese Ergebnisse stimmen auch mit Draber und Hansen (1994) beim Cs^+ -Effekt gut überein. Die Vermutung des schnellen Schaltens beim AMFE, die sich aus zehn Jahre dauernden Untersuchungen ergab, bestätigt sich durch diese Resultate. Welches Gatingmodell nun den AMFE verursacht, wird im nächsten Kapitel untersucht.

11 Gating-Modelle für den anomalen Molfraktionseffekt des Einzelkanalstroms in *Chara*

Bis jetzt wurde die zeitliche Auflösung von 2-Kanal-Aufnahmen in *Chara* soweit verbessert, dass schnelles Schalten in den zugänglichen Bereich des direkten Fits einer Zeitreihe mit einem Hidden-Markov-Modell (Albertsen und Hansen, 1994) kam. Es ergab sich, dass die Reduktion des Einzelkanalstroms in einer K^+/Tl^+ -Lösung aus der Mittelung über einen Burst des schnellen Schaltens resultiert (Tabelle 10.2 und Abb. 11.9). Dies zeigte, dass der AMFE in *Chara* ein Gating-Effekt ist. Es wurde jedoch kein mechanistisches Modell vorgeschlagen, das erklären konnte, wie eine Ionen-Mischung das Gating derartig beeinflussen kann, dass der scheinbare Einzelkanalstrom vermindert wird.

11.1 Liganden-Modell und „Foot-in-the-Door“-Modell

Ein Vorschlag für ein solches Modell ergibt sich aus etlichen Hinweisen darauf, dass der Radius des Selektivitätsfilters variabel sein könnte und durch Liganden-Bindung oder permeierende Ionen beeinflusst werden könnte. Perozo *et al.* (1999) fanden mit Hilfe von Elektron-Paramagnetik-Resonanz Untersuchungen Änderungen im Durchmesser der äußeren Pore im KcsA Kanal und brachten pH-abhängiges Gating in Zusammenhang mit der Bewegung der vier Untereinheiten.

Änderungen in der Selektivität wurden von Schneggenburger und Ascher (1997) auch mit Subleveln assoziiert. Ogielska und Aldrich (1999) berichteten, dass der *Shaker* K^+ -Kanal, der durch Na^+ -Ionen geblockt war, in reiner Na^+ -Lösung wieder leitfähig wurde (Abschnitt 12.5). Auf der Basis des Modells von Doyle *et al.* (1998) schlugen Ogielska und Aldrich (1999) vor, dass eine Manschette (cuff) von Aminosäuren die Pore offen hält. Während der C-Typ-Inaktivierung relaxiert dieser „Cuff“ und wird für die K^+ -Ionen zu eng. Nun passen allerdings Na^+ -Ionen wegen des kleineren Ionenradius der Pore. Ein Bruch der Wasserstoffbrückenbindung zwischen E418 und V451 und V452

im *Shaker*-Kanal führt zu einer Veränderung des Selektivitätsfilterdurchmessers (Larsson und Elinder, 2000; Loots und Isacoff, 2000; Abschnitt 12.5).

Ein anderer Aspekt, der im Modell betrachtet wird, ist die Bindung an die vier Untereinheiten des Kanals. Der Zusammenhang zwischen Leitfähigkeit und Anzahl der gebundenen Liganden ist die Hauptfragestellung eines Modells des Glutamat-Rezeptors wie es von Rosenmund *et al.* (1998) vorgeschlagen wurde. Wenn die Bindungsstelle des Glutamats vorher von einem hohen affinitären Antagonisten besetzt wird, um dadurch die Geschwindigkeit der Bindungen des Glutamats herabzusetzen, passiert der Kanal drei unterscheidbare Leitfähigkeitszustände (Abb. 11.1). Da beim Übergang in den ersten Zustand zwei Zeitkonstanten auftreten, wird dadurch die Anzahl 4 (vier Untereinheiten) verifiziert.

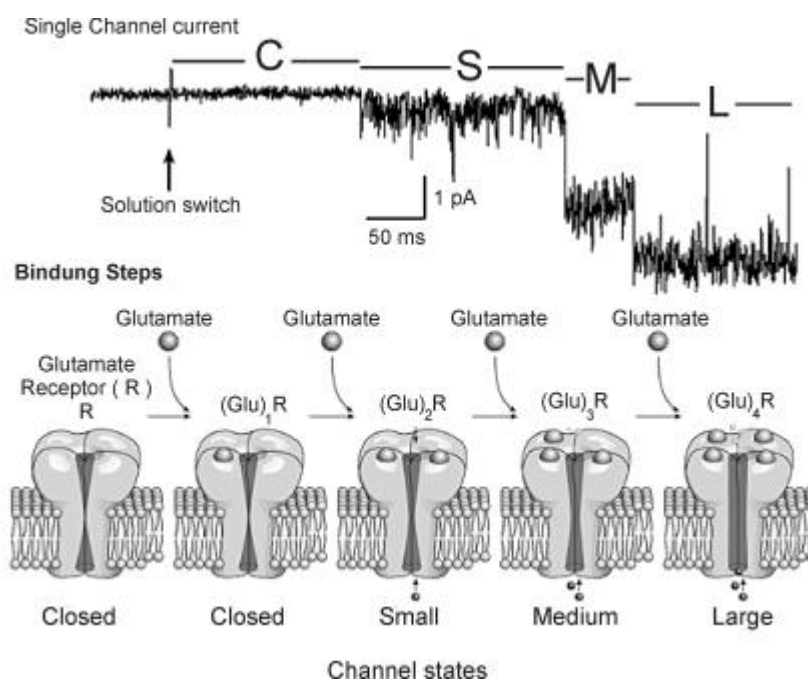


Abbildung 11.1: Sequentielle Bindung von Glutamat an einen Glutamat-Rezeptor-Kanal und dessen Einzelkanalstrom aufgetragen gegen die Zeit, die durch Patch-Clamp-Technik bei einem Haltepotential von -160 mV gemessen wurde. Der Pfeil in der Zeitreihe deutet den Zeitpunkt an, zu dem der Lösung Glutamat hinzugefügt wurde. Durch die langsame Freisetzung des Antagonisten wird die schrittweise Besetzung der Bindungsstellen mit Glutamat aufgelöst. Je nach Anzahl der Besetzung der Bindungsstellen 2, 3 oder 4 mit Glutamat werden Kanalzustände mit kleinen (S), mittleren (M) und großen (L) Einzelkanalströmen beobachtet (<http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/140/groups/mmcsf/index.html>).

Das 4-Untereinheiten-Modell ist nicht auf Glutamat-Rezeptoren beschränkt, sondern gilt auch für CNG-Kanäle. Eine ähnliche Beziehung zur tetrameren Struktur ergab sich aus Sublevel-Untersuchungen im verzögerten Gleichrichterkanal drk1 (Chapman *et al.*,

1997) oder in NMDA-Rezeptor-Kanälen (Schneggenburger und Ascher, 1997). Zheng *et al.* (2001) fanden eine treppenartige Öffnung in der Feinstruktur-Aktivierung und -Deaktivierung des *Shaker*-Kanals und brachten die Sublevels mit den einzelnen Zuständen der vier Untereinheiten in Verbindung. Eine allosterische Bindung von Mg^{2+} (oder Ca^{2+}) an Bindungsstellen jeder Untereinheit des BK-Kanals wurde von Zhang *et al.* (2001) beschrieben.

Die dritte Anforderung, die an ein AMFE-Modell gestellt wird, ist der Einfluss der Ionen-Bindung an die Gating-Eigenschaften. Effekte dieser Art sind bereits aus Messungen mit klassischen Mikroelektroden bekannt, so z. B. die Verschiebung des Aktivierungspotentials des K^+ -Kanals in Schliesszellen durch die K^+ -Konzentration (Blatt, 1988). Die Patch-Clamp-Technik (Abschnitt 3.2) erbrachte einen direkten Beweis, dass die Ionenkonzentration das Gating beeinflusst. So veranlasst z. B. die Erhöhung der externen K^+ -Konzentration die K^+ -Kanäle dazu, langsamer zu schließen (Swenson und Armstrong, 1981; Kiss und Korn, 1998) oder bei Abwesenheit von externen K^+ -Konzentrationen zu einem Zusammenbruch der Leitfähigkeit zu führen (Zhou *et al.*, 2001; Abschnitt 12.5). Etliche Beobachtungen dieser Art führten zum einfachen „Foot-in-the-Door“-Modell des Gatings. Das besagt, dass der Kanal mit Ionen innerhalb der Pore nicht inaktivieren kann (Kiss *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001). Ähnliche Befunde wurden auch über den Na^+ -Kanal berichtet (Townsend und Horn, 1999). Demo und Yellen (1992) fanden, ähnlich wie Levy und Deutsch (1996), jedoch auch eine Beschleunigung der Offen-Rate mit wachsender äußerer K^+ -Konzentration. Sie schlugen ein Permeationsmodell mit zwei Bindungsstellen vor, bei dem die eine Bindungsstelle als Gating-Stelle agiert. In den Untersuchungen von Zhang *et al.* (2001) verlangsamte die Bindung von Mg^{2+} (oder Ca^{2+}) die Rate, die Offenzustände zu verlassen. Ein Anstieg der Chlorid-Konzentration erhöhte die Offenwahrscheinlichkeit des Chlorid-Kanals (Pusch *et al.*, 1995; Pusch, 1996; Chen und Miller, 1996).

Draber und Hansen (1994) fanden, dass im Fall des spannungsabhängigen Blocks des K^+ -Kanals in *Chara* durch Cs^+ die Ratenkonstante des Übergangs in einen Geschlossen-zustand proportional zur Cs^+ -Konzentration war (Abschnitt 8.5). Die wechselseitige Beziehung zwischen Ionenbindung und Schaltverhalten wurde im *Shaker*-Kanal mit einem eingebauten Cystein im externen P-Loop deutlich. Die Bindung von Zn^{2+} und Cd^{2+} bringt den Kanal in den langsamen C-Typ-Inaktivierungszustand. Der Zustand des Kanals übt aber auch einen starken Einfluss auf das K_d der Cd^{2+} -Bindung. Dies deutet Konformationsänderungen des externen Mundes an. In den Messungen von Perozo *et al.* (1999) war es der pH-Wert, der den Durchmesser des äußeren Eingangs veränderte.

Die obigen Befunde führten zu folgendem Vorschlag eines Mechanismus für den AMFE. Einer der Faktoren, die eine Änderung in der Selektivität hervorrufen können, ist die Liganden-Bindung, die zur Anpassung des Porenradius beisteuert und dadurch die Selektivität des K^+ -Kanals und dessen Gating-Eigenschaften ändert (CNG-Kanäle:

Ruiz und Karpen, 1999; Sundermann und Zagotta, 1999a,b; BK-Kanäle: Moss und Magleby, 2001; Shi und Cui, 2001; Glutamat-Rezeptoren: Rosenmund *et al.*, 1998; Stern-Bach *et al.*, 1998). Das bedeutet, dass die Ionenbindung an allosterische Stellen bei allen vier Untereinheiten des Kanals angenommen wird. Für den AMFE werden zwei Mechanismen erwogen, die die Gating-Eigenschaften des Selektivitätsfilters erklären könnten: Ionenbindung an allosterische Stelle (Liganden-Modell) oder Regulierung des Gating-verhaltens durch die permeierenden Ionen in der Pore. Im folgenden werden fünf verschiedene Modelle in Betracht gezogen, die den AMFE erklären sollen.

1. Der direkte Effekt der Ionenbindung auf das Gating: Dabei sind die Bindungsratenkonstanten gleich den Gatingratenkonstanten.
2. Ein nichtlinearer Effekt der Ionenbindung auf das Gating: Das Gating wird auch hier durch die Bindung verursacht, aber Zwischenschritte (Ionenbindung und anschließende Änderung in der Proteinkonfiguration) lösen Sättigungskinetiken in der Beziehung zwischen Ionenkonzentration und Gatingratenkonstanten aus.
3. Modulation des Gatings durch Ionenbindung: Gating resultiert aus temperatur-induzierten Vibrationen, aber die Frequenz dieser Vibrationen wird durch die Ionenbindung moduliert. Dies ist ähnlich den Ergebnissen von Ruiz und Karpen (1999), die auch zu dem Schluss kamen, ein einfaches MWC-Modell (Monod *et al.*, 1965) für das Binden von cGMP an die vier C-Termini des CNG-Kanals aufgeben zu müssen.
4. Ähnlich wie beim Hille-Schwarz-Modell ist die Leitfähigkeit durch die Besetzung mit unterschiedlichen Ionen in der Pore blockiert, jedoch nicht wegen deren Wechselwirkungen, sondern wegen der Konformationsänderung des Selektivitätsfilters. Die Gatingratenkonstanten sind gleich den Besetzungsratenkonstanten.
5. Modulation durch Besetzung der Pore: Die durchschnittliche Besetzung der Pore entscheidet über die Ratenkonstanten der inhärenten Vibration (Übergänge zwischen den Markov-Zuständen) des Proteins.

11.2 Liganden-Bindung: Allgemeine Eigenschaften der ersten drei Modelle

Cakan (2002) versuchte, den AMFE mit Hilfe von Liganden-Modellen zu modellieren, um die AMFE-Kurve durch ein Gating-Modell zu erzeugen. Eine Änderung des Gatings

durch Liganden-Bindung wurde wie bereits oben besprochen bis jetzt hauptsächlich auf der cytosolischen Seite beobachtet (Ruiz und Karpen, 1999; Moss und Magleby, 2001). Beispiele für Liganden-Bindung an der externen Seite sind selten. Es gibt eine Ca^{2+} -Bindung beim EF-Hände Motiv in Ca^{2+} -Kanälen (Feng *et al.*, 2001), eine Bindung von Na^+ und Cs^+ an den Porenmund von NMDA-Rezeptoren (Antonov und Johnson, 1999) oder eine Bindung von Cd^{2+} an künstlich gesetzte Cystein-Residuen (Yellen *et al.*, 1994). Die Bindungsstellen beim Glutamat-Rezeptor liegen auch auf der Außenseite des Kanals (Rosenmund *et al.*, 1998).

Die Modelle gehen von einem einfachen 4-Untereinheiten-Modell aus, da angenommen wird, dass der Kanal aus vier identischen Untereinheiten besteht. Tatsächlich wurde der K^+ -Kanal in *Chara* bisher nicht geklont. Es wird jedoch aus seinem Verhalten geschlossen, dass es ähnlich dem BK-Kanal ist (Tester, 1988, Abschnitt 3.1). Es wird bei den ersten drei Modellen angenommen, dass jede der vier Untereinheiten eine Bindungsstelle besitzt (ähnlich wie in Abb. 11.1, Rosenmund *et al.*, 1998), die K^+ oder Tl^+ mit den Ratenkonstanten $k_{1,1}$ und $t_{1,1}$ binden und sie mit den Ratenkonstanten $k_{1,S}$ und $t_{1,S}$ freisetzen kann. Daher kann die Ionenbindung an jede Untereinheit des Kanals durch ein 3-Zustandsmarkovmodell mit den Zuständen K (K^+ -gebunden), F (frei) und T (Tl^+ -gebunden) beschrieben werden. In dieser ersten Näherung sind die Markov-Modelle unabhängig, aber Kooperativität kann leicht eingeführt werden, indem die Ratenkonstanten der Ionenbindung und -freisetzung abhängig von den Zuständen der anderen Untereinheiten gemacht werden.

Der Makrozustand des Kanals wird durch ein Symbol aus vier Großbuchstaben beschrieben. KKKK bedeutet, dass alle vier Bindungsstellen mit K^+ -Ionen besetzt sind. KKKT beinhaltet, dass 3 Stellen mit K^+ -Ionen und eine mit einem Tl^+ -Ion besetzt sind. TTTT bedeutet, dass alle vier Bindungsstellen mit Tl^+ besetzt sind, FFFF ist mit keinem Ion besetzt, KFKT bindet zwei K^+ -Ionen, ein Tl^+ -Ion und besitzt eine unbesetzte Bindungsstelle usw.

Binden und Freisetzen eines Ions an eine allosterische Stelle im 4-Untereinheiten-Modell wird durch folgende Gleichungen

$$\frac{dK_b}{dt} = k_{1,1} K F - k_{1,S} K_b \quad (11.1a)$$

und

$$\frac{dT_b}{dt} = t_{1,1} T F - t_{1,S} T_b \quad (11.1b)$$

beschrieben, wobei

K die K^+ -Konzentration,
T die Tl^+ -Konzentration,

$k_{1,1}$	die Ratenkonstante der Bindung von K^+ ,
$k_{-1,S}$	die Ratenkonstante der Freisetzung von K^+ , (der Index S bedeutet "single subunit")
$t_{1,1}$	die Ratenkonstante der Bindung von TI^+ ,
$t_{-1,S}$	der Freisetzung von TI^+ ,
K_b	die Wahrscheinlichkeit, dass K^+ an die Bindungsstelle gebunden ist,
T_b	die Wahrscheinlichkeit, dass TI^+ an die Bindungsstelle gebunden ist
F	die Wahrscheinlichkeit, dass die Bindungsstelle leer ist.

Die Summe über alle Zustände der Bindungsstellen muss eins sein. Dies berücksichtigt automatisch die Normierung der Wahrscheinlichkeiten.

$$K_b + T_b + F = 1 \quad (11.2)$$

11.2.1 Modell 1: Direkter Einfluss der Ionenbindung auf das Gating: Ionenbindung und scheinbarer Einzelkanalstrom

Die Wahrscheinlichkeit für die Besetzung einer Bindungsstelle mit K^+ ist:

$$p_K = K_b = \frac{K_b}{F + K_b + T_b} \quad (11.3a)$$

Für einen Zustand im Steady-State wird die Änderung der Bindungswahrscheinlichkeit pro Zeit in den Gleichungen (11.1a) und (11.1b) gleich Null gesetzt und in Gleichung (11.3a) eingesetzt.

$$p_K = K_b = \frac{\frac{k_{1,1}}{k_{-1,S}} K}{1 + \frac{k_{1,1}}{k_{-1,S}} K + \frac{t_{1,1}}{t_{-1,S}} T} \quad (11.3b)$$

Entsprechend mit TI^+ ergibt sich

$$p_T = T_b = \frac{\frac{t_{1,1}}{t_{-1,S}} T}{1 + \frac{k_{1,1}}{k_{-1,S}} K + \frac{t_{1,1}}{t_{-1,S}} T} \quad (11.3c)$$

und für den unbesetzten Zustand

$$p_F = F = \frac{I}{I + \frac{k_{1,1}}{k_{-1,S}} K + \frac{t_{1,1}}{t_{-1,S}} T} \quad (11.3d)$$

Ohne Kooperativität ist die Wahrscheinlichkeit in einem Makrozustand mit 6 K⁺-besetzten, N freien, 4-N-6 TT⁺-besetzten Bindungsstellen (6, N = 0, 1, 2, 3, 4)

$$p(\mathbf{k}, 4-\mathbf{k}-\mathbf{f}, \mathbf{f}) = p_K^k p_T^{4-k-f} p_F^f \quad (11.4)$$

Wenn die Besetzung des freien Zustands F klein ist ($k_{1,1} K > k_{-1,S}$ und $t_{1,1} T > t_{-1,S}$), dann kann die „1“ im Nenner von Gleichung 11.3b,c vernachlässigt werden, und nur das Verhältnis zwischen K⁺- und TT⁺-Bindung ist von Bedeutung. Es wird eine Größe R eingeführt, die folgendermaßen definiert ist.

$$R = \frac{t_{1,1} k_{-1,S}}{t_{-1,S} k_{1,1}} \frac{T}{K} \quad (11.5)$$

Damit werden die Gleichungen 11.3b,c,d umgewandelt in

$$p_K = \frac{1}{1+R}, \quad p_T = \frac{R}{1+R}, \quad p_F = 0 \quad (11.6a,b,c)$$

Die Steady-State-Bindungswahrscheinlichkeiten (Gleichung 11.3) werden zur Berechnung des scheinbaren Einzelkanalstroms herangezogen. Dies bedeutet, dass die Mittelung über den Burst des Stroms der Hauptmechanismus ist, der die Stromreduktion verursacht. Diese Näherung ist gerechtfertigt, wenn die Integrationszeit des Filters des Messaufbaus länger ist als die Verweildauern in den Offen- und Geschlossenzuständen des Kanals (Hansen *et al.*, 1997). Wie bereits erwähnt, ist dieser Effekt sehr deutlich im Falle des Cs⁺-Blocks in *Chara* (Klieber und Gradmann, 1993), bei dem das Niveau und das Gating bei einer Abtastrate von 100 kHz aufgelöst wird, nicht aber bei einer Abtastrate von 5 kHz (Draber und Hansen, 1994; Abschnitt 8.5).

Im Falle des AMFE ist es die Stromreduzierung durch Gating in den Kapiteln 8, 9 und 10 ausführlich dargestellt (Farokhi *et al.*, 2000). Durch diese Ergebnisse ist die Anwendung von Steady-State-Bindungswahrscheinlichkeiten (Gleichung 11.3) zur Berechnung des scheinbaren Einzelkanalstroms sinnvoll.

11.2.1.1 Erzeugung des AMFE des scheinbaren Einzelkanalstroms

Der Strom bei einer vorgegebenen Membranpotential ist:

$$I = \sum_{k,f=0}^{k+f=4} p(k,f,4-k-f) I(k,f,4-k-f) \quad (11.7)$$

wobei p die Besetzungswahrscheinlichkeit des Makrozustands $6K,NF,(4-6-N)T$ mit dem dazugehörigen realen Offenkanalstrom $I(6,N,4-6-N)$ ist.

In einem ersten Satz von Simulationen wurde nicht angenommen, dass sich der Offenkanal-Strom $I(6,N,4-6-N)$ mit der Molfraktion ändert. Dies bedeutet, dass die Leitfähigkeit für K^+ und Tl^+ gleich ist. Diese Annahme wurde gemacht, um den Einfluss der Wahrscheinlichkeiten $p(6,N,4-6-N)$ ohne Überlagerung derjenigen von $I(6,N,4-6-N)$ zu untersuchen. In Abb. 11.2 sind die scheinbaren Einzelkanalströme, die mit unterschiedlichen realen Offenkanalströmen $I(6,N,4-6-N)$ berechnet wurden, in Abhängigkeit von der Tl^+ -Konzentration in einer Lösung von $[Tl^+] + [K^+] = 150$ mM dargestellt (Cakan, 2002). Die Kurven Nr. 3 und Nr. 5 kommen nahe an die Messdaten.

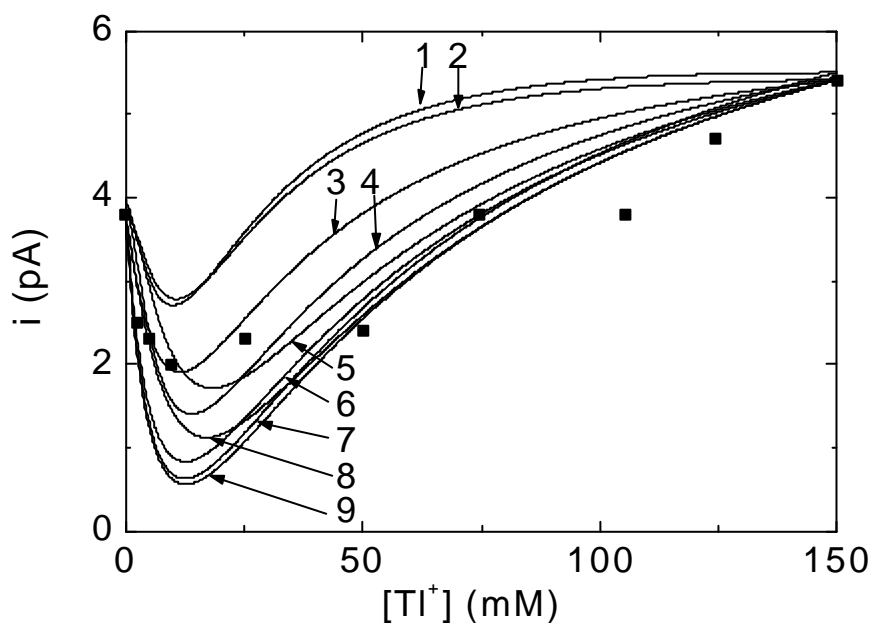


Abbildung 11.2: Vergleich der gemessenen Datenpunkte (Quadrate, Abb. 8.1, Farokhi *et al.*, 2000) mit dem scheinbaren Einzelkanalstrom I (Gleichung 11.7) aus der Berechnung von Modell 1 in Abhängigkeit des Tl^+/K^+ -Verhältnisses bei einer Gesamtkonzentration von $[Tl^+] + [K^+] = 150$ mM. Dabei sind 9 verschiedene Kurven aus Modell 1 dargestellt, die mit unterschiedlichen realen Offenkanalströmen $I(6,N,4-6-N)$ (Gleichung 11.7) berechnet wurden (Cakan, 2002; Hansen *et al.*, 2002)..

Die Anwendung verschiedener Datensätze zeigte jedoch einige grundlegende Probleme, die Kurven an die Daten anzufitten. Wenn das Minimum am vermuteten richtigen Ort (bei 10 mM TT^+) liegt und sich der Strom auf der TT^+ -Seite gut nähert, dann ist der Wert für den Strom im Minimum zu niedrig (Kurven Nr. 6 bis 9). Wenn andererseits der Strom den richtigen Wert im Minimum annimmt (Kurve Nr. 3), dann ist der Strom im Bereich zwischen Minimum und reinem TT^+ zu hoch. Kurve Nr. 5, die die Messdaten am besten zu beschreiben scheint, hat ihr Minimum zu Werten von TT^+ verschoben, die zu hoch sind.

Die Probleme sind jedoch ein Bestandteil des Modells. Das Verhältnis R (Gleichung 11.6) bestimmt das Minimum der AMFE-Kurve und die Sättigung der TT^+ -Besetzung. Mit anderen Worten verlagern hohe Werte von R (Gleichung 11.5) die Region des AMFE-Minimums zu kleineren Werten von TT^+ (Abb. 11.2). Sie verlagern aber auch die Sättigung für die TT^+ -Besetzung in Abb. 11.2 nach links. Dies führt zur Beugung der Kurven oberhalb der Datenpunkte auf der rechten Seite vom Minimum. Obwohl es einen zusätzlichen Freiheitsgrad gibt, der sich aus der Anpassung der Offenkanal-Ströme von 4K, 3KT, 3TK, 3TF und 4T ergibt, kann die Kurve nur innerhalb enger Grenzen gezogen werden.

11.2.1.2 Abhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeit der Makrozustände

Eine Abhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeit der Makrozustände 4K, 4T, 3KF, 3TF, 3KT, 3TK und 2T2K vom Verhältnis der TT^+/K^+ -Konzentration ist in Abb. 11.3 dargestellt (Cakan, 2002). Eine Änderung in der Kurvenform kann durch den Zustand 3KF nicht erfolgen, da die Beziehung zwischen 4K und 3KF im Bereich zwischen einer TT^+ -Konzentration von 0 mM und dem Minimum der AMFE-Kurve konstant ist (Abb. 11.3). Daher ist der einzige freie Parameter die Summe der Ströme, die zu diesen beiden Zuständen gehören. Das Verhältnis zwischen 4K und 3KF wird jedoch wichtig, wenn das zeitliche Verhalten in Betracht gezogen wird, da diese Zustände auf die jeweiligen Zustände A und O des Markov-Modells A-O-G-C-Z (Kapitel 10 und Abschnitt 11.2.1.4) bezogen werden könnten.

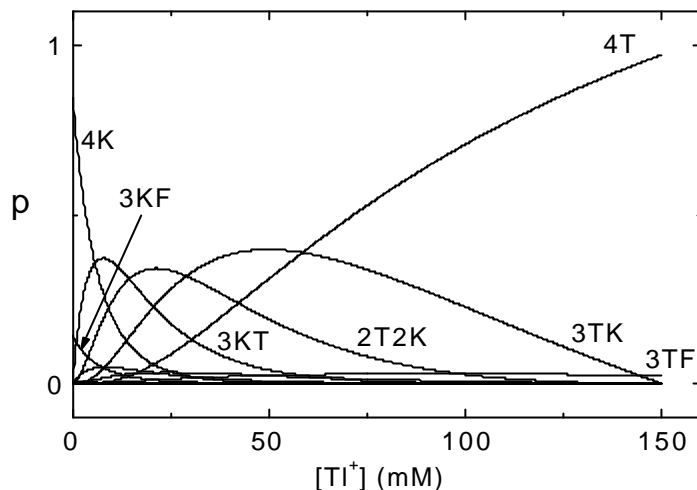


Abbildung 11.3: Abhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeit der Makrozustände 4K, 4T, 3KF, 3TF, 3KT, 3TF und 2T2K von Verhältnis der Tl^+/K^+ -Konzentration. Die Ratenkonstanten sind mit denen der Kurve Nr. 5 aus Abb. 11.2 identisch (Cakan, 2002; Hansen *et al.*, 2002).

11.2.1.3 Anpassung der AMFE-Kurve durch weitere Leitfähigkeitszustände

Aus Abb. 11.3 geht hervor, dass der einzige Weg, ein breiteres Minimum in der AMFE-Kurve zu erhalten, der ist, dem Zustand 2K2T eine Leitfähigkeit zuzuordnen. Abb. 11.4 zeigt, dass dies in einem sehr guten Fit der Messdaten resultiert.

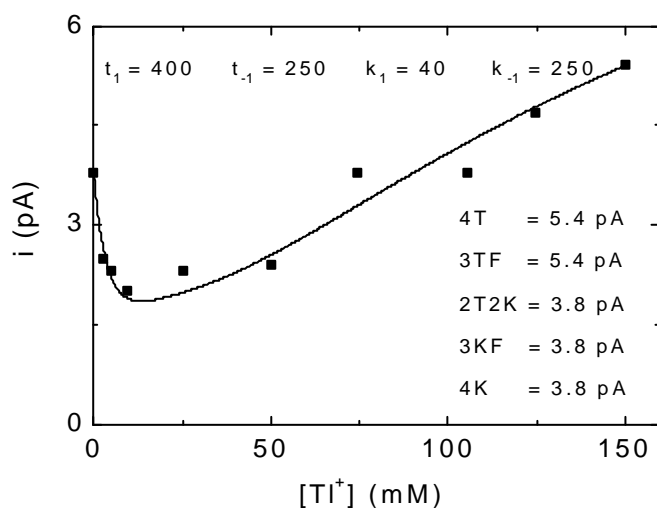


Abbildung 11.4: Die AMFE-Kurve wird mit einem Leitfähigkeitszustand 2K2T gefittet. Die Daten des Modells sind die aus der Kurve Nr. 8 in Abb. 11.2, aber mit einem Offenkanalstrom von 3.8 pA nicht nur für 4K und 3KF, sondern auch für 2T2K mit $t_1 = 400$, $k_1 = 40$ und $t_{-1} = k_{-1} = 250$ (Cakan, 2002; Hansen *et al.*, 2002).

In Abb. 11.4 ist der Offenkanalstrom von 3KT gleich Null. Dies mag eine ungewöhnliche Annahme sein. 3KT verhindert jedoch einen so guten Fit, wie er in Abb. 11.4 dargestellt ist, da ein Leitfähigkeitszustand 3KT das Minimum auf die rechte Seite verlagert. Dies kann durch eine stärkere Bindung von TT^+ -Ionen kompensiert werden, indem der Asymmetrie-Faktor R erhöht wird (Gleichung 11.5). Diese stärkere Bindung von TT^+ -Ionen führt zu einer früheren Sättigung der TT^+ -Bindung und dadurch zu einer stärkeren Aufwärts-Beugung (wie im Falle aller Kurven in Abb. 11.2), was einen guten Fit auf der rechten Seite vom Minimum verhindert. Auf der anderen Seite ist nicht bekannt, wie die TT^+ -Bindung den Porenradius beeinflusst. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass der symmetrischere 2K2T-Zustand eine höhere Leitfähigkeit besitzt als der asymmetrische 3KT-Zustand.

Alternativ dazu gibt es die Annahme, dass die Permeabilität für K^+ und TT^+ gleich ist, d.h. dass $I(\kappa, \phi, 4 - \kappa - \phi)$ unabhängig von der Molfraktion ist. Die Annahme, dass $I(4\text{T}) = I(3\text{TF}) = I_{\text{T},1} [\text{TT}^+]$ führt zu einer flacheren Beugung zwischen dem Minimum und der vollen TT^+ -Konzentration, die Qualität des Fits in Abb. 11.4 wird aber nicht erreicht.

Obige Überlegungen sollten jedoch nicht zu ernst in Betracht gezogen werden. Außerdem ist nicht bewiesen, dass der erfolgreiche Fit in Abb. 11.4 bedeutet, dass Modell 1 richtig ist oder dass der Makrozustand 2K2T zur Leitfähigkeit beiträgt. Diese Vorsicht ist begründet, da das Zeitverhalten ein gravierenderes Problem von Modell 1 aufzeigen wird, das schließlich zur Modifikation dieses Modells führt.

11.2.1.4 Zeitliches Verhalten

Modell 1 scheint in der Lage zu sein, den AMFE zu beschreiben. Probleme treten jedoch auf, wenn das Schaltverhalten untersucht wird. In Abschnitt 10.3 wurden verschiedene 5-Zustandsmodelle für den HMM-Fit der Zeitreihen verwendet, die vom K^+ -Kanal in *Chara* erhalten wurden. Sie alle hatten zwei Offen- und drei Geschlossenzustände. Die Likelihoods der dazugehörigen Fits waren nicht signifikant unterschiedlich. Daher konnte keine Entscheidung für ein bestimmtes Modell getroffen werden. Die Untersuchungen folgen weiterhin anhand des Modells A-O-G-C-Z, wie in Abschnitt 9.2 und 10.4.

Im Falle der Messungen in reiner K^+ -Lösung ist es angebracht, folgende Annahme zu machen: $A = 4\text{K}$, $O = 3\text{KF}$, $G = 2\text{K2F}$, $C = \text{K3F}$, $Z = 4\text{F}$. In Mischlösungen ist es jedoch fraglich, ob ein 5-Zustandsmodell das 4-Segment-Modell mit $3^4 = 81$ Zuständen wiedergeben kann, auch wenn sie zu 15 Klassen von Makrozuständen zusammengefasst werden können, von denen jeder solche Zustände wiedergibt, die wegen der 4-Segment-Symmetrie des K^+ -Kanals äquivalent sind.

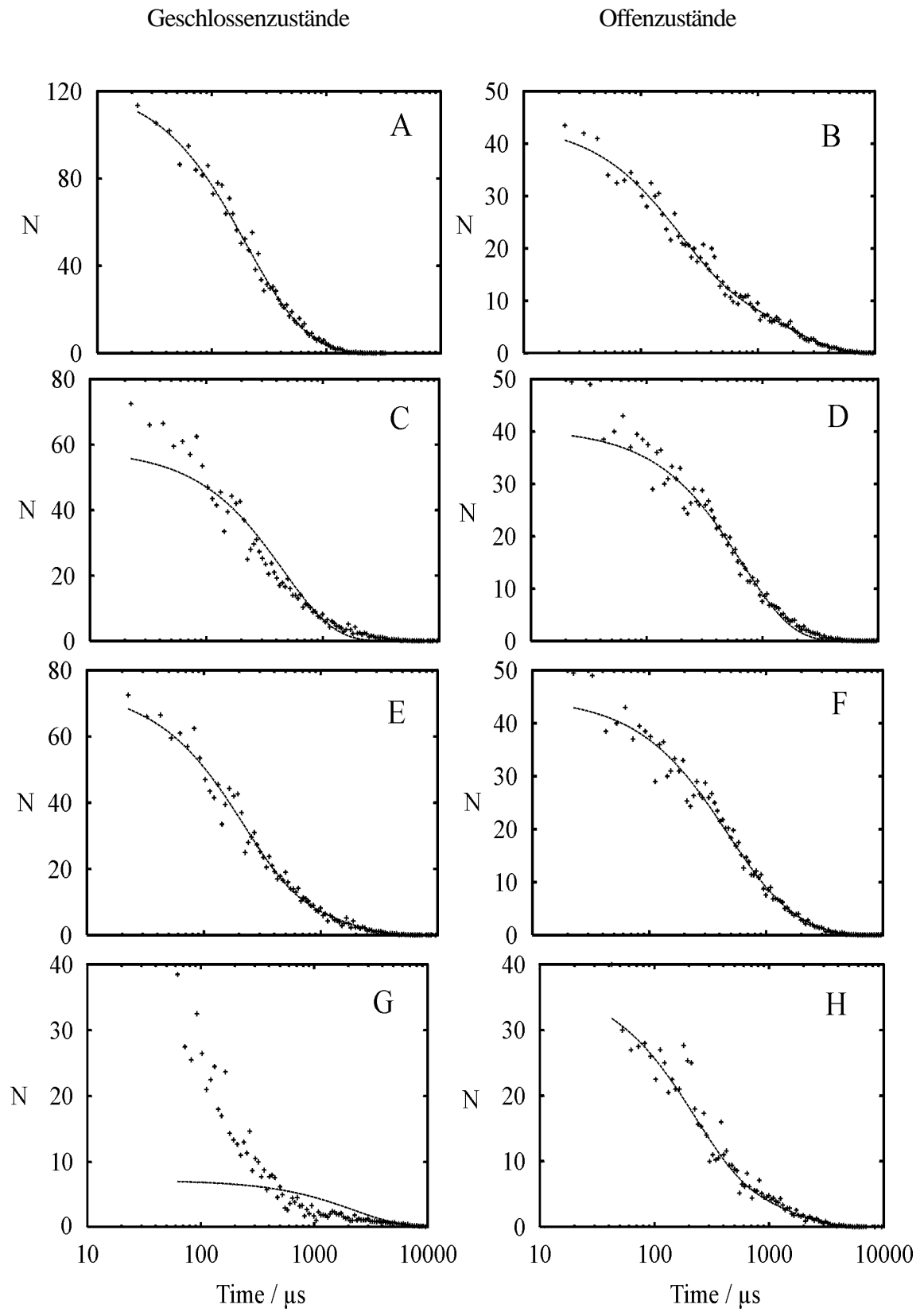
Um herauszufinden, wie viele Zustände in einer Einzelkanal-Patch-Clamp-Messung unterschieden werden können, wenn sich der K^+ -Kanal von *Chara* wie das vorgegebene

Modell verhält, wurden Zeitreihen mit einem Sprungsimulationsprogramm des 4-Segment-Modells (Cakan, 2002) erzeugt (simulierte Daten). Die Simulation der Zeitreihe mit den vier Untereinheiten erfolgt ähnlich wie bei Rießner (1998) (Abschnitt 4.6) nur mit dem Unterschied, dass sich jede der vier Untereinheiten wie ein einzelnes Markov-Modell mit den Zuständen K (K^+ -Bindung), F (frei) und T (Tl^+ -Bindung) verhält. So wird zuerst der Anfangszustand gesetzt und bestimmt, womit jede Bindungsstelle als nächstes besetzt wird, wenn sie vorher frei wäre. Danach wird der Zeitpunkt bestimmt, wann die besetzte Bindungsstelle wieder frei wird. Der Makrozustand des gesamten Systems wird aus einer Überprüfung der vier einzelnen Zustände erhalten. So kann entweder die Verweildauer in jedem Zustand bestimmt werden, oder es wird jedem dieser Makrozustände ein Stromwert zugewiesen, um eine Zeitreihe zu erhalten.

Um die optimalen Bedingungen herauszufinden, wurden die Ratenkonstanten um den Faktor 100 herabskaliert, um Missed-Events (Draber und Schultze, 1994) auszuschließen. Rauschen wurde nicht überlagert, was bedeutet, dass die Ergebnisse die oberste Grenze dessen darstellen, was aus einer wirklichen Messung herausgefunden werden kann. Unter dieser Bedingung konnte anstelle der zeitaufwendigen HMM-Analyse (Albertsen und Hansen, 1994; Abschnitt 4.5), die für die realen Daten notwendig ist (Kapitel 10), die Dwell-Time-Analyse (Blunck *et al.*, 1998, Abschnitt 4.4) durchgeführt werden

Die Ergebnisse sind in Abb. 11.5. Die Streuung ergibt sich aus der Statistik des Markov-Prozesses. Abb. 11.5A,B verifiziert, dass die Simulationsdaten in reinem K^+ durch ein 3-Zustandsmodell A-O-G gefittet werden können. Ein Fit mit einem 5-Zustandsmodell (nicht gezeigt) ergibt keine höhere Wahrscheinlichkeit. Dies soll nicht als Widerspruch gegen das 5-Zustandsmodell angesehen werden, da nicht alle fünf kinetischen Zustände des Modells von Kapitel 9 und Kapitel 10 aus dem selben Mechanismus resultieren müssen. Zheng *et al.* (2001) fanden, dass die meisten Geschlossen-Zustände im *Shaker*- K^+ -Kanal auf das (innere) Haupt-S6-Gate bezogen sind. Manche Geschlossen-Zustände werden jedoch durch das (äußere) Poren-Gate verursacht, wenn das Haupt-Gate immer noch geöffnet ist. Sie könnten auf A-O-G bezogen sein, das das Flickern erzeugt, das hier untersucht wird.

Vier Zustände sind notwendig, um die Simulationsdaten für 20 mM Tl^+ + 230 mM K^+ (Minimum der AMFE-Kurve) zu fitten. Die kinetischen Parameter sind diejenigen von Kurve Nr. 7 in Abb. 11.2, aber mit gleichem Offenkanalstrom der leitenden Zustände, die 4K, 3KF, 3KT, 3TK, 3TF, 4T für die Abb. 11.5C-F waren. Die Abb. 11.5C-D zeigen, dass drei Zustände nicht ausreichen, um die Tl^+ -Daten zu fitten, und dass ein vierter Zustand eingeführt werden muss, der die geschlossenen und offenen Dwell-Time-Histogramme (Abb. 11.5E, F) fittet.



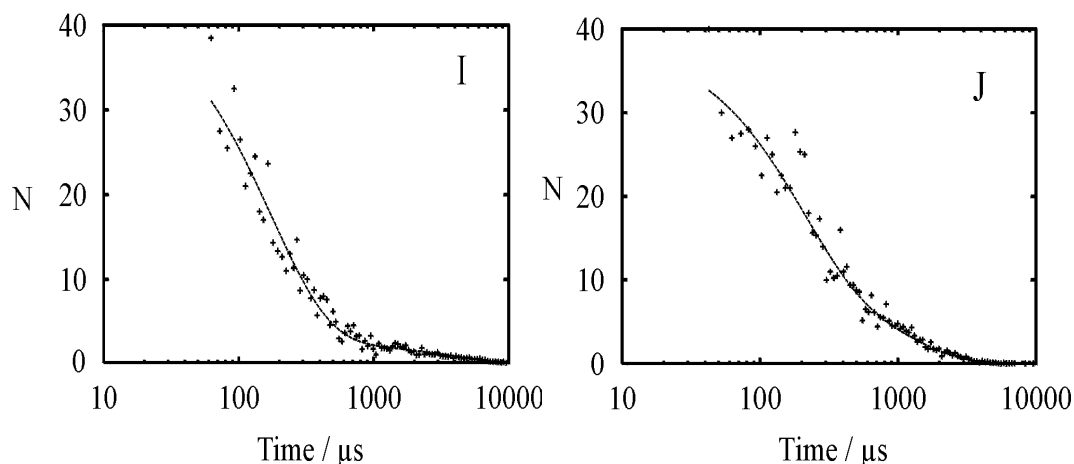


Abbildung 11.5: Dwell-Time-Histogramme der simulierten Zeitreihe mit den Ratenkonstanten von Kurve Nr. 7 in Abb. 11.2 mit der gleichen Leitfähigkeit für 4K, 3KF, 3TF, 3TF, 4T für (A, B; GJ) und zusätzlich 3KT und 3TK (C-F). Auf der linken Seite sind die geschlossenen Zustände dargestellt, auf der rechten Seite die offenen. (A, B) Modell 1 in reiner K^+ -Lösung. (C-J) Modell 1 in einer Lösung aus 240 mM K^+ und 10 mM Tl^+ mit unterschiedlichem Offenkanalstrom des Zustands 3KT und 3TK (C-F: 3.8 pA und GJ: 0 pA): Die simulierten Daten wurden mit einem 3-Zustandsmodell (A, B, C, D, G, H) bzw. mit einem 4-Zustandsmodell gefittet (E, F, I, J).

Es mag die Frage gestellt werden, ob dieser zusätzliche Zustand aus der Zuordnung von Leitfähigkeit zu 3KT resultiert. Daher wurden Simulationen mit $I(3KT) = I(3TK) = 0$ durchgeführt. Wiederum ergibt sich ein schlechter Fit für die 3-Zustandsmodelle (Abb. 11.5G,H). Der gute Fit in Abb. 11.5H (der besser ist als derjenige in Abb. 11.5D) wurde auf Kosten des Fits des Geschlossen-Histogramms in Abb. 11.5G erhalten. Dies ist nicht überraschend, da der zusätzliche Zustand 3KF (und 3TK) den Geschlossen-Zuständen zugeordnet wird.

Die Ratenkonstanten, die durch das Fitten der Simulationsdaten erhalten wurden, sind in Tabelle 11.1 gezeigt. In reinem K^+ waren drei Zustände ausreichend, um die Simulationsdaten zu fitten. Daher haben nur drei Zustände die Möglichkeit, den Zuständen des 5-Zustandsmodells zugeordnet zu werden, das für den Fit der realen Daten benutzt wurde (Abschnitt 10.3 und 10.4). Diese Zustände sind A, O und G. Das offensichtliche Problem liegt darin, dass die relativen Größen der Ratenkonstanten in Tabelle 11.1 (Linie AB) nicht besonders gut mit den gemessenen (Linie M) übereinstimmen. Es könnte jedoch möglicherweise eine bessere Korrespondenz erreicht werden, indem Kooperativitäts-Faktoren eingeführt werden, die die Ratenkonstanten vom Zustand der Ionenbindung abhängig machen. Dies wurde hier aber nicht untersucht, da andere Probleme des Zeitverhaltens von Modell 1 gravierender sind.

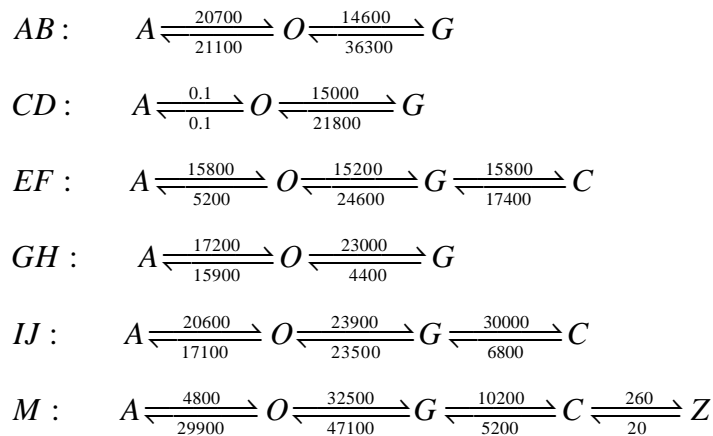


Tabelle 11.1: Fitergebnisse der Ratenkonstanten der Simulationsdaten aus Abb. 11.5. (M) Vergleichsdaten bei 250 mM K⁺-Lösung bei einer Haltespannung von +80 mV (Abb. 10.1).

Das erste dieser Probleme ist der neue Zustand, der für eine Mischlösung eingeführt werden muss (Tabelle 11.1 Linie EF). Dies steht im Widerspruch zu den experimentellen Ergebnissen. In Abschnitt 9.2 und 10.3 waren keine weiteren Zustände notwendig, um die gemessenen Zeitreihen zu fitten, die in der Mischlösung (K⁺+Tl⁺) erhalten wurden, als diejenigen in reinem K⁺. Es könnte jedoch argumentiert werden, dass in den Messdaten die extra Zeitkonstante mit einer anderen zusammengefallen ist und dass dies nicht herausgefunden werden konnte. Das kann in Daten mit Rauschen jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Zuordnung der sehr niedrigen Ratenkonstanten zum A-O-Übergang (CD in Tabelle 11.1) ist ungewöhnlich, aber sie konnte durch neue Simulationen und unterschiedliche Fit-Strategien nicht verhindert werden. Trotzdem waren die Ergebnisse, die mit dem 4-Zustandsfit erhalten wurden, zufriedenstellend, so dass keine Rücksicht auf Besonderheiten des Fits mit der falschen Anzahl von Zuständen genommen wurde.

Während die Unterschiede der Ratenkonstanten der Simulationsdaten und der Messdaten nicht so schwerwiegend sind, dass sie durch einige zusätzliche Annahmen überwunden werden können, brachten die neuen Messungen, die in Tabelle 11.2 gezeigt sind, gravierendere Einwände gegen Modell 1. Ein Hauptmerkmal von Modell 1 ist die Proportionalität zwischen Ratenkonstanten und Ionenkonzentrationen (Gleichungen 11.3b-d). Aus diesem Grund wurden weitere Messungen in 25 mM KNO₃ (Abb. 11.6) und 250 mM TINO₃ durchgeführt, um sie mit denjenigen in 250 mM K⁺ zu vergleichen. Die sich daraus ergebenden Zeitreihen wurden mit Hilfe des Direkten-Zeitreihen-Fits mit einem HMM (Fredkin und Rice, 1992; Albertsen und Hansen, 1994; Farokhi *et al.*, 2000; Abschnitt 4.5) untersucht.

11.2.1.5 Versuchsdurchführung bei 25 mM K^+ -Lösung

Die Durchführung der Messungen erfolgt wie in Abschnitt 8.1 mit dem Unterschied, dass bei diesen Messungen die neuen Maßnahmen der Rauschreduzierung, die in Kapitel 5 beschrieben wurden, angewendet werden. Als Verstärker wird bei diesen Messungen im Gegensatz zu den vorherigen Messungen der integrierende Patch-Clamp-Verstärker (Dagan 3900 A, USA) verwendet (Abschnitt 3.2), da er ein geringeres Rauschen besitzt. Durch die Entladung des eingebauten Rückkopplungskondensators mussten die Abtastwerte vorher ab einem gewissen Schwellenwert abgeschnitten werden (Abschnitt 3.3.1). Dann konnten die gemessenen Zeitreihen mit dem Direkten-Zeitreehen-Fit (Abschnitt 4.5) analysiert werden.

Die Pipetten, die hier verwendet wurden, waren aus Quarz-Glas, und der Ziehvorgang erfolgte mit einem Quarz-Glas Puller (Abschnitt 5.2.2). Bei diesen Messungen wird der hohe Aufwand bei der Herstellung der Elektroden, der den Nachteil der weniger guten Reproduzierbarkeit mit sich bringt, durch die Reduzierung des Rauschens aufgewogen.

Ohne diese neuen Maßnahmen wäre eine Analyse der Zeitreihen mit 25 mM K^+ -Lösung bei einer Filterfrequenz von 50 kHz nicht möglich gewesen. Die Rauschreduzierung betrug bis zu 0.7 pA bei einer Filterfrequenz von 50 kHz. So war es möglich, die kleinen Einzelkanalströme (Abb. 11.6) mit dem Direkten-Zeitreehen-Fit zu untersuchen. In Abb. 11.6 ist die Strom-Spannungskurve in 25 mM K^+ - und 250 mM K^+ -Lösung dargestellt. Der Einzelkanalstrom nimmt deutlich ab.

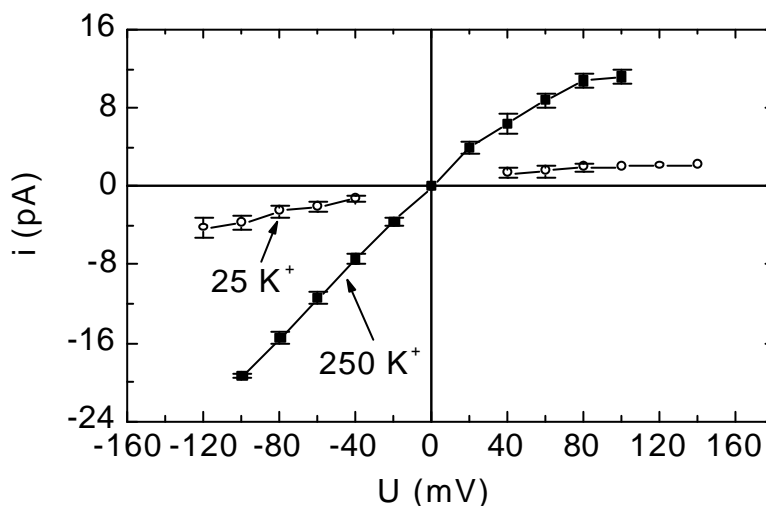


Abbildung 11.6: Strom-Spannungskurve, die in 25 mM KNO_3 und 5 mM $Ca(NO_3)_2$ bei Zimmertemperatur in einer symmetrischen K^+ -Lösung (offene Kreise) aufgenommen wurde. Zum Vergleich ist die Messung mit 250 mM KNO_3 (gefüllte Quadrate, Abb. 8.2) ebenfalls abgebildet. Für beide Messung ist jeweils die Standardabweichung aus sieben bis zehn Messdaten dargestellt.

11.2.1.6 Analyse der Ratenkonstanten durch einen Direkten-Zeitriihen-Fit bei 25 mM K⁺ - und 250 mM TI⁺-Lösung

Wenn im Falle der Messungen in reinem K⁺ folgende Zuordnung gemacht wird:

A = 4K und O = 3KF

und in reinem TI⁺:

A = 4T und O = 3TF,

dann werden folgende Ergebnisse erwartet:

1. Das Verhältnis k_{OA}/k_{AO} sollte in 25 mM K⁺ zehnmal kleiner sein als in 250 mM K⁺.
2. Das Verhältnis k_{OA}/k_{AO} sollte in 250 mM TI⁺ R-mal (Gleichung 11.5, R =4 bis 10) höher sein als in 250 mM K⁺.

Die Vorhersagen werden mit den Ergebnissen verglichen, die in *Chara* in 250 mM TI⁺ (Cakan, 2002), 250 mM K⁺ (Abb. 10.1) und 25 mM K⁺ erhalten wurden (wie in Tabelle 11.2 gezeigt). In jedem Fall gibt es keinen signifikanten Unterschied im k_{OA}/k_{AO} -Verhältnis (beim Vergleich von 250 mM TI⁺/250 mM K⁺ zu 250 mM K⁺/25 mM K⁺). Obwohl die Ratenkonstanten in 25 mM K⁺ etwas langsamer zu sein scheinen als in 250 mM K⁺, ist dieser Unterschied wegen der starken Streuung nicht signifikant. Zuverlässiger als die absoluten Werte der Ratenkonstanten ist das Verhältnis von Vorwärts- zu Rückwärtsreaktion. Dies verändert sich nicht um den Faktor 10, wie es in jedem Fall erwartet wird (10-fach niedriger in 25 mM K⁺ und 10-fach höher in 250 mM TI⁺ verglichen mit den Daten in 250 mM K⁺). Der Direkte-Zeitriihen-Fit der Zeitriihen könnte diese Aussage abschwächen. Es zeigt jedoch der Vergleich mit den Daten, die in Mischlösung (240 mM K⁺ und 10 mM TI⁺, dargestellt in Tabelle 11.3) erhalten wurden, dass die Analyse in der Lage ist, einen signifikanten Einfluss auf die Ratenkonstanten der A-O-Übergänge aufzulösen.

250mM K ⁺ :	$A \xrightleftharpoons[34500]{2500} O \xrightleftharpoons[40200]{37900} G \xrightleftharpoons[8900]{11400} C \xrightleftharpoons[20]{960} Z$
25mM K ⁺ :	$A \xrightleftharpoons[8580 \pm 4900]{1100 \pm 700} O \xrightleftharpoons[23200 \pm 4450]{25300 \pm 15000} G \xrightleftharpoons[1710 \pm 970]{4420 \pm 2050} C \xrightleftharpoons[110 \pm 90]{460 \pm 190} Z$
250mM TI ⁺ :	$A \xrightleftharpoons[21060 \pm 120]{4040 \pm 340} O \xrightleftharpoons[10850 \pm 2260]{19500 \pm 2260} G \xrightleftharpoons[1160 \pm 330]{4844 \pm 1455} C \xrightleftharpoons[21 \pm 1.5]{540 \pm 41} Z$

Tabelle 11.2: Die Ratenkonstanten des A-O-G-C-Z Markov-Modells, die durch einen Direkten-Zeitriihen-Fit bei einer Haltespannung von -100 mV bei 250 mM K⁺-, 25 mM K⁺- und 250 mM TI⁺-Lösung erhalten wurden.

Tabelle 11.2 zeigt den Vergleich der Ratenkonstanten für eine Haltespannung von -100 mV. Bei Betrachtung der Spannungsabhängigkeit der Ratenkonstanten bei 25 mM K^+ -Lösung wird in Abb. 11.7 auch keine Abhängigkeit zwischen den Ratenkonstanten bei unterschiedlichen Haltespannungen beobachtet. Besonders das Verhältnis k_{OA}/k_{AO} hat sich bei unterschiedlichen Spannungen nicht um einen Faktor 10 verändert. Auch das Verhältnis der anderen Hin- und Rückreaktionen im Markov-Modell ist nicht spannungsabhängig. Das bedeutet, dass sich die Ratenkonstanten nicht nur bei -100 mV zwischen 25 mM K^+ - und 250 mM K^+ -Lösung nicht unterscheiden, sondern auch für den gesamten negativen Spannungsbereich. Bei positiver Spannung konnte wegen des noch geringeren Einzelkanalstroms (kleines Signal/Rauschverhältnis) als bei den negativen Spannungen (Abb. 11.6; Abschnitt 8.3) der Direkte-Zeitriihen-Fit nicht durchgeführt werden.

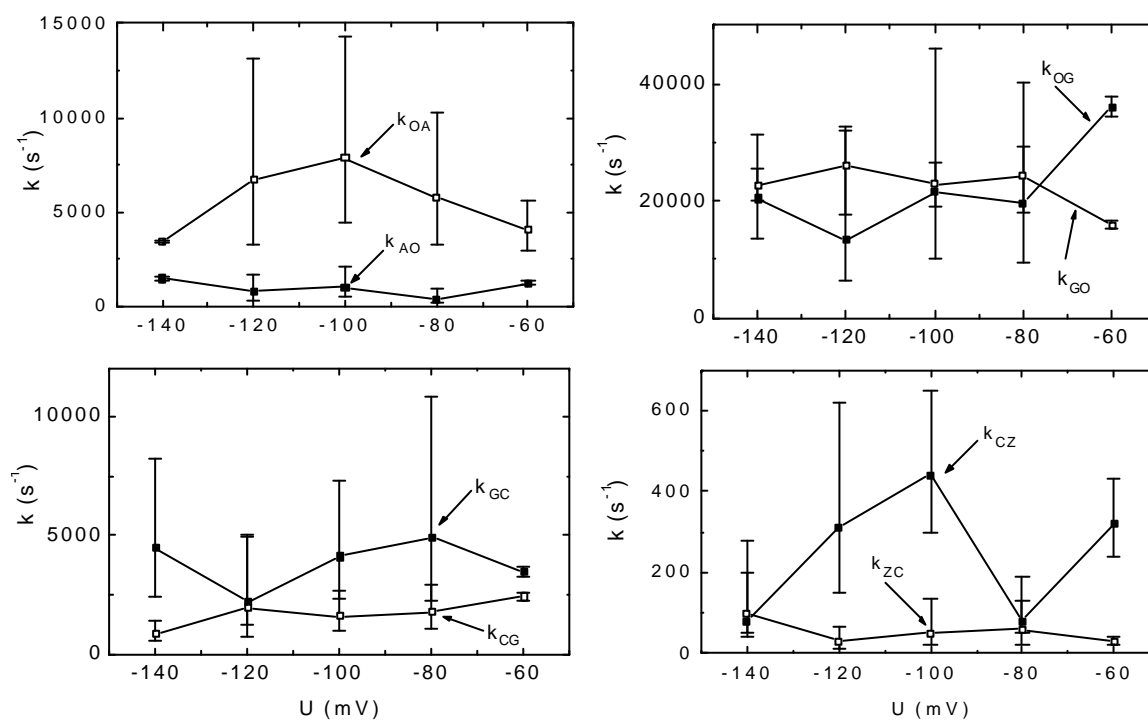


Abbildung 11.7: Betrachtung der unterschiedlichen Ratenkonstanten aus dem Direkten-Zeitriihen-Fit für das Markov-Modell A-O-G-C-Z im negativen Spannungsbereich bei 25 mM K^+ -Lösung. Wegen der großen Streuung bei der Bestimmung der Ratenkonstanten des Markov-Modells werden die geometrischen Mittelwerte mit deren Fehlern (geometrischer Faktor) dargestellt.

Die Zuverlässigkeit der Analyse wird auch durch den Effekt des Filterns auf den scheinbaren Einzelkanalstrom gestützt, der durch simulierte Zeitreihen, die mit Level-Detektoren analysiert wurden, erhalten wurde. Diese Ergebnisse sind wie erwartet: Die Daten aus der Mischlösung führten wegen der Mittelungseigenschaften des Filters zu einer

25%-igen Abnahme des Stroms. Die Abnahme, die aus den Ratenkonstanten in 25 mM K^+ , 250 mM Tl^+ und in 250 mM K^+ erhalten wurde, erreichte eine maximale Reduktion von 1 %. Alle diese Ergebnisse zusammen beinhalten, dass die vorhergesagten Änderungen in den Ratenkonstanten bei 25 mM K^+ und 250 mM Tl^+ nicht auftreten. Dies bedeutet, dass Modell 1 in seiner einfachen Form nicht in der Lage ist, den AMFE in *Chara* zu beschreiben.

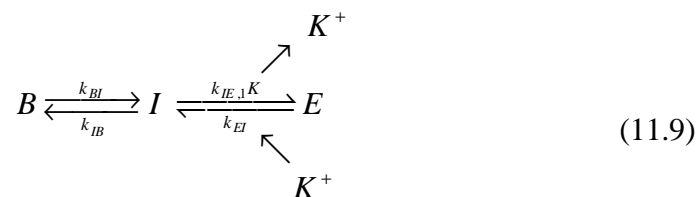
11.2.2 Modell 2: Nichtlinearer Effekt der Ionenbindung auf das Gating

Ein Versuch, das Scheitern von Modell 1, das gemessene Verhalten des Verhältnisses k_{OA}/k_{AO} vorherzusagen, zu beheben, ist die Einführung von Sättigungskinetiken auf die Bindungsreaktionen. Falls die Bindungsreaktionen von der Art einer Michaelis-Menton-Kinetik sind, könnte ein K_m von 1 mM sinnvoll sein, da *Chara* in „APW“ lebt. Dann befinden sich 250 und 25 mM weit in der Sättigungsregion, und eine Änderung im Verhältnis k_{OA}/k_{AO} würde in Tabelle 11.2 nicht erwartet werden.

Die Einführung einer Sättigungskinetik für K^+ - und Tl^+ -Bindung wird durch die Einführung eines Zwischenzustands in die Bindungsreaktion oder in der Freisetzungreaktion bewerkstelligt (Gleichung 11.8). Es wird angenommen, dass dieser Zwischenzustand I zwischen dem gebundenen Zustand B und dem leeren Zustand E in der Freisetzungreaktion liegt.



Wenn k_{BE} sehr klein ist, muss die Rückwärtsreaktion über I laufen. Das bedeutet, dass B sein Ion bereits verloren hat (B-I), aber die Untereinheit noch nicht bereit ist, wieder ein Ion zu binden. Dies benötigt eine zusätzliche Konformationsänderung (I-E), um die Bindungsstelle für die Bindung eines Ions vorzubereiten. Dieses Schema ist ähnlich dem in Modell 3. Daher wird hier die andere Alternative diskutiert, die besagt, I im direkten Weg zwischen E und B anzunehmen:



Das bedeutet, dass die Untereinheit nach der Bindung des Ions einige Zeit benötigt, um zur letztendlichen Konfiguration K umzuschalten. Der Zustand F des einfachen, oben diskutierten Modells 1 lautet:

$$F = I + E = \frac{k_{EI} + k_{IE}}{k_{EI}} I = r_1 I \tag{11.10}$$

wobei r_1 der Reservefaktor ist, der alle nicht unterscheidbaren Zustände in einem scheinbaren Zustand zusammenfasst (Hansen *et al.*, 1983).

Dieses Schema würde nicht zu einer weiteren Zeitkonstanten im Dwell-Time-Histogramm führen, wenn die Ratenkonstanten zwischen E und I die zeitliche Auflösung des Aufnahmesystems überschreiten. Eine solche Annahme ist sinnvoll, da die Bindung eines Ions (E-I) viel schneller sein könnte als die folgende Änderung in der Konformation des Proteins (I-B). Solch ein Verhalten ist bekannt von der Bindung von cGMP, das mit ca. 1 μ s auftritt, aber die gemessenen Zeitkonstanten sind mindestens 10 bis 1000 μ s. Daher gibt das aufgenommene Gating den modulierenden Effekt der Bindung wieder (Sundermann und Zagotta, 1999a,b).

Im Falle von Gleichung 11.10 werden die relativen Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände aus den Gleichungen

$$B + I + E = 1 \tag{11.11}$$

und

$$B = \frac{k_{IB}}{k_{BI}} I, \quad E = \frac{k_{IE}}{k_{EI}} I \tag{11.12a,b}$$

erhalten. Daher lautet die Steady-State-Besetzungswahrscheinlichkeit von I

$$I = \frac{1}{1 + \frac{k_{IB}}{k_{BI}} + \frac{k_{IE}}{k_{EI}}} = \frac{k_{BI} k_{EI}}{k_{EI} k_{IB} + k_{EI} k_{BI} + k_{IE} k_{BI}} \tag{11.13}$$

oder in Vektorschreibweise (Sanders und Hansen, 1981; Hansen, 1986):

$$B = \begin{matrix} \Rightarrow & \rightarrow \\ \left(\begin{array}{ccc} E & I & B \\ \Rightarrow & \rightarrow \\ \Rightarrow & \leftarrow \\ \leftarrow & \leftarrow \end{array} \right) \end{matrix} \quad I = \begin{matrix} \Rightarrow & \leftarrow \\ \left(\begin{array}{ccc} E & I & B \\ \Rightarrow & \rightarrow \\ \Rightarrow & \leftarrow \\ \leftarrow & \leftarrow \end{array} \right) \end{matrix} \quad E = \begin{matrix} \leftarrow & \leftarrow \\ \left(\begin{array}{ccc} E & I & B \\ \Rightarrow & \rightarrow \\ \Rightarrow & \leftarrow \\ \leftarrow & \leftarrow \end{array} \right) \end{matrix} \tag{11.14}$$

Jede Zeile gibt das Produkt der Ratenkonstanten (dargestellt durch die Pfeile) wieder. Der Nenner ist die Summe der Zeilen. Quellen- und Senken-Zustände der Ratenkonstanten werden durch die Buchstaben am Anfang und Ende der Pfeile identifiziert. Die Doppelpfeile stehen für die Bindung von K^+ , k_{EI} . Die Gleichungen für B und I besitzen eine Michaelis-Menton-Struktur, wie es durch das Auftreten des Doppelpfeils im Zähler und in einigen, aber nicht allen Zeilen im Nenner aufgezeigt ist. Dies ergibt

$$B = \frac{constK}{K_m + K} \quad (11.15)$$

was beinhaltet, dass die Zunahme der Übergänge nach I und B mit K^+ Gegenstand der Sättigung ist. Dies kann erklären, dass das Gating in 250 und 25 mM K^+ nicht signifikant verschieden war (Tabelle 11.2).

Die Aussagen von Abb. 11.2 bis Abb. 11.4 können auch auf das EIB-Modell mit den folgenden Ersetzungen

$$k_1 = r_1 k_{IB} \quad k_{-1} = k_{BI} \quad (11.16)$$

übertragen werden, mit ähnlichen Beziehungen für Tl^+ -Bindung und Tl^+ -Freisetzung. Das Verhältnis t_1/k_1 kann aus der Berechnung der Gesamtreaktionen k_{EB} für K^+ -Bindung und Tl^+ -Bindung erhalten werden.

$$\frac{t_1}{k_1} = \frac{\frac{t_{EIT} t_{IBT}}{t_{IET} + t_{IBT}}}{\frac{k_{EI,K} k_{IB,K}}{k_{IE,K} + k_{IBK}}} \frac{T}{K} \quad (11.17)$$

Daraus wird offensichtlich, dass das EIB-Modell zum selben R führt wie in Gleichung 11.5 und daher zu denselben Kurven wie in den Abb. 11.2 bis 11.4.

Solch ein Modell kann obige Einwände 1 und 2 entkräften, die besagen, dass die Besetzung von $O = 3KF$ und $A = 4K$ nicht in direktem Zusammenhang zu den Ionenkonzentrationen der Einzelkanalmessungen steht.

Es tritt jedoch ein neues Problem auf. Dieses Verhalten der Ratenkonstanten ist nicht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Farokhi *et al.* (2000). Sie fanden, dass sich das Verhältnis k_{AO}/k_{OA} unter AMFE-Bedingungen ändert, wohingegen das obige Modell das Verhältnis k_{AO}/k_{OA} annähernd konstant lassen würde. Stattdessen würde sich k_{OG} ändern, da die Abnahme der Summe von A und O mit der Tl^+ -Bindung durch eine Zunahme des gemessenen k_{OG} beschrieben werden kann, was zu einem Strom aus dem mit K^+ verbundenen E-I-B-Makrozustand führt.

11.2.3 Modell 3: Modulation des Gatings durch Ionenbindung

11.2.3.1 Struktur des aggregierten Markov-Modells

Wenn angenommen wird, dass die Ionenbindung die Ratenkonstanten der inhärenten temperaturgetriebenen Übergänge der Proteinkonfigurationen ändert (modulierte Effekt), dann ergibt sich ein Markov-Modell, das aus verschiedenen Kopien des Basis-Schemas A-O-G-C-Z mit in jeder Kopie veränderten Ratenkonstanten besteht. In Abb. 11.8 ist der wichtige Teil dieses Modells für die (4-j) K_jT (j = 0, 1, 2, 3, 4) aggregierten Markov-Zustände dargestellt, die die vorherrschenden Zustände unter der Bedingung wiedergeben, dass der leere Zustand F selten ist (Gleichung 11.6). Die Struktur des Modells 3 ist ähnlich dem allgemeinen allosterischen Modell des CNG-Kanals, das von Ruiz und Karpen (1999) vorgeschlagen wurde, oder des Ca²⁺-aktivierten BK-Kanals (Moss und Magleby, 2001), von dem angenommen wird, dass er ähnlich dem *Chara*-Kanal ist. Die Komplexität des Modells in Abb. 11.8 ist viel höher als die in Modell 1. Jedoch kann, wie von Magleby (2001) ausgeführt wird, Komplexität manchmal zu Einfachheit führen, vor allem wenn das komplexe Modell die strukturellen Eigenschaften des Proteins in Betracht zieht.

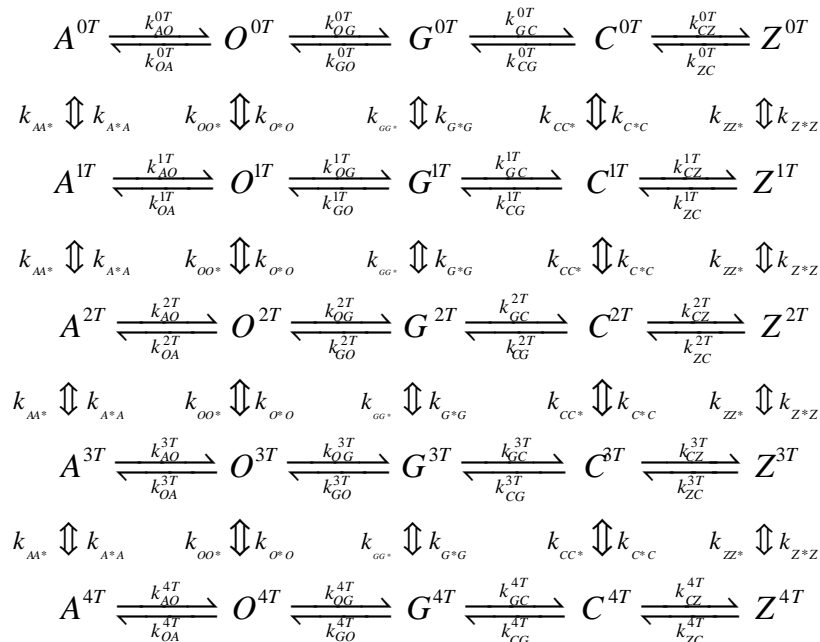
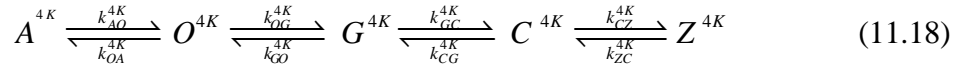
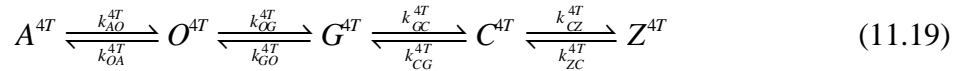


Abbildung 11.8: Aggregiertes Markov-Modell bestehend aus den fünf gleichen Grund-schemata A-O-G-C-Z. Jedes Schema bezieht sich auf einen der Zustände (4-j)K_jT der Ionenbindung (j = 0, 1, 2, 3, 4) unter der Bedingung, dass der leere Zustand F selten ist. $A^{0T} = A^{4K}$.

Im Falle reiner Lösungen ist die Darstellung ziemlich einfach. Die Ratenkonstanten, die aus der Analyse der gemessenen Zeitreihe erhalten werden, sind jeweils diejenigen des Reaktionsschemas ($A^{4K} = A^{0T}$)



und



11.2.3.2 Scheinbarer und reduzierter Einzelkanalstrom beim AMFE

In Abb. 11.9 sind der scheinbare und reduzierte Einzelkanalstrom $i_{\text{fit}}/i_{\text{sim}}$, der durch die simulierte Zeitreihe auf der Basis des A-O-G-C-Z Markov-Modells mit den Ratenkonstanten aus dem direkten Fit (Abschnitt 4.5) der gemessenen Zeitreihen in reiner K^+ -, Tl^+ - und gemischter K^+/Tl^+ -Lösung bestimmt wurde, dargestellt. Diese Zeitreihen wurden mit den gemessenen Einzelkanalströmen verglichen. Die Daten bei reiner K^+ -Lösung und am Minimum sind den vorherigen Kapiteln entnommen. Der Datenpunkt bei reiner Tl^+ -Lösung wurde von Cakan (2002), die anderen beiden Datenpunkte um das Minimum wurden durch neue Messungen bestimmt. Im Bereich des Minimums stimmen die Werte gut überein. So ist der Effekt des schnellen Schaltens nicht nur beim Minimum im AMFE erkennbar, sondern das schnelle Schalten, das zu einer Stromreduzierung führt, ist auch um das Minimum herum feststellbar.

Abb. 11.9 zeigt eine lineare Abhängigkeit des Gatings vom Tl^+/K^+ -Verhältnis im Bereich zwischen 0 K^+ und dem Minimum des AMFE. Bei den Messungen handelte es sich um Einzelkanal-Messungen (obwohl Zwei-Kanal-Aufnahmen ausgewertet wurden). Daher kann nicht angenommen werden, dass sich diese Proportionalität aus der Gesamt-Mittelung ergab (ein von der Molfraktion abhängiges Verhältnis der Kanäle in 4K, in 3KT und in anderen Zuständen), sondern nur aus der Mittelung über den Zeitbereich. Dies beinhaltet, dass Binden und Freisetzen an den allosterischen Stellen sehr viel schneller sein muss als die Übergänge zwischen den Zuständen A-O-G.

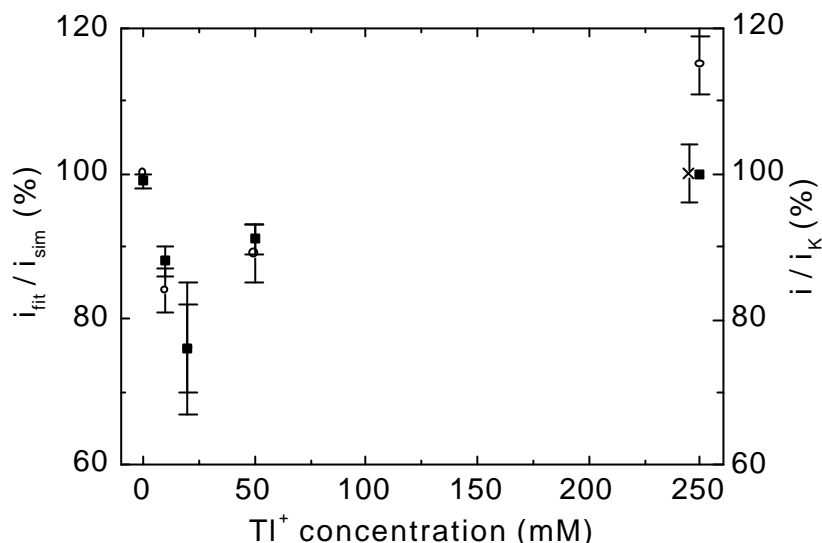


Abbildung 11.9: Darstellung des scheinbaren und reduzierten Einzelkanalstroms i_{fit}/i_{sim} (gefüllte Quadrate), der durch die simulierte Zeitreihe (10 s, $2 \cdot 10^6$ Datenpunkte) auf der Basis des A-O-G-C-Z Markov-Modells mit den Ratenkonstanten aus dem direkten Fit der gemessenen Zeitreihen bestimmt wurde. Dies wird mit den gemessenen Einzelkanalströmen (offene Kreise) verglichen. Im Bereich des Minimums stimmen die Werte gut überein. Die Abweichung bei 250 mM Tl⁺-Konzentration ist keine falsche Aussage, sondern resultiert aus dem höheren Einzelkanalstrom bei reiner Tl⁺-Lösung im Vergleich zur K⁺-Lösung. Das Kreuz gibt den Wert an, wenn $i_{fit} = i_k$ wäre. Die Daten bei reiner K⁺-Lösung und am Minimum sind den vorherigen Kapiteln entnommen. Der Datenpunkt bei reiner Tl⁺-Lösung wurde von Cakan (2002) bestimmt, die anderen beiden Datenpunkte um das Minimum sind neue Messungen. Das Ergebnis des HMM-Fits der neuen Messwerte ist in Tabelle 11.3 dargestellt. Die Standardabweichung ergibt sich aus jeweils drei bis vier Messdaten.

Die dazugehörigen Ratenkonstanten durch den Direkten-Zeitreehen-Fit um das Minimum des AMFEs sind in Tabelle 11.3 dargestellt.

$A \xrightleftharpoons[1200 \pm 200]{5230 \pm 3300} O \xrightleftharpoons[17460 \pm 4060]{84200 \pm 11300} G \xrightleftharpoons[3240 \pm 650]{4060 \pm 2040} C \xrightleftharpoons[40 \pm 20]{220 \pm 10} Z$	240 K ⁺ + 10 Tl ⁺
$A \xrightleftharpoons[2140 \pm 1200]{2850 \pm 1400} O \xrightleftharpoons[18460 \pm 5020]{74900 \pm 39000} G \xrightleftharpoons[2160 \pm 1200]{6150 \pm 3400} C \xrightleftharpoons[30 \pm 10]{230 \pm 150} Z$	200 K ⁺ + 50 Tl ⁺
$A \xrightleftharpoons[8330]{2110} O \xrightleftharpoons[11090]{12230} G \xrightleftharpoons[1180]{4500} C \xrightleftharpoons[20]{330} Z$	230 K ⁺ + 20 Tl ⁺

Tabelle 11.3: Die Ratenkonstanten des A-O-G-C-Z Markov-Modells, die durch einen Direkten-Zeitreehen-Fit bei einer Haltespannung von +80 mV bei 240 mM K⁺- + 10 mM Tl⁺-, 200 mM K⁺- + 50 mM Tl⁺- und 250 mM Tl⁺-Lösung erhalten wurden. Der dazugehörige scheinbare Einzelkanalstrom ist in Abb. 11.9 dargestellt.

11.2.3.3 Modulation der Ratenkonstanten des Markov-Modells durch Konformationsänderungen des Kanalproteins

Wenn von der Markov-Zustands-Darstellung in Abb. 11.8 ausgegangen werden kann, dann lauten die scheinbaren Ratenkonstanten zwischen A und O in Mischlösungen:

$$k_{AO} = \frac{k_{AO}^{0T} A^{0T} + k_{AO}^T A^T + k_{AO}^{2T} A^{2T} + k_{AO}^{3T} A^{3T} + k_{AO}^{4T} A^{4T}}{A^{0T} + A^T + A^{2T} + A^{3T} + A^{4T}} \quad (11.20)$$

$$k_{OA} = \frac{k_{OA}^{0T} O^{0T} + k_{OA}^T O^T + k_{OA}^{2T} O^{2T} + k_{OA}^{3T} O^{3T} + k_{OA}^{4T} O^{4T}}{O^{0T} + O^T + O^{2T} + O^{3T} + O^{4T}} \quad (11.21)$$

(Zustände mit mehr als 2T werden vernachlässigt). Die Konzentrationen A^{4K} , A^T , A^{2T} , O^{4K} , O^T , O^{2T} etc. sind durch obiges 4-Segment-Modell gegeben.

Die numerischen Konsequenzen der Gleichungen 11.20 und 11.21 stehen wahrscheinlich im Widerspruch zu den Daten aus den vorherigen Kapiteln und zu Farokhi *et al.* (2000). In einigen Aufnahmen tritt eine bis zu 100 fache Änderung in k_{AO} zwischen den Aufnahmen bei 250 mM K^+ und dem Minimum der AMFE-Kurve auf. Wahrscheinlich ist diese starke Änderung in k_{AO} nicht echt, da sich die Steady-State-Konzentrationen, die sich in Kapitel 10 ergeben (Farokhi *et al.*, 2000), von den dargestellten gemittelten Ratenkonstanten unterscheiden. Dies deutet die starke Streuung der Bestimmungen der Ratenkonstanten an. Wenn dieser Faktor allerdings mehr als 10 betragen würde, hätte dies bzgl. der Gleichungen 11.20 und 11.21 einige Konsequenzen. Die maximale Abnahme der Ratenkonstanten kann nicht größer sein als das Verhältnis $A^{4K}/(\text{alle } A)$ (im dem Fall, dass die Ratenkonstanten zwischen den Zuständen A und O mit mindestens einem gebundenen TT^+ Null sind). Daher muss A^{4K} mindestens um einen Faktor von 10 abnehmen, vom Wert in reiner K^+ -Lösung bis zum Minimum der AMFE-Kurve. Dies ist nahe am Verhalten, das in Abb. 11.3 dargestellt ist, eine größere numerische Reserve wäre aber wünschenswert.

Daher muss ein alternativer Mechanismus in Betracht gezogen werden. Es wird erwartet, dass Binden und Freisetzen an den möglichen Bindungsstellen eine sehr viel höhere Frequenz hat als die Übergänge zwischen A-O-G. In diesem Fall spürt das Protein eine mittlere Kraft für Konformationsänderungen (Abb. 11.10). Die daraus resultierende Änderung kann die Ratenkonstanten des A-O-G-C-Z-Schemas beeinflussen ohne die numerischen Einschränkungen, die durch die Gleichungen 11.20 und 11.21 gegeben sind. Jedoch kann die Beschreibung nicht länger mit Hilfe eines einzigen großen Markov-Modells erfolgen.

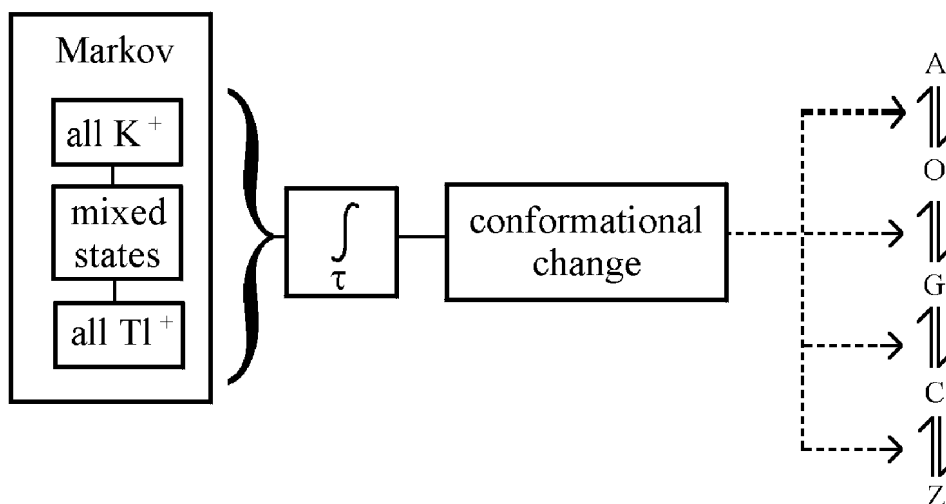


Abbildung 11.10: Auf der linken Seite sind die Markov-Modelle der allosterischen Bindungsstelle (Modell 1) bzw. der Bindungsstellen innerhalb der Pore dargestellt (Morais-Cabral *et al.*, 2001). Die durchschnittliche Besetzung der Markov-Zustände beeinflusst über einen Integrationsmechanismus (Zeitkonstante der Konformationsänderung) die Konformation des Kanalproteins. Diese Konformation moduliert die Ratenkonstanten des A-O-G-C-Z Modells des Kanal-Gatings. Somit kann die Beschreibung nicht länger mit Hilfe eines einzigen großen Markov-Modells erfolgen.

Das Modell von Abb. 11.8, modifiziert durch Abb. 11.10, entkoppelt Gating-Events und Ionenbindung und ist daher in der Lage, all die beobachteten Eigenschaften zu erzeugen:

- Unabhängigkeit der Gating-Ratenkonstanten von der K^+ -Konzentration.
- Keine Notwendigkeit zur Annahme, dass die Ratenkonstanten in reiner K^+ - und reiner Tl^+ -Lösung das Verhältnis $k_{-1,S} t_{1,1} / k_{1,1} t_{1,S}$ wiedergeben.

Trotz des Erfolgs des Modells in den Abb. 11.8 und 11.10 werden zwei Modelle diskutiert, die auf der möglichen Aktion der Ionen in der Pore basieren, da es in der Literatur viele Hinweise gibt, dass der „Foot-in-the-door“-Effekt (Kiss *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001) in Betracht gezogen werden muss.

11.3 Foot-in-the-door-Modelle

Als Alternative zu den vorherigen Liganden-Modellen werden hier zwei Foot-in-the-door-Modelle für den AMFE vorgestellt.

11.3.1 Modell 4: Direkte Wirkung auf die Besetzung

In den vorherigen Kapiteln 8 bis 10 wurde diskutiert, ob ein Hille-Schwarz-Modell (1978) das Gating erzeugen kann, das verantwortlich für die Reduktion des scheinbaren Einzelkanalstroms ist (Farokhi *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass dieses Modell die beobachtete Geschlossen-Zeit erklären kann, aber zu Offen-Zeiten führen würde, die viel zu kurz sind, da sie auf die Transferraten der Stromleitung bezogen sind, die auf einer Zeitskala auftreten, die 1000 fach schneller ist als das beobachtete Gating. Dieser Einwand kann entkräftet werden, wenn in Betracht gezogen wird, dass die Ionen in der Pore den Durchmesser kontrollieren (Kiss und Korn, 1998; Ogielska und Aldrich, 1999; Townsend und Horn, 1999; Larsson und Elinder, 2000; Loots und Isacoff, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Abschnitt 12.5). Wenn angenommen wird, dass die Besetzung der Pore mit zwei K^+ -Ionen den Radius des Selektivitätsfilters derartig anpasst, dass die Wahrscheinlichkeit, in den Filter zu gelangen, für Tl^+ um den Faktor 1000 abnimmt (und umgekehrt), dann ergeben sich Offen-Zeiten in Bereich von einigen 10 μs wie in Tabelle 10.2. gefunden wurden. Der AMFE wird erzeugt, wenn die Pore zusammenbricht und undurchlässig wird, wenn sich zwei verschiedene Ionen in der Pore befinden. Die Pore öffnet wieder, wenn durch die Statistik das richtige Ion zurück in die Pore gelangt. Solch ein Modell könnte die AMFE-Kurven in den Abb. 8.1, 11.2 und 11.9 leicht erzeugen. Jedoch weisen die Messungen, die in Verbindung zu Tabelle 10.1, 11.2 und Abb. 10.2 stehen, darauf hin, dass zwei Offenzustände involviert sind, die keine inhärente Eigenschaft des obigen einfachen Modells darstellen (Farokhi *et al.*, 2000).

11.3.2 Modell 5: Modulationseffekt der Besetzung

In diesem Fall wird ein alternativer Mechanismus angenommen, der davon ausgeht, dass das Selektivitätsfilter zwei Offen-Zustände besitzt. Aus dem Geschlossen-Zustand G weitet sich der Selektivitätsfilter zum Offen-Zustand O. Dann kann das Protein eine weitere Konformationsänderungen machen in einen Zustand A, der den Offen-Zustand weiter stabilisiert. Modell 5 basiert auf der Annahme, dass die Übergangswahrscheinlichkeit vom Zustand O in den Zustand A von der Besetzung der Pore abhängt. Falls die Pore mit zwei gleichen Ionen (K^+ - K^+ oder Tl^+ - Tl^+) besetzt ist, ist die Wahrscheinlich-

keit, dass Zustand A angenommen wird, hoch. Wenn die Pore mit verschiedenen Ionen besetzt ist, werden die Ratenkonstanten langsamer.

Kinetisch ist Modell 5 sehr ähnlich zu Modell 3 (Abb. 11.10) mit dem Unterschied, dass wahrscheinlich anstelle von vier Bindungsstellen zwei Bindungsstellen vorhanden sind. Die tatsächliche Anzahl ist unbekannt. Sie kann also vier sein, wenn zwischen der 2,4 und der 1,3 Konfiguration unterschieden wird oder wenn das Hohlraum-Ion und das externe Ion miteinbezogen werden (BernPche und Roux, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Der Unterschied zum Modell in Abb. 11.10 besteht darin, dass der Zugang zu den Bindungsstellen nicht unbegrenzt ist, da die Ionen nur von der externen oder der internen Stelle eintreten können. Die Abhängigkeit vom TI^+/K^+ -Verhältnis wird nach den Mechanismen in Abb. 11.10 eingeführt: Die Vibrationen des Proteins, die sich auf die Übergänge zwischen A, O und G beziehen, sind langsamer (Faktor 1000) als die Übergangszeiten der permeierenden Ionen. Dadurch ist die Bewegung des Proteins durch das durchschnittliche Auftreten der K^+-K^+ , K^+-TI^+ oder TI^+-TI^+ -Besetzung in der Pore kontrolliert. Dies kann zum TI^+/K^+ -Verhältnis proportional sein. Wiederum (Abb. 11.10) muss eine numerische Beschränkung wie diejenige in den Gleichungen 11.20 und 11.21 nicht notwendigerweise auferlegt werden, da die Beziehung zwischen der Proteinvibration, dem mittleren TI^+/K^+ -Verhältnis in der Pore und dem K^+/TI^+ -Verhältnis in der Lösung als nichtlinear angenommen wird.

Die Foot-in-the-door-Modelle sollen nun anhand des Na^+ -Effekts beim K^+ -Kanal weiter diskutiert werden. Wegen des geringeren Ionendurchmessers können die Na^+ -Ionen den K^+ -Kanal nach Doyle *et al.* (1998; Abschnitt 2.4) nicht passieren. Daher werden sich die folgenden Untersuchungen mit der Fragestellung beschäftigen, ob sich bei Zugabe von Na^+ -Lösung die Selektivität des Filters derart ändert, dass die Na^+ -Ionen auch den K^+ -Kanal passieren können.

12 Der Na⁺-Effekt auf den K⁺-Kanal

Na⁺-Ionen können vielfältig auf die K⁺-Kanäle wirken. Die Blockierung und der damit verbundene kleinere Einzelkanalstrom wurde in vielen Vorgängerarbeiten beobachtet (Bertl, 1989; Blunck, 1996; Hansen *et al.*, 1997; Keunecke *et al.*, 1997; Keunecke, 2000; Ogielska und Aldrich, 1999; Weise und Gradmann, 2000).

Bei Bertl (1989) wurde bei Zugabe von 125mM Natrium in Gegenwart von 125 mM KCl eine Reduktion der Leitfähigkeit des Kanals beobachtet. Bei Anwesenheit von 125 mM NaCl auf vacuolärer und cytosolischer Seite ist der Einzelkanalstrom im Vergleich zur Kontrolllösung kleiner, bei positiver Spannung tritt sogar eine negative Kennlinie auf. Das Na⁺ auf der vacuolären bzw. cytosolischen Seite hat lediglich einen Effekt auf einer Seite des Spannungsbereichs und zwar derart, dass der Effekt auftritt, wenn der Strom das Na⁺ in die Pore zieht. Vacuoläres Na⁺ wirkt somit nicht auf den Stromverlauf vom Cytosol in die Vacuole.

Der Na⁺-Block weist viele phänomenologische Gemeinsamkeiten mit dem AMFE auf: das Zusammenlaufen der scheinbaren Einzelkanalströme bei 7 °C (Farokhi, 1998; Blunck, 1996) und das scheinbare Verschwinden schneller Zeitkonstanten in Gegenwart des blockierenden Ions (Keunecke, 1995; Blunck, 1996; Hansen *et al.*, 1997). Diese Ähnlichkeiten veranlassten eine Vertiefung der Untersuchungen für den Na⁺-Block.

Ein besonderer Aspekt sind die von Weise und Gradmann (2000) gefundenen Sublevel in Gegenwart von Na⁺. Diese Art von Sublevel wurde bei Blunck (1996) nicht beobachtet. Es bestand die Vermutung, dass Sublevel eine Erscheinung sind, die auf Gating zurückzuführen ist.

Die Analyse der Zeitreihen mit Na⁺-haltiger Lösung richtete sich zuerst auf die Frage, ob schnelles Schalten auftritt. So wurde das Schaltverhalten und der Stromspannungsverlauf in einer Na⁺-freien und Na⁺-haltigen Lösung untersucht. Die Frage der Abhängigkeit von der Konzentration der Na⁺-Ionen war zuerst für die Untersuchung des schnellen Schaltens nicht relevant. Der erste Ansatz besteht darin, die Untersuchungen bei geringeren Na⁺-Konzentrationen als bei Bertl (1989) und Blunck (1996) durchzuführen.

12.1 Messmethoden und Analyse

Die Messungen und die darauf folgenden Analysen wurden für Zeitreihen, die unter den in Kapitel 11 beschriebenen Bedingungen aufgenommen wurden, durchgeführt. Die aufgezeichneten Zeitreihen wurden mit dem direkten Fit der Zeitreihen (Abschnitt 4.5) untersucht.

12.2 Strom-Spannungs-Charakteristiken des K^+ -Kanals in Na^+ -Lösung

Abb. 12.1 zeigt Strom-Spannungskurven, die in Na^+ -freier und Na^+ -haltiger (50 und 100 mM NaCl) Lösung aufgenommen wurden. Die Leitfähigkeit ist für einwärtsströmende K^+ -Ionen deutlich größer als für auswärtsströmende (eine Charakteristik des K^+ -Kanals von *Chara Corallina*, Abb. 8.2).

Bei Zugabe von 50 mM NaCl hat sich die Kurvenform und die Einzelkanalleitfähigkeit gegenüber der reinen K^+ -Lösung (200 mM KCl) nicht verändert. Bei einer Erhöhung der Natriumkonzentration auf 100 mM wurde ebenfalls keine Veränderung des Einzelkanalstroms festgestellt.

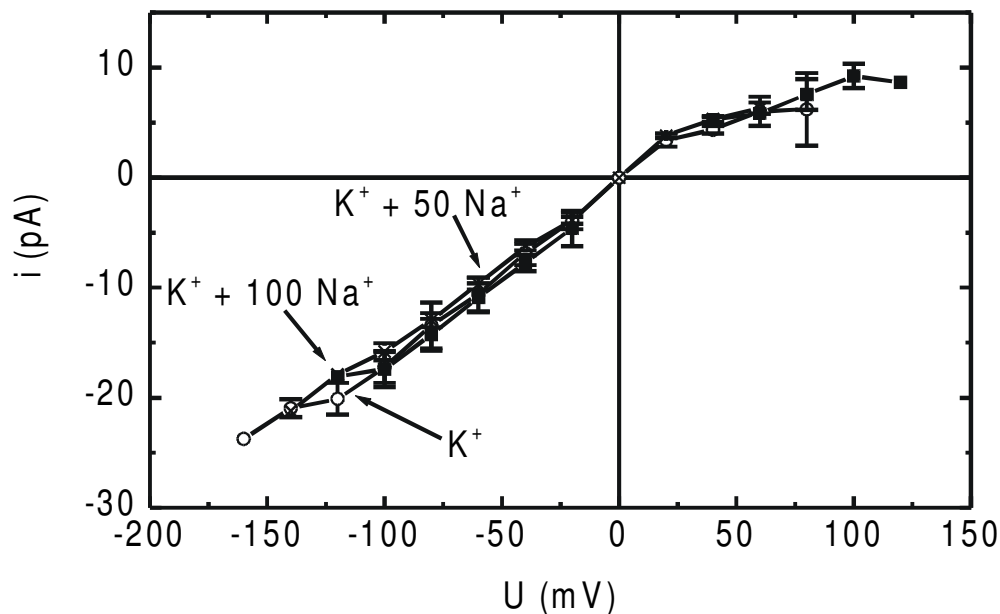


Abbildung 12.1: Die Strom-Spannungskurven zeigen keinen Blockeffekt des K^+ -Stroms bei Zugabe von Natrium. Die Einzelkanalleitfähigkeit ändert sich dadurch nicht. Die Kreise stellen die Spannungsabhängigkeit des Kaliumkanals in der Kontrolllösung (200 mM KCl + 5 mM $CaCl_2$) dar. Die Kreuze zeigen die Leitfähigkeit nach Zugabe von 50 mM NaCl, die gefüllten Quadrate zeigen die Leitfähigkeit nach Zugabe von 100 mM NaCl.

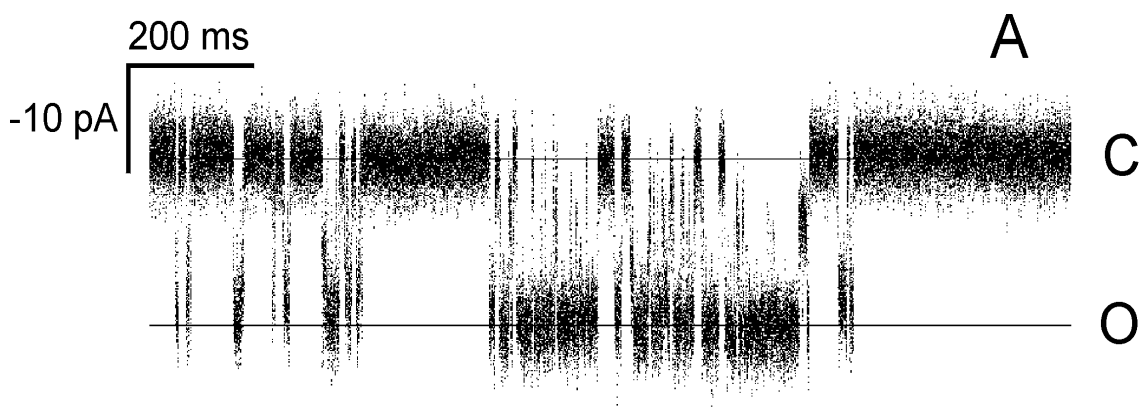
12.2.1 Nachfiltern der gemessenen Zeitreihen

Die Ergebnisse in Abb. 12.1 stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bertl (1989), Blunck (1996) und Weise und Gradmann (2000), die eine Reduzierung des Einzelkanalstroms fanden. Die Vermutung ist, dass bei den älteren Messungen schnelles Schalten vorgelegen hat, das bei den Messungen zu Abb. 12.1 durch die neuen Maßnahmen der Rauschreduzierung (Kapitel 5) und die dadurch hervorgerufene verbesserte zeitliche Auflösung (Abtastrate von 200 kHz mit einer Filterfrequenz von 50 kHz) aufgelöst wird. Ein solcher Effekt trat bereits beim Cs⁺-Block auf (Draber und Hansen, 1994; Abschnitt 8.5). Es stellt sich somit die Frage, ob bei schlechterer zeitlicher Auflösung auch bei den Daten in Abb. 12.1 eine scheinbare Reduzierung des Einzelkanalstroms sichtbar wird. Daher werden die Zeitreihen mit einem gleitenden Mittelwertfilter (Gleichung 12.1) nachgefiltert (Huth, 1999). Er ersetzt die Abtastpunkte $f(t)$ durch:

$$f^*(t) = \frac{1}{2N+1} \sum_{n=-N}^N f(t+n) \quad (12.1)$$

wobei N die Filtereinstellung in den Abtastpunkten bedeutet.

Abb. (12.2) zeigt die Zeitreihe mit der ursprünglichen 50 kHz Filterung (Abb. 12.2A) und nach Nachfilterung mit 5 kHz (Abb. 12.2B). Der Einzelkanalstrom wurde durch diese Nachfilterung im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Cs⁺ (Draber und Hansen, 1994) nicht verändert. Das bedeutet, dass die Reduzierung der zeitlichen Auflösung nicht zur Änderung der Leitfähigkeit des Kanals führen würde.



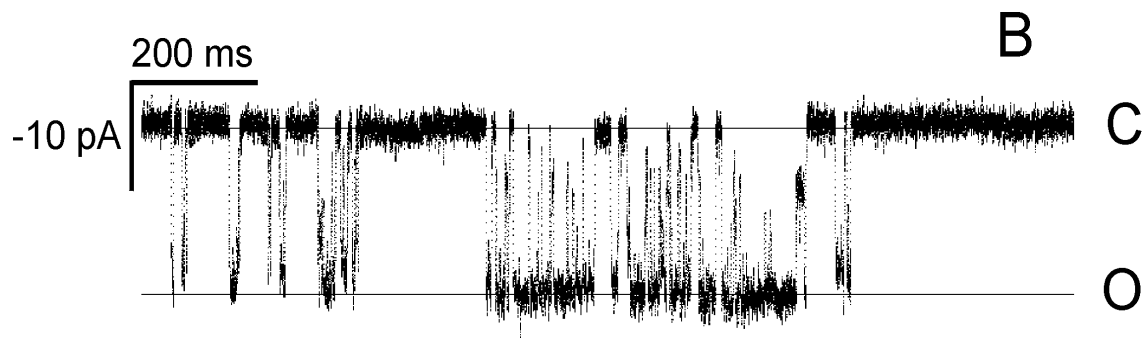


Abbildung 12.2: Einzelkanalstrom (300 000 Datenpunkte) des K^+ -Kanals von *Chara* in Excised-Patch-Konfiguration in einer Lösung von 200 mM KCl + 100 mM NaCl + 5 mM $CaCl_2$ bei einem Haltepotential von $V = -80$ mV. Die Filterfrequenz beträgt bei (A) 50 kHz und bei (B) 5 kHz. Der Einzelkanalstrom nimmt durch die Reduzierung der zeitlichen Auflösung nicht ab. C und O auf der rechten Seite stellen die jeweiligen Niveaus dar (C = geschlossen, O = ein Kanal geöffnet). Der C-Zustand stellt das Nullniveau dar.

12.3 Bestimmung der Ratenkonstanten durch einen direkten Fit der Zeitreihen

Aus den Erfahrungen für die Bestimmung der Ratenkonstanten beim AMFE (Kapitel 9 und 10) werden die Ratenkonstanten des dazugehörigen Markov-Modells mit dem selben Modell wie beim AMFE (O-O-C-C-C) mit Hilfe des direkten Fits der Zeitreihen (HMM-Zeitreihenfit, Abschnitt 4.5) gefittet.

Da bei diesen Messungen der Dagan 3900 A als Patch-Clamp-Verstärker verwendet wird, bei dem die Spannung am Kondensator in bestimmten Abständen entladen werden muss (Abschnitt 3.2), entstehen bei der Entladung kleine Werte, die wegen der logarithmischen Berechnung des Likelihoods den Fit scheitern lassen. Deshalb müssen diese Werte vor dem Start des Direkten-Zeitreihen-Fits aus der Zeitreihe herausgeschnitten werden.

Aus den Ratenkonstanten der gefitteten Zeitreihen werden dann, wie in den Kapiteln 9 und 10, Zeitreihen simuliert und aus den simulierten Zeitreihen die Offen-Kanal-Ströme bestimmt. Es wurde nur eine unwesentliche Reduktion (maximal 3%) des Offen-Kanal-Stroms i_{fit}/i_{sim} in den Zeitreihen bei Zugabe von 100 mM Na^+ -Lösung festgestellt (Abb. 12.3), die mit den angefitteten Ratenkonstanten und einem Offen-Kanal-Strom i_{sim} simuliert wurden (Abschnitt 4.6). Bei der Betrachtung der Ratenkonstanten mit 100 mM Na^+ -Lösung ergeben sich keine gravierenden Unterschiede zu den Ratenkonstanten in reiner K^+ -Lösung (Abb. 10.1) Besonders die Übergangswahrscheinlichkeiten vom Zustand O in den Zustand A sind bei allen Spannungen größer als der Übergang vom Zustand A in den O-Zustand (wie bei reiner K^+ -Lösung). Somit bleibt der Kanal auch

hier länger im offenen Zustand. Damit ist die Bestimmung des Einzelkanalstroms glaubwürdig.

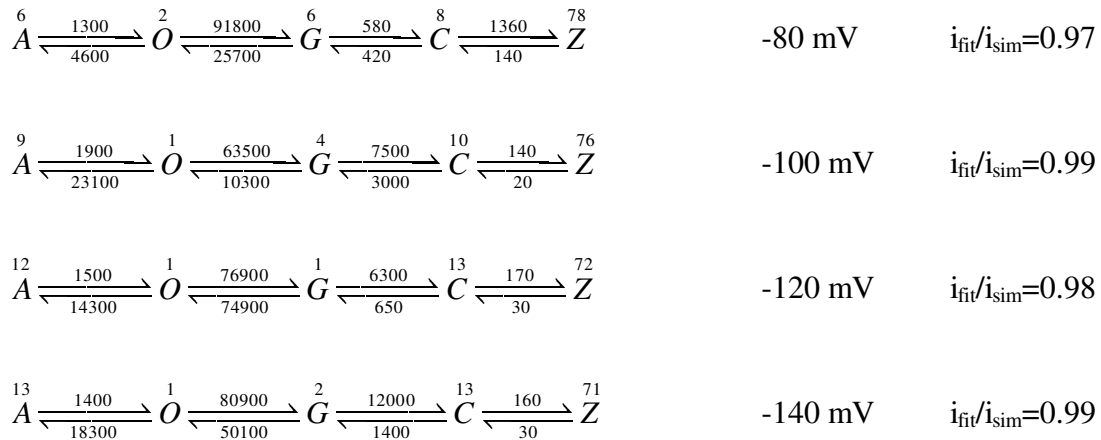


Abbildung 12.3: Die Einzelkanal-Ratenkonstanten (s⁻¹), die sich aus dem direkten Fit von Zeitreihen (2·10⁶ Datenpunkte) bei -80, -100, -120 und -140 mV in 200 mM KCl + 100 mM NaCl + 5 mM CaCl₂ ergaben. Die Zahlen über den Zuständen geben die Besetzungswahrscheinlichkeiten in Prozent der gesamten Zeit des Intervalls an. Rechts sind die Verhältnisse des Einzelkanalstroms dargestellt, die mit den angefiteten Ratenkonstanten und einem Offen-Kanalstrom i_{sim} simuliert wurden.

Der Kanal verhält sich so, als ob die Na⁺-Ionen keinen Effekt auf das Schaltverhalten und die Blockierung des Kanals haben. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass ein einfaches „foot-in-the-door“-Modell des Gatings vorliegt, das besagt, dass der Kanal mit K⁺-Ionen innerhalb der Pore nicht inaktivieren kann (Lu *et al.*, 2001). Das bedeutet für diese Messungen, dass die hohe K⁺-Konzentration nicht zulässt, dass die Na⁺-Ionen das Schaltverhalten des K⁺-Kanals beeinflussen. So wurde die Na⁺-Konzentration auf 125 mM erhöht und die K⁺-Konzentration auf 125 mM reduziert. Damit soll untersucht werden, ob sich durch weitere Hinzugabe von Na⁺ ein Einfluss auf die Leitfähigkeit ergibt. Es sind somit die gleichen Bedingungen, unter denen Blunck (1996) gemessen hat.

12.4 Wirkung der Änderung der Na⁺-Konzentration auf den Einzelkanalstrom des K⁺-Kanals und sein Kooperativitätsverhalten

Abb. 12.4 zeigt eine Zeitreihe, die bei 125 mM KCl und 125 mM NaCl (+ 5 mM CaCl₂) bei einem Haltepotential von -120 mV gemessen wurde. Diese Zeitreihe kann in zwei

Bereiche (B_{Na} und B_K) unterteilt werden. Der Pfeil in Abb. 12.4 soll den Zeitpunkt andeuten, an dem sich die beiden Bereiche voneinander trennen. Der Einzelkanalstrom ist bis zum Zeitpunkt der Pfeilmarkierung (Bereich B_{Na}) kleiner als der Einzelkanalstrom danach (Bereich B_K). Es ist an dieser Stelle ein Sprung in der Zeitreihe erkennbar, der eine Änderung des Einzelkanalstroms mit sich bringt, der andeutet, dass sich eine Konfigurationsänderung des Kanals ergeben hat. Diese Beobachtungen traten ausschließlich in der vorgegebenen Konzentration von 125 KCl und NaCl auf.

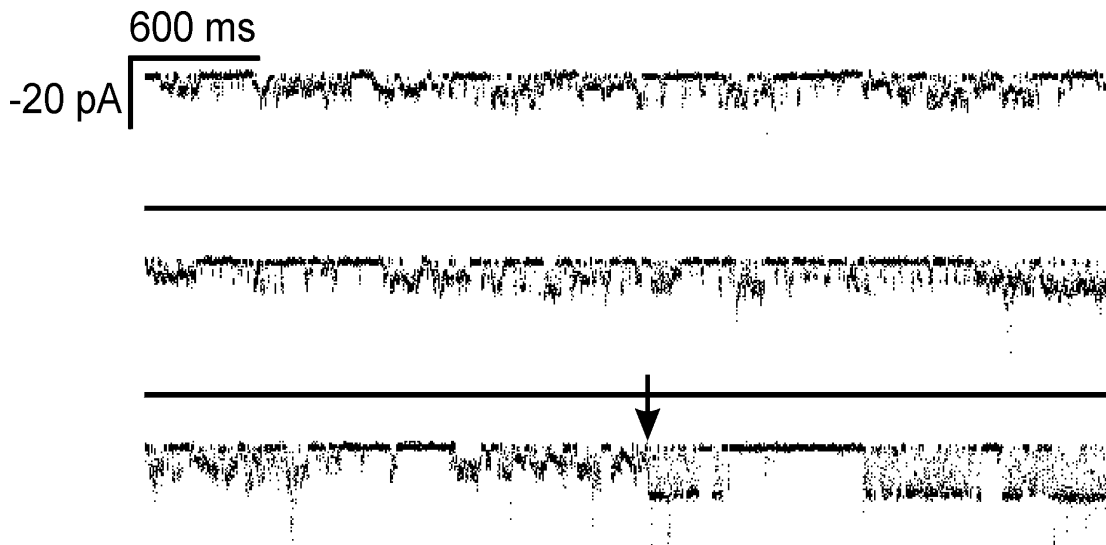


Abbildung 12.4: Gemessene Zeitreihe des Stroms (1 500 000 Datenpunkte) vom Tonoplasten Vesikel von *Chara* in Excised-Patch-Konfiguration in einer Lösung von 125 mM KCl + 125 mM NaCl + 5 mM $CaCl_2$ bei einem Haltepotential von $U = -120$ mV. Die Zeitreihe wird hier in zwei Bereiche mit unterschiedlichen Einzelkanalströmen unterteilt. Der erste Bereich (B_{Na}) mit dem kleineren Einzelkanalstrom und der zweite Bereich (B_K) mit dem größeren Einzelkanalstrom. Der Pfeil markiert die Trennungsstelle der beiden Bereiche.

In Abb. 12.5 wird die Spannungsabhängigkeit des Einzelkanalstroms für die beiden Bereiche B_{Na} und B_K in 125 mM KCl und 125 mM NaCl dargestellt. Die Einzelkanalströme für die reine K^+ -Lösung entsprechen den selben Werten wie der Einzelkanalstrom im Bereich B_K entsprechend Abb. 12.1 (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet). Da die KCl-Konzentration kleiner ist, ist der Einzelkanalstrom im Bereich B_K und bei reiner K^+ -Lösung kleiner als in Abb. 12.1.

Es zeigt sich, dass der reduzierte Einzelkanalstrom im Bereich B_{Na} nur für den Einwärtsstrom auftritt. Im Auswärtsstrom entstehen keine unterschiedlichen Leitfähigkeitsbereiche, trotz einer symmetrischen Na^+ -Lösung. Dies ist beim AMFE mit Tl^+ -Lösung anders (Abschnitt 8.3). Unter diesen Bedingungen haben die Tl^+ -Ionen auf beiden Seiten eine Stromreduzierung bei symmetrischer Lösung verursacht (Abb. 8.2).

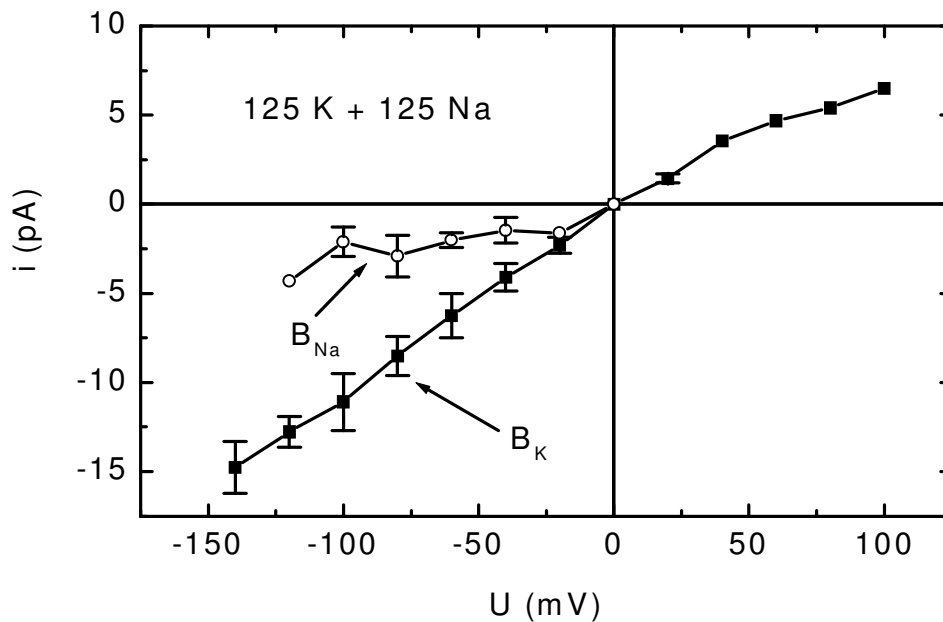


Abbildung 12.5: Strom-Spannungskurven für die unterschiedlichen Leitfähigkeitsbereiche im K⁺-Kanal bei Zugabe von 125 mM NaCl. In der Messlösung befanden sich jeweils symmetrisch 125 mM KCl + 125 mM NaCl + 5 mM CaCl₂. Die Kreise stellen den Einzelkanalstrom des Kanals im Bereich (B_{Na}) und die gefüllten Quadrate den Einzelkanalstrom im Bereich (B_K) aus Abb. 12.4 dar.

12.4.1 Getrennte kinetische Untersuchung der Bereiche B_K und B_{Na}

Es stellt sich die Frage, ob der Bereich B_{Na} nur auf das Gatingverhalten und damit verbundenes schnelles Schalten zurückzuführen ist oder ob andere Ursachen dafür verantwortlich sind. Solch spontane Änderungen des K⁺-Kanals in *Chara Corallina* wurden auch von Draber *et al.* (1993) gefunden. Die Analyse zeigt bei Draber *et al.* (1993), dass sich die Offenwahrscheinlichkeit durch Kooperativität spontan ändert. Sie wirkt somit auch auf den Gesamtstrom des Kanals. Die Ursache für diese Konfigurationsänderung lag in der langsamsten Ratenkonstante des Markov-Modells. Diese langsame Ratenkonstante wurde sprunghaft bei allen Kanälen gleichzeitig verändert. Auch bei Wang *et al.* (2000) änderte sich die Kinetik des Einzelkanalstroms abrupt. Dies führte auch zu einer Änderung der Offenwahrscheinlichkeit. Die Beobachtungen bei der Na⁺-Messung sind andere (Änderung der Einzelkanalleitfähigkeit statt Änderung der Offenwahrscheinlichkeit), aber die Spontaneität der Änderung ist bei beiden Phänomenen gleich.

Um zu sehen, welche Übergangsrate des Gating-Modells für die Änderung der Leitfähigkeit verantwortlich ist, wird folgende Analyse durchgeführt: Die beiden Bereiche (B_K und B_{Na}) werden abgeschnitten und getrennt voneinander mit dem Direkten-

Zeitreihen-Fit angenähert. Die Analyse für jeden Bereich der Zeitreihe erfolgt, wie oben erwähnt bei 100 mM NaCl (Abschnitt 12.3). Das Ergebnis der Ratenkonstanten für den Zustand A-O-G-C-Z ist in Abhängigkeit der Haltespannung für den Einwärtsstrom in Abb. 12.6 dargestellt.

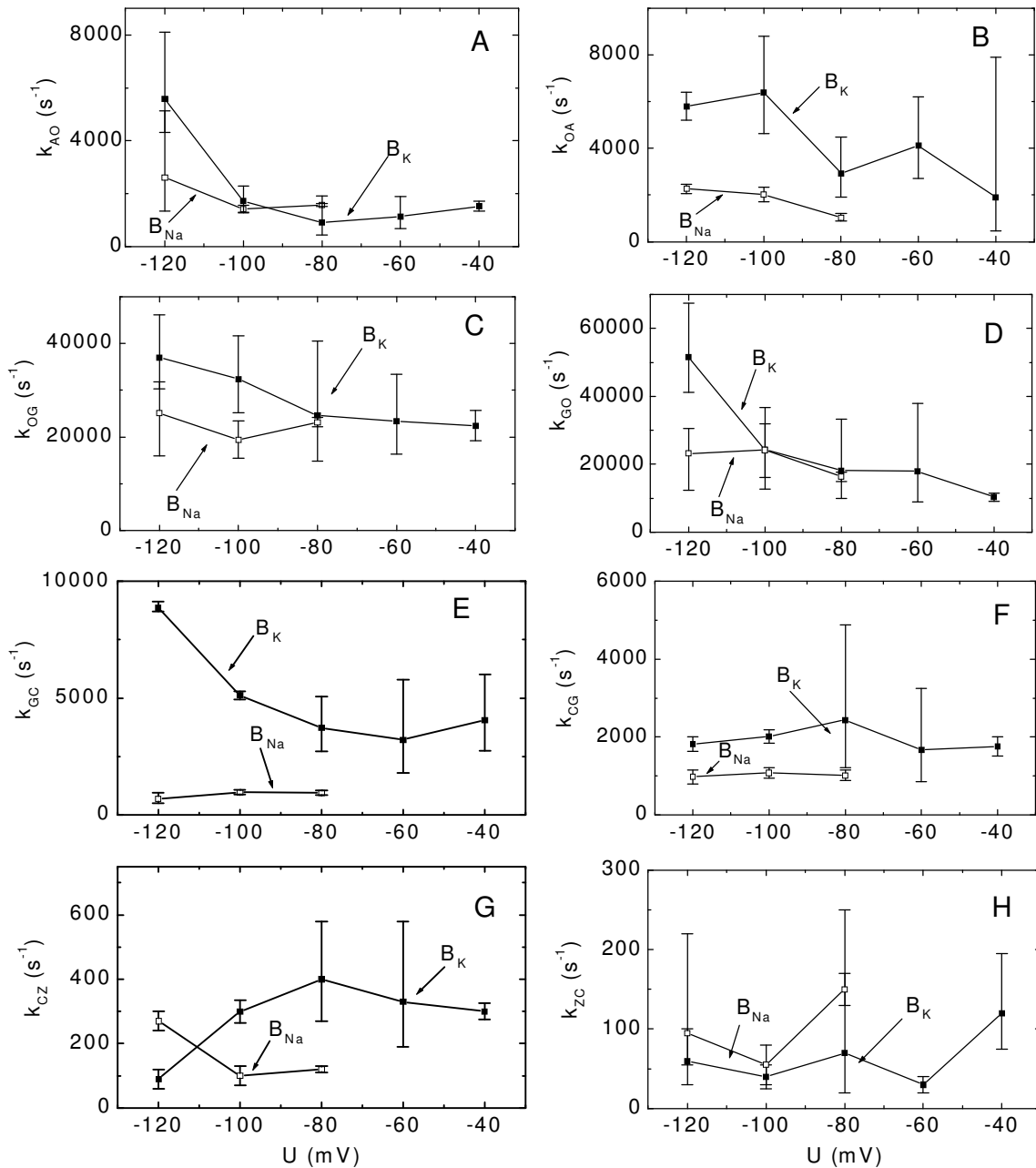


Abbildung 12.6: Vergleich der verschiedenen Ratenkonstanten aus dem Direkten-Zeitreihen-Fit für den Bereich (B_K) und den Bereich (B_{Na}) aus dem Markov-Modell A-O-G-C-Z im negativen Spannungsbereich. Wegen der großen Streuung bei der Bestimmung der Ratenkonstanten des Markov-Modells werden die geometrischen Mittelwerte mit deren Fehlern (geometrischer Faktor) dargestellt.

Alle Ratenkonstanten des Markov-Modells im Bereich B_{Na} sind spannungsunabhängig, aber die Ratenkonstanten k_{OA} , k_{OG} , k_{GO} und k_{GC} für den Bereich B_K nehmen mit Zunahme der negativen Spannung zu, und k_{CZ} nimmt ab. Aus diesen Ratenkonstanten wird, wie im vorherigen Abschnitt 12.3 beschrieben, die Einzelkanalstromreduzierung mit Hilfe von Simulationen der Zeitreihen aus den gefitteten Ratenkonstanten bestimmt. Das Ergebnis dieser Analyse ist für die Spannungen -80, -100 und -120 mV in Tab. 12.1 dargestellt. Es wird deutlich, dass nicht nur für den Bereich B_K keine Einzelkanalstromreduzierung festgestellt wird, sondern auch im Bereich B_{Na} ist nur eine Stromreduzierung von 3 bis 7% beobachtet worden. Dies kann die starke Abnahme der Einzelkanalleitfähigkeit in Abb. 12.5 nicht erklären.

Nachdem die Reduzierung des scheinbaren Einzelkanalstroms durch schnelles Schalten als Ursache für den kleineren Einzelkanalstrom im Bereich B_{Na} ausgeschlossen ist, stellt sich die Frage, was die Stromreduzierung in Abb. 12.5 bedeutet. Dafür werden nicht nur die Ratenkonstanten (Abb. 12.6), die den absoluten Wert des Übergangs angeben, im Verhältnis der Haltespannung dargestellt, sondern auch die daraus resultierenden Besetzungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Zustände des Markov-Modells A-O-G-C-Z (Abschnitt 4.7). Diese entsprechen den relativen Hin- und Rückreaktionen der Übergänge und sind in Abhängigkeit der Haltespannung aufgetragen (Abb. 12.7).

U (mV)	-80	-100	-120
$i_{\text{fit}}/i_{\text{sim}}$ für B _K	1.00	1.00	1.00
$i_{\text{fit}}/i_{\text{sim}}$ für B _{Na}	0.95 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.93 ± 0.02

Tabelle 12.1: Reduktion des Offen-Kanal-Stroms $i_{\text{fit}}/i_{\text{sim}}$ in einer Zeitreihe bei verschiedenen Haltespannungen, die mit den Durchschnittswerten der Ratenkonstanten und einem Offen-Kanal-Strom i_{sim} simuliert wurde. Für die restlichen Haltespannungen im Bereich B_K ($U = -40, -60$ und -140 mV) wurde ebenfalls keine Änderung des Offen-Kanal-Stroms festgestellt.

Die Ratenkonstanten k_{OA} und k_{OG} unterscheiden sich für die beiden Bereiche B_{Na} und B_K. Sie sind im Bereich B_{Na} kleiner. Dadurch ist die Besetzungswahrscheinlichkeit des Zustands O für den Bereich B_{Na} größer.

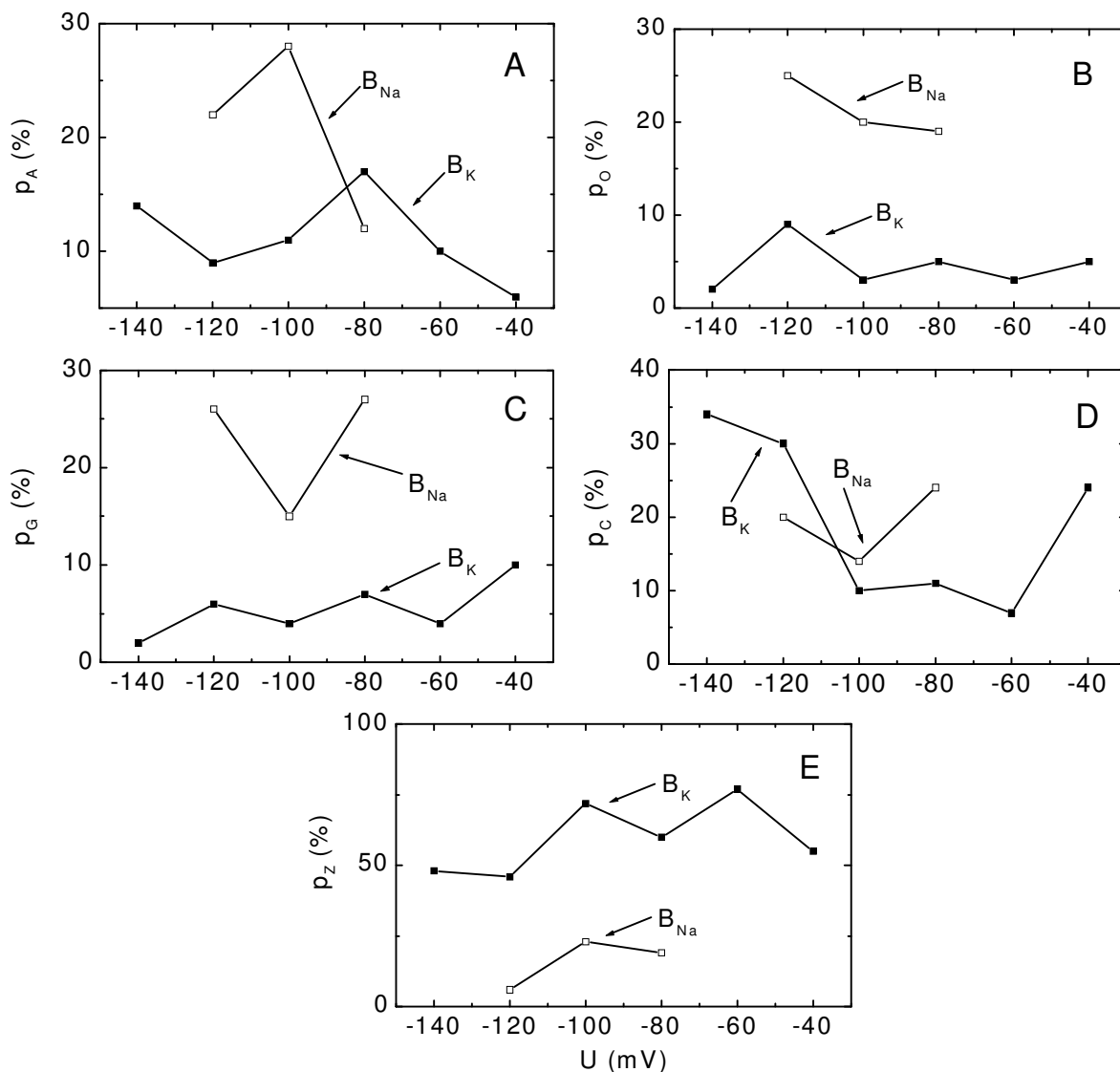


Abbildung 12.7: Besetzungswahrscheinlichkeiten in den Zuständen A, O, G, C und Z für die Bereiche B_K und B_{Na} aus dem Markov-Modell A-O-G-C-Z im negativen Spannungsbereich.

Die größte unterschiedliche Ratenkonstante für die beiden Bereiche B_K und B_{Na} ist jedoch die Ratenkonstante k_{GC} (Abb. 12.6E), die indirekt für die unterschiedlichen Besetzungswahrscheinlichkeiten des Zustands Z verantwortlich ist (Abb. 12.7E). k_{GC} ist für den Bereich B_{Na} kleiner als im Bereich B_K , was dazu führt, dass der Zustand Z seltener besetzt wird für B_{Na} . Der Zustand Z nimmt für beide Bereiche B_{Na} und B_K mit Zunahme der negativen Spannung ab. Es zeigt sich, dass sich der langsamste Zustand (der Zustand, in dem sich der Kanal am häufigsten aufhält) in den beiden Bereichen am deutlichsten unterscheidet. Dieses Ergebnis stimmt somit mit den Ergebnissen von Draber *et al.* (1993) gut überein. Bei Draber *et al.* (1993) unterscheiden sich die beiden Konfigurationen mit unterschiedlichen Offenwahrscheinlichkeiten in der langsamsten Ratenkon-

stante. Somit ist auch der langsamste Zustand mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit besetzt. Das bedeutet aber auch, dass das schnelle Schalten nicht für die unterschiedlichen Einzelkanalleitfähigkeiten des K⁺-Kanals bei Zugabe von 125 mM NaCl (Abb. 12.5) verantwortlich sein kann. Somit bleibt die Frage, was die Ursache für die unterschiedlichen Leitfähigkeiten des K⁺-Kanals ist.

Was bei Draber *et al.* (1993) nicht beobachtet wurde, ist die höhere Besetzung der Zustände O und G. Damit erhöht sich der Anteil der schnellen Schaltereignisse im B_{Na}-Bereich, ohne dass dadurch der Einzelkanalstrom verändert wird. Dieser Unterschied zwischen dem B_K- und B_{Na}-Bereich in Abb. 12.4 wird daran erkannt, dass im B_K-Bereich lange Pausen auftreten (hohe Besetzung von Z), während im B_{Na}-Bereich das schnelle Schalten durchgehender auftritt.

12.5 Neuere Ergebnisse aus Strukturuntersuchungen als mögliche Erklärung für den beobachteten Na⁺-Effekt

Es gibt viele Arbeiten, in denen sich die Selektivität des Kaliumkanals bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen oder bei Anwesenheit von Na⁺-Ionen ändert. Zhou *et al.* (2001) untersuchten die Gestalt des Selektivitätsfilters des KcsA-Kanals bei geringerer K⁺-Konzentration (Abb. 12.8). Bei geringerer K⁺-Konzentration (3 mM K⁺) sind weniger Ionen im Selektivitätsfilter vorhanden, d.h. nicht alle Bindungsstellen sind von einem K⁺-Ion besetzt. Dadurch nehmen Val 76 und Gly 77 (vom GYG-Motiv des KcsA-Kanals) eine komplett neue Gestalt an. Das Val 76 Carbonyl ist nicht mehr in Richtung der Pore zu einem K⁺-Ion orientiert, sondern mit einem Wasserstoff von einem Wassermolekül außerhalb der Pore gebunden. Dieses Wasser geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amid von Gly 77 an eine benachbarte Untereinheiten ein. Das α -Carbon des Gly 77 wird demzufolge einwärts gedreht und verschließt die Pore (Sanduhrform). Diese niedrige K⁺-Konzentration erzeugt einen nicht leitfähigen Zustand des Selektivitätsfilters, da der Kanal unmittelbar schließt. Der Durchmesser der Pore bricht zusammen. Das bedeutet, dass der Kanal zwei unterschiedliche Konformationen hat: bei geringerer K⁺-Konzentration ist er nicht leitfähig, bei hoher K⁺-Konzentration ist er leitfähig.

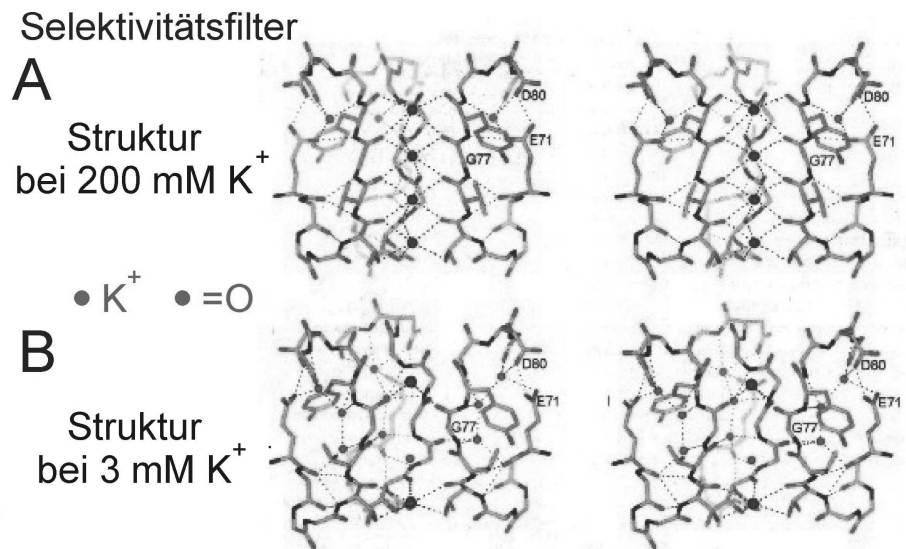


Abbildung 12.8: Struktur des Selektivitätsfilters bei hohen und niedrigen K^+ -Konzentrationen. (A) Bei hoher K^+ -Konzentration sind alle vier Positionen im Selektivitätsfilter mit K^+ -Ionen besetzt und von Sauerstoffatomen umgeben. Die Struktur der Selektivität ist derartig, dass die K^+ -Ionen durchkommen. (B) Bei 3 mM K^+ -Konzentration sind nur die Position 1 und 3 von einem K^+ -Ion besetzt. Dadurch orientiert sich Val 76 und Gly 77 nicht mehr in Richtung der Pore zu einem K^+ -Ion, sondern zu einem Wasserstoff von einem Wassermolekül außerhalb der Pore. Dieses Wasser geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amid von Gly 77 an eine benachbarte Untereinheiten ein. Das α -Carbon des Gly 77 wird demzufolge einwärts gedreht und verschließt die Pore (Sanduhrform). So ist der Kanal bei niedrigen K^+ -Konzentrationen nicht leitfähig (Zhou *et al.*, 2001).

Es gibt K^+ -Kanäle, die nicht nur bei reiner Na^+ -Konzentration Natrium-leitfähig sind, sondern auch bei geringeren Konzentrationen von K^+ -Ionen, wie z. B. der Kv 2.1 Kanal (Ogielska und Aldrich, 1998; Kiss und Korn, 1998) im C-inaktivierten Zustand. Der Shaker-Kanal hingegen leitet auch bei fortgeschrittener C-Typ-Inaktivierung Natrium nur in Abwesenheit von Kaliumlösung. Der Shaker-Kanal hat daher eine hohe Kaliumaffinität, und so nimmt die Natrium-Leitfähigkeit des Kanals bereits bei Hinzugabe von einigen μM K^+ -Konzentration ab. Bei höheren K^+ -Konzentrationen ist der Kanal dann für K^+ -Ionen leitfähig. Dies ist ein AMFE, bei dem das Minimum der Leitfähigkeit bei sehr geringen K^+ -Konzentrationen liegt. Durch die Mutation (A463C) in S6 wird die scheinbare Kaliumaffinität von μM in mM Bereich vermindert und somit wird der Shaker Kanal, wie der Kv 2.1, auch bei K^+ -Konzentrationen im mM Bereich Natrium-leitfähig. Nach einer Hypothese von Ogielska und Aldrich (1999) bilden die Aminosäuren T445, W434 und W435 eine Manschette (cuff), die dem eigentlichen Selektivitätsfilter (GYG) als Stützgerüst dient. Durch Veränderung dieser Manschette passt sich der Porendurchmesser bei Besetzung der C-Inaktivierungs-Bindungsstelle mit K^+ sich dem K^+ - und sonst dem Na^+ -Ionenradius an. Diese Art von Beobachtungen führten zum

einfachen „food-in-the-door“-Modell des Gatings, das besagt, dass der Kanal mit Ionen innerhalb der Pore nicht inaktivieren kann (Lu *et al.*, 2001; Abschnitt 11.1 und 11.3). Überraschend dabei ist, dass die Änderung der K⁺-Affinität des Shaker-Kanals durch die Mutation in S6 erfolgt ist und nicht durch Mutationen direkt im P-Loop. Dies bedeutet, dass die Verknüpfung (Brücke) zwischen dem S6-Segment (A463) und dem P-Loop (an V443, das neben GYG liegt; Abschnitt 2.4) die Selektivität des Kanals direkt beeinflusst.

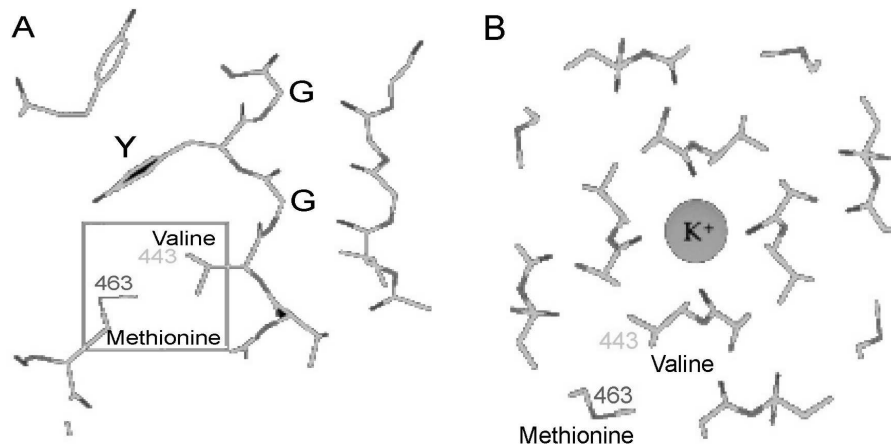


Abbildung 12.9: Die Mutation an der Stelle 463 in S6 wirkt direkt auf die Pore. Die Kristallstrukturanalysen von KcsA-K⁺-Kanal wurden für den Shaker-Kanal übernommen. Methionin und Valin werden in den Darstellungen optisch hervorgehoben. (A) Eine seitliche Sicht der Wechselwirkung zwischen den Seitenketten innerhalb einer Untereinheit (im Rechteck dargestellt). Die GYG Aminosäuren dienen als Orientierung. (B) Die Darstellung von oben zeigt die Wechselwirkung von Methionin und Valin und allen vier Untereinheiten. Es wird deutlich, wie Wechselwirkungen von S6 mit dem P-Loop die Leitfähigkeit beeinflussen. Das durchgehende K⁺-Ion ist in der Mitte dargestellt (Ogielska und Aldrich, 1999).

Die Rolle von Brückenbindungen am P-Loop wurde direkt in den Ergebnissen von Larson und Elinder (2000) dargestellt. Es wird gezeigt, dass das Glutamat E418 am Ausgang des S5-Segments mit dem Val 451 und Gly 452 am Ausgang des S6-Segments über Wasserstoffbrückenbindung verbunden ist. Da der P-Loop einen Ring bildet, sind diese Aminosäuren benachbart, obwohl sie in verschiedenen Segmenten liegen (Abb. 12.10). Die Brücke E418-G452 führt zu einer Stabilisierung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Durch die Mutation E418C bricht der Kanal zusammen. Da Cystein ungeladen ist, werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen 418C und G452 gebrochen. So rutscht Pro 450 aus der Pore und führt zum Zusammenziehen der aromatischen Manschette und Verengung der Pore. Durch eine Mutation von G452C und die Einführung einer Disulfid-Bindung zwischen 452C und 418C wird die Konformation des Kanals wieder stabilisiert. Das E418 steht auch in Zusammenhang mit der S4-Helix. Die S4-Helix, die sich mit der Spannung dreht (Bezannilla, 2000;

Abschnitt, 2.4), kann damit auch Wasserstoffbrücken zwischen E418 und V451 und G452 brechen (Abb. 12.10B), und zur Verengung der Pore führen. Durch diese Verengung besteht die Möglichkeit, dass Na^+ -Ionen für den Selektivitätsfilter passend werden, und statt K^+ -Strom Na^+ -Strom fließt.

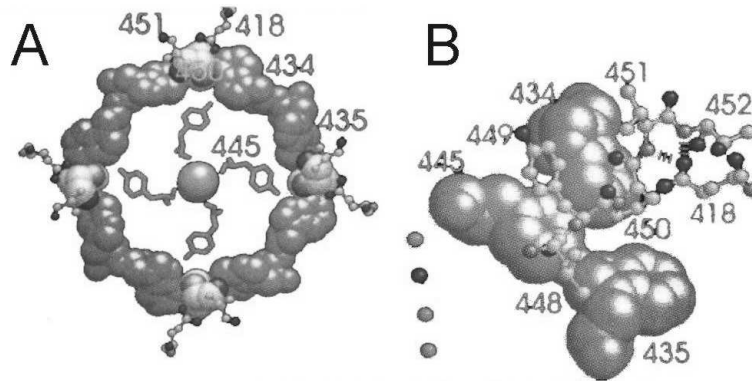


Abbildung 12.10: (A) Eine Darstellung der aromatischen Manschette (cuff), die Pro 450 enthält. Es wird deutlich, dass E418 benachbart zu V451 liegt. Die Manschette ist die Verankerung der vier Y445, die einen Ring bilden, der für die Selektivität des Filters verantwortlich ist. Dieser Ring bestimmt den Abstand zu den permeierenden Ionen (Doyle *et al.*, 1998). Die gelbe Kugel in der Mitte stellt ein K^+ -Ion dar. Die Perspektive der Abbildung ist von der Außenseite des Kanals.

(B) In der Darstellung wird deutlich, dass E418 mit G452 über eine Wasserstoffbrückenbindung in Wechselwirkung tritt. Diese Wechselwirkung hält den Offenzustand der Pore stabil. Fällt diese Wechselwirkung weg, wird die Pore eng, da P450 die Verankerung für Y445 ist. Die K^+ -Ionen und die Wassermoleküle sind auf der linken Seite der Abbildung dargestellt (Larson und Elinder, 2000).

12.5.1 Bedeutung dieser Untersuchungen in Bezug auf den Na^+ -Effekt bei *Chara*

Die oben erwähnten Untersuchungen machen deutlich, dass der Selektivitätsfilter nicht starr ist, sondern sich verändern kann. Die Veränderungen im Durchmesser des Selektivitätsfilters sind dafür verantwortlich, dass auch andere Ionen außer den K^+ -Ionen den Kanal passieren können. So besteht die Möglichkeit, dass die Unterschiede in den Einzelkanalströmen in den beiden Bereichen B_K und B_{Na} darauf beruhen, dass spontane Änderungen im Kanal den Selektivitätsfilter des Kanals verändern und so der K^+ -Kanal für Na^+ -Ionen durchlässig wird. Diese spontanen Änderungen des Selektivitätsdurchmessers können z. B. darin begründet sein, dass sich bei Abwesenheit von K^+ -Ionen die Pore verkleinert und dadurch für die Na^+ -Ionen passierbar wird (Foot-in-the-door-

Prinzip). Das bedeutet: Solange sich keine K⁺-Ionen in der Pore aufhalten, wird der Selektivitätsdurchmesser den Na⁺-Ionen angepasst, bis sich erneut K⁺-Ionen in der Pore befinden (Abb. 12.8). Der Porendurchmesser ist, wie oben beschrieben, nach Zhou *et al.* (2001) von der Ionenbesetzung in der Pore abhängig. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass der Pro 450 spontan aus der aromatischen Manschette rutscht, und sich die Pore verengt. Diese Verengung könnte dazu führen, dass der Kanal für K⁺-Ionen sperrt und Na⁺-Ionen durchlässt. Es können auch andere spontane Ursachen für dieses Phänomen vorliegen.

Da bis jetzt noch keine gesicherten Erkenntnisse über die molekulare Struktur des dominierenden K⁺-Kanals der Grünalge *Chara corallina* vorliegt (Abschnitt 3.1), ist es nicht möglich, die Frage zu beantworten, wie der Selektivitätsmechanismus des K⁺-Kanals funktioniert. Dafür müssen Mutationen für den Kanal durchgeführt werden. Allein mathematische Analysen reichen nicht aus.

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist das Kooperativitätsverhalten des K⁺-Kanals. Eine mögliche Interpretation für Kooperativitätsverhalten kann die Vorstellung von Ansammlungen von Kanälen sein, welche in der Membran nahe miteinander verbunden sind. Strukturelle Änderungen eines Kanals, wie eines der Beispiele, (Ogielska und Aldrich, 1998, 1999; Larson und Elinder, 2000; Zhou *et al.*, 2001) die im vorherigen Abschnitt erwähnt wurden, können zu strukturellen Änderungen der benachbarten Kanäle führen. Die Änderung der Offenwahrscheinlichkeit bei Draber *et al.* (1993) kann hier auch vorliegen. Die Kanäle ändern ihre Struktur und werden für K⁺-Ionen nicht mehr durchlässig. Aber die Struktur lässt danach Na⁺-Ionen, da es sich nicht um einen Na⁺-Kanal handelt, mit einer kleineren Leitfähigkeit durch.

13 Diskussion

In dieser Arbeit ist zum ersten Mal der Nachweis des Gatingmechanismus beim AMFE erbracht worden. Dies besagt, dass die Abnahme des Einzelkanalstroms beim AMFE durch schnelle Schaltungsprozesse erfolgt, die selbst bei der in dieser Arbeit erreichten hohen Auflösung von 50 kHz nicht mehr beobachtet werden.

Gating kann durch Vibrationen des Proteins verursacht werden (Elber und Karplus, 1987), die den Kanal öffnen und schließen, aber auch durch Mechanismen wie denen, die im Hille-Schwarz-Modell (Hille und Schwarz, 1978) oder im Wu-Modell (Wu, 1991, 1992) vorgeschlagen werden. Wenn Ti^+ -induzierte Veränderungen der Protein-Vibrationen die Ursache für den AMFE sind, könnten die hier bestimmten Ratenkonstanten verwendet werden, um die Vorhersagen zu überprüfen, die sich aus Molecular Dynamics Rechnungen ergeben.

Im Fall der Permeationsmodelle wie dem von Hille-Schwarz (1978) oder Wu (1991, 1992) kann ein Gap im Ionenstrom hervorgerufen werden, wenn zwei verschiedene Ionen an zwei Bindungsstellen gebunden werden (Hille und Schwarz, 1978), bei denen sich die Ionen gegenseitig von einer einzigen Bindungsstelle freisetzen (Wu, 1991, 1992). Die Fähigkeit, einen AMFE zu erzeugen, liegt beim Hille-Schwarz- und beim Wu-Modell daran, dass verschiedenartige Ionen sich schwerer gegenseitig von der Bindungsstelle verdrängen als gleichartige.

In Modell 5 dieser Arbeit wird eine Kombination von Hille-Schwarz-Modell (1978) (als Permeationsmodell) und Gating-Effekt als Ursache des AMFE vorgeschlagen. Wenn sich K^+ -Ionen in der Pore aufhalten und an den zwei Bindungsstellen in der Pore (Doyle *et al.*, 1998) binden, werden nur K^+ -Ionen durchgelassen, und die Ti^+ -Ionen können nicht mehr durch die Pore gelangen. Bei einer Bindung von Ti^+ -Ionen ist es umgekehrt. Zwischen diesen beiden Phasen gibt es Unterbrechungen durch Mischbesetzungen (Gating-Effekt), was zu einer Stromreduzierung führen kann.

13.1 Verweildauer der Zustände

Der Unterschied zwischen Model 5 in Abschnitt 11.3.2 und dem Hille-Schwarz- (1978) oder Wu-Modell (1991, 1992) liegt darin, dass Modell 5 die langen Lebensdauern im offenen Zustand erklären kann. Dies sei durch die folgenden numerischen Überlegungen dargestellt.

Aus den Daten in Abb. 10.1 kann die Lebensdauer der betreffenden Zustände berechnet werden, da die Kenntnis der Ratenkonstanten die Berechnung der Einzelkanal-Verweildauern in den Offen- und Geschlossen-Zuständen erlaubt (Tabelle 10.2).

In allen Ansätzen muss aufgrund der Proportionalität zwischen TI^+ -Konzentration und Stromreduzierung durch Gating (Abb. 11.9) angenommen werden, dass die Wahrscheinlichkeit, dass das "falsche" Ion (dasjenige, das das schon gebundene Ion nicht freisetzen kann) eintritt, proportional zu seiner relativen Konzentration ist. In den Messungen beim Minimum der AMFE-Kurve (Abb. 11.9) entspräche die Wahrscheinlichkeit, dass das falsche Ion eintritt, dem Quotienten $20 \text{ mM TI}^+ / 250 \text{ mM Gesamt-konzentration}$.

Im Hille-Schwarz- und im Wu-Modell wird bei jedem Eintritt eines stromtragenden Ions in die Pore die Entscheidung gefällt, ob es ein K^+ -Ion oder ein TI^+ -Ion ist. Die mittlere Zeit eines Sprungs an die Bindungsstelle kann aus dem Strom abgeleitet werden: 8.45 pA korrespondieren mit 50 ns . Das bedeutet, dass nach $0.625 \text{ } \mu\text{s}$ ($250 \text{ mM}/20 \text{ mM}$ mal 50 ns) der Ionenstrom unterbrochen werden würde. Das ist viel kürzer als die mittlere Lebensdauer des schnellen Offen-Zustands von $30 \text{ } \mu\text{s}$ (Tabelle 10.2). Die Geschlossen-Zeit hingegen ($20 \text{ } \mu\text{s}$ in Tabelle 10.2) könnte mit Hilfe des Hille-Schwarz- oder des Wu-Modells ohne Probleme erklärt werden. Somit würde das Verhältnis von $20 \text{ } \mu\text{s} / 50 \text{ ns}$ aus der Änderung der Aktivierungsenergie folgen, die wirksam wird, wenn das falsche Ion das andere Ion aus dem Kanal freisetzen soll (Baukowitz und Yellen, 1996).

Es mag in obigen Berechnungen einige Ungenauigkeiten bezüglich der Offen-Zeit geben, aber es scheint unwahrscheinlich anzunehmen, dass diese Ungenauigkeiten eine Verlängerung von $0.625 \text{ } \mu\text{s}$ auf die gemessenen $30 \text{ } \mu\text{s}$ erklären können. Daraus kann geschlossen werden, dass solche Modelle ungeeignet sind, bei denen die Besetzung der den AMFE verursachenden Bindungsstelle im eigentlichen Permeationsweg nur durch die konzentrationsbedingten Wahrscheinlichkeiten gegeben ist. Stattdessen müssen Veränderungen in der Proteinstruktur aufgrund der Besetzung allosterischer Stellen im Protein angenommen werden, die die Ratenkonstanten des Öffnens und Schließens verändern. Diese Erklärung kommt denjenigen nahe, die von Pietrobon *et al.* (1988) vorgeschlagen wurden, sowie dem Modell von Draber *et al.* (1991).

13.2 Alternative Modelle zur Erklärung des Gatingmechanismus beim AMFE

Es wurden alternative Modelle, die sich auf einem Gatingmechanismus beruhen, für die Beschreibung der Transportvorgänge durch den Kanal bei verschiedenartigen Ionen vorgeschlagen. Es muss als Kernaussage erhalten bleiben, dass ungleichartige Besetzung von Bindungsstellen zu Flussverringerungen führt.

Nach einer Hypothese von Ogielska und Aldrich (1999) bilden die Aminosäuren T445, W434 und W435 eine Manschette (cuff), die bei Besetzung der C-Inaktivierungs-Bindungsstelle mit K^+ sich dem K^+ - und sonst dem Na^+ - Ionenradius anpasst. Verschiedene Effekte können diesen Mechanismus beeinflussen. Zum Beispiel ist ein Lysin im P-Loop des RCK-4 Kanals verantwortlich dafür, dass der Kanal nur dann K^+ durchlässt, wenn K^+ -Ionen am P-Loop gebunden werden (Pardo *et al.*, 1992).

In Modell 3 (Abschnitt 11.2.3) geht es beim K^+/Tl^+ -AMFE und beim Block durch Cs^+ und Na^+ um den molekularen Mechanismus der Transportkontrolle durch Bindungsprozesse der blockierenden Ionen an die vier Untereinheiten des K^+ -Kanals mit Hilfe der Analyse von Patch-Clamp-Zeitreihen.

Es gibt zahlreiche Beispiele, bei denen die Bindung von Liganden die Leitfähigkeit des Kanals, die Selektivität des K^+ -Kanals und dessen Gating-Eigenschaften ändern kann (Glutamat-Rezeptoren: Rosenmund *et al.*, 1998; CNG-Kanäle: Ruiz und Karpén, 1999; Sundermann und Zagotta, 1999a,b; BK-Kanäle, die dem hier benutzten *Chara*-Kanal ähnlich sind: Moss and Magleby, 2001). Bei diesen Untersuchungen ergeben sich die vier Bindungsstellen an den vier Untereinheiten. Je nach Anzahl der Liganden entsteht die dazugehörige Leitfähigkeit. So ergibt sich eine Tetramerstruktur. Befunde dieser Art führen auf die Hypothese, dass am Porenrand oder in der Pore Bindungsstellen existieren, die die Selektivität des Kanals beeinflussen.

Modifikationen der Gating-Frequenz durch solch allosterische Bindungsstellen würde auch das Gating in den K^+ -Daten erklären. Im Fall des Cs^+ -Blocks fanden Draber und Hansen (1994) dieselbe Anzahl von Zeitkonstanten in K^+ - und Cs^+/K^+ -Lösungen. Sie vermuteten, dass die Ca^{2+} -Bindung (Bertl *et al.*, 1993) in K^+/Cs^+ -Lösungen durch die Cs^+ -Bindung ersetzt wurde. Das ist jedoch nicht unbedingt notwendig. In K^+ - und Cs^+ -Lösungen könnte die Besetzung oder Nichtbesetzung einer Bindungsstelle (pro Untereinheit) mit K^+ - oder Cs^+ -Ionen die Ursache der Modifikation der Ratenkonstanten des schnellen Schaltens sein, wie es in Abb. 10.1 und Tabelle 10.2 dargestellt ist.

13.3 Selektivitätsänderungen durch thermische Vibrationen

Gating als das Hauptkriterium, das die älteren AMFE Modelle widerlegt, veranlasst, die Modellierung von Modell 1 (Abb. 11.2) auf das Nicht-Markov-Modell von Abb. 11.8 zu verlagern. Dadurch ergibt sich als die wichtige Aussage der Modellierung die ionenabhängige Modulation des Gatings. Das Modell einer inhärenten vibrierenden Struktur ist ein grundlegendes Konzept auf dem Gebiet der Proteine und von großer funktioneller Bedeutung, die nicht auf Kanäle beschränkt ist. So ermöglichen z. B. thermische Fluktuationen den O₂ und CO₂ Zugang zu den Häm-Gruppen von Myoglobin (Elber und Karplus, 1987). Thermische Fluktuationen sind eine wichtige Eigenschaft im Mechanismus der durch den Protonengradienten getriebenen Bewegung des ATPase-Rotors (Junge *et al.*, 1997). In den Abb. 11.8 und 11.10 treten diese Fluktuationen mit jeder Anzahl von gebundenen Liganden auf, aber die Ratenkonstanten des grundlegenden (aggregierten) Markov-Modells werden durch das Zeitmittel der Anzahl der gebundenen Liganden moduliert.

Das Modell des vibrierenden Kanal-Proteins würde auch den Befund verschiedener Selektivitäten unterschiedlicher Kanäle erklären. Ein nicht-spezifischer Kationen-Kanal, wie z.B. der CNG-Kanal (Balasubramanian *et al.*, 1997; Rosenmund *et al.* 1998; Ruiz und Karpen, 1999) würde eine sehr große Amplitude der Durchmesser-Oszillation besitzen, d.h. eine sehr breite Verteilung der Radien. Dies gibt Ionen verschiedenster Art ein Zeitintervall zu passieren. Ein sehr selektiver Kanal sollte demnach eine sehr starre Konstruktion besitzen, die in einem sehr engen Bereich von Porenradien während einer Oszillation resultiert. Hierzu passt die Stabilisierung der Struktur des hochselektiven K⁺-Kanals durch die schrägstehenden auf den Hohlraum gerichteten P-Loop Helices (Doyle *et al.*, 1998).

13.4 Gates im K⁺-Kanal und ihre Beeinflussung

Kandidaten für die Gates, die durch die Oszillationen kontrolliert werden, sind diejenigen, die bei Zheng *et al.* (2001) dargestellt sind: das (äußere) Porengate, das (innere) Porengate, das (innere) S6-Gate auf der cytosolischen Seite des Kanals und das N-Typ-Inaktivierungsgate (Ball and Chain). Indem sie Chimären von ROMK2 und IRK1 verwendeten, fanden Choe *et al.* (2000) ebenfalls, dass Effekte der Ionenbindung mit einem inneren und einem äußeren Gate verbunden waren. Die Wirkung von Tl⁺ schien mit beiden Gates verbunden zu sein.

Die Präferenz für das Porengate stellt sich aus den meisten Studien heraus, die sich mit der Wirkung der Ionen auf das Gating beschäftigen. Yool und Schwarz (1996) fanden, dass eine Mutation im P-Loop auf der cytoplasmatischen Seite von GYG (T441S) einen

K^+/NH_4^+ AMFE im *Shaker*-Kanals verursacht, der im Wildtyp nicht gefunden wurde. Die 3P-Stelle (drei Positionen auswärts vom Glutamat in P-Region in IRK1) spielte auch als modifizierende Stelle in Einwärtsgleichrichtern eine wichtige Rolle (Choe *et al.*, 2000). Die Rolle der 3P-Position korrespondiert mit der Folgerung von Townsend und Horn (1999), dass sich das Aktivierungsgate des Na^+ -Kanals (beeinflusst durch permeierende Kationen) auf der cytoplasmatischen Seite des Selektivitätsfilters befindet. Diese Sichtweise wird durch den Befund unterstützt, dass ein Lysin 1418 verantwortlich für die Aktivierung des Na^+ -Kanals durch permeierendes Na^+ -Ionen ist. Die Rolle des Selektivitätsfilters wird auch von anderen Autoren favorisiert (Demo und Yellen, 1992; Matteson und Swenson, 1986; Kiss *et al.*, 1999; Proks *et al.*, 2001).

Die Mutation einer Bindungsstelle am äußeren Porenmund (D378Y) von Kv2.1 beeinflusste die Ionenleitung und -blockade (Kirsch *et al.*, 1995). Yellen *et al.* (1994) zeigten die Rolle des externen Mundes für Cd^{2+} - und Zn^{2+} -induziertes Gating in einem T449C *Shaker*-Mutanten auf.

Zeit als Argument gegen die Beteiligung des äußeren Gate könnte aus der Tatsache entstehen, dass normalerweise das Porengate mit langsamen Prozessen wie der C-Typ-Inaktivierung assoziiert ist (Kiss *et al.*, 1998, 1999; Larsson und Elinder, 2000), wobei die Ratenkonstanten im A-O-G-Unterschema von Farokhi *et al.* (2000) im Bereich über 10000 s^{-1} liegen. Die HMM-Analyse der Zwischenschritte des Gatings in *Shaker*- K^+ -Kanälen, von denen angenommen wird, dass sie mit dem Porengate assoziiert sind, ergab allerdings Ratenkonstanten im selben Zeitbereich (Zheng *et al.*, 2001). Sundermann und Zagotta (1999 a,b) fanden Ratenkonstanten in diesem Zeitbereich, die durch zyklische Nukleotid-Bindung auf der cytosolischen Seite von CNG-Kanälen moduliert werden. Kurze Lebenszeiten in Bereich einiger $10\text{ }\mu\text{s}$ wurden in BK-Kanälen gefunden (Ferguson *et al.*, 1993). Daher liefern die Ratenkonstanten kein Argument, ein spezielles Gate als Ort der schnellen Schaltereignisse auszuschließen.

13.5 Auswirkung der Ratenkonstanten der Ionenbindung auf die gemessenen Ratenkonstanten des Markov-Modells

Die Ratenkonstanten, die im Zeitbereich der sehr schnellen Ionenbindung liegen, werden in den gemessenen Ratenkonstanten der Übergänge zwischen den Markov-Zuständen der Zeitreihen nach den Abb. 11.8 und 11.10 nicht ersichtlich. Dies wurde bereits für den CNG-Kanal (Ruiz und Karpen, 1999) und für die Wirkung von Ca^{2+} auf den BK-Kanal (Rothberg und Magleby, 2000) berichtet. Nur wenn die Liganden-Bindung künstlich verlangsamt wird, kann dies beobachtet werden (Rosenmund *et al.*, 1998). Im Hinblick darauf ist es wichtig, dass Moss und Magleby (2001) keine Änderung in der Anzahl der kinetischen Zustände bei Ca^{2+} -Bindung fanden, dafür aber eine Modulation

der Ratenkonstanten.

Der Unterschied zwischen den Modellen 3 und 5 liegt in der Lokalisation des Markov-Modells auf der linken Seite von Abb. 11.8. In den Modellen 1 bis 3 werden die realen allosterischen Bindungsstellen an beliebiger Stelle am Protein vermutet, die Modelle 4 und 5 befassen sich mit der Wechselwirkung zwischen Selektivitätsfilter und permeierenden Ionen. Bei der Einführung von Modell 1 wurden die Publikationen, die sich mit Ligandenbindung beschäftigen, angegeben. Beispiele für ein tetrameres Modell wie das in Abb. 11.1 wurden jedoch nur für die cytosolische Seite gegeben (Moss und Magleby, 2001; Ruiz und Karpen, 1999; Sundermann und Zagotta, 1999 a,b; Zhang *et al.*, 2001). Berichte über allosterische Bindungsstellen am äußeren Mund sind selten (EF-Hände beim Ca^{2+} -Kanal: Feng *et al.*, 2001; Stellen für das Binden von Cs^+ oder Na^+ im NMDA-Rezeptor: Antonov und Johnson, 1999; Glutamat bei Glutamat-Rezeptor: Rosenmund *et al.*, 1998). Im mutierten *Shaker*-Kanal sorgt ein künstlich eingesetztes Cystein für das Binden von Cd^{2+} mit einem allosterischen Effekt auf das Gating (Yellen *et al.*, 1994). Die Abwesenheit von Berichten über native allosterische Bindungsstellen am äußeren P-Loop, auch wenn dort geladene Residuen wie E418 oder E422 im *Shaker*-Kanal vorhanden sind (Larsson und Elinder, 2000) oder K356 im Kv2.1 (Immke *et al.*, 1999), bedeutet nicht, dass es keine solchen Bindungsstellen gibt. Außerdem müssen die allosterischen Stellen nicht auf die unmittelbare Nachbarschaft des Selektivitätsfilters beschränkt sein, da auch der S3-S4-Verbinder eine Rolle bei der Kanal-Aktivierung spielt (Mathur *et al.*, 1997).

13.6 Wirkung der permeierenden Ionen auf das Gatingverhalten

Die Wechselwirkung zwischen dem permeierenden Ion und dem Selektivitätsfilter wird andererseits durch etliche Untersuchungen, die bereits oben erwähnt wurden (Kiss *et al.*, 1998, 1999; Ogielska und Aldrich, 1998, 1999; Immke *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001) gestützt, nicht nur in K^+ -Kanälen, sondern auch in Ca^{2+} -Kanälen (Dang und McClesky, 1998). Bereits Demo und Yellen (1992) berichteten, "dass die Wirkung der permeierenden Ionen auf das Gating durch ihre Wechselwirkung mit den Bindungsstellen innerhalb der Pore auftritt". Solche Bindungsstellen werden von vielen Autoren diskutiert (Matteson und Swenson, 1986; Demo und Yellen, 1992; Levy und Deutsch, 1996). Lu *et al.* (2001) zeigten, dass es eine Wechselwirkung von Tl^+ mit dem Selektivitätsfilter in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Choe *et al.* (2000) gibt, dass K^+ -Ionen Konformationsänderungen des Selektivitätsfilters von Kir1.1b triggern können. Eine Bindungsstelle in der Pore selbst wäre in Übereinstimmung mit unserem Befund, dass der AMFE auftritt, wenn der Strom das Tl^+ in die Pore zieht.

Unter dem Gesichtspunkt neuester Ergebnisse (z.B. BernPche und Roux, 2001) ist es jedoch offensichtlich, dass die Bindung in tiefen energetischen Tälern (Hille-Schwarz-Modell, 1978) nicht auftritt. Stattdessen müssen Konformationsänderungen, die durch die Ionen im Selektivitätsfilter induziert werden, in Betracht gezogen werden. Sogar bei Mutation einer negativen Ladung benachbart zum GYG-Motiv (D378T in Kv2.1: Kirsch *et al.*, 1995) deutet die Analyse der Wirkung der Ionenstärke an, dass es keine elektrostatische Wechselwirkung gibt, die die Ursachen für die beobachteten Änderungen in der Na^+/K^+ -Selektivität und für das Gating sind (Zhou *et al.*, 2001). Diese haben aber eine Wirkung auf Konformationsänderungen.

Die Überlegungen zu den Modellen 1 bis 3 waren jedoch nicht vergeblich, obwohl Modell 5 am meisten favorisiert wird. Abb. 11.10 kann auch verwendet werden, um Modell 5 zu beschreiben. Dann ist das Markov-Modell auf der linken Seite ein Markov-Modell der Besetzung der Orte 1, 2, 3, 4 in der Pore ähnlich dem Modell in Abb. 10.4 bei Morais-Cabral *et al.* (2001). Dieses Modell kann wie ein Untermodell von dem Modell behandelt werden, das zu den Kurven in den Abb. 11.2 und 11.4 führt. Der mittlere und der linke Teil von Abb. 11.8 sind dieselben für Modell 3 und Modell 5.

Eine Folge der Gültigkeit von Abb. 11.3 für Modell 3 und Modell 5 ist ein neues Verständnis der Rolle der zeitlichen Auflösung. Im Falle des Cs^+ -Blocks in *Chara* (Draber und Hansen, 1994) war die Argumentation von Hansen *et al.* (1997) offensichtlich. Bei einer Abtastrate von 5 kHz führte die Mittelung im Anti-Aliasing-Filter zu einer Reduktion des scheinbaren Einzelkanalstroms. Der volle Offen-Kanalstrom wurde bei einer Abtastrate von 100 kHz erreicht. In Abb. 11.3 ist die Wahrscheinlichkeit des Zustands KKKK in reiner K^+ -Lösung nahe 1 mit entsprechenden Ratenkonstanten $k_{1,1}$ und $k_{1,S}$. Folglich wird immer der korrekte Einzelkanalstrom gemessen, und die durch das Gating verursachte Stromreduktion des AMFE ist bei allen zeitlichen Auflösungen, die angewendet wurden gleich. Im Gegensatz dazu nahm die Offenwahrscheinlichkeit im Bereich des AMFE zu ungefähr 75 % ab. (Abb. 11.2 und 11.9). Auch dieser Wert ist unabhängig von der zeitlichen Auflösung, solange das Gating schneller ist.

Weitere Untersuchungen werden einige der obigen Annahmen über den durch das Gating verursachten AMFE modifizieren. Die grundlegende Botschaft bleibt jedoch bestehen: Gating-Modelle des AMFE sind realisierbar und können die Permeationsmodelle, wie die von Hille und Schwarz (1978), Wu (1992) und anderen (Nonner *et al.*, 1998), ersetzen.

13.7 Kooperative Änderung der Selektivität bei Anwesenheit von Na^+ -Lösung

Bei den Na^+ -Messungen werden die gemischten Konfigurationen wie beim Hinzufügen

von Ti^+ -Lösung nicht sichtbar (Kapitel 12). Stattdessen wird hier ein Modell in Anlehnung an die Ergebnisse von Zhou *et al.* (2001) vorgeschlagen, das davon ausgeht, dass der K^+ -Kanal bei Abwesenheit der K^+ -Ionen kollabiert. Wenn sich keine K^+ -Ionen im Selektivitätsfilter aufhalten, wird der Selektivitätsfilter für die K^+ -Ionen undurchlässig. Wie bei der C-Inaktivierung (Kiss *et al.*, 1998) könnte der Durchmesser des Selektivitätsfilters für Na^+ -Ionen passend werden. Diese Art von Änderungen des Selektivitätsfilters wurde in zahlreichen weiteren neuen Arbeiten dargestellt (z. B. Ogielska und Aldrich, 1998, 1999; Larson und Elinder, 2000). Die von Weise und Gradmann (2000) in Gegenwart von Na^+ beobachteten Sublevels können somit auch durch Na^+ -Ströme im K^+ -Kanal verursacht werden.

In den in Abb. 12.4 dargestellten Messungen treten diese Änderungen des Selektivitätsfilters nicht nur bei einem einzigen K^+ -Kanal, sondern bei allen Kanälen gleichzeitig auf. Ein solches Kooperativitätsverhalten wurde schon in K^+ -Kanälen von Chara bei Draber *et al.* (1993) beobachtet. In diesen Untersuchungen wird dabei in erster Linie eine Änderung der Leitfähigkeit bei Anwesenheit von Na^+ -Ionen beobachtet. Bei Draber *et al.* (1993) wurde eine Änderung der Offenwahrscheinlichkeit beobachtet. Da sie aber in reiner K^+ -Lösung gemessen haben, wurde nur das Schließen der zahlreichen Kanäle durch ein Kooperativitätsverhalten beobachtet. Erst bei einer Anwesenheit von ausreichend Na^+ -Ionen können die K^+ -Kanäle, die die K^+ -Ionen nicht mehr durchlassen, trotzdem noch Strom führen, da sie aufgrund der Reduzierung des Porendurchmessers für die Na^+ -Ionen durchlässig geworden sind. Die Änderung der Selektivitätsfilter wird so wie beim *Shaker*-Kanal nur durch Abwesenheit der K^+ -Ionen verursacht.

Auch beim *Shaker*-Kanal wird die C-Inaktivierung bei Abwesenheit der K^+ -Ionen schneller (Kiss *et al.*, 1998; Ogielska und Aldrich, 1998, 1999). Das bedeutet, dass der K^+ -Kanal ohne K^+ -Ionen entsprechend den Röntgenstrukturuntersuchungen von Zhou *et al.* (2001) schneller kollabiert. Bei der in Abb. 12.5 dargestellten Untersuchung ist wahrscheinlich bei Abwesenheit der K^+ -Ionen ein deutlich geringerer Einzelkanalstrom, der wahrscheinlich durch die Na^+ -Lösung zustande kommt, festzustellen. Das bedeutet, dass bei Abwesenheit von K^+ -Ionen der Durchmesser der Selektivitätsfilter so zusammenrückt, dass die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen GYG (Doyle *et al.*, 1998) einen Ring bilden, der für die Na^+ -Ionen durchlässig wird. Eine plötzliche Änderung der Offenwahrscheinlichkeit und deren Kinetik ist auch in der Arbeit von Wang *et al.* (2000) aufgetreten. Die Änderung der Selektivitätsfilter kann auch spontan passieren und muss nicht durch Verringerung der K^+ -Konzentration in der Pore geschehen. Es können zum Beispiel die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen 418 C und V451 und G452 gebrochen werden und dadurch P 450 aus der Pore rutschen (Larsson und Elinder, 2000). So kann sich auch der Durchmesser des Selektivitätsfilters verringern. Was die Ursache für diese Verringerung ist, kann nur durch Mutationsuntersuchungen beantwortet werden.

Warum dieser Effekt gleichzeitig bei allen Kanälen auftritt, ist ein ungelöstes Phänomen.

Es wird zwischen den benachbarten Kanal-Proteinen eine Art mechanische Wechselwirkung postuliert. Diese Art von Kooperativität kann als kooperatives Mode-Shifting (Herzig *et al.*, 1993) verstanden werden. Die Kanäle sind wahrscheinlich in der Membran so dicht benachbart, dass eine strukturelle Änderung von einem Kanal dieselbe strukturelle Änderung in den benachbarten Kanälen induziert.

14 Fazit und Ausblick

Das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Stromreduzierung beim anomalen Molfraktionseffekt (AMFE) durch einen Gatingeffekt verursacht wird. Damit hat sich die Vermutung von Draber *et al.* (1991) und der vorangegangenen Diplomarbeit (Farokhi, 1998) als richtig erwiesen. Von allen in Kapitel 11 vorgestellten Modellen geben Modell 3 und Modell 5 die überzeugendsten Mechanismen für die Beeinflussung des Gatings durch das TI^+/K^+ -Mischverhältnis. Wenn es auch für die in Modell 3 postulierten Bindungsstellen keine experimentellen Hinweise gibt, kann ihre Existenz nicht ausgeschlossen werden. Für Modell 5 spricht allerdings, dass der AMFE auftritt, wenn TI^+ -Ionen mit dem elektrischen Strom in die Pore gezogen wird.

Die Vertiefung des hier erreichten Kenntnisstandes muss auf mehreren Ebenen geschehen: Messtechnisch erstrebenswert ist eine Erhöhung des zeitlichen Auflösungsvermögens. Das Signalrauschverhältnis konnte bereits in dieser Arbeit deutlich verbessert werden. Der *Chara*-Kanal gehört im Vergleich zu den anderen Kanälen bereits zu den Spitzenreitern der Starkstromtechnik mit Spitzenwerten von 20 pA. Die Quarzpipetten (Abschnitt 5.2.2) zusammen mit dem Heranziehen des Patches an die Wasseroberfläche, bewirkten eine so starke Rauschunterdrückung, dass die Messungen bei 25 mM K^+ -Lösung mit 50 kHz Bandbreite möglich wurden. (Abb. 11.6). Über den bisherigen Stand hinaus ging die Verwendung des Axopatch 200B Verstärkers (Axon Instruments) statt des Dagan 3900A Verstärkers (Parzefall *et al.*, 1998), bei dem nicht nur eine Kapazitivitätsrückkopplung (Abschnitt 3.2) vorhanden ist, sondern der Vorverstärker zusätzlich gekühlt wird. Wenn hierdurch das Rauschen weiter abnimmt, könnten höhere Abtastraten und Filterfrequenzen zu einer noch besseren Auflösung führen.

Durch die Maßnahmen der Rauschreduzierung und Erhöhung der Abtastraten ergibt sich auch wieder die Möglichkeit, die schnellen Ratenkonstanten durch eine Dwell-Time-Analyse zu nähern, ohne dass dabei Missed-Events-Probleme eine so gravierende Rolle spielen. Der Vorteil der Dwell-Time-Analyse liegt darin, dass der Fit weniger Zeit benötigt und eine bessere Kontrolle für die Genauigkeit des Fits vorhanden ist.

Die Erhöhung des zeitlichen Auflösungsvermögens auf mathematischem Wege macht noch Sinn, da alle Aussagen an der Grenze des Auflösungsvermögens gewonnen wur-

den. Hier wird die Dissertation von Harlfinger neue Möglichkeiten eröffnen. Er kombiniert den direkten Fit der Zeitreihen (Albertsen und Hansen, 1994; Abschnitt 4.5) mit dem Fit des Amplitudenhistogramms durch Beta- statt Gaußverteilungen (Rießner 1998), um die Genauigkeit der Bestimmung der Ratenkonstanten der Zeitreihen zu erhöhen. Hierbei dient eine gewichtete Summe aus dem Direkten-Zeitreihen-Fit und dem Betaverteilungsfit als Auswahlkriterium beim Simplex-Algorithmus. Durch diese Kombination werden sogar die schnellen Ratenkonstanten über 100 ms^{-1} an die wahren Werte angefüttet.

Das Hauptinteresse zukünftiger Arbeiten wird jedoch auf die Biophysik der Kanäle abzielen. Für den AMFE wurden fünf verschiedene Gatingmodelle vorgeschlagen (Kapitel 11). Sie führen die Änderung der Leitfähigkeit und des damit in Zusammenhang stehenden Durchmessers des Selektivitätsfilters entweder auf die allosterischen Bindungsstellen (Liganden-Modell) oder auf die Änderung der Besetzung der Pore mit Ionen, die mit dem Selektivitätsfilter in Wechselwirkung treten (Foot-in-the-door-Modell), zurück. Vom Prinzip sind sich die Modelle 3 und 5 sehr ähnlich. Bei beiden ändern sich die gemessenen Ratenkonstanten des Markov-Modells des Gatings durch die Kräfte, die allosterische Ionenbindung oder die Besetzung des Selektivitätsfilters auf das Protein ausüben (Abb. 11.10).

Das Foot-in-the-door-Modell wurde weiterhin beim Na^+ -Effekt untersucht. Bei Hinzugabe von Na^+ -Lösung wurden zwei unterschiedliche Leitfähigkeitszustände beobachtet, die durch ein Kooperativitätsverhalten bei allen Kanälen gleichzeitig zustande gekommen sind.

Weiterhin könnte in Zukunft untersucht werden, wie die Kanäle miteinander in Wechselwirkung (Abschnitt 12.4 und 12.5.1) stehen, so dass eine strukturelle Veränderung eines Kanals an die benachbarten Kanäle weitergeleitet wird. Kooperativitätsverhalten könnte auch bei den Modellen, die beim AMFE untersucht wurden, vorkommen. Bei den Modellen 3 und 5 könnten die Bindung von Ionen an allosterische Bindungsstellen oder die Wechselwirkung von permeierenden Ionen mit dem Selektivitätsfilter kooperativ sein. Dadurch wird das Verhalten dieser Nicht-Markov-Modelle noch komplexer.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stecken somit den Rahmen ab, in dem die weiterführenden Untersuchungen laufen können. Bei diesen muss davon ausgegangen werden, dass die Ratenkonstanten der Ionenbindung oder Konformationsänderung des Selektivitätsfilters weit über der zeitlichen Auflösung liegen. Daher besteht keine Möglichkeit, dies direkt nachzuweisen. Wenn auch theoretisch untersucht werden kann, welches der beiden Modelle den AMFE besser wiedergibt, werden weitere Messungen unverzichtbar sein.

Elektrophysiologische Fragestellungen gibt es noch einige: Es bietet sich an, die Umkehrpotentiale während der hier besprochenen Phänomene, z. B. im B_{Na} -Bereich von

Abb. 12.4 oder während der Stromreduzierung beim AMFE, aber auch beim Cs^+/K^+ -Block oder in Rb^+/K^+ -Mischungen (Keunecke und Hansen, 2000) zu messen.

All die oben besprochenen Untersuchungen sind noch in einem normalen elektrophysiologischen Labor durchzuführen. Die richtig leistungsfähigen Methoden werden jedoch sehr aufwendig. Was im neuen ZBM sicher durchführbar ist, sind molekularbiologische Untersuchungen. Mit Punktmutationen kann nach den hypothetischen Bindungsstellen von Modell 3 gesucht werden. Hierbei muss beachtet werden, dass die Antworten nicht einfach zu deuten sein werden. Wie die in Abschnitt 11.1 und 12.5 besprochenen Arbeiten gezeigt haben, kann irgendeine Mutation im P-Loop aber auch auf den weiter entfernten Helices zu einer Änderung der Leitfähigkeit und/oder Geometrie des Proteins führen und damit zu einer Änderung des Gating-Verhaltens. Dennoch ist dies ein Weg, der eine Fülle neuer Erkenntnisse liefern wird.

Einen direkten Zugang zu den strukturellen Veränderungen im Protein geben mehrere Methoden: Spin-Spin-Kopplung (Perozo *et al.*, 1999), Röntgenstrahlstreuung (Zhou *et al.*, 2001) oder Fluoreszenztransfer (Bezanilla, 2000). Während die ersten Methoden den Zugang zu sehr teuren Geräten erfordern (z.B. Synchrotronstrahlung in Stanford für die Röntgenstrahlbeugung und aufwendige Kristallisationsmethoden) bietet die Fluoreszenztransfermethode die Möglichkeit der Durchführung auch in einem normalen molekularbiologischen Labor, wie z. B. im ZBM. Hierbei werden an zwei benachbarten Residuen im Protein Fluoreszenzfarbstoffe geheftet. Der Abstand bestimmt die Energieübertragung, so dass ähnlich wie bei der Spin-Spin-Kopplung (Perozo *et al.*, 1999) in verschiedenen Zuständen Abstände gemessen werden können (Bezanilla, 2000).

Ein Einsatz, dessen hohes Potential sich in der Arbeit von Bernéche und Roux (2001) gezeigt hat, ist auch die Molecular-Dynamics-Berechnung der Bindungspotentiale für Ionen aus dem Proteingerüst.

Welcher dieser Ansätze auch immer für die Weiterführung der Untersuchungen gewählt wird, sie alle eröffnen die Möglichkeit, mechanische Veränderungen während der Funktion des Proteins zu erfassen. Die Bedeutung der vorliegenden Arbeit wird hauptsächlich darin liegen, mit der Widerlegung der alten Permeationsmodelle für den AMFE und dem Nachweis der Rolle des Gatings und damit der Proteinverformungen, konkrete Fragen aufgeworfen zu haben, die mit den oben genannten Verfahren zu beantworten sind. Diese Aufgabenstellung kommt gerade zur richtigen Zeit, da der Vorstoß in die Welt der Protein-Dynamiken im 21. Jahrhundert eine Beschleunigung erfahren hat, die im vorherigen Jahrhundert noch nicht vorstellbar war. So werden demnächst die Prozesse, die hinter Modell 5 stehen, im Detail sichtbar werden.

15. Zusammenfassung

Das Verständnis der hohen Selektivität von Kanälen wurde durch das Strukturmodell aus der MacKinnon-Gruppe (Doyle *et al.*, 1998; Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001) erheblich verbessert. Danach täuschen die Carbonylgruppen der Poren den Ionen eine passende Wasserhülle vor, wenn der Ionenradius genau zum Porenradius passt.

Dieses sehr überzeugende Modell wirft jedoch die Frage auf, was geschieht, wenn ein Kanal seine Selektivität ändert. Hierfür liegen experimentell gewonnene Hinweise vor: In hoher Na^+ -Konzentration wird der in Oozyten exprimierte K^+ -Kanal vom *Shaker*-Typ für Na^+ durchlässig (Ogielska und Aldrich, 1998; 1999). In hoher Ca^{2+} -Konzentration bei Abwesenheit von K^+ wird der K^+ -Kanal im Tonoplasten von *Vicia faba* und *Beta vulgaris* L. für Ca^{2+} permeabel (Schulz-Lessdorf und Hedrich, 1995).

Eine Änderung des Selektivitätsfilters wurde auch bei der Frage des anomalen Molfraktionseffekts (AMFE) in einer Mischlösung von K^+ - und Tl^+ -Lösung vermutet. Zuvor musste der Nachweis erbracht werden, dass der AMFE durch einen Gatingmechanismus verursacht wird, und die frühere Annahme, dass der AMFE durch einen Permeationseffekt (Hille-Schwarz-Modell oder Wu-Modell) verursacht wird, nicht zutrifft.

So konnten alle Messungen mit dem linearen 5-Zustands-Modell gefittet werden, das in Abb. 10.1 dargestellt ist. Die Qualität des Fits konnte durch Hinzunahme eines weiteren Zustands in Anwesenheit von Tl^+ nicht verbessert werden (Farokhi, 1998).

Die Vorgehensweise und Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Das Fitten der Amplitudenhistogramme durch eine Überlagerung von Gauß-Funktionen ergab eine Verbreiterung in Anwesenheit von Tl^+ -Lösung.
2. Eine Dwell-Time-Analyse, die auf einem O-O-C-C-C-Markov-Modell (O: Offen-, C: Geschlossenzustand) basiert, scheiterte beim Versuch, die Ratenkonstanten oberhalb der Filterfrequenz abzuschätzen. Daher konnte die Abwesenheit der eigentlich erwarteten Abnahme des scheinbaren Einzelkanalstroms in Zeitreihen, die mit den abgeschätzten Ratenkonstanten simuliert wurden, nicht als Beweis gegen die Gating-Hypothese genommen werden.

3. Ein direkter Fit der gemessenen Zeitreihen, der fünf verschiedene 5-Zustands-Hidden-Markov-Modelle verwendete, ergab, dass die Anwesenheit von TI^+ die Ratenkonstanten derartig veränderte, dass in Anwesenheit von TI^+ die Anzahl der Übergänge in den kurzlebigen Offen-Zustand ($30 \mu\text{s}$) stark anstieg, verglichen mit der Anzahl in Abwesenheit von TI^+ -Lösung.

Diese Modelle erklären die 25 %-ige Abnahme der Amplitude des scheinbaren Einzelkanalstroms mit Hilfe eines schnellen Gating-Mechanismus. Die Abhängigkeit des Einzelkanalstroms von der TI^+/K^+ -Molfraktion, die ein Minimum bei $[\text{TI}^+]/[\text{K}^+] = 1:15$ aufweist, ist somit proportional zur Offenwahrscheinlichkeit in den Bursts. So ist die Frage, ob der AMFE durch einen Permeations- oder Gatingmechanismus verursacht wird, beantwortet.

Obige Analyse zeigt, dass die Änderung der Ratenkonstanten des schnellen Schaltens die Ursache für die Abnahme des scheinbaren Einzelkanalstroms ist. Die Ratenkonstanten der relevanten O-G-Übergänge betragen ca. 100 ms^{-1} (wenn k_{sim} in Abb. 10.2 anstatt von k_{fit} in Betracht gezogen wird). Zusammen mit den anderen Ratenkonstanten (Gleichungen 4.9 und 4.10) führt das zu einer mittleren Verweildauer (inverser Eigenwert) des Offenzustands von $30 \mu\text{s}$ (Tabelle 10.2). Es mag die Frage gestellt werden, ob in Abb. 10.1 das richtige Markov-Modell verwendet wurde. Dies ist jedoch für das Ergebnis der hier zugrundeliegenden Fragestellung nicht von großer Bedeutung. Hier wird eine Methode benötigt, die zur Rekonstruktion einer Zeitreihe führt, die dieselben statistischen Eigenschaften besitzt wie die gemessene, um die Verminderung des Stroms durch Gating (wie in Abb. 10.2 gezeigt) zu untersuchen. Dies kann mit Hilfe jedes Modells geschehen, das statistisch gleichwertig zum wirklichen Modell ist, d. h. ein Modell ist, das die direkte Zuweisung der Markov-Zustände zu Konfigurationen des Kanalproteins erlaubt (Tabelle 10.1).

Ein weiteres Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass der direkte Fit der Zeitreihen für schnelle Ratenkonstanten besser geeignet ist als die Dwell-Time-Analyse. Somit bietet der direkte HMM-Zeitreihenfit eine sehr gute Möglichkeit, solche Problemstellungen zu bearbeiten.

Neben diesen Ergebnissen wurde zusätzlich versucht, das Rauschen einer Zeitreihe durch verschiedene Maßnahmen zu reduzieren. Zu diesen gehören sowohl die Verwendung eines Patch-Verstärkers mit einem integrierten Rückkopplungskondensator als auch die Verringerung der Eintauchtiefe und die Verwendung von dickwandigen Quarzpipetten ($d_{\text{innen}} = 1 \text{ mm}$ und $d_{\text{außen}} = 2 \text{ mm}$). Dadurch hat sich die Auflösung des Einzelkanalstroms deutlich verbessert, und es ergibt sich die Möglichkeit, auch bei geringeren Konzentrationen, die nahe an den physiologischen Bedingungen liegen, Messungen durchzuführen.

Der Nachweis, dass der AMFE ein Gatingeffekt ist, macht die Suche nach neuen Modellen notwendig. Als Erstes wurden drei Liganden-Modelle vorgeschlagen, die auf einer allosterischen Bindungsstelle für jede Untereinheit des Kanals basieren, bei der

der Einzelkanalstrom durch die Bindung der Ionen direkt beeinflusst wird. Es wurden zwei weitere Modelle vorgeschlagen, die auf dem Foot-in-the-door-Prinzip beruhen, bei dem die Leitfähigkeit des Kanals von der Besetzung der K^+ -Ionen in der Pore abhängig ist. Diese fünf unterschiedlichen Modelle haben jeweils die folgenden Eigenschaften:

1. Im ersten Modell wird die Ionenbindung direkt als der Übergang von einem Markov-Modell zu einem anderen beobachtbar. Dieses Modell kann zwar die Abhängigkeit des scheinbaren Einzelkanalstroms von der TI^+ -Konzentration erklären, aber es sagt eine lineare Abhängigkeit der scheinbaren Ratenkonstanten von den Ionenkonzentrationen voraus. Um dies zu überprüfen, wurden neue Messungen in 25 mM, in 250 mM KNO_3 und in 250 mM $TINO_3$ durchgeführt. Der vorhergesagte Effekt wurde nicht beobachtet.
2. Das zweite Modell kann dieses Problem meistern, indem für die Ionenbindung Sättigungskinetiken eingeführt werden. Das Problem bei diesem Modell ist, dass das Verhalten der Ratenkonstanten des zugehörigen Markov-Modells nicht in Übereinstimmung mit den Messergebnissen ist.
3. Im dritten Modell, das kein reines Markov-Modell ist, wird das Gating durch inhärente Vibrationen des Proteins verursacht. Die Ratenkonstanten der damit verbundenen Übergänge hängen vom Mittelwert der Besetzung der allosterischen Stellen ab.
4. Das vierte Modell basiert auf einer „Foot-in-the-door“-Näherung, dessen Haupteigenschaft darin besteht, dass im Selektivitätsfilter zwei K^+ -Ionen notwendig sind, um den Porenradius für die K^+ -Ionen passend zu halten. Bei diesem Modell wird nicht von zwei Offenzuständen des Kanals ausgegangen, die jedoch bei den gemessenen Daten festgestellt wurden.
5. Das fünfte Modell ist, wie das dritte Modell, auch kein reines Markov-Modell, da angenommen wird, dass die Proteinkonformation (und dadurch die Ratenkonstanten des Markov-Modells der Zeitreihen) von der Kraft abhängt, die über das zeitliche Mittel über die Besetzungen des Markov-Modells durch Ionenbindung ausgeübt wird, die in der Pore selbst (Modell 5) oder außerhalb (Modell 3) auftreten kann.

Um die Foot-in-the-door-Modelle weiter zu untersuchen, wurde der Na^+ -Block im K^+ -Kanal erforscht. Dabei wurde festgestellt, dass die K^+ -Kanäle so wie bei Draber *et al.* (1993; plötzliche Änderung der Offenwahrscheinlichkeit des K^+ -Kanals) ein Kooperativitätsverhalten aufweisen, bei dem sich der Einzelkanalstrom und die Besetzungs-

wahrscheinlichkeit in den langsamsten geschlossenen Zustand abrupt ändern. Es liegt die Vermutung nah, dass sich dabei der Durchmesser des Selektivitätsfilters des Kanals durch das Foot-in-the-door-Prinzip ändert und bei einer Verkleinerung des Durchmessers die Na^+ -Ionen den K^+ -Kanal passieren. Das Kooperativitätsverhalten deutet darauf hin, dass die Kanäle durch die Lipidschicht in Wechselwirkung stehen, und strukturelle Änderung des einen Kanals die Strukturen der benachbarten Kanäle beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Albertsen, A. (1992). Erfassung und Auswertung schneller Schaltvorgänge bei Patch-Clamp Untersuchungen. Diplomarbeit, Kiel.
- Albertsen, A. (1994). Fast patch-clamp data acquisition and kinetic analysis of multi-channel records. Doktorarbeit, Kiel.
- Albertsen, A.; Hansen, U. P. (1994). Estimation of kinetic rate constants from multi-channel recordings by a direct fit of the time serie. *Biophys. J.* 67:1393-1403.
- Antonov, S. M.; Johnson, J. W. (1999). Permeant ion regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channel block by Mg^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 96: 14571-14576.
- Antz, C.; Geyer, M.; Fakler, B.; Schott, M. K.; Guy, H. R.; Frank, R.; Ruppersberg, J. P.; Kalbitzer, H. R. (1997). NMR structure of inactivation gates from mammalian voltage-dependent potassium channels. *Nature* 385: 272-275.
- Assmann, S. M.; Romano, L. A. (1998). Secondary messenger regulation of ion channels/Plant patch clamping. *Meths. Enzymology* 294: 410-441.
- Balasubramanian, S.; Lynch, J. W.; Barry, P. H. (1997). Concentration dependence of sodium permeation and sodium ion interactions in the cyclic AMP-gated channels of mammalian olfactory receptor neurons. *J. Membr. Biol.* 159: 41-52.
- Ball, F. G.; Rice, J. A. (1992). Stochastic models for ion channels: introduction and bibliography. *Math. Biosci.* 112: 189-206.
- Ball, F. G.; Sansom, M. S. B. (1988). Aggregated Markov processes incorporating time interval omission. *Adv. Appl. Prob.* 20: 546-572.
- Ball, F. G.; Sansom, M. S. P. (1989). Ion-channel gating mechanisms: model identification and parameter estimation from single channel recordings. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 236: 383-416.
- Baukrowitz, T.; Yellen, G. (1996). Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from a multi-ion pore of a K^+ channel. *Science* 271: 653-656.

- Baum, L. E.; Petrie, T.; Soules, G.; Weiss, N. (1970). A maximization technique occurring in the statistical analysis of probabilistic functions of Markov chains. *Ann. Math. Statist.* 41: 164-171.
- Benz, R.; Lauger, P. (1976). Kinetic analysis of carrier-mediated ion transport by the charge-pulse technique. *J. Membr. Biol.* 27: 171-191.
- BernPche, S.; Roux, B. (2001). Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* 414: 73-76.
- Bertl, A. (1989). Current-voltage relationships of sodium-sensitive potassium channel in the tonoplast of *Chara corallina*. *J. Membr. Biol.* 109: 9-19.
- Bertl, A.; Gradmann, D.; Slayman, C. L. (1992). Calcium- and voltage-dependent ion channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 338: 63-72.
- Bertl, A.; Slayman, C. L.; Gradmann, D. (1993). Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* 132: 183-199.
- Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80: 555-592.
- Blatt, M. R. (1988). Potassium-dependent bipolar gating of potassium channels in guard cells. *J. Membr. Biol.* 102: 235-246.
- Blatt, M. R.; Gradmann, D. (1997). K⁺-sensitive gating of the K⁺ outward rectifier in *Vicia faba* guard cells. *J. Membr. Biol.* 158: 241-256.
- Blunck, R. (1996). Nachweis des schnellen Schaltens beim Na⁺-Block des K⁺-Kanals in *Chara*. Diplomarbeit, Kiel.
- Blunck, R.; Kirst, U.; Rießner, T.; Hansen, U. P., (1998). How powerful is the dwell-time analysis of multi-channel records? *J. Membr. Biol.* 165: 19-35.
- Bowman, B. J.; Bowman, E. J. (1986). H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *J. Membr. Biol.* 94: 83-97.
- Caceci, M. S.; Cacheris, W. P. (1984). Fitting curves to data - the simplex algorithm is the answer. *BYTE* 5/84: 340-362.
- Cakan, O. (2002). Reaktionskinetische Modellierung, Computersimulation und Analyse gemessener Zeitreihen zur Überprüfung einiger Hypothesen zum schnellen Schalten im Protein des K⁺-Kanals beim Anomalen Molfraktionseffekt. Diplomarbeit, Kiel.
- Catterall, W. A. (1988). Structure and function of the voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61.

- Catterall, W. A. (1992). Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Rev.* 72: 15-48.
- Chapman, L.; VanDongen, H. M.; VanDongen, A. M. (1997). Activation-dependent subconductance levels in the drk1 channel suggests a subunit basis for ion permeation and gating. *Biophys. J.* 72: 708-719.
- Chen, T. Y.; Miller, C. (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-O Cl channel. *J. Gen. Physiol.* 108: 237-250.
- Choe, H.; Sackin, H.; Palmer, L. G. (2000). Permeation properties of inward-rectifier potassium channels and their molecular determinants. *General Physiology* 115: 391-404.
- Chung, S. H.; Gage, P. W. (1998). Signal processing techniques for channel current analysis based on hidden Markov models. *Methods in Enzymology* 293: 420-437.
- Chung, S. H.; Krishnamurthy, V.; Moore, J. B. (1991). Adaptive processing techniques based on Hidden Markov Models for characterizing very small channel currents buried in noise and deterministic interferences. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 334: 357-384.
- Chung, S. H.; Moore, J. B.; Xia, L.; Premkumar L. S.; Gage, P. W. (1990). Characterization of single-channel currents using digital signal processing techniques based on hidden Markov models. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 329: 265-285.
- Ciani, S.; Krasne, S.; Miyazaki, S.; Hagiwara, S. (1978). A model for anomalous rectification: electrochemical-potential-dependent gating of membrane channels. *J. Membr. Biol.* 44: 103-134.
- Colquhoun, D.; Hawkes, A. G. (1977). Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 199: 231-262.
- Colquhoun, D.; Hawkes, A. G. (1981). On the stochastic properties of single ion-channels. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 211: 205-235.
- Colquhoun, D.; Hawkes, A. G. (1982). On the stochastic properties of bursts of single ion-channel openings and of clusters of bursts. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 300: 1-59.
- Colquhoun, D.; Hawkes, A. G. (1987). A note on correlations in single ion channel records. *Proc. Royal Soc. Lond. B.* 230: 15-52.
- Colquhoun, D.; Hawkes, A. G. (1990). Stochastic properties of ion channel openings and bursts in a membrane patch that contains two channels: evidence concerning the number of channels present when a record containing only single openings is observed. *Proc. Royal Soc. Lond. B.* 240: 453-477.

- Colquhoun, D.; Hawkes, A. G.; Srodzinski, K. (1996). Joint distributions of apparent open times and shut times of single ion channels and the maximum likelihood fitting of mechanisms. *Phil. Transactions of the Royal Society of London A* 354, 2555-1290.
- Colquhoun, D.; Sakmann, B. (1985). Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end plate. *J. Physiol.* 369: 501-557.
- Conejero, C. (1997): Anion exchanger AE1 as a candidate pathway for taurine transport in rat erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 272: 1457-1464.
- Corey, D. P.; Stevens, C. F. (1983). Science and technology of patch-recording electrodes. In: *Single Channel Recording*. Sakmann, B. and Neher, E., editors. Plenum Press, New York and London. pp 53-68.
- Crouzy, S. C.; Sigworth, F. J. (1990). Yet another approach to the dwell-time omission problem. *Biophys. J.* 58: 731-743.
- Dang, T. X.; McClesky, E. W. (1998). Ion channel selectivity through stepwise changes in binding affinity. *J. Gen. Physiol.* 111: 185-193.
- Demo, S. D.; Yellen, G. (1992). Ion effects of gating of the Ca^{2+} activated K^+ channel correlate with occupancy of the pore. *Biophys. J.* 61: 639-648.
- Dietrich, P.; Hedrich, R. (1998). Anions permeate and gate GCAC1, a voltage-dependent guard cell anion channel. *Plant J.* 15: 479-487.
- Doyle, D. A.; Morais-Cabral, J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- Draber, S. (1990). Untersuchung des anomalen Molfraktionseffektes mit Hilfe der Patch-Clamp Technik. Diplomarbeit, Kiel.
- Draber, S. (1994). Methods for analyzing fast single-channel data and studies on the K^+ channel under Cs^+ blockade and under control conditions. Doktorarbeit, Kiel.
- Draber, S.; Hansen, U. P. (1994). Fast single-channel measurements resolve the blocking effect of Cs^+ on the K^+ channel. *Biophys. J.* 67: 120-129.
- Draber, S.; Schultze, R. (1994). Correction for missed events based on a realistic model of a detector. *Biophys. J.* 66: 191-201.
- Draber, S.; Schultze, R.; Hansen, U. P. (1991). Patch-Clamp studies on the anomalous mole fraction effect of the K^+ channel of cytoplasmic droplets of *Nitella*: An attempt to distinguish between a multi-ion single-file pore and an enzyme kinetic model with lazy state. *J. Membr. Biol.* 123: 183-190.

- Draber, S.; Schultze, R.; Hansen, U. P. (1993). Cooperative behavior of K⁺-channels in the tonoplast of *Chara corallina*. *Biophys. J.* 65: 1553-1559.
- Dudel, J.; Hallermann, S.; Heckmann, M. (2000). Quartz glass pipette puller operating with a regulated oxy-hydrogen burner. *Eur. J. Physiol.* 441: 175-180.
- Durell, S. R.; Guy, H. R. (1998). Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K⁺ channels in open, closed, and inactivated conformations. *J. of Structural Biol.* 121: 263-284.
- Eisenberg, R. S. (1990). Channels as enzymes. *J. Membr. Biol.* 115: 1-12.
- Eisenman, G.; Latorre, R.; Miller, C. (1986). Multi-ion conduction and selectivity in the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel from skeletal muscle. *Biophys. J.* 50: 1025-1034.
- Elber, R.; Karplus, M. (1987). Multiple conformational states of proteins: a molecular dynamics analysis of myoglobin. *Science* 235: 318-321.
- Esser, J. E.; Liao, Y. J.; Schroeder, J. I. (1997). Characterization of ion channel modulator effects on ABA- and malate-induced stomatal movements: strong regulation by kinase and phosphatase inhibitors, and relative insensitivity to mastoparans. *J. Experimental Botany* 48: 539-550.
- Farokhi, A. (1998). Analyse von Strom-Spannungskurven und Markov-Schalten des K⁺-Kanals in *Chara* in Hinblick auf die Beteiligung schnellen Schaltens beim anomalen Molfraktionseffekt in Anwesenheit von Tl⁺. Diplomarbeit, Kiel.
- Farokhi, A.; Keunecke, M.; Hansen, U. P. (2000). The anomalous mole fraction effect in *Chara*: Gating at the edge of temporal resolution. *Biophys. J.* 79: 3072-3082.
- Feng, Z. P.; Hamid, J.; Doering, C.; Jarvis, S. E.; Bosey, G. M.; Bourinet, E.; Snutch, T. P.; Zamponi, G. W. (2001). Amino acid residues outside of the pore region contribute to N-type calcium channel permeation. *J. Biol. Chem.* 276: 5726-5730.
- Ferguson, W. B.; McManus, O. B.; Magleby, K. L. (1993). Opening and closing transitions for BK channels often occur in two steps via sojourns through a brief lifetime subconductance state. *Biophys. J.* 65: 702-714.
- FitzHugh, R. (1983). Statistical properties of the asymmetric random telegraph signal with application to single channel analysis. *Math. Bioscience* 64: 75-89.
- Fredkin, D. R.; Rice, J. A. (1992). Maximum likelihood estimation and identification directly from single-channel recordings. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 249: 125-132.

- Friel, D. D.; Tsien, R. W. (1989). Voltage-gated calcium channels: direct observation of the anomalous mole fraction effect at the single channel level. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86: 5207-5211.
- Galli, A.; Defelice, L. J.; Duke, B. J.; Moore, K. R.; Blakely, R. D.; (1995): Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *J. Exp. Biol.* 198: 2197-2212.
- Glauner, K. S.; Mannuzzu, L. M.; Gandhi, C. S.; Isacoff, E. Y. (1999). Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 402: 813-817.
- Guy, H. R.; Durell, S. R. (1994). Models of the outer vestibules and selectivity filters of Na^+ , Ca^{2+} and K^+ channels. Presentation at the 38th annual meeting of the Biophysical Society, March 6-10, 1994, New Orleans. *Biophys. J.* 66: A248.
- Haak, T. (2000). Entwicklung und Erprobung einer neuartigen Methode der Einzelkanalstrommessung in biologischen Membranen. Diplomarbeit, Kiel.
- Hagiwara, S.; Miyazaki, S.; Krasne, S.; Ciani, S. (1977). Anomalous permeabilities of the egg cell membrane of a starfish in K^+ - Tl^+ Mixtures. *J. Gen. Physiol.* 70: 269-281.
- Hansen, U. P. (1986). Reaction kinetic models of pumps, co-transporters and channels. In: *Ion Channels and Electrogenic Pumps in Biomembranes. Abstracts of Lectures and Posters, Osaka University*, pp. L13-L33.
- Hansen, U. P.; Albertsen, A.; Moldaenke, C.; Draber, S.; Schultze, R. (1995). Detecting events in signals from sensors: the Hinkley-detector is the answer. *Sensors Materials* 7: 289-300.
- Hansen, U. P.; Cakan, O.; Abshagen, M.; Farokhi, A. (2002). Gating Models of the Anomalous Mole Fraction Effect of Single-Channel Current in *Chara*. *J. Membr. Biol.* Submitted.
- Hansen, U. P.; Gradmann, D.; Sanders, D.; Slayman, C. L. (1981). Interpretation of current-voltage relationships for "active" ion transport systems: I. Steady-state reaction-kinetic analysis of class-I mechanisms. *J. Membr. Biol.* 63: 165-190.
- Hansen, U. P.; Keunecke, M.; Blunck, R. (1997). Gating and permeation models of plant channels. *J. Exp. Bot.* 48: 365-382.
- Hansen, U. P.; Tittor, J.; Gradmann, D. (1983). Interpretation of current-voltage relationships for "active" ion transport systems: II Nonsteady-state reaction-kinetic analysis of class-I mechanisms with one slow time-constant. *J. Membr. Biol.* 75: 141-169.

- Harlfinger, P. (2000). Bestimmung sehr schneller Übergangsraten in Markov-Prozessen durch verbesserte Berücksichtigung der Amplitudenverteilung im direkten Zeitreihenfit. Diplomarbeit, Kiel.
- Hawkes, A. G.; Jalali, A.; Colquhoun, D. (1992). Asymptotic distributions of apparent open times and shut times in a single channel record allowing for the omission of brief events. *Philosophical Transactions of the Royal Soc. Lond. B.* 337: 383-404.
- Hedrich, R.; Bregante, M.; Dreyer, I.; Gambale, F. (1995). The voltage-dependent potassium-uptake channel of corn coleoptiles has permeation properties different from other K⁺ channels. *Planta* 197: 193-199.
- Heginbotham, L.; Lu, Z.; Abramson, T.; MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* 66: 1061-1067.
- Heldt, H. W. (1999). *Pflanzenbiochemie* 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Herzig, S.; Patil, P.; Neumann, J.; Staschen, C. M.; Yue, D. T. (1993). Mechanisms of β -adrenergic stimulation of cardiac Ca²⁺ channels revealed by discrete-time Markov analysis of slow gating. *Biophys. J.* 65: 1599-1612.
- Hess, P.; Tsien, R. W. (1984). Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* 309: 453-456.
- Hille, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Hille, B.; Schwarz, W. (1978). Potassium channels as multi-ion-single-file pores. *J. Gen. Biol.* 72: 409-442.
- Hinkley, D. V. (1971). Inference about the change-point from cumulative-sum-tests. *Biometrika* 57: 1-17.
- Ho, K.; Nichols, C. G.; Lederer, W. J.; Lytton, J.; Vassilev, P. M.; Kanazirska, M. V.; Hebert S. C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362: 31-37.
- Huth, T. (1999). Entwicklung und Erprobung von Methoden zur Analyse des schnellen Schaltens beim Na⁺-Kanal von N1E-115 Neuroblastomzellen. Diplomarbeit, Kiel.
- Immke, D.; Wood, M.; Kiss, L.; Korn, S. J. (1999). Potassium-dependent changes in the conformation of the Kv2.1 potassium channel pore. *J. Gen. Physiol.* 113: 819-836.
- Jackson, M. B. (1997). Inversion of Markov processes to determine rate constants from single channel data. *Biophys. J.* 73: 1382-1394.

- Jan, L. Y.; Jan, Y. N. (1992). Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 537-555.
- Junge, W.; Lill, H.; Engelbrecht, S. (1997). ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem. Sci.* 22: 420-423.
- Keller, B. U.; Hedrich, R.; Raschke, K. (1989). Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* 341: 450-453.
- Keunecke, M. (1995). Untersuchung des anomalen Molfraktionseffektes an der Grünalge *Chara corallina*. Diplomarbeit, Kiel.
- Keunecke, M. (2000). Untersuchungen zum Ionentransport aus dem Xylem in den Symplasten des Maisblattes. Doktorarbeit, Kiel.
- Keunecke, M.; Hansen, U. P. (2000). Different pH-dependence of K⁺ channel activity in bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *Planta* 210: 792-800.
- Keunecke, M.; Sutter, J. U.; Sattelmacher, B.; Hansen, U. P. (1997). Isolation and patch clamp measurements of xylem contact cells for the study of their role in the exchange between apoplast and symplast of leaves. *Plant and Soil* 196: 239-244.
- Kijima, S.; Kijima, H. (1987a). Statistical analysis of channel current from a membrane patch: I. Some stochastic properties of ion channels or molecular systems in equilibrium. *J. Theor. Biol.* 128: 423-434.
- Kijima, S.; Kijima, H. (1987b). Statistical analysis of channel current from a membrane patch: II. Some stochastic theory of a multi-channel system in the steady-state. *J. Theor. Biol.* 128: 435-455.
- Kirsch, G. E.; Pascual, J. M.; Sheih, C. C. (1995). Functional role of a conserved aspartate in the external mouth of voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.* 68: 1804-1813.
- Kirst, U. (1997). Modellierung und Softwareentwicklung für die statistische Analyse von Patch-Clamp-Daten. Diplomarbeit, Kiel.
- Kiss, L.; Immke, D.; Turco, J. L.; Korn, S. (1998). The interaction of Na⁺ and K⁺ in voltage-gated potassium channels: Evidence for cation binding sites of different activity. *J. Gen. Physiol.* 111: 195-206.
- Kiss, L.; Korn, S. J. (1998). Modulation of C-type inactivation by K⁺ at the potassium channel selectivity filter. *Biophys. J.* 74: 1840-1849.
- Kiss, T.; LoTurco, J.; Korn, S. J. (1999). Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys. J.* 76: 253-263.

- Klein, S.; Timmer, J.; Honerkamp, J. (1997). Analysis of multi channel patch clamp recordings by Hidden Markov models. *Biometrics* 53: 870-884.
- Klieber, H. G.; Gradmann, D. (1993). Enzyme kinetics of the prime K⁺ channel in the tonoplast of *Chara*: selectivity and inhibition. *J. Membr. Biol.* 132: 253-265.
- Korn, S. J.; Horn, R. (1988). Statistical discrimination of fractal and Markov models of single-channel gating. *Biophys. J.* 54: 871-877.
- Kubo, Y.; Baldwin, T. J.; Slesinger, P. A.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362: 127-133.
- Lankat-Buttgereit, B.; Tampé, R. (2002). The transporter associated with antigen processing: Function and implications in human diseases. *Physiol. Rev.* 82: 187-204.
- Larsson, H. P.; Baker, O. S.; Dhillon, D. S.; Isacoff, E. Y. (1996). Transmembrane movement of the Shaker K⁺ channel S4. *Neuron* 16: 287-397.
- Larsson, H. P.; Elinder, F. (2000). A conserved glutamate is important for slow inactivation in K⁺ channels. *Neuron* 27: 573-583.
- Läuger, P. (1980). Kinetic properties of ion carriers and channels. *J. Membr. Biol.* 57: 163-178.
- Läuger, P. (1985). Ionic channels with conformational substates. *Biophys. J.* 47: 581-591.
- Levis, R. A.; Rae, J. L. (1998). Low-noise patch-clamp techniques. *Methods-Enzymol.* 293: 218-66.
- Levy, D. I.; Deutsch, C. (1996). Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys. J.* 70: 798-805.
- Loots, E.; Isacoff, E. Y. (2000). Molecular coupling of S4 to a K⁺ channel's slow inactivation gate. *J. Gen. Physiol.* 116: 623-635.
- Lu, T.; Wu, L.; Xiao, J.; Yang, J. (2001). Permeant ion-dependent changes in gating of Kir2.1 inward rectifier potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 118: 509-521.
- Lühring, H. E. (1986). Recording of single K⁺ channels in the membrane of cytoplasmic drop of *Chara australis*. *Protoplasma* 133: 19-28.
- Lühring, H. E. (1999). pH-sensitive gating kinetics of the maxi-K channel in the tonoplast of *Chara australis*. *J. Membr. Biol.* 168: 47-61.

- Maathuis, F. J. M.; Sanders, D. (1992). Plant membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology* 4: 661-669.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of voltage-activated potassium channel. *Nature* 350: 232-235.
- Magleby, K. L. (2001). Commentary: Kinetic gating mechanisms for BK channels: When complexity leads to simplicity. *J. Gen. Physiol.* 118: 583-587.
- Mathur, R.; Zheng, J.; Yan, Y.; Sigworth, F. J. (1997). Role of the S3-S4 linker in *Shaker* potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* 109: 191-199.
- Matteson, D. R.; Swenson, R. P. (1986). External monovalent cations that impede the closing by acting at a site in the channel. *J. Gen. Physiol.* 87: 795-816.
- Miller, C. (1991). Annus Mirabilis of potassium channels. *Science* 252: 1092-1096.
- Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12: 88-118.
- Morais-Cabral, J. H.; Zhou, Y.; MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414: 37-42.
- Moss, B. L.; Magleby, K. L. (2001). Gating and conductance properties of BK channels are modulated by the S9-S10 tail domain of the α Subunit: A study of mSlo1 and mSlo3 wild-type and chimeric channels. *J. Gen. Physiol.* 118: 711-734.
- Moss, B. L.; Silberberg, S. D.; Nimigean, C. M.; Magleby, K. L. (1999). Ca²⁺-dependent gating mechanisms for dSlo, a large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel. *Biophys. J.* 76: 3099-3117.
- Murata, K.; Mitsuoka, K.; Hirai, T.; Walz, T.; Agre, P.; Heymann J. B.; Engel, A.; Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 207: 599-605.
- Nedler, J. A.; Mead, R. (1965). A simplex method for function minimization. *Computer J.* 7: 308.
- Neher, E.; Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Nelson, D.; Cox, M. (2001). *Lehninger, Biochemie*, 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin.
- Nonner, W.; Chen, D. P.; Eisenberg B. (1998). Anomalous mole fraction effect, electrostatics, and binding in ionic channels. *Biophys. J.* 74: 2327-2334.

- Numberger, M.; Draguhn, A. (1996). Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Ogielska, E. M.; Aldrich, R. W. (1998). A mutation in S6 of *Shaker* potassium channels decreases the K⁺ affinity of an ion binding site revealing ion-ion interactions in the pore. *J. Gen. Physiol.* 112: 243-257.
- Ogielska, E. M.; Aldrich, R. W. (1999). Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore: Ion interaction and C-type inactivation. *J. Gen. Physiol.* 113: 347-358.
- Ophasi, L. R.; Webb, W. W. (1994). Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes. *Biophys. J.* 66: 75-79.
- Page, E. S. (1954). Continuous inspection schemes. *Biometrika* 41: 100-115.
- Page, E. S. (1955). A test for a change in parameter occurring at an unknown point. *Biometrika* 42: 523-527.
- Pallotta, B. S.; Wagoner, P. K. (1992). Voltage-dependent potassium channels since Hodgkin and Huxley. *Physiol. Rev.* 72: 53-67.
- Pardo, L. A.; Heinemann, S. H.; Terlau, H.; Ludewig, U.; Lorra, C.; Pongs, O.; Stuehmer, W. (1992). Extracellular potassium modulates a rat brain potassium channel. *PNAS* 89: 2466-2470.
- Parzefall, F.; Wilhelm, R.; Heckmann, M.; Dudel, J. (1998). Single channel currents at six microsecond resolution elicited by acetylcholine in mouse myoballs. *J. Physiol.* 512: 181-188.
- Perozo, E.; Cortes, D. M.; Cuello, L. G. (1999). Structural rearrangements underlying K⁺ channel activation gating. *Science* 285: 73-78.
- Pietrobon, D.; Prod'hom, B.; Hess, P. (1988). Conformational changes associated with ion permeation in L-type calcium channels. *Nature* 333: 373-376.
- Pongs, O. (1992). Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev.* 72: 69-88.
- Press, W. H.; Flannery, B. P.; Teukolsky S. A.; Vetterling, W. T. (1987). *Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sidney. pp 326-330.
- Proks, P.; Capener, C. E.; Jones, P.; Ashcroft, F. M. (2001). Mutations within the P-loop of Kir6.2 modulate the intraburst kinetics of the ATP-sensitive potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 118: 341-353.

- Pusch, M. (1996). Knocking at the channel's door. The permeating chloride ion acts as the gating charge in ClC-O. *J. Gen. Physiol.* 108: 233-236.
- Pusch, M.; Ludewig, U.; Rehfeldt, A.; Jentsch, T. J. (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-O by the permeant anion. *Nature* 373: 527-531.
- Qin, F., Auerbach, A., Sachs, F. (1996). Estimating single channel kinetic parameters from idealized patch clamp data containing missed events. *Biophys. J.* 70: 264-280.
- Radomski, O. (2000). Programmentwicklung zur modellgestützten Analyse von Zeitreihen verrauschter Markovprozesse mit ein- und zweidimensionalen Dwell-Time-Histogrammen. Diplomarbeit, Kiel.
- Rießner, T. (1994). Statistische Analyse von schnellen Schaltereignissen in Patch-Clamp Daten mit Hilfe von erweiterten Beta-Verteilungen. Diplomarbeit, Kiel.
- Rießner, T. (1998). Level detection and extended beta distributions for the analysis of fast rate constants of Markov processes in sampled data. Doktorarbeit, Kiel.
- Rießner, T.; Woelk, F.; Abshagen, M.; Hansen, U. P. (2002). A new level detector for ion channel analysis. *J. Membr. Biol.* submitted.
- Rosenmund, C.; Stern-Bach, Y.; Stevens, C. F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280: 1596-1599.
- Rothberg, B. S.; Magleby, K. L. (2000). Voltage and Ca^{2+} activation of single large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels described by a two-tiered allosteric gating mechanism. *J. Gen. Physiol.* 116: 75-99.
- Roux, B.; Sauvé, R. (1985). A general solution to the time interval omission problem applied to single-channel analysis. *Biophys. J.* 48: 149-158.
- Ruiz, M. L.; Karpen, J. W. (1999). Opening mechanism of a cyclic nucleotide-gated channel based on analysis of single channels locked in each liganded state. *J. Gen. Physiol.* 113: 873-895.
- Sakano, K.; Tazawa, M. (1986). Tonoplast origin of the envelope membrane of cytoplasmic droplets prepared from *Chara* internodal cells. *Protoplasma* 131: 247-249.
- Sanders, D. (1988). Solute transport in plant cells and tissues. Monographs and surveys in the biosciences. Wilkens M (ed.) Longman Scientific & Technical.
- Sanders, D.; Hansen, U. P. (1981). Mechanism of Cl^- transport at the plasma membrane of *Chara corallina*. II. Transinhibition and the determination of H^+/Cl^- binding order from a reaction kinetic model. *J. Membr. Biol.* 58: 139-153.

- Sanders, D.; Hansen, U. P.; Gradmann, D.; Slayman, C. L. (1984). Generalized kinetic analysis of ion-driven cotransport systems: a unified interpretation of selective ionic effects on Michaelis parameters. *J. Membr. Biol.* 77: 123-152.
- Schneggenburger, R.; Ascher P. (1997). Coupling of permeation and gating in an NMDA-channel pore mutant. *Neuron* 18: 167-177.
- Schottky, W. (1922). Zur Berechnung und Beurteilung des Schroteffekts. *Ann. d. Phys.* 68: 157-176.
- Schultze, R. (1990). Untersuchung zum Auftreten des anomalen Molfraktionseffektes der Strom-Spannungskurven des biologischen Kaliumkanals mit Hilfe von Computersimulationen und analytischen Kriterien. Diplomarbeit, Kiel.
- Schultze, R.; Draber, S. (1993). A nonlinear filter algorithm for the detection of jumps in patch-clamp data. *J. Membr. Biol.* 132: 41-52.
- Schulz-Lessdorf, B.; Hedrich, R. (1995). Protons and calmodulin modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment - channel interaction with calmodulin inhibitors. *Planta* 197: 655-671.
- Serrano, R. (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947: 1-28.
- Shi, J.; Cui, J. (2001). Intracellular Mg^{2+} enhances the function of BK-type Ca^{2+} -activated K^+ channel. *J. Gen. Physiol.* 118: 589-605.
- Sigworth, F. J. (1983). Electronic design of the patch-clamp. In: *Single Channel Recording*. Sakmann, B. and Neher, E., editors. Plenum Press, New York and London. pp 3-35.
- Singer, S. J.; Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of cell membranes. *Science* 173: 720-731.
- Song, L.; Magleby, K. L. (1994). Testing for microscopic reversibility in the gating of maxi sK^+ channels using two-dimensional dwell-time distributions. *Biophys. J.* 67: 91-104.
- Stern-Bach, Y.; Russo, S.; Neuman, M.; Rosenmund, C. (1998). A point mutation in the glutamate binding site blocks desensitization of AMPA receptors. *Neuron* 21: 907-918.
- Stryer, L. (1996). *Biochemie*. 4 Aufl. Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.

- Sun, Z. P.; Akabas, M. H.; Goulding, E. H.; Karlin, A.; Siegelbaum, S. A. (1996). Exposure of residues in the cyclic nucleotide-gated channel pore: P region structure and function in gating. *Neuron* 16: 141-149.
- Sunderman, E. R.; Zagotta, W. N. (1999a). Mechanism of allosteric modulation of rod cyclic nucleotide gated channels. *J. Gen. Physiol.* 113: 601-620.
- Sunderman, E. R.; Zagotta, W. N. (1999b). Sequence of events underlying the allosteric transition of rod cyclic nucleotide gated channels. *J. Gen. Physiol.* 113: 621-640.
- Sutter, U. (1996). Biophysikalische Untersuchungen an Xylemkontaktzellen: Präparation, Meßtechnik, Transporteigenschaften und Modellentwicklung. Diplomarbeit, Kiel.
- Swenson, R. P.; Armstrong, C. M. (1981). K^+ channels close more slowly in the presence of external K^+ and Rb^+ . *Nature* 291: 427-429.
- Tabcharani, J. A.; Rommens, J. M.; Hou, Y. X.; Chang, X. B.; Tsui, L. C.; Riordan, J. R.; Hanrahan, J. W. (1993). Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature* 366: 79-82.
- Tester, M. (1988). Potassium channels in the plasmalemma of *Chara corallina* are multi-ion pores: voltage-dependent blockade by Cs^+ and anomalous permeabilities. *J. Membr. Biol.* 105: 87-94.
- Townsend, C.; Horn, R. (1999). Interaction between the pore and the fast gate of the cardiac sodium channel. *J. Gen. Physiol.* 113: 321-331.
- Urban, B. W.; Hladky, S. B. (1979). Ion transport in the simplest single ion pore. *Biochim. Biophys. Acta* 554: 410-429.
- Vanselow, K. H.; Hansen, U. P. (1989) Rapid effect of light on the K^+ -channel in the plasmalemma of *Nitella*. *J. Membr Biol.* 110: 175-187.
- Wagoner, P. K.; Oxford, G. S. (1987). Cation permeation through the voltage-dependent potassium channel in the squid axon. *J. Gen. Physiol.* 90: 261-290.
- Wang, H. L.; Ohno, K.; Milone, M.; Brengman, J. M.; Evoli, A.; Batocchi, A. P.; Middleton, L. T.; Christodoulou, K.; Engel A. G.; Sine, S. T. (2000). Fundamental gating mechanism of nicotinic receptor channel revealed by mutation causing a congenital myasthenic syndrome. *J. Gen. Physiol.* 116: 449-460.
- Weberling, F.; Schwantes, H. O. (1981). Pflanzensystematik. Ulmer Verlag UTB Stuttgart.

- Weise, R. ; Gradmann, D. (2000). Effects of Na⁺ on the predominant K⁺ channel in the tonoplast of *Chara*: Decrease of conductance by blocks in 100 nanosecond range and induction of oligo- or poly-subconductance gating modes J. Membrane Biol. 175: 87-93.
- White, P. J. (1996). The permeation of ammonium through a voltage-independent K⁺ channel in the plasma membrane of rye. J. Membr. Biol. 152: 89-99.
- Woelk, F. (2000). Signaldetektion bei verrauschten Markov-Prozessen. Diplomarbeit, Kiel.
- Woodhull, A. M. (1973). Ionic blockade of sodium channels in nerve. J. Gen. Physiol. 61: 687-708.
- Wu, J. (1991). Microscopic model for selective permeation in ion channels. Biophys. J. 60: 238-251.
- Wu, J. (1992). Dynamic ion-ion and water-ion interactions in ion channels. Biophys. J. 61: 1316-1331.
- Yang, N.; George, A. L.; Horn, R. (1996). Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. Neuron 16: 113-22.
- Yellen, G. (1984). Ionic permeation and blockade in Ca²⁺ activated K⁺ channels of bovine chromaffin cells. J. Gen. Physiol. 84: 157-186.
- Yellen, G.; Sodickson, D.; Chen, T. Y.; Jurman, M. E. (1994). An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. Biophys. J. 66: 1068-1075.
- Yeo, G. F.; Milne, R. K.; Edeson, R. O.; Madsen, B. W. (1988). Statistical inference from single channel records: two state Markov model with limited time resolution. Proc. R. Soc. Lond. B. 235: 63-94.
- Yool, A. J.; Schwarz, T. L. (1996). Anomalous mole fraction effect induced by mutation of the H5 pore region in the K⁺ *Shaker* channel. Biophys. J. 71: 2467-2472.
- Zannello, L. P.; Barrantes, F. J. (1994). Temperature sensitivity of the K⁺ channel of *Chara*. A thermodynamic analysis. Plant Cell Physiol. 35(2): 243-255.
- Zhang, X.; Solaro, C. R.; Lingle, C. J. (2001). Allosteric regulation of BK channel gating by Ca²⁺ and Mg²⁺ through a non-selective, low affinity divalent cation site. J. Gen. Physiol. 118: 607-635.
- Zheng, J.; Vankataramanan, L.; Sigworth, F. J. (2001). Hidden Markov model analysis of intermediate gating steps associated with the pore gate of Shaker potassium channels. J. Gen. Physiol. 118: 547-562.

Zhou, Y; Morais-Cabral, J. H.; Kaufman, A.; MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-48.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulf-Peter Hansen danke ich an erster Stelle, für das interessante Thema, die hervorragende Betreuung der Promotionsstelle und den nötigen Freiraum, den er mir gewährt hat. Seine konstruktiven Vorschläge und Beiträge machten diese Arbeit erst möglich.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen und kritischen Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Tobias Huth, Felix Woelk, besonders Oliver Radomski und Enno Hammes danke ich für die Antworten und Hilfestellungen bei den vielen Computerfragen und die kompetente Diskussionsbereitschaft.

Maike Abshagen, Tobias Huth, Thomas Haak und Ogün Cakan danke ich für das nette Klima beim Patchen, Maike Abshagen für ihre Hilfe bei den Mikroskop-Aufnahmen, Thomas Haak und Ogün Cakan für ihre Hilfe bei der Anzucht der Algen. Besonders bedanke ich mich bei Ogün Cakan für die angenehme Zimmer- und Arbeitsatmosphäre, die nicht nur die Arbeit weiter brachte, sondern auch noch angenehm machte.

Mein ganz herzlicher Dank geht an Katrin Schinner für die tolle Freundschaft und ihre Mitwirkung und Unterstützung vom Anfang bis zum Ende dieser Arbeit.

Vielen Dank an Astrid Erdmann und Oliver Karschnick, die beim Korrekturlesen dieser Arbeit äußerst hilfreich mitgewirkt haben.

Bei meiner Frau Shirin Jafarisabaei möchte ich mich in ganz besonderer Weise herzlich bedanken, da sie immer meine Launen ertrug und mich dabei trotzdem tatkräftig unterstützte.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und den Eltern von Shirin, die mich jederzeit unterstützten.