

4-Mode-Gating-Modell

Modellierung der Inaktivierung des Natriumkanals

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

vorgelegt von
Tobias Huth

Kiel, April 2005

Referent: Prof. Dr. U.P. Hansen

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

.....

Der Dekan

Vorbemerkung

Teilergebnisse dieser Dissertation sind bereits wie folgt vorab veröffentlicht worden:

Klose, A., Huth, T., Alzheimer, C. (2005) PLC-independent suppression of potassium channels by the PLC inhibitor U73122. Pflugers Arch, 449: 81.

Schröder, I., Harlfinger, P., Huth, T., Hansen, U. P. (2005) A Subsequent Fit of Time Series and Amplitude Histogram of Patch-Clamp Records Reveals Rate Constants up to 1 per Microsecond. J Membr Biol, 202: in press.

Schröder, I., Huth, T., Sutchmezian, V., Jarosik, J., Schnell, S. and Hansen, U. P. (2004) Distributions-per-level: a means of testing level detectors and models of patch-clamp data. J Membr Biol, 197: 49-58.

Diese Arbeit wurde finanziert vom

BMBF (Projektnummer: 03F0261A)

der DFG (Projektnummer: Ha 712/11-3)

und der Fraunhofer Gesellschaft (Projektnummer: M/SAB1/3/A005)

1	Einleitung	1
2	Einführung in die Grundlagen des Natriumkanals	3
2.1	ELEKTROPHYSIOLOGIE DES NATRIUMKANALS	3
2.2	UNTERSUCHUNGEN AM NATRIUMKANAL	4
2.3	MOLEKULARE STRUKTUR UND FUNKTION DES NATRIUMKANALS	5
2.4	MODELLIERUNG MIT MARKOV-MODELLEN	10
3	Material und Methoden: Molekularbiologie	13
3.1	ZELLKULTUR	13
3.2	VEKTOREN UND BAKTERIEN	16
3.3	KLONIERUNG DER BAKTERIEN UND PLASMIDGEGWINNUNG	18
3.4	NACHWEISMETHODEN	21
3.5	LIPOSOMALE TRANSFEKTION	25
3.6	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON NAV1.2A	27
3.7	STABILE TRANSFEKTION	28
3.8	SEQUENZIERUNG VON NAV1.2A	31
4	Material und Methoden: Elektrophysiologie	33
4.1	PATCH-CLAMP-TECHNIK	33
4.2	DER PATCH-CLAMP-VERSTÄRKER	35
4.3	DER PATCH-CLAMP-AUFBAU	36
4.4	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	40
4.5	KOMMANDOPOTENTIALIA	44
4.6	SEEANEMONENTOXINE	45
4.7	MESSLÖSUNGEN	48
4.8	HERSTELLUNG DER PIPETTEN UND DER BADELEKTRODEN	49
5	Material und Methoden: Auswertung	51
5.1	AUFBEREITUNG VON WHOLE-CELL MESSUNGEN	52
5.2	AUFBEREITUNG VON SINGLE-CHANNEL-MESSUNGEN	53
5.3	ADDITION DER EINZELKANALDATEN	55
5.4	HINKLEY-DETEKTOR	56
5.5	VERTEILUNG FÜR SEPARATE STROMNIVEAUS	59
5.6	DWELL-TIME-HISTOGRAMME UND DEPENDENCY-PLOTS	61
5.7	SEQUENTIELLE DWELL-TIME-HISTOGRAMME	65
5.8	2-DIMENSIONALER-DWELL-TIME-FIT	68
5.9	DIREKTER-ZEITREIHENFIT	77
6	Ergebnisse: Leistungen der Fit-Algorithmen	79
6.1	DIREKTER-ZEITREIHENFIT BEI EREIGNISGESTEUERTEN DATEN	79
6.2	FEHLERBERECHNUNG IM 2D-FIT	80
6.3	AUSWIRKUNGEN DER LÄNGE DER SIMULIERTEN ZEITREIHE AUF DEN 2D-FIT	84
6.4	GRENZEN DES 2D-FITS	86
6.5	MODELLUNTERSCHIEDUNG	92
6.6	MEHRKANALAUFEICHNUNGEN	96
6.7	LEVELDETEKTION BEI SCHNELLEM SCHALTEN	97
6.8	KOMPLEXE MODELLE	100
7	Transfektionsexperimente	103
7.1	NATIVE HEK293-ZELLEN	103
7.2	TRANSFEKTIONSSUBSTANZEN	104
7.3	SEQUENZIERUNG VON WILDTYP UND F1489Q	107

8	Whole-Cell-Messungen	108
8.1	NEUROBLASTOMZELLEN UND NAV1.2A WILD-TYP	108
8.2	SEEANEMONENTOXINE	109
8.3	CHLORAMINT	111
8.4	NAV1.2A F1489Q	112
9	Einzelkanalmessungen	115
9.1	NACHWEIS DES SCHNELLEN SCHALTENS BEIM MAXIK	115
9.2	BEHANDLUNG DER PIPETTEN	118
9.3	EINZELKANALSTRÖME	119
9.4	EINZELKANALAUFZEICHNUNGEN DER UNVERGIFTETEN KANÄLE	120
9.5	EINZELKANALAUFZEICHNUNGEN VON HEK293 MIT NAV1.2A F1489Q	125
9.6	EINZELKANALAUFZEICHNUNGEN MIT CHLORAMINT	128
9.7	EINZELKANALAUFZEICHNUNGEN MIT SEEANEMONENTOXINEN	137
10	Ergebnisse	145
10.1	PARALLELEN DER GIFTWIRKUNG VON ATX II UND CHLORAMINT	145
10.2	SCHNELLES SCHALTEN BEI NATRIUMKANÄLEN	149
10.3	MODELLIERUNG: ANPASSUNG VON MARKOV-MODELLEN	152
10.4	MODELLIERUNG: DIREKTER-ZEITREIHENFIT	164
10.5	MODELLIERUNG: SIMULATION DER BESETZUNGS-WAHRSCHEINLICHKEIT	165
10.6	MODELLIERUNG: ANPASSUNG DER GEMESSENEN ZEITREIHEN	166
11	Diskussion	175
11.1	EXPRESSION DER Na^+ -KANÄLE IN EINEM HETEROLOGEN SYSTEM	175
11.2	BESCHICHTUNG UND TROCKNUNG DER PIPETTEN	177
11.3	SEQUENTIELLE DWELL-TIME-HISTOGRAMME	178
11.4	2-DIMENSIONALER-DWELL-TIME-FIT	179
11.5	4-MODE-GATING MODELL: BINDUNGSSTELLEN	181
11.6	4-MODE-GATING MODELL: INAKTIVIERUNGSMECHANISMEN	185
11.7	4-MODE-GATING MODELL: SCHNELLES SCHALTEN	190
11.8	4-MODE-GATING-MODELL: ANWENDUNG AUF LITERATURBEISPIELE	193
11.9	4-MODE-GATING-MODELL: PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG	194
12	Zusammenfassung	195
	Literatur	199
	Abkürzungen	214
	Anhang	215
	ANHANG: CHEMIKALIEN, ENZYME UND KITS, PRIMER	215
	ANHANG: VERBRAUCHSMATERIALIEN	216
	ANHANG: GERÄTE	217
	ANHANG: GENSEQUENZ NAV1.2A	218
	ANHANG: PROGRAMMCODE DES ZUFALLSGENERATORS	221
	Danksagung	222

1 Einleitung

Ionenkanäle sind integrale Bestandteile der Membranen von lebenden Zellen, von der Bakterie über Pflanzen bis zum Säugetier. In wechselnder Anzahl und Zusammensetzung sind diese Proteine in die Zellhomöostase eingebunden und an der Informationsübertragung von Zelle zu Zelle maßgeblich beteiligt. Wichtigste Eigenschaften von Kanälen sind die Selektivität für bestimmte Ionen und die Regulation der Öffnung durch bestimmte intra- und extrazelluläre Reize wie z.B. Hormone, Energieversorgung der Zelle und Membranspannung.

Unter den vielen bekannten Ionenkanälen nimmt die immer noch große Gruppe der spannungsabhängigen Kanäle eine besondere Stellung ein. Mit diesen einzigartigen Proteinen, es sind keine weiteren spannungsabhängigen bekannt (Blaustein & Miller, 2004), ist es möglich, auf elektrischem Weg Informationen zwischen Zellverbänden auszutauschen. Dieses betrifft insbesondere 3 Organsysteme, die Informationsübertragung im Nervensystem, die Erregungsleitung am Herzen und die Erregungsleitung am Skelettmuskel.

Eine Sonderstellung nimmt hier der Natriumkanal ein, da er am schnellsten auf die Membranspannung reagiert und das elektrische Konzert der verschiedenen Kanaltypen einleitet. Drei wichtige Eigenschaften zeichnen diesen Kanal aus: die Selektivität für Na^+ -Ionen, die sehr schnelle Aktivierung (Öffnung im Bereich von Bruchteilen einer Millisekunde) und die schnelle selbständige Inaktivierung (das Schließen des Kanals im Bereich von Millisekunden), die an die Öffnung gekoppelt ist. Für die Aufklärung und mathematische Formulierung dieser Eigenschaften haben Hodgkin und Huxley 1963 den Nobelpreis bekommen.

In der Betrachtung der Funktionsweise des Natriumkanals spielte die Modellierung des Natriumstroms an Nerven und Muskelpräparaten schon früh eine wichtige Rolle (Hodgkin und Huxley, 1952). Seit dieser Zeit wurden die Modellvorstellungen immer mehr erweitert und verfeinert (Bezanilla & Armstrong, 1977; Armstrong & Bezanilla, 1977; Nonner, 1980; Horn & Vandenberg, 1984; Patlak 1991; Vandenberg & Bezanilla, 1991; Marks & Jones 1992; Keynes, 1994). Besonders die Einführung neuer Messmethoden, z.B. die Aufzeichnung von Gating-Currents und die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981) hat hier einen großen Anteil. Patch-Clamp-Untersuchungen erlauben jetzt sogar die kinetische Betrachtung des einzelnen Natriumkanalproteins.

Seit ca. 10 Jahren ist es dann um biophysikalische Fragestellungen, die den Natriumkanal betreffen, relativ still geworden. Einige wenige Autoren haben sich mit der Modellierung der Struktur-Funktions-Beziehung des Natriumkanals beschäftigt. Das betrifft die Veränderung der Inaktivierung durch Toxine (Benzinger et al., 1999), durch Anästhetika (Balsler et al., 1996) durch die Temperatur (Irvine et al., 1999), durch Mutationen (Clancy & Rudy, 2002) und das Membranpotential (Keynes & Elinder, 1998).

Dieses hat mehrere Ursachen. Die wichtigste ist wohl, dass durch molekularbiologische Methoden ein sehr einfacher Zugriff auf die Proteinfunktionen gegeben ist. Im Vergleich zu diesen Methoden scheint der Arbeitsaufwand einer komplexen Modellierung im Verhältnis zu den erzielbaren Aussagen sehr beschränkt (z.B. Keynes & Elinder, 1998). Molekularbiologische Untersuchungen sind es dann auch, die bis heute zu einer schon sehr detaillierten Betrachtung der Struktur-Wirkungsbeziehungen führen (siehe Catterall, 2000; Goldin, 2003) und zum Teil auch aus Untersuchungen am Kaliumkanal abgeleitet werden können (Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2002).

Ein weiterer Grund ist, dass der Natriumkanal einen sehr geringen Kanalstrom aufweist und man im Vergleich zu Kaliumkanälen eine aufwendigere Mess- und

Analysetechnik für die Modellierung von Einzelkanalableitungen benötigt. Vorhandene Methoden zur Modelluntersuchung am Kaliumkanal können deshalb nur mit mäßigem Erfolg auf Natriumkanäle übertragen werden (Michalek et al., 1999). Man wendet sich deshalb einfacheren Objekten zu, wie zum Beispiel dem MaxiK (Rothberg & Magleby, 1999, 2000; Magleby, 2003) oder dem Shaker-Kanal (Zheng et al., 2001).

In der heutigen Forschung hat die Modellierung von komplexen Zusammenhängen in elektrisch erregbaren Geweben (Herz und Nervengewebe) einen hohen Stellenwert (siehe z.B. Del Giudice et al, 2003; Garny et al., 2005). Allerdings sind diese Studien schon weit entfernt von einer Struktur-Funktionsanalyse des Kanalproteins und tragen zum Verständnis hier nicht wesentlich bei.

In dieser Arbeit kann nun in fast idealer Weise der Faden der Modellierung wieder aufgegriffen und mit molekularbiologischen Erkenntnissen verknüpft werden.

Grundlage hierfür ist eine deutlich verbesserte Mess- und Auswertetechnik und ein sehr leistungsfähiges Werkzeug der Modellierung, der 2-Dimensionale-Dwell-Time-Fit, der in dieser Arbeit für den Natriumkanal weiterentwickelt wird. Die Brücke zu der Molekularbiologie wird durch eine Natriumkanalmutante hergestellt, bei der eine wichtige Funktion der Inaktivierung verändert ist (West et al., 1992; Kellenberger et al., 1997a).

Richtig spannend wird die Modellierung in dieser Arbeit aber erst dadurch, dass es gelingt, mit dem irreversibel bindenden ChloraminT (Wang, 1984; Rack et al., 1986; Niemann et al., 1991; Quinonez et al., 1999; Huth, 1999) die Mechanismen der Inaktivierung kinetisch voneinander zu trennen. Nun besteht ein Zugriff auf 4 unterschiedliche Modi der Beeinträchtigung der Inaktivierung, ein Ansatz der vorher schon von Ruiz & Karpen (1997, 1999) für einen Kaliumkanal beschrieben wurde und zu wesentlichen Erkenntnissen im Bereich der Gating-Mechanismen geführt hat.

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die mit dem ChloraminT gewonnene Modellvorstellung auf die reversibel die Inaktivierung beeinflussenden Seeanemonentoxine (Catterall, 1988; Norton, 1991; Schmidt, 2000) übertragen werden kann. Die Vorstellung, dass nur ein Toxinmolekül pro Kanal bindet (Chen et al., 1996; Rogers et al., 1996; Sheets et al., 1999; Blumenthal & Seibert, 2003) muss nun revidiert werden.

Dieses führt in dieser Arbeit zu dem 4-Mode-Gating-Modell der Inaktivierung, das besagt, dass am Natriumkanal 4 Bindungsstellen für ChloraminT oder Seeanemonentoxine vorhanden sind und durch die jeweilige Anzahl der besetzten Bindungsstellen eine definierte Beeinträchtigung der Inaktivierung auftritt.

2 Einführung in die Grundlagen des Natriumkanals

Dieses Kapitel beschränkt die Darstellung der Grundlagen der Forschung zum Natriumkanal auf das, was notwendig ist zum Verstehen der vorliegenden Arbeit. Für tiefer gehende allgemeine Einblicke sei auf die Zitate verwiesen.

2.1 Elektrophysiologie des Natriumkanals

Natriumkanalproteine lassen sich in den Membranen elektrisch erregbarer Zellen der meisten Invertebraten und Vertebraten finden (Goldin, 2002). Sie sind Bestandteil eines Systems, mit dem auf elektrischem Wege Informationen zwischen Zellen ausgetauscht werden können. Das betrifft hauptsächlich Gewebe des Nervensystems, des Herzmuskels und der Skelettmuskulatur.

Die das Signal tragenden Änderungen der elektrischen Membranspannung (Aktionspotential) entstehen durch spannungsabhängiges Öffnen von Na^+ - und K^+ -Kanälen. Die Natriumkanäle sind für den schnellen Anstiegs des Aktionspotentials verantwortlich (Abbildung 2.1). Dabei wird das Membranpotential durch einen kurzfristigen Anstieg der Natriumleitfähigkeit in Richtung auf das Na^+ -Gleichgewichtspotential verschoben. Durch die folgende schnelle Abnahme der Na^+ - und eine verzögert einsetzende Zunahme der K^+ -Leitfähigkeit strebt das Membranpotential nach einigen Millisekunden wieder gegen das Kaliumgleichgewichtspotential. Der Vorgang kann von neuem ablaufen.

Auf diesem elektrischen Weg können Informationen in komplexen Organismen schnell transportiert werden und am Zielorgan bestimmte Wirkungen wie z.B. die Kontraktion einer Muskelzelle auslösen.

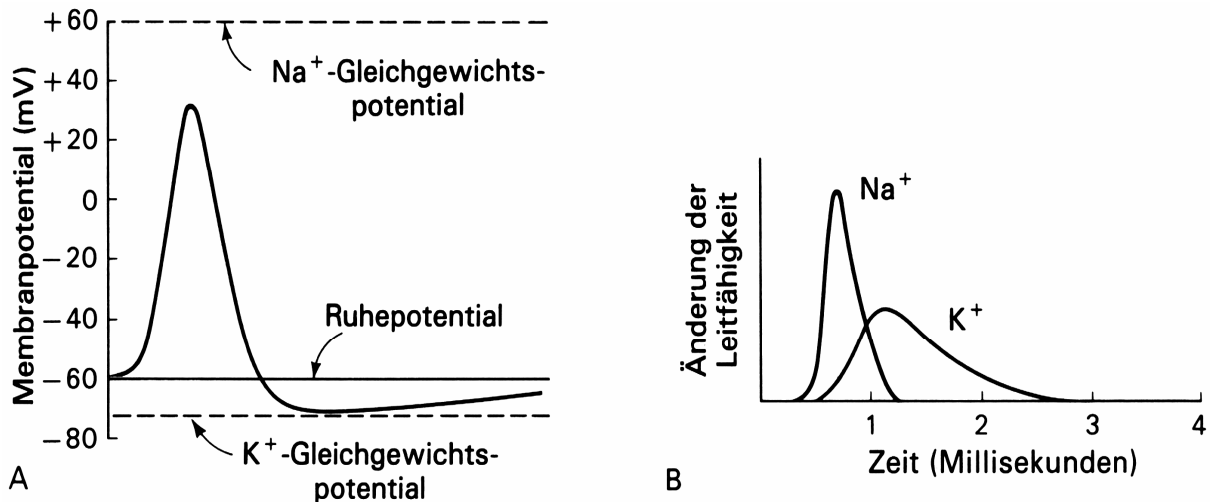


Abbildung 2.1 (A) Zeitlicher Ablauf eines Aktionspotentials mit Darstellung der Nernstpotentiale für Natrium- und Kaliumionen (gleiche Zeitachse in (A) und (B))
(B) Änderung der relativen Leitfähigkeit für Natrium- und Kaliumionen mit der Zeit (Stryer, 1996)

Den Zusammenhang zwischen Na^+ -Kanälen, K^+ -Kanälen und der Membranspannung haben Hodgkin und Huxley (1952) zum ersten Mal mathematisch formuliert und damit die bis heute gültige Grundlage für die Forschung am Aktionspotential und verwandter Phänomene gelegt. Die bereits von Hodgkin und Huxley postulierten Schlüsselfunktionen des einzelnen

Natriumkanals beschreibt Abbildung 2.2 aus moderner Sicht: (a) die spannungsabhängige Öffnung des Kanals, (b) die schnelle Inaktivierung und (c) die selektive Leitfähigkeit für Natriumionen. Das Aktionspotential resultiert aus einer Aufsummation der Einzelkanalleitfähigkeiten einiger hundert Kanäle.

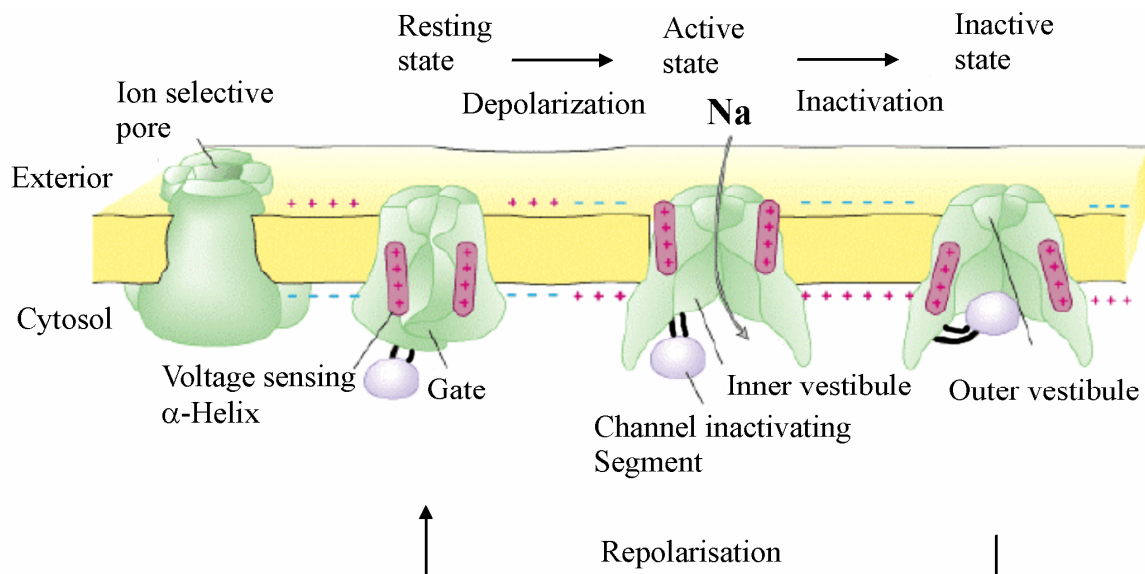


Abbildung 2.2 Vereinfachte Darstellung der Funktion eines Natriumkanals (nach Armstrong & Hille, 1998)

In der Abbildung sind die drei Grundzustände des Natriumkanals, geschlossen aktivierbar (Resting State), offen aktiviert und geschlossen inaktiviert nach Hodgkin und Huxley (1952) eingezeichnet.

2.2 Untersuchungen am Natriumkanal

Nach den bahnbrechenden Erkenntnissen von Hodgkin und Huxley (1952) wurden in den 60er und 70er Jahren mit der Voltage-Clamp-Technik (Marmont, 1949) an Tintenfisch-Axonen und myelinisierten Nervenfasern von Vertebraten die grundlegenden Funktionen des Natriumkanals analysiert (Armstrong, 1981; Hille, 1984).

Während der 70er und Anfang der 80er Jahre kamen elektrochemische Studien mit der Patch-Clamp-Technik und die selektive Markierung der Kanäle mit Toxinen hinzu, die bis heute wichtige Werkzeuge in der Untersuchung von Ionenkanälen sind. Diese biochemischen Methoden führten zur Entdeckung der Struktur des Natriumkanal-Proteins mit einer α -Einheit (260 kDa), einer β_1 -Einheit (36 kDa) und einer β_2 -Einheit (33 kDa) (Beneski & Catterall, 1980; Agnew et al., 1980; Hartshorne & Catterall, 1981; Hartshorne et al., 1982).

Mit molekularbiologischen Methoden und Antikörpern gegen das Kanalprotein konnten Noda et al. (1984) die cDNA von *eel electroplax* bestimmen. Die Entschlüsselung weiterer cDNAs, z.B. aus dem Gehirn der Ratte und die funktionelle Expression der Kanäle in Oozyten und später im Zellmodell folgten (Goldin et al., 1986; Noda et al., 1986a, 1986b). Hinzu kam die Entdeckung der cDNA der Beta-Untereinheiten (Isom et al., 1992, 1995). Mit diesen neu entwickelten Methoden folgte eine Vielzahl von Studien über Struktur-Wirkungsbeziehungen in den 90er Jahren (Abschnitt 2.3).

Relativ früh konnte schon mit Methoden des Molekular-Modeling die Grobstruktur des Proteins bestimmt werden (Guy & Seetharamulu, 1986). Der Durchbruch im Verständnis

der Kanalstrukturen ereignete sich 1998, als es der MacKinnon Gruppe gelang, ein Kaliumkanalprotein zu kristallisieren und dessen Feinstruktur mit Röntgenbeugung aufzuklären (Doyle et al., 1998). Wichtige Aspekte der Struktur können daraus auch für den Natriumkanal abgeleitet werden (Abschnitt 2.3).

Weitere wichtige Tools für die Untersuchung ist die Kernspinnmagnetresonanz (NMR). Sie ermöglicht die Aufklärung der Struktur relativ kleiner Moleküle wie Kanalagonisten und Antagonisten (Rohl et al., 1999), die dann als Negativformen für Teile des Kanals benutzt werden. Einem ähnlichen Ziel dient die gezielte Herstellung von speziellen Polypeptiden (Eaholtz et al., 1994), die gegen bestimmte Kanalstrukturen gerichtet sind. Einen direkten Zugang zur Struktur und Funktion ermöglicht die Markierung von Aminosäuren des Kanalproteins mit Farbstoffen (TMRM: Sorensen et al., 2000; FRET: Biskup et al., 2004; UV-Anregung: Nguyen & Horn, 2002).

Das Interesse an der Erforschung der Ionenkanäle erhält zum Beispiel dadurch Nahrung, dass seit dem Beginn der 90er Jahre mehrere Erbkrankheiten identifiziert wurden, die direkt mit Mutationen des Natriumkanals assoziiert sind. Betroffen sind die Muskulatur (periodische Paralyse: Ptáček et al., 1991; Rojas et al., 1991; Paramyotonia congenita: McClatchey et al., 1992; Ptáček et al., 1992), das Herz (Long QT-Syndrom Typ 3: Bennett et al., 1995; Wang et al., 1995) und das Gehirn (Epilepsien: siehe Lehmann-Horn & Jurkat-Rott, 1999; Head & Gardiner, 2003). Dieses Gebiet wird auch in Zukunft, nicht zuletzt wegen der klinischen Relevanz und der direkten Verbindung zwischen Genmodifikation und makroskopischer Wirkung, ein Gebiet intensiver Forschung bleiben (Lehmann-Horn & Jurkat-Rott, 1999).

Ein anderes interessantes Gebiet rückt in den Vordergrund der Forschung, nämlich die Einbindung des Natriumkanals in komplexere Abläufe der Zelle oder des ganzen Organismus (Catterall, 2000). Hier sind zu nennen die Protein-Kanalprotein-Interaktionen für die neuronale Entwicklung, axonales Pathfinding und Interaktionen der Zellen für das Formen von Zellverbänden.

Die Entdeckung neuer Natriumkanalsubtypen öffnet weiterhin ein großes pharmakologisches Feld für die Entwicklung neuer Zielsubstanzen, z.B. für die Behandlung neuropathischer Schmerzen (Lai et al., 2004).

Insgesamt sind noch viele Fragen, die die Funktion und Aufgaben des Natriumkanals im Organismus betreffen, ungeklärt. Nicht zuletzt wegen des Verständnisses der genannten Krankheiten und der Wirkung von Medikamenten und Giften sind Natriumkanäle ein interessantes und lohnendes Gebiet der Forschung und eine große Motivation für diese Arbeit.

2.3 Molekulare Struktur und Funktion des Natriumkanals

Aufbau:

Das Natriumkanalprotein besteht aus einer stark prozessierten 260 kDa großen α -Untereinheit und mehreren assoziierten kleineren β -Untereinheiten (Catterall, 2000). Die α -Untereinheit besteht aus 4 ähnlichen Domänen, die wiederum jeweils aus 6 membranspannenden Segmenten, die mit S1-S6 bezeichnet werden, zusammengesetzt sind. Anders als beim Kaliumkanal (Abbildung 2.3 oben), bei dem sich die vier Domänen erst nach der Proteinbiosynthese zusammenlagern, wird der Natriumkanal in einem Stück in der Zelle hergestellt. Die Domänen sind dabei über intrazelluläre Loops miteinander verbunden (Abbildung 2.3 unten).

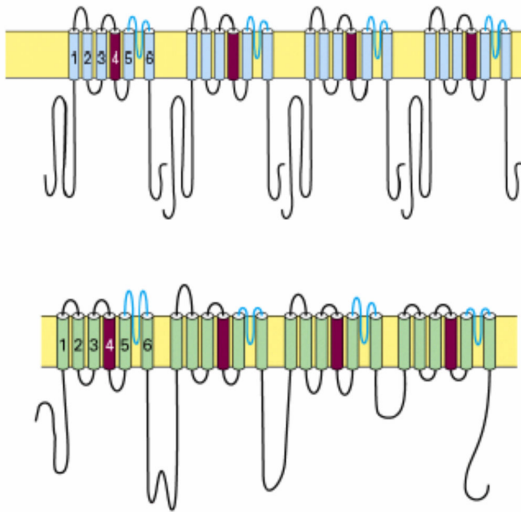


Abbildung 2.3 Oben: Modell eines Kaliumkanals, bestehend aus 4 Domänen eines 6 Helix-Motives
 Unten: Modell eines Natriumkanals (Die 4 Domänen sind zu einem einzigen Protein zusammengefasst und durch intrazelluläre Loops verbunden.)

Man geht davon aus, dass sich der Natrium- und auch der ähnlich aufgebaute Calciumkanal durch eine zweifache Genduplikation aus dem Kaliumkanal entwickelt haben (Spafford et al., 1999).

Nach der von Goldin et al. (2000) vorgeschlagenen Nomenklatur werden spannungsabhängige Natriumkanäle mit z.B. rNav1.2a bezeichnet, wobei das r für Ratte, v für spannungsabhängig (voltage dependent), 1 für die Kanalfamilie, 2 für den Subtyp und a für die α -Untereinheit stehen. Diese Nomenklatur richtet sich nach der von Kalium- und Calciumkanälen und soll ältere uneinheitliche Bezeichnungen ersetzen.

Für Säugetiere ist nach dem heutigen Stand der Forschung nur eine Familie von Natriumkanälen mit insgesamt 9 Mitgliedern bekannt und funktional exprimiert worden (Goldin, 2002). Für Nicht-Säugetiere sind bisher nur sehr unvollständige Ergebnisse über Sequenzen von Natriumkanälen vorhanden (Goldin, 2002).

Abbildung 2.4 fasst die heute bekannten Struktur-Wirkungsbeziehungen des Natriumkanals in einem einfachen Modell zusammen. Im Folgenden werden die Funktionselemente des Kanals separat betrachtet.

Selektivitätsfilter:

Das Selektivitätsfilter ist für die hohe Spezifität des Kanals für Natriumionen verantwortlich. Die Kenntnis der Struktur der als Negativformen benutzten Porenblocker Tetrodotoxin und Saxitoxin führte direkt zur Entdeckung der äußeren Pore des Kanalproteins und des Selektivitätsfilters (Hille, 1984). Mutationsexperimente können sowohl die zugehörigen Aminosäuren für die Giftbindung (Noda et al., 1989) als auch für das Filter identifizieren (Abbildung 2.4, kleine weiße Kreise, Terlau et al., 1991). Wichtige Struktur- und Funktionsaussagen gewinnt man durch Punktmutationen dieser Aminosäuren, die die Selektivität zu Gunsten von monovalenten organischen oder anorganischen Kationen (Schlief et al., 1996; Sun et al., 1997) oder auch von Calciumionen (Austausch in Domäne 1-4 von DEKA zu EEEE, Heinemann et al., 1992) verändern können.

Übereinstimmungen mit dem besser untersuchten Selektivitätsfilter des Kaliumkanals (Miller, 1991; Doyle et al., 1998) führten zu einer weiteren Erhärtung der obigen Ergebnisse.

Alle bisher studierten Natriumkanäle haben bezüglich der Leitfähigkeit ähnliche Eigenschaften. Daher wird angenommen, dass das Selektivitätsfilter auch gleich ist (Catterall, 2000).

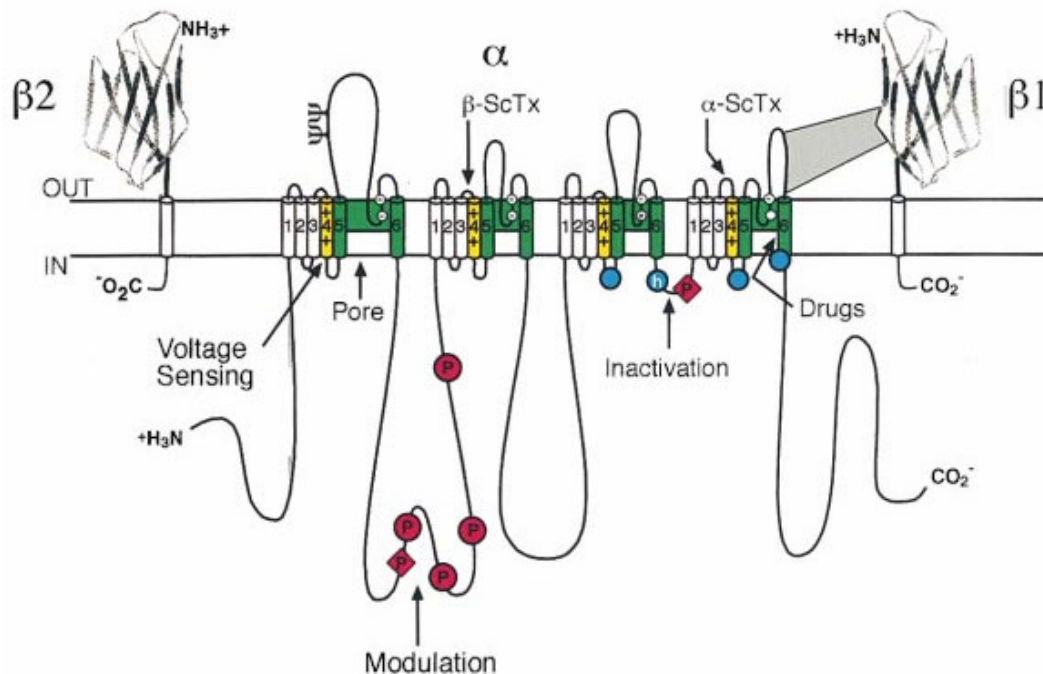


Abbildung 2.4 Darstellung des angenommenen Aufbaus der α -Subunit des Natriumkanals mit β 1- und β 2-Untereinheiten in Bezug auf die Zellmembran (Catterall, 2000)

Zylinder repräsentieren membranspannende α -Helices, Linien Polypeptidketten, deren Länge ungefähr der Anzahl der Aminosäuren in einem neuronalen Natriumkanal entspricht. Die extrazellulären β 1- und β 2-Untereinheiten sind ähnlich gefaltet wie Immunoglobuline.

Ψ : Aminosäuren für eine extrazelluläre Glykolisierung

Rote Kreise und Rauten: Aminosäuren für eine intrazelluläre Phosphorylierung

Grün: Aminosäuren, die die Pore des Kanals formen

Weißer Kreis: äußerer (EEDD) und innerer (DEKA) Ring von Aminosäuren des Selektivitätsfilters und der Tetrodotoxin-Bindungsstelle

Gelb: S4 Spannungssensoren

Blauer Kreis, h: Inaktivierungssegment (IFM) im intrazellulären Loop

Blauer Kreis: Aminosäuren, die als Rezeptor für das Inaktivierungssegment dienen

ScTx: Bindungsstellen für Skorpiongifte

Spannungssensor:

Spannungsabhängige Ionenkanäle sind die einzigen bekannten Proteine, die in der Lage sind, abhängig vom elektrischen Feld die Funktion zu ändern (Blaustein & Miller, 2004).

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Natriumkanälen und anderen Ionenkanälen ist an die Auswärtsbewegung positiv geladener Aminosäuren im elektrischen Feld gekoppelt (Hodgkin & Huxley, 1952; Armstrong, 1981). Ungefähr 12 positiv geladene Gruppen, die in den S4-Helices lokalisiert sind (siehe oben), werden bei der Aktivierung durch das elektrische Feld der Membran bewegt (Hirschberg et al., 1995; Catterall, 2000).

Die Art der Bewegung der S4-Helix und die Kopplung an den Öffnungsmechanismus des Kanals sind zurzeit Gegenstand heftiger Diskussion (Blaustein & Miller, 2004). In

Abbildung 2.5 sind drei verschiedene Modelle mit den S4-Helices jeweils in der In- und Out-Position (minimale und maximale Verschiebung im elektrischen Feld) dargestellt.

Das entscheidende Merkmal des Sliding-Helix-Modells in Abbildung 2.5a ist, dass sich die S4-Helix in einer Proteinumgebung unter Einfluss des elektrischen Feldes herausdreht oder herausgleitet (Yang et al., 1996; Larsson et al., 1996; Glauner et al., 1999; Bezanilla, 2000).

Das Paddle Modell (Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b; Jiang et al., 2004), das auf einer Röntgenkristalluntersuchung des Kaliumkanals in der In- und Out-Position beruht, schlägt ein Umklappen der Helix in einer Lipidumgebung vor (Abbildung 2.5b).

Im Transporter-Like Modell (Abbildung 2.5c) hingegen werden die positiven Ladungen, die von der wässrigen Umgebung der Innenseite der Membran zugänglich sind auf die wässrige Außenseite „transportiert“. Dadurch wandern die Ladungen auch durch das elektrische Feld über der Zellmembran. Dieses geschieht im Vergleich zu den anderen Modellen durch eine sehr geringe Konformationsänderung des Proteins um die S4-Helix herum (Starace et al., 1997; Yellen, 1998; Starace & Bezanilla, 2004).

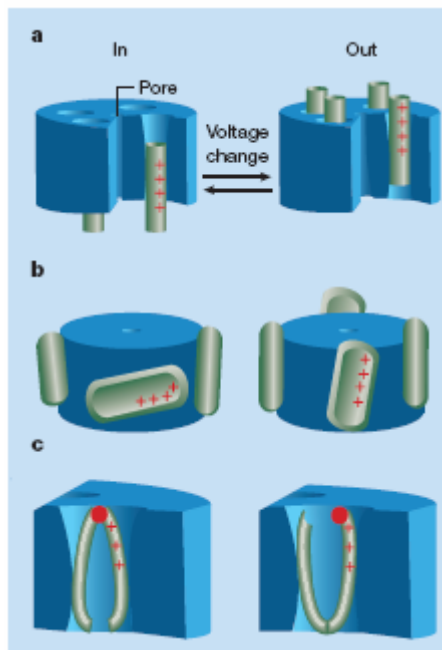


Abbildung 2.5 Mögliche Modelle der Bewegung der Spannungssensoren (S4-Helices) auf eine Änderung der Membranspannung (Blaustein & Miller, 2004). Erklärung im Text

a: Sliding-Helix Modell

b: Paddle Modell

c: Transporter-like Modell

Interessant für diese Arbeit ist, dass auf dem extrazellulär zugänglichen Teil der S4-Helix Bindungsstellen für Site 3-Toxine identifiziert werden (Rogers et al., 1996). Zu den Site 3-Toxinen gehören auch die hier verwendeten Seeanemonentoxine (Blumenthal & Seibert, 2003, siehe Abschnitt 4.6). Die S4-Helix wird bei Bindung eines Toxinmoleküls in der Out-Position fixiert und damit die Kopplung zwischen Aktivierung und Inaktivierung gestört (Cestèle et al., 1998).

Inaktivierung:

Die Inaktivierung des Natriumkanals wird unterteilt in schnelle Inaktivierung (Millisekunden), langsame (Sekunden) und ultra-langsame (Sekunden bis Minuten) Inaktivierung (Goldin, 2003). Die langsame Inaktivierung (Mitrovic et al., 2000; Vilin et al., 2001; O'Reilly et al., 2001) hängt wahrscheinlich mit einer komplexen Umstrukturierung des Kanalproteins zusammen. Der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt (Goldin, 2003).

Die ultra-langsame Inaktivierung, die eine noch langsamere Zeitkonstante aufweist, kann an einem mutierten Nav1.4 nachgewiesen werden (Hilber et al., 2001). Allerdings sind Interaktionen mit der schnellen Inaktivierung vorhanden (Hilber et al., 2002).

Die schnelle Inaktivierung, die für die rasche Repolarisation im Aktionspotential mit entscheidend ist, spielt sich im Millisekundenbereich ab. Für das schnelle Schließen ist der so genannte Hinged-Lid-Mechanismus (Kellenberger et al., 1997a) verantwortlich.

In Abbildung 2.6A ist dieser Mechanismus schematisch dargestellt. Die intrazelluläre Schleife zwischen Domäne 3 und 4 fungiert dabei als Scharnier (Vassilev et al., 1988, 1989; Stühmer et al., 1989). Die Aminosäuren I1488, F1489 und M1490 in dieser Schleife bilden den Deckel (West et al., 1992; Eatholz et al., 1994; Kellenberger et al., 1997b), der als IFM-Motiv bezeichnet wird. Er blockiert die Pore von intrazellular und führt damit zur Inaktivierung.

Die Struktur des zentralen Bereichs dieses Inaktivierungs-Tors wurde durch dreidimensionale NMR-Studien an kurzen analogen Peptidstrukturen aufgeklärt (Rohl et al., 1999). Abbildung 2.6B zeigt eine α -Helix, die auf einer Seite von dem IFM-Motiv flankiert wird. Die zentrale hydrophobe Aminosäure F1489 ist dabei nach außen in das wässrige Milieu projiziert. Deswegen wird angenommen, dass diese Aminosäure der Ligand für die Blockade der Pore ist.

Die blauen Kreise in Abbildung 2.4 markieren Aminosäuren, die an einem komplexen Rezeptor für das Inaktivierungs-Gate beteiligt sind (McPhee et al., 1995; Smith & Goldin, 1997; Lerche et al., 1997; Filatov et al., 1998; MCPhee et al., 1998; Tang et al., 1998).

Motoike und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das C-terminale Ende des Kanalproteins eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung spielt (Motoike et al., 2004). Es ist notwendig, um den geschlossenen Hinged-Lid-Mechanismus zu stabilisieren und ein Wiedereröffnen des Kanals zu verhindern.

Die schnelle Inaktivierung muss also als ein komplexer molekularer Mechanismus betrachtet werden, bei dem noch längst nicht alle Details bekannt sind.

Noch komplizierter wird dieser Mechanismus dadurch, dass die Inaktivierung an die Aktivierung gekoppelt ist. Die Auswärtsbewegung der S4-Helix aus Domäne IV scheint das Startsignal für die Inaktivierung zu sein (Catterall, 2000).

Mutationsexperimente (Chen et al., 1996) und Seeanemonentoxine, die diese S4-Helix in der Out-Position so fixieren, dass keine schnelle Inaktivierung erfolgt, (Rogers et al., 1996; Sheets et al., 1999) belegen diese Modellvorstellung. Die genaue Art der Kopplung ist allerdings für den Natriumkanal noch nicht bekannt.

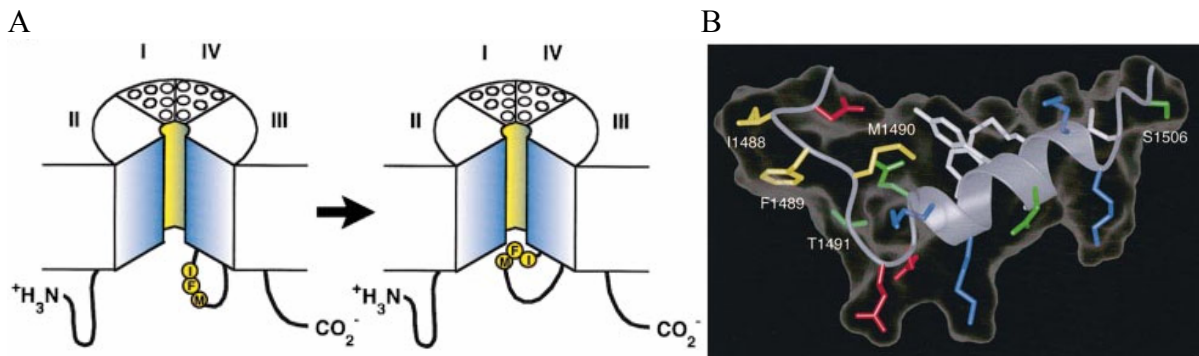


Abbildung 2.6 (A) Mechanismus des Hinged-Lid (nach Catterall, 2000)
(B) Molekulare Struktur des IMF-Motives (Rohl et al., 1999)

β -Untereinheiten:

Die β_1 -, β_2 - und β_3 -Untereinheiten des Natriumkanals haben zwei Funktionen. Die erste besteht darin, das Schaltverhalten des Kanals zu modulieren. Im Oozyten-Expressionssystem ist die Inaktivierung der α -Untereinheit verlangsamt, nimmt aber bei Koexpression von β_1 und β_2 wieder normale Werte an (Isom et al., 1992, 1995; Bennet et al., 1993; Schreibmayer et al., 1994). Der immunglobulinartige Anteil der β_1 -Untereinheit (Chen & Cannon, 1995; Makita et al., 1996; McCormick et al., 1998) interagiert dabei mit dem extrazellulären Anteil der S6-Helix aus Domäne IV (Abbildung 2.4, Makita et al., 1996; Qu et al., 1999) und kann so das Schaltverhalten beeinflussen.

Die zweite Funktion bezieht sich auf die Zell-Zell Interaktion. Natriumkanäle interagieren z.B. mit der β_2 -Untereinheit mit den extrazellulären Proteinen Tenascin-C und Tenascin-R (Srinivasan et al., 1998). Zellen, die mit β_2 transfiziert sind, werden durch diese Proteine abgestoßen (Xiao et al., 1999). Diese Interaktion könnte ein Signal sein, um ausgezeichnete Bereiche in Zellen mit hoher Natriumkanaldichte zu formen, wie z.B. dem Schnürring am Axon.

Neuromodulation:

Die Funktion von Natriumkanälen kann wie auch bei anderen Kanälen über intrazelluläre Pathways über die Phosphorylierung von Aminosäuren (siehe Abbildung 2.4) moduliert werden. Stellwerte sind der Spitzenstrom, die Spannungs- und Zeitabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung und der persistierende Strom. Die Modulation kann über die Aktivierung von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren erfolgen (Cantrell et al., 1996; Mittman & Alzheimer, 1998), über Dopamin an D1-like Rezeptoren (Dopamin-Rezeptoren, Surmeier & Kitai 1993; Cantrell et al., 1997), über die Koexpression von G-Proteinen ($G_{\beta\gamma}$, Ma et al., 1997; Mantegazza et al., 2005) und über Hypoxie und Stickstoffmonoxid (NO, Hammarstrom & Gage 1998, 1999, 2000).

Besonders dem persistierenden Natriumstrom (I_{NaP}) kommt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Erregbarkeit von Neuronen zu (Catterall, 2000). Dieses wird in der Diskussion (Abschnitt 11.9) weiter ausgeführt.

2.4 Modellierung mit Markov-Modellen

Markov-Modelle werden z.B. dafür eingesetzt, Modellvoraussagen im Bereich der Spracherkennung (Rose & Juang, 1996), der Gensequenz-Erkennung (Siepel & Haussler,

2004) und wie in dieser Arbeit, der Proteinbewegung zu treffen. Obwohl auch andere Theorien zur Modellbildung existieren, wie z.B. die Theorie der Fraktale (Liebovitch et al., 1987), sind die Markov-Modelle in der Lage alle bisherigen experimentellen Befunde zu beschreiben (Korn & Horn, 1988).

Der relativ einfache Formalismus der Markov-Modelle wird in dieser Arbeit eingesetzt, um die beobachtbare Messgröße, den Strom des Natriumkanals zu modellieren und Aussagen über die zugrunde liegenden Konformationsänderungen des Proteins zu treffen.

S_i bezeichnet Zustände des Modells (zugeordnet zu den Proteinkonformationen), M_j die beobachtbaren Eigenschaften des Systems (geschlossener – offener Kanal). Ist die Anzahl der Zustände größer als die Anzahl der Eigenschaften, so spricht man von einem Hidden- oder auch Aggregated-Markov-Modell, kurz HMM.

Folgende Annahmen beinhaltet ein Markov-Modell:

- **fehlendes Gedächtnis:** Die Übergangswahrscheinlichkeiten der Zustände sind unabhängig von den vorherigen beobachtbaren Eigenschaften.

- **Stationarität:** Die Übergangswahrscheinlichkeiten der Zustände sind unabhängig von der Zeit.

- **Linearität (Markov-Annahme):** Die Übergangswahrscheinlichkeiten der Zustände hängen nur vom aktuellen Zustand ab (Generell lassen sich aber auch HMM höherer Ordnung aufstellen.).

Das Zeitverhalten des Systems wird deswegen vollständig durch eine Differentialgleichung erster Ordnung beschrieben (Blunck et al., 1998).

$$\frac{dq(t)}{dt} = K \cdot q(t) \quad (2.1)$$

$q(t)$: Vektor der Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände S_i

K : Vektor der Übergangsraten k_{ij} vom Zustand S_i nach S_j

mit

$$\sum_j K_j = 1 \quad (2.2)$$

und

$$\sum_j q_j(t) = 1 \quad (2.3)$$

Das Gleichungssystem wird gelöst durch:

$$q(t) = q(0) \cdot e^{K \cdot t} \quad (2.4)$$

Während Linearität und Stationarität die Modellierung nicht weiter einschränken, ergeben sich durch die Annahme eines fehlenden Gedächtnisses Einschränkungen. So deuten aktuelle Patch-Clamp-Daten (unveröffentlicht) eines MaxiK-Kanals sehr wohl auf eine Änderung der Übergangswahrscheinlichkeiten nach dem Eintreten eines bestimmten Ereignisses hin. Eine Modellierung mit Markov-Feldern (höherdimensionale nicht lineare Modelle) könnte den linearen Formalismus zwar ersetzen, würde aber die Handhabung deutlich erschweren.

Für die Interpretation der Daten dieser Arbeit ergeben sich aber mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Einschränkungen durch die Annahme der drei obigen Kriterien.

Zwei Aufgaben sind für die Auswertung der Daten dieser Arbeit wichtig:

- Das Finden des passenden Modells S_i für die beobachteten Eigenschaften M_j des Systems.
- Das Optimieren der Übergangsraten K für die beobachteten Eigenschaften M_j unter Annahme eines Modells S_i .

3 Material und Methoden: Molekularbiologie

Die verwendeten Chemikalien, Kits, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Anhang aufgelistet. Die Handhabung entspricht, sofern nicht anders angegeben, den Anleitungen der Hersteller.

Die grundlegenden Arbeitsschritte werden entsprechend Sambrook et al. (1998) und Ausubel et al. (1999) durchgeführt und sind hier nicht im Einzelnen aufgeführt.

3.1 Zellkultur

HEK293-Zellen (ATCC Nummer[www.atcc.org]: CRL-1573):

Die Zelllinie HEK293 ist eine permanente Linie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, die mit dem Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977). Das Wachstumsmuster ist epithelial adhärent. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von A. Schromm, Forschungszentrum in Borstel, zur Verfügung gestellt.

Die HEK-Zellen zeigen eine hohe Teilungsrate und sind relativ tolerant gegenüber der Zusammensetzung des Nährmediums, pH-Änderungen, niedrigen Temperaturen und der Behandlung mit Trypsin zum Ablösen der Zellen. Die Zellmembran ist direkt ohne enzymatische Vorbehandlung den Patch-Clamp-Pipetten zugänglich. Diese Eigenschaften sind ideal für den Umgang mit der Kultur und für die durchgeführten Experimente.

HEK293-Zellen weisen intrinsische Kaliumkanäle (Abschnitt 7.1) auf. Andere Ionenkanäle konnten an dieser Kultur nicht nachgewiesen werden, allerdings sind nach Auskunft von Dr. T. Scheuer, Pharmakologie in Seattle, zeitweilig endogene Natriumströme unterschiedlicher Ausprägung zu sehen. Die Eigenschaft, β -Aktin, ein Protein des Zellgerüsts, relativ stark zu exprimieren („Housekeeping-Gen“) wird für die Methode zum Screenen der Klone der stabilen Transfektion verwendet (siehe Kapitel 3.7).

Neuroblastomzellen (ATCC Nummer: CRL-2263):

Die Zelllinie N1E115 wurde durch Klonierung aus der Linie C-1300 eines Neuroblastoms der Maus gewonnen (Amano et al., 1972; Richelson, 1973). Das Wachstumsmuster ist neuronal adhärent. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von H. Ließegang, Zoophysologie in Kiel, und K. Schmidt-Lassen, Pharmazie in Kiel, zur Verfügung gestellt.

Bei den Neuroblastomzellen handelt es sich um neuronale Zellen, die aufgrund ihres Blastomcharakters eine hohe mitotische Aktivität aufweisen und daher leicht in Kultur zu halten sind (Spector, 1981). Sie weisen in der Quantität und Qualität anderen elektrisch erregbaren Geweben vergleichbare Ströme auf (Kostyuk et al., 1978; Moolenaar & Spector, 1978; Nagy et al., 1983) und eignen sich daher gut für elektrophysiologische Untersuchungen. An Ganzzelleableitungen kann aufgrund von abnehmenden Strömen beobachtet werden, dass sich die Dichte der Natriumkanäle in der Zellmembran im Laufe der Kultur und mit niedrigerer Passagefrequenz (<2x / Woche) verringert. Dieser Effekt muss bei Ganzzelleableitung beachtet werden, um deutliche Signale zu messen. Er kann aber bei Einzelkanalmessungen ausgenutzt werden, um Aufnahmen mit wenigen, bzw. nur einem Kanal zu erzielen. Die Zellen aus der Pharmazie zeigen dabei nach dem Auftauen einen besonders hohen Strom, bis zu 1,5 nA / pro Zelle (siehe Abschnitt 8.1).

Brutschrank:

Die Zellen werden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. An den Brutschrank wird ein selbstgebauter Umschalter (in Zusammenarbeit mit H. Schlüter, IEAP in Kiel, entwickelt) angeschlossen (Abbildung 3.1), der bei Unterschreiten eines einstellbaren Druckes von der leeren auf eine volle CO₂-Gasflasche umschaltet.

Der Druckumschalter arbeitet im Niederdruckbereich von 0,1 - 1 bar, dem Betriebsdruck des Brutschrankes. An die beiden CO₂-Flaschen ist deshalb jeweils ein zweistufiger Druckminderer vorgeschaltet. Damit nicht bei jeder Öffnung des Brutschrankes durch den Druckabfall umgeschaltet wird, ist ein dreistufiger Verzögerungsschalter (1. Warnung, 2. Umschalten, 3. Alarm) eingebaut.

Um die Luftfeuchtigkeit konstant zu halten, werden die Wasserspeicher im Brutschrank regelmäßig mit Aqua dest. aufgefüllt. Das Lämpchen für den CO₂ Sensor wird alle 4 Monate gewechselt.

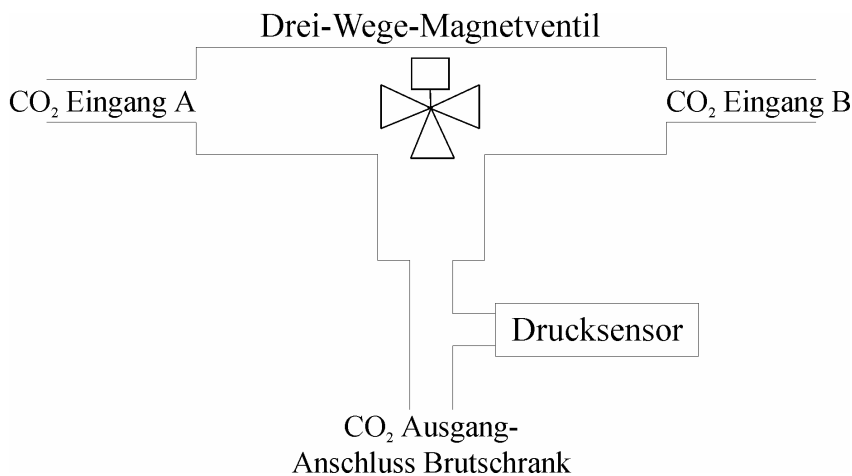


Abbildung 3.1 Schema des Druckumschalters

Magnetventil (Z110A) von Sirai (Steinhöring), Drucksensor (CTE80016R0) von Sensortechnics (Puchheim)

Medium:

Für die Kultur der beiden Zelllinien wird ein MEM-Medium (Modified-Eagle-Medium) mit 10% FCS (Fetal-Calf-Serum) verwendet. Dem Medium werden 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt, um die Gefahr einer Bakterienkontamination zu verringern, für die stabile Transfektion (Abschnitt 3.7) zusätzlich 1 mg / ml Geneticin (G418).

Das FCS wird bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert und nach Sterilfiltration aliquotiert. FCS und Penicillin/Streptomycin-Lösungen werden bis zur Verwendung in sterilen Plastik-Tubes bei -20°C aufbewahrt.

Kultur:

Der Umgang mit den beiden verwendeten Zelllinien ist, soweit nicht anders angegeben, gleich.

Die Kultur der Zellen erfolgt in gasdurchlässigen 75 ml-Zellkulturflaschen mit jeweils 8-10 ml Medium. Das Medium wird alle 2-3 Tage komplett gewechselt, und die Zellen bei totaler optischer Konfluenz (siehe Zählen der Zellen) zuvor gesplittet. Optische Konfluenz und Zustand der Zellen werden vor jedem Füttern oder Aussetzen der Zellen unter einem Inversmikroskop mit Phasenkontrast beurteilt.

Zum Passagieren (Ausdünnen/ Umsetzen) wäscht man die Zellen in der Kulturflasche mit 1-2 ml PBS (Rezept siehe Tabelle 3.1) und dann versetzt man sie mit 1-2 ml Trypsin-EDTA. Nach 3 min bei 37°C werden die Zellen abgeklopft und 1:5 bis 1:20 gesplittet. Alternativ können die Neuroblastomzellen ohne Trypsin durch Spülen mit der Pipette vollständig abgelöst und gesplittet werden. Alle Arbeiten erfolgen auf einer Sterilwerkbank.

PBS	
8 g NaCl	282 mM
0,2 g KCl	2,7 mM
1,44 g Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
0,24 g KH ₂ PO ₄	1,8 mM
ad 1000 ml H ₂ O	
auf pH 7,4 mit HCl aq einstellen	

Tabelle 3.1 Zusammensetzung von 1l Waschlösung PBS

Zählen der Zellen:

Das Zählen der Zellen ist für folgende Arbeitsschritte wichtig: Aussaat für die Transfektion, Patch-Clamp Messungen, Einfrieren und Klonieren der Zellen.

Die Zellen werden dazu mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin bei 37°C abgelöst. Im nächsten Schritt zentrifugiert man die Zellen bei 4°C und 1500 g für 5 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen. Durch das FCS im Medium erfolgt eine Inaktivierung des Resttrypsins. Durch sanftes Resuspendieren homogenisiert man die Zellen in dem Medium. 10-100 µl der Zellsuspension werden mit Trypanblau ad 200 µl gemischt und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Für die Transfektionsexperimente wird ein weiteres Maß für die Zellzahl benötigt. Die optische Konfluenz gibt an, wie viel Prozent der Wachstumsfläche durch die Zellen bedeckt sind. Die reale Konfluenz der Zellen kann nur durch die Erstellung einer Wachstumskurve und durch Auszählung der Zellen bestimmt werden. Oft korreliert eine zu 90-100% bedeckte Wachstumsfläche mit nur 30 bis 60 % realer Konfluenz.

Einfrieren:

Das Anlegen von Sicherheitskulturen (so genannte Backup-Kulturen) ist für die Zellkultur sehr wichtig. Die Zellmorphologie und die Zelleigenschaften verändern sich im Laufe von mehreren Wochen Zellkultur. So nehmen z.B. die Expressionsraten der Natriumkanäle bei Neuroblastomzellen ab. Trotz aller Sorgfalt kann es zu Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen kommen. Dann ist ein Austausch gegen eine eingefrorene Zellkultur notwendig. Um größere Zellausbeuten für Backup-Kulturen zu erzielen, können die Zellen von den 50 ml Kulturflaschen in 250 ml Flaschen überführt werden.

Nach dem Auszählen werden 1,5-2,5 Millionen Zellen in 0,75 ml Medium in ein Kryotube gegeben und 0,75 ml Medium mit 20% DMSO (Dimethylsulfoxide) hinzugefügt.

Da DMSO für die Zellen toxisch ist, müssen sie zügig in einen -80°C Gefrierschrank überführt werden. Um ein zu schnelles Herunterkühlen zu verhindern, das ebenfalls die Zellen schädigen könnte, kann man sie vorher mit Zellstoff umwickeln. Weitere Kulturen werden nach dem Einfrieren in der Physiologie in Kiel in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Auftauen:

Nach dem Auftauen der Kryotubes werden die Zellen bei 4°C und 1500 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen zügig mit 10 ml Medium in eine Kulturflasche überführt. Nach 7-14 Tagen können die Zellen dann das erste Mal gesplittet bzw. für Messungen verwendet werden.

Aussetzen:

24h vor Messung oder Transfektion werden die Zellen nach dem Zählen mit 2 ml Medium in Petrischalen für adhärenente Zellen mit 35 mm Durchmesser ausgesetzt. Nach spätestens 24h haben sich alle vitalen Zellen auf dem Boden der Petrischale angeheftet.

3.2 Vektoren und Bakterien

Vektoren:

Für die Expression des Natriumkanals Nav1.2a und der Natriumkanalmutante Nav1.2a F1489Q (Kellenberger et al., 1997a) wird der Vektor pCDM8 (Kieffer, 1991) von Invitrogen verwendet. Dieser Vektor mit den beiden Nav1.2a Inserts (Sequenz siehe Anhang) wurde freundlicherweise von William A. Catterall, Pharmakologie in Seattle, zur Verfügung gestellt.

Von einem Umklonieren oder Verändern des Vektors wurde dringend abgeraten, da das Insert in anderen Vektoren nicht stabil sei. Es gäbe Interaktionen mit dem Ampicillin-Gen des Vektors und dem Nav1.2a. Das würde zu unvorhersagbaren Punktmutationen, Deletionen und Rearrangements führen (Auskunft Todd Scheuer, Pharmakologie, Seattle).

Für die Expression des EGFP ((E=enhanced; GFP=grün fluoreszierendes Protein; Prasher et al., 1992; Cormack et al., 1996) wird der Vektor pEGFP-C1 von Clontech (GenBank Accession #: U55763) verwendet.

Dieses für die FACS-Methode (fluorescence assisted cell sorting) optimierte Protein (Emission ins rote verschoben und erhöhte Quantenausbeute, Cormack et al., 1996) hat sein Anregungsmaximum bei 488 nm (blau), das Emissionsmaximum liegt bei 507 nm (grün). Dieser Vektor enthält eine Genkassette, die ein Neomycin-Phosphotransferase-Gen für die Resistenz gegen Kanamycin zur Selektion in *E. coli* mit einem bakteriellen Promotor und zur eukaryotischen Selektion mit Geneticin (G418) mit einem SV40-Promotor kodiert.

In der Abbildung 3.2 sind beide Vektoren mit ihren Genen dargestellt, wobei bei der Länge von 4,4 kb (kilo-Basenpaare) des pCDM8-Vektors das Natriumkanal-Insert von 6 kb fehlt.

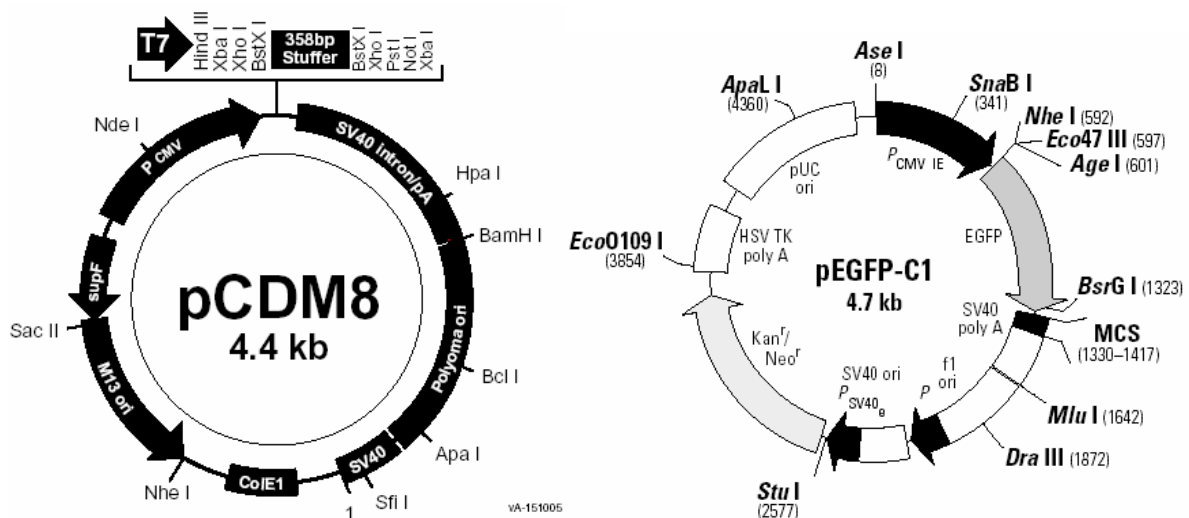


Abbildung 3.2 Schema des Natriumkanal-Vektors (pCDM8) und des EGFP-Vektors (pEGFP-C1)

pCDM8:

pMB1 origin (pBR322): bases 1-587
 M13 origin: bases 588-1182
 SupF gene: bases 1183-1384
 Synthetic supF gene: bases 1183-1384
 CMV promoter: bases 1516-2170
 T7 promoter: bases 2171-2189
 Polylinker and stuffer fragment: bases 2198-2655
 Splice and polyadenylation signals: bases 2656-3352
 Polyoma origin and enhancers: bases 3353-4188
 SV40 origin (enhancerless): bases 4189-4352

pEGFP-C1:

Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1-589
 Enhancer region: 59-465
 TATA box: 554-560
 Transcription start point: 583
 C->G mutation to remove Sac I site: 569
 Enhanced green fluorescent protein gene
 Kozak consensus translation initiation site: 606-616
 Start codon (ATG): 613-615; Stop codon: 1408-1410
 Insertion of Val at position 2: 616-618
 GFPmut1 chromophore mutations (Phe-64 to Leu; Ser-65 to Thr): 805-810
 His-231 to Leu mutation (A->T): 1307
 Last amino acid in wild-type GFP: 1327-1329
 MCS: 1330-1417

SV40 early mRNA polyadenylation signal
 Polyadenylation signals: 1550-1555 & 1579-1584
 mRNA 3' ends: 1588 & 1600
 f1 single-strand DNA origin: 1647-2102 (Packages the noncoding strand of EGFP.)
 Bacterial promoter for expression of Kan^r gene -35 region: 2164-2169; -10 region: 2187-2192
 Transcription start point: 2199
 SV40 origin of replication: 2443-2578
 SV40 early promoter
 Enhancer (72-bp tandem repeats): 2276-2347 & 2348-2419
 21-bp repeats: 2423-2443, 2444-2464, & 2466-2486
 Early promoter element: 2499-2505
 Major transcription start points: 2495, 2533, 2539 & 2544
 Kanamycin/neomycin resistance gene
 Neomycin phosphotransferase coding sequences: Start codon (ATG): 2627-2629; stop codon: 3419-3421
 G->A mutation to remove Pst I site: 2809
 C->A (Arg to Ser) mutation to remove BssH II site: 3155
 Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal
 Polyadenylation signals: 3657-3662 & 3670-3675
 pUC plasmid replication origin: 4006-4649

Bakterien:

Für die Vermehrung des Vektors pCDM8 werden kompetente *E. coli* (TOP10/P3) von Invitrogen verwendet. Das Besondere an diesem Bakterienstamm ist das P3-Plasmid. Dieses Low-Copy-Plasmid von 60 kb enthält Resistenzgene für Kanamycin, Tetracyclin und

Ampicillin. Das Kanamycin-Gen ist funktionsfähig und kann dazu benutzt werden, Zellen mit dem P3-Plasmid zu selektieren. Die Gene für die Tetracyclin und Ampicillin-Resistenz sind dagegen durch eine Mutation abgeschaltet und werden erst wieder aktiv durch das Vorhandensein des SupF-Gens des pCDM8-Vektors (siehe Abbildung 3.2). Aufgrund der hohen Spontanmutationsrate dieser Resistenzgene müssen zur Kultur der Top10/P3 Zellen unbedingt 10 µg/ml Tetracyclin und 100µg/ml Ampicillin für die LB-Agarplatten und das LB-Flüssigmedium eingesetzt werden, da eine Doppelmutation sehr unwahrscheinlich ist. Die Kulturtemperatur ist 37°C. Flüssigkulturen werden bei 225 rpm (rounds per minute) in einem Inkubator geschüttelt.

Der pEGFP-C1 Vektor wird in dem *E. coli* Stamm DH5α (Invitrogen) vermehrt. Zur Kultur der Bakterien setzt man 25 µg/ml Kanamycin hinzu. Die Kulturtemperatur ist 37°C. Flüssigkulturen werden bei 225 rpm in einem Inkubator geschüttelt.

Antibiotika werden aus steril filtrierten eingefrorenen Stammlösungen (x1000) dem Medium nach der Sterilisation im Autoklaven hinzu gegeben. Die Herstellung der Medien erfolgt wie in Tabelle 3.2 angegeben.

LB-Agar (10 cm Bakterien-Petrischalen)	Luria Broth Base, Miller Medium und Luria Broth Agar (1,2%) Sterilisation 20 min bei 121°C, gespannter Wasserdampf.
Flüssig-LB 5 ml- 1000 ml (Erlenmeyerkolben 100-2000 ml)	Luria Broth Base, Miller Medium Sterilisation 20 min bei 121°C, gespannter Wasserdampf

Tabelle 3.2 Herstellung der Bakterienmedien

3.3 Klonierung der Bakterien und Plasmidgewinnung

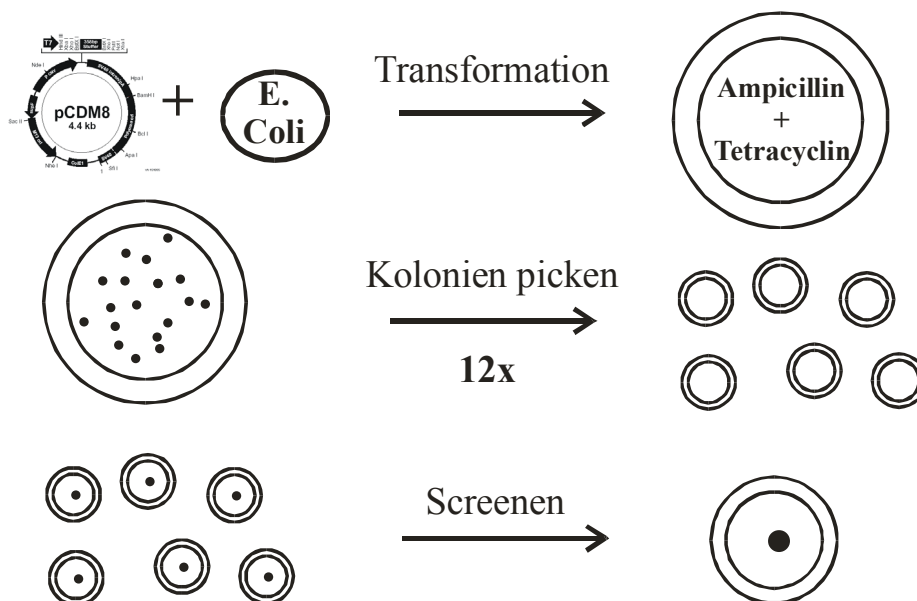


Abbildung 3.3 Schema der Klonierung der Bakterien in Petrischalen mit dem pCDM8-Vektor (der erste Schritt zur Gewinnung der Vektor-DNA)

Transformation:

Die Transformation der kompetenten *E. coli* Top10/P3 mit dem pCDM8-Vektor erfolgt über einen Temperaturschock nach Anleitung des Herstellers. Um die Transformationseffizienz einschätzen zu können, wird ein Aliquot der Top10/P3 mit dem mitgelieferten pUC18 Plasmid transformiert. Die mit pUC18 transformierten *E. coli* werden auf einen LB-Agar mit 100µl/ml Ampicillin ausplattiert. Mit der folgenden Gleichung lässt sich die Transformationseffizienz abschätzen:

$$N = \frac{3 \cdot 10^7 \cdot n}{\mu\text{g} \cdot \mu\text{l} \cdot v} \quad (3.1)$$

N: Transformierte *E. coli* / µg Plasmid DNA

n: Anzahl der ausgezählten Kolonien

v: Volumen der ausplattierten *E. coli*

Nach der Transformation mit dem pCDM8-Vektor werden die Zellen auf LB-Agar ausplattiert und 12-24h bei 37°C inkubiert, bis deutliche Einzelkolonien zu erkennen sind. Die Transformationseffizienz liegt bei den Versuchen, abgeschätzt mit dem pUC18-Vektor bei $N=2,2 \times 10^8$ (N sollte mindestens 1×10^8 betragen). Insgesamt sind bei jeder Transformation genügend Bakterienkolonien für den nächsten Schritt der Selektion vorhanden.

Selektion:

Einzelne Kolonien werden nach der Transformation mit einem sterilen Holzstäbchen gepickt und in 5 ml Fläschchen mit LB-Medium überführt. Bei 300 rpm und 37°C inkubiert man die Bakterien im Schüttler, bis eine deutliche Trübung des Mediums auftritt. 1-4 ml Flüssigkultur wird von jedem Fläschchen mit einer Miniprep isoliert und mit den in Kapitel 3.4 beschriebenen Methoden auf das Vorhandensein des pCDM8-Vektors überprüft. Der beste Klon, d.h. der Klon mit der größten Plasmid-Ausbeute, wird für die weitere Benutzung konserviert bzw. in größerem Maßstab vermehrt.

Stocks:

Zur kurzfristigen Konservierung der Bakterien (mehrere Wochen) eignet sich das Lagern der Bakterien-Platten und der 5 ml Flüssig-LB-Flaschen bei 4°C. Die Klone werden dauerhaft in Glycerol-Stocks (10% Glycerin + 90% LB-Medium, Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff) bei -80°C konserviert.

Nach dem Auftauen werden die *E. coli* ausplattiert und einzelne Kolonien zum Animpfen gepickt.

Plasmidgewinnung:

Für die Plasmidgewinnung werden Maxipreps von Qiagen und Sigma eingesetzt. Um die Ausbeute für die Low-Copy-Plasmide zu maximieren, wird die Menge des Flüssigmediums von 125-250 ml im Standardprotokoll auf 500-1000 ml erhöht. Das Medium wird mit 250-500µl aus einer 5 ml Übernacht-Kultur angeimpft. Die Kulturen mit dem EGFP-C1 Vektor weisen eine deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf als die mit dem größeren pCDM8-Vektor. Nach Erreichen einer OD600 (optische Dichte bei 600 nm) im Photometer von ~1,5 erfolgt die Extraktion der Plasmid-DNA.

Die Präparation erfolgt mit einigen Abweichungen nach Herstellerangaben. Um das größere Bakterien-Pellet verarbeiten zu können, werden die Medienvolumina für den

Aufschluss der Bakterien verdoppelt, und es erfolgt eine Vorfiltration über einen sterilisierten Miracloth Filter. Eine weitere Abweichung gegenüber dem Protokoll ist das Erhitzen des Tris-Eluationspuffers (Sigma Maxiprep) auf 65°C.

Nach der Präparation wird die DNA-Menge quantifiziert. Hierfür stehen 2 Messarten zur Verfügung: Photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm entweder als Spektrum im Photometer von Hitachi oder in Mikroküvetten im Photometer von Biochrome, wobei jeweils die Verunreinigung durch Proteine bei 280 nm berücksichtigt wird. Die zweite Methode der Bestimmung ist der Vergleich auf einem DNA-Gel mit definierten Banden einer verdauten λ -DNA (siehe Tabelle 3.3). Bei allen Methoden scheint sowohl die absolute als auch die relative Quantifizierung mit einem großen Fehler behaftet zu sein, so dass erst der Vergleich zweier unterschiedlicher Messmethoden eine gewisse Sicherheit gibt.

Präparationen von >0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ werden bei -80°C gelagert und direkt für die Transfektion verwendet. Niedrigere Ausbeuten kann man durch eine Ethanol-fällung aufkonzentrieren (Protokoll siehe Tabelle 3.4).

Die Sigma Maxipreps erzielen u.a. durch die geringe Eluationsmenge von 3 ml (10 ml bei Qiagen) regelmäßig Ausbeuten von 0,2-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dadurch entfallen die Probleme, die mit der Ethanol-fällung verbunden sind. Die Ethanol-fällung erfordert durch die großen Probenmengen einen hohen Material- und Zeitaufwand. Außerdem ist die Reinheit der Plasmid-DNA bei der Qiagen-Präparation nach Ethanol-fällung wesentlich schlechter, wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist. Deswegen ist das Sigma-Kit vorzuziehen.

Bande / bp	DNA / μg
23130	0,48
9416	0,19
6557	0,14
4361	0,09
2322	0,05
2027	0,04
564	0,01
125	0,003

Tabelle 3.3 DNA-Menge der einzelnen Banden von 1 μg λ -DNA, die mit dem Restriktionsenzym HIND III verdaut wird

Schritte der Ethanol-fällung
Zugabe von 3M Natriumacetat pH 5,0 (10% des Probenvolumens)
Zugabe von Ethanol abs. (250% des Probenvolumens)
Mischen (Vortex, langsame Stufe)
30 min bei -80°C lagern
60 min zentrifugieren
Überstand verwerfen
Waschen mit 1 ml Ethanol abs. (-20°C)
5 min Zentrifugieren, Überstand verwerfen
erneut 5 min zentrifugieren, Überstand verwerfen
Pellet bei 37°C trocknen
Aufnahme des Pellets in sterilen Tris-Puffer (Maxikit Sigma)

Tabelle 3.4 Aufkonzentrieren und Entsalzen der DNA durch Ethanol-fällung

Sämtliche Zentrifugationsschritte werden wegen des großen Probenvolumens bis 50 ml in einer Zentrifuge bei 5000 g und 4°C durchgeführt.

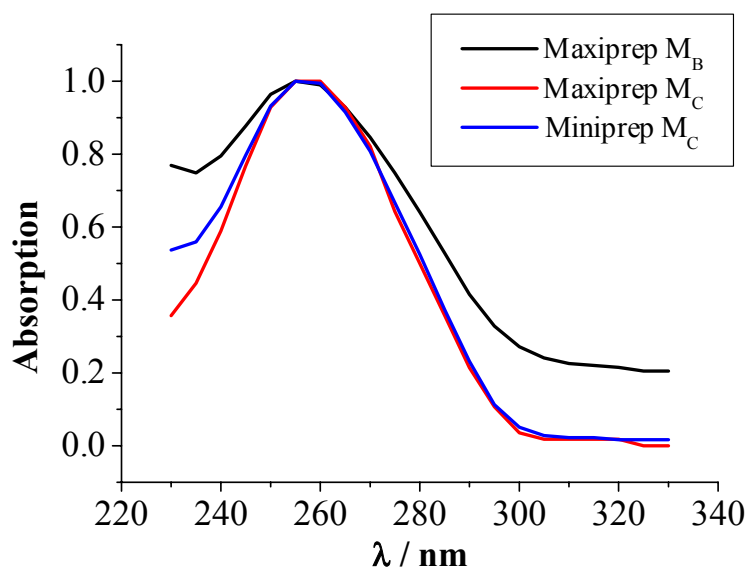


Abbildung 3.4 photometrische Bestimmung der DNA-Ausbeute nach Maxiprep und Miniprep
 Das Maximum der Absorption von DNA liegt bei 260 nm (auf eins normiert). Die Maxi-Präparation des Klon M_C (Sigma, ohne Ethanol-fällung) zeigt eine deutlich höhere Reinheit als die DNA der Präparation M_B (Qiagen mit anschließender Ethanol-fällung). Auch die zugehörige Mini-Präparation zeigt höhere Absorptionswerte bei 230 nm, wodurch eine größere Verunreinigung angezeigt wird.

3.4 Nachweismethoden

Nachweismethoden für das Nav1.2a Insert werden benötigt, um bei der Klonierung der Bakterien die pCDM8-positiven Klone zu selektieren. Hierzu eignen sich ein Enzymverdau und die PCR-Methode (Saiki et al., 1988). Weiterhin können mit der PCR-Methode HEK293-Zellen auf die Expression der Natriumkanäle untersucht werden (Abschnitt 3.7). Beide Methoden funktionieren bei den unten beschriebenen Protokollen sehr zuverlässig.

Der Enzymverdau des Vektors pCDM8 wird mit den Enzymen Sac I und Cla I durchgeführt. (Versuchsprotokoll siehe Tabelle 3.5). Der Nachweis erfolgt auf einem 1,2% Agarosegel zusammen mit einer 1 kb-Basenladder.

Restriktionsverdau, 60 min bei 37°C	
Plasmid-DNA	-> 1 µl (Miniprep)
Multicorepuffer(1:10)	-> 2 µl
Enzym	-> 1µl (10 units)
H2O	-> ad 20 µl

Tabelle 3.5 Zusammensetzung des Versuchsansatzes für den Restriktionsverdau

Die Schnittstellen kurz vor und hinter dem Nav1.2a Insert sowie zweimal im Insert sind in Abbildung 3.5 schematisch gezeigt. Das typische Bandenmuster auf dem Agarosegel, das für den Wildtyp und die Mutante des Inserts gleich ist, ist in Abbildung 3.7 links zu sehen. Die anhand der Basensequenz (siehe Anhang) errechneten und die mit der Basenladder bestimmten Fragmentlängen sind in Tabelle 3.6 zu sehen und stimmen gut überein.

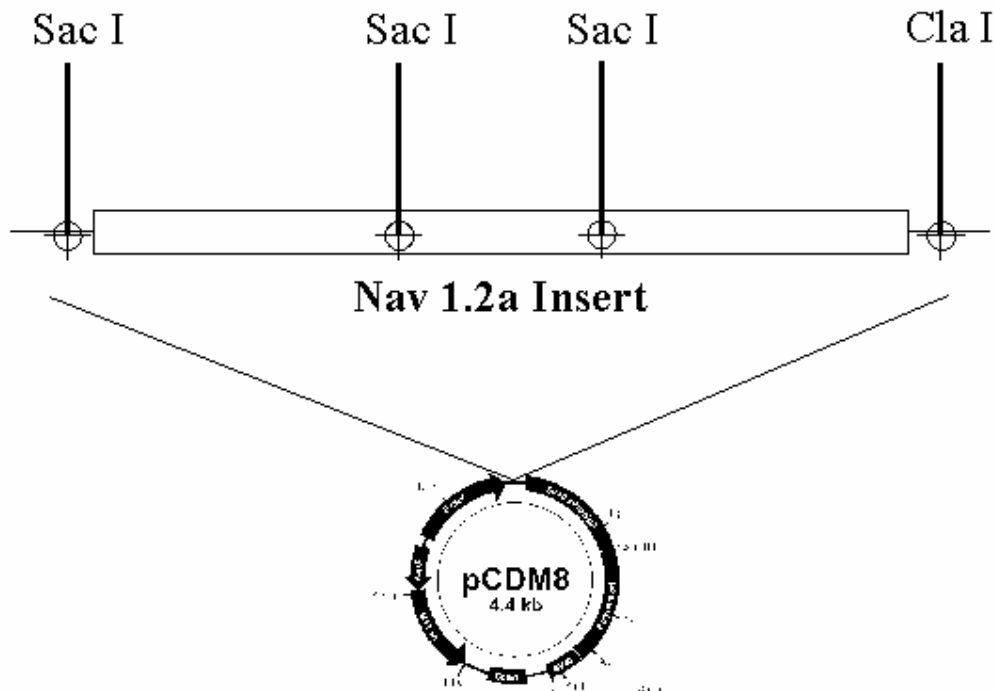


Abbildung 3.5 Nachweis des Nav1.2a Inserts mit der Restriktionsenzym-Methode
Die Schnittstellen der Enzyme Sac I und Cla I sind dargestellt.

Fragment	theoretische Länge / bp	gemessene Länge / bp
1	1171	1300
2	2509	2550
3	2846	3000
4	3848	4000

Tabelle 3.6 Theoretisch errechnete und gemessene Fragmentlängen des oben dargestellten Restriktionsverdau mit den Enzymen Cla I und Sac I
Sie stimmen in Anzahl und Länge gut überein (siehe Abbildung 3.7).

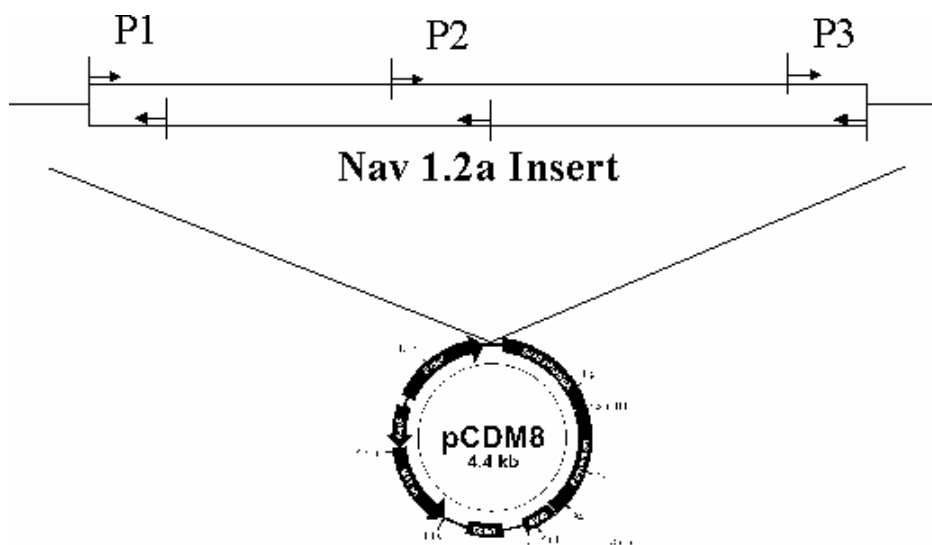


Abbildung 3.6 Nachweis des Nav1.2a Inserts mit der PCR-Methode
Die drei Primerpaare P1, P2 und P3 sind am Anfang, in der Mitte und am Ende der Natriumkanal-DNA lokalisiert.

Für den PCR-Nachweis werden die in Tabelle 3.8 aufgeführten Primer verwendet. Die Primer sind so ausgewählt, dass je ein Teil am Anfang, in der Mitte und am Ende des Inserts amplifiziert wird (siehe Abbildung 3.6) und sich die Längen deutlich voneinander unterscheiden. Außerdem sind die Primer so gewählt, dass die Annealingtemperatur (berechnet nach der Wallace Regel: $(T = \text{„}2x(A+T)+4x(G+C)-10\% \text{“})$) im Bereich von 49°C - 52°C liegen.

Auch die PCR unterscheidet nicht zwischen Wildtyp und Mutante. Das Ergebnis einer PCR mit dem Vektor pCDM8 mit Nav1.2a auf einem 1,2% Agarosegel ist in Abbildung 3.7 zu sehen. Mit dem in Tabelle 3.3 verwendeten Protokoll kann jeweils ein Primerpaar, aber auch alle 3 Paare gleichzeitig eingesetzt werden. Auch hier stimmen, wie in Tabelle 3.9 zu sehen ist, die bestimmten Fragmentlängen mit den erwarteten überein.

PCR-Ansatz für 25 µl:

PCR-Mastermix (1:2)	12,5 µl
Primer forward (100 pmol/µl)	0,5-1,0 µl
Primer revers (100 pmol/µl)	0,5-1,0 µl
Template:	
Bakterienkultur	Spitze von Pipette/Stoher
Miniprep	0,1 µl
Vector-DNA	<10 ng
rtPCR (*)	1,0 µl
H2O (Nuclease-Free)	ad 25 µl

Thermocycler:

1. Denaturierung 95°C 4 min Miniprep oder 8 min Bakterienkultur
2. Zyklus 30x

Denaturierung	95°C für	30 sec
Annealing	50°C für	30 sec
Elongation	72°C für	45 sec
3. Elongation 72°C für 10 min
4. Warten 4°C

Nachweis:

Geldokumentation mit 1 kb Basenladder auf dem Gel

Agarose	1,2%
Ethidium Bromid	0,05µl / ml
TBE-Puffer	1:10
Elektrophorese	120V, 15-120 min (Elektrophoresekammer)
UV-Analyse / Photodokumentation	

Tabelle 3.7 Protokoll für den PCR-Nachweis von Nav1.2a für verschiedenen Materialien (Templates)

* rtPCR: reverse Transkriptase PCR. Dieses Protokoll wird auch für den Nachweis von β -Aktin (siehe 3.7) verwendet. Die Anleitung für die Geldokumentation wird auch für den Restriktionsverdau und die DNA-Quantifizierung mit λ -DNA benutzt.

Primerpaar	forward Sequenz 5'3'	reverse Sequenz 5'3'
Nav1	ATGGCACGGTCAGTGCTG	TCCAACCAATTCCAGGGA
Nav2	AACAACCTCCAGATAGCC	GATCAGGAAGTCCAGCCA
Nav3	GCGAGAGTGGAGAGATGG	TCGTAGGAAGGTGGAGAA

Tabelle 3.8 Sequenzen der Primerpaare zum Nachweis von Nav1.2a (siehe Abbildung 3.7)
Die Annealing-Temperaturen liegen zwischen 49°C und 52°C.

Primerpaar	theoretische Länge / bp	gemessene Länge / bp
Nav1	545	550
Nav2	825	800
Nav3	327	300

Tabelle 3.9 Theoretisch errechnete und gemessene Fragmentlängen (Abbildung 3.7) der oben dargestellten PCR

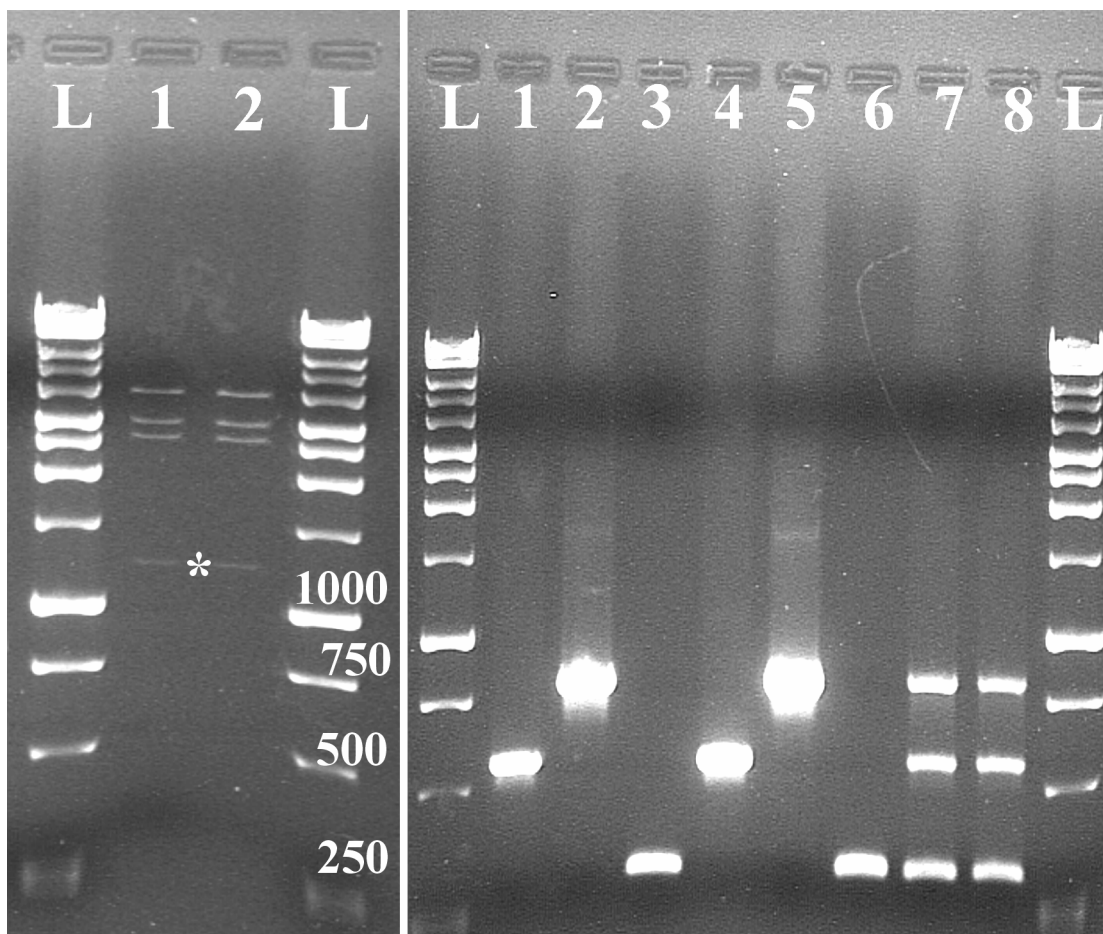


Abbildung 3.7 Geldokumentation des Restriktionsverdaus und der PCR, flankiert jeweils von einer 1 kb-Basenladder

In dem Restriktionsverdaus zweier Klone links zeigt sich in den Banden 1 und 2 das charakteristische Bandenmuster mit einem kurzem (*) und drei längeren Fragmenten. Im rechten Bild ist die PCR der Vektorpräparation zweier Klone dargestellt. Jeweils das Produkt von einem Primerpaar, also eine Bande in den Banden 1-6 und gleichzeitig in einer PCR die Produkte der 3 Primerpaare in 7 und 8. L: Basenladder, die Banden 250, 500, 750 und 1000 sind markiert.

3.5 Liposomale Transfektion

Die Liposomale Transfektion (Felgner et al., 1987; Budker et al., 1997) wurde in dieser Arbeit gewählt und in diesem Labor etabliert, weil sie im Gegensatz zu anderen Transfektionsmethoden, z.B. Calciumphosphat-Methode oder Elektroporation, eine hohe Effizienz und ein einfaches Versuchsprotokoll verspricht. Außerdem gründet sich ein großer Teil des Methodentransfers (Forschungszentrum in Borstel u.a.) auf liposomale Transfektion.

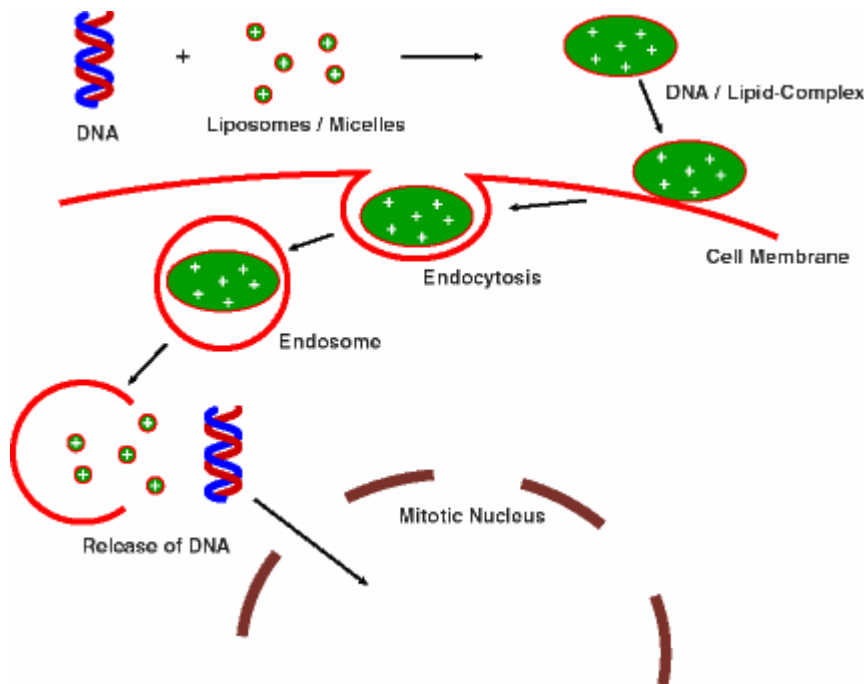


Abbildung 3.8 Schema der liposomalen Transfektion

Zu sehen ist, wie die Vektor-DNA mit Hilfe der Liposomen in die Zelle eingeschleust wird, dort freigesetzt wird und während der Mitose in den Zellkern eindringt (Transfection Technology, Biontex).

Ein Schema des Transfektionsablaufes ist in Abbildung 3.8 abgebildet. Die Vektor-DNA bildet mit den Liposomen/Micellen der Transfektionssubstanz Komplexe, die über Endocytose in die Zelle aufgenommen werden. Die zweite Funktion der Transfektionssubstanz ist das Freisetzen der DNA aus den Endosomen in das Zytoplasma. Befindet sich der Zellkern in der Teilungsphase, kann er die DNA aus dem Zytoplasma aufnehmen. Dann läuft die Biosynthese der kodierten Proteine ab. Hier spricht man von transienter Transfektion. Wird die Vektor-DNA hingegen dauerhaft in den Zellkern eingebaut und bei Zellteilungen weitergegeben, spricht man von stabiler Transfektion. Die Wahrscheinlichkeit hierfür lässt sich anhand der Experimente auf eine stabil transfizierte Zelle auf 10 000 transient transfizierte abschätzen.

Wichtige Kriterien für eine erfolgreiche Transfektion sind die Transfektionseffizienz, d.h. wie viele der behandelten Zellen eine Expression der Fremdproteine zeigen, die Stärke der Expression und die Toxizität für die Zellen. Ausschlaggebend sind die Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion, die Menge der Vektor-DNA im Verhältnis zur Menge der Transfektionssubstanz und die Inkubationszeit. Größere Mengen DNA sind in der Regel toxisch, zu geringe Mengen zeigen eine nur schwache Expression (Abschnitt 7.2). Auch die Reinheit der DNA scheint für die Transfektion nicht unerheblich zu sein (siehe Abbildung 3.4), um die Bildung des DNA-Lipid-Komplexes nicht zu stören (Angaben der Hersteller der

benutzten Substanzen). Auch ist LPS (Lipopolysaccharid) in den Präparationen für viele Säugerzellen toxisch (Gassen & Schimpf, 1999). Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente sind in Abschnitt 7.2 dargestellt.

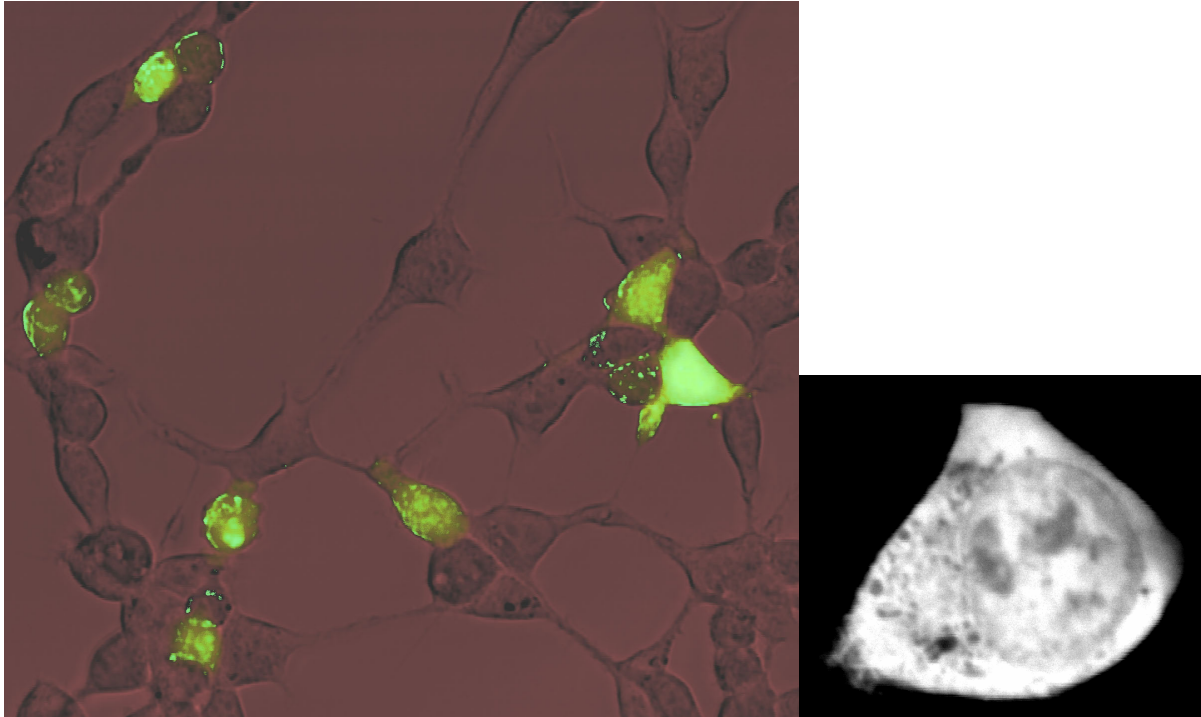


Abbildung 3.9 HEK239-Zellen transient mit dem EGFP-Vektor transfiziert: Falschfarbenaufnahme mit einem konfokalen Mikroskop (Zeiss)
links Zellverband, Anregung bei 488 nm + Mikroskoplicht, rechts Einzelzelle, Anregung bei 488 nm
 Neben nicht transfizierten Zellen (links, roter Hintergrund) sind mehrere Zellen mit fluoreszierendem Pigment in unterschiedlicher Intensität zu erkennen. Die GFP-Proteine sind nicht gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, sondern lassen das Zytoplasma granuliert erscheinen und bilden so auch Zellorganellen ab (rechts).

Für die Transfektion werden 3 verschiedene kationische liposomale Transfektionssubstanzen verwendet.

Genepor 2 wurde nur zum Testen verwendet und nach Protokoll des Herstellers mit Substanz „DNA-Diluent“ verwendet (siehe auch Abschnitt 7.2). Die Anleitungen der Hersteller für Metafectene und Superfect wurden in mehreren Testversuchen hinsichtlich Toxizität und Effizienz weiterentwickelt und auch die Zelldichte für die elektrophysiologischen Untersuchungen optimiert. Die Dichte muss einerseits zum Zeitpunkt der Transfektion groß sein, d.h. am besten 90-100% optische Konfluenz im Mikroskop (entspricht 30-60% realer Konfluenz, die aufwändig anhand von Wachstumskurven ermittelt werden müsste), damit sich möglichst viele Zellen in der Mitose-Phase befinden. Andererseits werden für elektrophysiologische Ableitungen Zugänge zu Einzelzellen benötigt. Wenn also zum Zeitpunkt der Transfektion die Zellen schon eine hohe Konfluenz aufweisen, sind nach ein bis drei Tagen, die für die Genexpression benötigt werden, durch Zellteilung dichte, zum Teil mehrlagige Zellrasen entstanden.

3.6 Transiente Transfektion von Nav1.2a

Die transiente Transfektion wird als Kotransfektion durchgeführt. Das bedeutet, dass das Markerprotein (hier das EGFP) und das zu exprimierende Protein auf verschiedenen Vektoren liegen. Die Alternative ist ein Vektor, der sowohl das Markerprotein enthält, (meistens) fusioniert mit dem zu untersuchenden Protein. Die Kotransfektion funktioniert nach dem Alles- oder Nichts- Prinzip. Wenn sich die Zellen in der Mitose befinden, werden alle vorhandenen Vektoren aufgenommen und, sofern zum Zellsystem kompatibel, auch zu > 90% exprimiert (Abschnitt 7.2).

Schritt	Superfect (Qiagen)	Metafectene (Biontex)
1. Aussaat	Auszählen in der Zählkammer 150.000 Zellen / 3,5 cm Petrischalen für 24h absetzen lassen	
2. Zelldichte	vor der Transfektion die optische Zelldichte kontrollieren	
3.1 Trans- fektionsreagenz	1µg EGFP-C1 + 1-10 µg pCDM8 in 100 µl Medium (ohne FCS/PS) aufnehmen 10-20 µl Superfect hinzugeben	1µg EGFP-C1 + 1-10 µg pCDM8 in 100 µl Medium (ohne FCS/PS) aufnehmen 6-12 µl Metafectene in 100 µl Medium (ohne FCS/PS) aufnehmen
3.2 Mischen	durch vorsichtiges Pipettieren	beide Lösungen vorsichtig mischen
3.3 Inkubieren	Lösung 10 min bei 20°C inkubieren	Lösung 15 min bei 20°C inkubieren
4.1 Zellen	Lösungswechsel mit 1 ml frischen Serums (mit FCS/PS)	
4.2 Zugabe der Reagenz	Transfektionsreagenz hinzugeben und vermischen	
5. Inkubieren	Für 75-120 min bei 37°C und 5 % CO ₂ inkubieren	a) für 75 min inkubieren b) über Nacht inkubieren
6. Lösungs- wechsel	Lösungswechsel mit 2 ml frischem Serum (mit FCS/PS)	a) Lösungswechsel b) Lösungswechsel am nächsten Tag
7. Messung		

Tabelle 3.10 Transfektionsprotokoll für die transiente Transfektion für Superfect und Metafectene
Gleiche Schritte sind nur in der Spalte für Superfect aufgelistet. Unterschiedliche Mengenangaben und
Zeiten sind fett gedruckt.

Vorteile der Kotransfektion sind:

1. Es werden keine Fusionsproteine (Markerprotein + zu exprimierendes Protein) erzeugt, die die Proteinfunktion beeinflussen könnten.
2. Die pCDM8-Vektoren mit den Nav1.2 Wildtyp und F1489Q Inserts müssen nicht verändert werden (siehe Abschnitt 3.2).
3. Das Verhältnis von Markerprotein zu Nav1.2a kann für die Expression und die Patch-Clamp-Anlage optimiert werden.
4. Die Kotransfektion ist flexibel für neue Ansätze mit anderen Vektoren.

Nachteile der Kotransfektion sind:

1. Eine quantitativ gleichmäßige Expression über mehrere Versuche ist schwer zu erzielen.
2. Vor jedem Versuch ist eine neue Transfektion erforderlich. Das bedeutet langfristig einen höheren Arbeits- und Materialaufwand.
3. Bei der Kopplung von Markerprotein und zu exprimierendem Protein lassen sich über den Marker Aussagen über die Stärke der Expression und den Lokus der Expression in der Zelle treffen. Dies ist bei der Kotransfektion nicht möglich.
4. Bei einer stabilen Transfektion erscheint es relativ unwahrscheinlich, dass gleichzeitig zwei Vektoren in das Genom der Zelle integriert werden.

Einen Anhaltspunkt für das kritische Verhältnis von DNA-Menge zur Menge der Transfektionssubstanz liefern die Hersteller der Substanzen und die beiden Arbeitsanleitungen von Parlow & Schmolz und Schmidt.

Das Protokoll für die transiente Transfektion, das in mehreren Schritten an die Erfordernisse der Messungen angepasst wird (siehe oben), ist in Tabelle 3.10 abgedruckt. Daraus ergibt sich eine Zeitspanne von 3-4 Tagen von der Aussaat der Zellen bis zur Messung. Hier ist eine vorausschauende Versuchsplanung nötig.

3.7 Stabile Transfektion

Die Motivation für den initial hohen Zeitaufwand für eine stabile Transfektion einer Zelllinie ergibt sich aus den Nachteilen der transienten Transfektion. Durch die transiente Transfektion lässt sich keine hundertprozentig konstante Genexpression erzielen. Ein einheitliches Versuchsobjekt ist für den Vergleich von Messungen, das Erkennen von Artefakten und neuen Phänomenen nicht zu unterschätzen. Bei häufigen Experimenten kehrt sich der Zeit- und Materialaufwand zu Gunsten der stabilen Transfektion um. Die Versuchsvorbereitung für elektrophysiologische Untersuchungen beschränkt sich dann auf das Aussäen der Zellen.

Bei der stabilen Transfektion wird noch ein weiteres Merkmal benötigt, eine eukaryotische Resistenz (Resistenzgen für die HEK-Zellen) gegenüber einem Selektionsfaktor. Der eingebrachte Vektor kodiert die Resistenz. Dies ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Als Selektionsfaktor wird die Geneticin-Resistenz (Geneticin = G418) verwendet. Die Resistenz gegenüber dem pro- und eukaryotischen Antibiotikum liegt auf dem EGFP-C1 Vektor von Clontech.

Auch für die stabile Transfektion wird der Kotransfektions-Ansatz gewählt. Die Alternative wäre ein Umklonieren der Natriumkanal-Gens in den EGFP-C1 Vektor gewesen, um alle 3 Merkmale auf einem Vektor zu haben. Der pCDM8-Vektor sollte jedoch nicht verändert werden, das es sehr schwer ist, das Natriumkanal-Gen in einer anderen Umgebung stabil zu halten (Abschnitt 3.2).

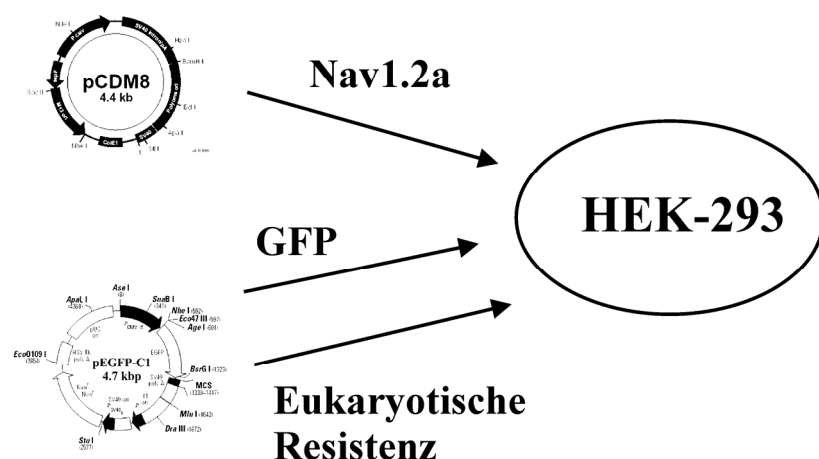


Abbildung 3.10 Schema der stabilen Transfektion

Im Gegensatz zur transienten Transfektion wird die eukaryotische Resistenz, die mit dem Vektor eingeschleust wird, ausgenutzt.

Schritt	Versuchsdurchführung
1. Aussaat der Zellen	1,5 Mio. Zellen werden pro Kulturflasche (50 ml) ausgesetzt.
2. Transfektion	Bei totaler optischer Konfluenz wird die Transfektion nach Protokoll (Tabelle 3.3) durchgeführt.
3. Zusatz von Geneticin	Nach 2 Tagen wird dem Mediums Geneticin (1 mg / ml) zugegeben und danach alle zwei Tage das Medium gewechselt.
4. Vermehrung	Nach Absterben aller nicht resistenten Zellen und Bildung von „Zellklon-Inseln“ mit ca. 100-1000 Zellen werden die Klone mit Trypsin abgelöst und in der Flasche verteilt.
5. Klonierung	Bei totaler optischer Konfluenz werden die Zellen trypsinisiert, ausgezählt und nach der Limited Dilution(*) Methode „einzeln“ in die Wells einer 96-Well-Platte überführt.
6. Screenen der Wells	Vor dem ersten Füttern nach ca. 7 Tagen werden die Wells unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und alle Wells selektiert, in denen genau 1 Klon anhand des EGFPs zu erkennen ist.
7. Vermehrung	Die Zellen aus Schritt 6 werden alle zwei bis drei Tage gefüttert und bei Zellklonen von ca. 50-100 Zellen trypsinisiert und verteilt.
8. Umsetzen	Wenn die optische Konfluenz maximal ist, werden die Zellen nach Ablösen mit Trypsin in größere Wells (6 oder 24) überführt.
9. Vermehrung	Die Zellen werden alle zwei bis drei Tage gefüttert und 1-2x abgelöst und verteilt.
10a. Screening der Klone	Bei totaler optischer Konfluenz werden die Zellen trypsinisiert und in 2 Teile aliquotiert. Der erste Teil wird auf das Vorhandensein des Nav1.2a Inserts gescreent.
10b. Backup der Klone	Der zweite Teil, wird wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, eingefroren oder wieder zur Vermehrung ausgesetzt.

Tabelle 3.11 Versuchsprotokoll für die stabile Transfektion

* Die Limited Dilution Methode: die Zellkonzentration wird zweistufig herunterverdünnt, so dass im Schnitt eine einzige Zelle in 300µl Medium aufgenommen wird, dem Volumen eines Wells in einer 96er Well-Platte.

In Tabelle 3.11 sind die einzelnen Schritte für die stabile Transfektion aufgeführt. Die Transfektion erfolgt im Gegensatz zur transienten Transfektion unter optimalen Bedingungen, d.h. es befindet sich ein Maximum von Zellen durch eine optische Konfluenz von 90-100% in der Teilungsphase (siehe oben). Nach der Transfektion warte man zwei Tage bis zur Exposition mit G418, damit sich die Zellen von der Transfektion erholen können. Vor dem Mediumwechsel auf G418 wird auf ein Ausdünnen der Zellen verzichtet. So dauert es zwar länger (5-7 Tage), bis die nicht resistenten Zellen abgestorben sind, dafür gehen durch das Ausdünnen keine Klone verloren.

Die Schritte, bei denen die Zellen abgelöst und verteilt werden, dienen zur Beschleunigung des Zellwachstums, da sich die Zellen bei Kontakt im Wachstum inhibieren. Für den gesamten Versuchablauf sind 12-16 Wochen zu rechnen.

Das Screenen der Klone ist mit der Patch-Clamp-Methode anhand der Natriumströme im Whole-Cell-Modus möglich, bei einer zu erwartenden geringen Kotransfektionsrate von Marker und Resistenzgenen und Nav1.2a jedoch ein sehr mühsames Unterfangen. Aus diesem Grund wird ein Screening-Verfahren mit relativ hohem Durchsatz entwickelt.

Die mRNA extrahiert man aus den Zellen und schreibt sie in cDNA um (rtPCR). Dann liefert die PCR-Methode den Nachweis, ob Nav1.2a-mRNA vorhanden ist. Zur Überprüfung des Verfahrens wird ebenfalls mit der PCR-Methode das β -Aktin als „Housekeeping-Gen“ der HEK293-Zellen nachgewiesen (Choi et al., 1991; Primer freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Andra Schromm, Forschungszentrum in Borstel). Die Primer hierfür sind in Tabelle 3.13 gezeigt. Die Geldokumentation eines Screening ist in Abbildung 3.11 zu sehen.

Bis zu diesem Zeitpunkt ist leider noch kein positiver Nav1.2a Zellklon gefunden worden. Hingegen konnten viele Klone erzeugt werden, die resistent gegen Geneticin sind und die das EGFP in unterschiedlicher Quantität stabil exprimieren, also den Vektor EGFP-C1 in das Genom integriert haben. Das zeigt, dass die Methode der stabilen Transfektion prinzipiell funktioniert.

Schritt	Versuchsdurchführung
Ernten der Zellen	Ein Aliquot aus Schritt 11, Tabelle 3.11 wird im trypsinfreien Pellet für den Versuch eingesetzt. Wünschenswert sind 10^6 - 10^7 Zellen, 10^5 sind aber ausreichend.
Präparation der mRNA	Qiagen-Plant-Kit!: nach dem Protokoll „RNeasy Mini-Protocol for Isolation of total RNA from Animal-Cells!“ unter Einsatz der QIA-Shredder Spincolumn 2 zum Homogenisieren der Zellen.
Bestimmung der RNA-Menge	Verdünnung des Isolates 1:20 auf 100 μ l RNase freies H ₂ O. Messung der RNA-Konzentration mit 96-Well Platten für UV am GENios, Eichkurven von Anne Hoffmann, ZBM Kiel, erstellt
reverse Transkription	mit Omniscript-rT-Kit von Qiagen Einsatz von 1 μ g RNA (bis 50 pg sinnvoll, siehe Herstellerangaben)
PCR	nach Protokoll Tabelle 3.7 mit Primern für β -Aktin und Nav1.2a
Geldokumentation	Dokumentation des Ergebnisses auf Agarosegel (siehe Tabelle 3.7)

Tabelle 3.12 Versuchsprotokoll für das Screenen der Zellklone auf Nav1.2a

Aus Kosten- und Zeitgründen ist ein Pooling der Zell-Klone (5-10 Stück) nach dem Schritt der mRNA-Extraktion sinnvoll. Die RNA-Templates müssen dann bei -20°C aufbewahrt werden, um die nachträgliche Identifikation des/der positiven Klons/Klone durch getrenntes Analysieren zu ermöglichen.

Primerpaar	forward Sequenz 5'3'	reverse Sequenz 5'3'
β-Aktin	AGCGGGAAATCGTGCGTG	CAGGGTACATGGTGGTGC
EGFP_1	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	TCTAGATCCGGTGGATCC
EGFP_2	CGACGTAAACGGCCACAA	GTACCGTCGACTGCAGAA

Tabelle 3.13 Primer für den PCR-Nachweis von β-Aktin und den EGFP-C1 Vektor von Clontech

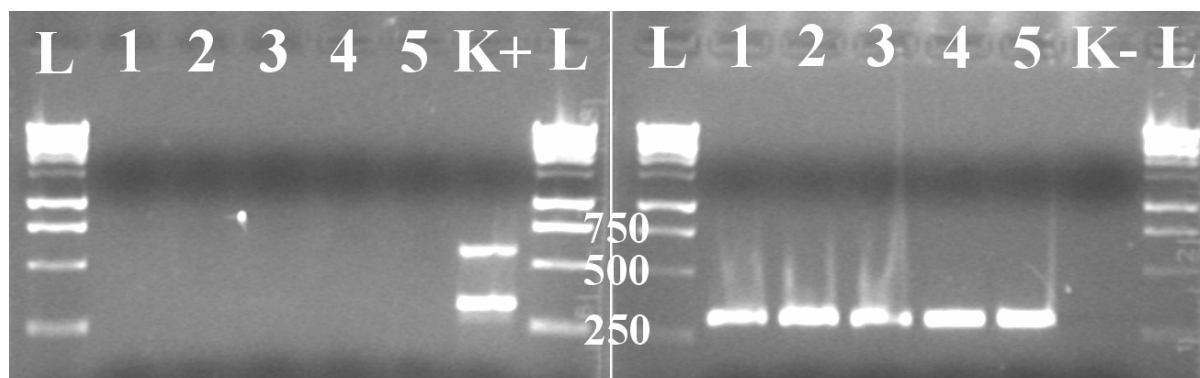


Abbildung 3.11 Geldokumentation des Screening auf Nav1.2a

Das Template, bestehend aus der rT-PCR von stabil transfizierten HEK293-Zellen (G418-Resistenz und sichtbar EGFP), wird mit Primern für das β-Aktin und dem Nav1.2a-Primer versetzt und das Produkt der anschließenden PCR dokumentiert.

links 1-5: fehlender Nachweis des Nav1.2a mit dem Primerpaar Nav1.2a

rechts 1-5: Nachweis des β-Aktins in den gleichen Templates

K+: positive Kontrolle mit einer vorherigen rtPCR Präparation von nativen HEK293 und einem pCDM8 Vektor mit Nav1.2a

K-: negative Kontrolle ohne Template mit Primern für β-Aktin und Nav1.2a

L: 1kb-Basenladder, die Banden mit 250, 500 und 750 Basenpaaren sind markiert

3.8 Sequenzierung von Nav1.2a

Die Sequenzierung des Nav1.2a Vektors im Bereich des IFM-Motivs (Abschnitt 7.3) dient zur Kontrolle der Nav1.2a F1489Q Mutante. Mit den bisher beschriebenen Nachweisverfahren ist eine Unterscheidung zwischen Mutante und Wildtyp nicht möglich. Für die Sequenzierung steht ein Kapillarsequenzierer Megabace 1000 von Amersham zur Verfügung.

Im ersten Schritt wird die so genannte Sequenzierreaktion durchgeführt, die in Tabelle 3.15 dargestellt ist. Im zweiten Schritt werden die markierten Basenfragmente in einer gelgefüllten Kapillare des Sequenzierers im elektrischen Feld aufgetrennt und die Fluoreszenzintensitäten mit Laserlicht ausgelesen.

Der Sequenzierer liest bei den Versuchen jeweils mehr als 250 Basen pro Versuchsansatz aus, wobei die Basen im mittleren Bereich am besten bestimmt werden können. Deshalb werden zwei Primer für die Sequenzreaktion konstruiert, die 100 bp vor in der Forward-Richtung und 100 bp hinter dem IFM-Motiv in der Revers-Richtung an die DNA des Nav1.2a Inserts binden. Jeder Nachweis wird dann mit beiden Primern in 2 Einzelansätzen durchgeführt. Durch die Redundanz in den Basensequenzen ist ein Abgleich möglich. Die Versuchsanleitung ist in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Primer zum Sequenzieren	forward Sequenz 5'3'	reverse Sequenz 5'3'
IFMSeq	TCTTCATCATCTTCGGCT	AATCAAAGACCATCCCTT

Tabelle 3.14 Primer für die Sequenzreaktionen

Die Primer wurden in einer Standard PCR erfolgreich getestet.

Sequenzierreaktion	
DyEnamic ET-Kit von Amersham :	
400 ng DNA-Template (in 1 µl H ₂ O)	
20 pmol Primer (in 1 µl H ₂ O)	
2 µl Dilution-Buffer	
2 µl Premix	
4 µl H ₂ O	
Thermocycler (Tetradencycler) :	
30 Zyklen	
- Denaturierung	95°C für 20s
- Annealing	50°C für 15s
- Elongation	60°C für 60s
Ethanol-fällung :	
(siehe Tabelle 3.4)	

Tabelle 3.15 Schritte der Sequenzierreaktion vor der Analyse in den Kapillaren des Megabace 1000

4 Material und Methoden: Elektrophysiologie

4.1 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik (Neher & Sakmann, 1976) ist eine elektrophysiologische Methode, um Ströme über Zellmembranen zu bestimmen. Neher und Sakmann erhielten für die Entdeckung und Entwicklung dieser Methode 1991 den Nobelpreis für Medizin.

Mit verschiedenen Varianten dieser Methode ist es möglich, sowohl makroskopische Ströme über die ganze Membran einer Zelle als auch mikroskopische Ströme durch einzelne Ionenkanäle zu messen. Über die Kenntnis der variablen Ströme eines Ionenkanals erhält man einen Zugang zum Aufbau und zur Funktion des Kanalproteins.

Beim Patchen wird eine Glaspipette mit einer sehr kleinen Öffnung (wenige μm^2) in die Nähe der Zellmembran gebracht. Durch Anlegen eines Unterdrucks an die aufgesetzte Pipette bildet sich eine sehr dichte Verbindung zwischen Pipettenspitze und Zellmembran mit einem Abstand von weniger als 1 nm aus (Corey & Stevens, 1983). Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Ca^{2+} -Brücken und Van der Waals-Kräfte (Corey & Stevens, 1983; Opsahl & Webb, 1994) sind verantwortlich für diese Verbindung (Seal), wobei der Kriechwiderstand zwischen Glas und Membran einige $10^9 \Omega$ (Gigaseal) betragen kann. Durch den extrem hohen Widerstand ist es möglich, mit geeigneten Verstärkern auch sehr kleine Ströme $<1 \text{ pA}$ mit hoher Zeitauflösung von 100-300 kHz (Bandbreite des Verstärkers) zu messen.

Je nach Konstellation der Pipette zur Zellmembran unterscheidet man dabei verschiedene Patch-Konfigurationen (Hamill et al, 1981; Abbildung 4.1). Die Orientierung der Membran bestimmt auch die Wahl der Bad- und Pipettenlösung.

a) Cell-Attached

Nach der Bildung eines Gigaseals befindet sich das Präparat in der Cell-Attached-Konfiguration (siehe Abbildung 4.1). Damit ist dieser Modus der am einfachsten zu erreichende. Alle weiteren Schritte verringern die Wahrscheinlichkeit eines stabilen Seals. Ein weiterer Vorteil der Cell-Attached-Konfiguration ist, dass die Zelle völlig intakt belassen wird und somit die Membrankanäle in ihrer natürlichen Umgebung gemessen werden können. Dies ist besonders dann wichtig, wenn unbekannte Kofaktoren oder Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett (Naren & Kirk, 2000; Paysan & Breer, 2001) für die Funktion des Kanals notwendig sind.

Diese Konfiguration hat aber auch gravierende Nachteile. Das Membranpotential über dem Seal kann nur näherungsweise geschätzt werden, da sich das Verstärkerpotential auf die Serienschaltung aus Patch und Restmembran aufteilt. Die Spannung über der Restmembran, die dem Ruhemembranpotential der Zelle entspricht, ist aber unbekannt. Außerdem kann die Lösung in der Zelle nicht kontrolliert werden. Weiterhin verschlechtert die dabei erforderliche relativ große Eintauchtiefe der Pipette das Signal-Rauschverhältnis (Keunecke, 1995; Farokhi et al., 2000).

Allerdings wird durch die neue Methode der Pipettenbeschichtung in dieser Arbeit (Abschnitt 4.8) der Nachteil des größeren Rauschens aufgehoben (Abschnitt 11.2).

b) Inside-Out

Zieht man die Pipette in der Cell-Attached Konfiguration von der Zelle ab, löst sich ein Membranstück von der Zelle, ohne dass der Sealwiderstand abnimmt (Abbildung 4.1). Das

Potential und die Lösungen auf beiden Seiten der Membran lassen sich genau kontrollieren. Durch das Heraufziehen der Pipettenspitze bis kurz unter die Oberfläche lässt sich das Rauschen durch eine Abnahme der Pipettenkapazität deutlich verringern (Keunecke, 1995; Farokhi et al., 2000).

c) Whole-Cell

Um in die Whole-Cell Konfiguration zu gelangen, stellt man einen Cell-Attached-Patch her und durchbricht dann den Membranbereich im Pipettenmund (Abbildung 4.1). Dieses lässt sich durch Anlegen eines plötzlichen Unterdrucks an die Pipette oder durch einen hochfrequenten Wechsellspannungspuls (2000 mV, 1-200 ms, Angaben aus dem Dagan 3900A Manual) erreichen. Dadurch ist eine direkte Verbindung zwischen der Elektrolytflüssigkeit der Pipette und dem Zytosol hergestellt. Durch den direkten Zugang zum Zytosol wird der Strom über die ganze Zellmembran erfasst. Damit entspricht diese Methode den klassischen Untersuchungen mit Einstichelektroden, ist aber im Gegensatz dazu auch für sehr kleine Zellen geeignet. Da die ganze Zelle in die Untersuchung einbezogen ist, und so eine Mittelung über alle Transportprozesse stattfindet, lässt sich ein Screening der Zellen bei bestimmten Fragestellungen besonders gut mit dieser Methode durchführen.

d) Outside-Out

Um in die Outside-Out Konfiguration zu gelangen, geht man von einem bestehenden Whole-Cell Seal aus und entfernt die Pipette langsam axial von der Zelle. Die Membran reißt auf und schließt sich dann wieder um die Pipettenöffnung (nicht abgebildet). Die Außenseite der Zellmembran ist somit der Badlösung zugewandt, und es können Einzelkanalströme mit den gleichen Bad- und Pipettenlösungen gemessen werden wie vorher im Whole-Cell-Modus.

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Außenseite der Membran über die Badlösung zugänglich ist und so z.B. extrazellulär ligandengesteuerte Kanäle bei Austausch der Badlösung untersucht werden können.

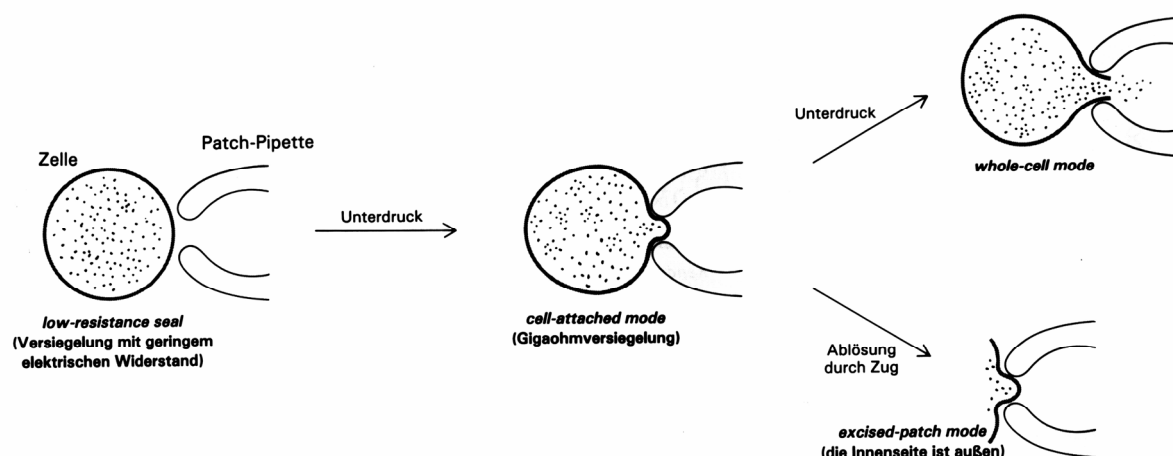


Abbildung 4.1 Die Abbildung zeigt die benutzten Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik und wie man sie im Prinzip herstellt.

Für weitere Einzelheiten über das sehr weite Feld der Patch-Clamp-Technik sei auf die Literatur verwiesen, z.B. Hamill et al. (1981), Single-Channel Recordings (Sakmann & Neher, 1995) oder Patch-Clamp-Technik (Numberger & Dragun, 1996).

4.2 Der Patch-Clamp-Verstärker

Zwei prinzipielle Modi werden bei elektrophysiologischen Messungen unterschieden. Entweder wird bei fester Spannung der Strom über der Membran gemessen (voltage clamp) oder bei konstantem Strom die Spannung bestimmt (current clamp).

Integraler Bestandteil der Patch-Clamp-Technik ist die räumliche Trennung von Strom-Spannungswandler und Hauptverstärker. Die hohen Anforderungen an den Strom-Spannungswandler betreffen im Wesentlichen einen hohen Signal-Rausch-Abstand und das Auflösen der kleinen Einzelkanalströme, sowie einer großen Dynamik, um auch bei den tausendmal größeren Strömen der Ganzzelleleitungen nicht zu übersteuern.

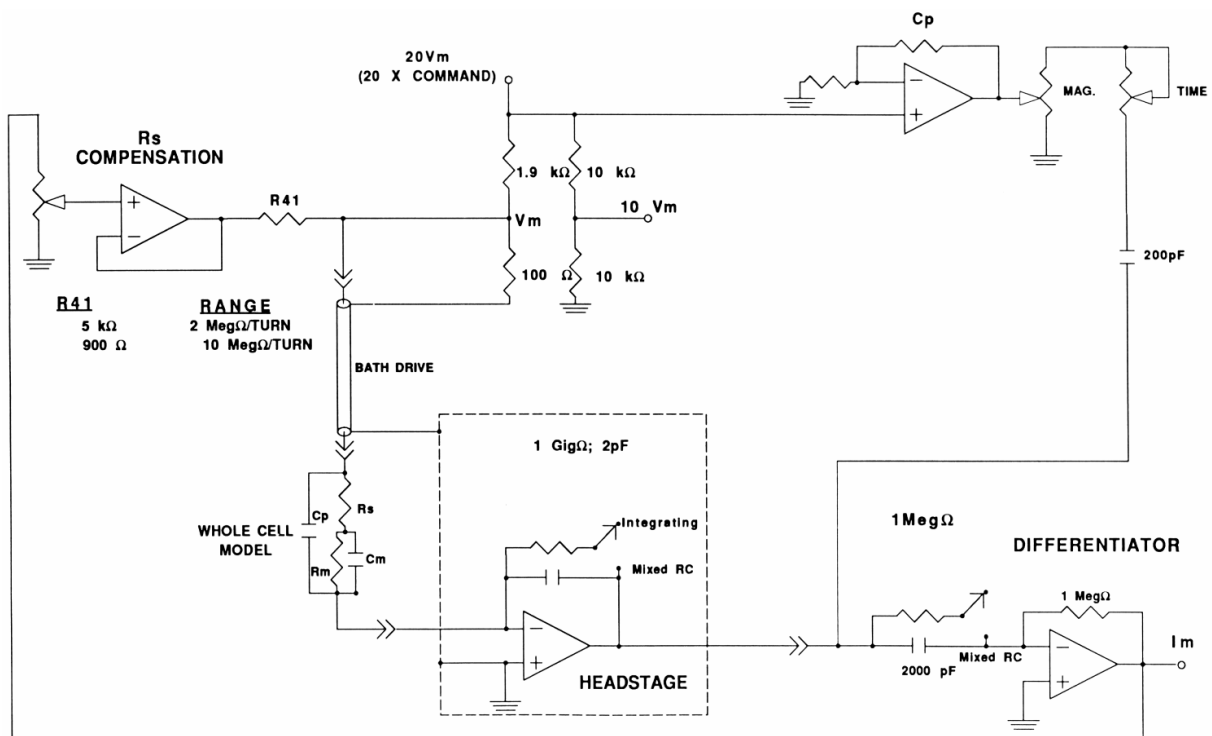


Abbildung 4.2 Vereinfachtes Schaltbild des Dagan 3900A-Verstärkers im Voltage-Clamp Modus
Das Whole-Cell-Model entspricht dabei der Zelle in der Badlösung. Das Besondere an diesem Verstärker ist das so genannte Bath Drive zum Einstellen der Kommandospannung und der Integrating-Modus zur Verringerung des Rauschens (Erklärung im Text).

Ein vereinfachtes Schaltbild des in dieser Arbeit verwendeten Verstärkers Dagan 3900A ist in Abbildung 4.2 zu sehen. Wichtig sind dabei zwei Besonderheiten, die den Dagan von vielen anderen Patch-Clamp-Verstärkern unterscheiden.

Zum einen wird im Voltage-Clamp Betrieb das Kommandopotential nicht über die Pipette, sondern über die „Erdelektrode“ appliziert (bath drive). Der Vorverstärker hält dabei die Pipette durch eine negative Rückkopplung auf virtueller Erde (virtual ground). Dadurch kann ein Teil der Elektronik (z.B. die Spannungseinspeisung) im Vorverstärker eingespart werden. Da der Vorverstärker gleichzeitig als Pipettenhalter fungiert, wird so der Aufbau kompakter. Außerdem wird durch die virtuelle Erde an der Pipette keine aktive Abschirmung des Vorverstärkers benötigt. Das Gehäuse liegt auf Messerde.

Die zweite Besonderheit des Verstärkers ist der so genannte Integrating-Mode. Anstelle eines üblicherweise benutzten Widerstandes als Rückkopplungselement wird ein

Kondensator verwendet. Der Kondensator wird durch den Strom, der durch die Pipette fließt, aufgeladen. Die Ladespannung ist dabei proportional zum Zeitintegral des Pipettenstroms. Durch den nachgeschalteten Differentiator im Hauptverstärker wird die Ladespannung wieder in ein Stromsignal konvertiert. Der Vorteil dieser Schaltung ist der nahezu ideale Frequenzgang bis 100 kHz Bandbreite (limitiert durch die Zeitauflösung des Differentiators) und das Wegfallen des thermischen Rauschens eines sonst verwendeten Widerstandes.

Das Problem dieser Schaltung ist, dass der Kondensator regelmäßig entladen werden muss, um den Verstärker nicht in die Sättigung zu treiben. Diese „Entladeblitze“ können dann in den Datenaufzeichnungen stören. Sie müssen mit der Software bei der Auswertung der Datenreihen entfernt werden. Umgehen lässt sich das diskontinuierliche Entladen durch einen anderen Verstärkermodus, mit einem parallel geschalteten Widerstand (mixed RC) zum kontinuierlichen Entladen. Das Rauschen ist in diesem Verstärkermodus ca. um den Faktor 2 größer. Dieses verdeutlicht den Wert des Integrating-Modus für rauscharme Einzelkanalaufzeichnungen.

In dem Schaltbild in Abbildung 4.2 sind weiterhin das Spannungsnetzwerk für das Bath-Drive, die Serienwiderstandkompensation R_s und die Kapazitätskompensation C_p zu erkennen. Es fehlen die Zusatz-Schaltungen für die Kompensation im Whole-Cell-Modus.

4.3 Der Patch-Clamp-Aufbau

An einen Patch-Clamp-Aufbau werden verschiedene Anforderungen gestellt, die sich teilweise widersprechen. Für die Aufnahme von Einzelkanaldaten müssen Störsignale so weit wie möglich eliminiert werden. Dieses betrifft sowohl elektrische als auch mechanische Einflüsse. Das Messprotokoll erfordert eine durch die Experimente bedingte Kontrolle über das Messobjekt, so dass zusätzliche Geräte/Vorrichtungen hinzukommen, die wiederum das Rauschen erhöhen können.

Der bestehende Aufbau von Albertsen (1994), Keunecke (1999) und Huth (1999) wurde zusammen mit Schröder (2003) weiterentwickelt und an die Versuchsbedingungen angepasst. Dadurch entsteht ein Messplatz, der sehr einfach und effizient zu bedienen ist und ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis aufweist. Eine schematische Darstellung des jetzigen Versuchsaufbaus ist in Abbildung 4.3 zu sehen.

Elektrische Abschirmung:

Im Gegensatz zu anderen Aufbauten befindet sich diese Anlage in einem großen Faradaykäfig, der den Aufbau, Verstärker, Oszilloskop und den Untersucher komplett umschließt. Netzbetriebene Geräte sind soweit wie möglich außerhalb des Käfigs platziert, wie auch in Abbildung 4.3 zu sehen ist. Sämtliche Geräte und Metallteile innerhalb des Käfigs werden über einen zentralen Erdungspunkt mit der Gebäudeerde verbunden. Die Erdung des Aufbaus wurde optimiert. Dazu werden alle Kabel neu verlegt und Erdungskabel mit zu kleinen Querschnitten oder mangelhaften Steckern ausgetauscht. In Abbildung 4.4 ist das Rauschspektrum dieser Anlage abgebildet.

Mechanische Abschirmung:

Der Messaufbau muss von Schwingungen, die über den Fußboden (Gebäudeschwingungen, Trittschall, Türensclagen) übertragen werden, geschützt werden. Dazu ist die Metallplatte des Aufbaus auf einem schwingungsgedämpften Tisch mit träger Betonplatte gelagert (Huth,

1999). Der vorher benutzte Tisch wird wegen einer mangelhaften Niveauregulation ausgetauscht.

Um die Anlage noch besser vor Raumschall zu isolieren, werden Umbauten an der Mechanik durchgeführt. Der Abstand zwischen den beiden Trägersäulen wird verringert, und damit kann die schräge Gewindestange, die den Vorverstärker trägt, verkürzt werden. Die hydraulischen Mikromanipulatoren werden komplett entfernt. Beide Maßnahmen tragen zur mechanischen Stabilität bei und verringern die Eigenschwingung des Systems.

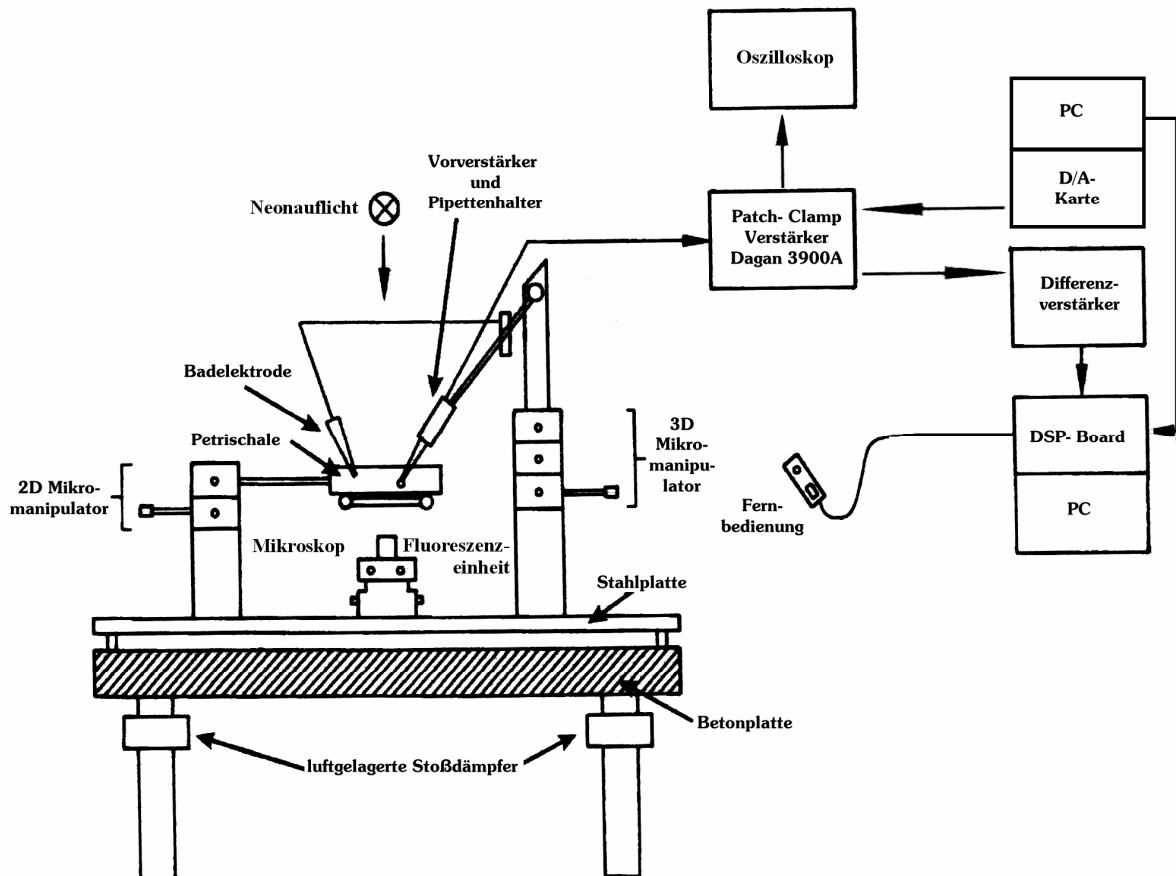


Abbildung 4.3 Schematische Darstellung des Patch-Clamp-Aufbaus mit angeschlossenen Geräten und Signalwegen

Mikroskop:

Das vorhandene Zeiss-Mikroskop wird gegen ein Olympus CKX41 mit Quecksilberbrenner und EGFP-Filterset im Filterblock ausgetauscht. Neben einer besseren Optik zeichnet sich dieses Mikroskop durch die Möglichkeit aus, transfizierte Zellen mit dem EGFP-Filter zu erkennen. Die Zuleitung der Hg-Lampe wird innerhalb des Käfigs in einem Edelstahlwellrohr mit Drahtgeflecht von AZ-Industrietechnik abgeschirmt, Transformator und Zünder für die Lampe befinden sich außerhalb des Faradaykäfigs. Das Restbrummen aus den Lüftungsschlitzen des Lampengehäuses kann mit Aluminiumfolie abgeschirmt werden. Für die native Beobachtung der Patch-Objekte wird Neonlicht von oberhalb des Käfigs mit einem Graufilter im Filterblock verwendet. Die Leuchtstärke und Abbildungsqualität ist für die durchgeführten Experimente auch mit 400-facher Vergrößerung ausreichend.

Mechanischer Aufbau (siehe Abbildung 4.3):

Um das Mikroskop herum ist die Mechanik für die Kontrolle von Messobjekt und Pipette aufgebaut. Auf der linken Seite befindet sich ein x-y-Manipulator, auf den der Objektträger mit der Halterung für die Erdelektrode über dem Objektiv installiert ist.

Auf der rechten Seite steht ein mechanischer x-y-z-Mikromanipulator für die Verschiebung der Pipette. Dieser Manipulator lässt sich zwar nicht so fein regulieren wie der vorher zusätzlich installierte hydraulische Manipulator von Narishige, die praktische Erfahrung zeigt aber, dass der einfache x-y-z-Mikromanipulator für die Kontrolle der Pipette ausreichend ist, bei erhöhter Stabilität des gesamten Systems und vereinfachter und schnellerer Bedienung. Auf dem Manipulator ist eine 45° geneigte Zahnstange befestigt, die den Vorverstärker mit Pipettenhalter trägt und zum Herunterlassen der Pipette in die Messlösung benutzt wird.

Weiterhin ist ein Schlauchsystem mit Dreiwegehahn und wassergefülltem U-Rohr an den Pipettenhalter angeschlossen. Hiermit kann ein Unter- bzw. Überdruck an die Pipette angelegt werden.

Oszilloskop:

Das Oszilloskop von Phillips besitzt eine Gleichspannungsversorgung und ist in einem zusätzlichen Faradaykäfig positioniert. Bei Messungen oberhalb einer Filterfrequenz von 10 kHz sollte es ausgeschaltet werden (siehe Abbildung 4.4), da der Transformator für die Hochspannungserzeugung Einstreuungen in das Messsystem verursacht.

Kommandopotential:

Das Messsignal für die Kommandospannung wird mit einer D/A-Karte von BMC-Messsysteme (Maisach) an einem separaten PC generiert. Die Karte ist an den Kommandoingang des Dagan-Verstärkers angeschlossen. Mit dem von mir geschriebenen Delphi-Programm Patch-Generator können über ein Setfile Potentiale und Haltezeiten vorgegeben werden. Das Programm verfügt über eine Zeitauflösung von einer μs , die erreichbare Genauigkeit unter Windows98 liegt bei $< \pm 10\mu\text{s}$ bei 500 ms Schaltdauer. Der Spannungsbereich im Programm muss analog zu den Einstellungen am Kommando-Eingang des Dagan-Verstärkers vorgegeben werden. Außerdem verfügt das Programm über einen Repeat-Schalter, der das Protokoll ständig wiederholen kann. So lassen sich sehr bequem fast beliebige Messspannungen vorgeben.

Der zweite Kanal der D/A-Karte ist mit dem Eingang der Datenaufnahme verbunden, so dass bei jeder Potentialänderung eine Markierung in den aufgenommenen Daten gesetzt wird (beschrieben bei Huth, 1999). Dieses Vorgehen ermöglicht sowohl eine kontinuierliche Messung mit hohen Abtastraten, als auch die automatische Prozessierung der Daten nach der Aufnahme durch die Markierungen.

Datenaufnahme:

Die Datenaufnahme erfolgt wie bei Huth (1999) beschrieben. Es können unter Windows98 kontinuierlich Daten bis zu 30 min mit einer Sampling-Frequenz von 200 kHz mit dem 12-Bit A/D-Wandler von Dalanco aufgenommen werden. Über die angeschlossene Fernbedienung kann man direkt am Messplatz eine neue Messung starten, so dass im Wechsel eine schnelle Kontrolle des Messobjektes und Datenaufnahme erfolgen kann. Zur Steuerung der Wandlerkarte dient das Programm `sampl250` (Albertsen, 1994).

Um Erdschleifen zwischen Verstärker und Messkarte zu vermeiden, erfolgt die Trennung der Erde mittels eines Differenzverstärkers beim Durchtritt durch den Faradaykäfig. Die modifizierte Version des Differenzverstärkers wird von Schröder (2003) beschrieben.

Mit Hilfe eines 10 M Ω Widerstandes kann eine zuverlässige Strommessung des Messsignals erstellt werden. Außerdem lässt sich zeigen, dass die Verstärkungsstufen des Dagens von 1-500 mV/pA linear sind.

Klimaanlage:

Die Messungen erfolgten überwiegend unter hochsommerlichen Temperaturen (Sommer 2003) mit zum Teil extremen Raumtemperaturen. Um einheitliche Messbedingungen zu erzeugen (Solltemperatur 20°C), kann mit einer transportablen Klimaanlage die Temperatur im Faradaykäfig um bis zu 5°C abgesenkt werden.

Rauschmessungen:

In Abbildung 4.4 ist eine typische Spektralanalyse in doppelt logarithmischer Darstellung einer Testmessung dieses Aufbaus abgebildet. Der 1/f-Abfall im niedrigen Frequenzbereich ist bis ca. 300 Hz zu erkennen. Auch die Filtergrenze von 50 kHz (senkrechte Linie in Abbildung 4.4) ist durch einen linearen Abfall der Amplitude auszumachen. Mehrere Peaks ab 20 kHz zeigen parasitäre Einstrahlungen in die Messanlage an. Der 20 kHz Peak ist auf das Oszilloskop im Faradaykäfig zurückzuführen und kann daher durch das Ausschalten während der Messung eliminiert werden. Die Ursachen für die anderen Peaks liegen außerhalb des Käfigs und sind nicht eindeutig bestimmten Quellen zuzuordnen, jedoch dürften hier Computer und Monitore ursächlich sein.

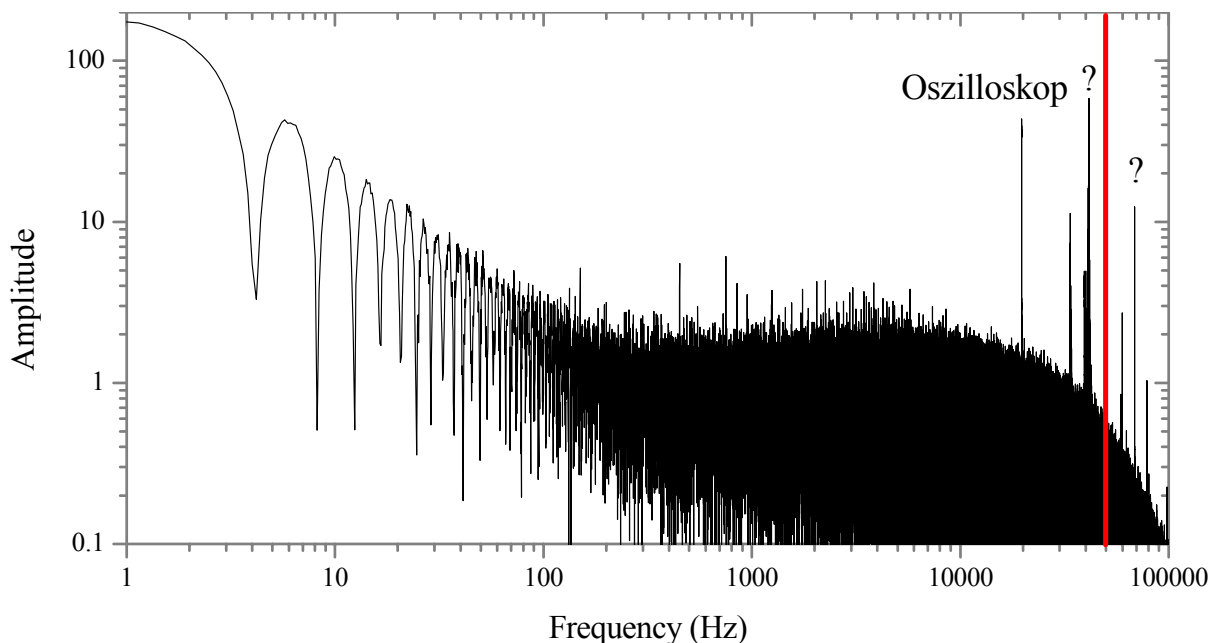


Abbildung 4.4 Spektralanalyse (Erklärung im Text)

Fast-Fourier-Transformation einer Messreihe mit 1 G Ω Testwiderstand. 10⁶ Punkte, Sampling-Frequenz = 200 kHz, Filterfrequenz= 50 kHz (rote vertikale Linie), Besselfilter 4. Ordnung

Die Fragezeichen markieren die Störfrequenzen mit der größten Amplitude, deren Ursache nicht eindeutig zu bestimmen ist.

4.4 Versuchsdurchführung

Testmessung:

Die Anlage wird mindestens eine halbe Stunde vor Messbeginn in Betrieb genommen, damit bis zur Messung der Verstärker die Betriebstemperatur erreicht hat. Zum Testen der Anlage, insbesondere um festzustellen, ob elektrische und mechanische Abschirmung sowie die Signalwege in Ordnung sind, führt man eine Testmessung durch. Dazu wird der Pipettenhalter durch einen 1 G Ω Testwiderstand ersetzt und der andere Pol des Widerstandes mit dem Bath-Drive verbunden. Tabelle 4.1 zeigt die Einstellungen für die Messung.

Einstellungen für die Testmessung	
Verstärker:	gain = 100 mV / pA Seal-Test = 10 mV Filter = 20 kHz
sampl250-Programm:	Sampling-Frequenz = 100 kHz Länge der Aufnahme = 100 (~1,8x10 ⁶ Punkte)
Testwiderstand:	1 G Ω

Tabelle 4.1 Einstellung für die Testmessung zur Vorbereitung eines Patch-Clamp-Experimentes

Nach der Testaufnahme wird mit dem Kiel-Patch-Programm (siehe Kapitel 5) anhand des Amplitudenhistogramms das SNR (Signal-Rausch-Verhältnis) bestimmt und die Morphologie des Signals überprüft. Das SNR ergibt sich aus $SNR = c / \sigma$ (c = Abstand der Testniveaus, σ = Standardabweichung der Rauschverteilung) und sollte bei diesem Aufbau und den Einstellungen bei 10,7 oder besser liegen.

Chlorierung der Pipettenelektrode:

Vor jedem Messabschnitt wird die Silberelektrode im Pipettenhalter mit Schmirgelpapier gesäubert und in einem Elektrolysebad (1 molare NaCl-Lösung) mit ca. 1 mA für 30 min neu chloriert.

Präparation der Zellen:

Die Zellen werden möglichst zeitnah zur Messung dem Brutschrank entnommen und möglichst warm gehalten. Das Nährmedium wird aus der Petrischale abgekippt und gegen die filtrierte und auf Raumtemperatur erwärmte Messlösung nach dreimaligem Waschen mit einer Spritze ausgetauscht. Dann befestigt man die Petrischale auf dem Objektisch, stellt die „Erdelektrode“ in die Messlösung und verbindet sie mit Bath-Drive.

Füllen der Pipetten:

Die Pipetten werden dem Trockenschrank (Abschnitt 4.8) entnommen und mit einem Mikrospritzenfilament mit der filtrierten Pipettenlösung befüllt. Dazu wird als erstes die Spitze der Pipette unter Druck mit dem Filament befüllt, dann das Filament zurückgezogen und die Pipette bis zur Hälfte befüllt. Leichtes Fingerschnipsen gegen die Pipette beseitigt restliche Luftblasen. Nach dem Befüllen wird die Pipette in den Pipettenhalter eingespannt.

Auswahl der Zelle:

Die eigentliche Messung beginnt mit der Auswahl einer Zelle. Bei den Neuroblastomzellen ist die Auswahl für Einzelkanalableitungen unkritisch. Für Ganzzellableitungen bieten sich einzeln liegende runde Zellen an, da hier die spätere Artefaktkompensation am einfachsten ist.

Transient transfizierte HEK293 Zellen werden mit Hilfe der Fluoreszenzeinrichtung ausgewählt. Kriterien hierfür sind Fluoreszenzintensität, Größe und Form der Zellen und Morphologie des Zytoplasmas. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes und die Dichte der Natriumkanäle in der Zellmembran scheinen nicht direkt korreliert zu sein. Die höchste Kanaldichte haben wahrscheinlich relativ große, ausgezogene Zellen mit deutlich granuliertem Zytoplasma und mittlerer Fluoreszenzintensität. Diese Angaben beruhen auf Erfahrungswerten, sind aber nicht empirisch abgesichert.

Zu beachten ist, dass sich vor allem einzeln liegende N1E115-Zellen im Gegensatz zu HEK293-Zellen im Laufe der Messung (ab ca. 30 min) abrunden. Die Anzahl der brauchbaren Zellen für Whole-Cell-Untersuchungen nimmt also nach Beginn der Messung noch zu. Dann wird die ausgewählte Zelle mit dem 40x-Objektiv in der Mitte des Gesichtsfeldes bei Normallicht eingestellt. Hierdurch kann sie auch vor Erwärmung durch zu hohe Lichtintensitäten des Quecksilber-Brenners geschützt werden.

Erreichen eines Gigaseals:

An die Pipette wird ein leichter Überdruck angelegt und die Pipettenspitze bis dicht unter die Wasseroberfläche in der Petrischale abgesenkt. Der Verstärker wird in den Voltage-Clamp-Modus geschaltet (Seal-Test = 10 mV, gain = 10 mV/pA Single-Channel; gain = 1 mV/pA Whole-Cell). Anhand des Verstärkersignals kann man den Pipettenwiderstand kontrollieren. Die Pipette wird vertikal über der Zelle positioniert und mit dem vertikalen Mikromanipulator bis fast auf die Zelle heruntergelassen. An dieser Stelle, wo die Pipette noch niederohmig ist, erfolgt der Nullabgleich am Verstärker (manual offset correction). Vorsichtig wird die Pipette weiter heruntergelassen, bis eine Zunahme des Pipettenwiderstandes bei Annäherung an die Zellwand am Oszilloskop zu beobachten ist. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks an die Pipette kann man dann fast schlagartig ein Gigaseal erzeugen. Bei Pipetten, die wie in Abschnitt 4.8 beschrieben, behandelt sind, gelingt dies bei meinen Versuchen in über 90% der Fälle.

Bei herkömmlich behandelten Pipetten (siehe Abschnitt 9.2) muss mit einem sich allmählich ausbildenden Seal bei nötigem größeren Unterdruck gerechnet werden. Innerhalb von 1-2 min vergrößert sich dann der Widerstand bei diesen Pipetten weiter.

Der Durchbruch in den Whole-Cell-Modus wird nach der Ausbildung des Gigaseals durch einen starken, kurz applizierten Unterdruck erreicht. Dieser Schritt und die eventuell vorher nötige Vorkompensation des Artefaktes sollten zügig erfolgen. Bei längerem Abwarten scheint sich ein Einreißen der Membran mit schlechten Seal-Widerständen nach dem Membrandurchbruch zu häufen.

Artefaktkompensation:

Abbildung 4.5 zeigt die bei Patch-Clamp Messungen auftretenden Artefakte bei Whole-Cell-Messungen. Die Entstehung der Artefakte hängt mit der Umladung der Zellmembran und der parasitären Einstreuung über die Pipettenspitze und den Elektrodenhalter zusammen.

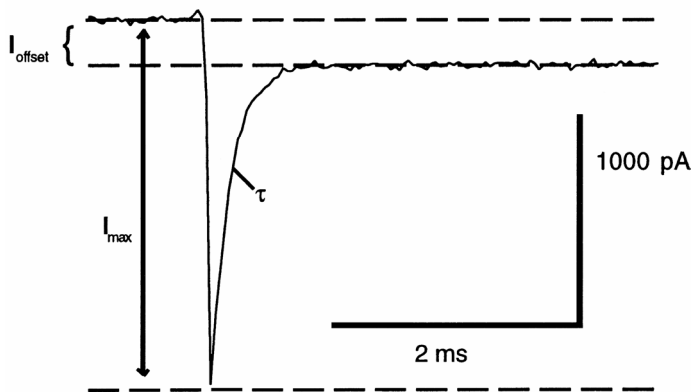


Abbildung 4.5 Stromantwort im Whole-Cell-Modus (Artefakt)

Zu sehen ist die Stromregistrierung bei einem rechteckförmigen Spannungspuls von 0 mV auf 10 mV. Zunächst entsteht der fast senkrecht ansteigende kapazitive Ladestrom I_{\max} , der dann exponentiell mit der Zeitkonstanten τ abfällt, bis nur noch der Haltestrom I_{offset} (Leckstrom) übrig bleibt (aus Numberger & Draguhn, 1996).

Abbildung 4.6 zeigt das Ersatzschaltbild von Pipettenhalter, Pipette und Zellmembran. Dieses System kann als Kombination mehrerer RC-Glieder dargestellt werden. Für verzweigte Zellen erhöht sich die Anzahl der RC-Komponenten weiter. Es ergibt sich das Problem, dass bei Änderungen des Kommandopotentials diese RC-Glieder aufgeladen werden müssen. Daraus resultieren kapazitive Artefakte in den Messaufzeichnungen (Abbildung 9.4), die vor der Auswertung eliminiert werden müssen. Sämtliche Auswerteprozeduren setzen eine konstante Nulllinie voraus.

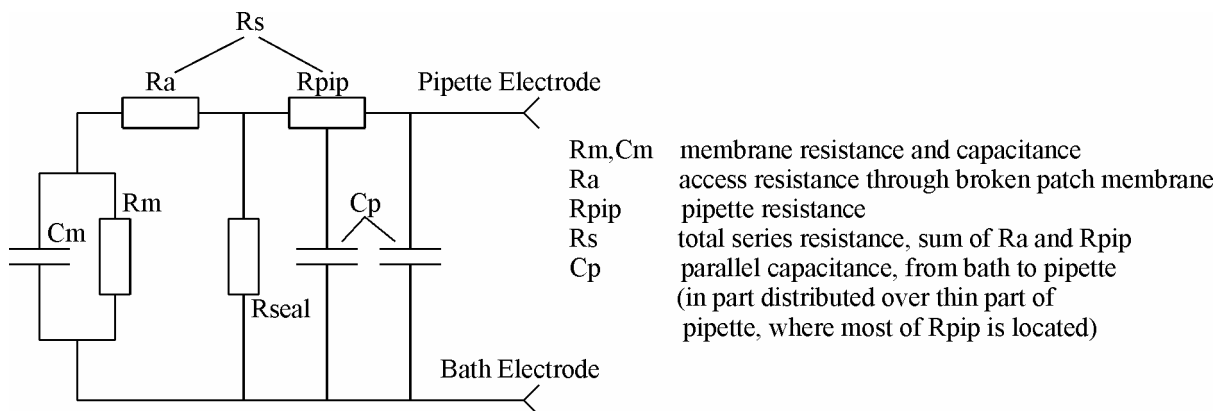


Abbildung 4.6 Ersatzschaltbild für Zelle und Pipette bei Ganzzelleableitungen (Dagan 3900A Operating Manual, Minneapolis)

Über bestimmte Extraschaltungen können solche Artefakte minimiert oder kaschiert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, nach der Vorstufe ein inverses Signal zur Membranumladung einzuspeisen, das, überlagert mit dem Ausgangssignal des Differentiators, das Artefakt „verschwinden“ lässt. Dieses bei Einzelkanalaufzeichnungen verwendete Verfahren verbessert die eigentliche Messung nicht, die Membran wird durch diese Kapazitätskompensation nicht schneller umgeladen.

Bei Ganzzelleableitungen jedoch wird zusätzlich zu einem weiteren RC-Kompensationsglied mit größeren Kapazitäten (Dagan 3911) durch das so genannte Hypercharging mit einer initial bis zu 10 mal höheren Spannung ein schnelleres Umladen der im Vergleich zur Einzelkanalmessung großen Membranfläche erreicht. Die Potentialverläufe

am Messobjekt bei Spannungssprüngen sind dadurch steiler, aber immer noch nicht rechteckförmig. Ein nützlicher Nebeneffekt ist, dass über die so eingestellte Kapazität die Membranoberfläche der Zelle bestimmt werden kann, so dass z.B. die Anzahl der Kanäle auf die Oberfläche normiert werden kann.

Der letzte Schritt der Kompensation erfolgt digital programmgesteuert (siehe Kapitel 5). Um optimale Ergebnisse zu erzielen, muss das analoge Signal aber so gut wie möglich vorkompensiert werden.

Nach dem Erreichen eines Gigaseals im Cell-Attached-Modus wird die oben beschriebene Kapazitätskompensation des Dagan 3900A hinzugeschaltet und so eingestellt, dass das Artefakt möglichst klein wird (I_{\max} in Abbildung 4.5 minimal). Im zweiten Schritte wird nun die zugehörige Zeitkonstante angepasst, bis das Artefakt minimal wird.

Bei der Whole-Cell-Kompensation erfolgt die beschriebene Cell-Attached-Kompensation genauso. Nach dem Membrandurchbruch wird das entsprechend der Membranfläche große Artefakt als erstes mit der Kapazitätskompensation des 3911-Moduls korrigiert und dann mit der Serienwiderstandkompensation. Bei großen Leckströmen müssen beide Korrekturmöglichkeiten iterativ angewendet werden, bis ein möglichst „rechteckiges“ Stromsignal am Oszilloskop abgelesen werden kann.

Leckströme, die dadurch auftreten, dass die Verbindung zwischen Pipettenrand und Zellmembran nicht unendlich dicht ist, sind neben den kapazitiven Artefakten ein weiteres Problem. Diese Ströme können durch die digitale Nachbearbeitung gut eliminiert werden, da sie für kurze Messabschnitte näherungsweise konstant sind. Der Aussteuerungsbereich des Verstärkers und damit die Einstellung der Verstärkung werden dadurch jedoch eingeschränkt. Für Einzelkanaluntersuchungen wird deshalb bei großen Leckströmen die Leakage-Adjust-Schaltung zur Kompensation benutzt. Diese Schaltung subtrahiert eine skalierbare Kopie der Kommandospannung von dem Messsignal. Es können Leckwiderstände von 100 M Ω aufwärts kompensiert werden.

Bei Whole-Cell-Untersuchungen wird auf die Korrektur des Leckstroms verzichtet, da hierdurch die digitale Kompensation keine Referenz mehr hat (Abschnitt 5.1).

Datenaufnahme:

Nach der Artefaktkompensation wird der Seal-Test des Verstärkers ausgeschaltet, die Kommandospannung hinzugeschaltet und der 4-polige Besselfilter des Dagens eingestellt. Die Eingangspolarität der Spannung ist bezogen auf die Kommandopotentiale, die in Abbildung 4.7 zu sehen sind, bei Einzelkanalmessungen invers und bei Whole-Cell-Messungen identisch. Bei Cell-Attached-Messungen (alle Einzelkanalmessungen) muss die vorhandene Membranspannung der Zelle ausgeglichen werden. Dazu wird eine konstante Kommandospannung am Verstärker im Bereich von 0...+50 mV so eingestellt, dass das Schalten der Natriumkanäle in der Häufigkeit und Amplitude des Stroms maximal ist (Zielwert ist +30 mV, die normalen Membranspannung der HEK293- und Neuroblastomzellen).

Dann kann mit der Fernbedienung die Messung mit dem sampl250-Programm gestartet werden. Nach ein bis zwei Aufnahmen wird die Artefaktkompensation angepasst, da sich der Sealwiderstand im Laufe der Messung ändern kann. Bei Einzelkanalaufzeichnungen wird dann kontrolliert, ob der/die Kanäle noch aktiv sind. Solange die Kanäle aktiv sind und das Seal stabil ist, werden weitere Messungen gestartet. In Tabelle 4.2 können die Einstellungen für die Aufnahme abgelesen werden.

Einstellungen	Filterfrequenz / kHz	Samplingfrequenz / kHz	Messdauer / s	Einstellung (Länge) im sampl250-Programm
Whole-Cell	2	100	~16	100
Cell-Attached	10	100	~32-800	200-5000 (1000)

Tabelle 4.2 Einstellungen für die Datenaufnahme einer Messung
Für Cell-Attached-Messungen ist die Längeneinstellung 1000.

4.5 Kommandopotentiale

An die Kommandopotentiale für Einzelkanalaufzeichnung mit Natriumkanälen werden hier folgende Anforderungen gestellt, die sich direkt aus dem Messvorhaben ergeben:

1. Die Inaktivierung der Kanäle sollte während der Repolarisationsphase vollständig aufgehoben werden, zumindest die schnelle Inaktivierung. Dazu müssen diese Potentiale möglichst lang und negativ sein (>1 s und < -80 mV; Hille, 1994).
2. Das depolarisierende Potential sollte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die Kanäle in den offen aktivierten Zustand (siehe Aktivierungskurven für rNav1.2a, Mantegazza et al., 2005) überführen. Dazu muss die depolarisierende Spannung möglichst hoch sein (> 0 mV).
3. Der Einzelkanalstrom sollte für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis möglichst groß sein. Dazu muss die depolarisierende Spannung ausreichend Abstand vom Nernst-Potential für Natriumionen halten (Abbildung 2.1A), also im Widerspruch zu 2. möglichst klein sein (das Gleichgewichtspotential für Na^+ ist bei den unten gewählten Konzentrationen $+66$ mV).
4. Für die statistische Auswertung müssen während der Lebensdauer eines Gigaseals viele Ereignisse gemessen werden. Dazu sollten die Messzyklen im Widerspruch zu 1. möglichst kurz sein, um durch häufige Depolarisation viele Ereignisse zu messen.
5. Um die Lebensdauer eines Gigaseals nicht zu verkürzen, sollte der Betrag der Kommandospannung klein sein, da hohe Spannungen die Zellmembran belasten.
6. Für unvergiftete Messungen an Wildtyp-Kanälen wären ca. 10 ms Depolarisation ausreichend, aber für Messungen mit Aufhebung der Inaktivierung (=Vergiftung) sollte diese Phase lang sein, um viele Ereignisse aufzuzeichnen.
7. Um die digitale Verarbeitung zu erleichtern und die Vergleichbarkeit (für den Untersucher) zu erhöhen, sollte das Protokoll für alle Messungen gleich sein.

Der Kompromiss aus diesen Anforderungen ist in Abbildung 4.7 für Einzelkanalaufzeichnungen links und Ganzzellaufzeichnungen rechts zu sehen. Dieses Protokoll wird mit dem Patch-Generator-Programm während der Messung ständig wiederholt.

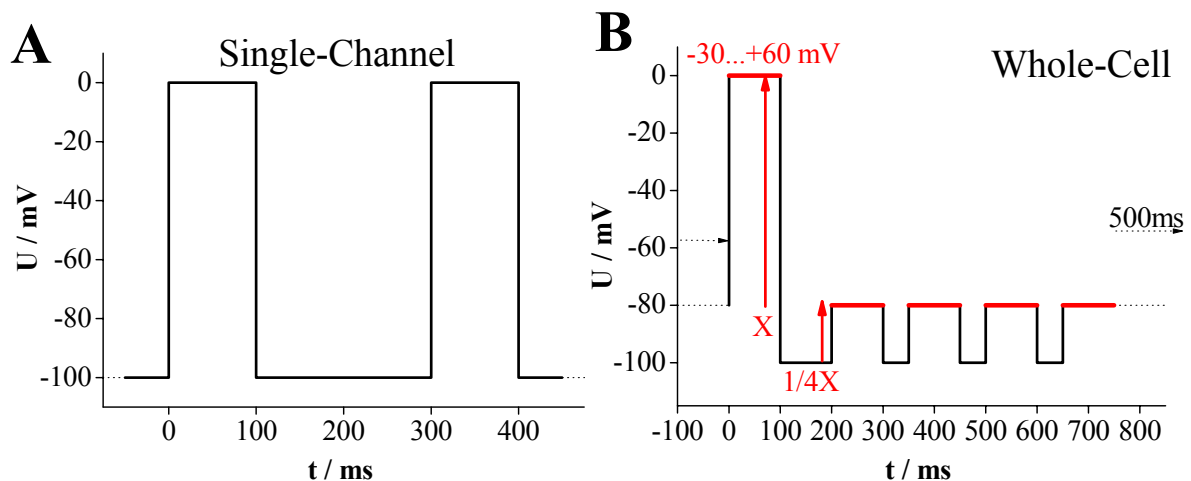


Abbildung 4.7 Kommandopotentiale für Patch-Clamp-Messungen

(A) für Einzelkanal-Ableitungen, (B) für Ganzzell-Ableitungen

Die roten Anteile markieren die variablen Potentiale. Bei zyklischen Wiederholungen werden die gestrichelten Potentiale am Anfang und am Ende verknüpft.

Für die Single-Channel-Messungen wähle ich ein Haltepotential von -100 mV für 200 ms, so dass die Belastung für die Membran noch nicht zu hoch ist und die Inaktivierung relativ sicher aufgehoben ist (Punkte 1,4 und 5). Für die Depolarisation wird ein Potential von 0 mV für 100 ms gewählt, als Kompromiss aus den Punkten 2, 3, 6 und 7.

Für die Ganzzelleableitungen wird die P/4 Methode (Heinemann, 1995) angewendet, entsprechend dem Protokoll in Abbildung 4.7. Auf einen depolarisierenden Reiz, der von -30 bis +60 mV in 10 mV Abständen erhöht wird, folgen 4 unterschwellige Reize mit $\frac{1}{4}$ der Amplitude. Für die automatische digitale Artefaktkorrektur zieht man die Summe der unterschwelligen Artefakte von dem Messimpuls ab, in der Annahme, dass sich Leckstrom und kapazitives Artefakt linear zur angelegten Spannung verhalten.

Die Zwischenpotentiale (schwarz) bei dieser Methode müssen lang genug andauern, damit das Artefakt vollständig abklingen kann. Der Steady-State-Zustand dieser Potentiale wird dann als Bezugsspannung für die folgende Potentialänderung benutzt. Insgesamt sollten die Potentiale wieder so kurz wie möglich sein, weil Leckstrom und kapazitives Artefakt nicht über längere Zeiten konstant sind. Artefaktkompensation ist nur dann möglich, wenn das Seal einen Widerstand von mind. 1 G Ω aufweist, da sonst im Artefakte der Patch-Clamp-Verstärker übersteuert. In diesem Fall decken sich das große Reizartefakt und die Summe der vier kleinen in der P/4-Methode nicht mehr.

4.6 Seeanemonentoxine

Die in dieser Arbeit verwendeten Seeanemonentoxine stammen aus der *Anemonia sulcata* (ATX II, Bild links in Abbildung 4.8) und *Anthopleura elegantissima* (Bild rechts, APE 1-1 und APE 1-2). Sie wurden freundlicherweise von Prof. L. Béress, Toxikologie in Kiel, zur Verfügung gestellt.

Die Aufreinigung des Anemonenrohsubstrates ist im Detail bei Sanchez et al. (1996), Schmidt (2000) und Bruhn et al. (2001) beschrieben. Für die Aufreinigung der verwendeten Toxine stehen jeweils einige hundert Kilogramm tief gefrorener Anemonen zur Verfügung. Dieser Rohextrakt wird anschließend von Prof. L. Béress in mehreren Schritten aufgereinigt,

an Krabben bezüglich der Toxizität vorgetestet und in 0.1 mg – 1 mg Einheiten lyophilisiert in Glasbehältern abgefüllt. Die benutzten Giftfractionen stammen nicht aus einem einheitlichen Aufschluss, deswegen sind hier nur die prinzipiellen Schritte aufgeführt.

Die Verarbeitungsschritte des bei -30°C gelagerten Rohsubstrates durch Prof. L. Béress umfassen:

- Homogenisierung in einem Mixer mit destilliertem Wasser bzw. mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln
- Aufschluss kalkhaltiger Korallen mit 10%-iger Essigsäure für 12 h
- Abzentrifugieren der Zellbruchstücke
- Vakuumkonzentration des Extraktes nach jedem Aufreinigungsschritt
- Aufreinigung und Trennung der Proteinfraction in mehreren Schritten mittels
 - Säulenchromatographie (Polysiloxane, Sanchez et al., 1996)
 - Ionenaustauschchromatographie
- Auftrennung der Protein-Fractionen durch Gelfiltration mit Sephadex G 50/ G10 in 1M Essigsäure
- Lyophilisierung
- Testung der Fractionen an Krabben durch i.m. Injektion (die Stärke der unkoordinierten Muskelkontraktionen der Krabben ist ein Maß für die Wirksamkeit des Giftes)
- abschließende HPLC-Chromatographie sowohl analytisch, um den Reinheitsgrad zu bestimmen als auch präperativ, um die Fractionen weiter aufzutrennen



Abbildung 4.8 links: Bild der *Anemonia sulcata* (Photo courtesy <http://philip.greenspun.com>)
rechts: *Anthopleura elegantissima* (©2002 Mary Jo Adams)

Die Primärstruktur der reinisolierten, biologisch wirksamen Fractionen wurden von Dr. E. Wachter, Physiologische Chemie in München, mit den Methoden des Edman-Abbaus entschlüsselt (Schmidt, 2000).

Das Ergebnis (Tabelle 4.3) zeigt eine weitgehende Übereinstimmung in Länge und Sequenz dieser Polypeptide. Bis auf das ATX Ia mit 46 Aminosäuren sind die verwendeten Gifte ATX II, APE 1-1 und APE 1-2 mit 47 Aminosäuren sehr ähnlich (>80% homolog), ATX II und APE 2-1 sogar bis auf 2 Aminosäuren (95% homolog). Besonders stark konserviert sind die carboxyterminalen Regionen mit Cystein-Cystein-Lysin-Glutamin und

die aminoterminalen Region mit Glycin. ATX Ia (Tabelle 4.3, 1. Zeile) zeigt dann auch im Gegensatz zu den anderen Fraktionen keine Wirkung auf die Natriumkanäle der N1E115-Zellen (Schmidt, 2000).

Gift	Aminosäuresequenz			
	10	20	30	40
ATX Ia	GAAC	LDCKSDGP	NTRGN	SMSGTIIWVFGCPSGWNNCEGRA-IIGYCCKQ
APE 1-1	GIA	CLCDS	DGSP	VRGNTLSGTYWLAGCPSGWHNCKSSGQLIGACCKQ
APE 1-2	GVP	CLCDS	DGPN	VRGNTLSGTYWLAGCPSGWHNCKSSGPLIGACCKQ
APE 2-1 (AP-C)	GVP	CLCDS	DGPN	VRGNTLSGIIWLAGCPSGWHNCKAHGPTIGWCKQ
ATX II	GVP	CLCDS	DGPN	VRGNTLSGIIWLAGCPSGWHNCKKHGPTIGWCKQ

Tabelle 4.3 Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstabencode verschiedener Gifte von *Anthopleura elegantissima* (APE) und *Anemonia Sulcata* (ATX)

Homologe Sequenzen sind rot unterlegt (aus Schmidt, 2000).

Aus der bekannten Primärstruktur der Polypeptide wird mittels des Experimental-Swiss-Model-Protein-Modelling E-Mail Servers (Peitsch, 1995; Guex & Peitsch, 1997; Schwede et al., 2003) die Oberfläche der Tertiärstruktur (Abbildung 4.9) ermittelt. Dabei werden bekannte Daten ähnlicher Proteine als Grundlage benutzt und die Giftstrukturen daran angepasst.

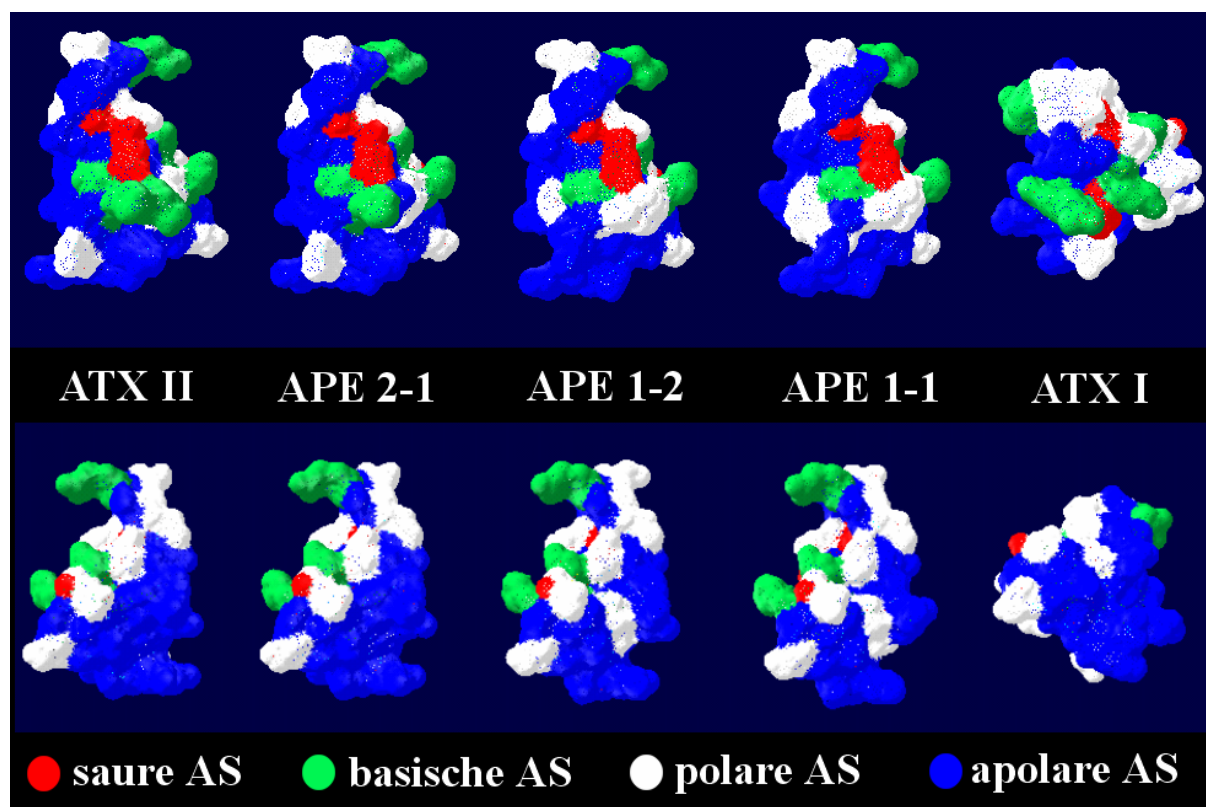


Abbildung 4.9 Räumliche Struktur der Oberflächenbeschaffenheit der verschiedenen Giftmoleküle. Die untere Zeile zeigt die Strukturen im Vergleich zu der oberen Reihe von hinten.

Durch die stark konservierten Cysteinreste kommt es zur Ausbildung dreier Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren 4-45, 6-34 und 27-44. Hierdurch wird die Faltung der Proteine

maßgeblich beeinflusst. Die Unterschiede in der Sequenz betreffen so hauptsächlich die Oberfläche der Proteine (Schmidt, 2000). Die schon erwähnten Unterschiede bezüglich der Primärstruktur sind bei dem ATX 1a auch in der räumlichen Struktur sehr deutlich zu sehen. Die 4 anderen Proteine sind hingegen auch hier sehr ähnlich. Bei ATX II und APE 2-1 sind die Unterschiede minimal. In der Rückansicht (siehe Abbildung 4.9 unten) sind hingegen die 4 Proteine kaum zu unterscheiden.

Für die Patch-Clamp-Messungen werden die lyophilisierten Giftportionen in gefilterter externer Lösung aufgenommen. Die Konzentrationen werden entsprechend der Messvorhaben von 2 μ molar - 100 μ molar eingestellt.

Für die Zubereitung der Messlösung müssen zwei Dinge beachtet werden, um eine definierte Konzentration zu gewährleisten. Das aufgelöste Gift darf nicht in Kontakt mit Plastikmaterialien kommen, die das Gift absorbieren könnten, und die Proteingifte sind in Lösung nicht lange stabil. Es muss daher, wenn möglich, auf Eis gearbeitet werden und überschüssige Lösungen zügig bei -20°C eingefroren und schnell aufgebraucht werden.

4.7 Messlösungen

Es werden zwei verschiedene Lösungen für die Messungen benutzt, die sich grundsätzlich in den Natrium- und Kaliumkonzentrationen unterscheiden. Die externe Lösung entspricht von ihrer Ionenzusammensetzung und Osmolarität dem extrazellulären Bereich einer typischen eukaryotischen Zelle und die interne dem Zellinneren.

Für Ganzzelleableitungen wird die interne Lösung als Pipetten- und die externe als Badlösung verwendet. Für Cell-Attached-Messungen werden sowohl für die Pipette als auch für das Bad externe Lösungen benutzt. Mit diesen Lösungen wird die physiologische Situation der Zellen nachgestellt, wobei die extrazelluläre Na^+ -Konzentration etwas größer gewählt wird, um den Natrium-Gradienten zu vergrößern und so den Einzelkanalstrom für die Messung zu erhöhen.

Zusätzlich zu NaCl und KCl enthalten die Lösungen:

a) HEPES

Die Lösungen werden mit HEPES gepuffert und mit NaOH auf pH 7,1 eingestellt, um den Einfluss der Protonen auf das Schaltverhalten der Na^+ -Kanäle (Bénitah et al., 1997) konstant zu halten.

b) CaCl_2 und MgCl_2

CaCl_2 und MgCl_2 werden dazu benutzt, die Sealbildung zu verbessern und die Membran zu stabilisieren.

c) D-Glucose

D-Glucose soll die Zellen in der Messlösung vital halten.

d) Saccharose

Saccharose ist osmotisch aktiv und dient zur Stabilisierung der Zelle bei dem Austausch von Pipettenlösung und Zytoplasma.

e) TEA

TEA-Cl (Tetraethylammoniumchlorid) ist ein potenter (fast) unselektiver Blocker der Kaliumkanäle.

f) ChloraminT

ChloraminT erhöht die Offen-Wahrscheinlichkeit der Natriumkanäle (Niemann et al., 1991).

mmol/l	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	D-Glucose	HEPES	TEA	ChloraminT
ExternTEA	160,0	4,0	1,8	1,2	5,0	5,0	10,0	-
Extern	160,0	4,0	1,8	1,2	5,0	5,0	-	-
ExternCT	160,0	4,0	1,8	1,2	5,0	5,0	10,0	1,0

Tabelle 4.4 Verwendete externe Lösungen.

mmol/l	NaCl	KCl	Saccharose	HEPES
Intern	12,0	120,0	22,0	5,0

Tabelle 4.5 interne Lösung

Die Messlösungen werden aus Stammlösungen 1:10 hergestellt und bei 4°C gelagert, die Stammlösungen bei -20°C.

4.8 Herstellung der Pipetten und der Badelektroden

Pipetten:

Die Pipetten für die Patch-Clamp-Untersuchungen werden aus hohlen Glasrohlingen, die mit Sigmacote (chlorinated organopolysiloxane in heptane; Sigma, Taufkirchen) beschichtet sind, in einem zweistufigen Verfahren gezogen.

Für die unterschiedlichen Patch-Konfigurationen werden verschiedene Glassorten benutzt:

Messmethode	Whole-Cell	Cell-Attached
Material	Borosilikatglas	Borosilikatglas
Innendurchmesser / mm	1,5	0,8
Außendurchmesser / mm	1,8	1,5
Länge des Rohlings / mm	50	60
Firma	Kimble, USA	Hilgenberg, Malsfeld
benutzter Pipettenpuller	PIP5-Heka	L/M-3P-A-List-Medical
Pipettenwiderstände / MΩ	~4	~35

Tabelle 4.6 Daten der verwendeten Patchpipetten

Nach dem Schneiden der Glasrohlinge mit einem selbst konstruierten Pipettenschneider (Werkstatt, IEAP Kiel) werden die 5-6 cm langen Rohlinge mit Sigmacote von innen beschichtet. Das hydrophobe Sigmacote bildet einen dünnen Silikonfilm auf Glasoberflächen und schirmt die Oberflächenladungen ab. Hierdurch wird das Rauschen vermindert (Keunecke, 1995; Farokhi, 2000) sowie die Seal-Wahrscheinlichkeit und der Sealwiderstand verbessert (siehe Abschnitt 9.2). Die Arbeiten erfolgen mit Handschuhen unter einem Abzug. Das Trocknen der Rohlinge unter dem Abzug sollte mindestens 2 Tage dauern.

Die Rohlinge werden mit einem Mikroelektrodenziehgerät zweistufig zu zwei Pipetten ausgezogen. Die Größe und Form des Pipettenmundes hängt von der Stromstärke ab, mit der die Glühwendel in beiden Schritten beheizt wird. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ergeben für das hier benutzte Gerät für Einzelkanalpipetten einen Spitzendurchmesser von weniger als 1 μm (Plieth, 1996). Die Einstellung des Pipettenziehgeräts muss ständig überprüft und eventuell korrigiert werden entsprechend dem Lebensalter der Glühwendel.

Die obere Pipette für den Cell-Attached-Modus wird verworfen, da die sehr lang ausgezogene Form schlechte kapazitive Eigenschaften aufweist (Farokhi, 2002) und schwer zu befüllen ist. Nach dem Ziehen werden die Pipetten nicht wie bisher üblich „frisch“ verwendet, sondern für 8-48h in einem Trockenschrank bei 55°C aufbewahrt und für die Messungen unmittelbar einzeln entnommen.

Erdelektroden:

Die Erdelektroden bestehen aus einer abgesägten Pasteurpipette, die mit externer Lösung mit Agar-Zusatz befüllt wird, in die ein chlorierter Silberdraht (Ag/AgCl ; $d=1\text{ mm}$) hereinragt. Die Lösung der Elektrode ist so gewählt, dass sie sich von der Badlösung in den Ionenkonzentrationen möglichst wenig unterscheidet. Dieses Vorgehen soll Übergangspotentiale (Offsets) vermeiden. Außerdem verhindert die verfestigte Agar-Lösung einen Ionenaustausch durch Konvektion zwischen Bad- und Elektrodenlösung. Dadurch bleibt die Belastung des Badmediums durch austretende Ionen (z.B. K^+ , Cl^- , Ag^+) gering.

Erdelektroden werden bei 4°C aufbewahrt und ca. alle 3 Monate neu hergestellt, um Übergangspotentialen und einem Verpilzen des Agars vorzubeugen.

5 Material und Methoden: Auswertung

Die Auswertung der Ganzzell- und Einzelkanalableitungen erfolgt mit dem Kiel-Patch-Programm, eine Weiterentwicklung des Day-Programms (Draber, 1994; Kirst, 1997; Blunck et al., 1998; Huth, 1999; Radomski, 2000). Im Vordergrund meiner Arbeit an diesem Programm stand die Anpassung an die ereignisgesteuerte Datenaufnahme, die damit verbundene Markierung der Daten (Huth, 1999) und die Programmierung des 2D-Dwell-Time-Fits. Die unten aufgelisteten Programmteile wurden bis auf das Simulat-Programm zum Simulieren von Patch-Clamp-Daten von mir selber oder unter meiner Anleitung in der Programmiersprache C++ erstellt:

- a) erweiterte Funktionen des Programms zum Editieren von Daten und zur Verarbeitung von markierten Daten bzw. potentialgesteuerten Messungen
- Speichern von Zeitreihen (binär, ASCII, markierte Daten, Stromverteilungen)
 - copy / paste/ edit Funktionen von markierten und nichtmarkierten Datenreihen
 - programmgestützte Artefaktelimination von ereignisgesteuerten Einzelkanaldaten
 - automatische Artefaktkorrektur von Whole-Cell-Daten

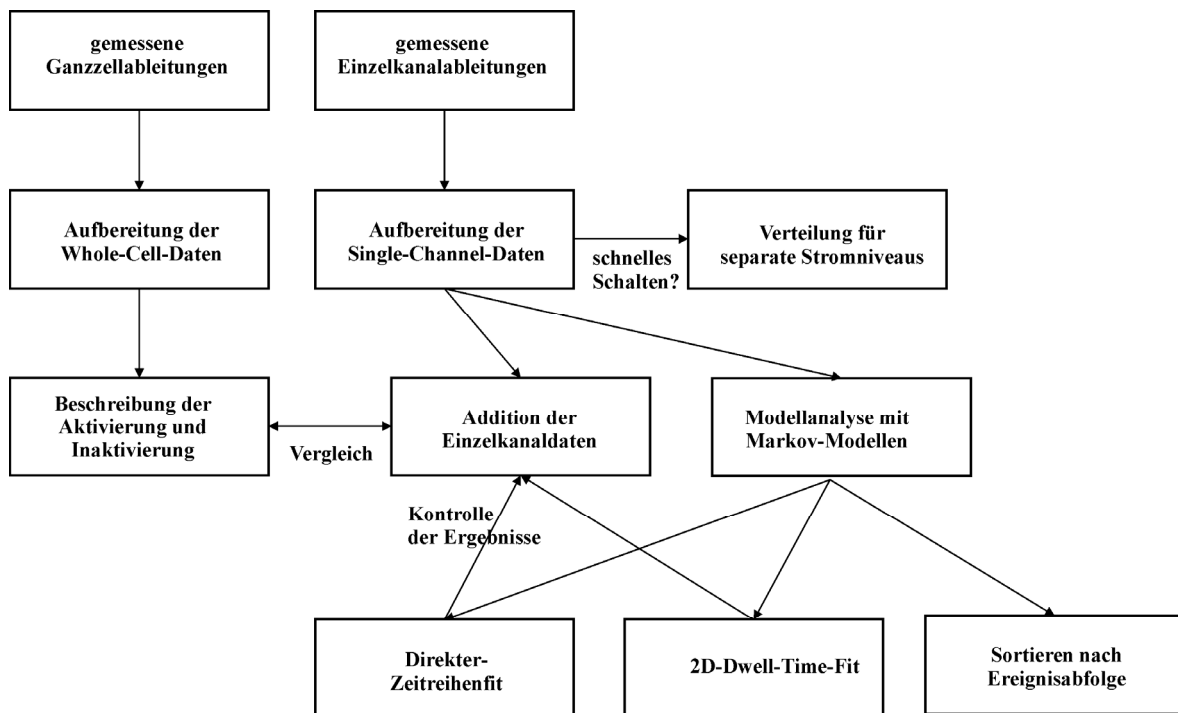


Abbildung 5.1 Ablaufdiagramm für die Auswertung

- b) Integration und Modifikation bestehender Programmteile
- Einbinden von Setfiles für die Simulation von Zeitreihen
 - Simulation von Zeitreihen
 - Erzeugung von Rauschdaten und Einbinden von gemessenen Rauschreihen

c) neue Funktionen

- 2D-Histogramme für ereignisgesteuerte Daten
- Aufsummation ereignisgesteuerter Einzelkanaldaten (Abschnitt 5.3)
- Sortieren der Dwell-Time-Histogramme nach Ereignisabfolge (Abschnitt 5.7)
- Verteilungen für separate Stromniveaus (Abschnitt 5.5)
- Dependency-Plots (Abschnitt 5.6)
- 2-Dimensionaler-Dwell-Time-Fit (Abschnitt 5.8)
- Verändern des Thread-Levels unter Windows 98 (Einstellung der Prozessor-Belastung durch das Programm)
- Hilfe-Funktion

In dem Diagramm in Abbildung 5.1 sind die Auswertemethoden aus diesem Kapitel im Zusammenhang und zur Orientierung des Lesers dargestellt.

5.1 Aufbereitung von Whole-Cell Messungen

Whole-Cell-Messungen, die mit Kommandopotentialen wie in Abschnitt 4.5 beschrieben aufgenommen sind, werden durch die Software automatisch prozessiert, um das Restartefakt digital zu entfernen. Die bereinigten Daten werden als ASCII-File auf Festplatte gesichert. Unterschiedliche Aufnahme-potentiale sind in dem Datenfile voneinander getrennt.

Anhand eines längeren Startabschnittes im Kommandopotential kann der Beginn eines neuen Abschnittes und damit die zugehörigen Potentiale identifiziert werden. In Abbildung 5.2 sind die Rohdaten (schwarz) zu sehen, die durch Gleichung (5.1) in die rote Kurve überführt werden.

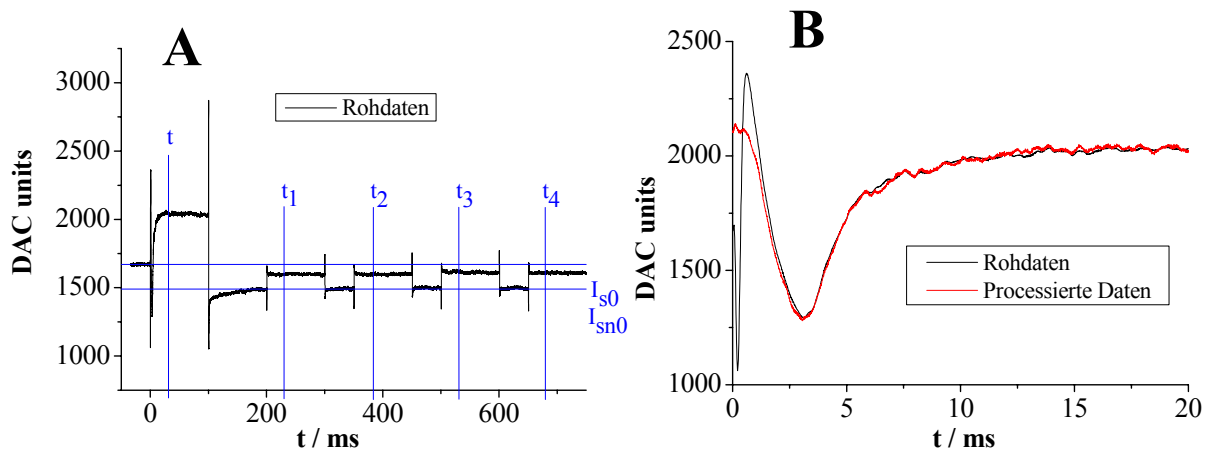


Abbildung 5.2 Artefaktkompensation von gemessenen Whole-Cell Daten

In (A) ist der gemessene Whole-Cell-Strom (nur im 1. Abschnitt bei t) überlagert von den Stromantworten auf die Kommandopotentiale (alle Abschnitte) des Whole-Cell-Protokolls aus Abbildung 4.7B zu sehen.

Vertikale blaue Linien kennzeichnen korrespondierende Punkte der Nutzspur (t, 1. Abschnitt) und der Korrekturspuren (t_n). Die horizontalen blauen Linien kennzeichnen die Steady-State Ströme der Nutzspur und der Korrekturspuren.

In (B) ist das Stromsignal des 1. Abschnittes vor der Artefaktkorrektur (Rohdaten) und nach der Artefaktkorrektur (Processierte Daten) zu sehen. Man beachte die veränderte Zeitachse.

Für den korrigierten Strom $I(t)$ gilt:

$$I(t) = I_s(t) - I_{s0} - \sum_{n=1}^4 I_s(t_{n^*k}) - I_{sn0} \quad (5.1)$$

$I_s(t)$: gemessener Strom zum Zeitpunkt t

I_{s0} : Steady-State Strom des Ruhepotentials vor der Depolarisation

$I(t_n)$: gemessener Strom zum Zeitpunkt t_n korrespondierend zum Zeitpunkt t während der unter-schweligen Depolarisation n

I_{sn0} : steady-state Strom des Ruhepotentials vor der unter-schweligen Depolarisation n

Steady-State-Ströme werden durch Mittelung von 1000 Messpunkten am Ende des Haltepotentials berechnet.

5.2 Aufbereitung von Single-Channel-Messungen

Im Folgenden wird beschrieben, wie die Korrektur des Restartefaktes bei Einzelkanalaufzeichnungen (Kommandopotentiale siehe Abschnitt 4.5) durchgeführt wird und die Zeitreihen für die Auswertung vorbereitet werden.

Das in meiner Diplomarbeit vorgestellte Verfahren (Huth, 1999) der Artefaktelimination mit einer Anpassung durch Exponentialfunktionen hat sich nicht bewährt. Deswegen wurde hier das in der Elektrophysiologie übliche Vorgehen (Heinemann, 1995) auf meine Messungen zugeschnitten. In Abbildung 5.3 ist eine Originalaufnahme einer Einzelkanalmessung abgebildet. Im Folgenden sind die Schritte für die Artefaktkorrektur anhand dieser Abbildung erklärt:

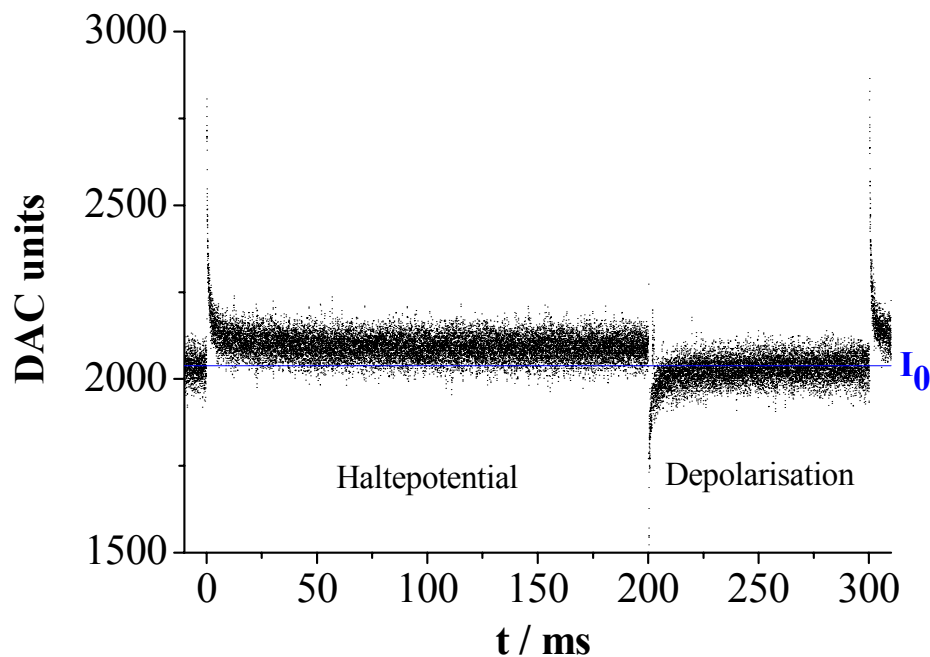


Abbildung 5.3 Originalaufnahme einer Cell-Attached-Messung

Spannungssprung von -80mV auf 0mV (Haltepotential \rightarrow Depolarisation)

Zu erkennen sind die kapazitiven Artefakte und der Leckstrom. Der Steady-State-Strom des Haltepotentials ist ungleich dem Steady-State-Strom der Depolarisation (I_0 , blaue Gerade).

a) Offsetkorrektur

Als erstes erfolgt bei einigen Messungen die Korrektur des Offsetanteils, der sich durch eine Verschiebung von I_0 im Laufe der Messung bemerkbar macht. Das Programm ermittelt anhand der letzten 500 Punkte einer Depolarisation den Steady-State-Strom I_0 . Die ca. 200 Depolarisationen einer Messung werden dann durch die Addition einer Konstanten zum Stromwert $I(t)$ für die jeweilige Depolarisation auf einen gemeinsamen Wert korrigiert.

Dieses Verfahren funktioniert nicht bei Abschnitten mit Schaltereignissen in den letzten 500 Punkten. Dieses ist häufig bei Giftmessungen der Fall. Bei Messungen mit sehr guten Seal-Widerständen und ohne driftende Potentiale kann auf die Offset-Korrektur verzichtet werden.

b) Referenzspuren zur Korrektur des kapazitiven Artefaktes (Abbildung 5.3)

Durch das Signal induzierte Depolarisationen ohne Schaltereignisse der Kanäle werden aus der Zeitreihe ausgewählt und durch Mittelung eine Referenzspur erstellt. Diese Referenzspur wird dann von allen Depolarisationen abgezogen. Bei Messreihen mit starken Änderungen der Artefakte kann die Erstellung einer Referenzspur auch für mehrere Bereiche der Zeitreihe getrennt notwendig werden. Dieses funktioniert aber nur, solange jeweils genügend Spuren ohne Schalten in den jeweiligen Bereichen vorhanden sind.

Das Rauschen R der gemessenen Zeitreihe erhöht sich dabei um:

$$R = \sqrt{1 + \frac{1}{nr}} \quad (5.2)$$

n: Anzahl der Spuren für die Bildung einer Referenzspur

r: Verhältnis des Ruhepotentials zum Testpotential (= 1 für Einzelkanaluntersuchungen, das Testpotential bezeichnet die unter-schwellige Depolarisation bei Whole-Cell-Messungen)

Für die Anzahl der Spuren wird bei meinen Messungen $n = 20$ gewählt. Damit erhöht sich das Rauschen nur unwesentlich und versehentlich ausgewählte Spuren mit Artefakten oder Schaltereignissen fallen nicht ins Gewicht. Der letzte Punkt ist von großer Bedeutung, da sich fehlerhafte Referenzspuren auf eine ganze Messung beziehen können und so systematische Fehler entstehen.

c) Sortieren der Depolarisationen und Zusammenfügen der Zeitreihen

Nach der Korrektur des Artefaktes werden alle Haltepotentiale und alle Bereiche mit Störsignalen bzw. schlecht kompensierten Artefakten herausgeschnitten. Um die Offen-Wahrscheinlichkeit in der Zeitreihe zu erhöhen, können auch Spuren ohne Schaltereignisse herausgeschnitten werden. Die bearbeiteten jeweiligen Messreihen eines Seals werden dann noch zu einer einzigen Zeitreihe zusammengefügt. Die so entstandene Zeitreihe enthält nur noch depolarisierende Abschnitte, die auch weiterhin durch eine Markierung der Daten voneinander getrennt sind.

d) Korrektur der ersten N Punkte

Im Bereich der ersten 0,1- 0,2 ms nach Depolarisation ist das Artefakt bei meinen Messungen noch sehr groß (Abbildung 5.3), teilweise ist sogar der Messbereich der A/D-Karte überschritten. Kleine Änderungen des Artefaktes von Abschnitt zu Abschnitt lassen eine vollständige Korrektur in diesem Zeitbereich nicht zu. Deswegen verfügt das Kiel-Patch-

Programm über eine Option, die ersten N Punkte jedes Abschnittes auf die Nulllinie der Artefaktkorrektur zu legen. Das Ergebnis einer solchen Korrektur, bezogen auf die Stromverteilung der Abschnitte, ist in Abbildung 5.4 zu sehen.

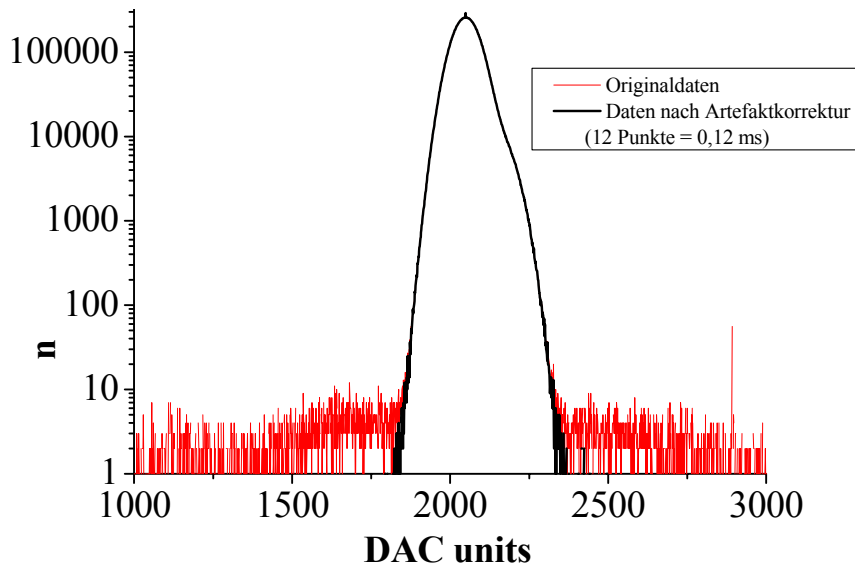


Abbildung 5.4 Stromverteilung einer gemessenen Zeitreihe mit Demonstration der Restartefaktkorrektur. Die rote Stromverteilung, der die Zeitreihen mit Restartefakt Bereich von 0,12 ms nach dem Potentialsprung zugrunde liegen, zeigt eine deutliche Verbreiterung. Nach der Korrektur dieses Zeitbereiches entsteht eine „glatte“ Verteilung (schwarz).

Entscheidend für den Erfolg der programmgestützten Korrektur ist die Qualität des analogen Signals. Die Artefakte unterliegen Schwankungen durch sich verändernde Sealwiderstände, Leckströme und eine eventuelle Drift der Nulllinie. Bei großen Sealwiderständen und einer guten Artefaktkompensation wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, sind nur kleine Änderungen zu erwarten, die dann erfolgreich nachbearbeitet werden können. Ziele der Korrektur sind konstante Stromniveaus, damit die Auswerterroutinen funktionieren, eine große Ausbeute an Ereignissen für die statistischen Analysen und das Erfassen von Ereignissen direkt nach der Depolarisation, die durch das Artefakt am stärksten verändert werden.

5.3 Addition der Einzelkanaldaten

Aus Einzelkanaldaten lassen sich durch Addition wie in Abbildung 5.5 veranschaulicht wird, quasi Whole-Cell-Ströme reproduzieren (aufaddierte Ströme oder Averages). Die Öffnungen von n Kanälen einer Zelle (Ganzzelleableitungen) sollten der n -maligen Öffnung eines Kanals (Einzelkanalableitung) bei vorausgesetzter Unabhängigkeit der Kanäle entsprechen.

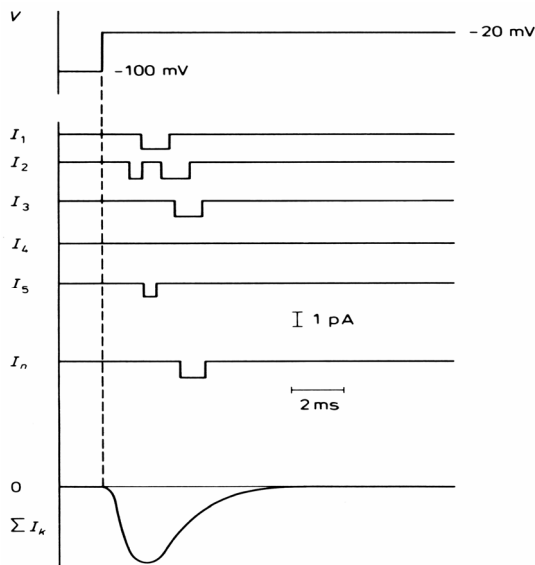


Abbildung 5.5 Prinzip der Erstellung von Ganzzelleableitungen aus Einzelkanalmessungen (nach Aldrich et al., 1983)

Aus n Einzelkanalströmen wird durch Summation der Ströme bei einer Whole-Cell-Ableitung nachgebildet.

Das Kiel-Patch-Programm summiert die gewählten Abschnitte beginnend bei der Markierung für den Potentialsprung auf und exportiert die erstellten Zeitreihen als ASCII-Datei. Auch hier gilt die Gleichung (5.2) für die Zunahme des absoluten Rauschens für n Spuren. Deswegen ist es für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis sinnvoll, bei gemessenen Daten nur Spuren mit Schaltereignissen für die Addition auszuwählen.

Diese Methode wird nicht nur dafür benutzt, Einzelkanalaufzeichnungen mit Ganzzelleableitungen zu vergleichen, es lassen sich so auch simulierte Zeitreihen mit gemessenen vergleichen (Michalek et al., 1999).

Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände der in dieser Arbeit erstellten Messungen sind zeitlich nicht konstant. Die Stromkurven enthalten für den Vergleich von Zeitreihen daher zwei wichtige Informationen:

- Die aufaddierten Stromkurven geben die zeitabhängige Besetzungswahrscheinlichkeit der Offen-Zustände wieder.
- Das zeitliche Integral über die aufaddierten Stromkurven gibt die gesamte Offen-Wahrscheinlichkeit über die betrachtete Zeit wieder.

5.4 Hinkley-Detektor

Die in den folgenden Abschnitten vorgestellten Auswerteverfahren setzen die so genannte idealisierte Zeitreihe voraus. Die idealisierte Zeitreihe soll jene Stromwerte wiedergeben, die durch das Schalten des als Markov-Modell angenommenen Kanals zwischen diskreten Stromniveaus (Symbolen) im biologischen Objekt entstehen, bevor diese Werte vom Rauschen verschmiert werden. Bei der so genannten Rekonstruktion ordnet ein Detektor jedem Punkt der verrauschten Datenreihe ein diskretes Stromniveau des angenommenen Markov-Modells eindeutig zu. Somit weist die so entstandene Zeitreihe nach dieser Transformation kein Rauschen mehr auf. Deswegen wird die rekonstruierte oder idealisierte Zeitreihe auch als unverrauschte Zeitreihe bezeichnet.

Der am häufigsten verwendete Algorithmus für die Rekonstruktion einer Zeitreihe ist ein Tiefpassfilter mit Schwellenwertdetektion, dessen Schwellenwertdetektor für die Erkennung eines Ereignisses auf die Mitte zwischen zwei angenommenen Stromniveaus des hypothetischen Markov-Modells eingestellt ist (Colquhoun und Sigworth, 1995). Schultze und Draber (1993) konnten jedoch zeigen, dass der Hinkley-Detektor höherer Ordnung dem Tiefpassfilter für ein gegebenes SNR in Bezug auf Zeitauflösung und die exakte Reproduktion der Ereignislänge überlegen ist. Deswegen kommt in den Auswerteverfahren der folgenden Untersuchungen auch dieser Detektor-Typ für die Erstellung idealer Zeitreihen zur Anwendung.

Der Hinkley-Detektor (Page, 1954; Page, 1955; Hinkley, 1971) ist ebenfalls ein Schwellenwertdetektor, der Übergänge in der verrauschten Zeitreihe z_t von dem geschlossenen Zustand μ_0 zum offenen Zustand μ_1 und umgekehrt erkennen soll.

Die Besonderheit des Algorithmus dieses Detektors besteht darin, dass die Integration über die Zeitreihe nicht im Tiefpass, sondern in einem echten Integrator geschieht und dass er eine nicht-lineare Funktion enthält, die den Testwert bei negativen Werten auf Null zurücksetzt.

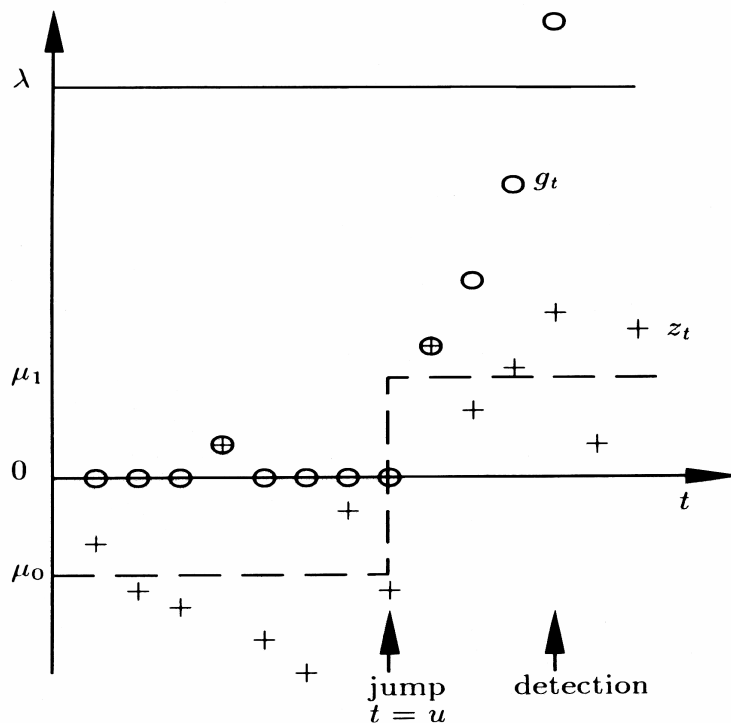


Abbildung 5.6 Funktionsweise des Hinkley-Detektors

Die Kreuze kennzeichnen die verrauschte Zeitreihe z_t , die Kreise die Folge der Testwerte g_t des Hinkley-Detektors, außerdem μ_0 und μ_1 die Stromniveaus. Wenn die Schranke λ überschritten wird, erkennt der Detektor einen Sprung zu der Zeit t mit dem letzten Testwert $g_t=0$. Daraus ergibt sich die gestrichelt ideale Zeitreihe (Schultze und Draber, 1993).

Der Detektor berechnet einen Testwert g_t aus den Messwerten z_t und der Summe g_{t-1} der vorherigen Testwerte nach (5.4) mit dem Startwert g_0 . Ein Sprung wird bei Überschreiten einer Schranke λ des Testwertes g_t (Abbildung 5.6) erkannt. Als Zeitpunkt für den Sprung wird die letzte Stelle in der Zeitreihe gewählt, an der $g_t=0$ ist. Nach einem Sprungereignis und bei negativen Testwerten wird g_t gleich Null gesetzt und damit der Detektor wieder in den

Ausgangszustand zurückgebracht. Die Funktionsweise des Detektors ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

$$g_0 = 0 \quad (5.3)$$

$$g'_t = g_{t-1} + \left(z_t - \left(\frac{\mu_0 + \mu_1}{2} \right) \right) \quad (5.4)$$

$$g_t = \max(0, g'_t) \quad (5.5)$$

Soll der Detektor einen Sprung in die andere Richtung erkennen, läuft der Algorithmus mit umgekehrtem Vorzeichen. Ist ein Sprung in beide Richtungen möglich, werden zwei Detektoren parallel betrieben.

Die Schranke λ bestimmt die Empfindlichkeit des Detektors und die Anzahl der Messpunkte, die benötigt werden, die Schranke zu überschreiten, damit also insbesondere die zeitliche Auflösung τ_{res} .

Dieser Zusammenhang sei an einer rauschfreien Zeitreihe veranschaulicht. Vor dem Sprung gilt $z_t = \mu_0$. Damit bleibt der Testwert $g_t = 0$, bis der Sprung erfolgt ist. Danach steigt g_t linear mit einer Steigung $\frac{\mu_0 - \mu_1}{2}$. Nach der Zeit τ_{res} wird die Schranke erreicht, und es gilt:

$$\lambda = \frac{\mu_1 - \mu_0}{2} \tau_{res} \quad (5.6)$$

Damit gilt für die Wahl der Schranke λ (Draber und Schultze, 1994a): Alle Ereignisse, die länger als τ_{res} sind, werden erkannt, kürzere Ereignisse bleiben verborgen (missed events).

Neben dem Problem, Ereignisse nicht zu erkennen, besteht die Gefahr, Ereignisse fälschlicherweise anzuzeigen. Je nach Wahl der Auflösung werden mehr oder weniger statistische Änderungen des Testwertes, die durch Rauschen bedingt sind, als Ereignis interpretiert (false alarms). Bei einer Anpassung der Empfindlichkeit an das Signal/Rauschverhältnis (SNR) der Zeitreihe konnte in Simulationsversuchen (Schultze und Draber, 1993) gezeigt werden, dass der Fehler für "false alarms" mit Gleichung (5.7) unter $1:10^4$ bleibt:

$$\tau_{res} = k_c \frac{T}{SNR} \quad (5.7)$$

- k_c :** Konstante, die von der Farbe des Rauschens abhängt
Weiß 22: Der Rauschanteil ist gleichmäßig über den Frequenzbereich verteilt.
Blau 32 : Das Rauschen steigt mit dem Quadrat der Frequenz.
T: Abtastintervall der Zeitreihe

Bessere Ergebnisse werden mit dem Higher-Order-Hinkley-Detektor erzielt. Die höhere Ordnung bewirkt eine bessere Unterdrückung der hochfrequenten Anteile des Rauschens. Hier wird ein Detektor achter Ordnung benutzt, der einen guten Kompromiss zwischen Rechenaufwand und Leistung bietet (Schulze & Draber, 1993).

Die Arbeitsweise des Higher-Order-Hinkley-Detektors unterscheidet sich im Prinzip nicht von dem einfachen Detektor. Zusätzlich werden jedoch die höheren Ordnungen des Algorithmus rekursiv berechnet:

$$g_t^{(i)} = \begin{cases} g_{t-1}^{(i)} + T g_t^{(i-1)} & \text{für } g_t^{(i)} \geq 0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (5.8)$$

$g_{t(i)}$: Testwert höherer Ordnung
T: Abtastintervall der Zeitreihe

Bei Überschreitung der Schranke λ durch den Testwert wird analog zum einfachen Hinkley-Detektor ein Sprung erkannt, und bei negativen Werten werden alle Testwerte gleich Null gesetzt.

5.5 Verteilung für separate Stromniveaus

Diese Methode der Verteilung für separate Stromniveaus wird erstmals bei Schröder (2003) und Schröder et al. (2004) vorgestellt. Für jedes Niveau der rauschfreien Zeitreihe (siehe Abschnitt 5.4) wird eine eigene Stromverteilung erstellt. Die gemessenen Stromwerte werden entsprechend ihrer Zuordnung zu Stromniveaus durch den Detektor in diese Stromverteilungen einsortiert.

Das Kiel-Patch-Programm verwendet für diese Aufgabe den Sublevel-Hinkley-Detektor (Draber & Schultze, 1994b), der auch Unterleitfähigkeiten erfassen kann. Die getrennten Stromverteilungen werden als ASCII-File auf die Festplatte gespeichert.

Mit dieser Methode lässt sich die Arbeitsweise von Leveldetektoren kontrollieren. Daraus kann man Rückschlüsse über die Lage von Niveaus, Anordnung von Zuständen / Übergänge zwischen Zuständen im Markov-Modell und Fehler (false alarms, missed events, Schröder et al., 2004) des Detektors ziehen.

Die Fähigkeit dieser Methode, schnelles Schalten zu demaskieren, ist für meine Arbeit von Bedeutung. Als schnelles Schalten bezeichnet man Übergänge zwischen Stromniveaus, die so schnell erfolgen, dass der für die Messung verwendete Filter den Sprüngen nicht mehr folgen kann und so die vom Rauschen überlagerte Stromverteilung sich nicht mehr als Summe von Gaußverteilungen darstellen lässt, sondern breiter oder asymmetrisch wird (FitzHugh, 1983; Rießner, 1994, 1998). Die so entstehenden Verteilungsfunktionen heißen Betaverteilungen und dienen sowohl der Anzeige schnellen Schaltens (fast gating) als auch zur Bestimmung der Übergangsraten jenseits der Filterfrequenz des Tiefpassfilters (Rießner, 1998; Harlfinger, 2003). Problematisch wird es, wenn durch ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis die Betafunktionen von der Verteilungsfunktion des Rauschens verdeckt werden. An dieser Stelle kommt die Verteilung für separate Stromniveaus ins Spiel. Durch die Auftrennung der Gesamtverteilung in Einzel-Darstellungen pro Stromniveau kann eine Entflechtung glücken, die die Überdeckung der Betaverteilungen durch die Rauschverteilungen vermindert.

In Abbildung 5.7A sind die Gesamt-Amplitudenhistogramme zweier simulierter Zeitreihen mit hochfrequenten (rot) und niederfrequenten Filter (hellblau) bei sonst gleichen Einstellungen abgebildet. Diese Abbildung veranschaulicht, dass sich die Verteilung durch

das Verhältnis von Schaltfrequenz und Filter verändert. Beide Histogramme lassen sich im Rahmen der „Messgenauigkeit“ mit der Summe aus zwei Gaußfunktionen optimal anpassen (nicht gezeigt), so dass daraus alleine noch keine Hinweis auf schnelles Schalten zu erhalten wäre.

Den Hinweis auf schnelles Schalten erhält man aus der Analyse der Verteilung für separate Stromniveaus (Schröder et al. 2004), wie sie in der Abbildung 5.7B für die beiden Verteilungen aus Abbildung 5.7A gezeigt sind. Bei der Näherung der geschlossenen Niveaus mit Gaußfunktionen fallen zwei Effekte auf:

Der erste Effekt besteht in der Verbreiterung der hellblauen Kurve gegenüber der roten. Das wird in den Bereichen 1a, 1b und 2a deutlich. Dies würde man aber in einer realen Messung so unmittelbar nicht sehen, da die Ratenkonstanten Markov-Modell des Kanals nur mit sehr großem Know-how (Gifte) verändert werden können. Dennoch gibt es eine Möglichkeit, die Verbreiterung zu erkennen, wenn ausreichend lange schaltfreie Stücke in der Zeitreihe die Vergleichskurve für reine Rauschverbreiterung liefern (Schröder et al. 2004). Solche schaltfreien Stücke sind gerade in dieser Arbeit bei Na^+ -Kanälen besonders leicht zu erhalten.

Den zweiten Effekt sieht man im Bereich von 2b im Vergleich zu 2a: Die rote Kurve knickt von der genäherten Gaußverteilung nach rechts ab. Dies kann durch Fehlfunktionen des Hinkley-Detektors (missed events, Schröder et al., 2004) erklärt werden. Bei der blauen Kurve kann das Abknicken nicht beobachtet werden, da es durch die Beta-Verbreiterung verdeckt wird. Auch das Fehlen dieses Abknickens kann als Hinweis auf schnelles Schalten gedeutet werden.

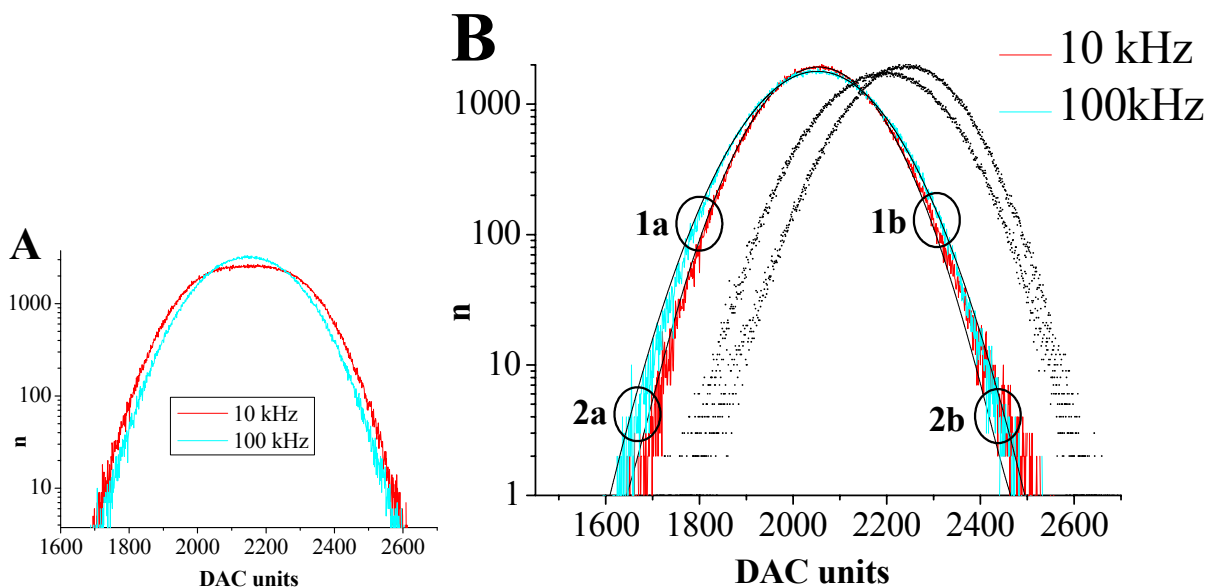


Abbildung 5.7 (A) Normales Gesamt-Amplitudenhistogramm mit allen Stromwerten in einer Verteilung (B) Verteilungen für separate Stromniveaus (insgesamt 4 Kurven)

Zeitreihen eines $C \rightleftharpoons O$ Modells werden mit symmetrischen Ratenkonstanten von 10 kHz (rot) oder 100 kHz (hellblau) simuliert. Das Filter liegt bei 50 kHz, die Abtastrate bei 200 kHz und $\text{SNR} = 2$. Die Histogramme der leitenden Niveaus sind durch Punkte angedeutet. Die beiden Niveaus des geschlossenen Zustandes in (B) sind übereinander geschoben, um sie besser vergleichen zu können. In (A) ist zu erkennen, dass die Niveaus durch schnelles Schalten in der Stromverteilung verschoben sind. Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

5.6 Dwell-Time-Histogramme und Dependency-Plots

Das Kiel-Patch-Programm stellt eine Reihe von Funktionen zur Verfügung, um die im Folgenden beschriebenen Diagrammtypen darzustellen und auszuwerten.

1-Dimensionale Dwell-Time-Diagramme:

Die Dwell-Time-Histogramme stellen die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Aufenthaltszeiten in den verschiedenen Stromniveaus in einer Zeitreihe dar und enthalten Informationen über die Anzahl der Zustände im Markov-Modell.

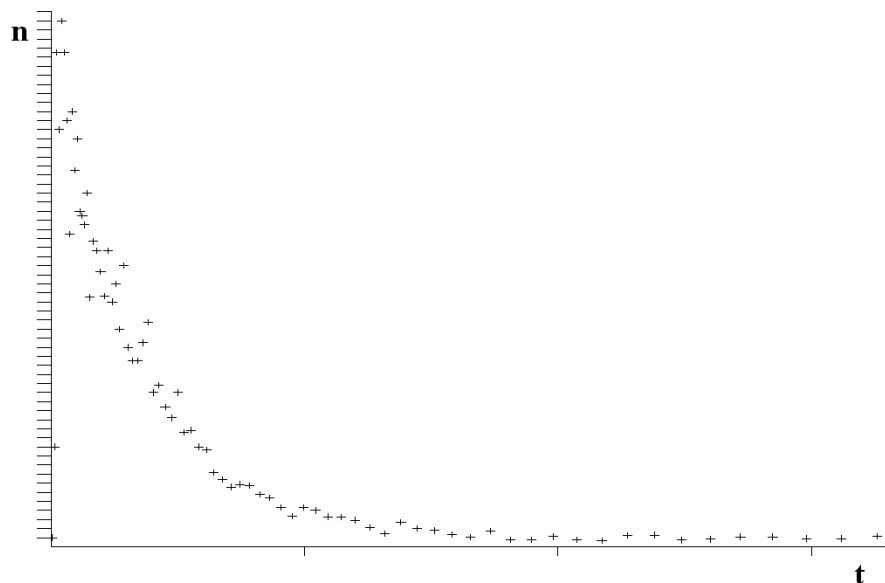


Abbildung 5.8 Beispiel eines Dwell-Time-Histogramms aus dem Kiel-Patch-Programm

Die Anzahl der Ereignisse mit gleicher Verweildauer im Bereich $t_i + \Delta t$, hier für den geschlossenen Zustand, werden gegen t_i aufgetragen.

Dem Ereignis i der rauschfreien Zeitreihe (Abbildung 5.8) wird anhand seiner Verweildauer in einem Zustand (Stromniveau) eine Zeit t_i (meistens gleich Anzahl seiner Abtastpunkte während dieser Verweildauer) zugewiesen. Für ein Stromniveau werden die t_i in die Klassen eines Histogramms (Bins) mit der Klassenbreite Δt einsortiert. Die so erstellten Diagramme pro Stromniveau können mit einer Summe aus Exponentialfunktionen angepasst werden:

$$f(t) = \sum_k a_k e^{-\frac{t}{\tau_k}} \quad (5.9)$$

Die Anzahl der minimal benötigten k entspricht der Anzahl der Zustände entsprechender Leitfähigkeit im Markov-Modell.

Die Klassenbreite der Bins eines solchen Diagramms kann konstant sein, oder exponentiell wachsend mit oder ohne Skalierung der Häufigkeiten auf die Klassenbreite. Für die bessere Darstellung der vorhandenen Zeitkonstanten bietet sich eine Einteilung mit exponentiell wachsenden Intervalllängen ohne Skalierung an (Sigworth & Sine, 1987). Dann entstehen charakteristische Histogramme. Bei ihnen ist bei ausreichender zeitlicher Auflösung die Anzahl der Maxima der Kurve gleich der Anzahl der Zeitkonstanten.

Mit dem Kiel-Patch-Programm können 1D-Dwell-Time-Diagramme dargestellt und die τ_k bestimmt werden. Außerdem kann man die Histogramme aller Leitfähigkeiten gleichzeitig mit dem Target-Fit (direkter Fit der Ratenkonstanten anstelle der Zeitkonstanten) an ein Markov-Modell anpassen und die Ratenkonstanten berechnen (maximal 5 Zustände; Blunck et al., 1998).

2-Dimensionale-Dwell-Time-Histogramme:

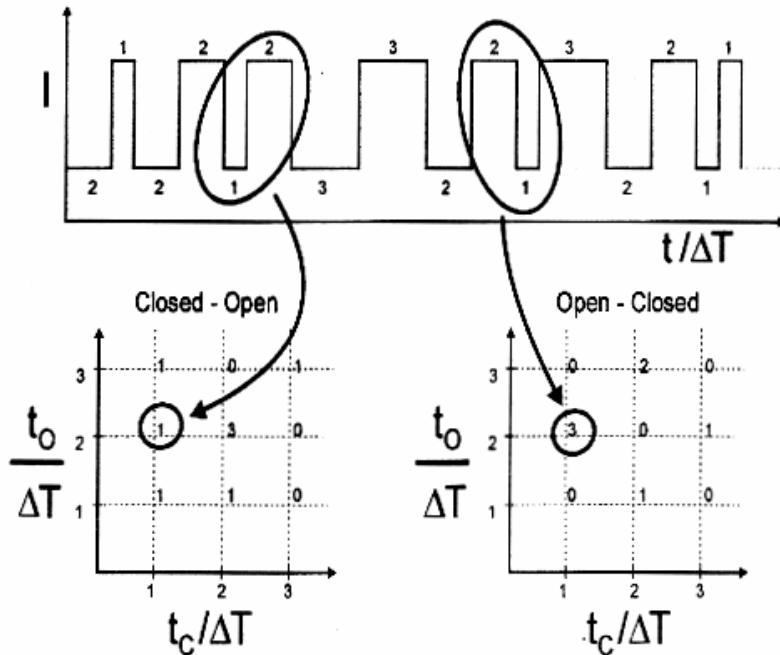


Abbildung 5.9 Schema für die Erstellung von 2D-Histogrammen

Aus der rauschfreien Zeitreihe (oben) werden jeweils benachbarte Offen- und Geschlossen-Zustände zusammengefasst und als Häufigkeit in ein 2 dimensionales Histogramm eingetragen.

Das inverse Problem der Dwell-Time-Analyse hat keine eindeutige Lösung. Das heißt, dass aus einer gemessenen Zeitreihe und den zugehörigen Dwell-Time-Histogrammen sich das zugrunde liegende Markov Modell nicht eindeutig bestimmen lässt. Es gibt Äquivalenz-Klassen von Markov Modellen, die die gleichen Dwell-Time-Histogramme erzeugen (Blatz & Magleby, 1986; Weiss & Magleby, 1989), und damit ist eine Unterscheidung innerhalb dieser Klasse nicht möglich.

Eine Verbesserung der Modellunterscheidung können 2D-Dwell-Time-Histogramme (Magleby & Weiss, 1990b) liefern, weil sie im Gegensatz zu 1D-Dwell-Time-Histogrammen die Information über die Folge angenommener Zustände mit einbeziehen. Sie unterscheiden sich von eindimensionalen dadurch, dass nicht nur die Verweildauer in einem Niveau registriert wird, sondern die Verweildauer im vorangegangenen Niveau mit betrachtet wird (Abbildung 5.9). Aus diesen beiden Zeiten im offenen und im geschlossenen Niveau wird ein Wertepaar erstellt. Diese Wertepaare werden analog zum eindimensionalen Fall zweidimensionalen Bins (Log-Binning-Technik; McManus et al., 1987) zugeordnet und in einem 2D-Histogramm dargestellt. In dieser Arbeit wird eine feste Einteilung der Bins von 10 Bins pro Dekade verwendet (Radomski, 2000).

In Abbildung 5.10 ist das Beispiel eines 2D-Histogramms dargestellt. Die Anzahl der Zustände in den leitenden (O) und nicht leitenden Niveaus (C) lässt sich anhand der Maxima

ablesen, außerdem können (begrenzte) Aussagen über die Schnelligkeit der Übergänge im Markov-Modell getroffen werden.

Die Begrenzung der Aussage rührt daher, dass Zeitkonstanten bei Modellen mit mehr als zwei Zuständen nur über eine komplexe Matrixoperation in Ratenkonstanten umgerechnet werden können (Albertsen, 1992; Jackson, 1997) und nicht direkt anschaulich zu erklären sind.

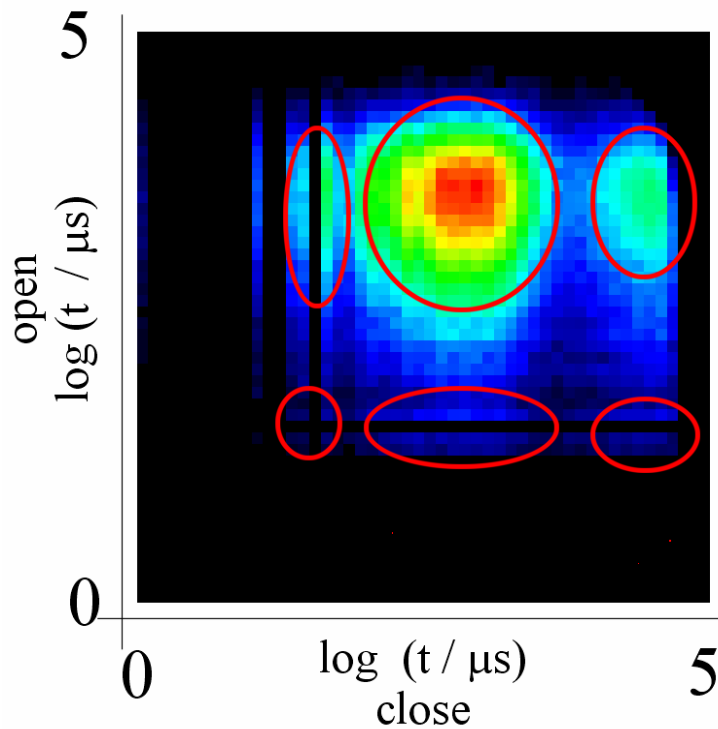
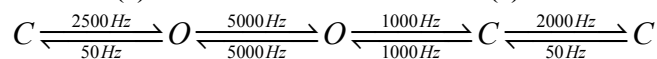


Abbildung 5.10 2-Dimensionales-Dwell-Time-Histogramm

Die Häufigkeit ist farblich von schwarz (0) bis rot (max) kodiert. Horizontal lassen sich anhand der „Hügel“ (rote Kreise) geschlossene Zustände (3) und vertikal offene Zustände (2) unterscheiden.

Zugrunde liegendes Modell:



Ein 2D-Dwell-Time-Histogramm grenzt die Klasse der in Frage kommenden Markov-Modelle weiter ein (Magleby & Weiss, 1990b). Mit dieser Eigenschaft lassen sich für die gemessenen Daten angenommene Modelle überprüfen.

Die Abfolge der Niveaus (C-O oder O-C, siehe Abbildung 5.9) hat, mikroskopische Reversibilität vorausgesetzt (Colquhoun & Hawkes, 1982), keine Bedeutung für die Auswertung. Die Open-Closed- und Closed-Open-Diagramme können zu einem Histogramm zusammengefasst werden, wie es im Kiel-Patch-Programm auch vorgesehen ist (Radomski, 2000).

Mikroskopische Reversibilität ist immer dann gegeben, wenn Transportprozesse im thermodynamischen Gleichgewicht sind. Wird Energie benötigt, so laufen die Prozesse in eine Vorzugsrichtung und sind damit für die Analyse nicht umkehrbar. Die Reversibilität kann z.B. mit einer Autokorrelationsfunktion überprüft werden. Ist die Zeitreihe zu jedem

gegebenen Zeitpunkt symmetrisch, liegt Reversibilität vor. Eine weitere Methode ist der χ^2 -Test von Song & Magleby (1994; siehe auch Rothberg & Magleby, 2001):

$$\chi^2 = \sum_{i,j} \frac{(F_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} + \frac{(B_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad (5.10)$$

F_{ij}: Anzahl der Ereignisse im Bin(i,j) des Open-Closed Histogramms (O-C forward)
B_{ij}: Anzahl der Ereignisse im Bin(i,j) des Open-Closed Histogramms (O-C backward)
E_{ij}: E_{ij} = (F_{ij} + B_{ij})/2, erwartete Anzahl der Ereignisse in bin (i,j)

Kann die mikroskopische Reversibilität nicht vorausgesetzt werden, wie z.B. bei den in Kapitel 9 beschriebenen Messungen mit Na⁺-Kanälen, wird durch die Zusammenfassung der C-O- und O-C-Histogramme zumindest kein zusätzlicher Fehler erzeugt, eventuell gehen hier aber Informationen verloren.

Histogramme höherer Ordnung n>2 erzielen bei mikroskopischer Reversibilität keinen weiteren Informationsgewinn (Fredkin et al., 1985; Löptien, 1999).

2D-Differenzenhistogramme:

Differenzenhistogramme entstehen durch Normierung zweier Histogramme unterschiedlicher Messreihen auf eine Bezugsgröße (siehe Abschnitt 5.8) und die Subtraktion der Häufigkeiten der Histogramme Bin für Bin. Hiermit kann getestet werden, ob zwei Zeitreihen durch eine äquivalente Klasse von Markov-Modellen beschrieben werden. Stimmen die Histogramme und damit die Modelle nicht überein, so treten nicht nur statistische Abweichungen (Rauschen) wie bei gleichen Modellen auf, sondern es können „Berge“ und „Täler“ in den Differenzenhistogrammen unterschieden werden. Analog zur Abbildung 5.10 können diese systematischen Abweichungen eventuell Abweichungen der Übergänge oder fehlende Zustände im Modell anzeigen.

Dependency-Plots:

Einen besseren visuellen Zugang zu der Abfolge der Zustände in den Markov-Modellen bieten Dependency-Plots, die aus 2D-Histogrammen erstellt werden. Die Dependency berechnet sich aus der Abweichung der Besetzung des 2D-Histogramms von der theoretisch erwarteten Besetzung für statistische Unabhängigkeit der Ereignisse (Magleby & Song, 1992):

$$dep_{ij} = \frac{n_{ij} - n'_{ij}}{n'_{ij}} \quad (5.11)$$

dep_{ij}: Dependency für das Bin (i,j)
n_{ij}: gemessene Besetzung des Bins (i,j) = Besetzung im 2D-Histogramm
n'_{ij}: erwartete Besetzung des Bins (i,j) bei Unabhängigkeit der Ereignisse

Wenn die Dependency eines Bins deutlich von 0 abweicht, besteht eine Abhängigkeit der Open- und Closed-Ereignisse. Es werden Abhängigkeiten im Markov-Modell angezeigt.

Die n'_{ij} lassen sich folgendermaßen berechnen:

$$n'_{ij} = P_{O_i} P_{C_j} N_T \quad (5.12)$$

mit

$$P_{O_i} = \sum_j n_{ij} / N_T \quad (5.13)$$

und

$$P_{C_j} = \sum_i n_{ij} / N_T \quad (5.14)$$

N_T : Gesamtzahl der Ereignisse im 2D-Histogramm
 P_{O_i} : Summe der Offen-Ereignisse in der Zeile i des Dwell-Time-Histogramms
 P_{C_j} : Summe der Geschlossen-Ereignisse in der Spalte j des Dwell-Time-Histogramms

Die praktische Verwendung eines Dependency-Plots scheint mir durch die hohe Anzahl der benötigten Ereignisse ($>10^7$ nach meiner Erfahrung) eingeschränkt zu sein (siehe auch Radomski, 2000). Eine solche Anzahl ist für gemessene Zeitreihen nur in Ausnahmen erreichbar.

5.7 Sequentielle Dwell-Time-Histogramme

Die Methode „Sortieren nach Ereignisabfolge“, die zu sequentiellen Dwell-Time-Histogrammen (Abbildung 5.12) führt, wurde in der Literatur, soweit bekannt, noch nicht dargestellt. Möglicherweise liegt das daran, dass die meisten Auswerteprogramme für den K^+ -Kanal entwickelt wurden, dessen Zeitreihe sich im stationären Gleichgewicht befindet. Die Vorteile sind für statistische Analysen die Anwendbarkeit der Zeitmittelung und die Gewinnung sehr großer Datenmengen von einem Patch. Bei ereignisgetriggerten Antworten wie beim Na^+ -Kanal beginnt die Zeitreihe meistens fern vom statistischen Gleichgewicht. Das Verfolgen des Weges von dieser Anfangsverteilung (das über eine Scharmittelung geschehen muss) zum statistischen Gleichgewicht ergibt zusätzliche Information, aus der manchmal die Anordnung der Zustände ermittelt werden kann. Das hier beschriebene Verfahren basiert auf der Erstellung von durch Scharmittelung erstellten 1D-Dwell-Time-Histogrammen. Die Ereignisse für die unterschiedlichen Stromniveaus werden für ereignisgesteuerte Messungen nicht in ein einziges 1D-Dwell-Time-Histogramm geschrieben, sondern sortiert nach ihrer Abfolge, wie in Abbildung 5.11 veranschaulicht, auf mehrere Diagramme aufgeteilt.

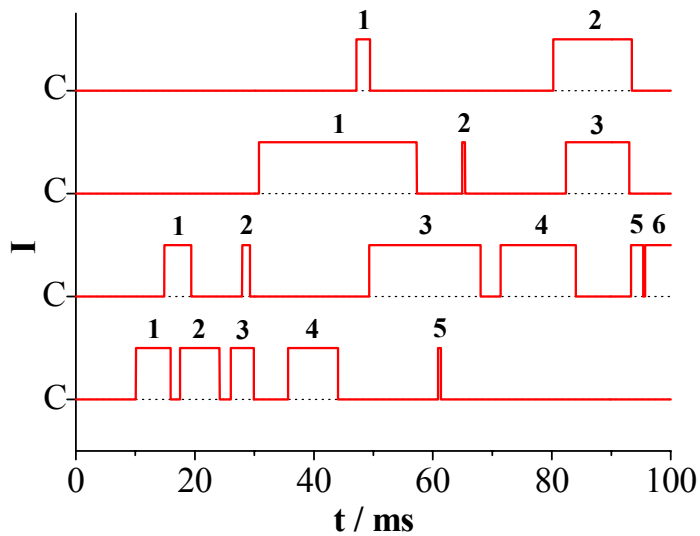


Abbildung 5.11 Schema zur Erstellung der Diagramme „Sortieren nach Ereignisabfolge“

Zum Zeitpunkt $t = 0$ ms erfolgt das Ereignis (Potentialsprung). Die Offen-Ereignisse der 4 rauschfreien Zeitreihen sind, beginnend bei jeweils 1, durchnummeriert (1-n). Alle Ereignisse mit der Nummer 1 werden in das Dwell-Time-Histogramm O_1 eingetragen. Entsprechend erfolgt die Erstellung der O_n -Diagramme.

Durch die Information über die Abfolge der Ereignisse weisen diese Histogramme den Zusammenhang zwischen Zuständen im Markov-Modell nach wie bei 2D-Dwell-Time-Histogrammen. Im Gegensatz dazu ist aber das erste Ereignis in jedem Niveau besonders ausgezeichnet. Genauso wie bei den anderen Dwell-Time-Histogramm-Typen lässt sich anhand der für die Anpassung der Kurven benötigten Zeitkonstanten die Anzahl der Zustände im Markov-Modell abschätzen.

Vorraussetzung für diese Methode sind Zeitreihen, bei denen sich das zu untersuchende Objekt zu Beginn einer Potentialänderung in einem definierten Zustand befindet. Weiterhin wird gefordert, dass ein mehrmaliger Wechsel zwischen leitenden Niveaus pro Potentialsprung erfolgt, um die C_n oder O_n beobachten zu können. Für die statistische Absicherung ist dann noch eine häufige Wiederholung des Potentialssprungs (Scharmittelung) zu fordern.

Abbildung 5.12 zeigt diese Methode auf 4 verschiedene simulierte Markov-Modelle für die Offen-Zustände angewendet. Analog dazu können die Geschlossen-Zustände betrachtet werden. Der Kanal befindet sich zum Zeitpunkt des simulierten Reizes immer im linken C-Zustand. Die möglichen Übergänge im Markov-Modell, ausgehend von diesem ausgezeichneten C-Zustand, sind durch die Pfeile angegeben. Die Unterschiede in den Diagrammen sind für die zugrunde liegenden Markov-Modelle typisch und lassen den Untersucher mit dieser Methode die Modelle diskriminieren. Die Diagramme können folgendermaßen interpretiert werden:

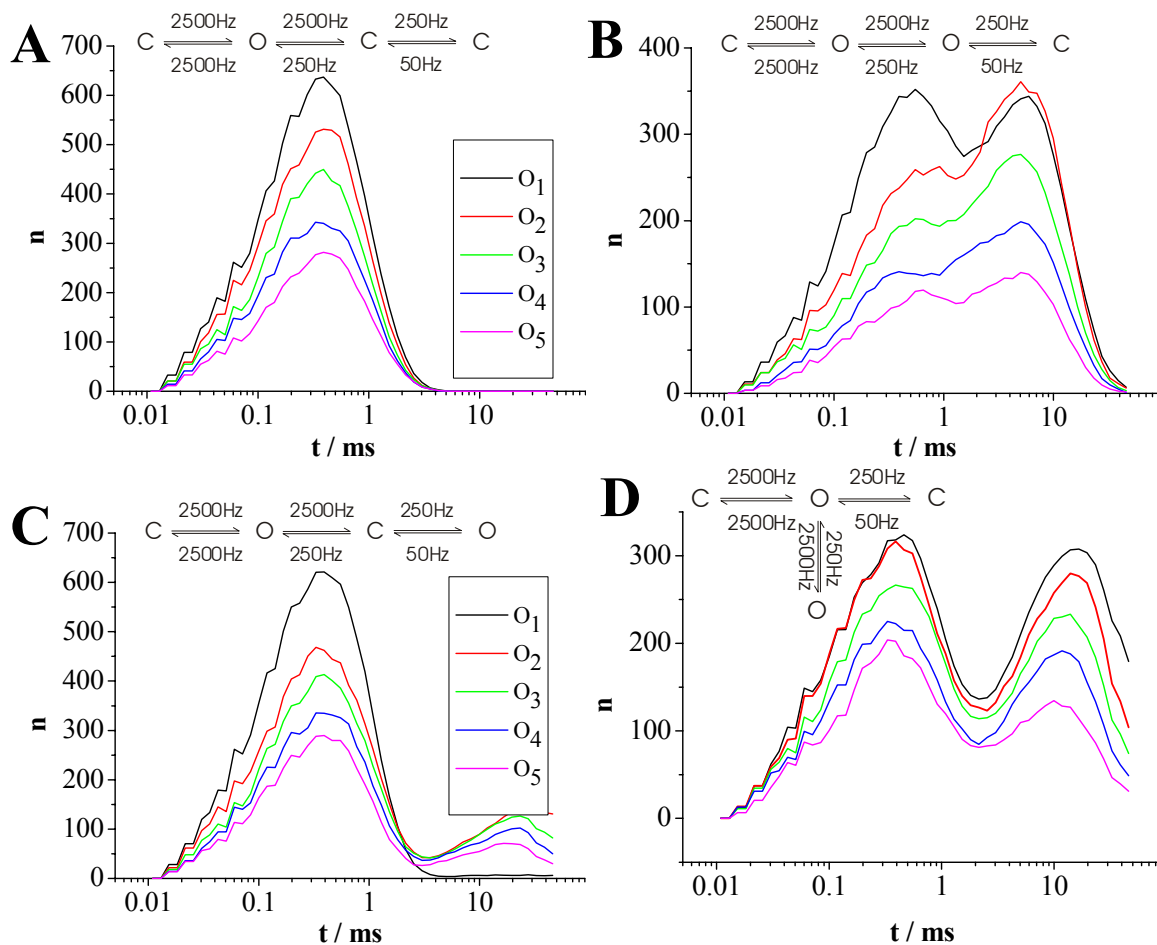


Abbildung 5.12 Darstellung der Open-Dwell-Time-Histogramme (O_1 - O_5)

Die Offen-Ereignisse sind nach der Abfolge bei einer simulierten Potentialänderung für verschiedene 4-Zustandsmodelle sortiert. Zum Zeitpunkt des „Reizes“ befindet sich der simulierte Kanal jeweils im linken C-Zustand.

10000 Reize ($=n$), $k_{12}=k_{21}=k_{23}=2500$ Hz, $k_{32}=k_{34}=250$ Hz, $k_{43}=50$ Hz, Länge eines Intervalls = 50 ms

Abbildung 5.12A:

Zu erkennen ist ein einziges Maximum für O_1 - O_5 , das für die jeweils folgende Öffnung des Kanals kleiner ausfällt.

Ein Offen-Zustand in dem zu Grunde liegenden Markov-Modell lässt keine Variation der Kurvenform zu. Die Wahrscheinlichkeit, aus einem O_n Zustand herauszuspringen, ist für alle folgenden O_{n+1} Zustände gleich, deswegen ist auch die Kurvenform gleich. Durch die zeitliche Begrenzung der Aufzeichnung fällt O_n mit größerem n häufiger aus dem Zeitfenster. Dadurch werden die Maxima kleiner.

Abbildung 5.12B:

Zu erkennen sind jeweils zwei Maxima, allerdings sind die Maxima für O_1 gleich hoch, während O_2 - O_5 ein höheres zweites Maximum zeigen.

Die abweichende Verteilung für O_1 lässt sich durch eine Fallunterscheidung erklären. Bei der ersten Öffnung befindet sich der Kanal am Anfang sicher im linken Offen-Zustand und springt von dort auch in den zweiten. Bei den folgenden Öffnungen wird die Besetzung des zweiten Offenzustandes immer wahrscheinlicher, weil die Rückreaktion k_{32} kleiner als k_{23}

ist. Damit nehmen die kurzen Verweildauern des ersten O-Zustandes im Histogramm ab. Das spiegelt sich in den Dwell-Time-Histogrammen in Abbildung 5.12 wieder.

Abbildung 5.12C:

Es sind bis auf O_1 jeweils zwei Maxima zu erkennen, die von O_2 - O_5 abnehmen. Bei der ersten Öffnung kann sich der Kanal nur im linken O-Zustand im Markov-Modell befinden, also lässt sich für O_1 auch nur eine Zeitkonstante nachweisen.

Abbildung 5.12D:

Für O_1 - O_5 sind je zwei Maxima mit abnehmender Höhe zu erkennen. Die Aufteilung auf die Maxima ist nicht signifikant verschieden von O_1 - O_5 .

Bei jeder Öffnung springt der Kanal vom linken oder rechten C zuerst in den oberen O-Zustand. Von dort haben die Sprünge in die beiden C oder in das untere O gleiche Wahrscheinlichkeit für alle O_n . Damit ergeben sich auch gleiche Zeitkonstanten für den Übergang in einen C-Zustand für O_1 - O_5 .

5.8 2-Dimensionaler-Dwell-Time-Fit

Der 2D-Fit (Magleby & Weiss, 1990a; Magleby & Weiss, 1990b) ist ein Verfahren, um Markov-Modelle mit Hilfe von 2D-Histogrammen an Patch-Clamp-Messungen anzupassen. Eine wichtige Eigenschaft dieses Verfahrens ist es, auch noch Markov-Modelle unterscheiden zu können, die für 1-dimensionale Dwell-Time-Histogramme zu einer Äquivalenzklasse gehören.

Das Schema in Abbildung 5.13 veranschaulicht die Funktionsweise dieses Verfahrens. Patch-Clamp-Zeitreihen werden mit den Filtereinstellungen der gemessenen Daten unter der Annahme eines Markov-Modells simuliert. Das Differenzhistogramm (Abschnitt 5.6) zwischen den gemessenen und simulierten liefert ein Maß für die Übereinstimmung beider Zeitreihen. Ein Fit-Algorithmus optimiert die Ratenkonstanten der Simulation, bis die größte Übereinstimmung erreicht ist.

In Anlehnung an Magleby & Weiss (1990a, 1990b) wurde dieses Verfahren in das Kiel-Patch-Programm implementiert. Hilfreich waren die bereits vorhandenen Programmteile zur Simulation von Zeitreihen (Rießner, 1998) und zur Erstellung von 2D-Histogrammen (Radomski, 2000). Die Leistungen des Programms sind jedoch mit den Vorgaben von Magleby und Weiss sehr beschränkt. Nur selten gelingt es, die richtigen Ratenkonstanten anhand von bekannten simulierten Daten zu ermitteln. Auch können in der neueren Literatur keine Hinweise mehr auf die Anwendung dieses Verfahren gefunden werden, was ebenfalls dafür spricht, dass der ursprüngliche Algorithmus nicht sehr leistungsfähig ist.

Nach mehreren Änderungen und Detailverbesserungen ist dieses Verfahren jedoch zu einem leistungsfähigen Tool zu Untersuchung von Patch-Clamp-Daten herangereift. Die Möglichkeiten gehen über die ursprünglich angestrebte Modellunterscheidung (Magleby & Weiß, 1990b) hinaus (siehe Kapitel 6).

Im Folgenden sind die einzelnen Programmteile ausgeführt.

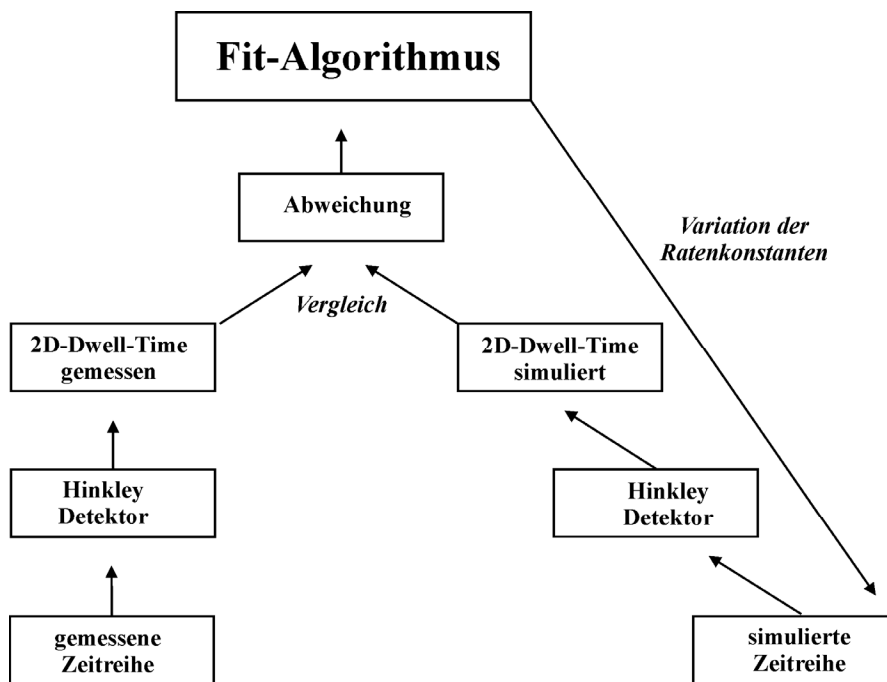


Abbildung 5.13 Ablaufdiagramm des 2D-Fits

Simulation:

Die Zeitreihen werden anhand eines vorgegebenen Markov-Modells und den zugehörigen Ratenkonstanten simuliert. Ziel ist es, mit den simulierten Daten so genau wie möglich die Charakteristik der gemessenen Daten abzubilden. Nur so können systematische Fehler bei dem Vergleich im 2D-Histogramm vermieden werden.

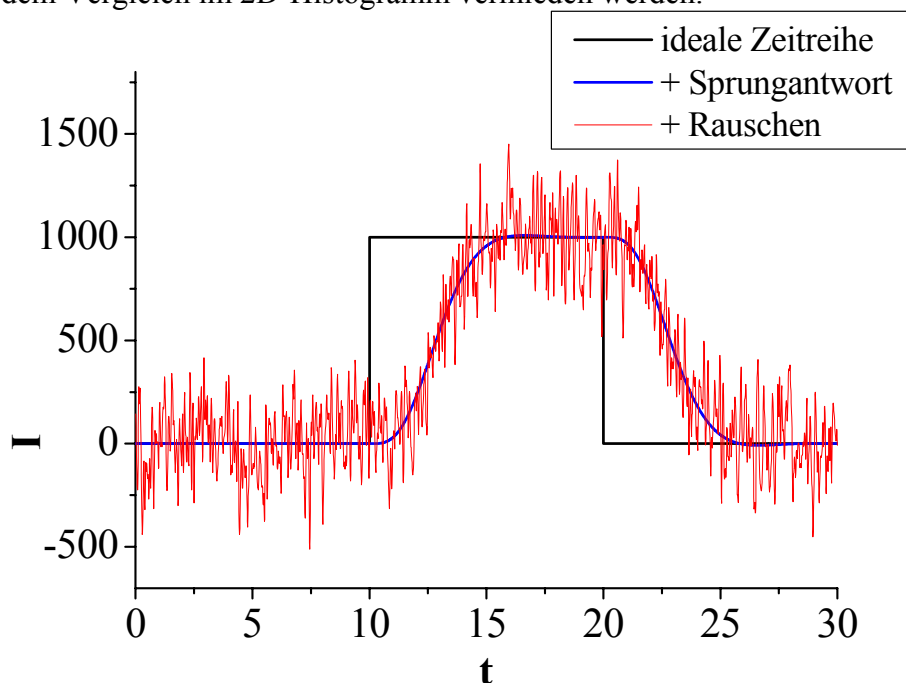


Abbildung 5.14 Prinzip zur Erstellung einer simulierten Zeitreihe (nach Rießner, 1998)
Erklärungen im Text, willkürliche Einheiten

Das Prinzip der Simulation einer Zeitreihe ist in Abbildung 5.14 gezeigt. Als Erstes wird eine rauschfreie Zeitreihe anhand der Ratenkonstanten und Leitfähigkeiten des Markov-Modells erstellt (schwarz). Im nächsten Schritt wird die Filterantwort für die Stromänderungen generiert in Anlehnung an den 4-poligen analogen Tiefpass-Besselfilters des Patch-Clamp-Verstärkers (blau). Dazu wird die Antwort des Filters als „Konserve“ (wird zur Reduktion der Rechenzeit aus einem Filter-File geladen) aus einer 4-poligen Besselfunktion berechnet und der Rechteckimpuls des Spannungssprunges entsprechend der Abtastrate mit dieser Konserve multipliziert. Zum Schluss fügt das Programm das Rauschen hinzu (rot).

Weißes Rauschen wird wie bei den Spannungssprüngen für jeden Abtastpunkt zu der Filterantwort addiert und die Breite der Rauschverteilung auf die Vorgabe für die Simulation angepasst.

Die alten Routinen zum Erzeugen des Rauschens von Rießner (1998) wird nicht benutzt, da nur feste Filter-Verhältnisse (1/4, 1/40) in Bezug auf die feste Abtastrate (100 / 200 kHz) möglich sind. Dies wird den tatsächlichen Verhältnissen bei Messungen nicht gerecht, da der Verstärker abweichende diskrete Filterfrequenzen aufweist (2, 5, 10, 20, 50 kHz). Mit den neuen Routinen ist es möglich, beliebige Einstellungen für Filter und Abtastfrequenz in der Simulation zu wählen. Allerdings beinhaltete die Rauschgenerierung von Rießner einen digitalen Hochpassfilter bei 1 kHz, der nun nicht mehr vorhanden ist. Diese Frage verliert an Bedeutung, da gemessene Rauschreihen eingebunden werden können. Hierdurch wird eine wesentliche bessere Übereinstimmung mit den simulierten Datenreihen erzielt.

Systematische Fehler in der Analyse der Datenreihen mit einem Level-Detektor können durch die wiederholte Benutzung derselben Rauschreihe entstehen, was besonders für die Simulation kurzer Abschnitte relevant ist. Dieses Problem könnte vermieden werden, indem das Rauschen jeweils neu erzeugt wird. Um aber die Rechenzeit für eine wiederholte Rauschgeneration zu vermeiden (bis zu 50 % Anteil an der Simulation) wird eine gegen die simulierten Abschnitte lange Rauschreihe im Speicher abgelegt und der Anfangspunkt für die Verknüpfung mit der rauschfreien Zeitreihe jeweils zufällig ausgewählt.

Die Simulation von Zeitreihen ist so erweitert, dass analog zu ereignisgesteuerten Messungen eine mehrmalige Simulation kurzer Abschnitte mit Markierung möglich ist. Weiterhin können wie bei gemessenen Daten bei der Elimination des Restartefaktes die ersten n Punkte auf Nullstrom gesetzt werden, um gemessene und simulierte Daten vergleichbar zu machen.

Mitentscheidend für die Qualität der Simulation, insbesondere für die statistische Verteilung der Ereignisse, ist der Zufallsgenerator des Programms, der für die Erstellung der rauschfreien Zeitreihe und die Erzeugung des weißen Rauschens benötigt wird. Der in C++ eingebaute Generator `rand()` erzeugt unter Windows-Systemen leider keine gleich verteilten Zufallszahlen und wurde durch den KISS-Generator (siehe Abbildung 5.15, Programmcode im Anhang) ersetzt, der eine bessere Gleichverteilung bei geringerer Streuung aufweist.

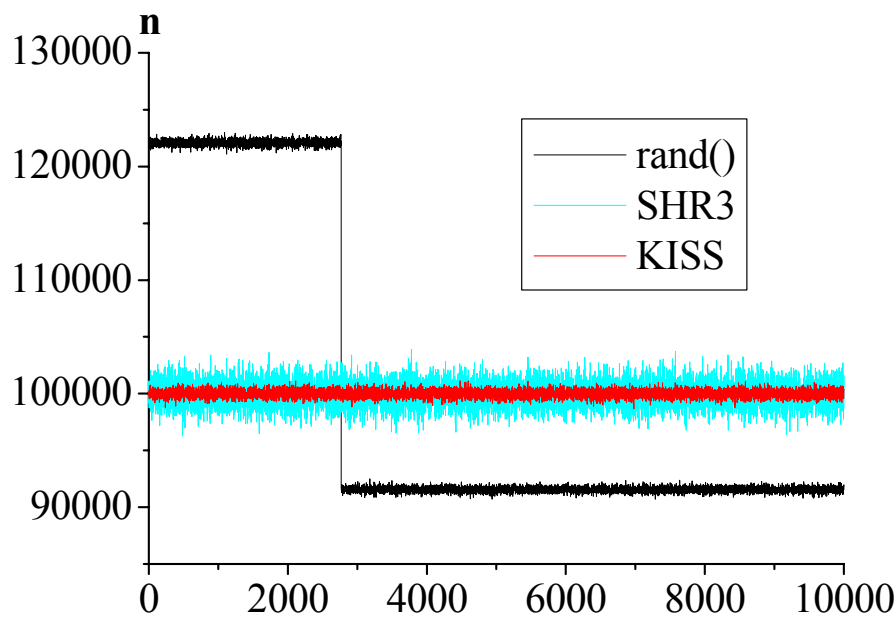


Abbildung 5.15 Verteilung der Zufallszahlen von 0-10000 für die Zufallszahlengeneratoren
schwarz: `rand()` der Programmiersprache C

blau: Generator SHR3

rot: aus 3 Generatoren (auch SHR) zusammengesetzter KISS-Generator unter Windows98

Der Generator `rand()` liefert im Gegensatz zu den anderen keine gleich verteilten Zufallszahlen. Die Häufigkeiten des KISS-Generators haben die geringste Abweichung vom statistischen Grenzwert.

Übereinstimmung der simulierten und gemessenen Zeitreihe:

Differenzhistogramme werden wie in Abschnitt 5.6 beschrieben aus 2D-Dwell-Time-Histogrammen der gemessenen und der simulierten Zeitreihe erzeugt. Aus diesen Diagrammen wird dann die Fehlersumme berechnet, die als einziger Parameter in die Optimierung der Ratenkonstanten durch den Fit-Algorithmus eingeht.

Ein prinzipielles Problem der Fehlersummen bei diesem Verfahren sind die stochastischen Schwankungen durch die Simulation. Da die Zeitreihen mit einem Zufallsgenerator erzeugt werden, entsteht ein unterschiedlicher Fehler für jede Simulation mit den gleichen Ratenkonstanten. Das Programm bietet hierfür als Lösungsmöglichkeit an, durch die Simulation mit der n -fachen Zeit der gemessenen Zeitreihe die stochastische Verteilung des Fehlers zu minimieren und möglichst „glatte“ simulierte 2D-Histogramme für die Fehlerberechnung zu erzeugen. Um Rechenzeit zu sparen, kann die Länge der simulierten Zeitreihen, beginnend mit kurzen Zeitreihen, mit zunehmender Konvergenz des Fit-Algorithmus erhöht werden.

Folgende Änderungen gegenüber dem vorgeschlagenen Verfahren von Magleby und Weiss (1990a) werden in dieser Arbeit eingeführt:

a) Detektor

Anstelle des vorgeschlagenen Half-Threshold-Tiefpass-Detektors wird der leistungsstärkere Hinkley-Detektor (Abschnitt 5.4) verwendet.

b) Normierung der 2D-Dwell-Time-Histogramme

Die Verwendung unterschiedlich langer Zeitreihen für gemessene und simulierte Zeitreihen erfordert eine Normierung der 2D-Dwell-Time-Histogramme. Die Normierung auf die Anzahl

der Ereignisse wird zugunsten einer Normierung auf die simulierte Zeit verändert. Die Normierung auf die Zeit verhindert, dass der Fit-Algorithmus die Ratenkonstanten gegen $k_{ij} \rightarrow 0$ (Keine Ereignisse in der Zeitreihe) oder $k_{ij} \rightarrow \infty$ (sehr viele Ereignisse) streben lässt. In der alten Normierung würde z.B. bei $k_{ij} \rightarrow \infty$ die steigende Anzahl der Ereignisse wegnormiert und die Fehlersumme in etwa konstant bleiben.

Außerdem beinhaltet die neue Normierung, dass langsame und schnelle Zeitkonstanten in einem gewissen Rahmen gleichwertig in der Fehlersumme berücksichtigt werden. Fehlen zum Beispiel die langsamen Zeitkonstanten, werden in der Simulation zu viele Ereignisse erzeugt. Die Fehlersumme wird groß.

c) Berechnung der Abweichung

(Für die Diskussion von Likelihood und quadratischer Abweichung siehe Abschnitt 6.2)

Magleby und Weiss (1990a) schlagen die Berechnung der Likelihood L vor:

$$L = \sum_{ij} \log(S_{ij} / N) D_{ij}, \text{ für } S_{ij} > 0 \quad (5.15)$$

S_{ij} : Besetzung des Bins(i,j) im simulierten 2D-Dwell-Time-Histogramm

D_{ij} : Besetzung des Bins(i,j) im gemessenem 2D-Dwell-Time-Histogramm

N : Gesamtzahl der simulierten Ereignisse (Normierung auf die Anzahl der Ereignisse nach Magleby und Weiss (1990a))

Das Programm erlaubt anstelle der Likelihood die Berechnung der Quadratischen Abweichung für jedes Bin(i,j) (1-Feld-Methode):

$$Q = \sum_{ij} (S_{ij} - D_{ij})^2 \quad (5.16)$$

Q: Quadratische Abweichung zwischen gemessener und simulierter Zeitreihe

Die gemittelten Abweichungen über 9-Bins oder 25-Bins (9-Feld / 25-Feld-Methode, da über 9 / 25 Felder des Histogramms gemittelt wird) können stattdessen berechnet werden:

$$Q = \sum_{ij} \left(\sum_{k=i-m}^{i+m} \sum_{h=j-m}^{j+m} D_{k,h} - \sum_{k=i-m}^{i+m} \sum_{h=j-m}^{j+m} S_{k,h} \right)^2 \quad (5.17)$$

m : $m=1$ für 9 Bins, $m=2$ für 25 Bins

Fit-Algorithmen:

Der Fit-Algorithmus hat die Aufgabe, die Ratenkonstanten im Markov-Modell (unabhängige Parameter) so zu variieren, dass das Fehlerkriterium minimal wird. Die Leistung des Algorithmus wird an der Fähigkeit gemessen, das globale Minimum unter den lokalen Minima herauszufinden und es mit einer hohen Genauigkeit zu bestimmen. Wichtig ist die Anzahl der dafür benötigten Iterationen, um die Rechenzeit zu minimieren. Problematisch für den Fit-Algorithmus wirkt sich die statistische Schwankung der Fehlersumme im 2D-Fit aus

(siehe oben). Dadurch wird die erreichbare Genauigkeit stark eingeschränkt, und die Erkennung lokaler Minima ebenfalls erschwert.

Zwei Fit-Algorithmen sind in das Kiel-Patch-Programm implementiert: zum einen der bei vielen Fit-Problemen in diesem Labor bewährte Simplex (Nedler & Mead, 1965), zum anderen ein genetischer Algorithmus (Rechenberg, 1973; Holland, 1975):

a) Simplex (aus *Numerical recipes in pascal*, Press et al., 1989)

Das Simplexverfahren benutzt in einem n -dimensionalen Raum (n ist die Anzahl der unabhängigen Parameter) einen $n+1$ -dimensionalen Körper (Simplex). Die Eckpunkte dieses Körpers bilden im n -dimensionalen Raum $n+1$ Datensätze der freien Parameter. Für jeden Eckpunkt wird eine Fehlersumme nach (5.15), (5.16) oder (5.17) berechnet. Der Eckpunkt mit der größten Fehlersumme Z_{\max} wird nun durch eine Spiegelung an der Hyperebene der anderen Punkte ersetzt (Abbildung 5.16A) und eine neue Fehlersumme berechnet.

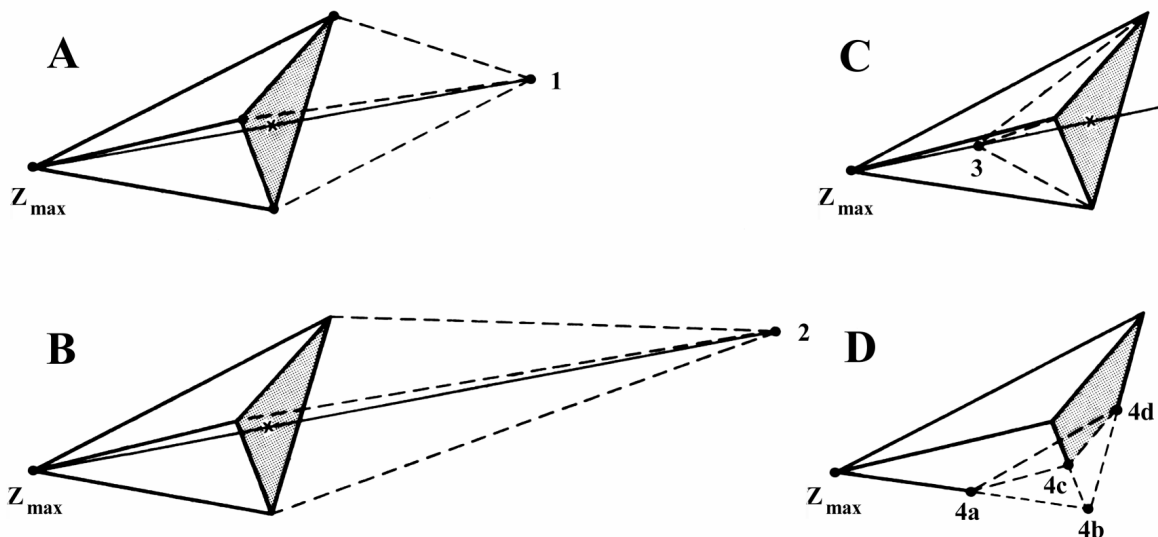


Abbildung 5.16 Mögliche geometrische Operationen des Simplex in drei Dimensionen

Der Ausgangspunkt ist jeweils das Tetraeder mit den durchgezogenen Linien. Der neu entstehende Körper ist straffiert gezeichnet. Der Eckpunkt mit der höchsten Fehlersumme ist mit Z_{\max} bezeichnet (Press et al., 1989).

Von der Fehlersumme abhängig sind die weiteren Operationen möglich (Abbildung 5.16):

A: Der neue Punkt 1 hat einen Fehler, der zwischen den anderen Fehlersummen liegt. Dann wird der neue Punkt 1 beibehalten.

B: Der neue Punkt 1 hat einen geringeren Fehler als der bisher kleinste Fehler. Die Spiegelung wird um einen Faktor a gestreckt und der Fehler von Punkt 2 berechnet. Liefert Punkt 2 einen noch kleineren Fehler, wird er beibehalten, andernfalls Punkt 1 verwendet.

C, D: Durch die Spiegelung wird der Fehler vergrößert. Jetzt wird davon ausgegangen, dass der Simplex sich dem Minimum so weit genähert hat, wie es seine Größe zulässt. Durch eine Volumenverringern wird versucht, den Fehler weiter zu verringern. Entweder wird der Punkt Z_{\max} an die Ebene mit dem Faktor b herangezogen oder, wenn Punkt 3 keine

Verbesserung bringt, alle Kanten des Simplex um den Faktor g kontrahiert. Dabei dient der Punkt mit der kleinsten Fehlersumme (4b) als Fixpunkt.

Nach einer hinreichend großen Anzahl solcher Operationen ist ein Minimum der Fehlerfunktion erreicht. Die Abbruchbedingung, das Unterschreiten der Schranke, richtet sich in der Fassung der Numerical Recipes (Press et al., 1989) nach der Abweichung des größten Fehlers Z_{\max} aus den $n+1$ Datensätzen vom kleinsten Z_{\min} :

$$\frac{Z_{\max} - Z_{\min}}{Z_{\max} + Z_{\min}} < \text{Schranke} \quad (5.18)$$

(5.18) wird aber für den 2D-Fit ersetzt durch:

$$\sum_i p \max_i - p \min_i < \text{Schranke} \quad (5.19)$$

i: Anzahl der freien Parameter

pmax_i: freier Parameter i aus dem Parametersatz mit dem größten Fehler Z_{\max}

pmin_i: freier Parameter i aus dem Parametersatz mit dem kleinsten Fehler Z_{\min}

Dadurch richtet sich das Abbruchkriterium nicht mehr nach den Fehlersummen der Parametersätze, sondern nach deren Konvergenz. Diese Veränderung erzielt wegen der statistischen Verteilung der Fehler (siehe oben) eine wesentlich stabilere Konvergenz. Bei wiederholten Fit-Versuchen mit gleichen Startwerten wird mit hoher Wahrscheinlichkeit das gleiche Ergebnis erreicht.

Aus der Funktionsweise des Simplex lässt sich leicht ableiten, dass die Wahl der Startwerte von entscheidender Bedeutung ist.

Zusätzlich verbessert eine Einschränkung des Parameterraums durch eine untere und obere Schranke den 2D-Fit. Über- oder unterschreitet ein Parameter die Schranken wird ein neuer zufälliger Wert im Bereich des Parameterraums erzeugt.

Die Standardeinstellungen für den Simplex im Kiel-Patch-Programm sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Mit diesen Einstellungen werden für 8 freie Parameter im Markov-Modell in der Regel 200-300 Iterationen und auf einem AMD-Athlon 1500 MHz-Rechner ca. 24 h benötigt.

Spannweite des Simplex für die Erzeugung der Startwerte für die Ratenkonstanten im Markov-Modell	5000 Hz
Maximale Anzahl der Iterationen	1000
Schranke (Parameter für das Abbruchkriterium, siehe (5.19))	$\lambda=1$
n-fache Länge der Simulation gegenüber den gemessenen Daten	$n=10$

Tabelle 5.1 Standardeinstellungen für den Simplex-Algorithmus

b) genetischer Algorithmus (GAlib Bibliothek; Wall, 1996)

Genetische Algorithmen sind stochastische Fit-Methoden, die zum ersten Male in den 70er Jahren von John Holland (1975) und Ingo Rechenberg (1973) eingeführt wurden. Analog zu der evolutionären Entwicklung in der Natur werden die vereinfachten Prinzipien auf einen Such-Algorithmus im n-dimensionalen Raum angewendet.

Ähnlich wie bei dem oben beschriebenen Simplex-Algorithmus wird mit einer Population von Parametersätzen gearbeitet. Der Suchalgorithmus und das zugrunde liegende mathematische Problem sind voneinander unabhängig. Den Algorithmus „interessiert“ nur die Fitness (Güte der Fehlersumme / Likelihood) eines Parametersatzes. Während der Simplex als lokaler Algorithmus mit begrenzt globalen Fähigkeiten beschrieben wird (Charbonneau, 2002), zeigt die Erfahrung, dass der genetische Algorithmus eine höhere Chance hat, das globale Minimum im n-dimensionalen Parameterraum zu finden (Charbonneau, 2002).

In Abbildung 5.17 sind die einzelnen Programmteile eines genetischen Algorithmus in einem Ablaufdiagramm zusammengefasst. Weitere Einzelheiten über diesen genetischen Algorithmus sind der Arbeit von Wall (1996) zu entnehmen. Die nächsten Zeilen gehen auf die einzelnen Schritte und die Besonderheiten des Kiel-Patch-Programms ein.

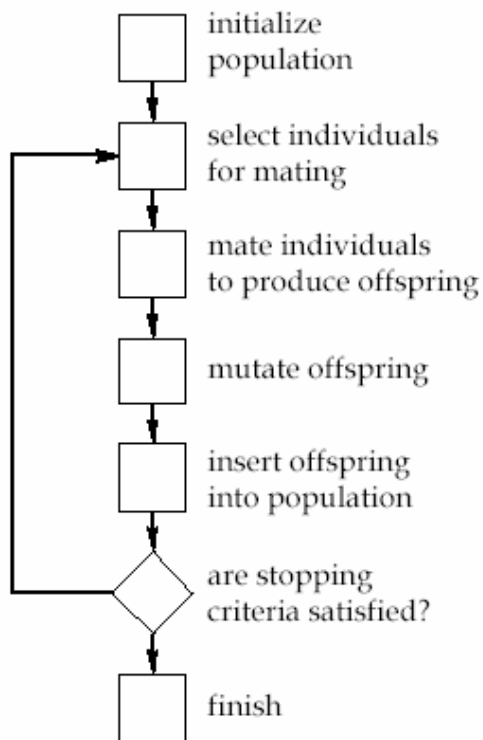


Abbildung 5.17 Ablaufdiagramm eines genetischen Algorithmus (aus Wall, 1996)

Die wesentlichen Schritte sind dargestellt, die tatsächliche Umsetzung der einzelnen Schritte kann aber von Programm zu Programm sehr verschieden sein. Auch existiert kein „offensichtliches“ Abbruchkriterium.

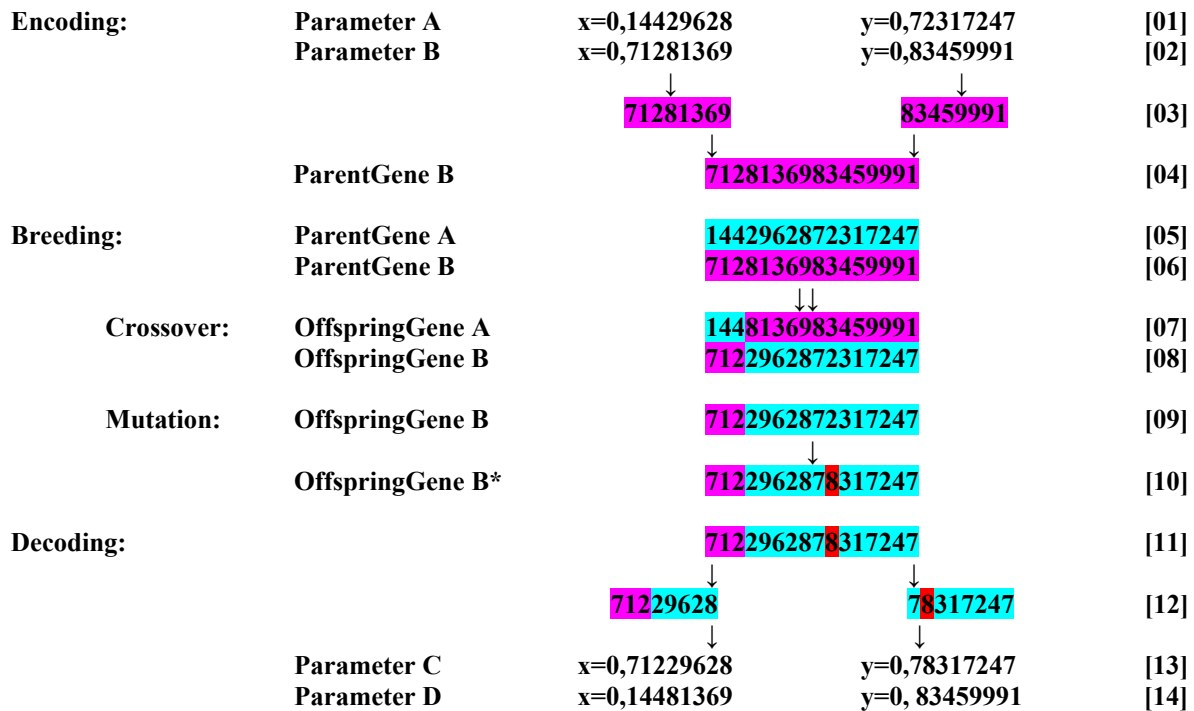


Abbildung 5.18 Schema des genetischen Algorithmus

Dargestellt ist, wie die Parameter kodiert und decodiert sowie durch Crossover und Mutation für die nächste Parametergeneration verändert werden (nach Charbonneau, 2002).

Fit-Parameter:

Die Parametersätze werden, wie in Abbildung 5.18 in Zeile 1-2 zu sehen ist, in Gene umcodiert. In dem Kiel-Patch-Programm kann die Bitzahl pro Parameter und die Anzahl der Parametersätze pro Generation (Populationsgröße) eingestellt werden. Außerdem ist es möglich, den Parameterraum für jeden Parameter nach unten und nach oben zu begrenzen. Der genetische Algorithmus beginnt mit sehr viel mehr Startwerten (durch die Rechenzeit begrenzt) als der Simplex ($n+1$, wenn n die Dimension des Parameterraums ist) und kann dadurch eine etwas bessere Überdeckung des Parameterraumes erreichen.

Bei Fit-Problemen, die einen sehr großen Parameterraum abdecken, können die Parameter auch logarithmisch skaliert werden, so dass langsame und schnelle Ratenkonstanten im Fit gleichmäßig gewichtet werden.

Evaluation der Fitness:

Jeder Parametersatz (Gene eines Individuums) wird durch die Simulation mit Hilfe der 2D-Histogramme wie oben beschrieben ausgewertet und ihm eine Fehlersumme oder Likelihood zugewiesen. Das Programm sortiert die Individuen einer Generation nach ihren Fehlern (Fitness) und entscheidet, welche von ihnen in die nächste Generation übernommen, welche durch Crossover neu entstehen, welche mutiert und welche aussortiert werden. Alle Gene (Parameter), die nicht in die nächste Generation übernommen werden, sind verloren.

Crossover:

Crossover bezeichnet die Methode, wie die Merkmale der Elterngeneration auf die nächste Generation durch Kombination beider Eltern-Gene vererbt werden. Eine Crossover-Rate von 90% besagt, dass 90% der Individuen der nächsten Generation wie in Abbildung 5.18, Zeile

7-8 zu sehen ist, erzeugt werden. Die restlichen 10%, hauptsächlich die mit der größten Fitness, werden aus der Elterngeneration unverändert übernommen.

Mutation:

Der Mechanismus der Mutation ist in Abbildung 5.18 in den Zeilen 9-10 veranschaulicht. Je nach dem betroffenen Bit bewirken die Mutationen große oder kleine Veränderungen in den Parametern. Durch die Mutationsrate wird vorgegeben, wie viele Individuen durch Mutation verändert werden. Die Einstellung der Mutationsrate im Programm ist sehr wichtig für die Konvergenz der Parameter. Für kleine Raten konvergieren die Parameter nur langsam, bei großen Raten wird der Fit-Algorithmus instabil (Charbonneau, 2002).

Abbruchkriterium:

Das Abbruchkriterium wird über die Fitness des besten Individuums einer Generation definiert. Ändert sich die Fitness für n Generationen nicht mehr, so ist das Abbruchkriterium erreicht. Außerdem kann eine maximale Anzahl von auszuwertenden Generationen vorgegeben werden.

Methode:

Zwei unterschiedliche Methoden stehen zur Verfügung: Simple-Genetic-Algorithm, bei dem für jede Generation alle Individuen neu erstellt werden oder der Steady-State-Algorithm, bei dem ein Großteil der Individuen erhalten bleibt und nur ein kleiner Teil durch die oben beschriebenen Mechanismen verändert wird (für eine weiterführende Beschreibung siehe Wall, 1996).

Die Standardeinstellungen für den genetischen Fit im Kiel-Patch-Programm sind in Tabelle 5.2 angegeben. Mit diesen Einstellungen werden für 8 freie Parameter im Markov-Modell 20000-80000 Iterationen und auf einem AMD-Athlon 1800 MHz-Rechner 7-28 Tage benötigt.

Populationsgröße	250
maximale Generationszahl	10000
Mutationsrate	0,010
Crossover-Rate	0,60
Kodierung der Parameter	16 Bit
Abbruchkriterium (Anzahl der Generationen ohne Verbesserung des Konvergenzkriteriums)	50
n-fache Länge der Simulation gegenüber den gemessenen Daten	n=1

Tabelle 5.2 Standardeinstellungen für den genetischen Algorithmus

5.9 Direkter-Zeitreihenfit

Der Direkte-Zeitreihenfit (auch HMM-Fit, Hidden-Markov-Model) ist ein Verfahren, dass die Ratenkonstanten eines vorgegebenen Markov-Modells direkt anpasst, ohne auf die rauschfreie Zeitreihe zurückzugreifen (Fredkin & Rice, 1992; Albertsen, 1994; Albertsen & Hansen, 1994; Farokhi et al., 2000; Venkataramanan et al., 1998a, 1998b, 2000). Die hier benutzte Programmversion (Harlfinger, 2003) ist mit einer Anpassung der Amplitudenhistogramme

durch β -Funktionen kombiniert (Rießner, 1998; Harlfinger, 2003; Schröder et al., 2005), um auch schnelle Ratenkonstanten detektieren zu können.

Bei dem Direkten-Zeitreihenfit wird ausgehend von der Wahrscheinlichkeit, dass sich das Modell zum Zeitpunkt $k-1$ im Zustand j befindet mit einer 1-Schritt Prädiktion (Huang et al., 1990) die Wahrscheinlichkeit geschätzt, dass das Model zwischen $k-1$ und k vom Zustand i in den Zustand j wechselt und mit der Wahrscheinlichkeit verglichen, dass der gemessene Strom $f_i(y_k)$ bei diesem Zustand auftritt (Horn & Lange, 1983; Fredkin & Rice, 1992; Albertsen & Hansen 1994; Klein et al., 1997).

Für die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal sich zum Zeitpunkt k im Zustand i befindet gilt:

$$a_k(i) = \sum_{j=1}^n a_{k-1}(j) p_{ji} f_i(y_k) \quad (5.20)$$

n: Anzahl der Zustände im HMM

$a_{k-1}(j)$: Wahrscheinlichkeit, dass sich das Modell zum Zeitpunkt $(k-1)\Delta t$ im Zustand j befindet

p_{ij} : Wahrscheinlichkeit, dass das Model zwischen $(k-1)\Delta t$ und $k \Delta t$ vom Zustand i in den Zustand j wechselt (Verknüpfung mit den Ratenkonstanten im Modell)

$f_i(y_k)$: normierte Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Strom zum Zustand i gehört (Verknüpfung mit den Messwerten über die Stromverteilung)

Aus den Schätzungen $a_k(i)$ zu allen Zeitpunkten k der Datenreihe wird die Likelihood berechnet:

$$L = \prod_k \sum_i a_k(i) \quad (5.21)$$

Die Ratenkonstanten des Modells werden beim vorliegenden Algorithmus mit einem Simplex-Algorithmus variiert, bis das Maximum der Likelihood erreicht ist.

Beim Fit eines neuen Datensatzes ohne ereignisgesteuerte Datenaufnahmen sind die Anfangsverteilungen der Zustände, also die $a_0(i)$, unbekannt, können aber durch die Steady-State-Verteilungen der Zustände abgeschätzt werden. Der Einfluss der Anfangsverteilung bei langen Zeitreihen ist außerdem zu vernachlässigen (Chung et al., 1991).

Bei ereignisgesteuerter Datenaufnahme, wie z.B. bei den Natriumkanälen, ist jedoch der Zustand zum Zeitpunkt t_0 bekannt. Diese Information lässt sich auswerten, und es gilt für a_0 :

$$a_0(i) = \begin{cases} 1 & \text{für } i = x \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (5.22)$$

x: Anfangszustand des Systems im Markov-Modell zum Zeitpunkt t_0

Unabhängig von Michalek et al. (1999), die dieses Vorgehen beschrieben haben, wurde der Direkte-Zeitreihenfit in Zusammenarbeit mit Harlfinger (2003) um die Tx-Option (entsprechend (5.22), x steht für den Anfangszustand im Markov-Modell) für markierte Daten erweitert. Nach jeder Datenmarkierung für das Eintreten des Ereignisses wird der Fit-Algorithmus mit (5.22) neu initialisiert.

6 Ergebnisse: Leistungen der Fit-Algorithmen

6.1 Direkter-Zeitreehenfit bei ereignisgesteuerten Daten

Die Anpassung von Daten mit dem Direkten-Zeitreehenfit im stationären Gleichgewicht (z.B. Daten von K^+ -Kanälen ohne N-Inaktivierung) und von ereignisgesteuerten Daten (z.B. spannungsgesteuerte Aktivierung von Na^+ -Kanälen) unterscheiden sich in zwei Aspekten hinsichtlich der Wahl der Anfangsbedingungen:

1. Messreihen, die sich im stationären Gleichgewicht befinden, sind sehr lang. Bei ihnen verschwindet der Einfluss der Startbedingungen (Chung et al. 1991). Bei kurzen ereignisgesteuerten Datenreihen wird die Wahl der Anfangsbedingungen jedoch kritisch.
2. Bei Datenreihen im stationären Gleichgewicht bedeutet die Wahl der Gleichgewichtsbesetzung im Mittel die beste Wahl. Ereignisgesteuerte Datenreihen beginnen jedoch fern vom stationären Gleichgewicht. Dann ist die Gleichgewichtsbesetzung im Allgemeinen eine sehr schlechte Wahl.

Nutzt man nun aber die Kenntnis der Anfangsbedingung bei diesen Daten aus, ergibt sich sogar ein Vorteil gegenüber den Messungen im stationären Gleichgewicht.

Hier wird gezeigt, dass die in Abschnitt 5.9 beschriebene neue Tx-Option (Initialisierung im Markov-Zustand x für jeden Zeitreehen-Abschnitt) des Direkten-Zeitreehenfits ermöglicht, ereignisgesteuerte Daten auszuwerten.

Der Test wird anhand einer Zeitreehe durchgeführt, die abschnittsweise mit dem Modell



simuliert wird, jeweils beginnend im C_1 -Zustand. Je fünf dieser Zeitreehen werden mit dem Direkten-Zeitreehenfit mit und ohne T1-Option ($x = 1$ für den C_1 -Zustand) analysiert.

Das Ergebnis ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Es wird der Quotient aus den Ratenkonstanten, die von dem Direkten-Zeitreehenfit gefundenen werden und den zur Simulation benutzten k_{ij} aufgetragen. Mit der T1-Option weichen die ermittelten Parameter k_{ij} nur wenig von den simulierten ab. Dies wird durch die minimale Abweichung von der gepunkteten Gerade angezeigt. Ohne die T1-Option sind die Abweichungen wesentlich gravierender, bis zu 250%. Aufgrund der kleinen Fehlerbalken ist dieses Ergebnis als statistisch signifikant zu bezeichnen.

Weitere Untersuchungen (hier nicht gezeigt) ergeben, dass die Tx-Option immer dann bessere Ergebnisse liefert, wenn die Anzahl der Ereignisse nicht groß gegenüber der Anzahl der simulierten Zeitreehen-Abschnitte wird.

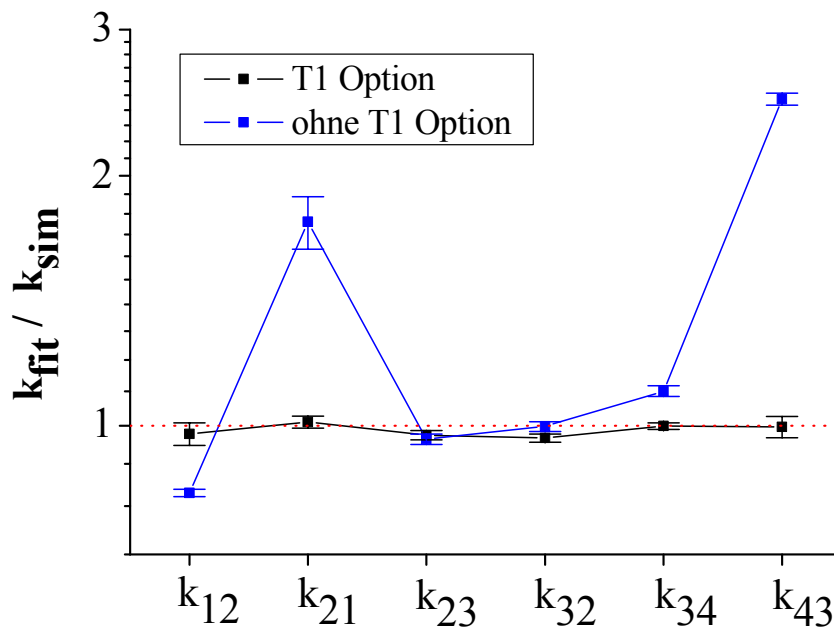


Abbildung 6.1 Anpassung des Direkten-Zeitreehenfits an ereignisgesteuerte Messreihen mit definiertem Anfangszustand

Initialisierung nach jedem Abschnitt (schwarze Kurve) und fehlende Initialisierung des Fit-Algorithmus (blaue Kurve, $n = 10$)

Modell (6.1), Sampling-Frequenz = 200 kHz, Filterfrequenz = 50 kHz, 5000 Simulationen à 50 ms, SNR = 8, beginnend jeweils im C_1 -Zustand

6.2 Fehlerberechnung im 2D-Fit

Es ist für die Fit-Algorithmen des 2D-Fits von zentraler Bedeutung, Abweichungen in den Ratenkonstanten zwischen gemessener und simulierter Zeitreihen anhand des Fehlerkriteriums (siehe Gleichungen (5.15) – (5.17)) unterscheiden zu können. In diesem Abschnitt wird die Berechnung der Abweichungen in den Differenzhistogrammen abhängig von dem gewählten Fehlerkriterium untersucht.

Die Unterscheidung wird dadurch erschwert, dass die Modellfunktion als Ergebnis einer Simulation (Date) selbst mit einem statistischen Fehler behaftet ist. Andere Modell-Zeitreeihen, die mit denselben Ratenkonstanten simuliert werden, ergeben beim Vergleich mit der gemessenen Zeitreeihe unterschiedliche Daten.

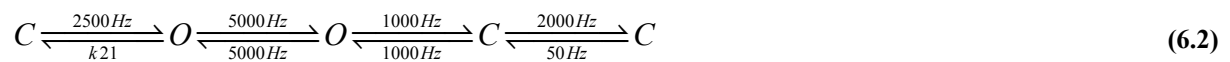
Die Fit-Algorithmen können Ratenkonstanten, die besser zu den gemessenen Daten passen, in der Regel nur dann unterscheiden, wenn sich die Dichteverteilung der Fehlersummen von Anpassungen mit besseren und schlechteren Sätzen von Konstanten nicht vollständig überdecken. Bei einer teilweisen Überdeckung hängt die Unterscheidbarkeit davon ab, welche Daten aus der jeweiligen Dichteverteilung miteinander verglichen werden. Für die Berechnung der Abweichung zwischen gemessener und simulierter Zeitreeihe anhand der 2D-Histogramme sind deshalb zwei Bedingungen zu fordern:

1. Trennbarkeit der Dichteverteilungen für geringe Abweichungen der Ratenkonstanten, um eine hohe Genauigkeit der Fit-Ergebnisse zu erzielen.
2. Trennbarkeit der Dichteverteilungen für große Abweichungen der Ratenkonstanten, damit der Algorithmus nicht so empfindlich von den Startwerten abhängt. Dieses ist für gemessene

Zeitreihen besonders wichtig, weil in komplexen Markov-Modellen passende Startwerte für die Ratenkonstanten nur schwer zu schätzen sind.

Zwei Fälle werden untersucht, um die Leistungen der vier Methoden zur Bestimmung der Abweichung (1-Felder, 9-Felder, 25-Felder mit quadratischer Abweichung und LogLikelihood, Gleichungen (5.15) – (5.17)) bezüglich der Punkte 1 und 2 zu testen.

A) Bestimmung der empirischen Dichteverteilung der Fehler in Abhängigkeit von der Ratenkonstanten k_{21} in dem komplexen Markov-Modell:



Zum Vergleich wird eine Zeitreihe mit $k_{21} = 50$ Hz simuliert und die Abweichungen von ebenfalls simulierten Modellzeitreihen mit verschiedenen k_{21} bestimmt. Während die gemessene Zeitreihe, um die realen Gegebenheiten bei einer Messung nachzubilden, nur aus einer einzelnen Simulation besteht, werden für ein gewähltes k_{21} je 5000 Simulationen durchgeführt. Für jede dieser Simulationen wird eine Date (Likelihood oder Quadratischer Fehler) aus dem Vergleich mit der „gemessenen“ Zeitreihe bestimmt. Die Dichtefunktionen der Daten sind für verschiedene vorgegebene k_{21} den Histogrammen der Abbildung 6.2 zu entnehmen.

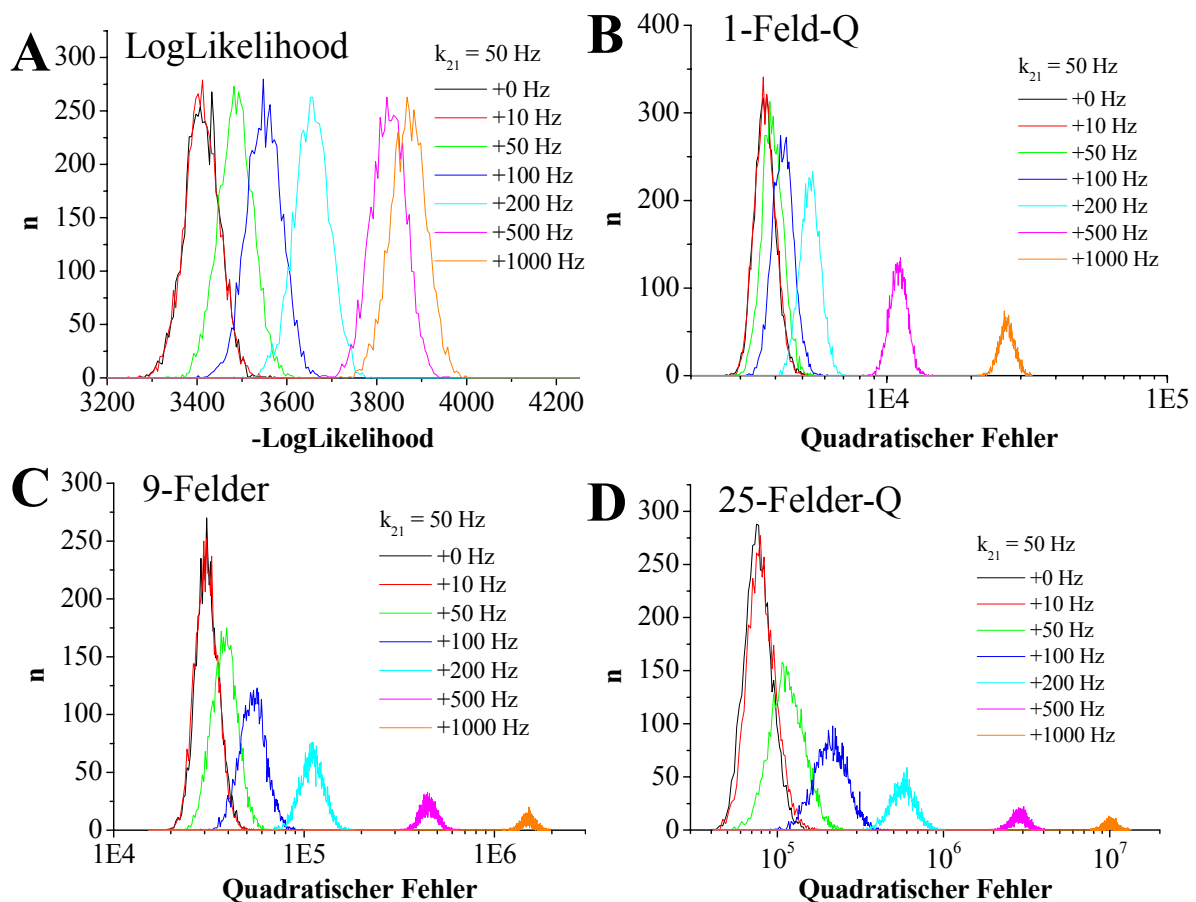


Abbildung 6.2 Darstellung der Dichteverteilung der Fehlersumme für unterschiedliche k_{21}
 Untersucht werden die vier Methoden zur Fehlerberechnung (A)-(D) (Erklärung im Text)
 Modell: (6.2), Sampling-Frequenz = 200 kHz, Filterfrequenz = 50 kHz, 1000 Abschnitte à 25 ms, SNR = 8

B) Praxisnahe Anpassung des Modells



mit dem 2D-Fit. Es wird eine „experimentelle Zeitreihe“ durch Simulation aus diesem Modell erzeugt. (250 s). Diese Zeitreihe wird 10-mal mit dem 2D-Fit angepasst. Die Startwerte für dieses Modell werden dabei jedes Mal neutral gewählt ($k_{ij} = 500$ Hz). Die Variabilität der Ergebnisse entsteht dadurch, dass die Zeitreihe der Modellfunktion im Fit-Algorithmus durch Simulation erzeugt werden muss. Als Maß für den Erfolg der Anpassung dient der Quotient aus den Ratenkonstanten, die der Fit ergibt und denen der „experimentellen“ Zeitreihe (Abbildung 6.3).

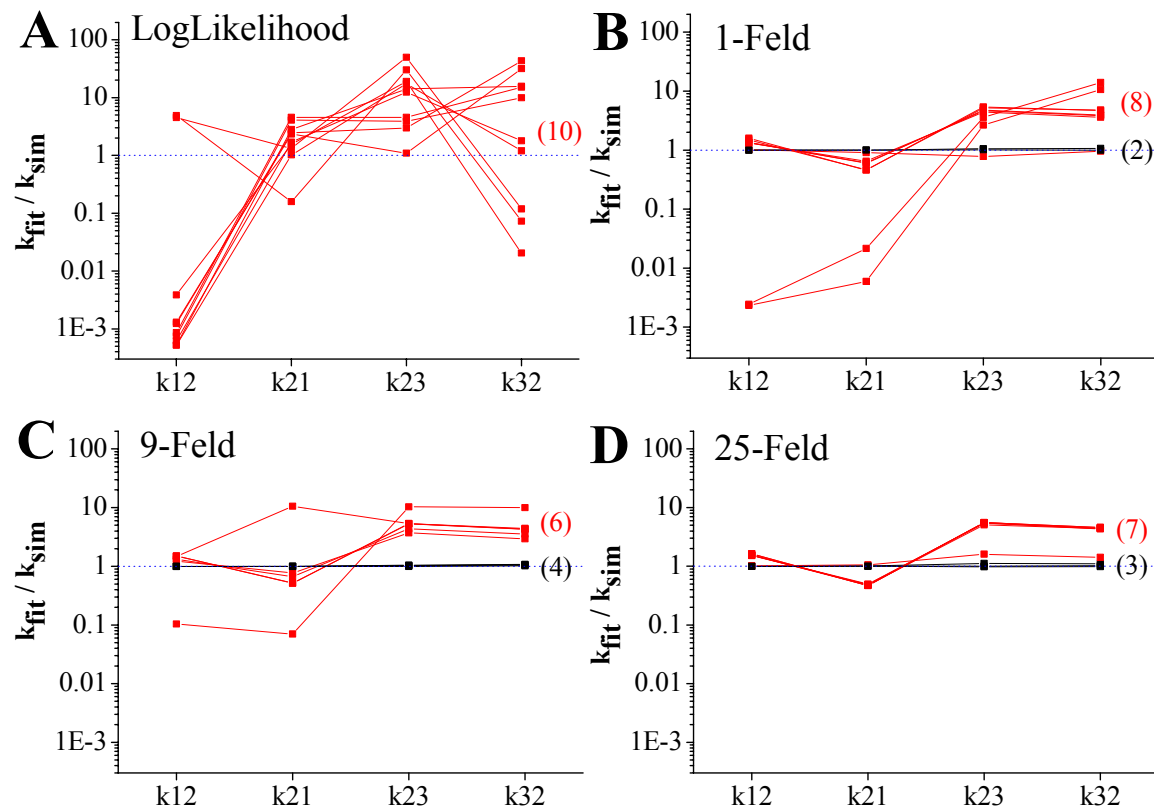


Abbildung 6.3 Fitergebnisse für eine Zeitreihe mit dem 2D-Fit (Simplex-Algorithmus), die wiederholt mit dem Modell (6.3) simuliert wird

(A) – (D) unterscheiden sich durch die angewendete Berechnung der Abweichung im 2D-Fit. Aufgetragen ist der Quotient aus den ermittelten Ratenkonstanten des 2D-Fits und denen der simulierten Modell-Zeitreihe. Richtige Ergebnisse sind schwarz, deutlich abweichende Ergebnisse rot dargestellt (in Klammern die jeweilige Anzahl, $n = 10$).

zu A)

Die beste Trennung der Dichteverteilung im gesamten Bereich der k_{21} weist die Fehlerberechnung der 25-Felder-Methode auf (Abbildung 6.2D). Die Unterschiede zur 9-Felder-Methode (Abbildung 6.2C) sind aber sehr gering. Die Fehlerbestimmung mit der LogLikelihood-Methode nach Magleby und Weiss (1990a; Abbildung 6.2A) zeigt eine sehr gute Trennung im Bereich kleinerer Abweichungen der k_{21} , bei großen Abweichungen überlappen sich die Verteilungen jedoch stark. Die Charakteristik der 1-Feld-Methode (Abbildung 6.2B) ist dagegen genau umgekehrt zu der LogLikelihood-Methode.

Insgesamt sind die Kurven der empirischen Dichteverteilungen aus Abbildung 6.2 annähernd glatt und scheinen die asymptotischen Dichteverteilungen erreicht zu haben. Damit ist die Anzahl der simulierten Zeitreihen mit $n = 5000$ in Bezug auf die Rechenzeit ausreichend.

Eine fast vollständige Trennung von der Dichteverteilung der k_{ij} der Messreihe ist erst bei $k_{12} = 200$ Hz erreicht (Abbildung 6.2A, C, D). Eine höhere Genauigkeit für k_{12} als ca. 100 Hz Abweichung nach oben ist mit dem 2D-Fit demnach nicht zu erwarten.

zu B)

In Abbildung 6.3 ist zu sehen, dass bei diesem Test der 2D-Fit mit der 9- und 25-Felder-Methode (D) am besten funktioniert. In 4 bzw. 3 von 10 Versuchen wird die Zeitreihe richtig angepasst. Die Fehler für die 25-Felder-Methode bei den erfolglosen Versuchen sind kleiner als in A, B und C.

Mit der 1 Feld-Methode werden nur 2 richtige Lösungen gefunden, und bei den erfolglosen sind größere Fehler der Ratenkonstanten zu finden. Mit der LogLikelihood-Methode findet der 2D-Fit unter diesen Bedingungen nicht eine richtige Lösung, die Fehler sind im Vergleich zu allen anderen Methoden am größten.

Aus A und B folgen für den Einsatz des 2D-Fits 3 Aussagen:

1. 9- und 25-Felder-Methode für die Fehlerberechnung sind dem LogLikelihood in Test A und B bis auf die Unterscheidung kleiner Abweichungen in den k_{21} in A deutlich überlegen.

Die 9- und die 25-Felder-Methode stellt als Mittelungsprozess im 2D-Histogramm einen Tiefpassfilter dar. Deswegen besteht die Möglichkeit, dass schnelle Ratenkonstanten mit dem 2D-Fit nicht erkannt werden. Aus dieser Überlegung heraus wird die 9-Felder-Methode bei weiteren Tests verwendet.

Die Benutzung der von Magleby und Weiss (1990a) vorgeschlagenen LogLikelihood reduziert den 2D-Fit mit Simplex-Algorithmus auf ein rein lokales Fit-Verfahren (kleine Abweichungen der k_{ij} werden gut unterschieden). Für eine globalere Fitstrategie eignet sie sich nicht.

Dieses Beispiel belegt sehr anschaulich, dass ein LogLikelihood-Test nicht grundsätzlich die beste Wahl ist. Es hängt stark von dem Datenmaterial ab, ob der LogLikelihood-Test oder ein Chi-Quadrat-Test (1-, 9-, 25-Felder-Methode) angewendet werden sollte (Milescu et al., 2005). Ein Vergleich beider Methoden ist der Literatur zu entnehmen (Singh & Sutradhar, 1989; Ganesan & Sherman, 1994).

Ein weiteres Problem bei der Verwendung des LogLikelihood (hier nicht gezeigt) kann dadurch auftreten, dass nicht besetzte Bins aus den Histogrammen der simulierten Daten nicht in die Fehlersumme eingehen (siehe Gleichung (5.15)), da der Logarithmus aus null nicht definiert ist. Wenn die Besetzungen der Histogramme von simulierten und gemessenen Daten stark voneinander abweichen, tritt dieser Fall bei vielen Bins ein. Das kann dahin führen, dass die LogLikelihood trotz divergierender Histogramme besser wird.

2. Die erreichbare Genauigkeit mit dem 2D-Fit ist durch die Lage der Dichteverteilungen der Fehlersummen beschränkt.

Für die sehr langsame Ratenkonstante k_{21} (50 Hz) in dem Modell (6.2) kann maximal ein Ergebnis im Bereich von 0-150 Hz erwartet werden. Für schnellere Ratenkonstanten, die im Modell mehr bestimmend sind, ist der relative Fehler geringer (siehe z.B. Abbildung 6.3).

3. Schon bei dem relativ einfachen Modell (6.3) mit 4 freien Parametern und neutralen Startwerten stößt der Simplex-Fit-Algorithmus an seine Grenzen (Abbildung 6.3A, B, C, D). Es muss damit gerechnet werden, dass ein Teil der Ergebnisse falsch ist. Eine Verbesserung für eine globale Suche stellt der genetische Algorithmus dar, der in den folgenden Abschnitten dieses Kapitels immer dann eingesetzt wird, wenn die Ergebnisse mit dem Simplex falsch sind.

6.3 Auswirkungen der Länge der simulierten Zeitreihe auf den 2D-Fit

In diesem Abschnitt wird untersucht, wie sich das Verhältnis der Länge von simulierter zur gemessenen Zeitreihe im 2D-Fit auswirkt.

Durch die Simulation längerer Zeitreihen (mehr Ereignisse) nimmt die relative Breite der Dichteverteilung der Fehlersummen ab (Magleby & Weiss, 1990a). Für unendlich lange Zeitreihen strebt die Überlappung von Verteilungen mit unterschiedlichen Ratenkonstanten k_{ij} gegen 0.

Mit dem 2D-Fit mit Simplex-Algorithmus wird eine Zeitreihe untersucht, die mit dem Modell



simuliert wird („gemessene Zeitreihe“). Im 2D-Fit haben die simulierten Zeitreihen zum Vergleich eine x-fache Länge der Messreihe ($x = 1, 10, 100$). Die gemessene Zeitreihe wird für jedes x 10mal ($n = 10$) angepasst. Die Normierung der gemessenen auf die simulierte Zeitreihe (Abschnitt 5.8) erfolgt über die Länge der Datenreihe. Die magenta dargestellten Lösungen in Abbildung 6.4 ergeben eine Vertauschung der Zustände C_1 und C_3 . Dieses würde bei stationären Zeitreihen keinen Unterschied machen, ist aber bei ereignisgesteuerten Prozessen nicht zulässig.

Der Quotient aus den Ratenkonstanten aus dem 2D-Fit und denen der Messreihe (k_{fit} / k_{sim}) ist in Abbildung 6.4 aufgetragen. Die Abweichung des Quotienten k_{fit} / k_{sim} eines Modells von der Geraden $y = 1$ spiegelt sich in den einzelnen Fehlersummen wieder, deren Mittelwerte in Tabelle 6.1 abzulesen sind.

Verhältnis: simulierte Zeitreihe / Referenzreihe	1	10	100
Anzahl der durchschnittlich simulierten Ereignisse	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$
Anzahl der richtigen Ergebnisse	1	4	3
Fehlersumme (normiert)	2,42	$1,20 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,06$
Anzahl der Ergebnisse mit vertauschtem Modell (*)	0	1	1
Anzahl der falschen Ergebnisse	9	5	6
Fehlersummen (normiert)	140 ± 20	26 ± 12	15 ± 3

Tabelle 6.1 Ergebnisse aus Abbildung 6.4

Die Anzahl der Ereignisse in der Messreihe beträgt $1,82 \cdot 10^5$. Die Fehlersummen sind auf die kleinste Summe normiert.

*Umkehr der Zustände im Markov-Modell: Die Modelle $C_1 \xrightleftharpoons[2000\text{Hz}]{2000\text{Hz}} O_2 \xrightleftharpoons[200\text{Hz}]{200\text{Hz}} C_3$ und $C_1 \xrightleftharpoons[200\text{Hz}]{200\text{Hz}} O_2 \xrightleftharpoons[2000\text{Hz}]{2000\text{Hz}} C_3$ sind für ereignisgesteuerte Daten nicht äquivalent.

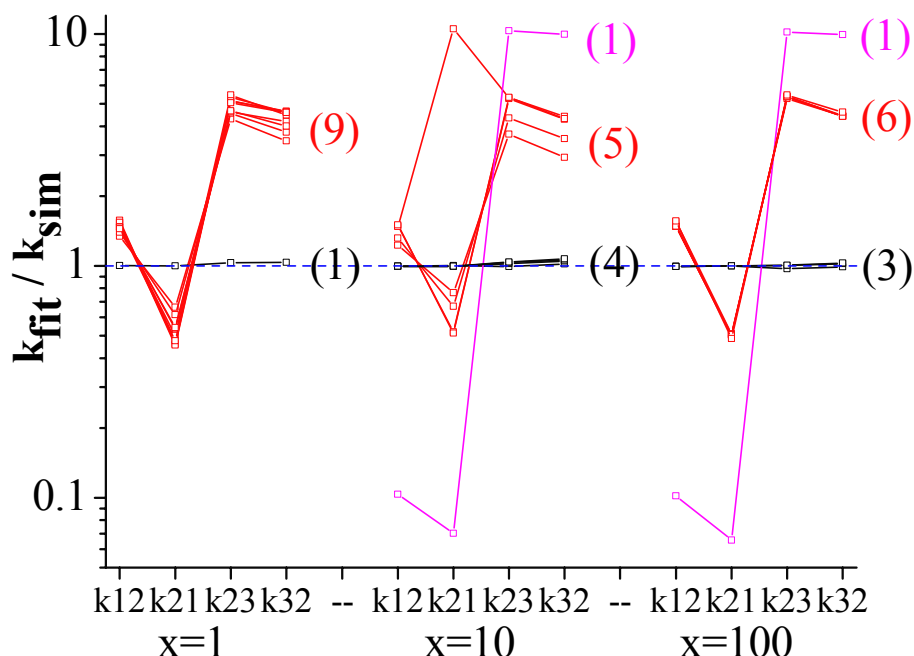


Abbildung 6.4 Ergebnisse des 2D-Fits mit dem Simplex-Algorithmus in Abhängigkeit von der Länge der simulierten Zeitreihen (x -fache Länge der gemessenen Zeitreihe, $x = 1, 10, 100$.)

Richtige Ergebnisse sind schwarz, abweichende Ergebnisse rot und Ergebnisse mit Umkehr der Zustände im Markov-Modell magenta dargestellt. Parameter einer Lösung sind durch Linien verbunden.

Simuliertes Modell: (6.4), $f_{\text{Sampling}} = 200 \text{ kHz}$, $f_{\text{Filter}} = 50 \text{ kHz}$, 5000 Abschnitte à 25ms, SNR = 8, Fehlerberechnung: 9-Felder-Methode

Das Ergebnis unter Berücksichtigung der Statistik für $n = 10$ zeigt, dass bis zu einer Mindestlänge der simulierten Zeitreihe (hier von $x = 1$ auf $x = 10$), die Anzahl der richtigen Ergebnisse des Simplex-Algorithmus stark ansteigt. Auch die Genauigkeit der richtigen Lösungen verbessert sich (Fehlersummen in Tabelle 6.1).

Von $x = 10$ auf $x = 100$ lässt sich nur noch eine unwesentliche Verbesserung der Genauigkeit der Ratenkonstanten erzielen (Fehlersummen der richtigen Ergebnisse in Tabelle 6.1).

Für die Benutzung des 2D-Fits mit dem Simplex-Algorithmus folgt:

1. Die Anzahl der richtigen Ergebnisse des Simplex lässt sich im Rahmen der zur Verfügung stehenden Rechenzeit nur bedingt durch die Länge der simulierten Zeitreihe verbessern, da die Rechenzeit des Computers im 2D-Fit fast proportional mit den Längen der simulierten Zeitreihen ansteigt.

Eine Länge der simulierten Zeitreihe, bei der das Verhältnis von Fitergebnissen zur Rechenzeit günstig ist, lässt sich durch dieses Experiment auf $2 \cdot 10^6$ Ereignisse ($x = 10$) abschätzen.

2. Die Genauigkeit des Simplex ist bei richtigen Ergebnissen sehr hoch. Die Abweichung der Ratenkonstanten von denen der Messreihe liegt dann bei unter 5 % (Abbildung 6.4).
3. Die erfolglosen Fitversuche lassen sich durch eine 15- bis 70-fach höhere Fehlersumme ausschließen, wenn etwas Erfahrung mit dem Verhalten des betreffenden Systems vorhanden ist.

6.4 Grenzen des 2D-Fits

In diesen Abschnitt werden Zeitreihen unter Grenzbedingungen mit dem 2D-Fit analysiert. Die Grenzbedingungen beziehen sich auf Parameter der gemessenen Zeitreihe, die die Modell-Analyse limitieren. Hier soll getestet werden, bis zu welchen Größen der folgenden Parameter eine Modell-Analyse sinnvoll erscheint:

A) schnelle Ratenkonstanten (Abbildung 6.5)

Der Tiefpassfilter, der bei Patch-Clamp-Messungen zum Einsatz kommt, beschränkt bei einfachen Analyseverfahren die Detektion von Ratenkonstanten, die größer sind als seine Filterfrequenz. Hier wird gezeigt, dass der 2D-Fit in der Lage ist, bei einer Filterfrequenz von 50 kHz die Ratenkonstanten bis zu der Grenze der getesteten Frequenzen von 500 kHz zu bestimmen.

Um dies zu zeigen, werden mit einem einfachen symmetrischen $C \xleftrightarrow[k_{21}]{k_{12}} O$ -Modell Testzeitreihen („gemessene Daten“) simuliert und mit dem 2D-Fit ausgewertet. Die Ratenkonstanten k_{ij} werden von 2,5 kHz bis auf 500 kHz erhöht. Die obere Grenze ergibt sich aus der Limitierung durch die Rechenzeit, da die Simulationszeit mit der Anzahl der Ereignisse fast linear verknüpft ist.

B) Signal-Rausch-Verhältnis (Abbildung 6.7)

Entscheidender Faktor für die Analyse von Patch-Clamp-Daten ist das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR), das durch die Auswerteprogramme gefordert wird. Ein gegebenes SNR macht den Einsatz eines bestimmten Tiefpassfilters in der Messtechnik erforderlich, wodurch die Erkennung von schnellen Ereignissen beschränkt ist.

In diesem Test kann gezeigt werden, dass der 2D-Fit bei dem $C \xleftrightarrow[2500\text{Hz}]{2500\text{Hz}} O$ -Modell in der Lage ist, ab einem SNR von 0,5 die Ratenkonstanten mit einem Fehler $< 20\%$ zu bestimmen.

Der Test wird mit festen k_{ij} wie in A ausgeführt, mit dem Unterschied, dass das Signal-Rausch-Verhältnis bis auf 0,25 erniedrigt wird.

C) minimale Besetzungs-Wahrscheinlichkeit der leitenden Niveaus (Abbildung 6.8)

Die Besetzungs-Wahrscheinlichkeit im leitenden Niveau ist bei Messungen mit spannungsabhängigen Natriumkanälen sehr klein (zum Teil $< 1\%$). Dieses führte in meiner Diplomarbeit (Huth 1999) dazu, dass die Datenreihen mit dem 1D-Fit (Blunck et al. 1998) und dem HMM-Fit (Albertsen & Hansen 1994; Farokhi et al. 2000) praktisch nicht mehr auszuwerten sind.

Hier sieht man, dass mit dem $C \xrightleftharpoons[5000\text{Hz}]{k_{12}} O$ -Modell bei Besetzungswahrscheinlichkeit bis zu 0,01 % die Ratenkonstanten mit einem Fehler von <10% angepasst werden können.

Der Test wird mit dem $C \xrightleftharpoons[5000\text{Hz}]{k_{12}} O$ -Modell wie in A durchgeführt. Die Ratenkonstante k_{12} wird von 500 Hz bis auf 1 Hz erniedrigt, wodurch die geringen Offenwahrscheinlichkeiten erreicht werden.

D) minimale Anzahl der Ereignisse (Abbildung 6.9)

Die Analyse von Übergängen im Markov-Modell erfordert eine bestimmte Anzahl von Ereignissen, um die Statistik in diesem Prozess aufzudecken. Diese (fast) triviale Aussage gewinnt dadurch Gewicht, dass es z.B. für Messungen an Natriumkanälen sehr schwer sein kann, die geforderte Anzahl der Ereignisse zu messen.

In diesem Test zeigt sich, dass der 2D-Fit für das einfache $C \xrightleftharpoons[2500\text{Hz}]{2500\text{Hz}} O$ -Modell ca. 120 Ereignisse benötigt, um die Ratenkonstanten mit einem Fehler <10 % zu identifizieren. Der Test wird an abschnittsweise simulierten Testreihen ausgeführt. Auf jeden Abschnitt mit 10000 Abtastpunkten entfallen im Schnitt 60 Ereignisse. Die Anzahl der simulierten Abschnitte der Testreihen („gemessene Daten“) wird von 1000 bis auf einen reduziert.

Zum Vergleich mit dem 2D-Fit werden die folgenden in diesem Labor benutzten Analyse-Programme verwendet und dieselben Zeitreihen analysiert:

- 1D-Exponential-Fit (siehe Abschnitt 5.6)

Die Fehler der Anpassung sind in den Diagrammen jeweils vernachlässigbar klein (kein Fehlerbalken).

- HMM-Fit (Direkter-Zeitreihenfit, siehe Abschnitt 5.9)

Die Fehler der Anpassung sind in den Diagrammen jeweils vernachlässigbar klein (kein Fehlerbalken).

- HMM-Fit mit β -Verteilungen (Direkter-Zeitreihenfit mit β -Verteilung, siehe Abschnitt 5.9)

Für die Testpunkte, bei denen der 2D-Fit mit Simplex-Algorithmus aufgrund des Algorithmus keine richtige Lösung findet, wird der genetische 2D-Fit verwendet. Dieses Vorgehen spart die um den Faktor 10-100 größere Rechenzeit des genetischen Algorithmus für einen Teil der Punkte. Eine Wiederholung der Anpassung mit dem genetisch Fit zur Fehlerbestimmung der Ergebnisse kann wegen dieses Zeitaufwandes nicht durchgeführt werden.

zu A)

In Abbildung 6.5 ist zu erkennen, dass der 1D-Fit (grüne Kurve) und der HMM-Fit (schwarze Kurve) nicht in der Lage sind, schnelle Ratenkonstanten zu erkennen. Schon deutlich vor der Filtergrenze werden die Konstanten der vorgegebenen Zeitreihe systematisch zu niedrig eingeschätzt. Dieses veranschaulicht die Schwierigkeiten bei der Analyse schnellen Schaltens (siehe auch Farokhi, 2002).

Der HMM-Fit mit Anpassung der Amplitudenhistogramme (β -Fit, violette Kurve) kann die k_{ij} jenseits der Filtergrenze genau bestimmen. Die Abweichung in den kleineren Ratenkonstanten lässt sich dadurch erklären, dass in diesem Bereich die Stromverteilungen für den β -Fit zu wenig Information beinhalten (Harlfinger, 2003). Die Fehler wirken sich auf den zweiten Teil, den HMM-Fit aus, der sonst ohne den β -Fit langsame k_{ij} besser anpassen kann (schwarze Kurve).

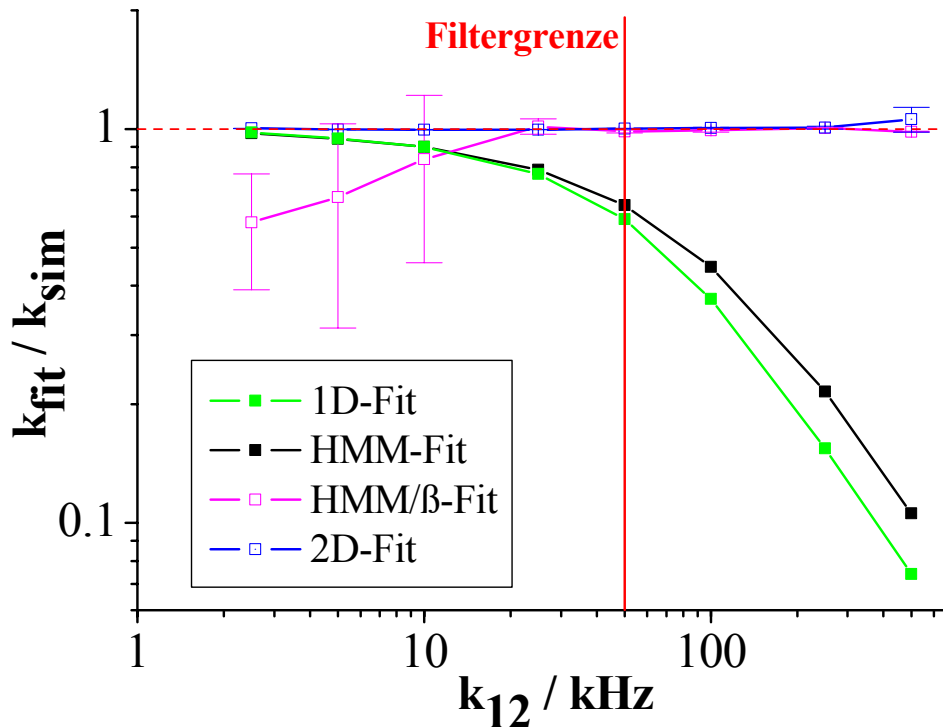


Abbildung 6.5 Vergleich von Analyse-Programmen hinsichtlich schneller Übergangsraten an simulierten Zeitreihen

Ergebnisse in Abhängigkeit von der Größe der Ratenkonstanten k_{12} und k_{21} , Abtastfrequenz $f_a=200$ kHz, Filterfrequenz $f_f=50$ kHz (rote vertikale Linie). Modell: $C \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O$, $k_{12}=k_{21}$, $n=5$ für den HMM/B-Fit und den 2D-Fit, Länge der Zeitreihe $t_s = 50s$, SNR = 8, Fehlerberechnung: 9-Felder-Methode

Der 2D-Fit ist in der Lage, über das gesamte Frequenzspektrum die Ratenkonstanten richtig anzupassen (blaue Kurve). Die Abweichungen in dem Punkt bei 500 kHz sind sehr wahrscheinlich ein Startwertproblem des 2D-Fits mit Simplex-Algorithmus, können aber wegen der Rechenzeit nicht mit dem genetischen Fit überprüft werden.

Nicht einsichtig ist, warum ein Verfahren, das auf einem Schwellenwertdetektor (hier der Hinkley-Detektor, Abschnitt 5.4) basiert, in der Lage ist schnelle Ratenkonstanten zu erkennen.

Es ist jedoch so, dass ein Teil der Übergänge so langsam ist (im Schwanz der Verteilung), dass sie vom Filter aufgelöst werden können. Bei einer hinreichend großen Anzahl der Übergänge kann aus den langsamen Übergängen in der Theorie die gesamte Verteilung rekonstruiert werden. In der Praxis ist dies jedoch nicht immer möglich, da meistens die Anzahl der Übergänge zu gering ist.

Magleby und Weiss (1990a) haben bereits die Erkennung von Ratenkonstanten jenseits der Filterfrequenz mit einem Half-Amplitude-Threshold-Filter für den 2D-Fit unter Benutzung von Simulationen beschrieben. Die Erklärung hierfür war, dass sich die Fehler des Detektors (missed events) in der gemessenen und in der simulierten Zeitreihe gegenseitig aufheben.

Die Berücksichtigung der missed events durch Korrekturalgorithmen (Ball & Sansom, 1989; Crouzy & Sigworth, 1990; Hawkes et al., 1992; Draber & Schulze, 1994a; Blunck et al., 1998), bewirkt eine nur geringe Verbesserung im Gegensatz zum Simulationsansatz und wird hier deshalb nicht berücksichtigt.

Abbildung 6.6 zeigt, dass schon geringe Veränderungen in den Ratenkonstanten bei schnellen Übergängen zu deutlichen Abweichungen in den Differenzhistogrammen führen. Dieses demonstriert, dass der 2D-Fit auch im Bereich schneller Ratenkonstanten empfindlich genug ist, um die Ratenkonstanten richtig zu bestimmen.

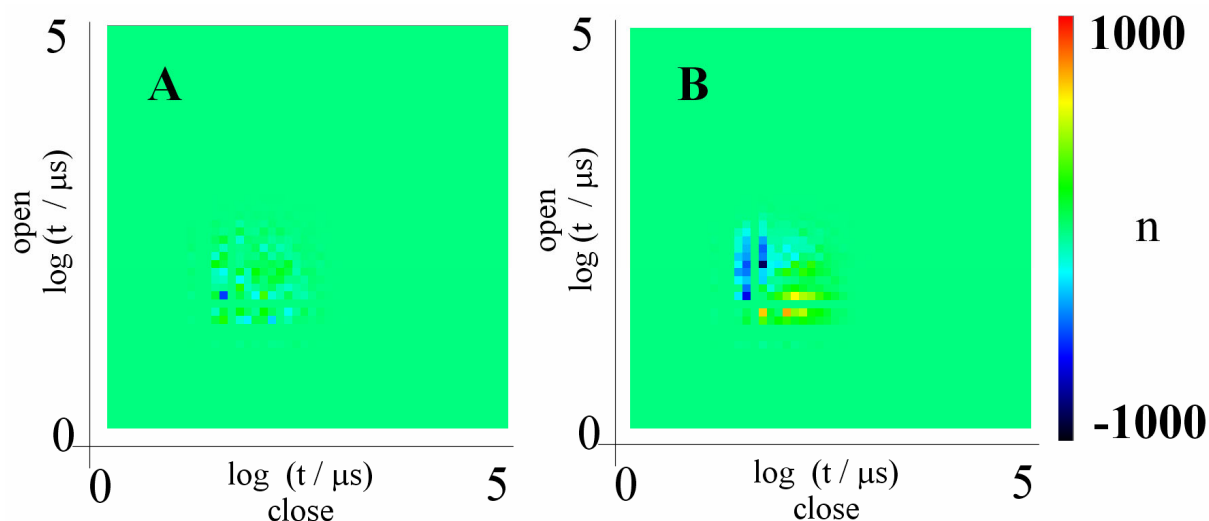


Abbildung 6.6 2D-Differenzhistogramme

(A) Modell I (simuliert) – Modell I (gemessen), (B) Modell I (simuliert) – Modell II (gemessen)

Modell I: $C \xrightleftharpoons[200\text{kHz}]{200\text{kHz}} O$, Modell II: $C \xrightleftharpoons[200\text{kHz}]{205\text{kHz}} O$

zu B)

In Abbildung 6.7 ist zu sehen, dass der HMM-Fit (schwarze Kurve) sehr empfindlich auf verrauschte Daten reagiert. Die Messdaten, die mit diesem HMM-Programm (Abschnitt 5.9) analysiert werden, sollten ein SNR von 4 aufweisen. Durch die Modellierung des Rauschens könnte sich grundsätzlich eine Verbesserung erreichen lassen (Venkataramanan et al., 1998a; Venkataramanan et al., 1998b).

Der 1D-Fit zeigt (grüne Kurve), dass ein Verfahren, das mit einem Detektor arbeitet, etwas robuster gegenüber Rauschen ist, zumindest bei k_{ij} deutlich unter der Filterfrequenz. Hier ist ein SNR = 2 zu fordern.

Der 2D-Fit mit genetischem Algorithmus (hellblaue Kurve) benötigt nur ein SNR = 0,5 für die Bestimmung der Ratenkonstanten mit einem tolerablen Fehler bei diesem Modell. Hier ist anzunehmen, dass die Fehler des Detektors (false alarms, missed events) bei gemessenen Daten und simulierten Daten auf die gleiche Weise entstehen und sich so, eine ausreichende Anzahl von Daten vorausgesetzt, bis zu einem gewissen Grad gegenseitig aufheben.

zu C)

Die Offenwahrscheinlichkeit wird in diesem Test dadurch geändert, dass im Modell in der Legende von Abbildung 6.8 die Dauer des Offenzustandes konstant gehalten wird und über k_{12} die Pausen in C verlängert werden.

In Abbildung 6.8 ist zu sehen, dass sowohl der HMM-Fit (schwarze Kurve) als auch der 2D-Fit mit genetischem Algorithmus (hellblaue Kurve) Offen-Wahrscheinlichkeiten unter 0,1% tolerieren. Dieses ist sicher ausreichend für die Analyse von unversehrten Natriumkanälen.

Für den 2D-Fit ist bei diesem Test die Normierung von gemessener und simulierter Zeitreihe auf die Zeit und nicht auf die Anzahl der Events (Magleby & Weiss, 1990a) von großer Bedeutung. Eine Modellzeitreihe könnte sehr viele Ereignisse enthalten, die bei der Normierung auf die Anzahl der wenigen Ereignisse der Messreihe trotzdem nicht ins Gewicht fallen würden.

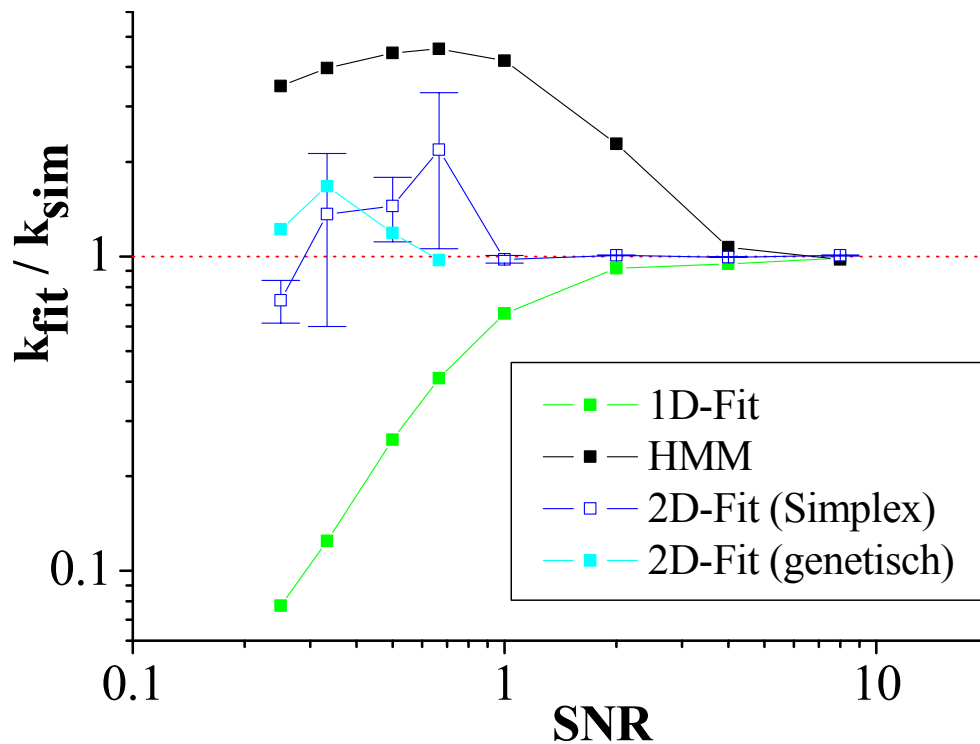


Abbildung 6.7 Vergleich von Analyse-Programmen hinsichtlich des Signal-Rauschverhältnisses (SNR) an simulierten Zeitreihen

Modell: $C \xrightleftharpoons[2500\text{Hz}]{2500\text{Hz}} O$, $n=5$ für den 2D-Fit (Simplex), Abtastfrequenz $f_a = 200$ kHz, Filterfrequenz $f_f = 50$ kHz, Länge der Zeitreihe $t_s = 50$ s, Fehlerberechnung: 9-Felder-Methode

zu D)

In Abbildung 6.9 ist zu sehen, dass sowohl der HMM-Fit (schwarze Kurve als auch der 2D-Fit (blaue Kurve) ca. 120 Ereignisse benötigen (=20000 Punkte der Zeitreihe), um die Ratenkonstanten im $C \xrightleftharpoons[2500\text{Hz}]{2500\text{Hz}} O$ -Modell hinreichend genau für Patch-Clamp-Messungen zu bestimmen. Das heißt, dass beide Verfahren etwa in der Lage sind, relativ kurze Zeitreihen erfolgreich zu analysieren und gibt einen Anhaltspunkt für Messreihen.

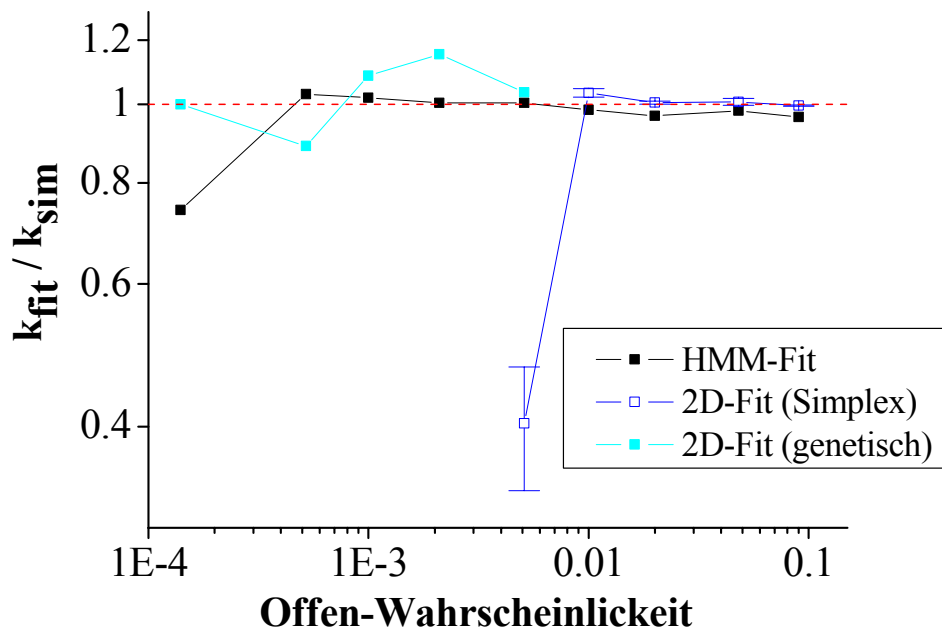


Abbildung 6.8 Vergleich von 2D-Fit und HMM-Fit hinsichtlich einer geringen Offenwahrscheinlichkeit. Die geringe Offenwahrscheinlichkeit wird durch die Verkleinerung der Ratenkonstanten k_{12} in folgendem Modell erreicht: $C \xrightleftharpoons[5000\text{Hz}]{k_{12}} O$, $n=5$ für den 2D-Fit (Simplex), Abtastfrequenz $f_a = 200$ kHz, Filterfrequenz $f_f = 50$ kHz, Länge der Zeitreihe $t_s = 50$ s, SNR = 8, Fehlerberechnung: 9-Felder-Methode

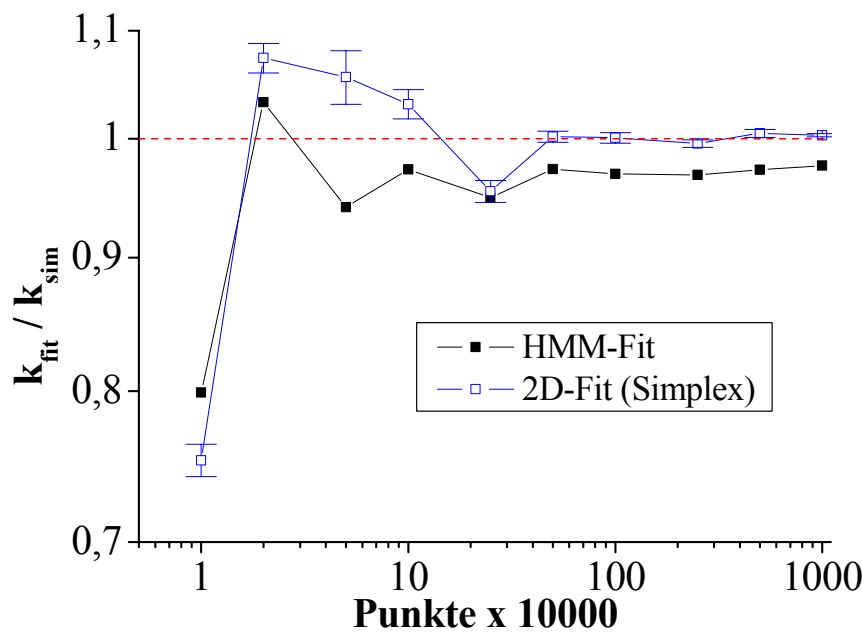


Abbildung 6.9 Vergleich von 2D-Fit und HMM-Fit hinsichtlich der Kürze einer Zeitreihe, bzw. wie wenig Ereignisse für einen erfolgreichen Fit nötig sind

Modell: $C \xrightleftharpoons[2500\text{Hz}]{2500\text{Hz}} O$, $n=5$ für den 2D-Fit, 10000 Punkte = 50 ms (1 Abschnitt der Zeitreihe) entsprechen im Mittel 60 Ereignissen, Abtastfrequenz $f_a = 200$ kHz, Filterfrequenz $f_f = 50$ kHz, SNR = 8, Fehlerberechnung: 9-Felder-Methode

Zusammenfassung dieses Abschnittes:

1. Unter den hier getesteten Bedingungen in A, B, C und D ist der 2D-Fit mit genetischem Algorithmus den anderen Analyseverfahren gleichwertig und im Gegensatz zu den anderen Verfahren sogar über einen großen Frequenzbereich der k_{ij} (A) einsetzbar. Bezüglich des Signal-Rausch-Verhältnis ist der 2D-Fit den anderen Verfahren sogar sehr deutlich überlegen (B).

Die Rechenzeit liegt aber etwa um den Faktor 100 über der des HMM-Fits. Das schränkt die Anwendbarkeit des 2D-Fits bei den heutigen Rechnerleistungen jedoch ein.

2. In A, B, C und D wurde jeweils ein Parameter unter Grenzbedingungen in einem sehr einfachen $C \rightleftharpoons O$ -Modell anhand von simulierten Daten getestet. Gemessenen Daten liegen jedoch komplexere Modelle mit gleichzeitig schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis und geringer Offen-Wahrscheinlichkeit zugrunde. So sind die in diesem Abschnitt bestimmten Grenzen nicht direkt auf gemessene Daten zu übertragen. Anhand dieser Parameter kann eine Abschätzung gegeben werden.

3. Für die Bestimmung realer Zeitreihen mit neutralen Startwerten sollte der 2D-Fit mit genetischem Algorithmus und nicht mit dem Simplex-Algorithmus verwendet werden, wie anhand von B und C zu erkennen ist.

6.5 Modellunterscheidung

In diesem Abschnitt werden die Fähigkeiten des HMM-Fits und des 2D-Fits untersucht, Markov-Modelle zu unterscheiden, die nicht einer Äquivalenzklasse angehören. Bei der Untersuchung von gemessenen Patch-Clamp-Daten ist dies für komplexe Modelle eine schwierige Disziplin. Magleby und Weiss (1990b) konnten bereits zeigen, dass der 2D-Fit im Gegensatz zu 1-dimensionalen Methoden ein besser geeignetes Instrument für diese Untersuchung ist.

Modellunterscheidung erfordert, dass die Differenz im Gütekriterium bei verschiedenen Modellen besser ist als Schwankungen für die einzelne Messreihe. Erste Versuche mit der Methode der 2D-Histogramme zur Modellanpassung (Huth, 1999; Radomski, 2000) zeigten jedoch, dass diese Voraussetzung nicht erfüllt war. Nur bei einer optimalen Anpassung der Datenreihe sind die Fehlersummen verschiedener Modelle vergleichbar. Diese Voraussetzung ist im Gegensatz zu den älteren Arbeiten nun durch den 2D-Fit gegeben.

Auch der Direkte-Zeitreihenfit ist mathematisch in der Lage, eine Modellanpassung zu leisten (Akaike, 1974; Zheng et al., 2001). In der Praxis sind jedoch selten eindeutige Aussagen zu treffen (Huth, 1999; Michalek et al., 1999).

Unter Bedingungen, die der Messung von Natriumkanälen entsprechen, wird eine Zeitreihe untersucht. Das bedeutet, dass die Zeitreihe abschnittsweise simuliert wird und sich die Abschnitte nicht im stationären Zustand befinden. Es wird ein 5-Zustandsmodell untersucht, das genügend Freiheitsgrade für die Anordnung der Zustände bietet.

Unter diesen Bedingungen kann gezeigt werden, dass eine Unterscheidung der Modelle mit dem HMM-Fit nicht vollständig möglich ist. Der 2D-Fit kann die Modelle mit höherer Sicherheit unterscheiden.

Für den Test wird eine Zeitreihe mit dem Modell:

$$C_1 \xrightleftharpoons[50\text{HZ}]{2500\text{HZ}} O_2 \xrightleftharpoons[5000\text{Hz}]{5000\text{Hz}} O_3 \xrightleftharpoons[1000\text{Hz}]{1000\text{Hz}} C_4 \xrightleftharpoons[50\text{HZ}]{2000\text{Hz}} C_5 \quad (6.5)$$

abschnittsweise simuliert. Sie wird im Folgenden als „gemessene Zeitreihe“ bezeichnet, startend im C_1 -Zustand (Anzahl der Abschnitte: $n=5000 \hat{=} 25\text{ms}$, $\text{SNR}=8$).

Die Bestimmung der Ratenkonstanten mit dem HMM-Fit und dem 2D-Fit wird anhand von Modellen durchgeführt, die wie Modell (6.5) zwei offene und drei geschlossene Zustände unterschiedlicher Anordnung aufweisen. Dazu gehört das für die Simulation der Zeitreihen benutzte Modell:

$$C_1 \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O_2 \xrightleftharpoons[k_{32}]{k_{23}} O_3 \xrightleftharpoons[k_{43}]{k_{34}} C_4 \xrightleftharpoons[k_{54}]{k_{45}} C_5 \quad (6.6)$$

und die nicht äquivalenten Modelle (dieses wurde mit den Modellen in Abschnitt 5.7 bereits gezeigt):

$$C_1 \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O_2 \xrightleftharpoons[k_{32}]{k_{23}} C_3 \xrightleftharpoons[k_{43}]{k_{34}} O_4 \xrightleftharpoons[k_{54}]{k_{45}} C_5 \quad (6.7)$$

und

$$C_1 \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O_2 \xrightleftharpoons[k_{42}]{k_{24}} C_4 \xrightleftharpoons[k_{54}]{k_{45}} C_5 \quad (6.8)$$

$$\begin{array}{c} \uparrow k_{23} \\ O_3 \\ \downarrow \end{array}$$

Die Startwerte werden mit $k_{ij} = 500 \text{ Hz}$ Modell-neutral gewählt, da bei gemessenen Daten eine Abschätzung optimierter Werte für komplexe Modelle schwierig ist und die k_{ij} in den verschiedenen Modellen nicht äquivalent sind.

Mit dem Modell aus (6.5) werden n Zeitreihen simuliert (Parameter wie oben). Unter Annahme der Modelle aus (6.6) - (6.8) werden diese Zeitreihen mit dem HMM-Fit und dem 2D-Fit angepasst. Die Ergebnisse der Anpassungen, die LogLikelihood und die quadratische Abweichung sind in Abbildung 6.10- 6.13 dargestellt.

In Abbildung 6.10 ist zu erkennen, dass der HMM-Fit anhand der größten LogLikelihood in der Lage ist, das Modell (6.6) als falsch zu identifizieren. Die nicht äquivalenten Modelle (6.6) und (6.8) können jedoch mit der LogLikelihood nicht unterschieden werden, da die Werte gleich sind. Für die Mittelung über die $n = 10$ Zeitreihen (rote Punkte) gilt dieselbe Aussage.

In Abbildung 6.11 ist zu sehen, dass der 2D-Fit mit Simplex-Algorithmus das richtige Modell aus (6.6) anhand der kleinsten Fehlersumme der Mittelwerte (rote Punkte) erkennen kann.

Die Anpassung der Zeitreihen mit dem Simplex Algorithmus ist jedoch sehr schlecht (siehe Abschnitt 6.3), die Fehlersummen sind deutlich größer als die der richtigen Ergebnisse (COOCC_o). Folgende Überlegungen lassen eine Modellanalyse mit dem Simplex-Algorithmus trotzdem sinnvoll erscheinen. Bei diesen ereignisgesteuerten Zeitreihen sind die

ersten Zustände stärker besetzt, als im stationären Gleichgewicht. Der 2D-Fit kann die Ratenkonstanten dieser ersten Übergänge deswegen trotz eines insgesamt schlechten Ergebnisses richtig anpassen (Daten hier nicht gezeigt). Schon die Abfolge der ersten drei Zustände in den Modellen der (6.6) - (6.8) ist verschieden, und damit hinreichend für eine Unterscheidung. Ein weiteres Argument für den Simplex ist die um den Faktor 50-100 längere Rechenzeit des genetischen Algorithmus.

In Abbildung 6.12 sind die Ergebnisse des 2D-Fit mit genetischem Algorithmus (schwarze Punkte) und mit anschließendem Simplex (rote Karos) zur Verfeinerung der Bestimmung der Ratenkonstanten dargestellt. Im Vergleich der 4 Fit-Ergebnisse des Simplex wird eindeutig das Modell aus (6.6) anhand der kleinsten Fehlersummen als das richtige Modell identifiziert. Der minimal mögliche Fehler (COOCC_o) wird in den Anpassungen des Modells aus (6.6) für 3 von 4 Ergebnissen erreicht. Für das Modell aus C, das der HMM-Fit als gleichberechtigt angesehen hat (Abbildung 6.10), sind die Fehlersummen eindeutig größer.

Der 2D-Fit mit genetischem Algorithmus und der Nachkorrektur mit dem Simplex ist daher die Methode der Wahl, um aus der Klasse der nicht äquivalenten Markov-Modelle das am besten passende herauszusuchen. Es sollte wegen der Möglichkeit einer falschen Anpassung durch den Fit-Algorithmus immer eine oder mehrere Kontrollen erfolgen. Insgesamt ist dann der Rechen- und Zeitaufwand für die Modellanalyse beträchtlich

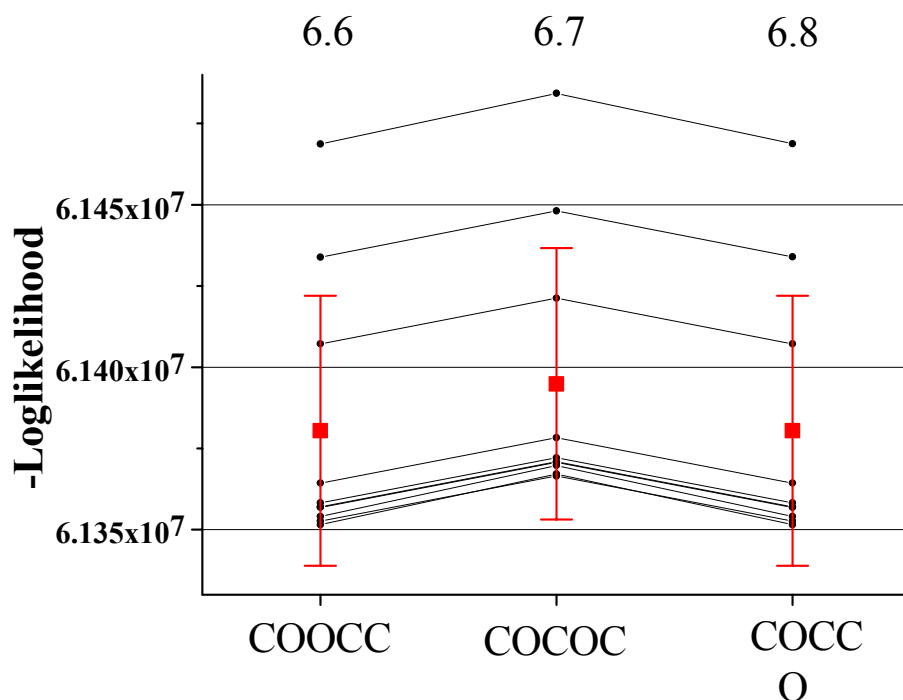


Abbildung 6.10 Direkter-Zeitreihenfit der 3 Testmodelle aus (6.6) – (6.8)
Die jeweiligen Fehlersummen einer Zeitreihe n_i sind miteinander verbunden.
Anpassung von $n = 10$ Messreihen, die mit dem Modell (6.5) simuliert sind

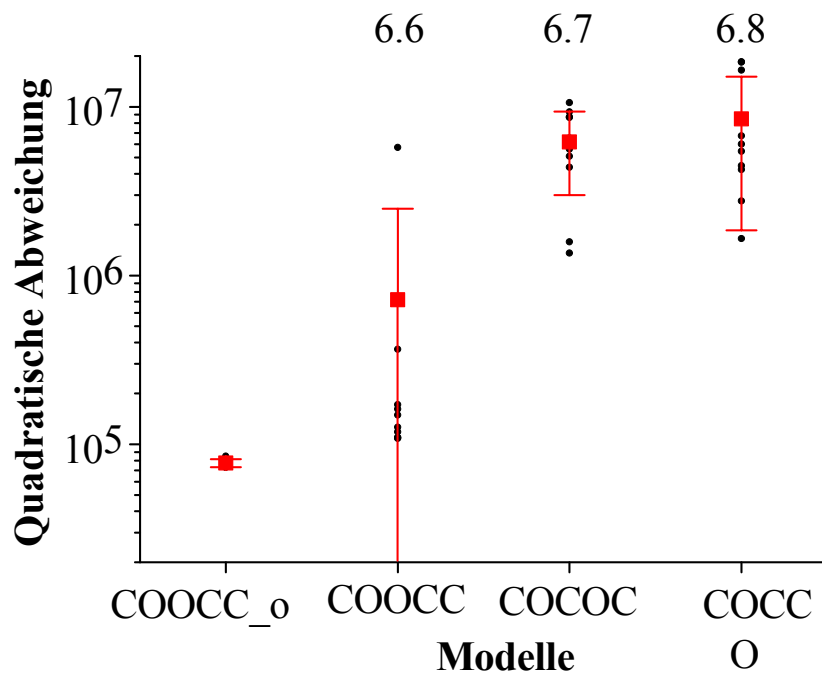


Abbildung 6.11 2D-Fit mit Simplex-Algorithmus der 3 Testmodelle aus (6.6) – (6.8)
 Zusätzlich wird der minimal mögliche Fehler durch COOCC_o dargestellt. Dieser wird durch den Vergleich von zwei simulierten Zeitreihen aus Modell (6.5) bestimmt.
 Anpassung von $n = 10$ Messreihen, die mit dem Modell (6.5) simuliert sind

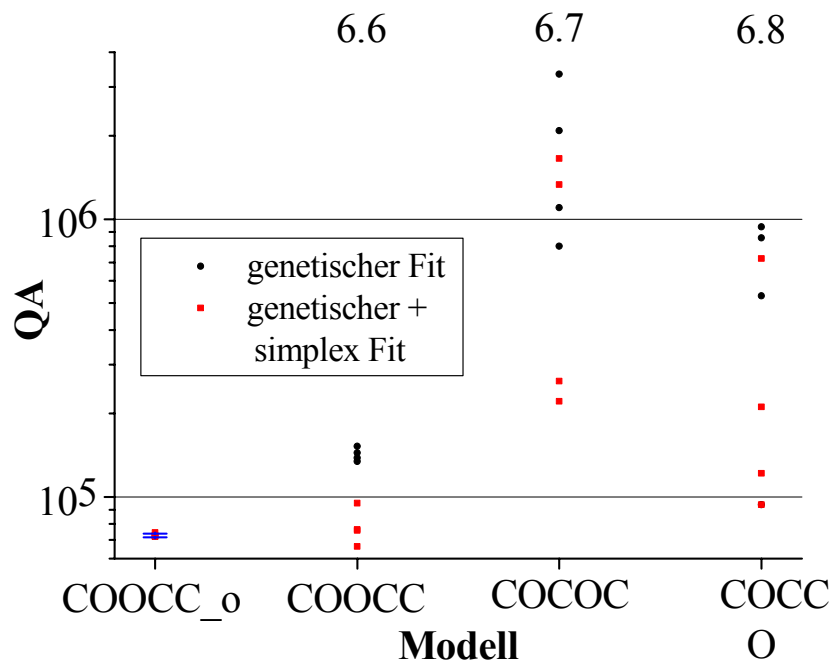


Abbildung 6.12 2D-Fit mit genetischen Algorithmus der 3 Testmodelle aus (6.6) – (6.8) (schwarz)
 Die Ergebnisse des genetischen Algorithmus werden als Startwerte für den anschließenden 2D-Fit mit Simplex-Algorithmus verwendet (rot). Zusätzlich wird der minimal mögliche Fehler durch COOCC_o dargestellt. Dieser wird durch den Vergleich von zwei richtigen Zeitreihen aus Modell (6.5) bestimmt.
 Anpassung von $n = 4$ Messreihen, die mit dem Modell (6.5) simuliert sind

6.6 Mehrkanalaufzeichnungen

Eine Analyse von Mehrkanalaufzeichnungen wird bei vielen Patch-Clamp-Messungen nötig, da es für viele Versuchsobjekte extrem schwierig ist, die Anzahl der Kanäle im Patch auf einen zu beschränken.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Zellen ist es möglich, über die Kulturbedingungen oder die Menge der eingesetzten DNA bei Transfektions-Experimenten, die Expressionsrate der Kanäle zu steuern (Kapitel 3). So lassen sich Versuchsbedingungen erzeugen, die die Einzelkanalaufzeichnung wahrscheinlich machen, aber dies erhöht auch die Wahrscheinlichkeit von Seals ohne Kanäle. Deswegen lohnt sich auch hier eine Mehrkanalanalyse, um die Anzahl nicht auswertbarer Messungen in Grenzen zu halten.

Mehrkanalaufzeichnungen machen die Modifikation der Analyseprogramme zur Modellanpassung notwendig. Blunck kann über die Erstellung von Makrokanälen (Zusammenfassung der Einzelmodelle von mehreren Kanälen) die 1-Dimensionale-Dwell-Time-Analyse im Target-Fit (Blunck et al., 1998) erweitern. Arne Albertsen erweitert den HMM-Fit auf eine Mehrkanal-Analyse (Albertsen und Hansen, 1994). Beide Verfahren sind jedoch durch Größe der benötigten Gleichungssysteme bzw. durch die Probleme der Handhabung der zugehörigen Matrizen (z. B. Rechenzeit, Zahlenformat) auf wenige Kanäle (≤ 3) limitiert. Für die Matrizengröße gilt:

$$D = (Z^n)^2 \tag{6.9}$$

D: Einträge in den Matrizen / Gleichungssysteme

Z: Zustände im Markov-Modell

n: Anzahl der Kanäle

Für die Analyse von Mehrkanalaufzeichnungen mit dem 2D-Fit wird die Definition des 2D-Histogramms so erweitert, dass alle Ereignisse von Niveau n auf $n \pm 1$ unabhängig von n in ein Histogramm einsortiert werden (vorher am Einzelkanal nur für 2 Niveaus: geschlossen und offen). Die Simulation der Testzeitreihen erfolgt, wie in Abschnitt 5.8 beschrieben, durch die Aufsummation von n Kanälen in der rauschfreien Zeitreihe.

In Abbildung 6.13 ist dargestellt, dass der 2D-Fit mit genetischem Algorithmus in der Lage ist, aus einer Zeitreihe, die mit zehn gleichen Kanälen mit einem $C \xrightleftharpoons[500\text{Hz}]{100\text{Hz}} O$ -Modell simuliert wird, die Ratenkonstanten sehr genau zu bestimmen. Die Rechenzeit steigt dabei durch die Simulation weiterer Kanäle und Auswertung von weiteren Niveaus mit dem Hinkley-Detektor, bezogen auf die Einzelkanalanalyse, um weniger als 10% für jeden zusätzlichen Kanal an. Bereits für zwei Kanäle sind die Rechenzeiten von HMM-Fit und 2D-Fit in derselben Größenordnung.

Die Beschränkung auf 10 Kanäle ist für die Situation bei gemessenen Einzelkanal-Daten hinreichend, da selten mehr Kanäle gleichzeitig gemessen werden. Die Anzahl der Freiheitsgrade im Fit-Algorithmus vergrößert sich durch die Mehrkanalanalyse, gleiche Kanäle vorausgesetzt, nicht. Daher ist mit dem Ergebnis aus Abbildung 6.13 zu erwarten, dass die Fehler bei der Bestimmung der Ratenkonstanten in dem Bereich liegen, der auch bei der Einkanalanalyse gefunden wird.

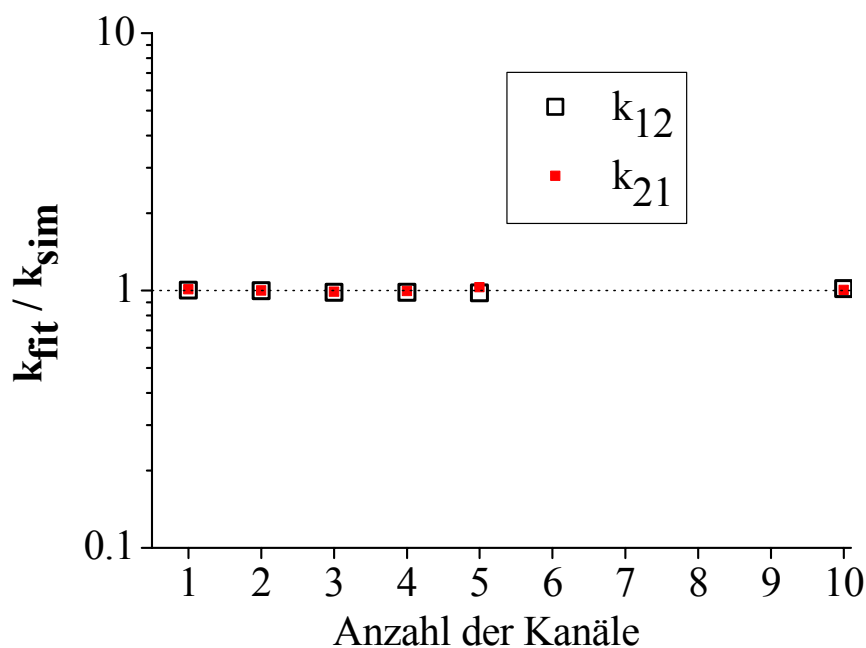


Abbildung 6.13 2D-Fit von Mehrkanalaufzeichnungen mit dem genetischen Algorithmus

Simuliertes Modell: $C \xrightleftharpoons[500\text{Hz}]{100\text{Hz}} O$, n -Kanäle. Abtastfrequenz $f_a = 200$ kHz, Filterfrequenz $f_f = 50$ kHz,

Länge der Zeitreihe $t_s = 50$ s, SNR = 8, Fehlerberechnung: 9-Felder-Methode

6.7 Leveldetektion bei schnellem Schalten

Für die Analyse von Zeitreihen mit Sprungdetektoren ist die richtige Einstellung der Stromniveaus sehr wichtig, um die Ratenkonstanten richtig zu bestimmen (siehe Abschnitt 5.4). Die Bestimmung der Stromniveaus mit dem menschlichen Gehirn durch die Abschätzung nach dem visuellen Tschebyscheff-Kriterium ist mindestens genauso gut wie die Anwendung der heutigen Computer-Algorithmen zur Leveldetektion (Woelk, 2000; Riessner et al., 2002).

Bei Zeitreihen mit schnellem Schalten, bei denen durch den Tiefpassfilter in der Messkette eine Stromreduktion auftritt, kann so aber nur das scheinbare und nicht das wahre Stromniveau, das für die Analyse mit Sprungdetektoren benötigt wird, bestimmt werden.

Mit dem 2D-Fit ist es möglich, auch das ursprüngliche Stromniveau zu bestimmen. Dies ermöglicht sogar den Nachweis und die Bestimmung einer durch schnelles Schalten vorgetäuschten Stromreduktion.

Diese Methode basiert auf der Annahme, dass der Hinkley Detektor nur bei Kenntnis des richtigen Stromniveaus die Verweildauern richtig bestimmt. Deshalb kann ausschließlich die Kombination aus richtigem Stromniveau und richtigen Ratenkonstanten das Amplituden-Histogramm im Bereich der Flanke des schnellen Schaltens reproduzieren (markierte Bereiche in Abbildung 6.15). Die Bestimmung der Ratenkonstanten wird durch den 2D-Fit übernommen (siehe Abschnitt 6.4, Bestimmung schneller Ratenkonstanten). Die Einstellung des Stromniveaus geschieht durch den Untersucher in einem iterativen Verfahren (Abbildung 6.14). Dazu wird das Stromniveau für den Hinkley-Detektor im 2D-Fit so lange variiert, bis die Abweichung der Flanken in den Amplitudenhistogrammen in gemessener und simulierter Zeitreihe gleich ist.

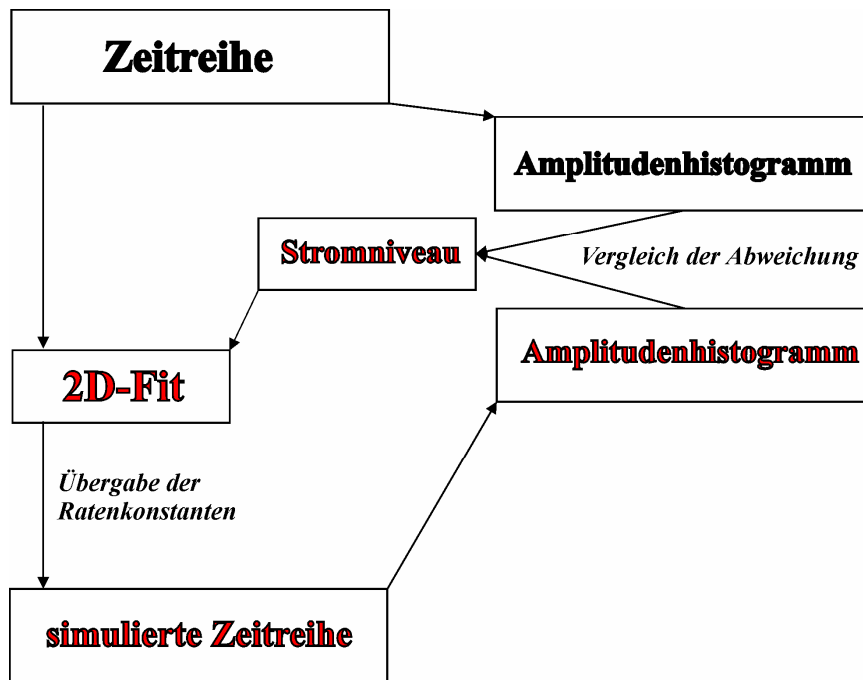


Abbildung 6.14 Schema des Ablaufdiagramms bei der Bestimmung eines unbekannten Stromniveaus
Die iterativen Anteile sind rot beschriftet.

In Abbildung 6.15A ist zu erkennen, dass nur bei der Wahl des richtigen Stromniveaus in Zusammenhang mit den richtigen Ratenkonstanten (2D-Fit) die Flanken der simulierten Zeitreihe (schwarz) und der durch den 2D-Fit angepassten (rot) im Bereich der Markierung zur Deckung kommen.

Die Negativ-Kontrolle in Abbildung 6.15B zeigt, dass die Simulation einer Zeitreihe mit richtigem Stromniveau, aber falsch angenommenen Ratenkonstanten (also ohne Einsatz des 2D-Fits) die Amplitudenhistogramme der simulierten Zeitreihe („gemessene Daten“, schwarze Kurve) und der Vergleichszeitreihe (rote Kurve) nicht zur Deckung bringt.

Für gemessene Daten mit schnellem Schalten gilt in der Regel, dass die schnellen Ereignisse das 2D-Histogramm quantitativ dominieren. Deswegen ist es auch möglich, ein einfaches Modell (z.B. $C \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O \xrightleftharpoons[k_{32}]{k_{23}} C$) für die Bestimmung der Level zu wählen. Durch diese Modellreduktion ist die Analyse auch von Markov-Modellen möglich, deren Struktur im Bereich der langsameren Reaktion nicht bekannt ist. Das reduzierte Modell hat genug Freiheitsgrade, um die schnellen Konstanten anzupassen und die Flanken im Amplituden-Histogramm auszuwerten.

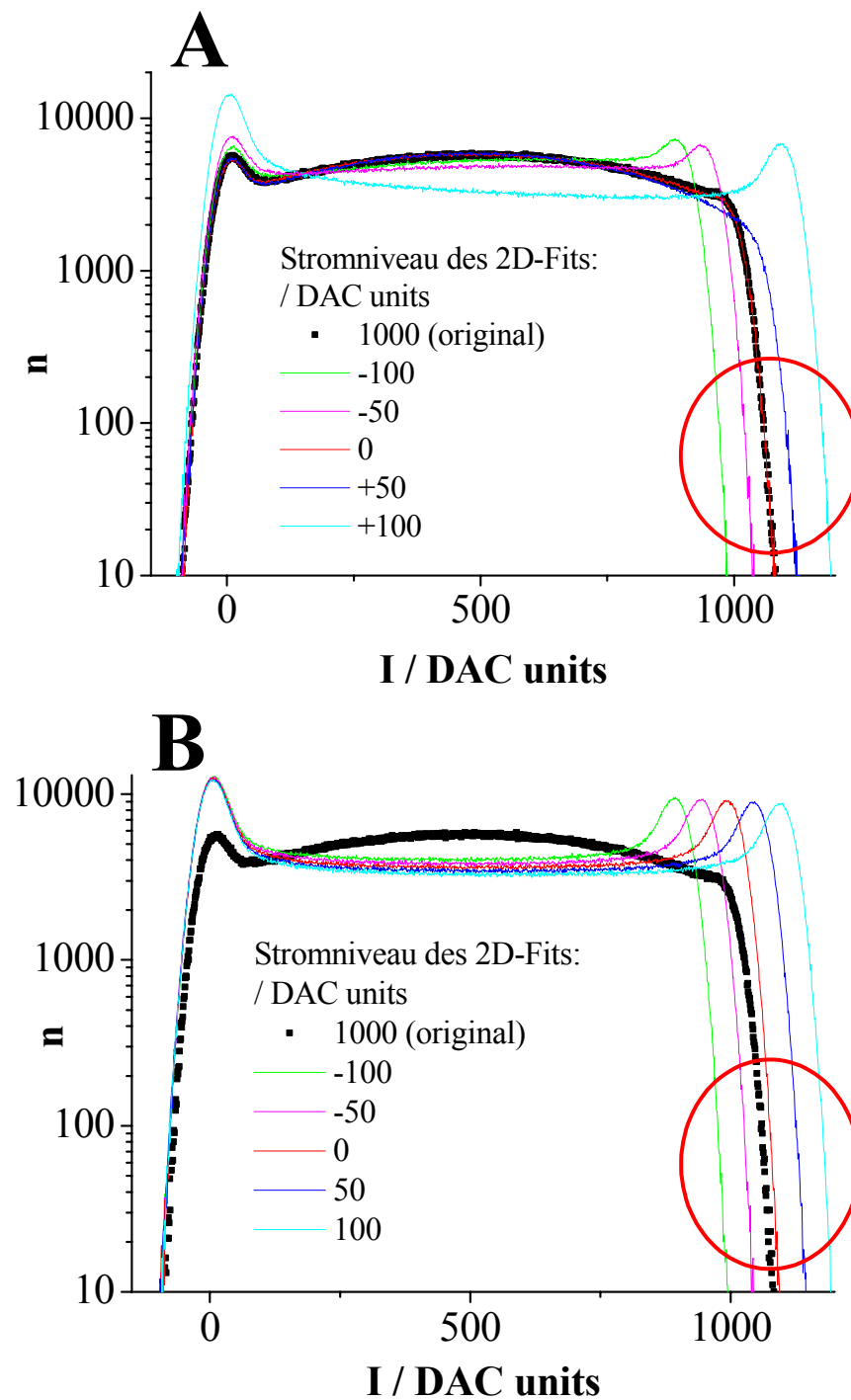


Abbildung 6.15 Amplitudenhistogramme

(A) Anpassung einer Zeitreihe durch den 2D-Fit mit verschiedenen Stromniveaus, Modell:

$$C \xrightleftharpoons[5\text{kHz}]{50\text{kHz}} O \xrightleftharpoons[200\text{kHz}]{200\text{kHz}} C$$

(B) Amplitudenhistogramme der Originalkurve aus (A) und simulierter Zeitreihen unterschiedlichen

Stromniveaus mit dem Modell $C \xrightleftharpoons[5\text{kHz}]{50\text{kHz}} O \xrightleftharpoons[100\text{kHz}]{100\text{kHz}} C$

(A) und (B): Abtastfrequenz $f_a=200$ kHz, Filterfrequenz $f_f=50$ kHz. SNR = 8, Erklärungen im Text

6.8 Komplexe Modelle

In diesem Abschnitt wird eine simulierte Zeitreihe mit einem Markov-Modell mit 5 Zuständen angepasst. Die acht Ratenkonstanten des Modells

$$C \begin{array}{c} \xrightarrow{k_{12}} \\ \xleftarrow{k_{21}} \end{array} O \begin{array}{c} \xrightarrow{k_{23}} \\ \xleftarrow{k_{32}} \end{array} O \begin{array}{c} \xrightarrow{k_{34}} \\ \xleftarrow{k_{43}} \end{array} C \begin{array}{c} \xrightarrow{k_{45}} \\ \xleftarrow{k_{54}} \end{array} C \quad (6.10)$$

bedeuten acht freie Parameter für die Anpassung mit den Fit-Algorithmen und stellen schon eine beträchtliche Herausforderung dar. Trotzdem kann die Zeitreihe in Bezug auf gemessene Daten hinreichend genau angepasst werden, wie die quadratischen Abweichungen in Tabelle 6.2 und die Strom-Averages in Abbildung 6.16 zeigen.

Auffällig ist, dass einige der in Tabelle 6.3 abgebildeten Ratenkonstanten aus der Anpassung von den Konstanten der analysierten Zeitreihe erheblich abweichen. Dieses Beispiel veranschaulicht ein Problem bei der Anpassung von Zeitreihen. Ohne einen Satz von orthogonalen Basisfunktionen der Transformation kann eine Zeitreihe auch mehrdeutig angepasst werden. Trotzdem sind die Fehler insgesamt so gering und die Ratenkonstanten immer qualitativ richtig interpretiert, so dass eine Verwendung zur Anpassung gemessener Daten gerechtfertigt erscheint.

Für den Test wird eine Zeitreihe mit dem Modell

$$C \begin{array}{c} \xrightarrow{2500\text{Hz}} \\ \xleftarrow{50\text{Hz}} \end{array} O \begin{array}{c} \xrightarrow{5000\text{Hz}} \\ \xleftarrow{5000\text{Hz}} \end{array} O \begin{array}{c} \xrightarrow{1000\text{Hz}} \\ \xleftarrow{1000\text{Hz}} \end{array} C \begin{array}{c} \xrightarrow{2000\text{Hz}} \\ \xleftarrow{50\text{Hz}} \end{array} C \quad (6.11)$$

mit 5000 Abschnitten à 25 ms simuliert („gemessene Zeitreihe“). Die Anpassung erfolgt jeweils zweimal mit dem HMM-Fit und dem 2D-Fit mit genetischem Algorithmus für das Markov-Modell aus (6.10).

Die Ergebnisse der Anpassung (Tabelle 6.3) werden mit dem gleichen Modell (6.10) 19-mal simuliert (um statistische Schwankungen der Einzelsimulation zu beseitigen), 19 2D-Histogramme erstellt und die Quadratischen Abweichungen zum 2D-Histogramm der obigen Original-Zeitreihe bestimmt (Tabelle 6.2). Die LogLikelihood wird direkt aus den Zeitreihen mit dem HMM-Fit erstellt.

Die Unterschiede mögen klein erscheinen, doch bei der LogLikelihood sind kleine Abweichungen bereits wichtig. Zum Beispiel betrachten Zheng et al. (2001) bereits eine Abweichung von weniger als 15 pro Freiheitsgrad und Akaike (1974) bei theoretischen Betrachtungen weniger als 2 als einen signifikanten Unterschied in der LogLikelihood.

Außerdem werden mit diesen Zeitreihen die Strom-Averages in Abbildung 6.16 erstellt.

	Quadratische Abweichung (9-Felder) n = 19	LogLikelihood
Original	80291 ± 5779	61595715
2D-Fit 1	80976 ± 3373	61595548
2D-Fit 2	75781 ± 5222	61595727
HMM 1	218723 ± 12383	61595488
HMM 2	259228 ± 15523	61595329

Tabelle 6.2 Abweichungen der Zeitreihen in den Differenzhistogrammen von der Original-Zeitreihe („gemessene Zeitreihe“) und in der LogLikelihood

Die Zeile Original wird durch die Simulation von Modellreihen mit den gleichen Ratenkonstanten wie die der „Messreihe“ erstellt. Die differierenden Stellen der LogLikelihood sind rot unterlegt. Die Nummerierung 1 und 2 wird im Folgenden als Bezeichnung für den jeweiligen Fit benutzt.

Ratenkonstanten	k_{12} / Hz	k_{21} / Hz	k_{23} / Hz	k_{32} / Hz	k_{34} / Hz	k_{43} / Hz	k_{45} / Hz	k_{54} / Hz
Original	2500	50	5000	5000	1000	1000	2000	50
2D-Fit 1	2599	238	6237	9141	902	426	4388	202
2D-Fit 2	2698	134	4463	8466	1265	583	2086	78
HMM: Startwerte	500	500	500	500	500	500	500	500
HMM 1	2514	47	9069	753	538	1090	1710	44
HMM 2	2588	0	13221	2724	592	1139	1674	44

Tabelle 6.3 Leistungsfähigkeit des 2D-Fits bei komplexen Modellen (2 Fits)

Im Vergleich dazu der Direkte-Zeitreihenfit (HMM-Fit, 2Fits), Fit einer Zeitreihe des Modells aus (6.11) mit dem genetischen Fit und anschließend mit dem Simplex-Fit

Bei über 100% bzw. unter 50% Abweichung sind die Ratenkonstanten rot dargestellt. Die Nummerierung 1 und 2 wird im Folgenden als Bezeichnung für den jeweiligen Fit benutzt.

Für die ermittelten Ratenkonstanten sind die Abweichungen (größer als 50%) von den Original-Konstanten in der Tabelle 6.3 rot dargestellt. Die Abweichungen in den k_{ij} sind dabei charakteristisch für das jeweilige Fit-Verfahren.

Die Genauigkeit des 2D-Fits bei der Bestimmung langsamer Ratenkonstanten ist eingeschränkt (siehe Abschnitt 6.2), die Konstanten k_{21} und k_{54} sind mit einem großen relativen Fehler behaftet. Der HMM-Fit schätzt k_{23} zu groß, k_{32} und k_{34} zu klein, wodurch eine Verschiebung in der Besetzung der beiden Offen-Zustände stattfindet. Diese Verschiebung für die beiden Hidden-Zustände im Markov-Modell ist ein deutliches Zeichen für die oben genannte nicht eindeutige Anpassung von Zeitreihen.

Die Abbildung 6.16 zeigt, dass die Zeitverläufe der gemittelten Einzelkanalwerte (Strom-Averages) sich sehr gut mit der analysierten Zeitreihe decken. Die beste Anpassung gelingt mit dem 2D-Fit 2. Die größte Abweichung zeigt der HMM-Fit 2, bei dem auch die Ratenkonstanten k_{21} und k_{23} größere Abweichungen zeigen.

Die quadratischen Abweichungen sind für die beiden 2D-Fits Ergebnisse im Bereich der besten zu erwartenden Werte (Original, Tabelle 6.2). Der 2D-Fit 2 liegt sogar noch unter dem zu erwartenden besten Wert (allerdings nicht außerhalb des 2-Sigma-Bereiches). Solche Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass die analysierte Zeitreihe nicht die mittlere Date in der Dichteverteilung der Fehlersummen darstellt, sondern auch am Rand dieser Verteilung liegen kann.

Die Quadratischen Abweichungen der Zeitreihen, die mit dem Ergebnis des HMM-Fits simuliert werden, sind um den Faktor 3 schlechter als die aus den 2D-Fits (Tabelle 6.2). Berechnet man allerdings die LogLikelihood von Zeitreihen, die aus den Ratenkonstanten des HMM-Fits ermittelt werden, so sind diese besser als für die Zeitreihen, die aus den Ergebnissen des 2D-Fits erzeugt werden. Das zeigt, dass die Quadratische Abweichung und die LogLikelihood nicht äquivalent sind.

Für die Beurteilung der Güte eines Fit-Ergebnisses werden in diesem Abschnitt drei Gütekriterien diskutiert, die LogLikelihood, die quadratische Abweichung und die Abweichung der Strom-Averages.

Versucht man nun, eine Wertung der beiden Kriterien dadurch zu erhalten, dass man überprüft, welche Ergebnisse in den Strom-Averages am besten übereinstimmen, so zeigt Abbildung 6.16, dass beide Verfahren etwa die gleiche Abweichung von dem Original haben. Eine Wertung ist hiermit also nicht möglich.

Ein weiteres Kriterium, das hier wegen der schwierigen Darstellung der großen erforderlichen Datenmenge nicht gezeigt wird, ist der visuelle Vergleich der Originalzeitreihe mit den angepassten Zeitreihen. Hierfür existiert aber kein physikalisches Maß und die subjektive Einschätzung des Beobachters ist gefragt. Die Beurteilung eines Fit-Ergebnisses sollte deswegen nur in der Zusammenschau von Strom-Averages, Fehlersummen und visuellem Vergleich erfolgen.

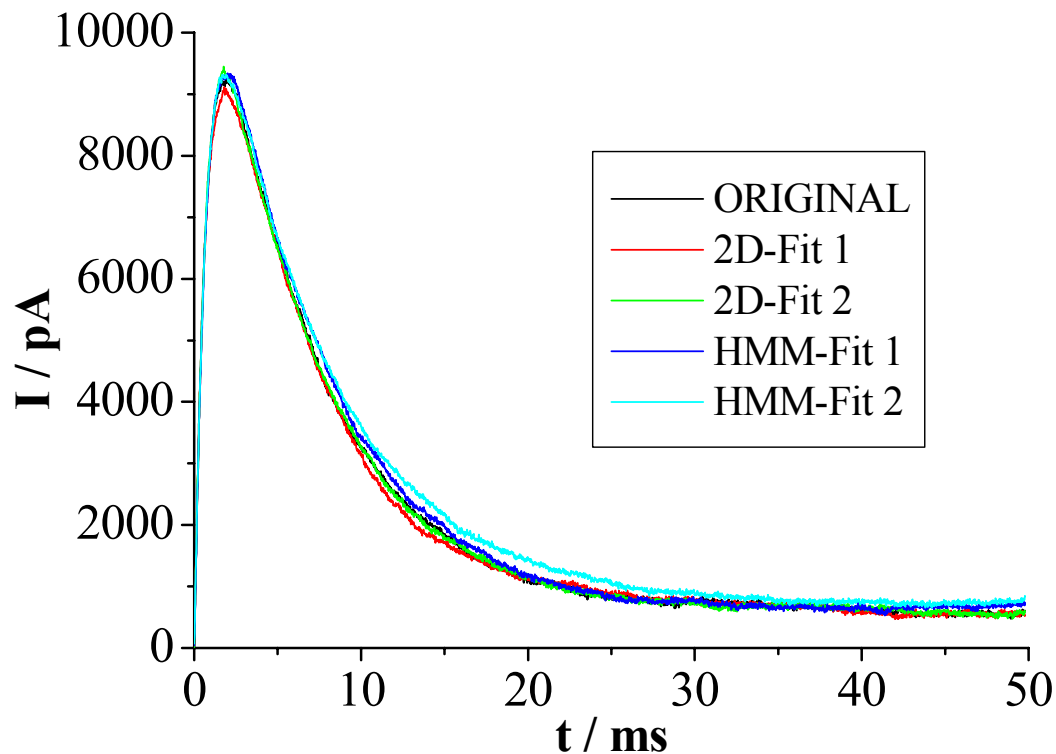


Abbildung 6.16 Strom-Averages der Modellanpassung aus Tabelle 6.3

7 Transfektionsexperimente

7.1 Native HEK293-Zellen

Grundvoraussetzung für die Messung von spannungsabhängigen Whole-Cell-Strömen von Natriumkanälen in den HEK293-Zellen ist die Abwesenheit von anderen Ionenströmen, die mit der Messung des Na^+ -Signal interferieren könnten.

Für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials besitzen alle Zellen Ionenpumpen (ATPasen). ATPasen stören bei Patch-Clamp-Messungen jedoch nicht, da ihr „Einzelkanalstrom“ um den Faktor 10^4 bis 10^6 unter dem von Kanälen liegt (Apell et al., 1985), so dass sie keine sichtbaren Sprünge in der Zeitreihe erzeugen. Zur Minimalausrüstung einer Zelle gehören jedoch diverse Kaliumkanäle für die Stabilisierung des Membranpotentials. Darüber hinaus hängt die Ausstattung der Zellen mit weiteren Transportern hauptsächlich von dem ursprünglichen Gewebetyp der Zellkultur ab.

Bereits die Einzelkanal-Messung von stabil mit dem MaxiK-Kanal transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 7.1) zeigt, dass die HEK-Zellen zusätzlich zu dem exprimierten MaxiK-Kanal einen intrinsischen Kanal aufweisen. Seine Leitfähigkeit ist bei gleicher Polarität des Stromes deutlich geringer als die des MaxiK-Kanals, wodurch eine Unterscheidung möglich ist.

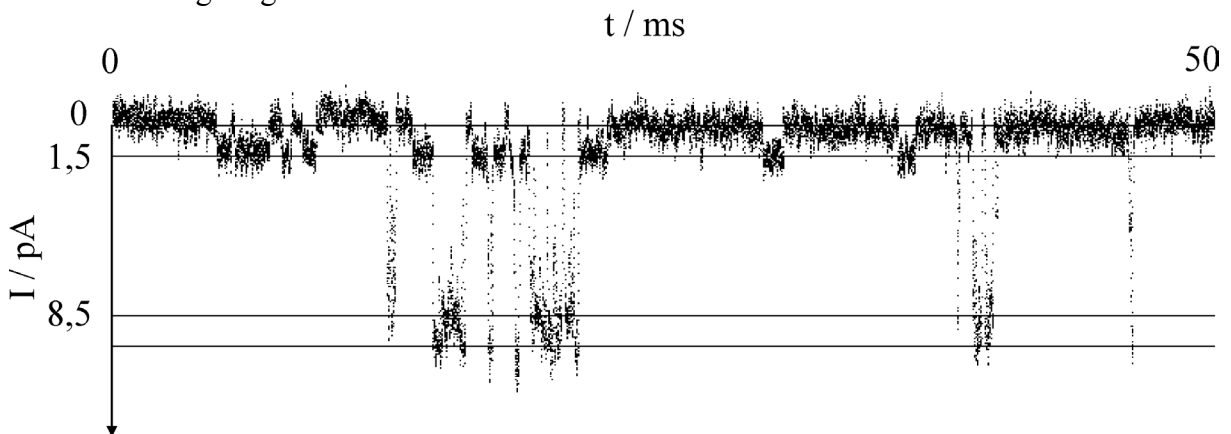


Abbildung 7.1 Einzellkanalableitung einer HEK293-Zelle, die mit einem MaxiK-Kanal stabil transfiziert ist (HEK293 mit MaxiK von A. Schromm, Forschungszentrum in Borstel, zur Verfügung gestellt) Zusätzlich zu dem leitenden Niveau des MaxiK-Kanals bei ca. 8,5 pA ist eine kleinere Leitfähigkeit mit ca. 1,5 pA zu erkennen. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen intrinsischen Kaliumkanal der HEK-Zellen.

Testmessungen mit Spannungssprüngen von -80 mV auf positive Spannungen an nativen HEK293-Zellen (Abbildung 7.2A) zeigen einen spannungsabhängigen positiven Whole-Cell-Strom. Durch das Abnehmen dieses Stromes bei intra- und extrazellulär gleicher K^+ -Konzentration (das treibende Potential für K^+ nimmt hierdurch ab, Abbildung 7.2B), lässt sich dieser Strom als Kaliumstrom identifizieren. Hinzu kommt, dass sich die Aktivierungskurven für einige spannungsabhängige K^+ -Kanäle bei einer höheren extrazellulären Kaliumkonzentration verschieben (Blatt & Gradmann, 1997), so dass tatsächlich kein Strom mehr fließt (Abbildung 7.2B).

Durch den Einsatz von TEA (fast unselektiver Blocker der Kaliumkanäle) in der Badlösung treten auch bei physiologischen Kaliumkonzentrationen der intra- und extrazellulären Lösungen (Abbildung 7.2C) keine spannungsabhängigen Ströme bei nativen HEK293-Zellen mehr auf. Bei der Messung von transfizierten HEK-Zellen und TEA in der Badlösung ist also zu erwarten, dass alle gemessenen spannungsabhängigen Ströme durch den transfizierten Natriumkanal bedingt sind.

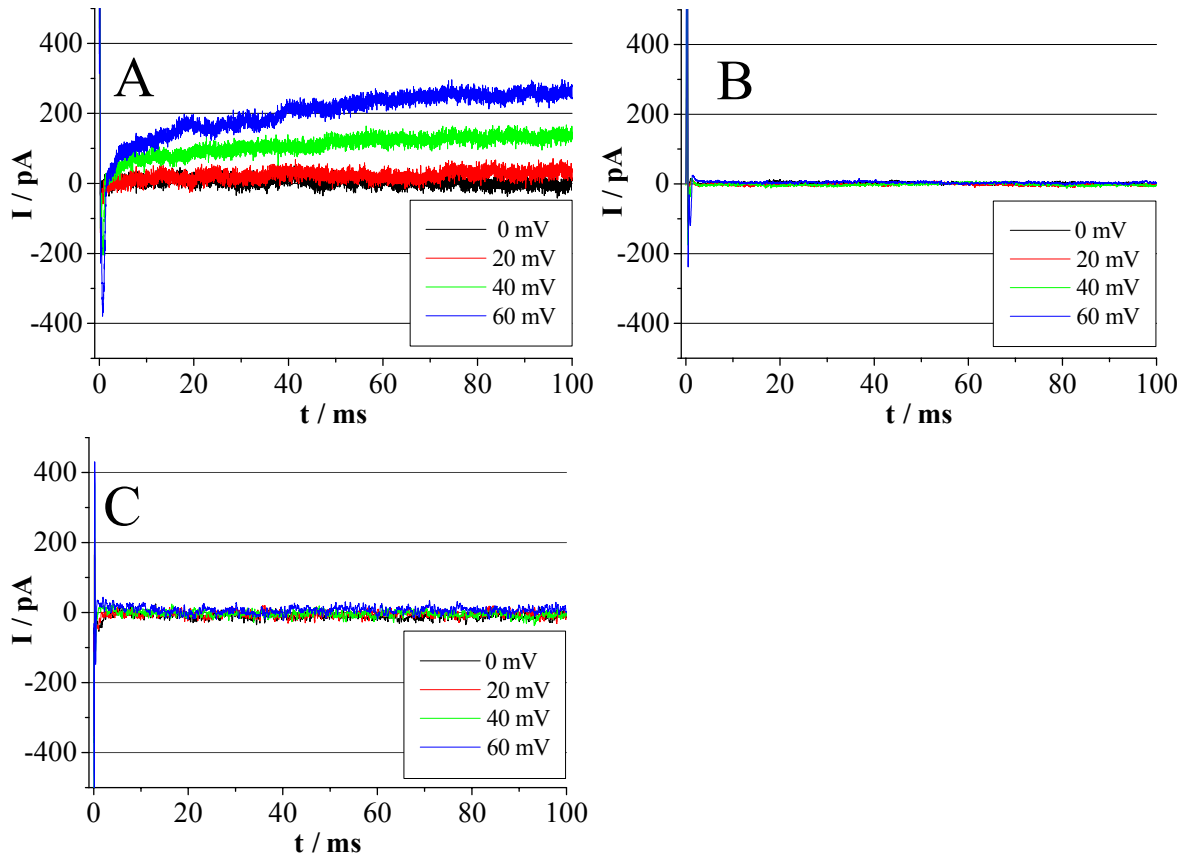


Abbildung 7.2 Whole-Cell Messung nativer HEK293 Zellen (120 mM KCl in der internen Messlösung)
(A) externe Messlösung mit 4 mM KCl
(B) externe Messlösung mit 120 mM KCl
(C) externe Messlösung mit 4 mM KCl und Zusatz von 10 mM TEA.

7.2 Transfektionssubstanzen

Für die Koftransfektion der HEK293-Zellen mit dem pCDM8-Vektor und dem C1-EGFP-Vektor soll die Expressionsrate des Natriumkanal-Proteins hoch sein, um gute Messungen zu erhalten. Außerdem darf die Zytotoxizität des Transfektionsansatzes nicht zu hoch sein, um die Zellen für Patch-Clamp-Messungen verwenden zu können. Die Kombination aus der Menge der Vektor-DNA und der Transfektionssubstanz wird in diesem Abschnitt hinsichtlich der Effizienz und der Zytotoxizität untersucht.

In dem Experiment in Abbildung 7.4 werden die Zellen nach dem Protokoll in Abschnitt 3.6 mit den drei Transfektionssubstanzen und dem C1-EGFP-Vektor getestet. Nach 24h, bzw. nach 48h für Geneporter II (Biozym, Hamburg) wird die Anzahl der transfizierten Zellen und

deren Fluoreszenzintensität als Maß für die Expressionsrate des EGFPs mit einem Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera (Nikon, Düsseldorf) bestimmt. (Abbildung 7.4 A, B, C links). Zusätzlich wird mit schwachem Mikroskopauflicht der nicht transfizierte Anteil der Zellen im selben Bildausschnitt sichtbar gemacht (Abbildung 7.4 A, B, C rechts).

Die Bilder werden nach den Kriterien Transfektionseffizienz (Anteil der transfizierten Zellen), Fluoreszenz und Zytotoxizität grob quantifiziert (Tabelle 7.1). Aus den drei Transfektionssubstanzen wird Superfect als Reagenz der Wahl hauptsächlich wegen seiner geringen Toxizität ausgewählt.

Die Ergebnisse der Experimente mit dem EGFP lassen sich auf die Expression des Nav1.2a übertragen, wie die anschließenden Expressionsversuche mit Nav1.2a zeigen.

Abbildung 7.3 zeigt die maximalen Whole-Cell-Ströme der Natriumkanäle in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge der Vektor-DNA. Für 5 μg ist die Kanaldichte in der Zellmembran vergleichbar mit Neuroblastomzellen (nur für N1E115 unter optimalen Kulturbedingungen). 10 μg DNA sind bereits toxisch für die Zellen und zeigen auch deutlich kleinere Ströme.

Aus dem Versuch in Abbildung 7.4 und den Daten der Abbildung 7.3 wird eine DNA-Menge von 5 μg / 300000 Zellen mit der Transfektionssubstanz Superfect (Qiagen, Hilden) ermittelt, um für die Transfektion mit dem Nav1.2a-Wildtyp die besten Expressionsraten zu erzielen.

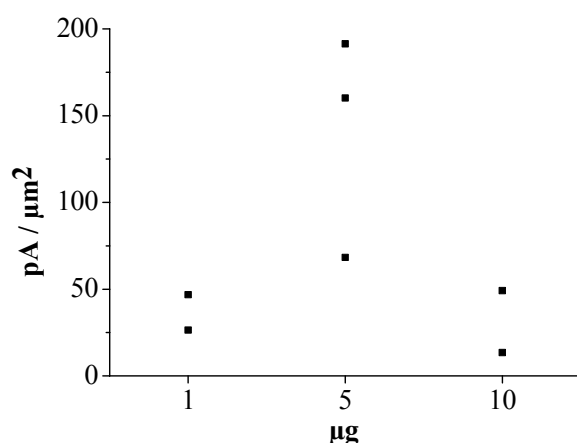
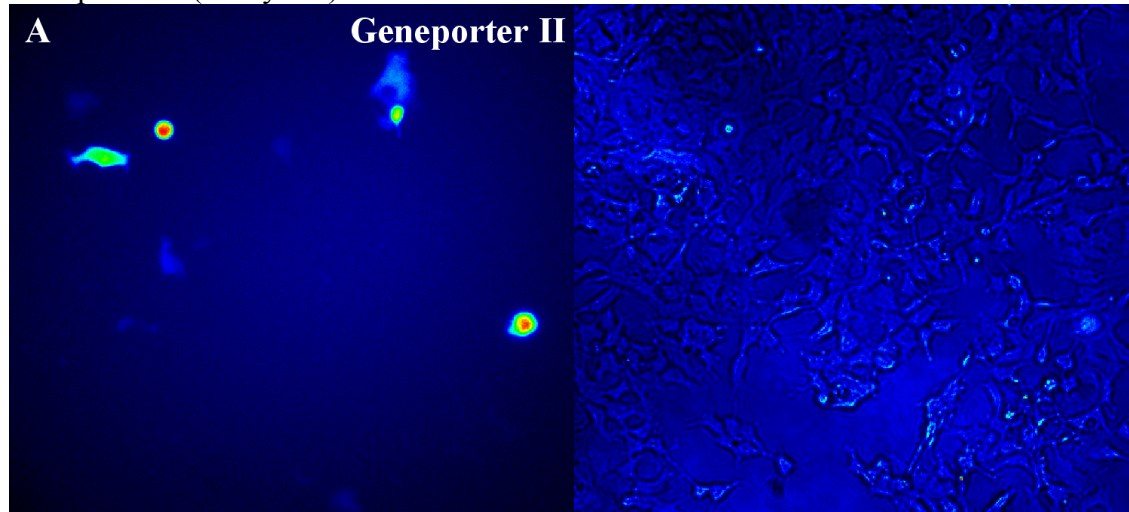
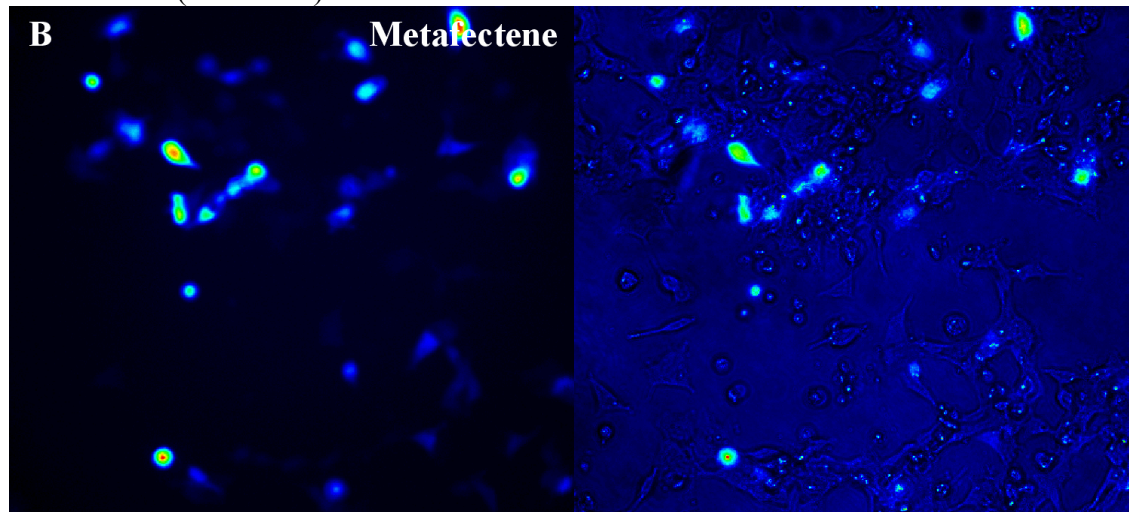


Abbildung 7.3 Zusammenhang der eingesetzten Menge der Vektor-DNA und des Whole-Cell Stroms für den Wild-Type des Nav1.2a
Ströme bei einer Depolarisation von 0 mV, Transfektionsprotokoll nach Abschnitt 3.6 mit Superfect

Geneporter II (Biozym®)



Metafectene (Biontex®)



Superfect (Qiagen®)

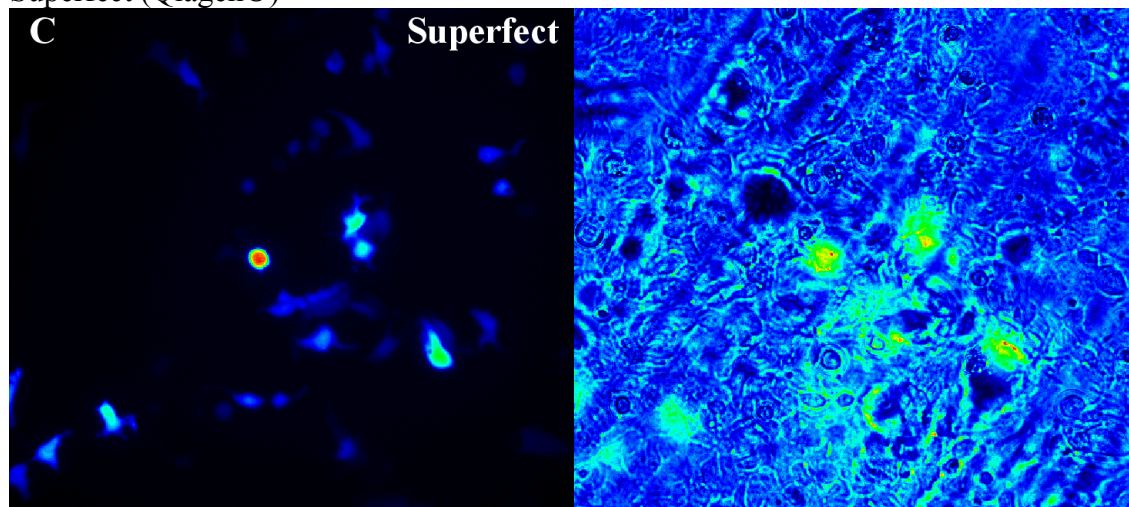


Abbildung 7.4 Transfektionsexperiment mit dem EGFP-Vektor

Links jeweils Falschfarbenaufnahme unter Fluoreszenzlicht (Intensität: schwarz < blau < grün < gelb < rot), rechts der jeweils gleiche Abschnitt mit zusätzlichem Mikroskoplicht, wodurch auch nicht transfizierte Zellen sichtbar werden

	Superfect	Metafectene	GeneporterII
Transfektionseffizienz	~ 30 %	> 30 %	~ 10%
Fluoreszenz (EGFP)	mittelgradig nach 24h	hochgradig nach 24h	Schwach - mittelgradig nach 48h
Zytotoxizität	schwach	stark	mittel

Tabelle 7.1 Unterschiede der Transfektionssubstanzen in der Effizienz, der Expression und der Toxizität

7.3 Sequenzierung von Wildtyp und F1489Q

Die Patch-Clamp-Versuche mit Zellen, die mit der Nav1.2a Mutanten F1489Q durchgeführt werden, zeigen sowohl in den Einzelkanalableitungen (Abschnitt 9.5) als auch in den Ganzzelleitungen (Abschnitt 8.4) deutliche Unterschiede zu den von Kellenberger et al. (1997a) publizierten Daten. Deswegen ist es notwendig, durch die durchgeführte Sequenzierung im Bereich des IFM-Motivs auszuschließen, dass es sich bei der untersuchten Mutante des Natriumkanals um eine andere Identität handeln könnte. Das IFM-Motiv gehört zum Hinged-Lid zwischen Domäne III und IV (Abbildung 2.6), das dem Chain-and-Ball-Modell der N-Inaktivierung von Armstrong et al. (1973) entspricht.

Die Daten der Sequenzierung (Methode siehe Abschnitt 3.8) in Abbildung 7.5 zeigen eindeutig, dass an der Stelle 1489 der Aminosäuresequenz die Aminosäure F (Phenylalanin) des Wildtyps gegen Q (Glutamin) ausgetauscht ist. Damit ist die Mutation F1489Q des Nav1.2a bewiesen. Aufgrund des Fehlens von intrinsischen Natriumströmen, dieses wird in Abschnitt 7.1 gezeigt, kann nun mit großer Sicherheit angenommen werden, dass die abweichenden Messergebnisse durch die Natriumkanalmutante selber hervorgerufen werden.

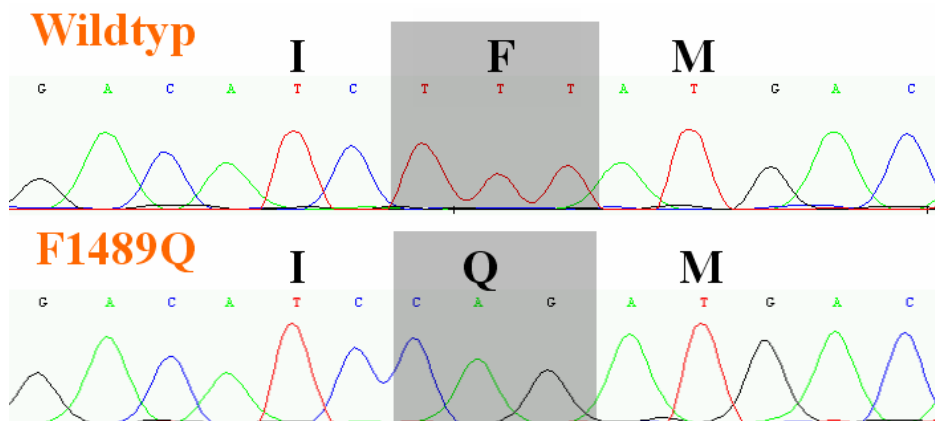


Abbildung 7.5 Aufbereitete Daten der Basen-Sequenzierung des IFM-Motivs von Wildtyp und der F1489Q Mutante

Zu sehen sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei der Auftrennung der Basenfragmente im Megabase Kapillarsequenzierer. Über den Kurven der Intensität ist farblich entsprechend markiert die Basensequenz zu sehen. Darüber ist jeweils im Ein-Buchstabencode die Zuordnung der Aminosäuresequenz des IFM-Motivs abgebildet.

8 Whole-Cell-Messungen

In dieser Arbeit werden Ganzzelleableitungen durchgeführt, um die Parameter der Natriumkanal-Ensembles der Zellen wie Expressionsrate (HEK-Zellen), Kanaldichte (N1E115-Zellen), Giftwirkung und Strom/Spannungs-Abhängigkeit beurteilen zu können. Die Beurteilung der Ganzzelleableitungen erfolgt im Wesentlichen qualitativ. Quantitative Aussagen werden anhand der Einzelkanalmessungen getroffen (Kapitel 9).

8.1 Neuroblastomzellen und Nav1.2a Wildtyp

In Abbildung 8.1 sind Natriumströme von Ganzzelleableitungen von (A) Neuroblastomzellen und (B) HEK293-Zellen mit Nav1.2a-Wildtyp dargestellt. Schnelle spannungsabhängige Aktivierung und schnelle Inaktivierung der Na^+ -Kanäle sind in den Stromverläufen von (A) und (B) deutlich zu erkennen. Auch die Verringerung des Stroms bei höheren Spannungen (+10 und +20 mV) durch die Abnahme der Driving Force ($E_{\text{Na}} - V_{\text{Clamp}}$) ist zu sehen. Die Spitzenströme sind bei den in etwa gleich großen Zellen ebenfalls ähnlich groß. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsobjekten sind in dieser Darstellung nicht zu erkennen.

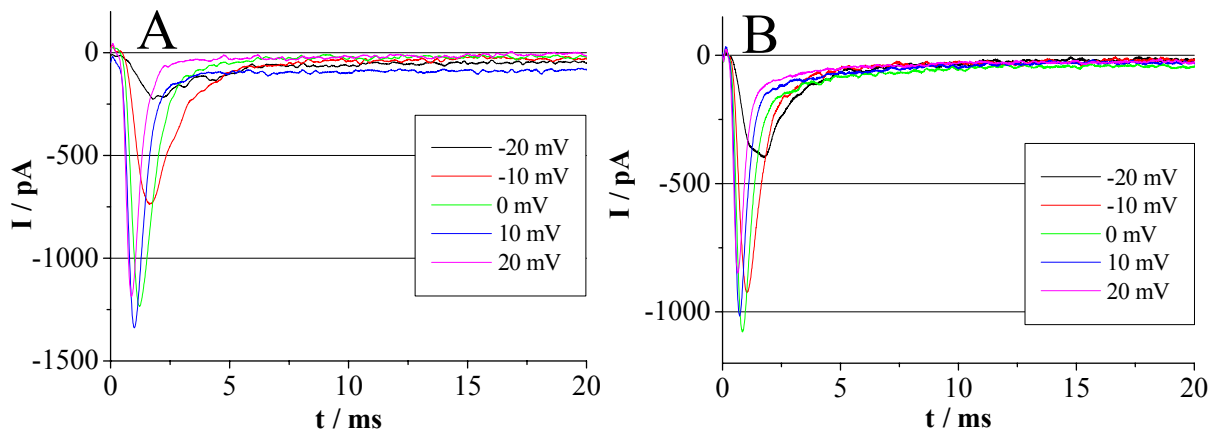


Abbildung 8.1 Whole-Cell-Ableitungen
(A) N1E115, (B) HEK293 mit Nav1.2a
Sprung von -80 mV auf die angegebene Spannung

Die Strom-Spannungskurven in Abbildung 8.2, die aus Messungen wie in Abbildung 8.1 gewonnen werden, zeigen für die NE115-Zellen eine breite Streuung der Stromwerte, während die Kurven der Nav1.2a fast identisch sind.

Diese Daten sind ein Hinweis darauf, dass für die N1E115-Zellen keine einheitliche Population der Na^+ -Kanäle vorliegt und dass je nach Kulturbedingungen die Ausprägung dieser Populationen unterschiedlich ist. Die Strom-Spannungskurven von Schmidt (2000) von Neuroblastomzellen zeigen eine ähnlich breite Streuung.

An diesen Messungen wird auch deutlich, dass ein molekularbiologisch hergestelltes Untersuchungsobjekt wie die HEK293-Zellen mit Nav1.2a den großen Vorteil kontrollierter Versuchsbedingungen bieten können. Die Population der Na^+ -Kanäle ist homogen und die Kanäle sind klassifiziert (im Gegensatz zu den Kanälen der N1E115-Zellen).

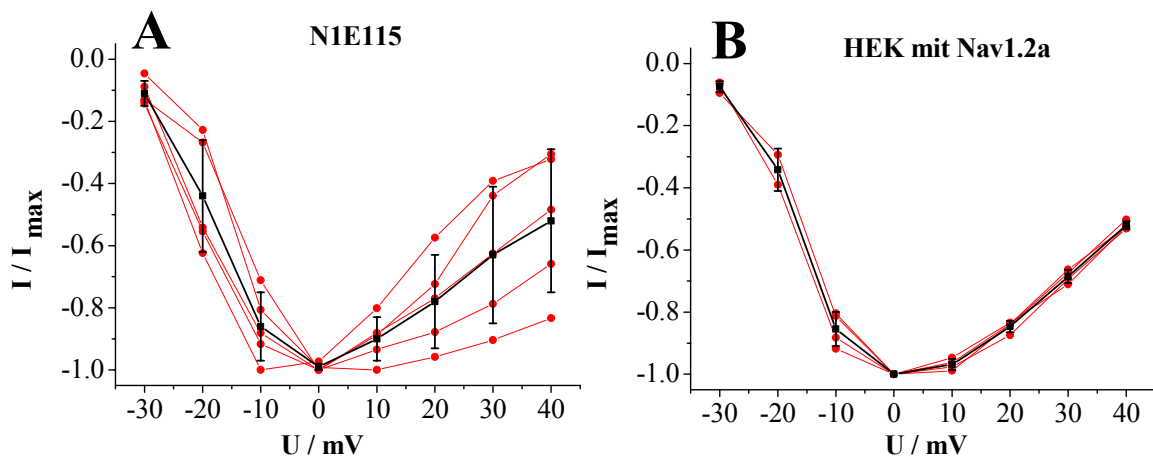


Abbildung 8.2 Strom-Spannungskurven von Whole-Cell-Ableitungen

(A) N1E115-Zellen, (B) HEK293-Zellen mit Nav1.2a Wildtyp

Der Spitzenstrom I ist gegen die Spannung aufgetragen, normiert auf den Strom bei 0 mV, I_{\max} . Die schwarzen Kurven stellen die Mittelwerte da.

Sprung von -80 mV auf die dargestellte Spannung, A: $n = 5$ (an 2 verschiedenen Tagen gemessen), B: $n = 4$ (an 3 verschiedenen Tagen gemessen)

8.2 Seeanemonentoxine

In Abbildung 8.3 sind Ganzzellaufnahmen von vergifteten Neuroblastomzellen und in Abbildung 8.4 Ganzzellaufnahmen von vergifteten HEK-Zellen mit Nav1.2a abgebildet. Zu erkennen sind die durch die Gifte hervorgerufene verlangsamte Inaktivierung der Kanäle und der persistierende Strom im steady-state-Zustand als Maß für die Giftwirkung (zum Vergleich siehe Abbildung 8.1).

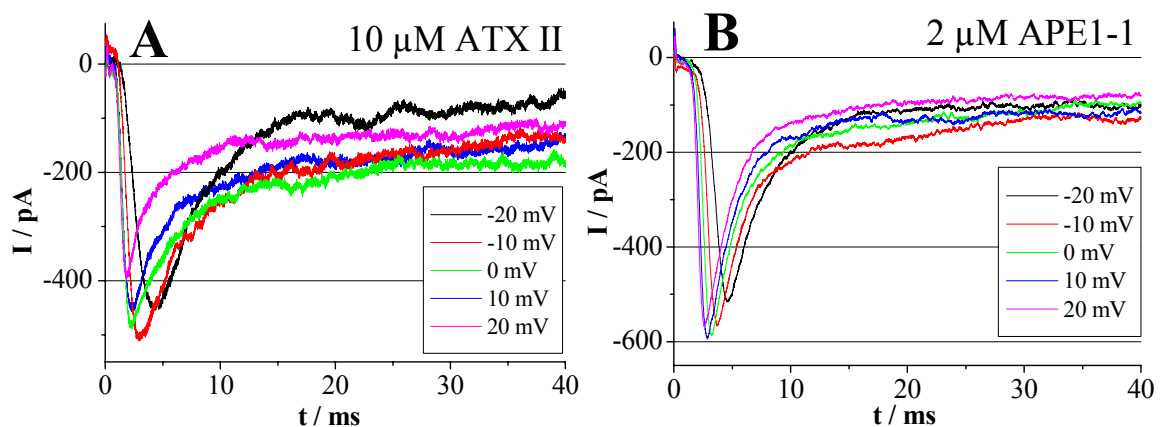


Abbildung 8.3 Ausgewählte Whole-Cell-Ableitungen von N1E115-Zellen

(A) Zusatz von 10 μM ATX II in der externen Lösung

(B) Zusatz von 2 μM APE 1-1 in der externen Lösung.

Spannungssprung von -80 mV auf die angegebene Spannung

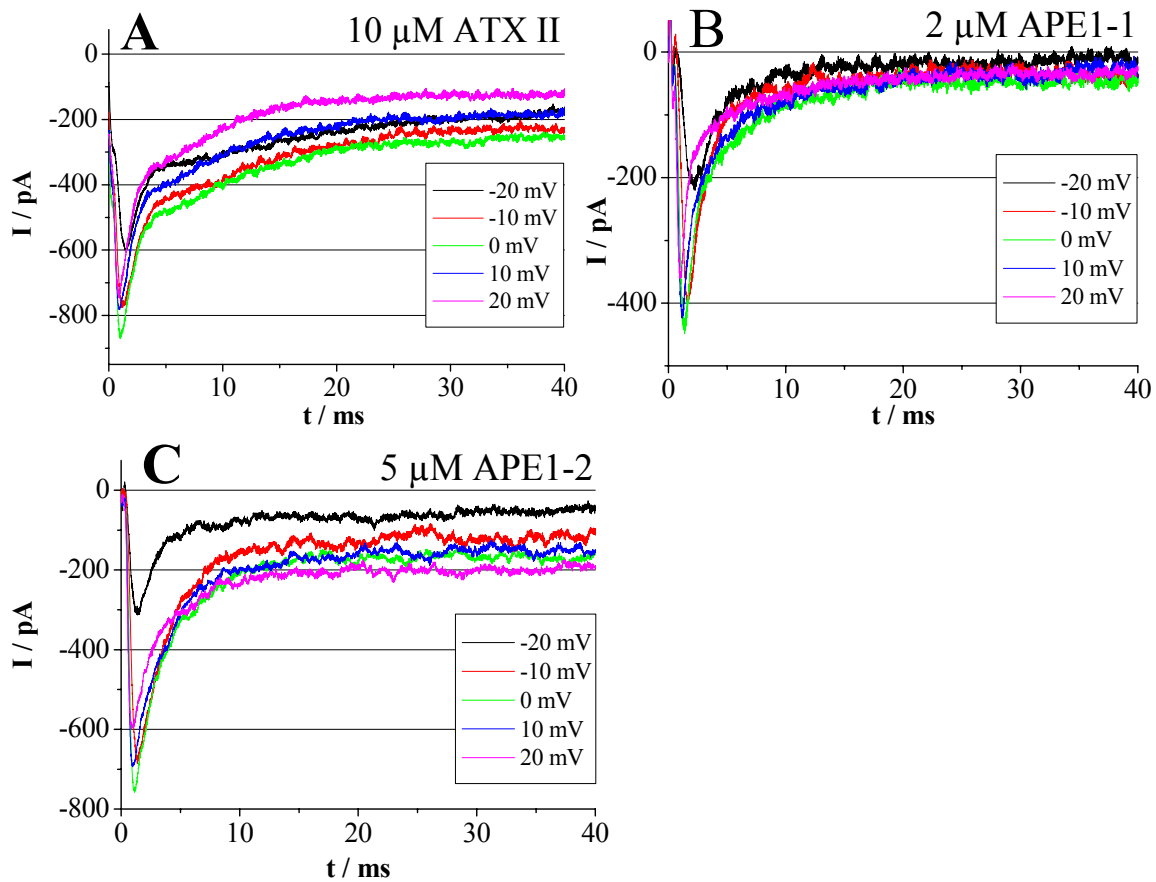


Abbildung 8.4 Ausgewählte Whole-Cell-Ableitungen von HEK-Zellen mit Nav1.2a
 (A) Zusatz von 10 μM ATX II in der externen Lösung
 (B) Zusatz von 2 μM APE 1-1 in der externen Lösung
 (C) Zusatz von 5 μM APE 1-2 in der externen Lösung
 Spannungssprung von -80 mV auf die angegebene Spannung

Anhand der Versuche von Schmidt (2000) und eigenen Versuchen (z.B. Abbildung 8.3 und 8.4) werden für die folgenden Einzelkanalmessungen die Giftkonzentrationen abgeschätzt, bei denen eine maximale Wirkung eintritt. Der Anteil des persistierenden Stroms in Abhängigkeit von der Spannung der Depolarisation ist in Abbildung 8.5 dargestellt.

ATX zeigt bei beiden Messobjekten den größten Anteil des persistierenden Stroms (~30% bei 0 mV) gefolgt von APE 1-2 bei Nav1.2a (~20% bei 0 mV) und APE 1-1 (~15% bei 0 mV).

Bei den Neuroblastomzellen ist der persistierende Strom bei ATXII und APE 1-1 ca. 10% größer als bei den HEK-Zellen mit Nav1.2a. Aufgrund der geringen Anzahl der Messungen und den großen Fehlerbalken ist dieses allerdings nur ein Anhaltspunkt.

Bis auf die leichte Zunahme (< 10%) des Anteils des persistierenden Stroms der Giftfraktion APE 1-2 bei höheren Spannungen, zeigen die Messungen keine Spannungsabhängigkeit.

Folgende Unterschiede ergeben sich zu den Whole-Cell-Messungen von Schmidt (2000) an Neuroblastomzellen:

A) Der Anteil des persistierende Strom ist bei ATXII deutlich kleiner (~20%, bei 0 mV), bei APE 1-1 etwas größer (~25% bei 0 mV) und bei APE 1-2 mit ~40% bei 0 mV deutlich größer als bei den von mir untersuchten HEK-Zellen mit Nav1.2a (20%)

B) Schmidt (2000) findet eine starke Zunahme des Anteils des persistierenden Stroms bei höheren Spannungen für APE 1-1 und APE 1-2. Bei ATX II hingegen besteht genauso wie in meinen Messungen nur eine geringe Spannungsabhängigkeit.

Aufgrund der nicht einheitlichen Qualität der Giftfraktionen, die durch die Isolierung, die Lagerung oder die Herstellung der Messlösungen verschieden sein können, lassen sich die Unterschiede in den Messungen zu Schmidt (2000) erklären. Außerdem zeigen diese Differenzen, dass die Giftwirkung für jede Fraktion getestet werden sollte, um eine maximale Wirkung zu erzielen.

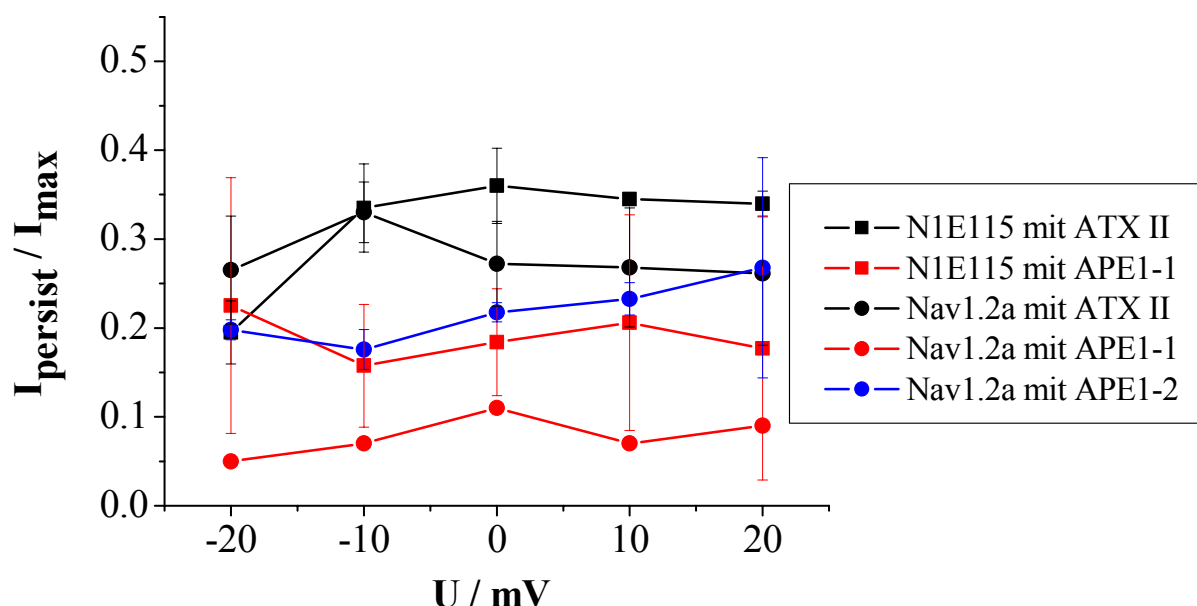


Abbildung 8.5 Verhältnis des persistierenden zum maximalen Natriumstrom $I_{\text{persist}} / I_{\text{max}}$ in Abhängigkeit vom Membranpotential unter Einwirkung verschiedener Anemonentoxine

Die Giftkonzentrationen entsprechen für Neuroblastomzellen denen aus Abbildung 8.3 und für HEK-Zellen denen aus Abbildung 8.4. $n = 2$, bis auf $n = 1$ für Nav1.2a mit APE 1-2

8.3 ChloraminT

Die Wirkung von ChloraminT auf Natriumkanäle ist gut dokumentiert und irreversibel (Ulbricht et al., 1986; Niemann et al., 1991; Huth, 1999). Die Whole-Cell-Messung in Abbildung 8.6 zeigt die typische Wirkung des ChloraminT im zeitlichen Verlauf an N1E115-Zellen.

Die Giftwirkung manifestiert sich in einer Zunahme des Spitzenstroms (bereits nach 1 min), einer Verlangsamung der Inaktivierung und in der Zunahme des persistierenden Stromanteils. Nach drei Minuten ist der maximale Spitzenstrom erreicht und nimmt dann wieder ab. Nach 5 Minuten erreicht der persistierende Strom sein Maximum, um dann parallel

zum Spitzenstrom abzunehmen. Nach 10 Minuten ist der stationäre Zustand fast erreicht (aus weiteren Messungen bekannt, Daten hier nicht gezeigt).

Quinonez et al. (1999) berichten einen sehr ähnlichen Stromverlauf in der zeitlichen Auflösung mit ChloraminT an Muskelfasern von *Bufus marinus*.

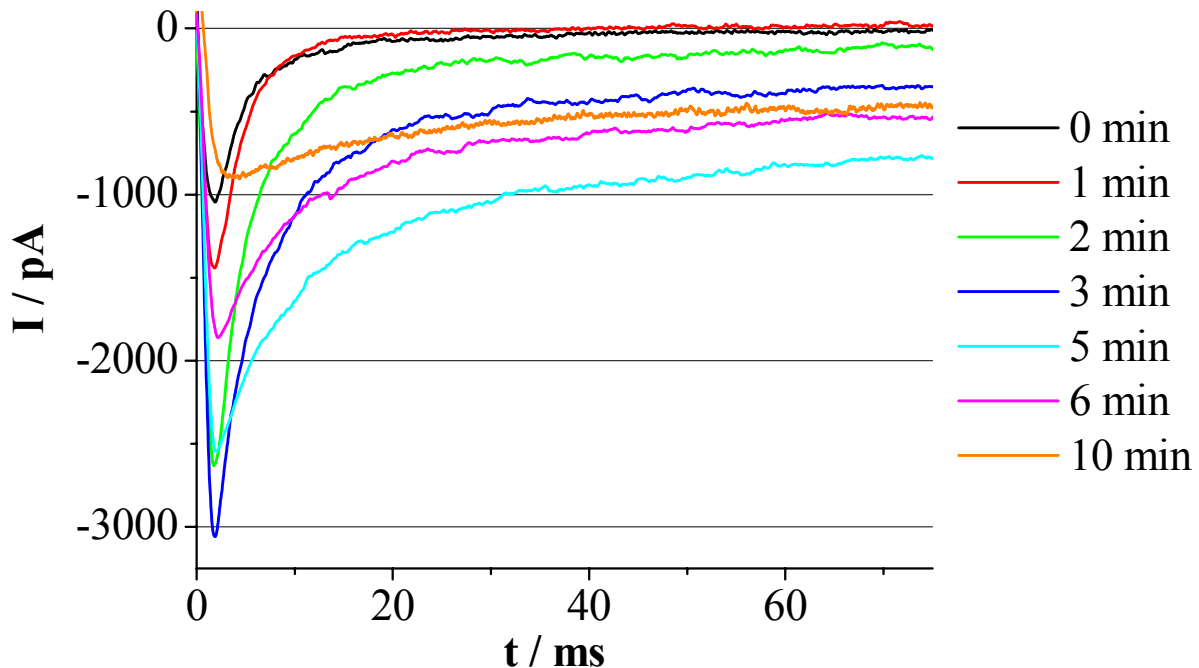


Abbildung 8.6 Whole-Cell-Ableitungen von Neuroblastomzellen mit ChloraminT im zeitlichen Verlauf, Applikation der 1 mM externen ChloraminT-Lösung über ein Glasfaserfilament, mit freundlicher Unterstützung von K. Bünnig, Physiologie in Kiel

Soft- und Hardware: PClamp 9.0, Axopatch 200A (siehe Methoden Takigawa & Alzheimer, 1999), Spannungssprung von -80 mV auf 0 mV

8.4 Nav1.2a F1489Q

Die Mutation F1489Q liegt zentral im Hinged-Lid-Mechanismus des Natriumkanals, der für die N-Typ-Inaktivierung des Kanals zuständig ist (Armstrong et al., 1973; Kellenberger et al., 1997a). In Abbildung 8.7 ist eine Ganzzelleableitung von transient transfizierten HEK293-Zellen mit der Natriumkanalmutante F1489Q (Mutation von Nav1.2a) abgebildet. Die Mutante zeigt gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 8.1) eine verlangsamte Inaktivierung, vor allem bei niedrigen Spannungen. Auch ist im Gegensatz zu Wildtyp ein etwas vergrößerter persistierender Strom (ca. 5%) in dieser Messung zu erkennen.

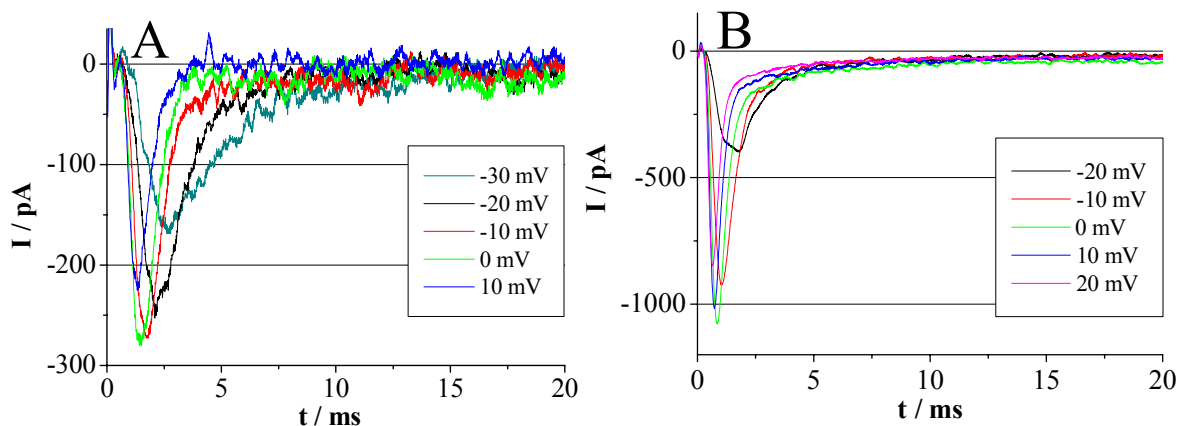


Abbildung 8.7 Whole-Cell Messung an HEK293-Zellen
A) Natriumkanalmutante Nav1.2a F1489Q in HEK293
B) Nav1.2a in HEK293 zum Vergleich
Spannungssprung von -80 mV auf die angegebene Spannung

Die Abbildung 8.8 zeigt das Verhältnis des persistierenden zum maximalen Natriumstrom in Abhängigkeit vom Membranpotential für 4 Ganzzelleableitungen. Dieses Verhältnis ist analog zu den vergifteten Kanälen ein Maß für die unvollständige Inaktivierung. Die großen Fehlerbalken zeigen an, dass der persistierende Stromanteil stark schwankt und auch mit etwas über 30% für den Spitzenwert deutlich unter den Werten von Kellenberger et al. (1997a) bleibt, der bei der Expression in Oozyten 90% beträgt. Dieses abweichende Ergebnis deckt sich mit den Einzelkanaldaten aus Abschnitt 9.5. Eine Spannungsabhängigkeit des persistierenden Stromanteils besteht nicht.

Die Strom-Spannungskurve aus Abbildung 8.9 zeigt bei der Mutante eine relativ große Streuung, die durch die geringen Ströme dieser Messungen (z.B. Abbildung 8.7) zu erklären ist. Insgesamt stimmt die Kurve für Spannungen ≥ -10 mV mit der Kurve des Wildtyps (gleiches Diagramm) überein. Bei negativeren Spannungen erfolgt die Aktivierung der mutierten Kanäle stärker. Die Streuung ist jedoch zu groß, und die Anzahl der Messungen zu klein, um dies eindeutig zu belegen.

Die maximalen Spitzenströme der Aktivierung sind mit 136 ± 56 pA (5 Messungen, 4 Patches, Daten nicht gezeigt) deutlich niedriger als der Spitzenstrom bei der Expression des Wildtyps, der für einige Zellen bis zu 2000 pA ansteigen kann. Dies zeigt, dass die Expressionsrate des mutierten Natriumkanals unter den gleichen Bedingungen wie bei der Transfektion des Wildtyps relativ klein ist.

Verschiedene Versuche, die Variation des Verhältnisses von DNA zu Transfektionssubstanz oder der Einsatz der Transfektionssubstanz Metafectene, konnten die Expressionsrate nicht signifikant verbessern (siehe Abschnitt 3.6 und Abschnitt 7.2).

Die erzielten Whole-Cell-Ströme lassen aber trotz der geringen Expressionsdichte der (funktionsfähigen) Kanäle eine erfolgreiche Einzelkanalmessung wahrscheinlich werden. Eine höhere Rate an Seals ohne Natriumkanal ist bei den Messungen an der Mutante aber zu erwarten.

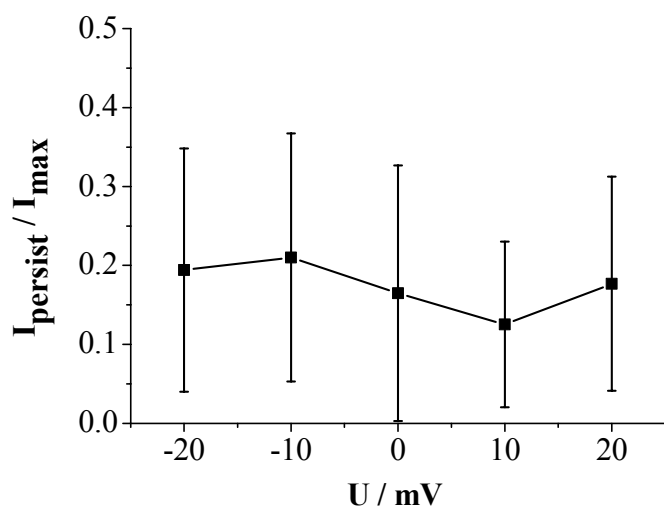


Abbildung 8.8 Verhältnis des persistierenden zum maximalen Natriumstrom $I_{\text{persist}} / I_{\text{max}}$
 I_{max} : Spitzenstrom der Aktivierung, in Abhängigkeit von dem Membranpotential bei der Nav1.2a Mutanten F1489Q (n = 4)

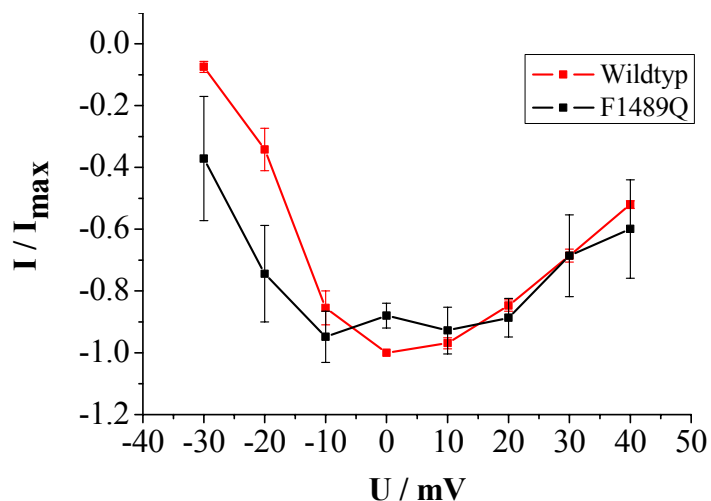


Abbildung 8.9 Normierte Strom-Spannungskurven von HEK293-Zellen mit Nav1.2a Mutante (n = 4)
 Zum Vergleich ist die Kurve des Nav1.2a-Wildtyp (n = 5) abgebildet. Die Spitzenströme der Aktivierung I sind auf den Spitzenstrom der Aktivierung I_{max} bei 0 mV normiert.

9 Einzelkanalmessungen

9.1 Nachweis des schnellen Schaltens beim MaxiK

Bei den Messungen am vergifteten Natriumkanal werden Einzelkanal-Ereignisse beobachtet, die eine verminderte Leitfähigkeit aufweisen (Abschnitt 9.6 und Abschnitt 10.1). Ebenso sind von anderen Kanälen in der Literatur diverse Beispiele für Unterleitfähigkeiten berichtet worden. Auch zu dem in dieser Arbeitsgruppe untersuchten Anormalen Molfraktionseffekt (Hansen et al., 2003), bei dem die Leitfähigkeit erniedrigt ist, zeigen sich Parallelen in Hinblick auf eine Stromreduktion.

Die zentrale Frage ist, ob die Reduktion der Leitfähigkeit durch schnelles Schalten (fast gating) hervorgerufen wird oder durch eine tatsächliche Verringerung der Kanalleitfähigkeit (Hansen et al., 1997, 2003; Townsend & Horn, 1999).

In Abschnitt 6.7 wurde bereit ein Verfahren mit dem 2D-Fit vorgestellt, mit dem sich die Stromniveaus, die durch schnelles Schalten reduziert werden, wieder rekonstruieren lassen. Um dieses Verfahren an gemessenen Daten zu testen und die Hypothese des schnellen Schaltens zu verifizieren, wird eine Messreihe mit dem MaxiK-Kanal untersucht. Dieser Kanal eignet sich für die Untersuchung deswegen so gut, weil er einen großen Einzelkanalstrom aufweist, der das Signal-Rauschverhältnis begünstigt.

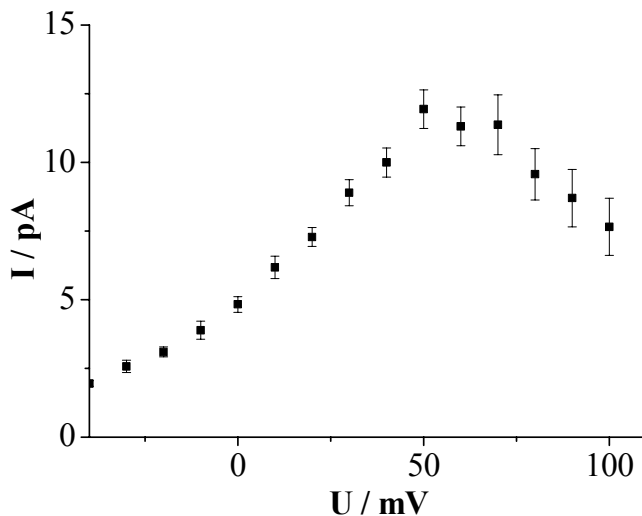


Abbildung 9.1 Einzelkanalleitfähigkeiten, negative Kennlinie bei MaxiK in HEK293
Kalium extern 5 mM; Kalium intern: 140 mM, n = 14, mit freundlicher Unterstützung von A. Klose, Physiologie Kiel

Abbildung 9.1 zeigt eine so genannte negative Kennlinie beim MaxiK, der Strom steigt nicht linear mit dem treibenden Potential. Eine Zeitreihe, die sich im Bereich der negativen Kennlinie befindet, wird mit dem Verfahren aus Abschnitt 6.7, ausgehend von dem scheinbaren Niveau, mit höheren Stromniveaus angepasst (symmetrisches Kalium 150 mM, Messung bei 140 mV, die Kennlinie ist gegenüber der Messung in der Abbildung ins Positive verschoben). Zusätzlich wird die gleiche Zeitreihe mit dem Beta-Fit aus Abschnitt 5.9 untersucht. Auch für den Beta-Fit werden die Niveaus variiert.

Für die Untersuchung wird die Zeitreihe so modifiziert, dass die Abschnitte ohne Kanalaktivität herausgeschnitten werden. Die verbleibende Zeitreihe wird mit dem Modell (9.1) angepasst. Dieses Modell, das zwei verschiedene C-O Übergänge ermöglicht, sollte für die Darstellung der Stromreduktion und des schnellen Schaltens ausreichend sein (Abschnitt 6.7).

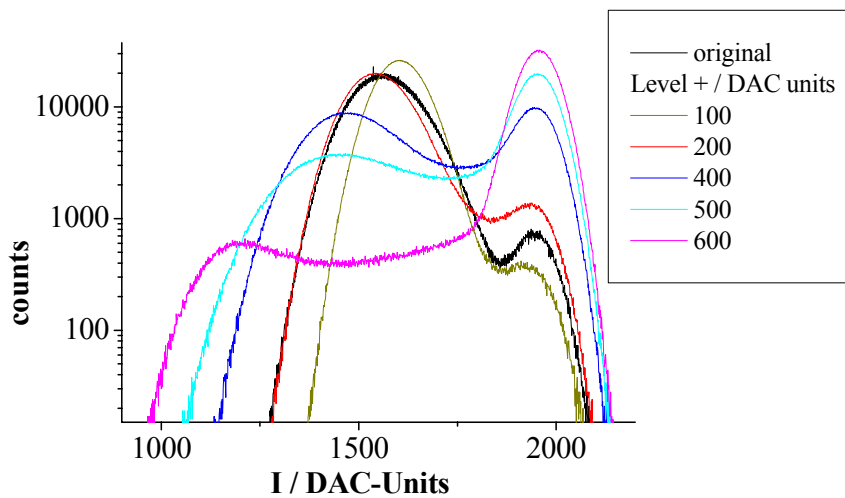


Abbildung 9.2 Anpassung einer MaxiK-Zeitreihe (schwarz) mit dem 2D-Fit
Die Zeitreihe wird unter Variation der Stromniveaus ausgehend vom scheinbaren Niveau (hier bei ca. 1550 Einheiten) mit dem 2D-Fit analysiert (Modell 9.1). Mit den ermittelten Ratenkonstanten werden Zeitreihen simuliert und daraus Amplitudenhistogramme erstellt.

Ausgehend von dem scheinbaren Stromniveau werden die Niveaus für den 2D-Fit und den Beta-Fit erhöht. Die Anpassung der Daten gelingt für beide Fit-Verfahren (Abbildung 9.2 und Abbildung 9.3A) am besten bei einer Erhöhung des Levels um 200 Einheiten (Abstand der scheinbaren Level: ca. 400 Einheiten). Insbesondere stimmen auch die Flanken der verbreiterten Verteilung (links) für den 2D-Fit mit den Messdaten überein.

Der Beta-Fit weist für dieses Niveau auch ein Minimum in der Fehlersumme der Anpassung auf (Abbildung 9.3B). Für den 2D-Fit sind die Fehlersummen für unterschiedliche Niveaus nicht vergleichbar, da die Anzahl der rauschbedingten Übergänge sich mit dem Niveau verändert und somit auch die Anzahl der Ereignisse im 2D-Histogramm.

Tabelle 9.1 zeigt die ermittelten Ratenkonstanten für beide Fit-Verfahren, wobei nur die schnellen Konstanten (fett dargestellt) von Bedeutung sind. Trotz der etwas größeren Werte von k_{23} und k_{32} für den 2D-Fit sind die Übereinstimmungen deutlich.

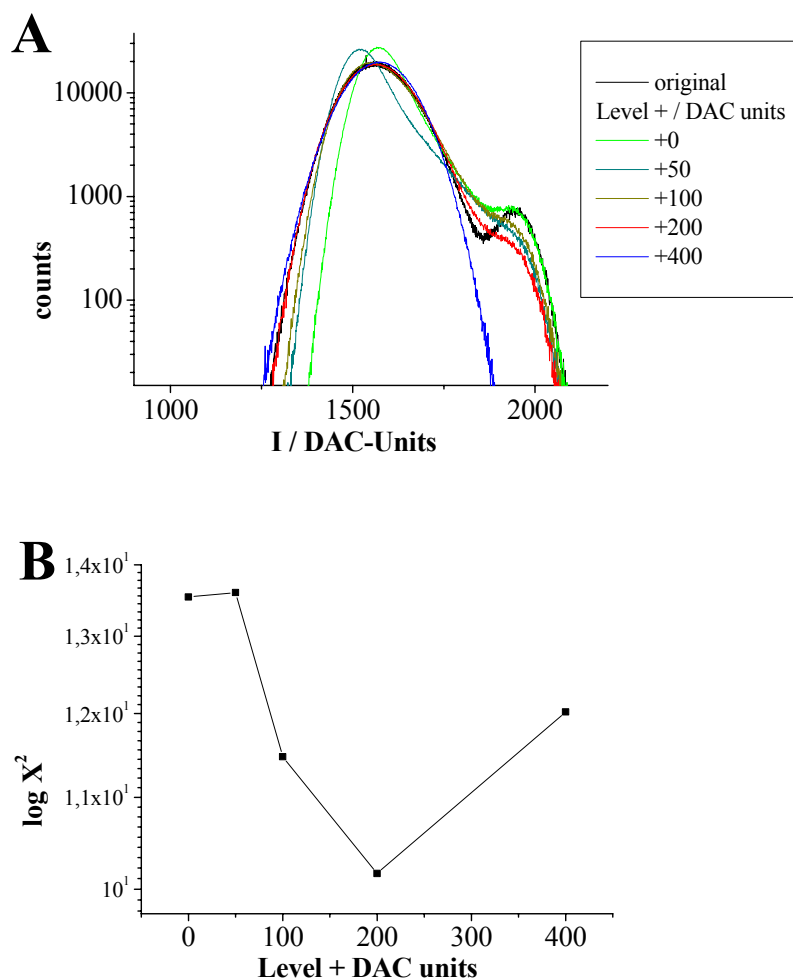


Abbildung 9.3 Anpassung der MaxiK-Zeitreihe mit dem Beta-Fit unter Variation der Stromlevel (A) Amplitudenhistogramme, (B) Fehlersummen der Anpassung für unterschiedliche Niveaus mit freundlicher Unterstützung von I. Schröder, ZBM Kiel

Fit-Verfahren	K_{12} / kHz	K_{21} / kHz	K_{23} / kHz	K_{32} / kHz
2D-Fit	77 ± 6	$8,8 \pm 0,9$	870 ± 90	1900 ± 200
Beta-Fit	130	5,7	740	1400

Tabelle 9.1 Ratenkonstanten der Anpassung des Modells (9.1) mit dem 2D-Fit ($n = 3$) und dem Beta-Fit

Die negative Kennlinie der Strom-Spannungs-Kurve des MaxiK kann mit dem Modell einer scheinbaren Reduktion der Einzelkanalleitfähigkeit durch schnelles Schalten im Bereich von 1-2 MHz erklärt werden. Das tatsächliche Niveau liegt dabei etwa 50% höher als die scheinbare Einzelkanalleitfähigkeit.

Der 2D-Fit und der Beta-Fit sind sich in der Vorhersage des wirklichen Stromniveaus und der zugrunde liegenden Ratenkonstanten einig. Beide Verfahren sind durch simulierte Daten abgesichert (für den 2D-Fit: Abschnitt 6.7; für den Beta-Fit: Rießner, 1998; Schröder et al., 2005). Eine wirkliche Reduktion der Leitfähigkeit des MaxiK erscheint somit äußerst unwahrscheinlich.

9.2 Behandlung der Pipetten

In Abbildung 9.4 sind sehr deutlich die Verbesserung des Messsignals durch das Trocknen der Pipetten bei 55°C für 24 h zu erkennen. Hierdurch werden die Zeitkonstanten des kapazitiven Artefaktes (Huth, 1999) deutlich schneller und die Amplitude des Rauschen kleiner. Außerdem erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, bei einem Patch-Versuch ein Seal zu erhalten auf über 90%. Dieses kann sowohl für HEK-Zellen, als auch für N1E115-Zellen nachgewiesen werden.

Insgesamt wird durch die in Abschnitt 4.8 beschriebene Vorbehandlung der Pipetten das Messen durch die hohe Seal-Wahrscheinlichkeit sehr erleichtert. Die deutlich kleineren Artefakte führen zu besseren Ergebnissen in der digitalen Nachkorrektur (siehe Abschnitt 5.2) für ereignisgesteuerte Messungen. Das verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis ist besonders für die Analyse der sehr kleinen Ströme mit ~ 2 pA bei Natriumkanälen von großer Bedeutung.

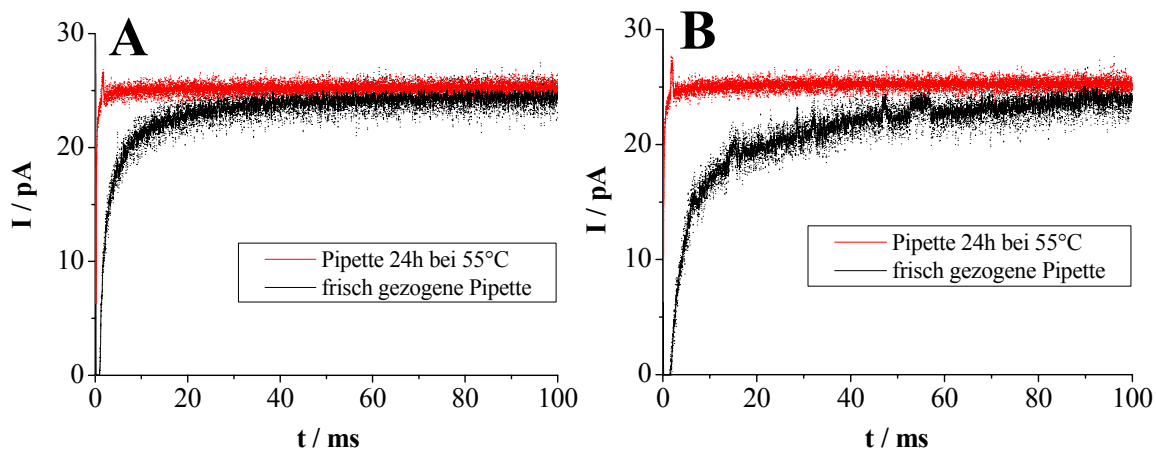


Abbildung 9.4 Vergleich der unterschiedlichen Vorbehandlung der Patch-Pipetten

Darstellung der Rohdaten (Punkte) nach einem Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV zum Zeitpunkt $t = 0$ ms, zusätzlich mit einem 15 Punkte Mittelwert-Filter gezeigt (Linien)

rot: typische Einzelkanalaufzeichnung, nach dem Ziehen der Pipette erfolgte ein „Trocknen“ für 24h bei 55°C, der Sealwiderstand beträgt ca. 100 G Ω

schwarz: typische Einzelkanalaufzeichnung, Verwendung von „frisch“ gezogenen Pipetten, der Sealwiderstand beträgt ca. 5 G Ω

(A) Messung an HEK-Zellen mit der Nav1.2a Mutanten F1489Q

(B) Messung an Neuroblastomzellen, unvergiftet (rot) und mit ATX II (schwarz)

Auf Grund der Beobachtung, dass bei trockenem Wetter die Patch-Clamp-Messungen besonders erfolgreich verlaufen, entstand die Idee dieser Vorbehandlung. Der Seal-Widerstand liegt fast immer über 50 G Ω , etwa um den Faktor 10 höher als bei nicht getrockneten Pipetten. Dieses wird durch die Daten in Tabelle 9.2 dargestellt. Die Seal-Bildung erfolgt sehr schnell. Eine Verbesserung des Seal-Widerstandes in den ersten Minuten wie bei der alten Methode ist nicht mehr zu beobachten.

Nach Benndorf (1995) ist Verkleinerung der Rauschamplitude durch die Abnahme frequenzunabhängiger Rauschanteile (Nyquist-Rauschen und Schrotrauschen) zu erklären, die zu $1/R$ proportional sind (R : Sealwiderstand). Mit den verwendeten Filtereinstellungen für den analogen Tiefpassfilter der Patch-Clamp-Anlage (10 kHz) wirkt sich eine Verbesserung des Sealwiderstandes bis auf ca. 100 G Ω auf den Rauschstrom aus (Benndorf, 1995). Für höhere Filterfrequenzen und / oder größere Widerstände werden die anderen, nicht R-abhängigen Rauschanteile dominierend.

Das schnellere Abklingen des kapazitiven Artefaktes ist auch auf die Verminderung der Pipettenkapazität zurückzuführen. Durch die Beschichtung mit dem Sigmacote kommt es zu einer Abnahme der Dielektrizitätskonstanten (siehe Benndorf, 1995). Auch ihre Verkleinerung vermindert den Verstärkungsfaktor für den kapazitiv bedingten Rauschanteil.

Weitere Beobachtungen zeigen, dass Pipetten, die länger als 48h getrocknet wurden, einen Alterungsprozess durchlaufen. Die Sealbildung erfolgt zwar sehr schnell, doch reißt die Membran danach fast immer ein, so dass das Seal nicht stabil bleibt.

Einen entscheidenden Nachteil für einige Messungen dieser Arbeit hat die Beschichtung mit Sigmacote (Sigma, Taufkirchen), unabhängig von der Trocknung der Pipetten. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Polysiloxan, chemisch ist es den Säulen für die Auftrennung der Seeanemonotoxine ähnlich. Das Gift wird offensichtlich an die Pipettenbeschichtung gebunden. So kann bei Einzelkanalmessungen mit dem Gift in der Pipette eine deutlich schwächere Giftwirkung beobachtet werden. Die Konzentration der Toxine muss ca. um den Faktor 10 gegenüber den Whole-Cell-Konzentrationen im Abschnitt 8.2 erhöht werden, um eine deutliche Wirkung zu erzielen.

Wird mit Giftkonzentration des ATX II $> 100 \mu\text{M}$ gemessen so nimmt die Qualität der Sealbildung wieder ab. Dieses ist ein Indiz für eine starke Interaktion des Sigmacotes mit der Zellmembran einerseits und mit den Giftmolekülen andererseits.

Pipetten	Sealwiderstand / $\text{G}\Omega$	n
24h 55°C	81 ± 16	9
frisch gezogen	6 ± 1	2
	< 1	4

Tabelle 9.2 Sealwiderstände an HEK293-Zellen

Die Pipetten werden intern vor dem Ziehen mit Sigmacote beschichtet. Die Pipetten haben in externer Lösung beschichtet und unbeschichtet einen Widerstand von $34 \pm 5 \text{ M}\Omega$. Mit einem Teil der frisch gezogenen Pipetten lässt sich kein richtiges Seal erreichen, dann ist der Widerstand deutlich unter $1 \text{ G}\Omega$.

9.3 Einzelkanalströme

In Abbildung 9.5 sind die Ströme aufgetragen, die anhand der Cell-Attached Messungen der Natriumkanäle bestimmt werden. Die Messungen mit Nav1.2a / F1489Q zeigen sowohl mit Seeanemonotoxinen als auch ohne eine größere Leitfähigkeit ($1,95 \pm 0,23 \text{ pA} \hat{=} 30 \text{ pS}$, $n = 12$, $E_{\text{Na}} = 66\text{mV}$) als die Messungen an Neuroblastomzellen ($1,66 \pm 0,16 \text{ pA} \hat{=} 25,5 \text{ pS}$, $n = 8$, $E_{\text{Na}} = 66\text{mV}$). Aufgrund des guten Signal-Rausch-Verhältnisses ($\text{SNR} \approx 4$) sind die Unterschiede der beiden Kanaltypen signifikant.

Die sorgfältige Eichung der Patch-Clamp-Anlage lässt einen Vergleich mit Literaturdaten zu. Niemann et al. (1991) haben eine Leitfähigkeit von $1,3 \text{ pS}$ und Schmidt (2000; selbe Anlage wie Niemann et al., 1991) eine von ca. 15 pS berichtet. Damit liegen die hier gemessenen Leitfähigkeiten mit $25,5 \text{ pS}$ deutlich über denen von Niemann et al. und Schmidt.

Zu beachten ist bei dem Vergleich, dass die in dieser Arbeit benutzte Filterfrequenz für die Messungen (10 kHz) höher liegt als bei den beiden anderen Autoren. Das kann bei den

anderen Autoren, insbesondere bei den kurzen Ereignissen der unvergifteten Natriumkanäle zu einer niedrigeren Einschätzung der Stromniveaus führen.

Für die Nav1.2a-Untereinheiten des Natriumkanals können zum Vergleich leider keine expliziten Leitfähigkeiten der Literatur entnommen werden. Somit lässt sich der oben genannte Unterschied zwischen Nav1.2a und Neuroblastomzellen nicht anhand von anderen Daten überprüfen. Die Ursache könnte allerdings darin liegen, dass die bei Cell-Attached-Messungen nicht zu kontrollierenden Membranpotentiale von N1E115-Zellen und HEK-Zellen nicht exakt gleich sind.

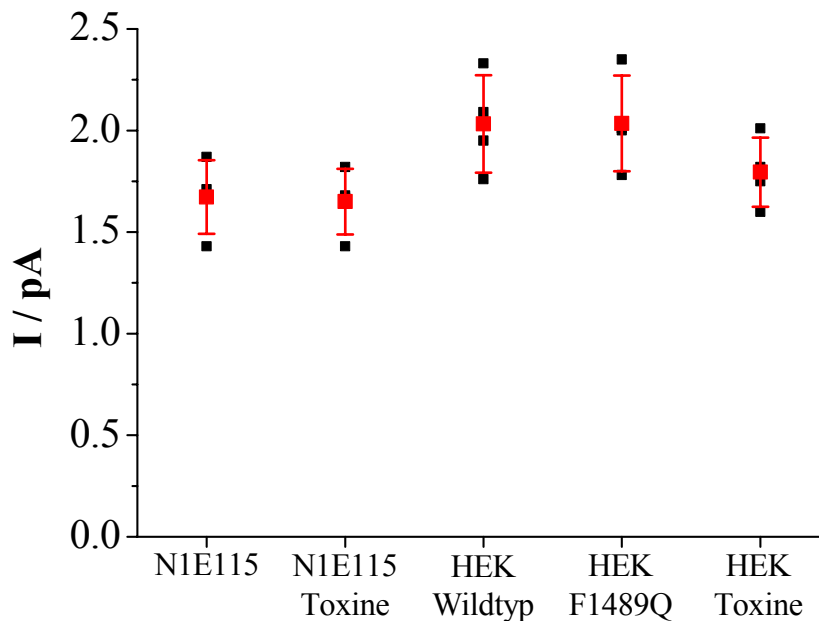


Abbildung 9.5 Einzelkanalströme an vergifteten (Seeanemontoxine) und unvergifteten N1E115-Zellen und an HEK293 mit Nav1.2a und mit F1489Q

Die Ströme sind in der Cell-Attached Konfiguration bei ca. 0 mV Membranpotential bestimmt (n=4).

9.4 Einzelkanalaufzeichnungen der unvergifteten Kanäle

Die Einzelkanalaufzeichnungen aus Abbildung 9.6 und die Strom-Averages aus Abbildung 9.7 zeigen die typischen Strom-Antworten von unvergifteten Natriumkanälen auf einen depolarisierenden Spannungssprung. Die Kanäle öffnen kurz nach dem Impuls und schließen nach einer kurzen leitenden Phase wieder. Während die Kinetik der Aktivierung bei den Kanälen der Neuroblastomzellen und der Nav1.2a in HEK-Zellen gleich ist, erfolgt die vollständige Inaktivierung bei den HEK-Zellen mit Nav1.2a etwas schneller.

Anhand der 2D-Histogramme in Abbildung 9.8 und der Ereignisabfolge in Abbildung 9.9 kann dieser Unterschied alleine auf die unterschiedlichen Closed-Zustände zurückgeführt werden.

Tabelle 9.4 zeigt die wichtigsten Parameter von drei Einzelkanalmessungen an N1E115-Zellen und an HEK-Zellen mit Nav1.2a Kanal, die in diesem Abschnitt betrachtet werden.

Natriumkanal	N1E115	HEK293 mit Nav1.2a
Messreihe	130803b	100703h+g
Messart	cell attached	cell attached
Kanäle	2	1
Abtastfrequenz / kHz	100	100
Filterfrequenz / kHz	10	10
Länge (Abschnitte á 100 ms)	4209	3249
Ereignisse (Hinkley-Detektor)	8224	5653
Artefakt / ms	0,12	0,18
Kanalstrom / pA	1,87	1,95
Rauschen / pA	0,47 pA	0,47 pA
A_a / pA	814	2397
τ_a (Aktivierung) / ms	0,20	0,20
A_i / pA	608	2197
τ_i (Inaktivierung) / ms	0,98	0,54

Tabelle 9.3 Unvergiftete Einzelkanalmessung an N1E115-Zellen und HEK-Zellen mit Nav1.2a

Die Amplitudenfaktoren und Zeitkonstanten der Aktivierung (τ_a , A_a) und Inaktivierung (τ_i , A_i) werden nach Gleichung (9.2) und (9.3) für $n = 1$ ermittelt.

Daten der Zeitreihen 130803b und 100703h+g, Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

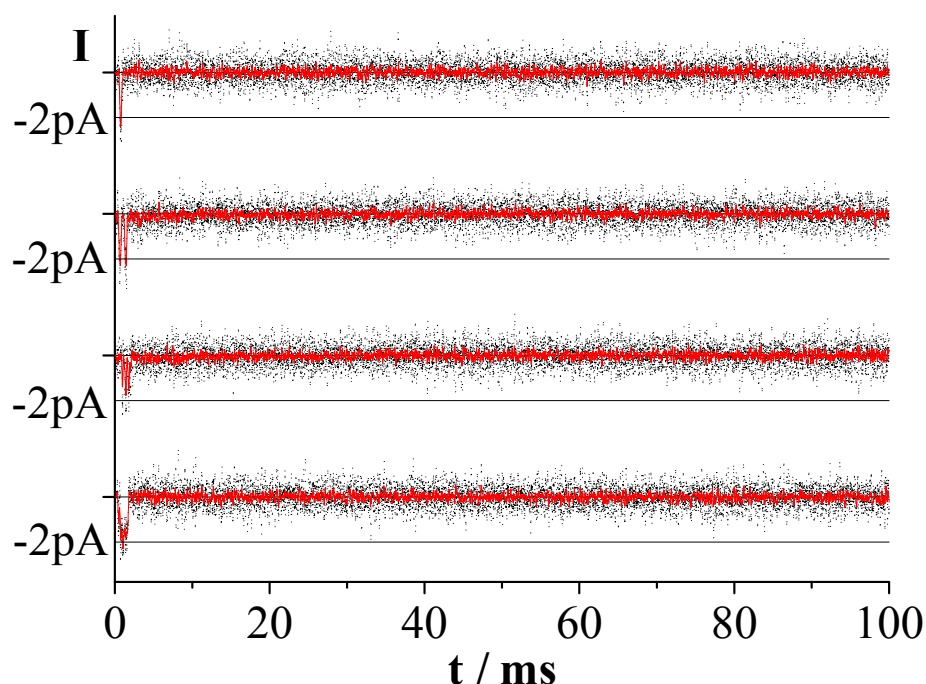


Abbildung 9.6 4 typische Einzelkanalaufzeichnungen an HEK-Zellen mit Nav1.2a (Zeitreihe 100703h+g)
Die schwarzen Punkte stellen die bei 10 kHz gefilterte Zeitreihe da. Die roten Linien sind aus einem 15-Punkte Mittelwertfilter gewonnen.

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

Strom-Averages (aufaddierte Einzelkanalströme):

Die aufaddierten normierten Einzelkanalmessungen (Strom-Averages) in Abbildung 9.7 werden mit einer sehr guten Übereinstimmung für die Aktivierung (9.2) und für die Inaktivierung (9.3) von Exponentialfunktionen mit jeweils einer Zeitkonstanten angepasst (τ_a und τ_i in Tabelle 9.3).

Die Averages zeigen für beide Messungen einen identischen Verlauf des Stromanstieges. Die maximale Offen-Wahrscheinlichkeit der Kanäle ist nach ca. 0,75 ms erreicht. Die Zeitkonstanten für die Aktivierung betragen jeweils $\tau_a = 0,20$ ms. Der gleiche Verlauf in der Phase der Aktivierung spricht für eine gute Übereinstimmung des aktivierenden Potentials (~ 0 mV).

Durch die gute Übereinstimmung wird auch das Auseinanderweichen der Kurven in der Phase der Inaktivierung signifikant. Die Kanäle der N1E115-Zellen inaktivieren hier etwas später ($\tau_i = 0,98$ ms) als die Nav1.2a-Kanäle ($\tau_i = 0,54$ ms).

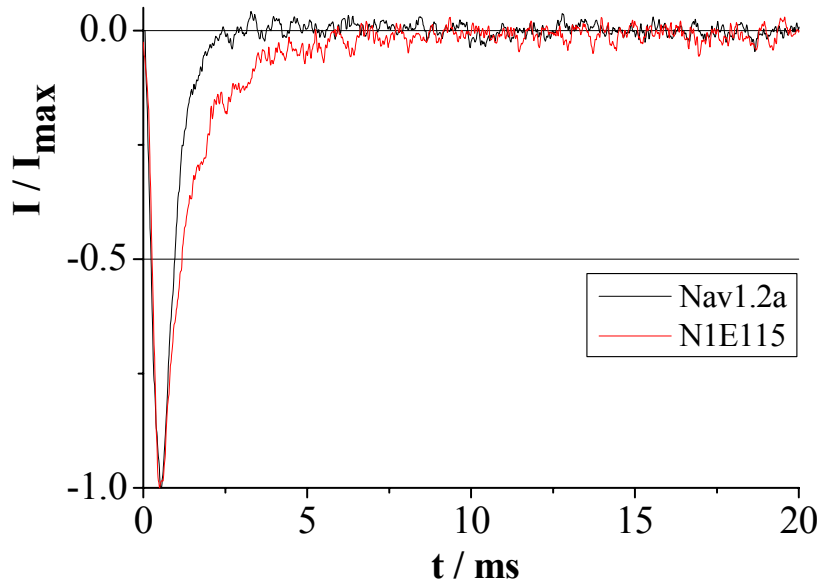


Abbildung 9.7 Normierte Strom-Averages (aufaddierte Einzelkanaldaten) der Messungen aus Tabelle 9.3

$$I(t) = \sum_n A_n \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_n}} \right) \quad (9.2)$$

Funktion für die Anpassung der Aktivierung.

n: Anzahl der benötigten Zeitkonstanten für die Anpassung der Strom-Averages

τ_n : Zeitkonstanten der Aktivierung

A_n : Amplitudenfaktor der Aktivierung

$$I(t) = \sum_n A_n e^{-\frac{t}{\tau_n}} + A_0 \quad (9.3)$$

Funktion für die Anpassung der Inaktivierung.

n: Anzahl der benötigten Zeitkonstanten für die Anpassung der Strom-Averages

τ_n : Zeitkonstanten der Inaktivierung

A_n : Amplitudenfaktor der Inaktivierung

A_0 : persistierender Stromanteil

2D-Histogramme:

Die 2D-Histogramme beider Messungen in Abbildung 9.8 zeigen im Wesentlichen die gleiche Charakteristik. Für die Interpretation der Diagramme sei auf die Legende zu Abbildung 9.8

verwiesen. Das Maximum (Markierung 3) in Abbildung 9.8A der N1E115-Messung ist im Vergleich zu den Nav1.2a weiter in Richtung längerer Closed-Abschnitte ausgedehnt. Zwischen dem depolarisierenden Spannungspuls und der ersten Öffnung, bzw. zwischen mehrfachen Öffnungen liegen längere geschlossene Abschnitte. Hierdurch ist die etwas langsamere Inaktivierung der N1E115-Zellen gegenüber den Nav1.2a-Kanälen zu erklären.

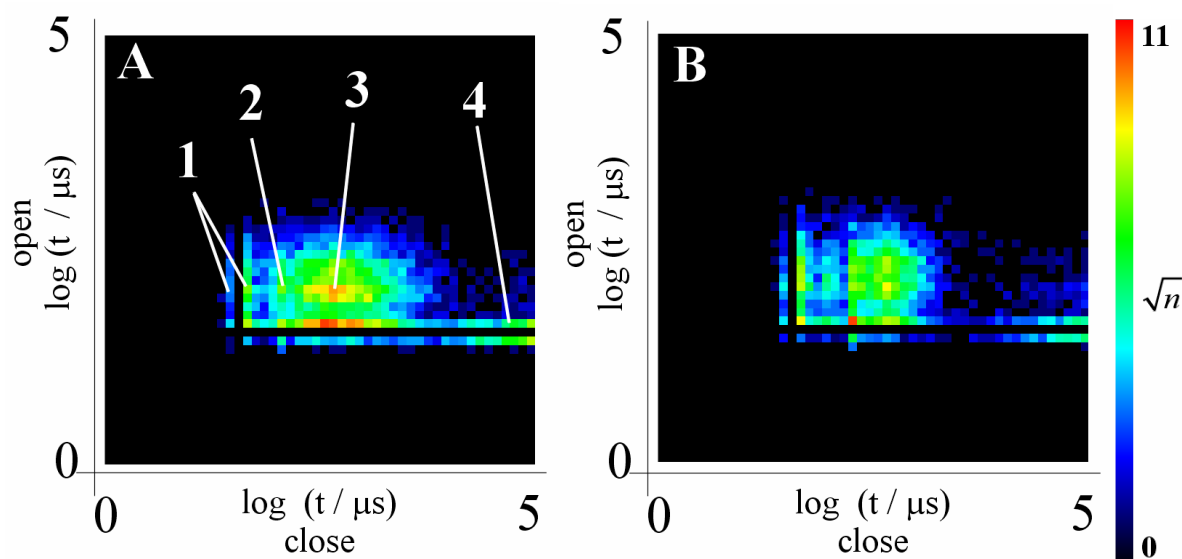


Abbildung 9.8 2D-Histogramme
 (A) N1E115 unversehrt (Zeitreihe 130803b)
 (B) HEK293 mit Nav1.2a unversehrt (Zeitreihe 100703h+g)

Für die Interpretation der 2D-Diagramme in diesem Kapitel gilt:

- A) 1: sehr kurze Closed-Zustände, „Kante“ in der Darstellung mit leerem Bin in der Mitte, hervorgerufen durch die Integration des Hinkley-Detektors in Bezug auf die Abtastfrequenz
 A) 2: kurze Closed-Zustände, „Kante“ in der Darstellung durch die Artefaktkorrektur der ersten 0,12 ms
 A) 3: mittellange Closed-Zustände mit benachbarten mittellangen Open-Zuständen, Hauptanteil der Ereignisse des unversehrten Natriumkanals
 A) 4: lange Closed-Zustände mit benachbarten kurzen Open-Zuständen, hauptsächlich durch Rauschereignisse (false alarms des Detektors) hervorgerufen

Für die teilweise Unterdrückung dieses Rauschanteils und die bessere Aussteuerung der anderen Anteile des Diagramms ist der Hinkley-Detektor auf ein höheres Stromniveau eingestellt als es der Leitfähigkeit des Kanals entspricht.

Für das Histogramm werden Messungen mit mehreren Kanälen wie Einzelkanalmessungen behandelt, z.B. wie in (A) wird nur ein leitender Stromlevel vorgegeben. Die Fehler in der Darstellung der Diagramme durch gleichzeitige Öffnungen mehrerer Kanäle sind gering, da bei der geringen Offen-Wahrscheinlichkeit der Natriumkanäle diese Ereignisse sehr selten auftreten.

Ereignisabfolge (sequentielle Dwell-Time-Histogramme):

In Abbildung 9.9 ist die Ereignisabfolge für die unversehrten Messungen an Neuroblastomzellen und HEK-Zellen mit Nav1.2a dargestellt. Insgesamt sind die Diagramme sehr ähnlich für beide Kanaltypen, die Open-Diagramme (B) und (D) können sogar als gleich angesehen werden. Für die Closed-Ereignisse können mindestens 3 Zeitkonstanten

unterschieden werden bei ca. 0,06 ms, 1 ms, 40 ms und für die Open-Ereignisse zwei bei ca. 0,05 ms und 0,1 ms.

Die Unterschiede liegen zum einen in der Breite der C1-Verteilungen in (A) und (C). Hier kann für die Aktivierung der Kanäle der N1E115-Zellen ein längerer C₁-Zustand (A) als für die Nav1.2a-Kanäle in (C), eventuell sogar im Gegensatz zu (C) 2 Closed-Zustände angenommen werden. Zum anderen ist die Verteilung der weiteren Closed-Ereignisse in (A) deutlich zweigipflig bei 0,06 ms und 1 ms, in (C) ist das erste Maximum bei 0,06 ms betont und das zweite nur noch schwach ausgeprägt.

Dieses doppelte Maximum der Closed-Ereignisse scheint für die meisten Ableitungen der Neuroblastomzellen typisch zu sein, wie die folgenden Messungen in diesem Kapitel zeigen.

Eine Ausnahme hiervon bildet die Messung in Abbildung 9.25, die wiederum der Messung an Nav1.2a sehr ähnlich ist. Wie bereits in Abschnitt 8.1 gezeigt, handelt es sich bei den Natriumkanälen der N1E115-Zellen nicht um eine einheitliche Population. Mit den Abbildungen der Ereignisabfolge lassen sich wahrscheinlich mindestens 2 Subtypen einfach unterscheiden (wahrscheinlich Nav1.2 und Nav1.3, Benzinger et al., 1999).

Die langen Closed-Ereignisse >10 ms in (A) und (C) sind wie in der Legende zu Abbildung 9.8 bereits besprochen, mit den false alarms des Hinkley-Detektors assoziiert.

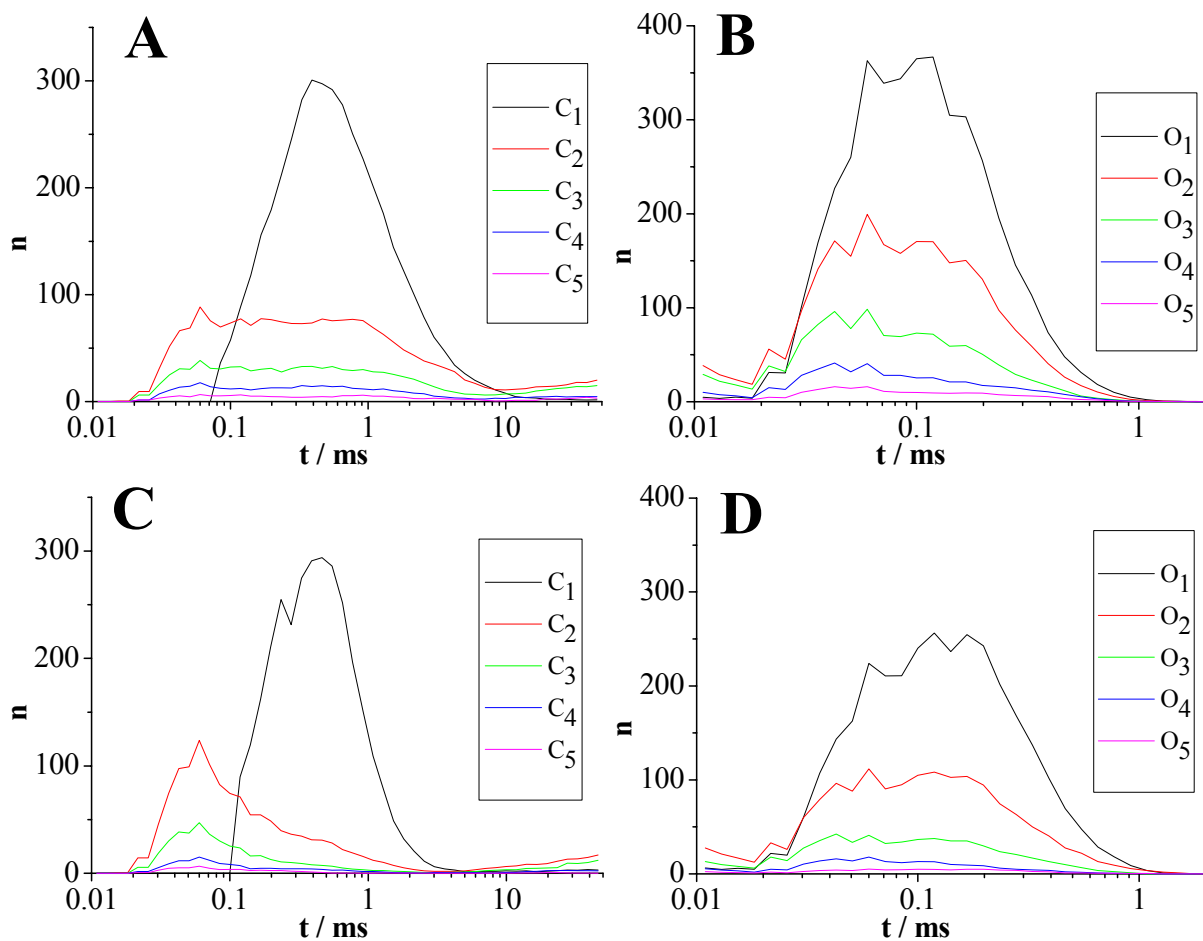


Abbildung 9.9 Ereignisabfolge (Methode siehe Abschnitt 5.7) für geschlossene und offene Zustände von unvergifteten Messungen

(A) und (B) von N1E115-Zellen (Zeitreihe 130803b)

(C) und (D) von HEK-Zellen mit Nav1.2a (Zeitreihe 100703h+g)

9.5 Einzelkanalaufzeichnungen von HEK293 mit Nav1.2a F1489Q

In Abbildung 9.10 sind typische Einzelkanalaufnahmen der Nav1.2a-Mutante F1489Q abgebildet. Im Vergleich zu dem Wildtyp sind die Öffnungen des Kanals, die auf einen depolarisierenden Spannungspuls folgen, etwas länger und es kommt zu mehrfachen Öffnungen, die beim Wildtyp nicht so häufig beobachtet werden können. Die Inaktivierung des Kanals erfolgt fast vollständig, die Wahrscheinlichkeit für ein erneutes Öffnen des Kanals wie in der untersten Spur in Abbildung 9.10 ist gering.

Tabelle 9.4 zeigt die wichtigsten Parameter von 3 Messungen an der Nav1.2a-Mutanten F1489Q. Es existieren noch zwei weitere Messungen, die ein Schaltverhalten wie in Abbildung 9.10 aufweisen, für eine statistische Auswertung aber zu wenige Ereignisse zeigen. Damit sind die Unterschiede zu den Messung dieses Kanaltyps an Oozyten von Kellenberger et al. (1997a) eindeutig.

Messreihe	140803a	150803a	160803d
Messart	cell attached	cell attached	cell attached
Kanäle	1	1	1
Abtastfrequenz / kHz	100	100	100
Filterfrequenz / kHz	10	10	10
Länge (Abschnitte á 100 ms)	439	493	546
Ereignisse (Hinkley-Detektor)	858	1336	844
Artefakt / ms	0,09	0,18	0,10
Kanalstrom / pA	1,78	2,35	2,01
Rauschen / pA	0,47	0,53	0,50
A_a / pA	448	430	716
τ_a (Aktivierung) / ms	0,23	0,29	0,22
A_i / pA	369	414	588
τ_i (Inaktivierung) / ms	0,68	1,6	0,65

Tabelle 9.4 Einzelkanalmessung an HEK293 Nav1.2a Mutante F1489Q

Die Amplitudenfaktoren und Zeitkonstanten der Aktivierung (τ_a , A_a) und Inaktivierung (τ_i , A_i) werden nach Gleichung (9.2) und (9.3) für $n = 1$ ermittelt.

Daten der Zeitreihen 140803a, 150803 und 160803d, Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

Strom-Averages (aufaddierte Einzelkanalströme):

Die normierten Strom-Averages aus Abbildung 9.11 zeigen für die schwarze und grüne Kurve eine weitgehende Übereinstimmung, genauso wie die analog zu Abschnitt 9.4 bestimmten Zeitkonstanten aus Tabelle 9.4. Die Aktivierung ist mit $\tau_a = 0,23$ und $0,22$ ms nicht von denen des Wildtyps und der Neuroblastomzellen mit $\tau_a = 0,2$ ms (Tabelle 9.3) zu unterscheiden. Die Zeitkonstante für die Inaktivierung mit $\tau_i = 0,68$ und $0,65$ sind etwas langsamer als die des Wildtyps mit $\tau_i = 0,54$ ms und spiegeln das unterschiedliche Einzelkanalverhalten aus Abbildung 9.10 nur wenig wieder.

Die rote Kurve der Strom-Averages ist wegen der deutlich langsamer Zeitkonstante der Aktivierung von $\tau_a = 0,29$ ms und der Inaktivierung von $\tau_i = 1,58$ ms auf ein niedrigeres Membranpotential bei den Cell-Attached-Messungen zurückzuführen. Die veränderte Charakteristik des Schaltverhaltens ist hier aber deutlicher ausgeprägt (Abbildung 9.10).

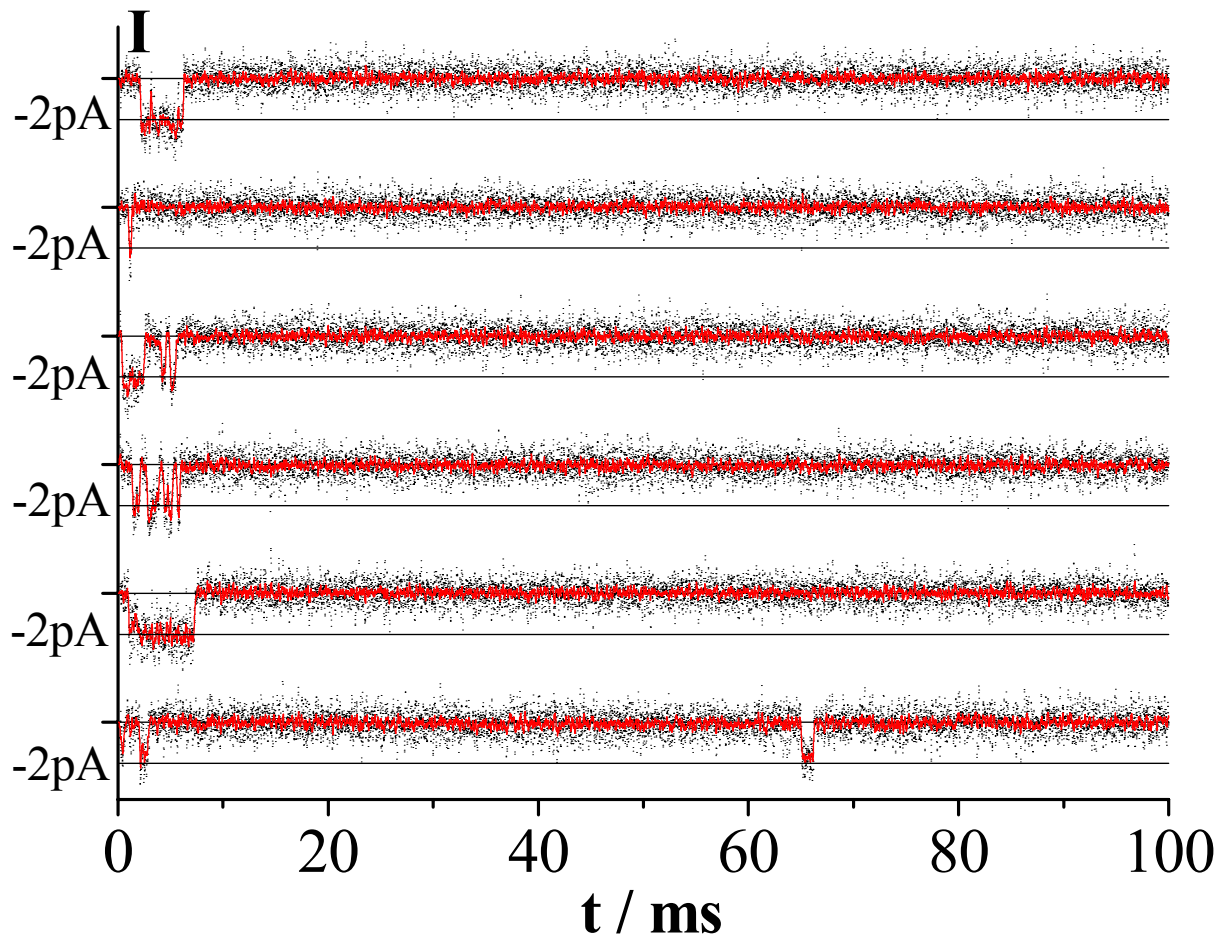


Abbildung 9.10 typische Einzelkanalaufzeichnungen der Zeitreihe 150803a
 Die schwarzen Punkte stellen die bei 10 kHz gefilterte Zeitreihe da. Die roten Linien sind aus einem 15-Punkte Mittelwertfilter gewonnen.
 Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

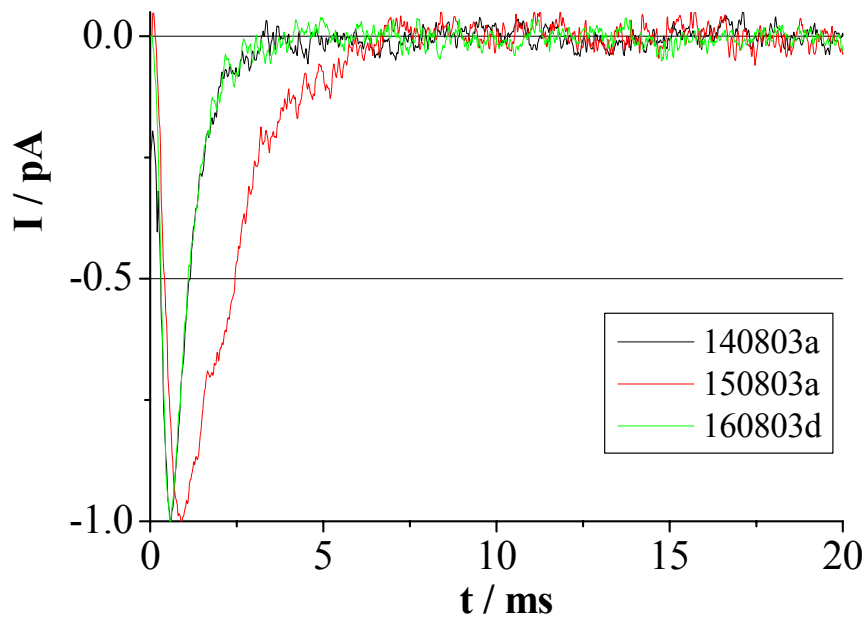


Abbildung 9.11 Normierte Strom-Averages (aufaddierte Einzelkanaldaten) der HEK-Zellen mit der Mutante F1489Q
 Zeitreihen: 140803a, 150803a, 160803d, Glättung durch einen 25-Punkte-Mittelwertfilter

2D-Histogramme:

Das 2D-Histogramm der Abbildung 9.12A zeigt nur geringfügige Unterschiede zu dem Diagramm des Wildtyps in Abbildung 9.12B. Das Hauptmaximum ist etwas zu längeren Closed-Zuständen verschoben. Außerdem sind die Länge und der Anteil längerer Open-Zustände etwas größer.

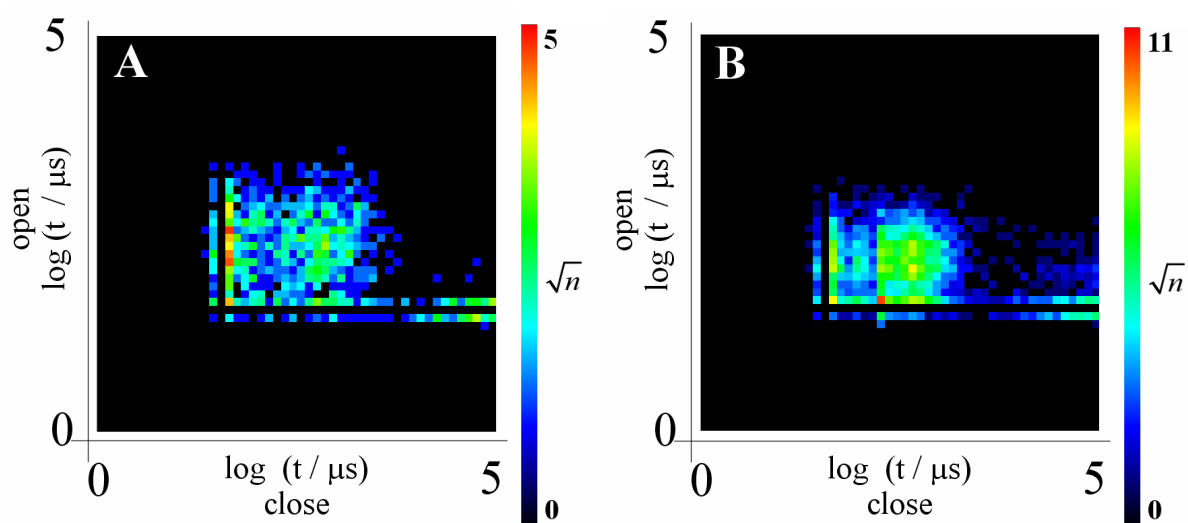


Abbildung 9.12 2D-Histogramm von Einzelkanal-Aufzeichnungen
 (A) HEK293 mit Nav1.2a F1489Q (Zeitreihe: 150803a)
 (B) HEK293 mit Nav1.2a unvergiftet (Zeitreihe 100703h+g)

Ereignisabfolge (sequentielle Dwell-Time-Histogramme):

Die Diagramme der Ereignisabfolge der Open- und Closed-Ereignisse in Abbildung 9.13 können die Unterschiede im Schaltverhalten der F1489Q Mutanten zu dem Nav1.2a-Wildtyp in Abbildung 9.9 (C) und (D) deutlicher herausheben als die Strom-Averages und die 2D-Histogramme.

Das erste Closed-Ereignis C_1 unterscheidet sich nicht wesentlich von der des Wildtyps. Die Unterschiede treten erst in den folgenden Ereignissen auf. Der Anteil weiterer Closed-Ereignisse in (A) ($C_2 - C_5$) ist deutlich größer als beim Wildtyp. Das gleiche gilt für die Open-Ereignisse ($O_2 - O_5$) in (B). Weiterhin erfolgt das langsame Maximum der Open-Ereignisse (0,4 ms) später als beim Wildtyp (0,2 ms), und es kommt zu einem Überschneiden der Kurven O_1 und der folgenden Öffnungen mit einer starken Ausprägung eines beim Wildtyp nicht vorhandenen schnellen Maximums bei 0,04 ms.

Dieser Befund ist mit dem beobachteten Schaltverhalten der Mutanten F1489Q zu vereinbaren. Die Schaltereignisse sind teilweise länger als beim Wildtyp und teilweise kommt es zu kurzen Mehrfachöffnungen, die beim Wildtyp in dieser Häufigkeit nicht beobachtet werden können.

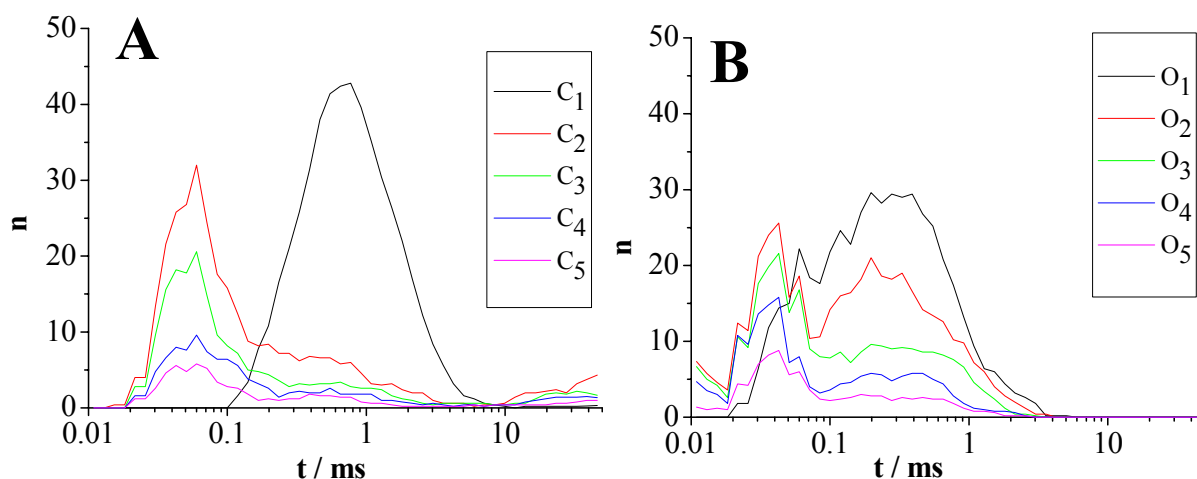


Abbildung 9.13 Ereignisabfolge (Methode siehe Abschnitt 5.7) für (A) geschlossene und (B) offene Zustände der Einzelkanal-Aufzeichnung der Mutanten F1489Q (Zeitreihe 150803a)

9.6 Einzelkanalaufzeichnungen mit ChloraminT

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass das irreversibel bindende ChloraminT (Wang, 1984; Quinonez et al., 1999) den Natriumkanal im zeitlichen Verlauf stufenweise verändert. Vier Stufen (Bindungsstellen) können in den Einzelkanalableitungen identifiziert werden, die sich auf die schnelle Inaktivierung auswirken.

Dieses Stufenmodell ist kompatibel zu der beobachteten Veränderung des persistierenden Stroms der Whole-Cell-Messungen aus Abschnitt 8.3. Die Steigerung der Aktivierung (siehe unten) erklärt den zunehmenden Spitzenstrom in den Messungen. Durch den Mode 4 mit reduziertem Einzelkanalstrom (siehe unten) ist die Abnahme des Spitzenstroms und des persistierenden Stroms in den Whole-Cell-Messungen sehr einfach zu erklären.

Die Abfolge der Stufen erfolgt bei den ausgewerteten Messungen immer in der gleichen Reihenfolge. Qualitative Unterschiede können für die 3 benutzten Versuchsobjekte N1E115-Zellen, HEK-Zellen mit Nav1.2a und mit der Nav1.2a Mutanten F1489Q nicht beobachtet werden.

Einzelkanalmessungen:

Typische Einzelkanalaufzeichnungen von Natriumkanälen, die mit ChloraminT vergiftet werden sind für N1E115-Zellen der Abbildung 9.14 und für HEK-Zellen mit der F1489Q Mutanten der Abbildung 9.15 zu entnehmen. Entsprechend der Schaltmoden, die in Tabelle 9.7 definiert sind, sind die Aufzeichnungen farbig dargestellt (Mode: 1, 2, 3). Die zugehörigen Parameter der Zeitreihen sind der Tabelle 9.5 und der Tabelle 9.4 zu entnehmen.

Für die Bestimmung der Moden werden Zeitreihen Abschnitt für Abschnitt bewertet. Durch die verwendete Aufzeichnungstechnik (Abschnitt 4.3) ist das Schaltverhalten (fast) ohne Unterbrechung von der Sealbildung bis zur spontanen Zerstörung des Seals dokumentiert. Tritt entsprechend der Definition in Tabelle 9.7 das Schaltverhalten eines höheren Modes auf, so wird dies festgehalten. Als Beispiel hierfür sei Tabelle 9.5 angeführt, in der zusätzlich zu den Parametern der Zeitreihe die Anzahl der Abschnitte und die Anzahl der Ereignisse pro Mode (Mode 1-3) aufgezeichnet sind. Für die Bewertung der Moden ist

von Bedeutung, dass in einem Schaltmode das Schaltverhalten eines niedrigeren Modes weiterhin auftreten kann, aber nicht das eines höheren (Mode 1-3).

Für 7 Messungen ist in Tabelle 9.8 der einheitliche Ablauf der Modes dokumentiert. Dieser Ablauf ist unabhängig von dem untersuchten Kanaltyp, insbesondere tritt er auch bei der Mutante F1489Q auf. In einigen Messungen kann nicht jeder Mode beobachtet werden. Hier ist davon auszugehen, dass der Übergang in einen höheren Mode relativ schnell erfolgt und nicht mehr zeitlich aufgelöst werden kann.

Die Modes sind so charakteristisch, dass auch bei Mehrkanalaufzeichnungen die Modes von einzelnen Kanälen in der zeitlichen Abfolge zugeordnet werden können (Tabelle 9.8). Dabei hilft besonders der Mode 4 bei der Unterscheidung der Modes in den einzelnen Kanälen. Nach dem Eintreten des Modes 4 beim ersten Kanal können alle Ereignisse mit erniedrigtem Stromniveau diesem Kanal zugeschrieben werden.

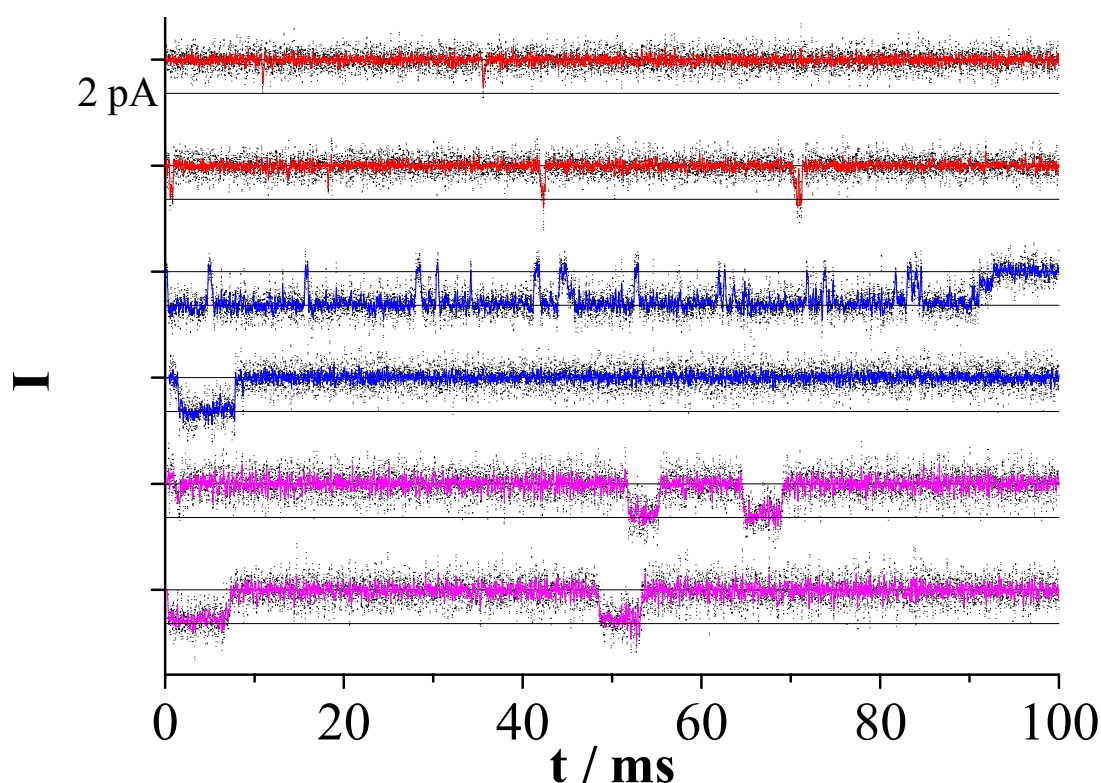


Abbildung 9.14 Einzelkanalaufzeichnungen an Natriumkanälen von N1E115-Zellen, die mit ChloraminT vergiftet werden

Das Schaltverhalten in Mode 1 ist typisch für die roten Aufzeichnungen, blau für Mode 2 und magenta für Mode 3. Die schwarzen Punkte sind die bei 10 kHz gefilterte Zeitreihe. Die farbigen Linien sind aus einem 15-Punkte Mittelwertfilter gewonnen.

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

In Abbildung 9.16 sind die Ausschnitte zweier Zeitreihen dargestellt, die je zwei Kanäle zeigen, von denen nur einer die verminderte Leitfähigkeit des Modes 4 zeigt. In den beiden roten Spuren in Abbildung 9.16 ist sogar die Superposition beider Leitfähigkeiten zu erkennen.

In beiden Zeitreihen können zu Beginn der Messung (nicht dargestellt) zwei Kanäle mit voller Leitfähigkeit beobachtet werden, später ein Kanal mit verminderter (Abbildung

9.16) und zum Schluss zwei Kanäle mit verminderter Leitfähigkeit (nicht dargestellt). Die reduzierte Leitfähigkeit kann durch je einige hundert zusammenhängende Spuren in den beiden Messungen belegt werden. Damit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nachgewiesen, dass die verminderte Leitfähigkeit unabhängig von den Modes 1-3 ist und als Mode 4 fortgeführt werden kann.

Ein weiterer Unterschied in den Modes betrifft die langsame Inaktivierung. Durch Auszählen der Messspuren mit Schaltereignissen kann die langsame Inaktivierung der Natriumkanäle abgeschätzt werden. Je höher der Anteil der Spuren mit Ereignissen ist, desto geringer ist die langsame Inaktivierung ausgeprägt. In Mode 1 beträgt der Anteil der Spuren mit Schaltereignis 11%, in Mode 2 42% und in Mode 3 und Mode 4 ca. 85% (Tabelle 9.5).

Messreihe	220803b			
Messart	cell attached			
Kanäle	1			
Abtastfrequenz / kHz	100			
Filterfrequenz / kHz	10			
Artefakt / ms	0,12			
	Mode 1	Mode 2	Mode 3	Mode 4
Länge (Abschnitte á 100 ms)	165	935	2343	248
Ereignisse (Hinkley-Detektor)	384	2347	52252	2525
Kanalstrom / pA	2,09	2,09	2,09	1,14
Rauschen / pA	0,53	0,62	0,67	0,57
A_a / pA	46,2	665	1350	25
τ_a (Aktivierung) / ms	0,15	0,21	0,37	1,4
A_{i1} / pA	39,4	644	500	---
τ_{i1} (Inaktivierung) / ms	0,65	1,3	1,00	---
A_{i2} / pA	---	---	241	---
τ_{i2} (Inaktivierung) / ms	---	---	2,5	---
Anteil der Spuren mit Ereignissen	11%	42%	85%	84%

Tabelle 9.5 Daten der Zeitreihe 220803b, aufgetrennt nach dem Schaltverhalten in den Modes 1-4, Einzelkanalmessung an N1E115-Zellen mit ChloraminT

Die Amplitudenfaktoren und Zeitkonstanten der Aktivierung (τ_a , A_a) und Inaktivierung (τ_i , A_i) werden nach Gleichung (9.2) und (9.3) ermittelt.

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

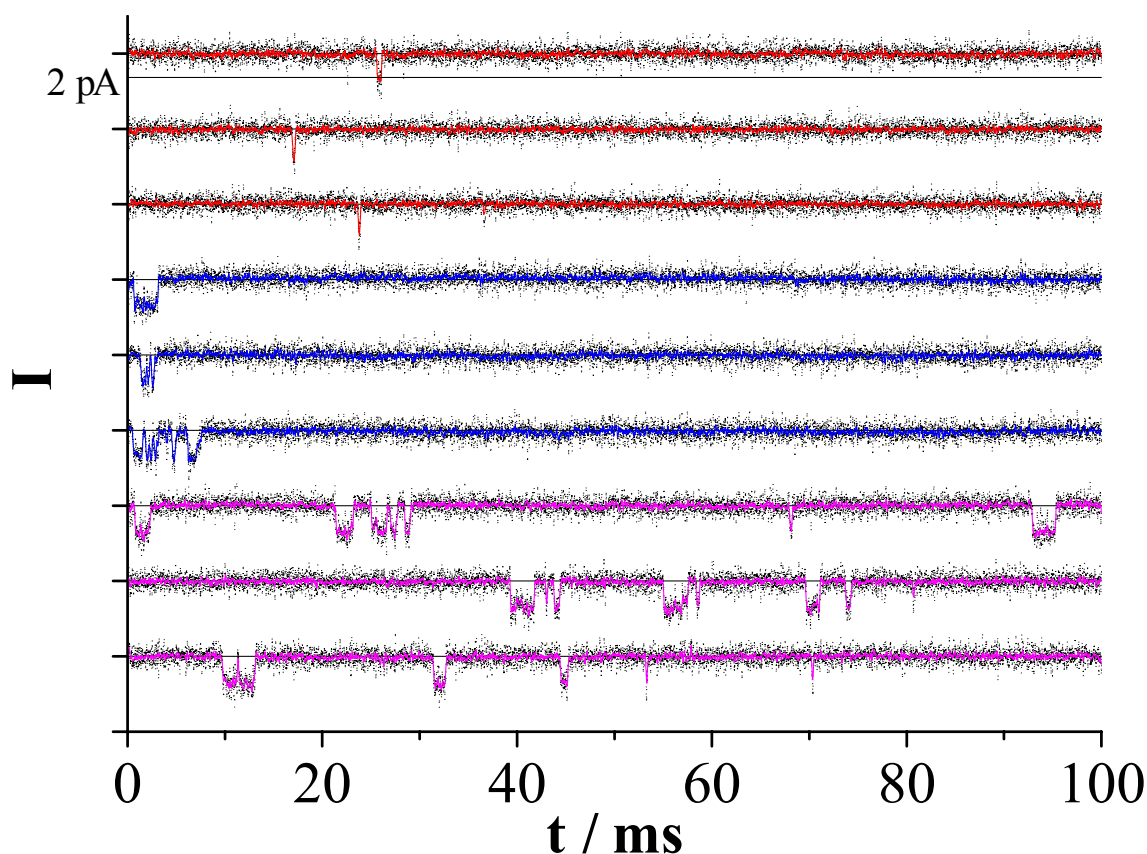


Abbildung 9.15 typische Einzelkanalaufzeichnungen an HEK-Zellen mit der Mutante F1489Q (Zeitreihe 290803a), die mit ChloraminT vergiftet werden

Das Schaltverhalten in Mode 1 ist typisch für die roten Aufzeichnungen, blau für Mode 2 und magenta für Mode 3. Die schwarzen Punkte sind die bei 10 kHz gefilterte Zeitreihe. Die farbigen Linien sind aus einem 15-Punkte-Mittelwertfilter gewonnen.

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

Messreihe	290803a
Messart	cell attached
Kanäle	1
Abtastfrequenz / kHz	100
Filterfrequenz / kHz	10
Länge (Abschnitte á 100 ms)	193
Ereignisse (Hinkley-Detektor)	521
Artefakt / ms	0,12
Kanalstrom / pA	2,5
Rauschen / pA	0,53

Tabelle 9.6 Daten der Zeitreihe 290803a, Einzelkanalmessung an HEK-Zellen mit Nav1.2a F1489Q, vergiftet mit ChloraminT

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

Schaltmodus	Verhalten des Kanals
normales Schalten (Mode 0)	kurze 1(-3) malige Öffnung nach Depolarisation
Mode 1:	zusätzlich kurze Öffnungen im Verlauf der Messspur, die nicht an die initiale Öffnung gekoppelt sind
Mode 2:	zusätzlich zu Mode 1 Bursts, die an die Aktivierung gekoppelt sind (zum Teil können diese Bursts einige 10 ms andauern)
Mode 3:	zusätzlich Bursts, die nicht an die initiale Öffnung gekoppelt sind verbunden mit einer große Offen-Wahrscheinlichkeit des Kanals für jede Depolarisation
Mode 4:	verminderte Einzelkanal-Leitfähigkeit, Burstverhalten wie in Mode 3

Tabelle 9.7 Definition der Modes

Die zeitliche Abfolge der Modes in den Messungen erfolgt immer irreversibel von einem niedrigeren Mode in einen höheren. Definiert ist das Schaltverhalten eines mit ChloraminT vergifteten Natriumkanals von dem unvergifteten Zustand bis zum Zustand halber Leitfähigkeit.

Mode 1-3 analog zu den Messungen in Abbildung 9.14 und Abbildung 9.15, Mode 4 in Abbildung 9.16

Burst: mehrmaliges benachbartes schnelles Öffnen und Schließen des Kanals

Zeitreihe	Messobjekt	Kanäle	Modeabfolge	Mode 4
DSA220803a	NE1115	1. 2.	nicht auszuwerten Mode 1 \mapsto Mode 2	--- ---
DSA220803b	NE1115	1. 2.	Mode 1 \mapsto Mode 2 \mapsto Mode 3 Mode 1 \mapsto Mode 2 \mapsto Mode 3	ja ja
DSA220803e	NE1115	1. 2. 3.	Mode 1 \mapsto Mode 2 \mapsto Mode 3 Mode 1 \mapsto Mode 2 Mode 1	ja --- ---
DSA210803a	HEK293 mit Nav1.2a	1. 2.	Mode 2 \mapsto Mode 3 Mode 1 \mapsto Mode 2 \mapsto Mode 3	ja ja
DSA210803b	HEK293 mit Nav1.2a	1.	Mode 1 \mapsto Mode 3	---
DSA210803c	HEK293 mit Nav1.2a	1.	Mode 1 \mapsto Mode 2 \mapsto Mode 3	---
DSA290803a	HEK293 mit F1489Q	1.	Mode 1 \mapsto Mode 2 \mapsto Mode 3	---

Tabelle 9.8 Messungen mit ChloraminT und die beobachteten Übergänge in die Modes 1-3

Außerdem ist in der letzten Spalte zu sehen, ob eine verminderte Leitfähigkeit zu beobachten ist (Mode 4), bevor das Seal instabil wird. Die versetzte Schreibweise zeigt für Mehrkanalaufzeichnungen die unterschiedliche zeitliche Abfolge der Modes für die Kanäle an.

Strom-Averages (aufaddierte Einzelkanalströme):

Dem unterschiedlichen Schaltverhalten in Mode 1-3 entsprechend sind die Strom-Averages verschieden, die für die Modes 1-3 auf den Maximalstrom normiert in Abbildung 9.17 dargestellt sind.

Der Mode 1 zeigt durch die wenigen kurzen zusätzlichen Ereignisse eine ähnliche Kinetik wie die der unvergifteten Messungen. In den Strom-Averages gehen diese Ereignisse in dem Rauschen unter, so dass kein persistierender Strom zu erkennen ist. Die Zeitkonstanten der Aktivierung mit $\tau_a = 0,15$ ms und der Inaktivierung mit $\tau_i = 0,65$ ms sind etwas schneller als die der unvergifteten Messung aus Abschnitt 9.4. Das liegt wahrscheinlich

an einer etwas höheren depolarisierenden Spannung in der Cell-Attached-Konfiguration im Vergleich zu der Messung aus Abschnitt 9.4.

In Mode 2 ist die Inaktivierung mit $\tau_i = 1,25$ ms verlangsamt. Dieses korreliert mit den Ereignissen aus Abbildung 9.14 und Abbildung 9.15, bei denen die Kanäle verspätet schließen. Ein persistierender Strom kann nicht beobachtet werden.

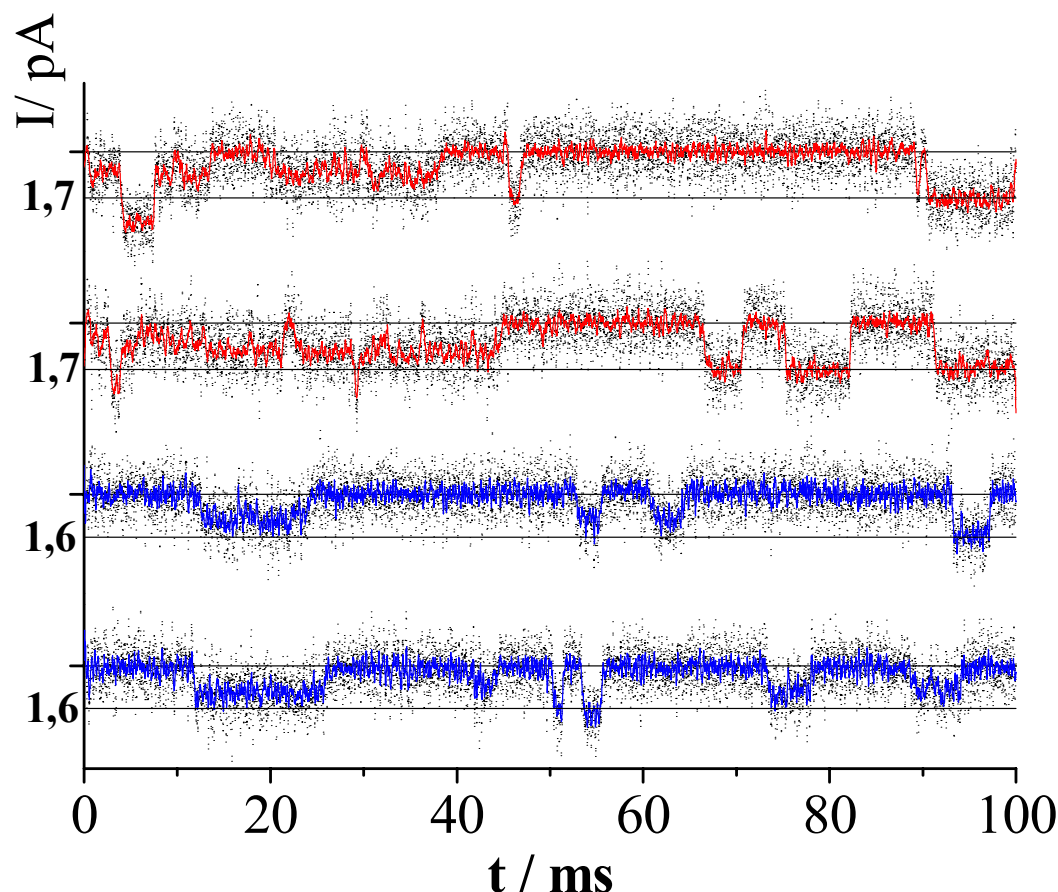


Abbildung 9.16 Einzelkanalaufzeichnung mit ChloraminT von je zwei Kanälen im späteren Verlauf der Zeitreihe

Während je ein Kanal seine anfängliche Leitfähigkeit zeigt, ist beim anderen Kanal die Leitfähigkeit ca. um die Hälfte reduziert (Mode 4). Die Ereignisse mit dem kleineren Strom erscheinen dabei „unruhig“ mit langsamem Ansteigen und Abfallen der Leitfähigkeit.

rot: N1E115, blau: HEK293 mit Nav1.2a, je 15 Punkte Mittelwertfilter, Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

In Mode 3 ist dann die „typische“ Giftwirkung von ChloraminT zu erkennen, die aus Whole-Cell-Experimenten beschrieben wird (Wang, 1984; Niemann et al., 1991; Quinonez et al., 1999), eine verlangsamte Inaktivierung und ein deutlich persistierender Strom von ca. 40%. (siehe auch Whole-Cell-Messung in Abschnitt 8.3). Die Inaktivierung verläuft biphasisch und im Gegensatz zu den anderen Modes werden für die Anpassung der Inaktivierung zwei Zeitkonstanten $\tau_{i1} = 1,00$ ms und $\tau_{i2} = 2,54$ ms benötigt. Zusätzlich ist auch die Aktivierung mit $\tau_a = 0,37$ ms verlangsamt.

In Mode 4 ergeben sich zusätzlich zu dem reduzierten Strom auch kinetische Unterschiede im Schaltverhalten zu Mode 3 (Abbildung 9.17). Die Aktivierung ist mit $\tau_a =$

1,39 ms deutlich verzögert. Eine Inaktivierung kann in den Strom-Averages nicht mehr nachgewiesen werden.

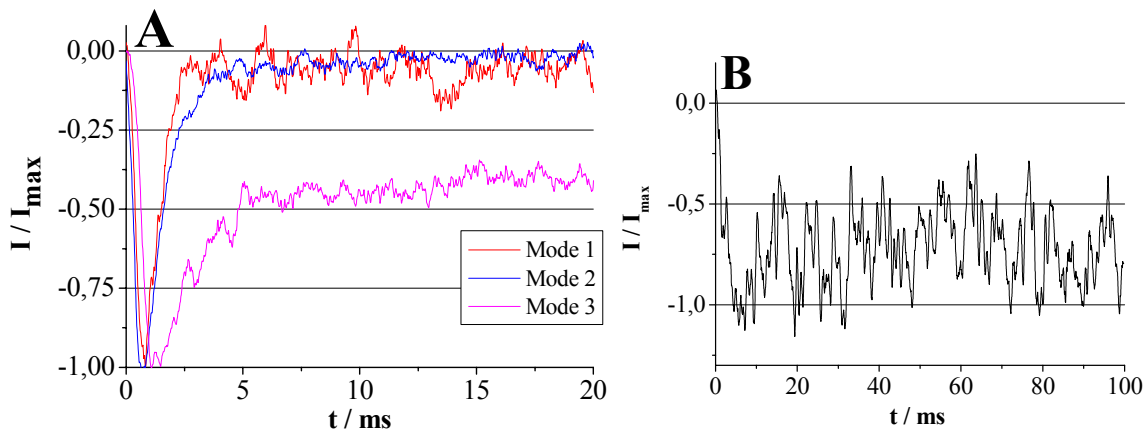


Abbildung 9.17 Strom-Averages der Zeitreihe 220803b in den Modes 1-4
 (A) normierte Averages der Modes 1-3, geglättet mit einem 25-Punkte Mittelwertfilter
 (B) Averages des Mode 4, geglättet mit einem 100-Punkte Mittelwertfilter

2D-Histogramme:

Die 2D-Histogramme der Modes 1-4 sind in Abbildung 9.18 dargestellt. Das unterschiedliche Schaltverhalten der Modes lässt sich an den 2D-Histogrammen nachvollziehen.

Mode 1: Trotz der weniger Ereignisse im 2D-Histogramms (A) lässt sich im Vergleich zu den unvergifteten Messungen ein zusätzlicher Anteil von langen Closed- und relativ kurzen Open-Ereignissen im Spektrum nachweisen (Pfeil).

Mode 2: Ein zusätzlicher Anteil von langen Open-Ereignissen im 2D-Histogramms (B) kennzeichnet den Unterschied zu Mode 1 (Pfeil).

Mode 3: Zusätzlich zu Mode 2 ist im 2D-Histogramms (C) ein großer Anteil langer Closed-Ereignisse zu erkennen (Pfeil 1). Dieser Anteil wird durch die Interburstintervalle im Laufe der Depolarisation hervorgerufen (siehe Definition der Modes in Tabelle 9.7).

Das Maximum der kurzen Closed-Ereignisse ist in Richtung noch kürzerer Ereignisse verschoben (Pfeil 2). Die Kanalöffnungen erfolgen jetzt überwiegend im Burst-Mode, wodurch viele kurze Closed-Ereignisse auftreten.

Mode 4: Das 2D-Histogramms (D) zeigt in der Verteilung der Ereignisse große Ähnlichkeiten mit Diagramm (C) (Mode 3). Das Spektrum ist etwas in Richtung längerer Open-Ereignisse verschoben. Dieses kann dadurch erklärt werden, dass durch die verringerte Leitfähigkeit im Mode 4 und der daraus folgenden Abnahme des Signal-Rausch-Verhältnisses die notwendige Integrationszeit des Hinkley-Detektors über die Ereignisse größer ist. Insgesamt liegt aber eine ähnliche Kinetik der Ereignisse zugrunde wie in Mode 3.

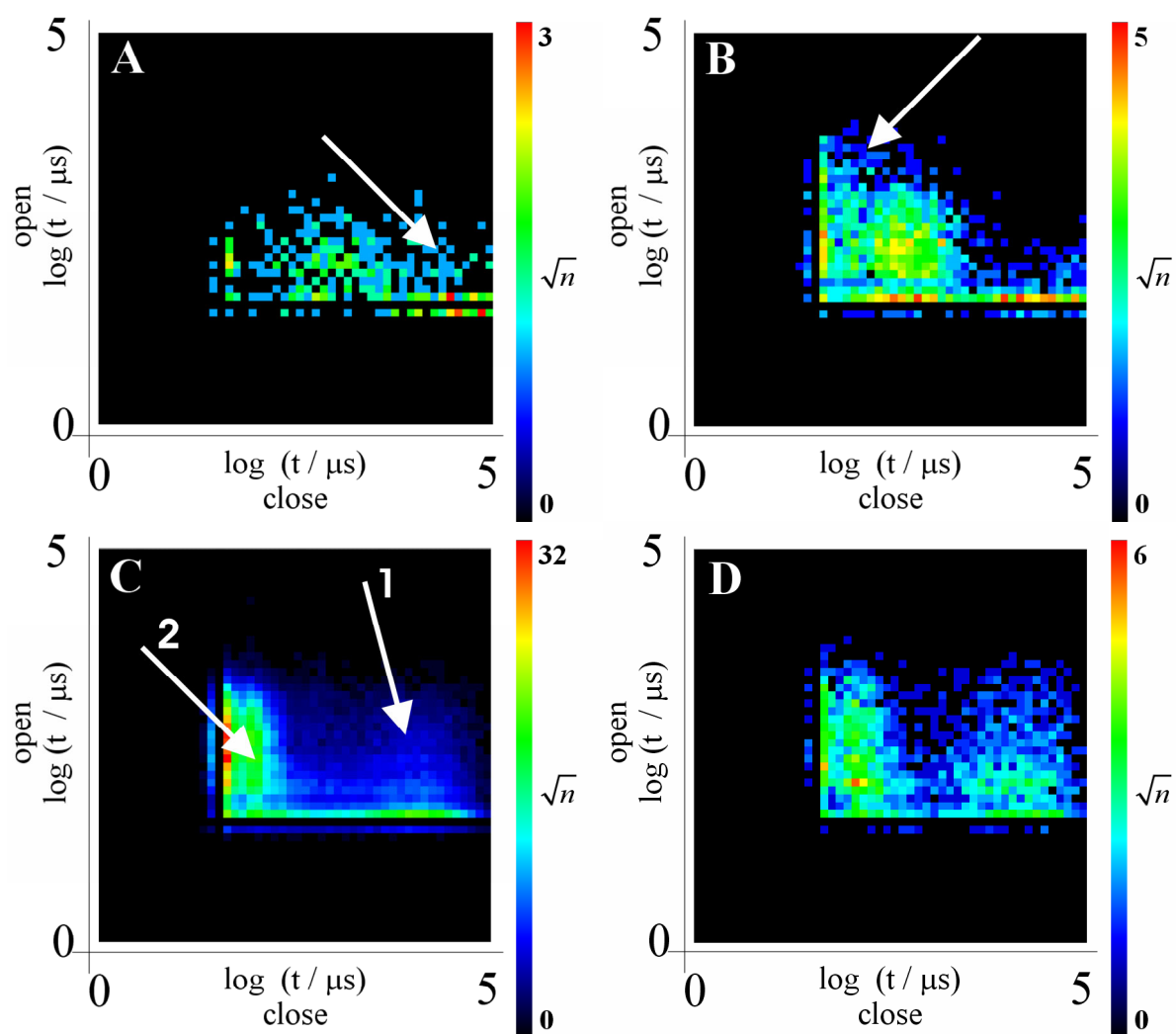


Abbildung 9.18 2D-Histogramme von Einzelkanalmessung an N1E115-Zellen mit ChloraminT (Zeitreihe 220803b)

(A) Mode 1, (B) Mode 2, (C) Mode 3, (D) Mode 4, Erklärung im Text

Ereignisabfolge (sequentielle Dwell-Time-Histogramme):

In Abbildung 9.19 ist die Ereignisabfolge für die Modes 1 und 2 dargestellt, in Abbildung 9.20 die der Modes 3 und 4.

Mode 1: Im Rahmen der Darstellung bei den relativ wenigen Ereignissen in Mode 1 ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den unvergifteten Messungen aus Abschnitt 9.4. Der einzige interessante Unterschied besteht in dem Auftreten längerer $C_2 - C_5$ Ereignisse in Abbildung 9.19A, die durch das Schaltverhalten in Mode 1 bedingt sind.

Mode 2: Mode 2 ist in Abbildung 9.19C durch einen größeren Anteil von kurzen Closed-Ereignissen $C_2 - C_5$ gekennzeichnet (im Vergleich der Flächen zu Abbildung 9.19A). Die Open-Ereignisse in (D) zeigen einen relativen Anstieg der kurzen Offen-Ereignisse $O_2 - O_5$ im Vergleich zum unvergifteten Kanal.

Diese Charakteristik wird durch die anfänglichen Bursts in Mode 2 hervorgerufen.

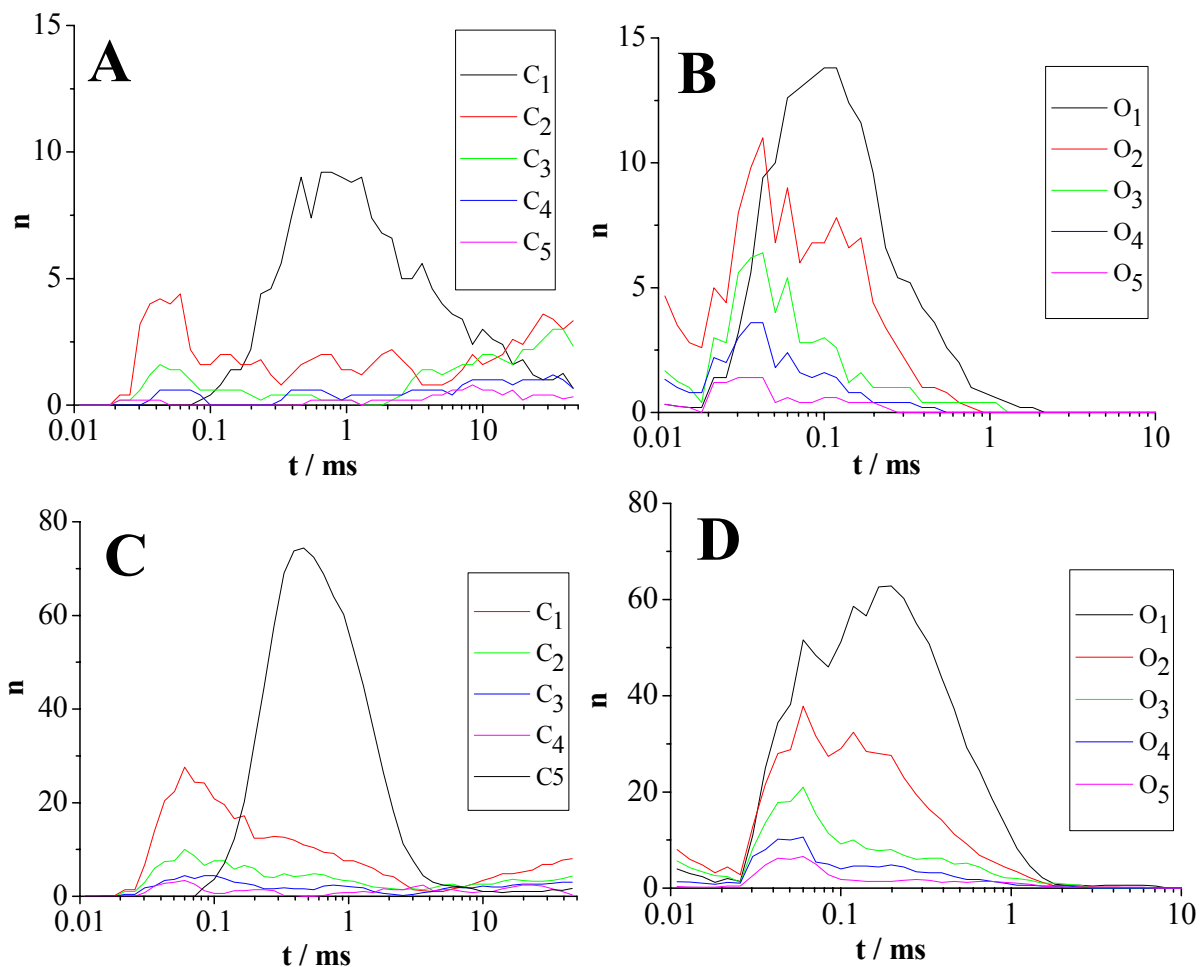


Abbildung 9.19 Ereignisabfolge (Methode siehe Abschnitt 5.7) der geschlossenen und offenen Zustände (Zeitreihe 220803b)

(A) und (B) Mode 1

(C) und (D) Mode 2

Mode 3: Dieser Mode unterscheidet sich in der Abfolge der Ereignisse sehr deutlich von den Messungen mit unvergifteten Kanälen und den Modes 1 und 2. Die Ereignisse C_1 sind in Abbildung 9.20E deutlich zweigipflig. Dieses ist ein Ausdruck der veränderten Aktivierung der Kanäle in Mode 3. In der Summe der normalen schnellen und der langsamen Aktivierung ergibt sich die verlangsamte Zeitkonstante $\tau_a = 0,37$ ms der Aktivierung aus der Tabelle 9.5. Die folgenden Closed-Ereignisse $C_2 - C_5$ sind extrem zu kurzen Ereignissen verschoben.

Die Offen-Ereignisse in (F) werden ebenfalls deutlich durch kurze Öffnungen dominiert. Insgesamt ist dies ein Ausdruck von Kanalöffnungen im Burst-Modus mit vielen kurzen Offen- und Geschlossen-Ereignissen wie sie auch in den Ableitungen der Kanäle im Mode 3 beobachtet werden.

Eine Besonderheit dieses Modes ist das Schneiden der O_1 -Kurve mit den folgenden $O_2 - O_5$. Dies deutet nach den Modelluntersuchungen an simulierten Zeitreihen in Abschnitt 5.7 auf zwei Offen-Zustände im zugrunde liegenden Markov-Modell hin, die linear angeordnet und wahrscheinlich durch einen C-Zustand getrennt sind. Mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit ist auch die gekoppelte lineare Anordnung zweier Offen-Zustände möglich.

Mode 4: Dieser Mode verhält sich bis auf die fast fehlende schnelle Komponente der Geschlossen-Ereignisse C_1 in (G) wie Mode 3. Das Fehlen dieser Komponente zeigt eine gegenüber Mode 3 noch einmal verlangsamte Aktivierung an, entsprechend der Zunahme der aktivierenden Zeitkonstante $\tau_a = 1,39$ ms (Mode 3: $\tau_a = 0,37$ ms).

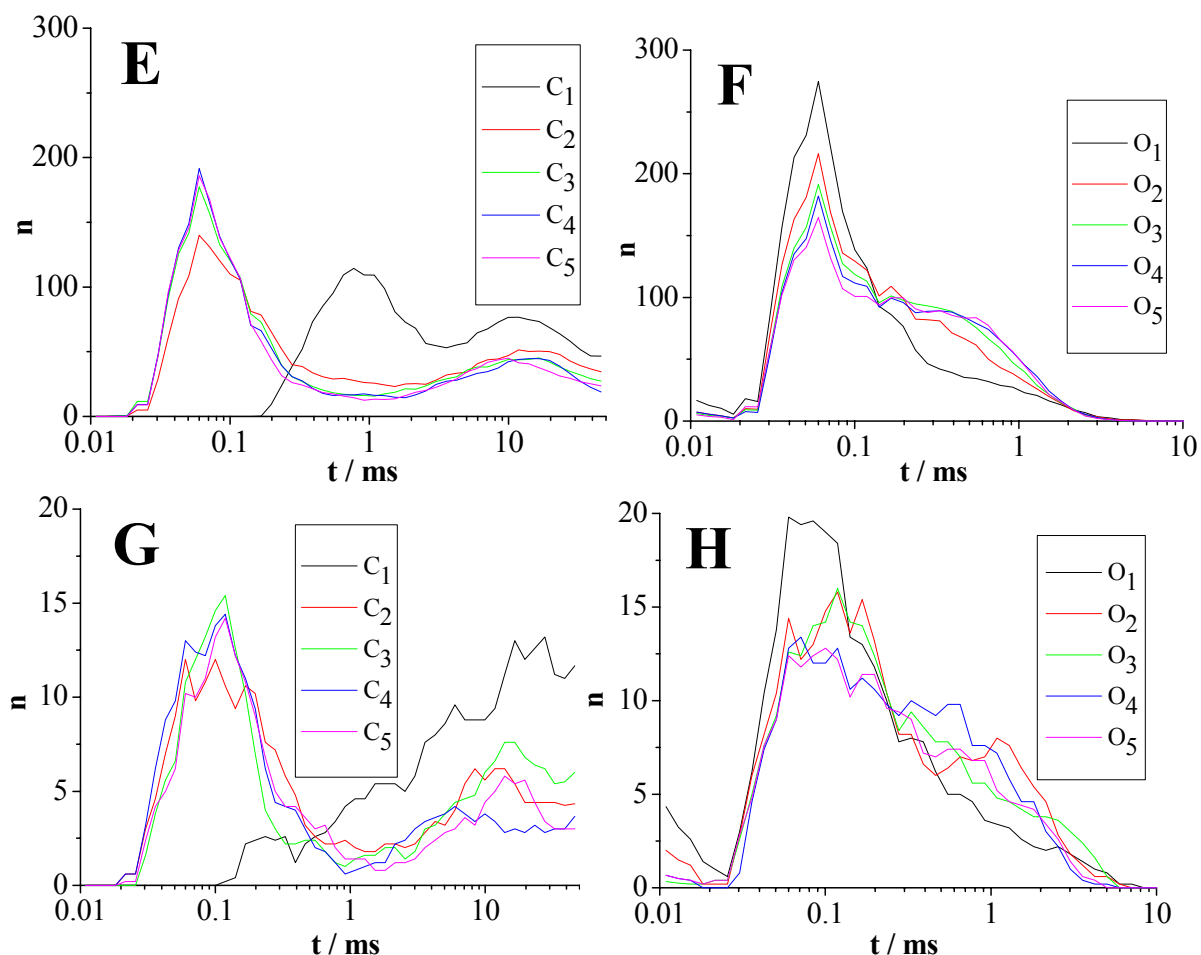


Abbildung 9.20 Ereignisabfolge (Methode siehe Abschnitt 5.7) der geschlossenen und offenen Zustände (Zeitreihe 220803b)
(E) und (F) Mode 3
(G) und (H) Mode 4

9.7 Einzelkanalaufzeichnungen mit Seanemonentoxinen

In diesem Abschnitt werden die Einzelkanalmessung der Natriumkanäle vorgestellt, die mit Seanemonentoxinen vergiftet sind. Die Dosis-Wirkungsbeziehung ist nicht direkt mit den Whole-Cell-Messungen vergleichbar, da es zu einer Interaktion der Toxine und der inneren Pipettenbeschichtung kommt (Abschnitt 9.2).

Die Giffraktionen APE 1-2 und ATX II zeigen an den Natriumkanälen der N1E115-Zellen und an Nav1.2a-Kanälen morphologisch die gleiche Wirkung. Die Messungen an Nav1.2a mit APE 1-1 hingegen können von der Wirkung auf das Schaltverhalten der Nav1.2a-Kanäle von den anderen beiden Toxinen abgegrenzt werden.

Schaltverhalten der Einzelkanäle:

Abbildung 9.21 zeigt das typische Einzelkanalverhalten von Natriumkanälen, die mit ATX II oder APE 1-2 vergiftet sind. Die initiale Öffnung ist verlängert, bzw. durch ein Burstverhalten der Kanäle ist das Schließen verzögert. Im Verlauf der Depolarisation sind weitere Bursts zu erkennen. Typisch sind aber auch Zeitreihen wie in Abbildung 9.21 unten, bei denen nur einzelne kurze Öffnungen des Kanals erfolgen, die nicht an die initiale Depolarisation gekoppelt sind.

Für das APE 1-1 ergibt sich bei den drei Zeitreihen aus Abbildung 9.23B und den Zeitreihen 300803a und 300803c (Daten nicht gezeigt) ein etwas anderes Schaltmuster, wie in Abbildung 9.22 (im Vergleich zu Abbildung 9.21) zu sehen ist. Die Kanalöffnungen erfolgen überwiegend als einzelne kurze Öffnungen, der größte Teil kurz nach der Depolarisation. Längere Öffnungen bzw. Bursts sind in diesen Messungen selten zu beobachten.

Allerdings verhalten sich die Messungen mit APE 1-1 an N1E115-Zellen im Gegensatz zu den hier gezeigten Messungen an Nav1.2a (Abbildung 9.22) wie die der mit ATX II und APE 1-2 vergifteten Zellen (Daten nicht gezeigt). Auch von Schmidt (2000) wird für Messungen an Neuroblastomzellen kein wesentlicher Unterschied für APE 1-1, ATX II und APE 1-2 berichtet.

Die Gründe für das unterschiedliche Verhalten können in dieser Arbeit nicht aufgelöst werden. Am wahrscheinlichsten ist eine unterschiedliche Zusammensetzung der benutzten APE 1-1 Giftfraktion.

In Tabelle 9.9 sind die Daten der Zeitreihen, die in diesem Abschnitt analysiert werden, aufgelistet.

Messreihe	310803g	300803b	100703m	300803h
Natriumkanal	N1E115	Nav1.2a	Nav1.2a	Nav1.2a
Gift	APE 1-1	APE 1-1	ATX II	APE 1-2
Giftkonzentration / μM	10	10	10	10
Messart	cell attached	cell attached	cell attached	cell attached
Kanäle	1	1	2	3
Abtastfrequenz / kHz	100	100	100	100
Filterfrequenz / kHz	10	10	10	10
Länge (Abschnitte á 100 ms)	437	827	1418	388
Ereignisse (Hinkley-Detektor)	645	4611	7316	1361
Artefaktkorrektur / ms	0,10	0,12	0,15	0,12
Kanalstrom / pA	1,63	1,76	1,60	1,26 (*)
Rauschen / pA	0,47	0,52	0,40	0,49
A_a / pA	338	118	2055	616
τ_a (Aktivierung) / ms	0,21	0,20	0,20	0,18
A_{i1} / pA	250	89,9	1208	608
τ_{i1} (Inaktivierung) / ms	0,70	5,7	0,37	0,64
A_{i2} / pA	26,2	25,3	277	26
τ_{i2} (Inaktivierung) / ms	5,8	15,7	4,2	4,8

Tabelle 9.9 In diesem Abschnitt betrachtete Messreihen

Die Amplitudenfaktoren und Zeitkonstanten der Aktivierung (τ_a , A_a) und Inaktivierung (τ_i , A_i) werden nach Gleichung (9.2) und (9.3) ermittelt.

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV, (*) mit einer depolarisierenden Spannung von ca. +20 mV aufgenommen, wodurch der Einzelkanalstrom geringer ausfällt als bei den anderen Messungen

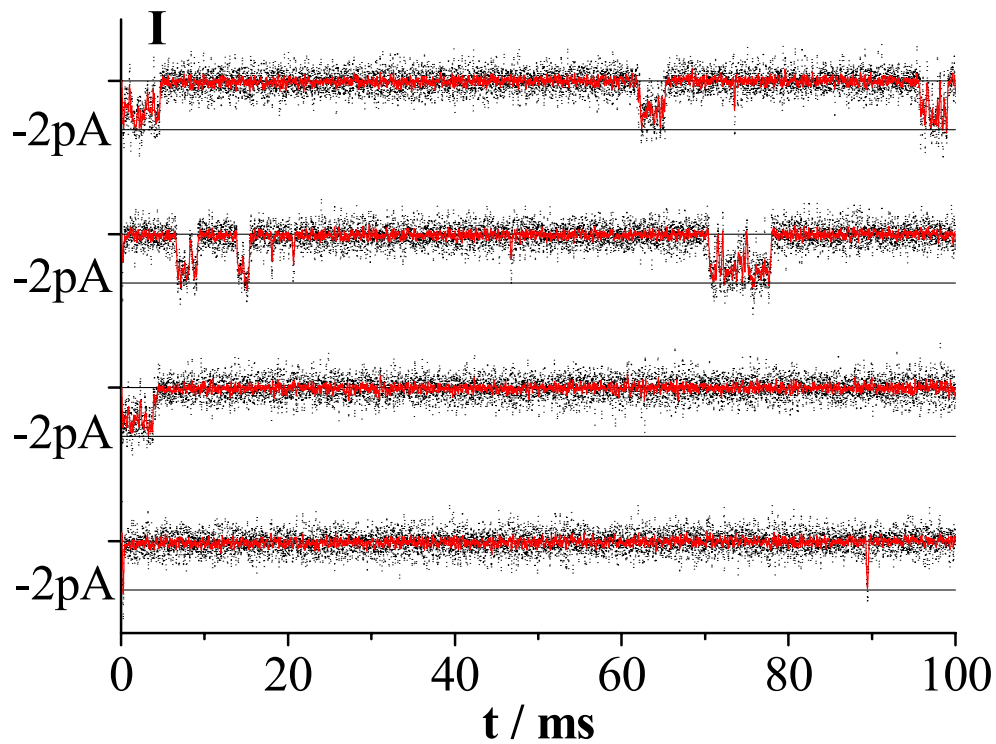


Abbildung 9.21 Typische Einzelkanalaufzeichnungen von Nav1.2a-Natriumkanälen mit ATX II vergiftet (Zeitreihe: 100703m)

Die schwarzen Punkte stellen die bei 10 kHz gefilterte Zeitreihe da. Die roten Linien sind aus einem 15-Punkte-Mittelwertfilter gewonnen.

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

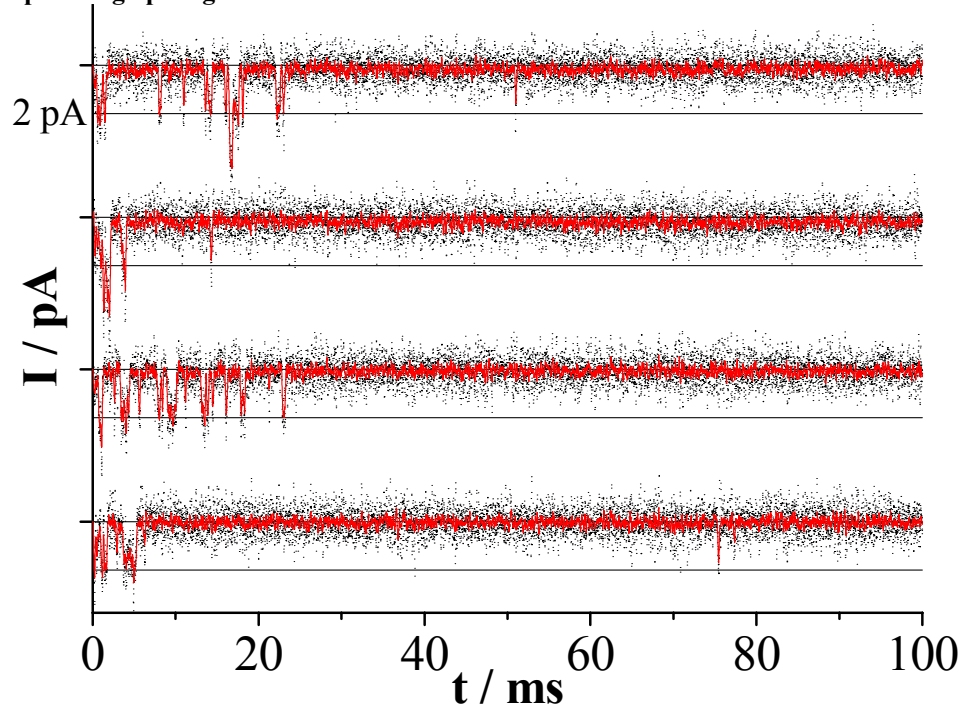


Abbildung 9.22 Typische Einzelkanalaufzeichnungen (Mehrkanal) von Nav1.2a-Kanälen, die mit APE 1-1 vergiftet sind (Zeitreihe 300803f)

Die schwarzen Punkte stellen die bei 10 kHz gefilterte Zeitreihe da. Die roten Linien sind aus einem 15-Punkte Mittelwertfilter gewonnen.

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

Strom-Averages (aufaddierte Einzelkanalströme):

In Abbildung 9.23 sind in (A) drei der normierten Strom-Averages aus den Messungen aus Tabelle 9.9 abgebildet. In dieser Tabelle sind auch die zugehörigen Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung, die mit den Gleichungen (9.2) und (9.3) ermittelt werden, zu finden. (B) zeigt die Messung 300803b aus Tabelle 9.9 und zusätzlich zwei weitere Strom-Averages von mit APE 1-1 vergifteten Nav1.2a-Kanälen. Die zugehörigen Zeitkonstanten sind in Tabelle 9.10 dargestellt.

In allen Messreihen lässt sich die Aktivierung mit einer Zeitkonstanten τ_a von ca. 0,2 ms anpassen. Damit besteht für die Aktivierung kein Unterschied zu den unvergifteten Messungen aus Abschnitt 9.4.

Für das Anpassen der Kurven der Inaktivierung werden im Gegensatz zu den unvergifteten Messreihen und denen mit der Nav1.2a-Mutante F1489Q jeweils zwei Zeitkonstanten benötigt. Die schnellere Zeitkonstante τ_{i1} liegt im Bereich der unvergifteten Messung für N1E115-Kanäle und Nav1.2a-Kanäle. Die zweite langsamere Zeitkonstante τ_{i2} wird durch die Giftwirkung bestimmt. Die Beziehung der Wirkung zu den Zeitkonstanten für ATX II ist in Abschnitt 10.1 dargestellt.

Beide Zeitkonstanten der Inaktivierung τ_{i1} und τ_{i2} sind für die Messungen mit ATX II und APE 1-2 jeweils deutlich schneller als die der Messungen mit APE 1-1 aus Tabelle 9.10. Auch diese ist ein Ausdruck einer veränderten Giftwirkung des APE 1-1 (siehe oben).

Ein relativ kleiner persistierender Strom kann bei der Messung 100703m mit ATX II nachgewiesen werden. Dieser Stromanteil fehlt bei den Messungen mit APE 1-1 trotz deutlicher Giftwirkung in den Einzelkanalableitungen.

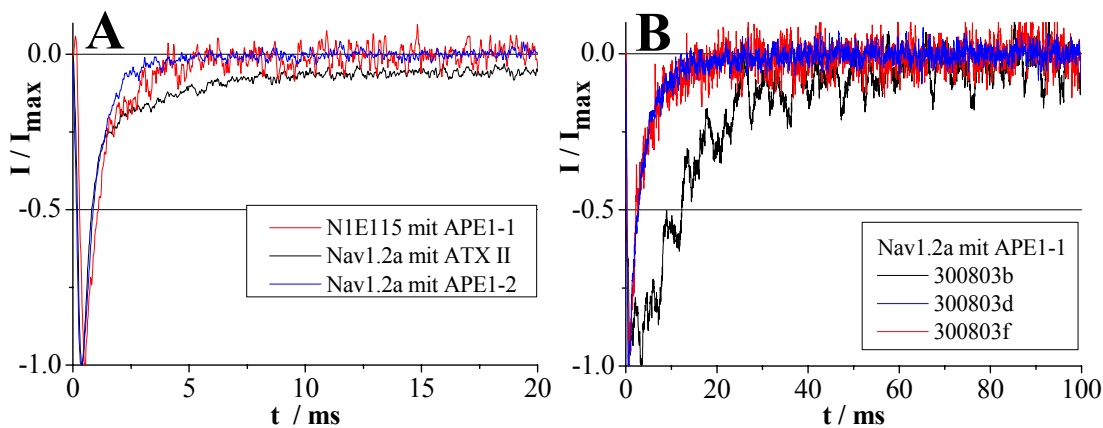


Abbildung 9.23 Normierte Strom-Averages der Einzelkanalaufzeichnungen

Man beachte die unterschiedliche Zeitskala in (A) und (B).

(A) N1E115 mit APE 1-1 (rot), Nav1.2a mit ATX II (schwarz), Nav1.2a mit APE 1-2 (blau) aus Tabelle 9.9
(B) Nav1.2a mit APE 1-1 aus Tabelle 9.9, zusätzlich die Strom-Averages der Mehrkanalaufzeichnungen 300803d (blau) und 300803f (rot)

Diese Aufzeichnungen sind für eine statistische Einzelkanalanalyse nicht geeignet, da die Anzahl der Kanäle $n > 3$ ist und nicht genügend schaltfreie Referenzspuren für eine hinreichend genaue Artefaktelimination vorhanden sind.

Zeitreihe	300803b	300803d	300803f
A_a / pA	118	675	691
τ_a (Aktivierung) / ms	0,20	0,17	0,23
A_{i1} / pA	89,9	540	511
τ_{i1} (Inaktivierung) / ms	5,7	2,6	2,5
A_{i2} / pA	25,3	77,3	78,9
τ_{i2} (Inaktivierung) / ms	15,7	11,8	14,8

Tabelle 9.10 Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung der Messungen an Nav1.2a-Kanälen mit APE 1-1

Die Amplitudenfaktoren und Zeitkonstanten der Aktivierung (τ_a , A_a) und Inaktivierung (τ_i , A_i) werden nach Gleichung (9.2) und (9.3) ermittelt.

Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

2D-Histogramme:

In Abbildung 9.24 sind die 2D-Histogramme der Messungen aus Tabelle 9.9 zu sehen. Die typische Erscheinungsform der Giftwirkung sind die Bursts, längere Ereignisse im Verlauf der Depolarisation, die durch die Abfolge von kurzen Geschlossen- und Offen-Zuständen charakterisiert sind.

Das Äquivalent im 2D-Histogramm sind lange Closed- mit kurzen Open-Zuständen für die Interburstintervalle und kurze Closed-Zustände mit kurzen Open-Zuständen für den eigentlichen Burst. Dieses ist besonders gut in der Messung mit ATX II (Abbildung 9.24C), aber auch in der Messung mit APE 1-2 (D) und in der N1E115-Messung mit APE 1-1 (A) zu erkennen.

Die Messung an Nav1.2a mit APE 1-1 zeigt dagegen ein anderes Spektrum, das Maximum der Ereignisse ist bei mittellangen Closed- und mittellangen Open-Zuständen zu finden. Dieses deckt sich mit dem oben beschriebenen Einzelkanalverhalten ohne Burst.

Ereignisabfolge (sequentielle Dwell-Time-Histogramme):

In den folgenden Abbildungen ist die Ereignisabfolge für die Messungen aus Tabelle 9.9 dargestellt.

Abbildung 9.25 (APE 1-1 an N1E115): Die beiden Diagramme für die Closed- und Open-Ereignisse sind den Diagrammen der unvergifteten Nav1.2a-Kanäle sehr ähnlich, unterscheiden sich aber von den anderen Messungen an N1E115 durch das weitgehende Fehlen des zweiten Maximums von C_2 - C_5 .

Daraus lässt sich schließen, wie in Abschnitt 8.1 bereits erwähnt, dass es sich bei dieser Messung um einen anderen Natriumkanal-Subtypen (evtl. Nav1.3, Benzinger et al., 1999) handelt als in den meisten anderen Messungen der N1E115-Zellen (wahrscheinlich Nav1.2).

Die Giftwirkung des APE 1-1 manifestiert sich lediglich in längeren Open-Ereignissen als in den unvergifteten Messungen (Abbildung 9.25B).

Abbildung 9.26 (APE 1-1 an Nav1.2a): Die Closed-Ereignisse zeigen in dieser Messung ein völlig anderes Spektrum als in allen anderen Messungen aus diesem Kapitel. Das erste Closed-Ereignis lässt sich mit seinen zwei Zeitkonstanten kinetisch nicht von den folgenden C_2 - C_5 unterscheiden. Während das erste Maximum im Bereich von 0,06 ms mit denen anderen Messungen vergleichbar ist, liegt das zweite Maximum im Bereich von 4 ms zwischen dem Maximum von unvergifteten Kanälen bei 0,2 ms und dem zusätzlichen Maximum der Vergiftung mit ChloraminT und den anderen Seeanemonotoxinen bei ca. 10 ms. Dieses ist ein Ausdruck einer beeinträchtigten Aktivierung der Kanäle (siehe auch

ChloraminT im Mode 4, Abschnitt 9.6). Außerdem sind die späteren Öffnungen kinetisch nicht von der ersten zu unterscheiden.

Die Open-Ereignisse sind in der Kinetik der unvergifteten Zeitreihe sehr ähnlich (Abbildung 9.9). Lediglich die Anzahl der $O_2 - O_5$ in Bezug zu O_1 ist angestiegen als Ausdruck der Vergiftung.

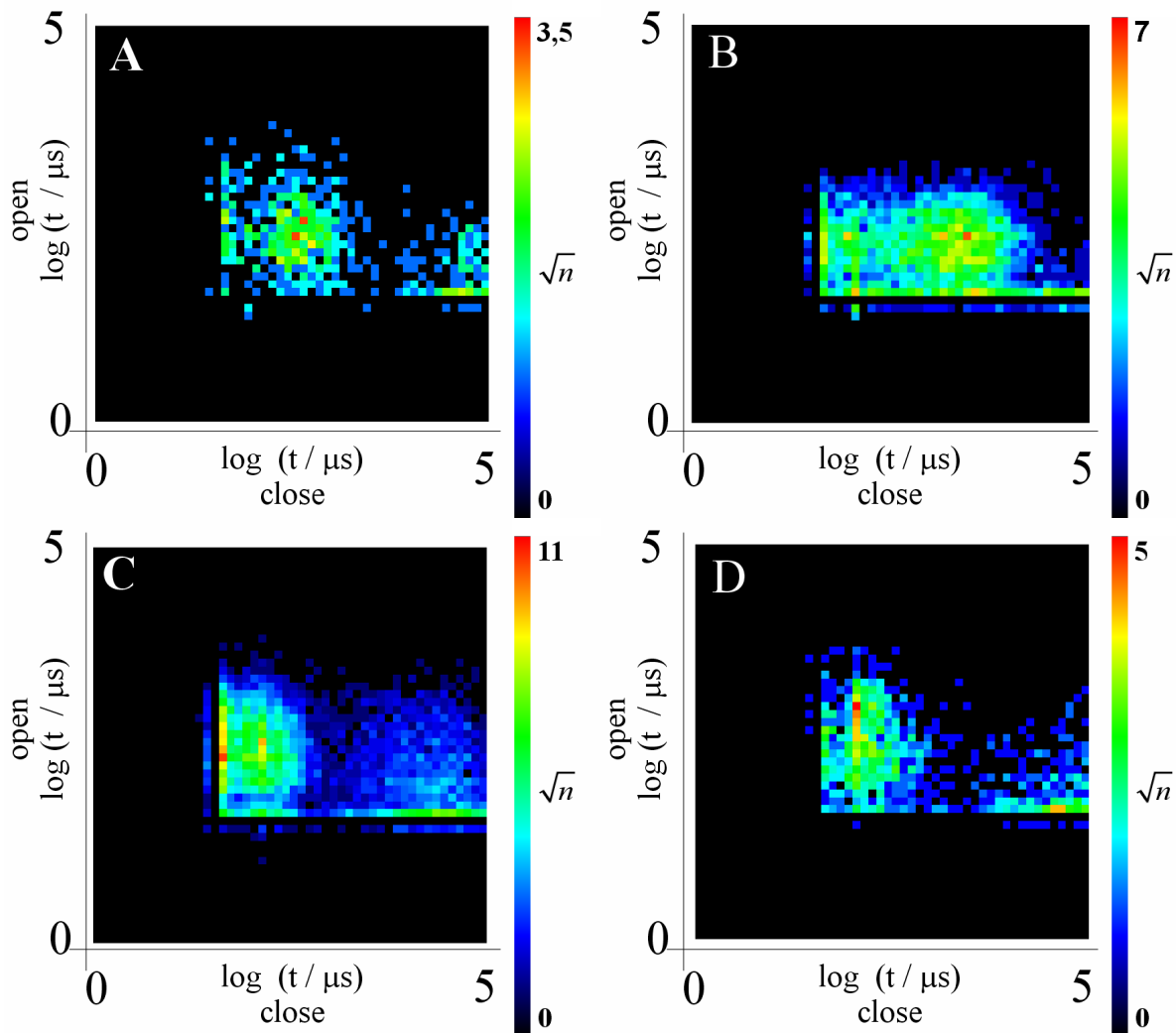


Abbildung 9.24 2D-Histogramm der Einzelkanalaufzeichnung aus Tabelle 9.9

- (A) N1E115-Zellen mit APE 1-1 (Zeitreihe: 310803b)
- (B) Nav1.2a mit APE 1-1 (Zeitreihe: 300803b)
- (C) Nav1.2a mit ATX II (Zeitreihe: 100703m)
- (D) Nav1.2a mit APE 1-2 (Zeitreihe: 300803h)

Abbildung 9.27 (ATX II an Nav1.2a) und Abbildung 9.28 (APE 1-2 an Nav1.2a): Die Diagramme der Closed-Ereignisse entsprechen im Wesentlichen denen der Messung mit ChloraminT im Mode 2 (Abbildung 9.19C).

Die Open-Ereignisse sind wiederum kinetisch der Vergiftung mit ChloraminT im Mode 3 sehr ähnlich (Abbildung 9.20F), mit einer schwächeren Ausprägung des ersten Maximums bei 0,06 ms. Der C_1 -Zustand ist allerdings anders als bei ChloraminT im Mode 3 / 4 (Abschnitt 9.6) und den Messungen mit APE1-1 an Nav1.2a (Abbildung 9.26). Dieser

Zustand entspricht dem der unvergifteten Kanäle. Die Aktivierung verläuft weitgehend ähnlich der der unvergifteten Kanäle (siehe oben Strom-Averages).

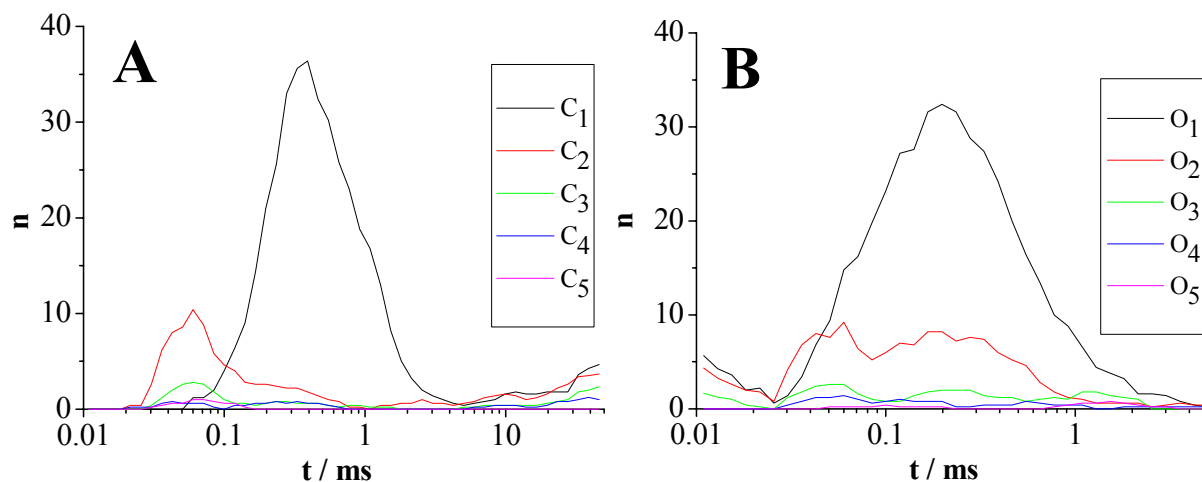


Abbildung 9.25 Ereignisabfolge (Methode siehe Abschnitt 5.7) der geschlossenen und offenen Zustände für N1E115 mit APE 1-1 (Zeitreihe: 310803b)

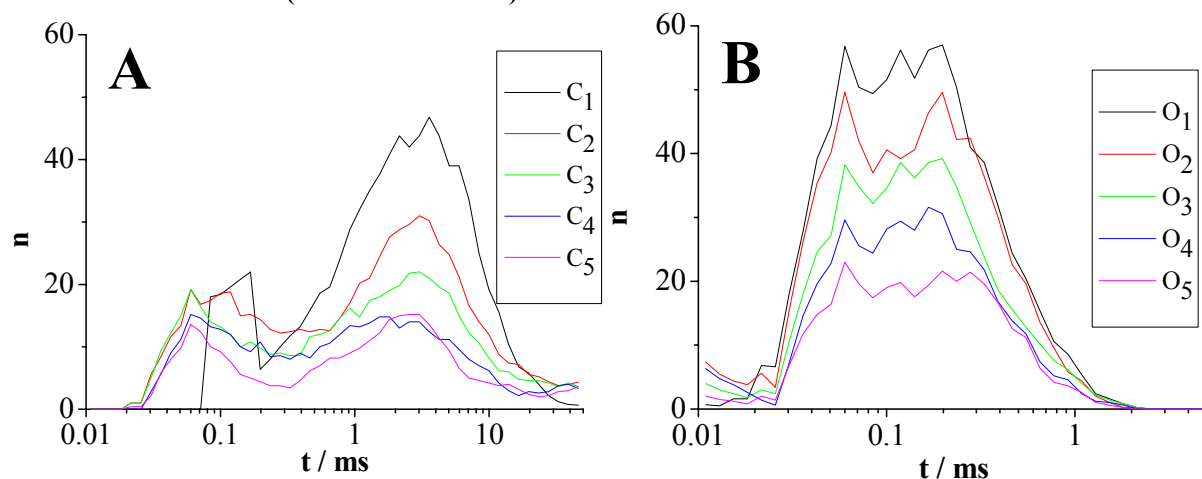


Abbildung 9.26 Ereignisabfolge (Methode siehe Abschnitt 5.7) der geschlossenen und offenen Zustände für Nav1.2a mit APE 1-1 (Zeitreihe: 300803b)

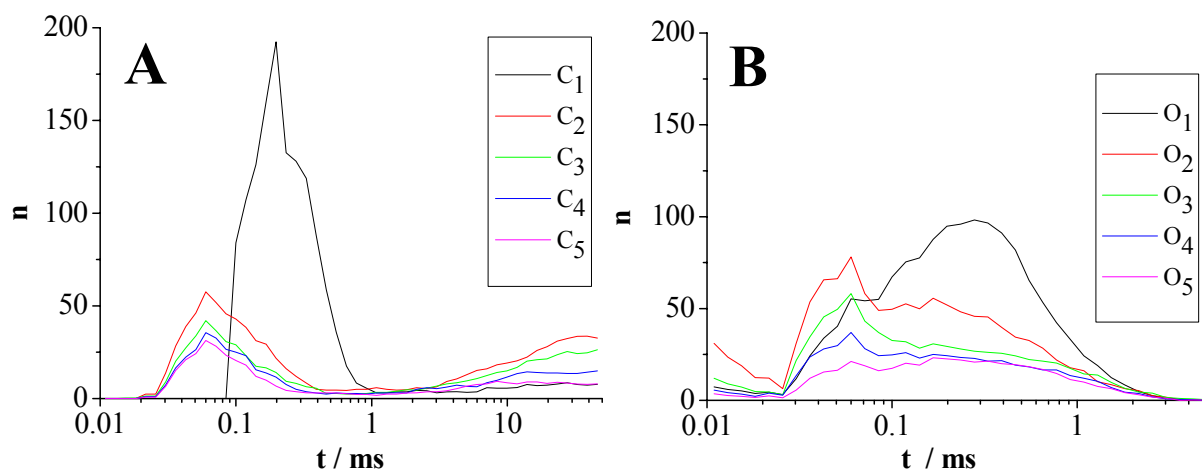


Abbildung 9.27 Ereignisabfolge der geschlossenen und offenen Zustände für Nav1.2a mit ATXII (Zeitreihe: 100703m)

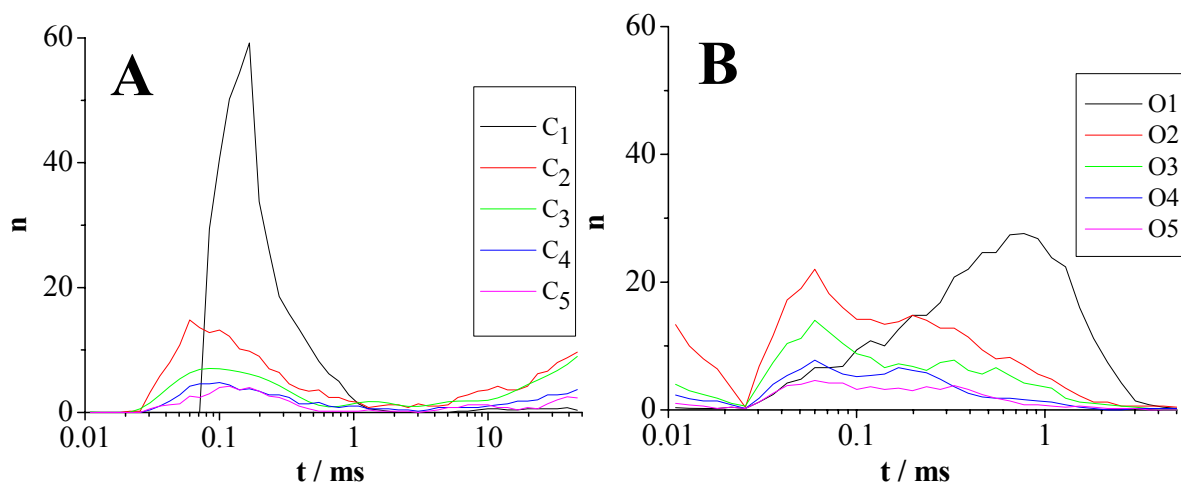


Abbildung 9.28 Ereignisabfolge (Methode siehe Abschnitt 5.7) der geschlossenen und offenen Zustände für Nav1.2a mit APE 1-2 (Zeitreihe: 300803h)

10 Ergebnisse

10.1 Parallelen der Giftwirkung von ATX II und ChloraminT

Es besteht eine große phänomenologische Übereinstimmung des Schaltverhaltens von Natriumkanälen, die mit ChloraminT vergiftet sind (Abschnitt 9.6) und den Schaltmustern der Vergiftung mit ATX II oder anderen Seeanemonotoxinen (Abschnitt 9.7).

Dieses führt zu der Hypothese, dass das irreversibel bindende ChloraminT (Wang, 1984; Niemann et al., 1991; Quinonez et al., 1999) und die auswaschbaren Seeanemonotoxine (Ulbricht & Schmidtmayer, 1981; Blumenthal & Seibert, 2003) die gleichen Mechanismen im Natriumkanal bedienen. Insbesondere soll gelten:

- a) ChloraminT besetzt 4 Bindungsstellen am Natriumkanal.
- b) Seeanemonotoxine besetzten 4 Bindungsstellen am Kanal.
- c) Die Besetzung der Bindungsstellen durch Seeanemonotoxine führt zur Veränderung des Schaltverhaltens in 4 Modes wie beim ChloraminT (Abschnitt 9.6).

Für die Untersuchung dieser Hypothesen sind folgende Punkte zu beachten. Da die Seeanemonotoxine im Gegensatz zu ChloraminT reversibel binden, ist bei diesen Messungen immer mit einem Mischzustand aus den Modes 1-4 zu rechnen.

Für die Einzelkanaldaten dieser Arbeit besteht das Problem, dass die Beschichtung der Pipetten mit Sigmacote keine Konzentrationsangabe des Giftes zulässt (Abschnitt 11.2). Die folgenden Angaben sind daher qualitative Aussagen. Die Giftwirkung lässt sich aber in den Strom-Averages durch den Anteil des persistierenden Stroms in Bezug auf den Spitzenstrom und die verlangsamte Inaktivierung abschätzen. Hill-Dosis-Kurven an Whole-Cell-Messungen sind mit diesen Parametern nicht eindeutig definiert, die Anzahl der gebundenen Liganden kann auf diese Weise nicht bestimmt werden.

Folgende Befunde sprechen für die obigen Hypothesen a) – c):

zu a)

Mit dem irreversibel bindenden ChloraminT kann an Einzelkanaldaten (Abschnitt 9.6) gezeigt werden, dass die Aufhebung der Inaktivierung in 4 Stufen erfolgt. Zwei unterschiedliche Modelle für Bindungsstellen wären aus der immer gleichen Abfolge der 4 Modes ableitbar:

1. Entsprechend der Hypothese a) existieren 4 gleichberechtigte Bindungsstellen am Kanalprotein. Es besteht eine eindeutige Beziehung zwischen der Anzahl der besetzten Bindungsstellen und des auftretenden Modes der Inaktivierung.
2. Es gibt nur eine Bindungsstelle am Kanal für das ChloraminT Molekül. Die Bindung löst eine Umlagerung des Kanalproteins aus. Im Verlauf dieser Umlagerung im Bereich von Minuten (siehe Messungen Abschnitt 9.6) würde die Inaktivierung sich analog zu den Modes 1-4 verändern. Hiergegen spricht jedoch eindeutig, dass nach Inkubation mit ChloraminT und anschließendem Waschen in giftfreier Lösung die Whole-Cell-Ströme relativ konstant bleiben (Niemann et al., 1991). Das Waschen löst nicht die gebundenen ChloraminT-Moleküle, verhindert aber die Bindung weiterer. Dann bleiben die Kanäle in den zuletzt eingenommenen Modes und eine fortschreitende Veränderung der Inaktivierung wie bei kontinuierlicher

Exposition auf ChloraminT wie in Abbildung 8.6 ist nicht zu beobachten. Eine weitere Bindung ist also erforderliche um in den nächsten Mode zu kommen.

zu b) und c):

Die in dieser Arbeit untersuchten Seeanemonentoxine unterscheiden sich bis auf eine Ausnahme (Nav1.2a mit APE 1-1, Abschnitt 9.7, die Ursachen hierfür bleiben unklar; siehe auch Schmidt, 2000) qualitativ nicht in den Einzelkanalaufnahmen. Deswegen gelten die hier an ATX getroffenen Aussagen wahrscheinlich für viele (alle) Site 3-Toxine, zu denen die Seeanemonentoxine gehören.

1) Die ATX II Wirkung lässt sich nicht durch eine Bindungsstelle erklären

Drei Messungen von Natriumkanälen aus Abbildung 10.1, die mit ATX II vergiftet sind, werden betrachtet. Anhand des persistierenden Stroms und der verlangsamten Inaktivierung lassen sich den drei Strom-Averages unterschiedliche Giftwirkungen (schwach, mittel, deutlich) zuschreiben. Die drei Messungen werden mit Hilfe der Definition der Modes 0-3 aus Tabelle 9.7 ausgewertet und die ermittelten Verteilungen auf die Modes in Abbildung 10.2 dargestellt.

Für die folgende Argumentation ist es wichtig, dass die Dissoziationskonstanten der Site 3-Toxine im Bereich von 1 s liegen (Chen & Heinemann, 2001) und damit deutlich länger sind als eine Messspur der Depolarisation (100ms).

Wenn man eine einzige Bindungsstelle zugrunde legt, müsste man erwarten, dass der Anteil der in die verschiedenen Modes sortierten Messspuren proportional mit der Giftwirkung steigt. Auch bei einer rein phänomenologischen Interpretation, wenn man die Modes für Seeanemonentoxine als nicht gegeben annimmt, müsste dies gelten. In der Verteilung in Abbildung 10.2 ist aber zu sehen, dass dies nicht der Fall ist. Bei einer stärker werdenden Giftwirkung kommt es zu einer Verschiebung in Richtung Mode 2 und 3.

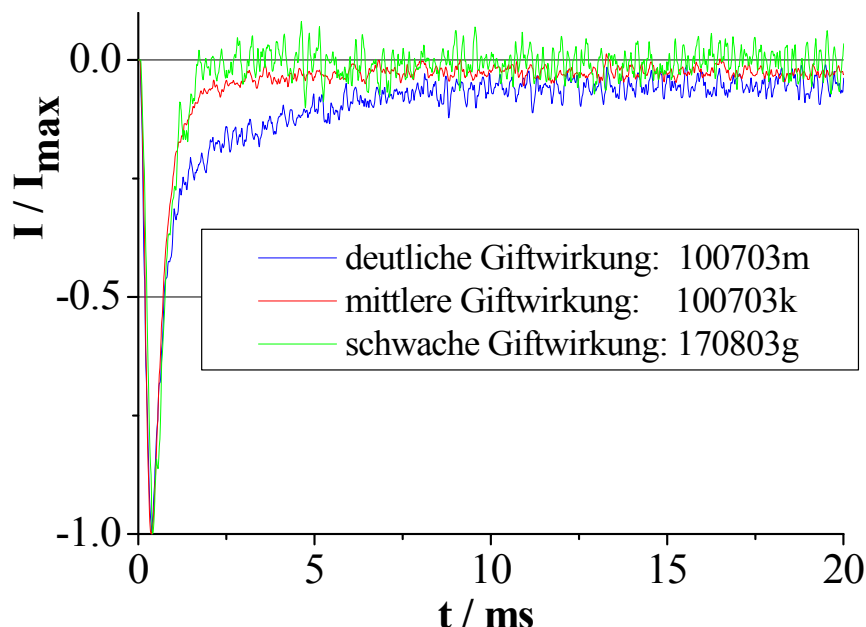


Abbildung 10.1 Aufaddierte Einzelkanalmessungen der mit ATX II vergifteten Nav1.2a-Kanäle

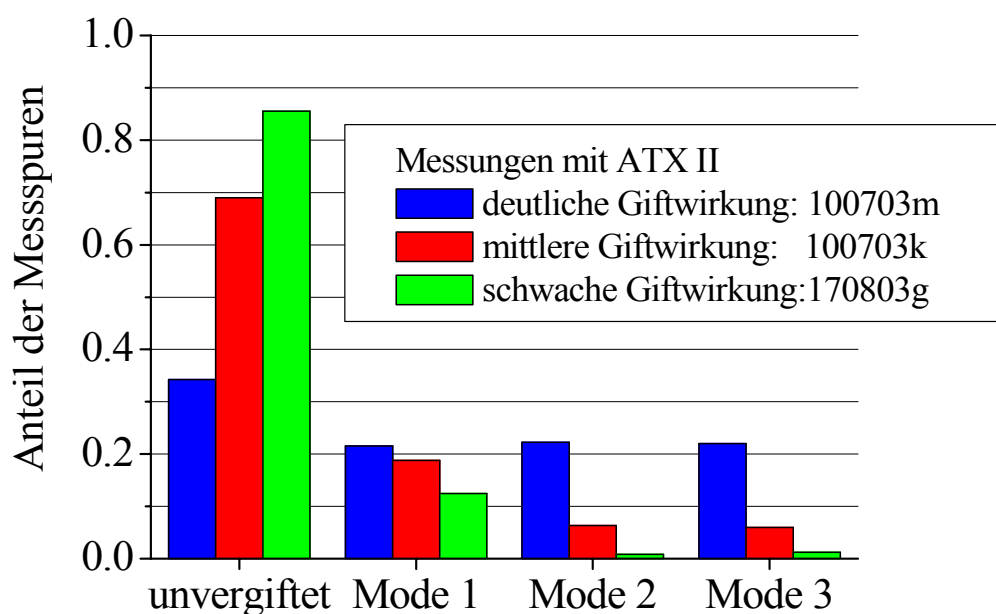


Abbildung 10.2 Schaltverhalten der mit ATX II vergifteten Nav1.2a-Kanäle
Darstellung der nach Modes sortierten Messspuren der Zeitreihen (aus Abbildung 10.1)

2) Extrapolation des persistierenden Stroms auf eine maximale Giftwirkung

Der persistierende Stromanteil, bezogen auf den Spitzenstrom der Messungen aus Abbildung 10.1, liegt deutlich unter dem maximal zu erzielenden Anteil der Whole-Cell-Messungen mit ATX II (Abschnitt 8.2) von ca. 20-40%. Die interne Beschichtung der Pipetten mit Sigmacote ist wie oben bereits erwähnt bei den Einzelkanalableitungen die Ursache hierfür.

Dieser große persistierende Stromanteil kann nur durch Messspuren, die dem Mode 3 und 4 zugeteilt sind, hervorgerufen werden.

Bezogen auf den Maximalwert korreliert der Anteil der Messspuren in Abbildung 10.2 im Mode 3 auch mit dem Anteil des persistierenden Stroms. Eine Extrapolation auf einen Anteil von 100% im Mode 3 führt auf einen persistierenden Strom im Bereich der maximalen Wirkung (starke Giftwirkung: 34%, mittlere Giftwirkung 23%).

Daraus folgt, dass für eine maximale Giftwirkung alle Spuren im Mode 3 schalten müssen. Unvergiftete und Spuren in Mode 1 und 2 dürften also nur in einer sehr kleinen Anzahl auftreten, da sie nicht zum persistierenden Strom beitragen. Mode 1 und 2 sind aber in den drei Messungen in 15-45% der Spuren zu beobachten. Auch dieser Befund spricht für das Vorhandensein von mehreren Bindungsstellen, da er mit nur einer nicht zu erklären ist.

3) Gruppierung von Ereignissen in einem Mode bei Seeanemonotoxinen

Bei der Auszählung der sequentiell gemessenen Zeitreihen treten die einzelnen Modes überzufällig häufig gruppiert über 2-5 Messabschnitte auf. Dieses ist besonders häufig im Mode 3 und bei unvergiftet erscheinenden Zeitreihen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass es mehrere Gating-Möglichkeiten des Kanals gibt und diese durch die Bindung der Liganden über mehrere Messspuren konserviert werden. Außerdem wird dadurch eine Dissoziationskonstante im Bereich 1 s plausibel, da 3 Messabschnitte 900 ms entsprechen.

4) Ähnlichkeit im Inaktivierungs-Verhalten

Betrachtet werden die drei Messungen aus Abbildung 10.1, die eine unterschiedliche Giftwirkung aufweisen. Die Zeitkonstanten der Inaktivierung der Strom-Averages mit 2 Exponentialfunktionen sind in Tabelle 10.1 dargestellt.

Die schnelle Zeitkonstante der Inaktivierung τ_{i1} stimmt mit etwa 0,4 ms bei den 3 Messungen überein. Die Giftwirkung manifestiert sich bei den beiden Messungen mit mittlerer und deutlicher Giftwirkung in der langsamen Konstante τ_{i2} . Nur diese beiden Messungen zeigen nennenswerte Ereignisse in Mode 3 (Abbildung 10.2). Der größere Anteil von Ereignissen in Mode 3 tritt bei der Messung mit der deutlichen Giftwirkung gemeinsam mit einer langsameren Konstante τ_{i2} auf. Das gleiche Verhalten der Zeitkonstanten der Inaktivierung zeigt sich in den Messungen mit ChloraminT, aufgeteilt nach Modes (Tabelle 9.5). Nur ab Mode 3 tritt eine zweite langsame Zeitkonstante τ_{i2} auf.

Auch dieses ist ein Beleg dafür, dass bei Seeanemonotoxinen die Beeinflussung der Inaktivierung stufenweise erfolgt und sich die Stufen in der Zeitkonstante τ_{i2} manifestieren.

Zeitreihe	100703m	100703k	170803g
Giftwirkung	deutlich	mittel	schwach
Anzahl der Spuren	1418	2007	998
ATX II / μM	10	10	10
A_a / pA	2060	3820	920
τ_a (Aktivierung) / ms	0,20	0,25	0,23
A_{i1} / pA	1210	2510	699
τ_{i1} (Inaktivierung) / ms	0,37	0,36	0,42
A_{i2} / pA	277	117	---
τ_{i2} (Inaktivierung) / ms	4,2	2,9	---
persistierender Strom	5%	2%	0%

Tabelle 10.1 Bestimmung der Zeitkonstanten der Inaktivierung anhand der aufaddierten Stromkurven aus Abbildung 10.1

Abhängigkeit der Zeitkonstanten für die Aktivierung und Inaktivierung bei unterschiedlicher Giftwirkung sowie der Anteil des persistierenden Stroms, Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

5) Auftreten von Subleveln (Mode 4) bei Seeanemonotoxinen

Eine verminderte Einzelkanal-Leitfähigkeit, die in Mode 4 bei ChloraminT auftritt, kann auch bei der Vergiftung mit Seeanemonotoxinen nachgewiesen werden. Sie ist wegen der reversiblen Bindung der Toxine und der schwachen Giftwirkung bei Einzelkanalmessungen (siehe oben) allerdings nicht regelmäßig zu beobachten.

Allerdings werden in verschiedenen Zeitreihen einzelne Events nachgewiesen, bei denen der Strom eindeutig reduziert ist (Abbildung 10.3). Weiterhin ist dieses Phänomen für Seeanemonotoxine in der Literatur beschrieben (Nagy, 1987).

Durch diese Beobachtung wird eine weitere Bindungsstelle plausibel, die auch bei ATX II auf den Mode 4 wie bei den ChloraminT-Messungen hindeutet.

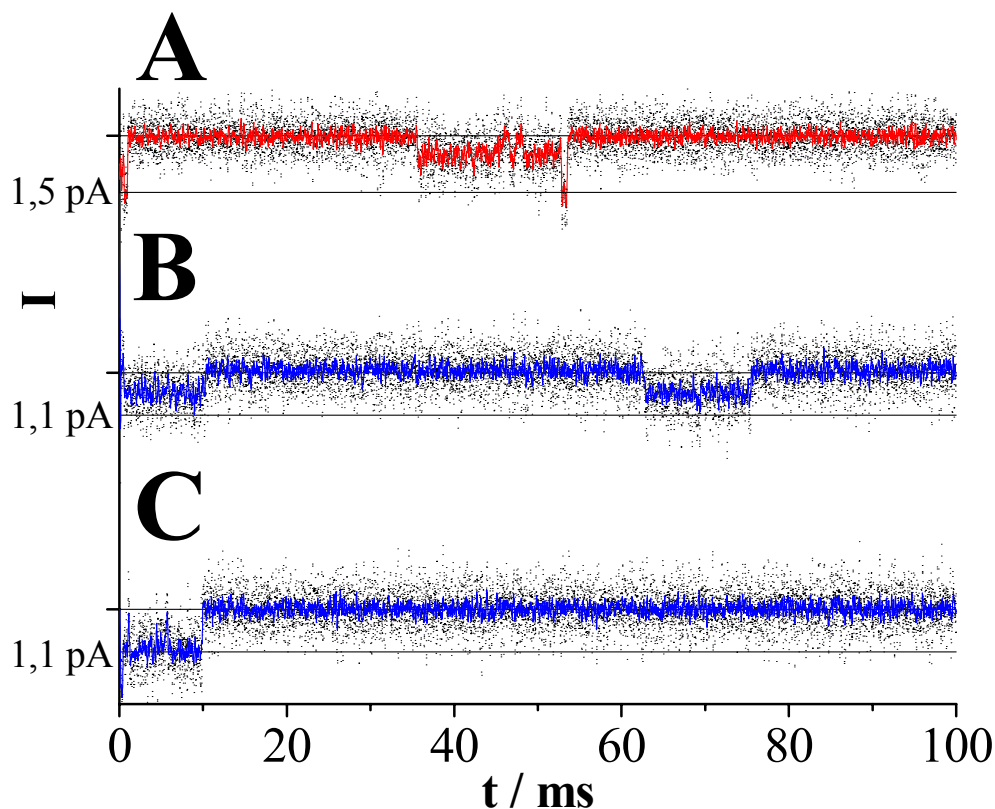


Abbildung 10.3 Verminderte Leitfähigkeit von Natriumkanälen, die mit Seeanemontoxinen vergiftet sind

(A) Zwei Leitfähigkeiten eines mit ATX II vergifteten Nav1.2a-Kanals in einer Messspur (Zeitreihe 100703k)

(B) und (C) Zwei Messspuren eines mit APE1-1 vergifteten Natriumkanals von N1E115-Zellen (Zeitreihe 300803h)

Die roten und blauen Linien sind aus einem 15-Punkte Mittelwertfilter gewonnen. Spannungssprung von -100 mV auf 0 mV

Zusammenfassung:

1)-5) zeigen, dass die Giftwirkung des ATX II nicht plausibel durch die Bindung eines Giftmoleküls an einen Kanal erklärt werden kann. Durch das Auftreten von Subleveln bei Seeanemontoxinen 5) kommt noch eine weitere Bindungsstelle hinzu.

Die Analogie in 1-5 zu ChloraminT lassen einen ähnlichen Wirkmechanismus dieser beiden Gifte sehr wahrscheinlich werden. Weitere Hinweise sind der Diskussion zu entnehmen (siehe Abschnitt 11.5).

10.2 Schnelles Schalten bei Natriumkanälen

In diesem Abschnitt wird gezeigt, dass die Leitfähigkeitsverminderung im Mode 4 (Abschnitt 9.6) sehr wahrscheinlich durch einen Gating-Effekt (schnelles Schalten, Hansen et al., 1997; Townsend & Horn, 1999; Hansen et al., 2003) hervorgerufen wird. Indem das unvermeidbare analoge Tiefpassfilter der Messanlage über kurze Offen- und Geschlossen-Zustände mittelt, erfolgt eine scheinbare Stromreduktion. Dieses ist ein wertvoller Hinweis auf die zugrunde liegenden Mechanismen der Stromreduktion im Kanalprotein.

Das Gating in Mode 1-3 hingegen bewirkt keine scheinbare Stromreduktion. Das bedeutet, dass das Gating durch Ratenkonstanten beschrieben werden kann, die nicht wesentlich größer sind als die Filterfrequenz des analogen Tiefpassfilters der Messanlage. Dieses Erkenntnis ist wichtig für die Modellierung des Schaltverhaltens in Abschnitt 10.3, da der Parameterraum der Ratenkonstanten für den 2D-Fit nach oben eingeschränkt werden kann.

Drei Kriterien sprechen für eine Stromreduktion im Mode 4 durch schnelles Schalten:

a) morphologischer Eindruck der Schaltereignisse

Die Einzelkanalereignisse erscheinen unruhig, mit langsamen Ansteigen und Abfallen des Stroms. Außerdem sind die Stromniveaus im leitenden Zustand nicht sicher zu bestimmen. Dieses sind Zeichen, die von anderen Kanälen, z.B. dem MaxiK-Kanal in der eigenen Arbeitsgruppe, für schnelles Schalten bekannt sind (Schröder et al., 2004).

b) Test mit Hilfe der Verteilung pro Level

In Abbildung 10.5 ist die Verteilung pro Niveau für Messungen mit ChloraminT im Mode 4 dargestellt. Die Breite der Rauschverteilungen für Grundniveau und das leitende Niveau im Mode 4 ist der Legende zu entnehmen.

Hier ist ein Effekt nicht zu sehen, der bei Messreihen im unten beschriebenen Mode 3 (Abbildung 10.6), also bei langsamen Schalten auftritt, ein Abknicken der Verteilungsfunktion der Stromwerte von den angenäherten Gaußverteilungen. Dieses Abknicken als Zeichen von Fehlern des Sprungdetektors wird bei schnellem Schalten durch die Verbreiterung der Verteilung überdeckt (Abschnitt 5.5). Somit deutet die Verteilung in Abbildung 10.5 auf schnelles Schalten hin.

c) Bestimmung der Ratenkonstanten

Der Test, ob die Stromreduzierung durch schnelles Schalten hervorgerufen wird, geschieht hier dadurch, dass man das Ausgangsniveau als bekannt voraussetzt. Für den Test wird das in Abschnitt 6.7 vorgestellte Verfahren zur Bestimmung des Niveaus bei schnellem Schalten benutzt. Es wird allerdings das bekannte Stromniveau aus Mode 1-3 vorgegeben ($I = 1,43$ pA), das nicht mit schnellem Schalten assoziiert ist (siehe unten). Damit kann das scheinbare Niveau in Mode 4 ($I = 0,93$ pA) mit dem 2D-Fit angepasst werden.

Im Gegensatz zu den simulierten Daten gestaltet sich hier die Anpassung mit dem genetischen 2D-Fit relativ schwierig, da wahrscheinlich das benutzte Modell $C \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O \xrightleftharpoons[k_{32}]{k_{23}} C$ für die Anpassung zu wenig Freiheitsgrade aufweist.

Die auftretenden Fitprobleme, aber auch die Möglichkeit, trotzdem zum Ergebnis zu kommen zeigen Tabelle 10.2 und Abbildung 10.4. Das Ergebnis mit der kleinsten Fehlersumme (Nr. 4) und einer guten Anpassung der schnellen Ereignisse im 2D-Differenzen-Histogramm (nicht gezeigt) stimmt mit der Stromverteilung der Messung überein. Für den Fit Nr. 4 sind also beide geforderten Bedingungen, die Anpassung der Stromverteilung und die Anpassung der schnellen Ratenkonstanten im 2D-Fit (siehe Abschnitt 6.7) für die Bestimmung des Niveaus und der Ratenkonstanten erreicht.

Das Ergebnis Nr. 4 zeigt, dass der $C_1 \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O_2$ -Übergang mit k_{ij} von ca. 500 kHz Ursache für die Stromreduzierung durch schnelles Schalten in Mode 4 ist.

Nr.	k_{12} / Hz	k_{21} / Hz	k_{23} / Hz	k_{32} / Hz	Quadratischer Fehler
1	95000	103000	53	48	418634± 24316
2	56000	51000	710	860	256395± 6567
3	54000	48000	680	800	273873± 4689
4	490000	460000	120	90	52455± 10031
5	49000	53000	980	840	272595± 10332
6	51000	56000	750	630	267668± 6768

Tabelle 10.2 Ergebnisse der Anpassung der Messung mit ChloraminT im Mode 4 (Zeitreihe: 210803a) mit einem $C \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O \xrightleftharpoons[k_{32}]{k_{23}} C$ -Modell

Die Anpassung mit dem kleinsten Fehler, Nr. 4, ist fett unterlegt.

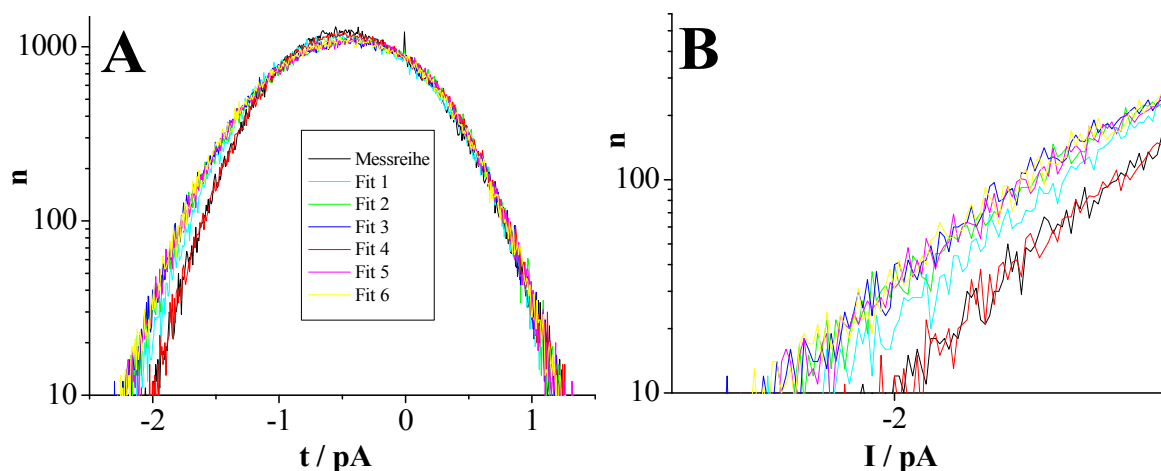


Abbildung 10.4 Stromverteilung der Messung mit ChloraminT (schwarze Kurve) an Nav1.2a in Mode 4 (Zeitreihe: 210803a) und der Fitergebnisse 1-6 aus Tabelle 10.2

(A) Gesamte Verteilung. (B) Ausschnitt aus (A)

Abschnitte ohne Schaltereignisse sind aus der Messung entfernt. Das scheinbare Stromniveau der Messdaten liegt bei 0,93 pA.

Analyse der Zeitreihen ohne Mode 4:

In Abbildung 10.6 ist die Stromverteilung pro Level (Schröder et al., 2004) für jeweils eine Messung mit ChloraminT in Mode 1-3 (A) und ATX II (B) dargestellt. Die Verteilungen (rot) zeigen ein Abknicken von den Gaußverteilungen (schwarz) zum jeweils anderen Niveau. Diese Form der Abweichung entsteht nach den Simulationsversuchen (siehe Abschnitt 5.5) als Fehler des Sprungdetektors. Dies ist ein Zeichen dafür, dass die Ratenkonstanten der Schaltereignisse nicht wesentlich schneller sind als die gewählte Filterfrequenz des analogen Tiefpassfilters der Messanlage. Auch die Phänomenologie der Schaltereignisse spricht nicht für eine wesentliche Verformung des Signals durch das Filter, d.h. die Stromniveaus sind eindeutig zu bestimmen und im Laufe der Zeitreihe konstant.

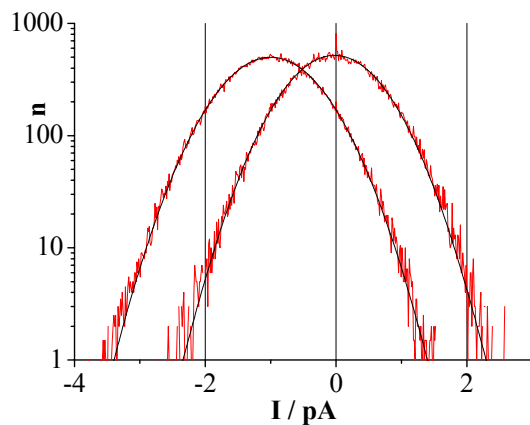


Abbildung 10.5 Stromverteilungen pro Level, Messung mit ChloraminT im Mode 4 (Zeitreihe: 210803a)
 In dieser Zeitreihe sind die Anteile der Zeitreihe ohne Schaltereignisse zum großen Teil herausgeschnitten. Für die bessere Vergleichbarkeit ist die Verteilung des leitenden Niveaus mit dem Faktor 0,5 auf die Höhe des nicht leitenden Niveaus skaliert. Der Kanalstrom in Mode 4 beträgt $I=0,93$ pA, Bereiche ohne Schaltereignisse weisen eine Rauschamplitude von $\sigma = 0,64$ pA auf, Abschnitte mit Ereignissen im Mode 4 eine Rauschamplitude von $\sigma = 0,77$ pA

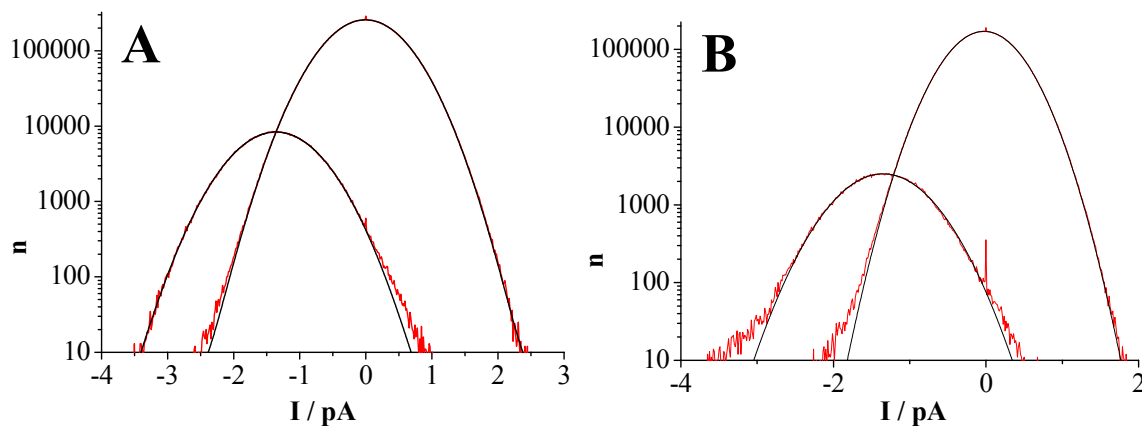


Abbildung 10.6 Stromverteilungen pro Level
 (A) Messung mit ChloraminT an N1E115-Zellen in den Modes 1-3 (Zeitreihe: 210803b)
 Das leitende Niveau liegt bei $I = 1,43$ pA. Die Rauschamplitude beider Niveaus beträgt $\sigma = 0,52$ pA.
 (B) Messung mit ATX II (Zeitreihe: 100703m) an Nav1.2a
 Das leitende Niveau liegt bei $I = 1,60$ pA. Die Rauschamplitude beider Niveaus beträgt $\sigma = 0,40$ pA.
 Die Stromverteilungen sind mit Gaußfunktionen für jedes Niveau angepasst. Der zusätzliche Peak bei 0 pA ist auf die Artefaktkorrektur zurückzuführen.

10.3 Modellierung: Anpassung von Markov-Modellen

Ziel der kinetischen Analysen dieser Arbeit ist es, das Schaltverhalten der Natriumkanäle in den unterschiedlichen Identitäten der vergifteten und un vergifteten Kanäle mit Markov-Modellen zu erklären. Es wird gehofft, dass diese Modelle und deren Ratenkonstanten die Dynamik des Kanalproteins beschreiben können, ebenfalls, dass einzelne Protein-Konfigurationen (oder Klassen äquivalenter Konfigurationen) einzelnen Zuständen im mathematischen Markov-Modell entsprechen. Dann würden die aus der Zeitreihenanalyse gewonnenen Übergangsraten der Markov-Prozesse direkt auf die Raten der Übergänge zwischen einzelnen Protein-Konfigurationen führen.

Die Strategie in diesem Abschnitt besteht darin, eine Zeitreihe, die wahrscheinlich alle kinetischen Parameter des Schaltverhaltens beinhaltet (ChloraminT-Vergiftung in Mode 3), mit den in Frage kommenden Markov-Modellen anzupassen. Aufgrund des enormen Aufwandes an Rechenzeit konnte das volle Repertoire des in dieser Arbeit entwickelten Modelltests nur an einer Zeitreihe in ganzer Breite durchgeführt werden. Eine Absicherung des Ergebnisses musste sich darauf beschränken, dass nachgeprüft wird, ob das ermittelte Modell auch die anderen Messreihen anpassen kann. Es zeigt sich tatsächlich, dass sich die weiteren Messungen der Modes 0-3 sowie der unvergifteten Kanäle sehr gut mit dem ermittelten Modell anpassen lassen (Abschnitt 10.6).

In diesem Abschnitt kann gezeigt werden, dass die ausgewählte Messreihe am besten durch das Modell (10.8) im 2D-Fit angepasst wird.

Markov-Modelle:

In (10.1) bis (10.14) sind die grundlegenden Markov-Modelle, die in diesem Abschnitt untersucht werden, dargestellt. Folgende Nebenbedingungen werden durch diese Modelle erfüllt:

a) Anfangszustand

Zum Zeitpunkt der Depolarisation t_0 befinden sich alle Natriumkanäle in einem Geschlossen-Zustand (C). Entsprechend dazu beginnt die Simulation der Markov-Modelle im 2D-Fit im Zustand (C_1).

b) Anzahl der Offen-Zustände

Die Messdaten in den Abschnitten 9.4- 9.7 zeigen zumindest 2 Offen-Zustände (O) in den 2D-Histogrammen und den sequentiellen Dwell-Time-Histogrammen. Deswegen sind 2 Offen-Zustände in den Markov-Modellen anzunehmen. Trotzdem werden Modelle mit nur einem Offen-Zustand getestet, um einige aus der Literatur mit einzubeziehen und das Verhalten des Fits bei verkürzten Modellen zu untersuchen (siehe unten).

c) Inaktivierender Zustand

In der Simulation muss der Kanal die Möglichkeit haben, die Kette der Zustände ohne Öffnung zu durchlaufen. Dieses wird durch den inaktivierenden Closed-Zustand (I) erreicht. Das ist zum einen wichtig für Messspuren mit Giftwirkung, die keine für unvergiftete Natriumkanäle typische Öffnung am Anfang zeigen, sondern erst verzögert im Verlauf der Zeitreihe. Diese verzögerte Öffnung kann durch einen Übergang aus dem I-Zustand zurück in den C_1 -Zustand erreicht werden.

Zum anderen ist der Zustand I für die Auswertung von Mehrkanalmessungen entscheidend, bei denen in vielen Messspuren nur ein Kanal aktiv ist. So kann ein Kanal „stumm geschaltet“ werden.

d) Beschränkung der Modelle

In Abschnitt 11.6 wird besprochen, dass von einigen Autoren sehr umfangreiche Modelle für die Beeinflussung des Gatings durch Ligandenbindung vorgeschlagen werden. Die Größe dieser Modelle liegt daran, dass die Bindung der Liganden und die Übergänge zwischen den Leitfähigkeiten des Kanals in ein gemeinsames Markov-Modell eingebunden werden. Hansen et al. (2003) schlagen eine Trennung der Markov-Modelle für die Ligandenbindung und für das Markov-Modell zur Beschreibung der Zeitreihe vor. In diesem Modell taucht die

Ligandenbindung nicht als Markov-Übergang im Gating-Modell auf. Sie wirkt nur parametrisch, in dem sie die Ratenkonstanten des Gating-Modells verstellt.

Die Trennung der Markov-Modelle für die Ligandenbindung und die Zeitreihe führt dazu, dass für das Gating nur so viele Freiheitsgrade benutzt werden müssen, wie in den kinetischen Eigenschaften der Zeitreihe sichtbar werden.

Auswahl der Modelle

Ausgehend von dem einfachsten, dem Äquivalent des Hodgkin- und Huxley-Modells (1952) für spannungsabhängige Ionenkanäle (10.5) werden weitere Closed-Zustände (C_i) hinzugefügt. Damit erhält man das Modell (10.2), das von mehreren Autoren für die Anpassung von Natriumkanal-Daten benutzt wird (Horn & Lange, 1983; Horn & Vandenberg, 1984; Patlak, 1991; Chahine et al., 1994).

Michalek et al. (1999) finden jedoch für einen HMM-Fit an sehr rauschigen Daten, die die Sicherheit der Aussage etwas einschränken, dass die verkürzte Version (10.1) am besten Natriumkanal-Daten anpasst. (10.3) und (10.4) erweitern die Modelle (10.1) und (10.5) auf zwei Offen-Zustände.

Modell (10.6), ein einfaches lineares Modell, wird aufgrund der gesammelten Erfahrungen aus der Diplomarbeit (Huth, 1999) verwendet. Die Modelle (10.7) – (10.9) erweitern Modell (10.6) auf 2 Offen-Zustände. (10.10) – (10.12) weisen zwei Geschlossen-Zustände vor dem ersten Offen-Zustand in der Kette auf, d.h. der Kanal muss vor der Öffnung mindestens zwei Geschlossen-Zustände durchlaufen. Die Modelle (10.13) und (10.14) versuchen schließlich, die zirkuläre Anordnung des Inaktiven-Zustands (I) der Modelle (10.1) – (10.5) mit den linearen Modellen zu verknüpfen, um die Aktivierung und Inaktivierung besser zu modellieren (siehe unten).

Die Ergebnisse der Versuche in Abschnitt 5.7 zeigen, dass die betrachteten Markov-Modelle für den hier gültigen Fall der fehlenden Stationarität nicht äquivalent sind.





$$\begin{array}{c}
 C_1 \rightleftharpoons C_2 \rightleftharpoons O_3 \rightleftharpoons O_4 \rightleftharpoons C_5 \\
 \Downarrow \\
 I_6
 \end{array}
 \tag{10.11}$$

$$\begin{array}{c}
 C_1 \rightleftharpoons C_2 \rightleftharpoons O_3 \rightleftharpoons C_4 \rightleftharpoons C_5 \\
 \Downarrow \\
 I_6
 \end{array}
 \tag{10.12}$$

$$\begin{array}{c}
 C_1 \rightleftharpoons O_2 \rightleftharpoons C_3 \rightleftharpoons O_4 \rightleftharpoons C_5 \\
 \Downarrow \nearrow \\
 I_6
 \end{array}
 \tag{10.13}$$

$$\begin{array}{c}
 C_1 \rightleftharpoons O_2 \rightleftharpoons C_3 \rightleftharpoons O_4 \rightleftharpoons C_5 \\
 \swarrow \searrow \\
 I_6
 \end{array}
 \tag{10.14}$$

Durchführung des 2D-Fits:

Aus den vorhandenen Messreihen wird die Zeitreihe 210803b der Modellanpassung ausgewählt (siehe Tabelle 10.3). Die Anzahl der Ereignisse und die Güte des Signal-Rausch-Verhältnisses liegen im Bereich dessen, was mit der hier verwendeten Messtechnik maximal zu erzielen ist.

Natriumkanal	Nav1.2a
Messreihe	210803b
Messart	cell attached
Kanäle	1
Abtastfrequenz / kHz	100
Filterfrequenz / kHz	10
Länge (Abschnitte á 100 ms)	2746
Ereignisse (Hinkley-Detektor)	13100
Artefakt / ms	0,12
Kanalstrom / pA	1,55
Rauschen / pA	0,52

Tabelle 10.3 Messung an Nav1.2a-Kanälen mit ChloraminT in den Modes 1-3 (überwiegend 3)
Messreihe: 210803b

Der Frequenzbereich der Ratenkonstanten in den Modellen wird für den genetischen 2D-Fit auf 1 Hz - 15 kHz für die langen Zeitreihen und 1 Hz - 20 kHz für die kurzen Zeitreihen (siehe unten) beschränkt. Das scheint bei einer Filterfrequenz des analogen Tiefpassfilters von 10 kHz und dem Ergebnis aus Abschnitt 10.2, dass bei dieser Messung kein schnelles Schalten auftritt, angemessen zu sein. Außerdem ergeben Vorversuche mit einem größeren Frequenzspektrum keinen Anhalt für bessere Fitergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Für alle Versuche wird die Ratenkonstante k_{12} , die aus dem C_1 -Zustand die Aktivierung einleitet, auf 1000 Hz (2500 Hz für die 20 ms Zeitreihen) nach unten beschränkt. Langsamere Ratenkonstanten der Aktivierung könnten den schnellen Anstieg in den Messdaten (Abbildung 10.7) nicht beschreiben.

Kriterien für die Modellauswahl:

Anhand von zwei Kriterien wird die Güte der Anpassung der Markov-Modelle bewertet. Mit der 2D-Fehlersumme können, wie in Abschnitt 6.5 gezeigt, Modelle unterschieden werden. Dieses Kriterium ist jedoch für die hier gemessenen Daten nicht hinreichend. Für stationäre Zeitreihen (gegebene Mikroreversibilität) ist der Zusammenhang zwischen 2D-Dwell-Time-Histogrammen und Ratenkonstanten im Markov-Modell eindeutig (Fredkin et al., 1985; Löptien, 1999), die Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten sind zeitlich konstant. Für die hier betrachteten ereignisgesteuerten Zeitreihen ist dieser Zusammenhang nicht mehr zwingend eindeutig, die Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten sind zeitlich veränderlich. Diese zusätzliche Information wird dadurch ausgenutzt, dass auch die Anpassung der Strom-Averages als Auswahlkriterium hinzugezogen wird. Die Beurteilung erfolgt anhand des Chebychev-Kriteriums durch die Betrachtung der Gleichmäßigkeit der Abweichung.

Aufgrund der Erfahrung mit dem 2D-Fit aus Kapitel 6 ist es nicht verwunderlich, dass offensichtlich falsche Anpassungen der Zeitreihen und eine Schwankung in den Ratenkonstanten bei den Ergebnissen auftreten, denn die fehlende Orthogonalität der Basisfunktionen (siehe Abschnitt 6.8) lässt eine gewisse Schwankung der Ratenkonstanten zu. Da allerdings die relativen Besetzungszustände von den Fit-Verfahren sehr ernst genommen werden, sind Hin- und Rückreaktion im Modell meistens gleichsinnig verschoben. Irrläufer des Fit-Verfahrens können durch mehrmalige Wiederholungen der Anpassungen pro Modell erkannt werden.

Insgesamt zeichnet sich für jedes Modell oder zumindest für eine Klasse von ähnlichen Modellen in der Regel ein konstantes Muster in der Anpassung ab, das sich besonders deutlich in den Stromkurven der Ergebnisse zeigt.

Folgende Versuche werden durchgeführt, um das beste Modell für die Anpassung der Daten zu ermitteln:

a) Vorversuche

In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) wird die Zeitreihe 210803b jeweils zweimal mit den Modellen (10.1) – (10.14) angepasst. Die hierbei ermittelten Probleme, die die Rauschreihe und die Modellierung der schnellen Aktivierung betreffen, werden in den weiteren Versuchsansätzen berücksichtigt.

Da das hier benutzte Fit-Verfahren für die Modellzeitreihe kein simuliertes, sondern gemessenes Rauschen einbindet (siehe Abschnitt 5.8), muss man die hierfür benutzte gemessene Rauschreihe optimieren. Alle Passagen, bei denen das Rauschen nicht exakt um die Nulllinie verteilt ist, werden herausgeschnitten. Hierdurch kann man die erzielte Fehlersumme im 2D-Fit um den Faktor 2 verbessern.

Zum anderen werden in c) die Abschnitte in der Zeitreihe auf 15 ms gekürzt, um die Aktivierung und die partielle schnelle Inaktivierung stärker zu gewichten. Nach 15 ms hat der Strom in etwa seinen stationären Zustand erreicht. Die Einbeziehung der folgenden relativ informationslosen Zeitbereiche würde den Einfluss der signifikanten Zeitabschnitte in der Fehlersumme schwächen.

Insgesamt zeigt sich schon hier, dass die meisten Ergebnisse ein sehr ähnliches Stromintegral über die Zeit aufweisen im Verhältnis zu den gemessenen Daten. Das Stromintegral stimmt auch bei vielen falschen Ergebnissen überein, bei denen die Strom-Averages nicht zur Deckung kommen.

b) Erste Fitversuche: Lange Zeitreihen

Die Modelle (siehe Abbildung 10.8), die in den Vorversuchen im Ansatz eine schnelle Aktivierung und einen Anteil einer schnellen Inaktivierung zeigen, werden jeweils mindestens zweimal angepasst. Anschließend verwendet man die Ergebnisse des genetischen Fit-Algorithmus als Startwerte für den 2D-Fit mit Simplex-Algorithmus (siehe Abbildung 10.8A), um evtl. eine Verbesserung der Ergebnisse erzielen zu können. Die Ratenkonstanten und Stromaverages werden durch den Simplex-Fit qualitativ aber nicht wesentlich verändert. Eine Verminderung der Fehlersumme im 2D-Differenzhistogramm ist nicht zu erreichen.

Bei den langen Zeitreihen versagt der Fit bei den meisten Modellanpassungen. Man kann es in Abbildung 10.7A daran erkennen, dass die Aktivierung gar nicht oder nur vermindert auftritt. Allerdings erhält man dafür eine gute Anpassung des stationären Stroms. Dies liegt, wie bereits oben erwähnt, an einer Übergewichtung des stationären Stroms im Verhältnis zur Aktivierungsphase in der Fehlersumme.

c) erste Fitversuche: Kurze Zeitreihen

Alle Modelle (10.1) – (10.14) werden wie in b) angepasst, mit dem Unterschied, dass die Abschnitte in der Zeitreihe auf 15 ms verkürzt sind (Dieses bedeutet auch eine verminderte Rechenzeit aufgrund der verkürzten Simulation.). Durch die Verkleinerung der Gesamtlänge erhält der Zeitbereich der schnellen Aktivierung der Natriumkanäle mehr statistisches Gewicht. Die Fehlersummen sind zusammen mit d) in Abbildung 10.8B aufgetragen.

Abbildung 10.7C und D zeigen ausgewählte Ergebnisse der Stromaverages. Fast alle aus dem Fit rekonstruierten Zeitreihen weisen ein zu schwache oder sehr häufig wie das Modell (10.8) Abbildung 10.7C eine etwa doppelt so starke Aktivierung auf. Nur in Ausnahmefällen gelingt wie in Abbildung 10.7D eine annähernde Übereinstimmung mit den Messdaten durch das Modell (10.9). Es ist also eine weitere Verbesserung der Fitstrategie notwendig (siehe nächster Absatz).

d) Einschränkung der Ratenkonstanten zum Erzwingen einer schnellen Aktivierung

Zusätzlich werden bei einigen Modellen außer k_{12} weitere Ratenkonstanten eingeschränkt, um Irrläufer des Fits zu verhindern (siehe Tabelle 10.4).

Die 2D-Fehlersummen der Fitergebnisse werden in der Regel jedoch deutlich schlechter (Daten nicht gezeigt), obwohl der Verlauf der Aktivierung in der Regel besser mit der Messreihe übereinstimmt. Das bedeutet, dass zugunsten der erzwungenen Aktivierung das Spektrum der Schaltereignisse nicht gut angepasst wird. Eine Einschränkung der Ratenkonstanten bis auf die oben erwähnte Begrenzung von k_{12} nach unten verbessert die Fitergebnisse also nicht.

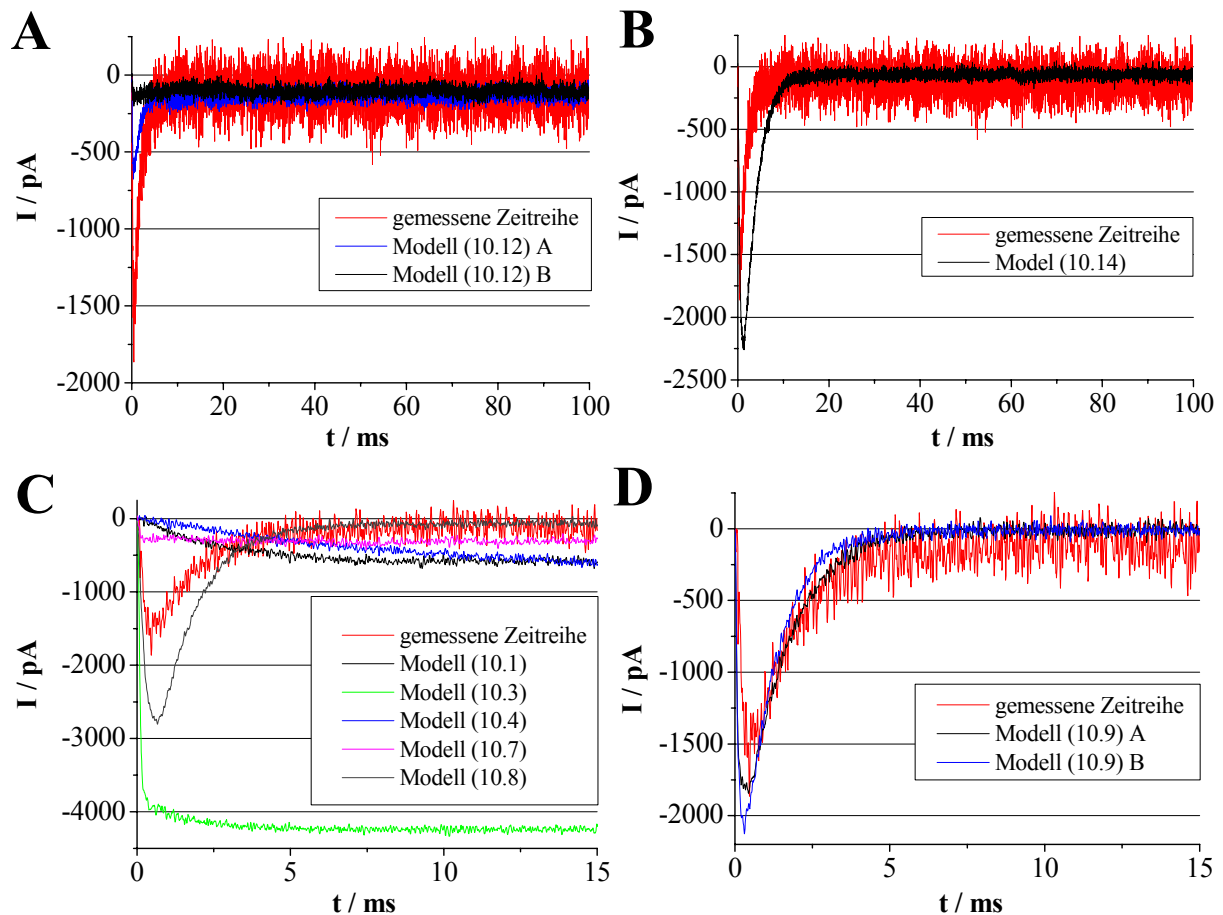


Abbildung 10.7 Typische Stromaverages der 2D-Fit Modellanpassung an die Zeitreihe 210803b (gemessene Daten)

(A) Anpassung des gesamten Messabschnittes (100 ms) mit dem Modell (10.12), gute Anpassung des Steady-State Stroms, aber fehlende schnelle Aktivierung

(B) Anpassung des gesamten Messabschnittes (100 ms) mit dem Modell (10.14), zu große Stromamplitude der Aktivierung und daraus folgender zu kleiner Steady-State-Strom

(C) Anpassung eines Teilabschnittes der Messreihe (15 ms), typische falsche Stromverläufe mit zu starker oder zu schwacher Aktivierung

(D) Anpassung eines Teilabschnittes der Messreihe (15 ms) mit dem Modell (10.9), bessere Übereinstimmung der angepassten Stromkurven, aber immer noch zu starke Aktivierung und dafür zu kleiner Steady-State-Strom

Modell	k_{12}/Hz	k_{21}/Hz	k_{23}/Hz	k_{24}/Hz	k_{25}/Hz	k_{34}/Hz	k_{35}/Hz
(10.1)	>1000		>1000	<500			
(10.2)	>1000		>1000			>1000	<500
(10.4)	>1000	<500	>1000		<500		
	k_{12}/Hz	k_{15}/Hz	k_{16}/Hz	k_{23}/Hz	k_{32}/Hz		
(10.7)	>1000		<500				
(10.8)	>1000		<500				
(10.9)	>1000		<500				
(10.10)	>1000	<500		>1000	<500		
(10.11)	>1000		<500	>1000	<500		
(10.12)	>1000		<500	>1000	<500		
(10.13)	>1000		<500				
(10.14)	>1000		<500				

Tabelle 10.4 Einschränkung des Wertebereiches der Ratenkonstanten für den 2D-Fit, um den Stromverlauf der Aktivierung zu verbessern

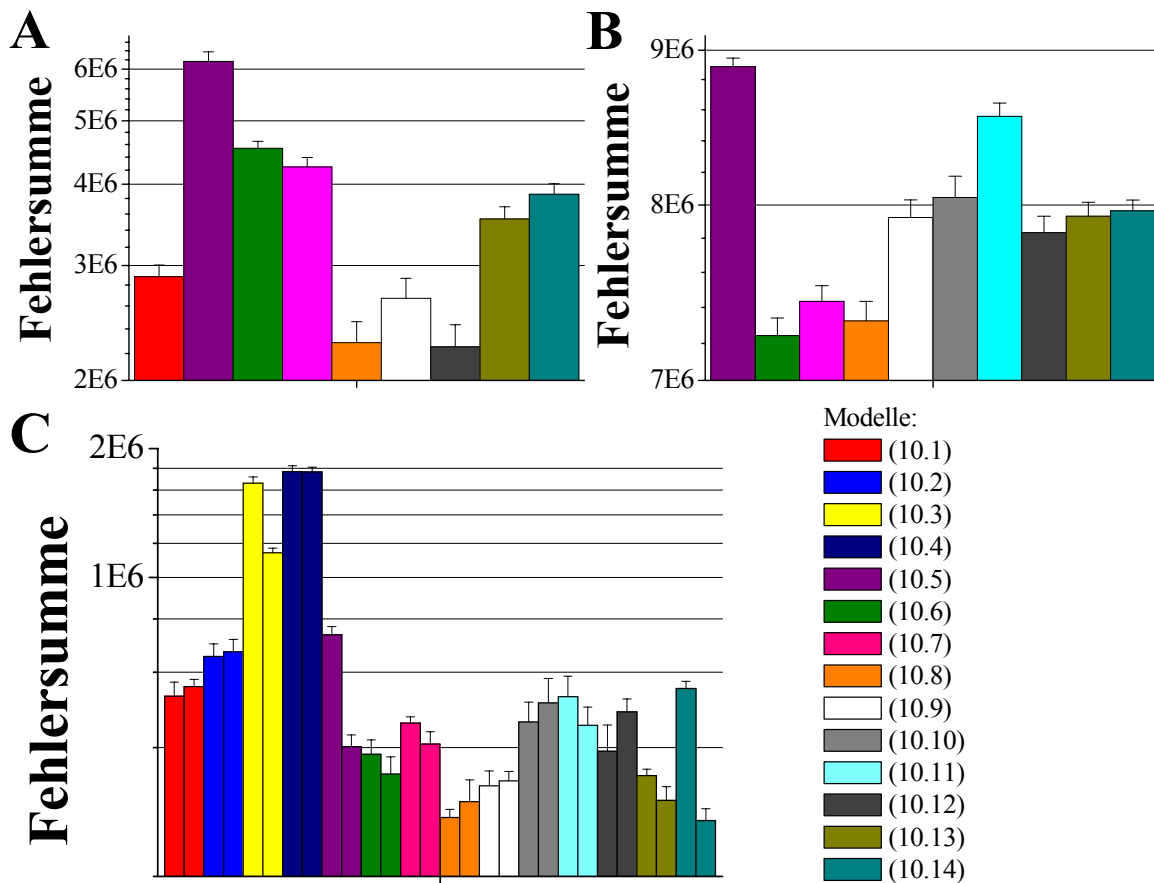


Abbildung 10.8 Anpassung der Zeitreihe 210803b mit dem 2D-Fit, Fehlersummen für die Modelle (10.1) – (10.14).

(A) Erste Fitversuche, Lange Zeitreihen: jeweils bestes Ergebnis (aus 2-3 Ergebnissen)

Nur die Modelle mit einer frühen Aktivierung sind dargestellt.

(B) erste Fitversuche, Kurze Zeitreihen: jeweils bestes Ergebnis (aus 2-3 Ergebnissen)

Nur die Modelle mit einer frühen Aktivierung sind dargestellt.

(C) Verbesserung der Aktivierung durch das Weglassen der Artefaktkorrektur der simulierten Zeitreihen: jeweils die besten zwei Ergebnisse (aus 3-5 Ergebnissen)

Im Gegensatz zu(A) und (B) erfolgt keine Artefaktelimination in den simulierten Zeitreihen des 2D-Fits (siehe Text).

e) Verbesserung der Aktivierung durch das Weglassen der Artefaktkorrektur der simulierten Zeitreihen

Die Artefaktkorrektur behandelt folgendes Problem: In den ersten 0,1-0,2 ms, in denen das Artefakt auftritt, ist das Membranpotential nicht genau bestimmt, da die Umladung der Pipetten- und Membrankapazität noch nicht abgeschlossen ist. Weiterhin wird ein schneller Stromanstieg in diesem Zeitbereich durch das analoge Tiefpassfilter beschränkt (10 kHz). Deshalb ist dieser Zeitbereich für den Vergleich mit simulierten Zeitreihen nicht klar definiert.

Zwei Korrekturverfahren werden ausprobiert:

- 1.: Weglassen dieses Zeitabschnittes
- 2.: Ersetzen der Stromwerte durch die Werte des Closed-Niveaus (Die Artefaktkorrektur ist sinnvoll, da die Messabschnitte jeweils im Closed-Niveau beginnen.)

Es zeigt sich, dass folgendes Vorgehen die besten Ergebnisse im 2D-Fit ergibt: Weglassen des Zeitbereichs bei den simulierten Daten und Einsetzen der Closed-Werte nur bei gemessenen Daten der ersten 0,1-0,2 ms. Damit scheint der Startpunkt für die simulierten Daten besser definiert zu sein.

In den bisherigen Versuchansätzen a) - d) werden diese Punkte sowohl in gemessenen als auch simulierten Daten auf das Closed-Stromniveau eingestellt. Nun können Ergebnisse mit einer fast perfekten Übereinstimmung der Messreihe und der Modellzeitreihe erreicht werden.

In Abbildung 10.8C sind die Fehlersummen der Anpassung für die Modelle dargestellt. Die zwei sehr ähnlichen Modelle (10.8) und (10.14) zeigen die besten Fehlersummen. Allerdings kann nur das Modell (10.8) die Stromkurve der gemessenen Daten reproduzieren wie in den beiden Anpassungen in Abbildung 10.9 zu sehen ist. Auch die Differenzhistogramme in Abbildung 10.10 zeigen eine für gemessene Daten erstaunlich gute Übereinstimmung von Messreihe und modellierter Zeitreihe. Die etwas besser passende Kurve (schwarz) in Abbildung 10.9 zeigt auch die niedrigere Fehlersumme in Abbildung 10.8C und die bessere visuelle Anpassung des 2D-Differenz-Histogramms in Abbildung 10.10.

Dies führt dazu, dass Modell 10.8 als wahres Modell angenommen wird, wie unten noch einmal zusammenfassend diskutiert wird.

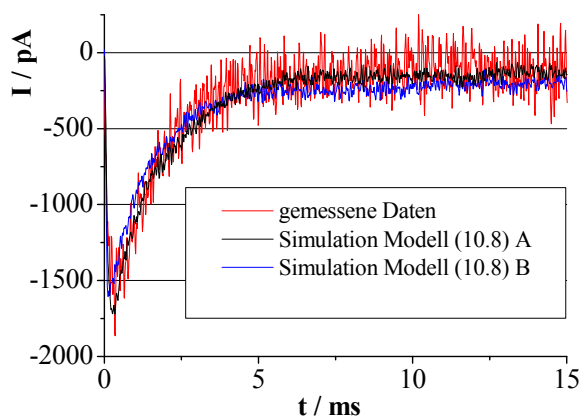


Abbildung 10.9 Anpassung eines Teilabschnittes der Messreihe (20 ms) mit dem Modell (10.8)

Durch die fehlende „Artefaktelimination“ der simulierten Zeitreihen des 2D-Fits lässt sich mit dem Modell (10.8), Fit A eine fast perfekte Anpassung der gemessenen Stromkurve erzielen. Auch die Kurve B stellt noch eine gute Anpassung dar.

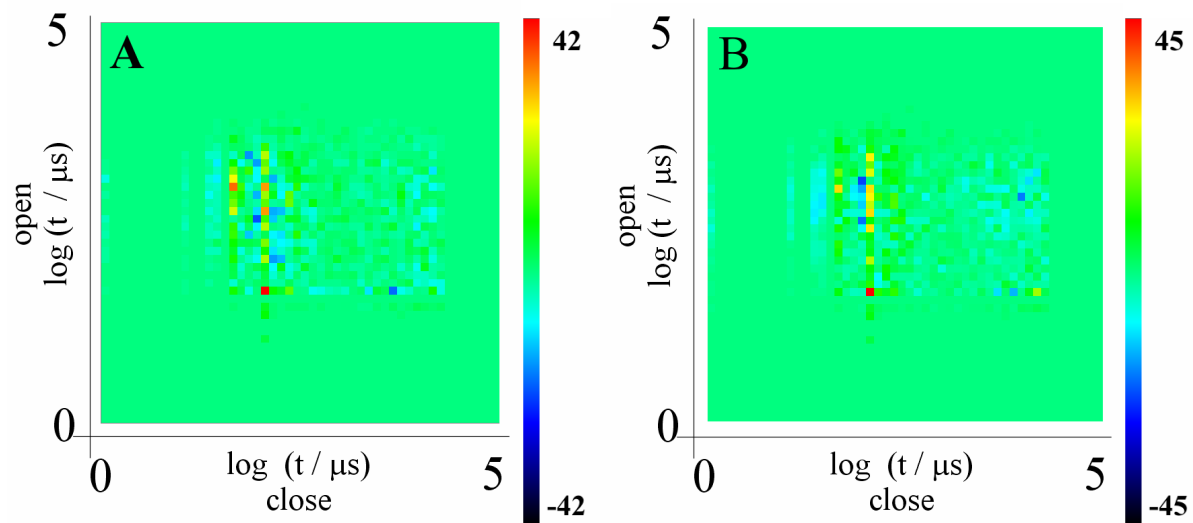


Abbildung 10.10 2D-Differenzhistogramme der Anpassung mit dem Modell (10.8)

(A) Mit den getesteten Modellen bestmögliche Anpassung im 2D-Fit

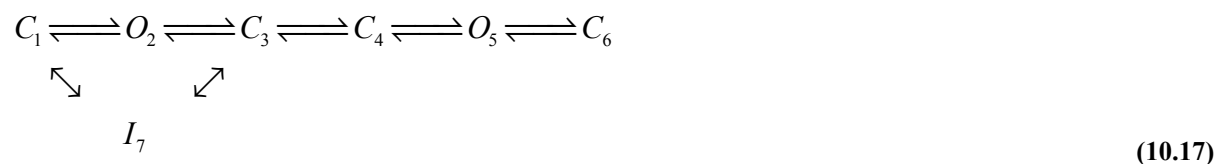
(B) gute Anpassung im 2D-Fit, aber schlechtere Anpassung als (A), zu erkennen in den höheren Maximalwerten und der deutlicheren Darstellung von Tälern (blau) und Hügeln (gelb-rot)

Die zugehörigen Fehlersummen sind in Abbildung 10.8 (C) und die Stromkurven in Abbildung 10.9 dargestellt.

f) Modellerweiterung

Zur Ergänzung und Erweiterung soll mit den Modellen (10.15) – (10.19) den Fragen nachgegangen werden, ob durch eine andere Anordnung der Zustände oder eine Erweiterung auf 3 Offen-Zustände (O) der Modelle bessere Anpassungen erreicht werden können.

Ausgehend von dem erfolgreichen Modell (10.8) mit dem Motiv $O_2 \rightleftharpoons C_3 \rightleftharpoons O_4$ wird in (10.15), (10.18) und (10.19) ein weiterer Offen-Zustand hinzugefügt. In den Modellen (10.16) und (10.17) ist zwischen 2 Offen-Zuständen ein weiterer Geschlossen-Zustand (C) eingefügt.



$$\begin{array}{ccccccccc}
 C_1 & \rightleftharpoons & C_2 & \rightleftharpoons & O_3 & \rightleftharpoons & C_4 & \rightleftharpoons & O_5 \\
 \Downarrow & & \Downarrow & & & & & & \\
 I_6 & & O_7 & & & & & &
 \end{array} \tag{10.18}$$

$$\begin{array}{ccccccccc}
 C_1 & \rightleftharpoons & O_2 & \rightleftharpoons & C_3 & \rightleftharpoons & O_4 & \rightleftharpoons & C_5 & \rightleftharpoons & O_6 \\
 \Downarrow & & & & & & & & & & \\
 I_7 & & & & & & & & & &
 \end{array} \tag{10.19}$$

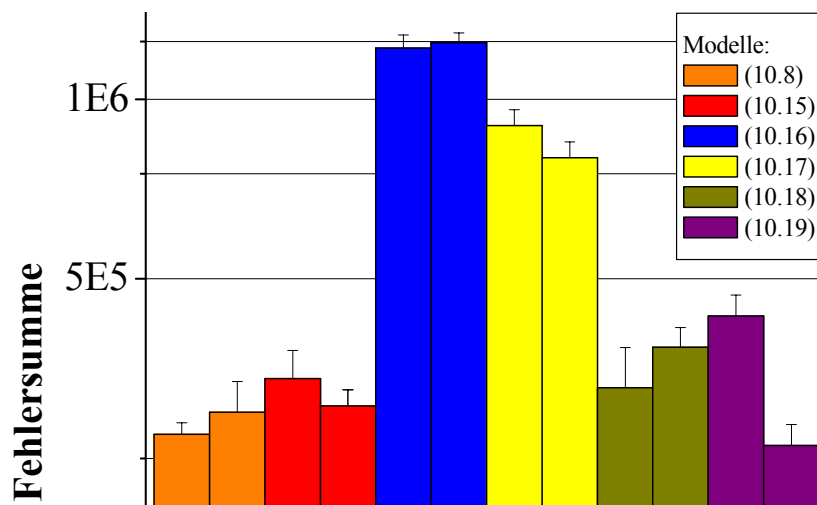


Abbildung 10.11 Anpassung der Zeitreihe (20 ms) mit den Modellen (10.8) und (10.15) - (10.19). Jeweils die besten zwei Ergebnisse (aus 3-5 Ergebnissen), keine Artefaktelimination in den simulierten Zeitreihen des 2D-Fits (siehe Text)

In Abbildung 10.11 ist zu erkennen, dass bis auf die Ausnahme einer Anpassung mit dem Modell (10.19) die Fehlersummen im Vergleich zu dem Modell (10.8) nicht besser, sondern schlechter geworden sind. Für das Modell (10.19) zeigt sich, dass alle Strom-Averages der Modellzeitreihen die gemessene Zeitreihe nicht anpassen können (Daten nicht gezeigt).

Hier gilt, dass durch eine vermeintliche Überbestimmung eines Modells die Ergebnisse nicht besser werden müssen. Durch das Hinzufügen weiterer Freiheitsgrade erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines Irrlaufes durch den Fit-Algorithmus dramatisch. Diese Erfahrung kann in der Praxis des Fittens häufig gemacht werden.

Die Verbesserung der Trefferquote des genetischen Algorithmus durch die Erhöhung der Individuen- oder Generations-Zahl um den hier geschätzten Faktor 10 pro 2 Freiheitsgrade ist aus Gründen der Rechenzeit unmöglich.

Modellauswahl:

Von den gestesteten Modellen kann das Modell (10.8) die Messreihe 210803b am besten anpassen. Es zeigt in allen Versuchen dieses Abschnittes (siehe Abbildung 10.8) mit die kleinste Fehlersumme und kann als einziges Modell die Stromkurve nach dem Chebyshev-Kriterium sehr gut anpassen (siehe Abbildung 10.9).

Folgende Argumente stützten diese Auswahl und lassen das Modell (10.8) als geeignet erscheinen, die Einzelkanalaufzeichnungen dieser Arbeit hinreichend genau zu beschreiben:

a)

Im 2D-Differenzenhistogramm (Abbildung 10.10A) sind nur noch sehr geringe Abweichungen zu erkennen. Die verbleibenden systematischen Hügel und Täler sind sehr klein und lassen sich im Gegensatz zu Untersuchungen an simulierten Daten wohl nicht weiter verbessern.

b)

Ähnliche Modelle wie (10.13) und (10.14) zeigen ebenfalls eine gute Anpassung des 2D-Spektrums, aber trotz aller Versuche (siehe oben: Einschränkung der Ratenkonstanten und Artefaktkorrektur) keine gute Anpassung der Stromkurven (Abbildung 10.7). Modelle mit einer anderen Anordnung der Offen-Zustände schneiden in den Fehlersummen jedoch generell schlechter ab.

c)

Schon mit den einfachen Modellen (10.5) und (10.6) mit nur einem Offen-Zustand lassen sich das 2D-Histogramm und die Stromkurven mittelgeradig genau anpassen. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Erweiterung auf Modelle mit zwei Offen-Zuständen hinreichend ist und Modelle mit drei O-Zuständen (10.15, 10.18, 10.19) sehr wahrscheinlich überbestimmt sind.

10.4 Modellierung: Direkter-Zeitreehenfit

Es wäre für diese Arbeit von großem Interesse, die Modellanpassung des 2D-Fits mit einem weiteren Fit-Verfahren zu überprüfen. Dazu bietet sich der für nicht stationäre Zeitreihen modifizierte Direkte-Zeitreehenfit an. Allerdings können die Erfolge bei simulierten Daten (Abschnitt 6.1) nicht an gemessenen Zeitreehen wiederholt werden.

Abbildung 10.12 zeigt die Stromkurven der Anpassung mit dem Direkten-Zeitreehenfit (Abschnitt 5.9). Eine wesentliche Übereinstimmung mit der Messreihe (rot) kann nicht erreicht werden. Auch mit einer weiteren Messreihe (ChloraminT im Mode 2, Daten nicht gezeigt) oder der Veränderung der Bedingungen des Startartefaktes (zum Vergleich 2D-Fit Abschnitt 10.3, Daten nicht gezeigt) lassen sich keine verbesserte Anpassungen erzielen.

Die Stromkurven schwanken dabei nicht so stark wie die des 2D-Fits, der Direkte-Zeitreehenfit konvergiert relativ stabil auf die „falschen“ Ratenkonstanten, wie Abbildung 10.12 zeigt. Eine bessere Anpassung unter anderen Startbedingungen ist nicht zu erwarten. Die Ergebnisse des Direkten-Zeitreehenfits können für die Interpretation der Daten deswegen leider nicht herangezogen werden.

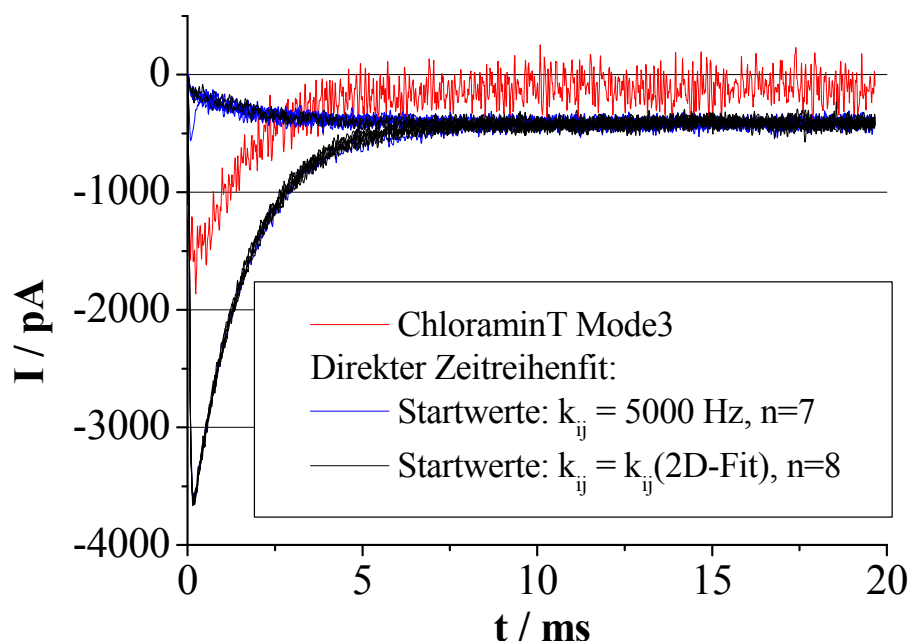


Abbildung 10.12 Ergebnisse des Direkten-Zeitreehenfits bei der Anpassung einer Zeitreihe mit ChloraminT im Mode 3

Als Starwerte wird ein neutraler Satz vom $k_{ij} = 5000$ Hz benutzt (blau). Außerdem werden die vom 2D-Fit ermittelten Ratenkonstanten k_{ij} als Startwerte eingesetzt (schwarz).

10.5 Modellierung: Simulation der Besetzungs-Wahrscheinlichkeit

Für die Interpretation von Modellanpassungen werden in erster Linie die ermittelten Ratenkonstanten benutzt. Allerdings ist der Zusammenhang der Konstanten zum Teil über mehrere Zustände komplex voneinander abhängig. Um die Analyse zu erleichtern, werden zusätzlich die Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten der Zustände herangezogen.

Da die Offen-Wahrscheinlichkeit des Natriumkanals nach einem Potentialsprung zeitlich nicht konstant ist, lassen sich die Besetzungs-Wahrscheinlichkeit im Markov-Modell nicht mit den üblichen Matrixmethoden (Albertsen, 1992; Jackson, 1997) für stationäre Zeitreihen berechnen. Die Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten werden stattdessen dem Simulationsprogramm (siehe Abschnitt 5.8) entnommen. Zusätzlich stehen noch die addierten Stromkurven zur Verfügung, die die gesamt Offen- und Geschlossen-Wahrscheinlichkeit über die Zeit anzeigen.

Abbildung 10.13 zeigt Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten für unterschiedliche Längen der Messspuren (0,02 s, 0,2 s und 2 s) und die Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von der Anzahl der Messspuren pro Zeitreihe (0,02 s: 1, 10, 100 Abschnitte, je 10 Wiederholungen). Nach 100 simulierten Spuren sind die Fehlerbalken der Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten bereits klein (schwarze Kurve). D.h. das bei 10^6 simulierten Messspuren wie in Abschnitt 10.6, wo diese Methode angewendet wird, die Fehler bei der Simulation vernachlässigbar klein sind.

Durch die Verlängerung der Messspuren verändern sich die Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten in diesem nicht stationären Prozess (violette und orange Kurve). Die Wahrscheinlichkeiten der nicht absorbierenden Zustände (hier alle außer C_5) nimmt mit zunehmender Länge der Messspuren ab. Die Angabe der $P(Z_i)$ ist daher mit der simulierten Zeit /Spur verknüpft.

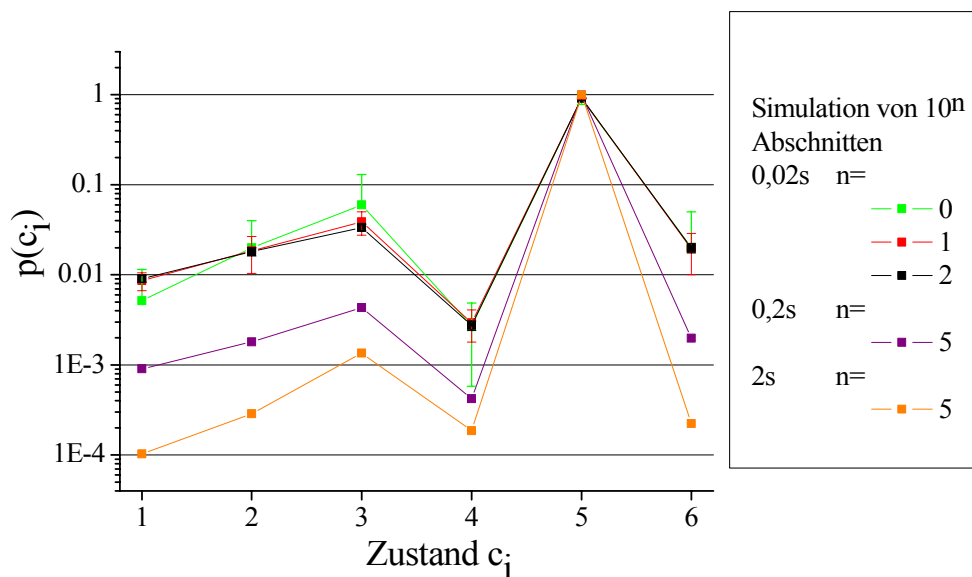


Abbildung 10.13 Simulierte Besetzungs-Wahrscheinlichkeit (ChloraminT, Mode 2 -N1E115)
 Dargestellt ist die Abhängigkeit der Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten $P(Z_i)$ von der Anzahl der Spuren pro Zeitreihe (10^n) und von der Länge der einzelnen Spuren (0,02 s, grün, rot, schwarz; 0,2 s, violett; 2 s, orange).

10.6 Modellierung: Anpassung der gemessenen Zeitreihen

In diesem Abschnitt werden Einzelkanalaufzeichnungen dieser Arbeit aus Kapitel 9 mit dem 2D-Fit angepasst. Das zugrunde liegende Markov-Modell für die Anpassung konnte in Abschnitt 10.3 ermittelt werden (Modell 10.8). In den Abbildung 10.14 folgende sind die Anpassungen der Zeitreihen mit dem 2D-Fit dargestellt. Tabelle 10.5 enthält die ermittelten Ratenkonstanten. In der folgenden Tabelle 10.6 sind die simulierten Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten der Fitergebnisse dargestellt.

Die Anpassung der gemessenen Daten mit dem 2D-Fit ist sehr viel aufwändiger als bei simulierten Daten. Die Rechenzeit wird durch die Optimierungsschritte des 2D-Fits für jede einzelne Zeitreihe sehr lang. Dies betrifft insbesondere die Einschränkung der Ratenkonstante k_{12} und die Anzahl der Individuen pro Generation im genetischen Algorithmus. Deswegen können nicht alle untersuchten Zeitreihen aus Kapitel 9 betrachtet werden.

Für die Anpassung der Modes 1-3 mit ChloraminT wird die Messung 220803b an N1E115-Zellen ausgewählt, die mit Abstand die meisten Ereignisse in den Modes aufweist. Dies ist keine Einschränkung, da der Kanal in dieser Zeitreihe die gleichen Kinetiken aufweist wie die Nav1.2a-Kanäle der HEK-Zellen. Sehr wahrscheinlich handelt es sich auch um einen Nav1.2 der N1E115-Zellen (Benzinger et al., 1999). Außerdem ist die Anpassung der Messspuren in Mode 3 der N1E115 denen im Mode 3 an Nav1.2a sehr ähnlich (siehe Tabelle 10.5).

Weiterhin erscheint es sehr schwierig, eine Zeitreihe mit ChloraminT im Mode 4 anzupassen. Die vielen schnellen Übergänge des reduzierten Stroms dominieren das 2D-Histogramm sehr stark, so dass die wenigen langsamen Übergänge kaum zur Fehlersumme beitragen. In dieser Arbeit wird deshalb lediglich das schnelle Schalten im Mode 4 betrachtet (Abschnitt 10.2).

Bei der Interpretation der 2D-Fitergebnisse ist folgendes zu beachten:

a) 2D-Histogramme

Die 2D-Differenzhistogramme der Ergebnisse sind nicht so „glatt“ wie die Anpassung bei simulierten Daten (Kapitel 6). Zum Teil wirken sich Restartefakte punktuell (z.B. Abbildung 10.8A) im Histogramm aus und lassen aufgrund der dadurch veränderten Skalierung die Histogramme schlechter angepasst erscheinen.

b) Stromkurven

Wie bereits in Abschnitt 10.3 erwähnt werden die 2D-Dwell-Time-Histogramme angepasst und nicht die aufaddierten Stromkurven. Deswegen ist eine Übereinstimmung von gemessener und angepasster Stromkurve ein hartes Kriterium für einen guten Fit, aber in fast allen Fällen nicht perfekt zu erreichen. Um so erfreulicher ist, dass, wie bereits bei den simulierten Daten (Kapitel 6) auch bei den gemessenen Daten die niedrigste Fehlersumme im 2D-Fit mit der besten Übereinstimmung der Stromkurven korrespondiert.

Die gemessenen Daten weisen eine größere Rauschamplitude auf als die jeweilige Anpassung. Das liegt daran, dass nicht stochastische Rauschartefakte in einzelnen Messspuren in die aufaddierten Stromkurven (Strom-Averages) übernommen werden und zusätzlich das Rauschen vergrößern.

c) Rechenzeit

Das Optimum der Anpassung im genetischen Algorithmus kann bei den Messdaten noch nicht erreicht werden. Durch die Erhöhung der Individuen pro Generation um den Faktor 10 gegenüber den Simulationsexperimenten aus Kapitel 6 wird eine deutliche Verbesserung auf Kosten einer Rechenzeit von 1-4 Wochen pro Fit erzielt.

d) Einschränkung der Ratenkonstanten

Eine wesentliche Verbesserung der Anpassung kann durch die Einschränkung der Ratenkonstante k_{12} erreicht werden. Diese Einschränkung korreliert mit der Anpassung der schnellen Phase des Stromanstiegs am Anfang der aufaddierten Stromkurve.

Alle Versuche, andere Ratenkonstanten k_{ij} einzuschränken bis auf die obere Begrenzung bei 20 kHz, führen im Regelfall zu schlechteren Anpassungen.

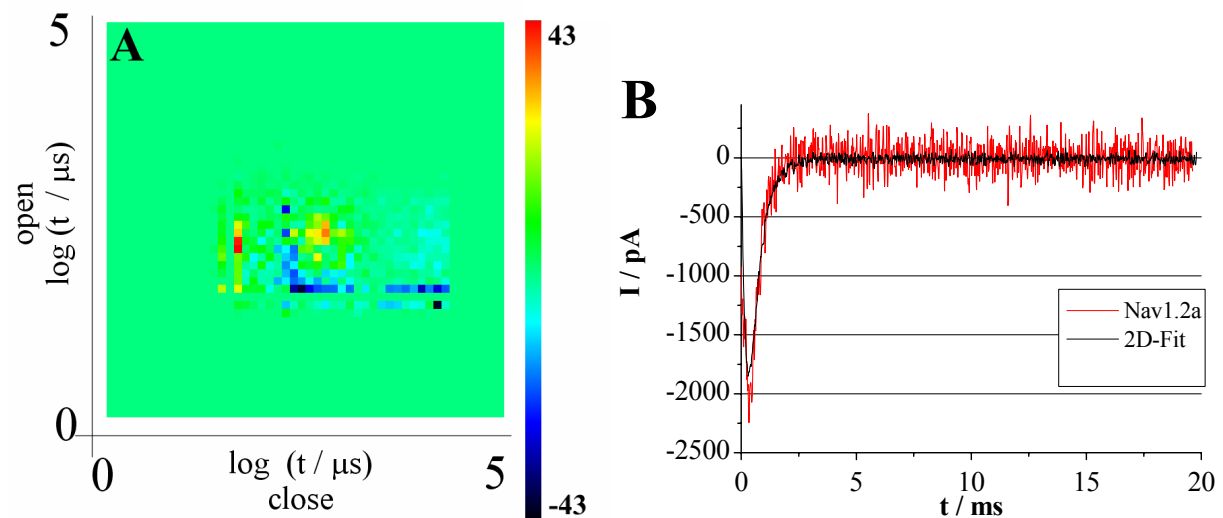


Abbildung 10.14 Anpassung einer unvergifteten Zeitreihe (Nav1.2a, 100703h) durch den 2D-Fit (A) Differenzhistogramm der Anpassung, (B) Stromkurven

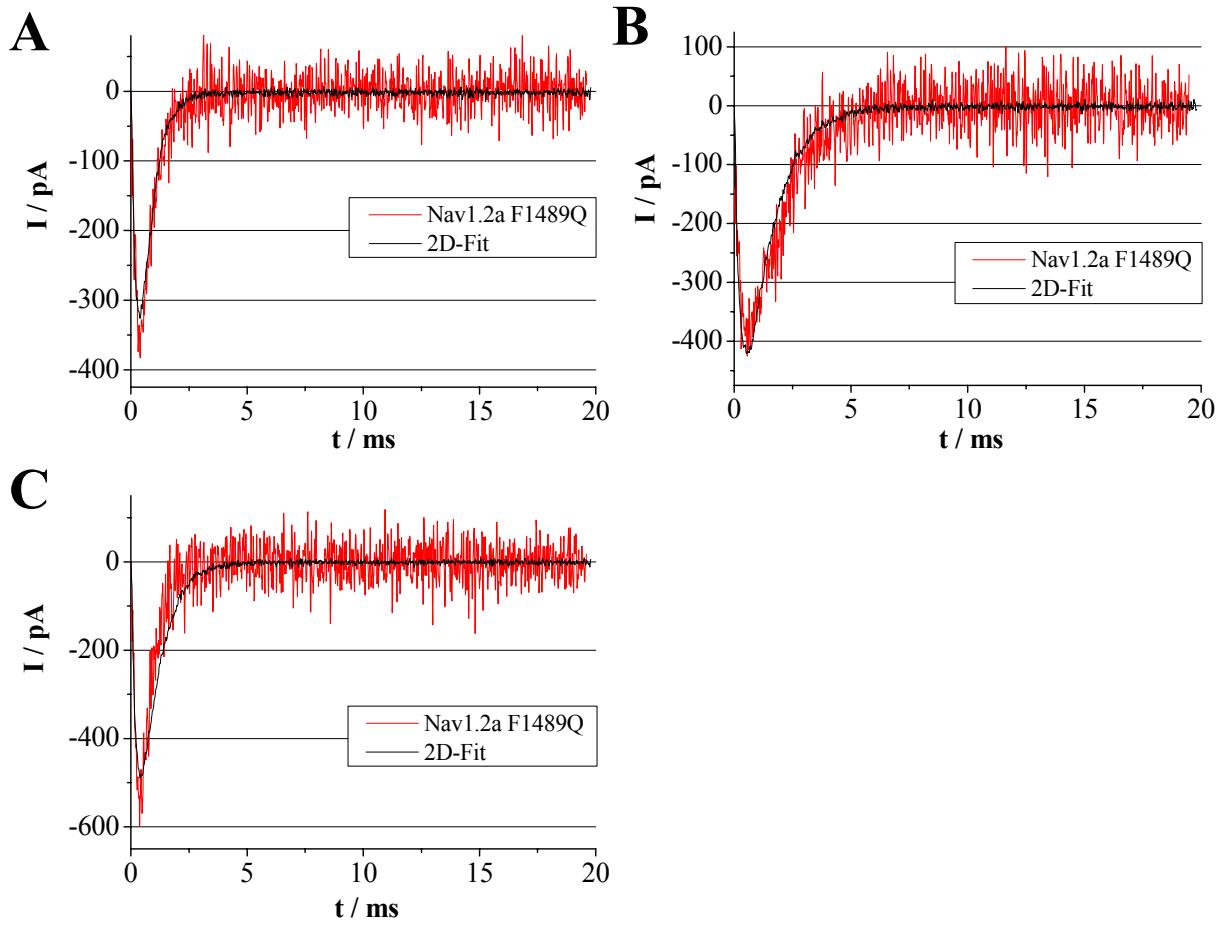


Abbildung 10.15 Stromkurven: Anpassung der Zeitreihen mit Nav1.2a F1489Q durch den 2D-Fit
 (A) 140803a, (B) 150803a, (C) 160803a

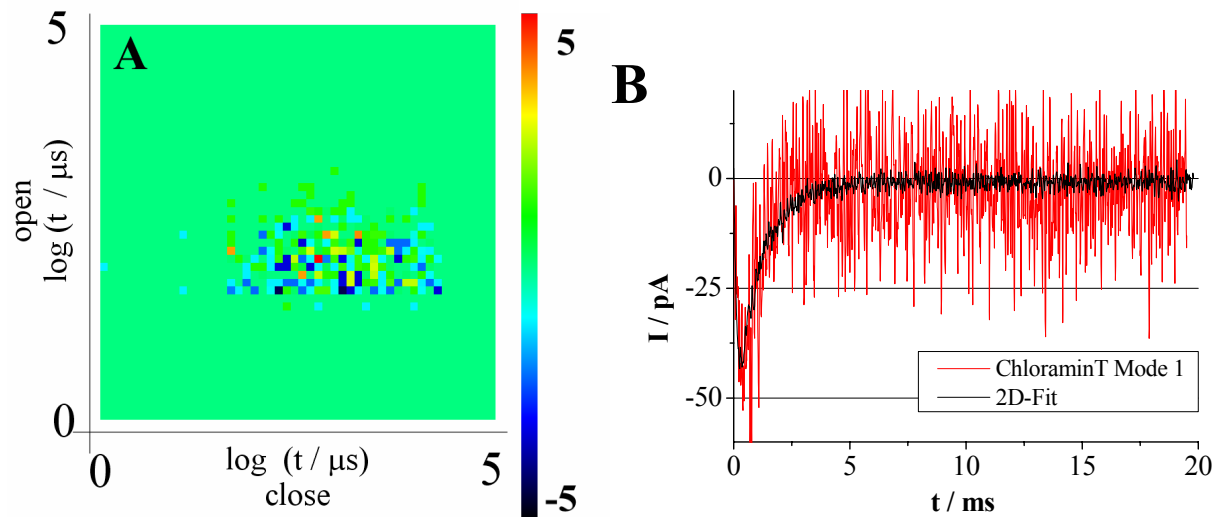


Abbildung 10.16 Anpassung der Zeitreihen mit ChloraminT im Mode 1 (220803b) durch den 2D-Fit
 (A) Differenzhistogramm der Anpassung, (B) Stromkurven

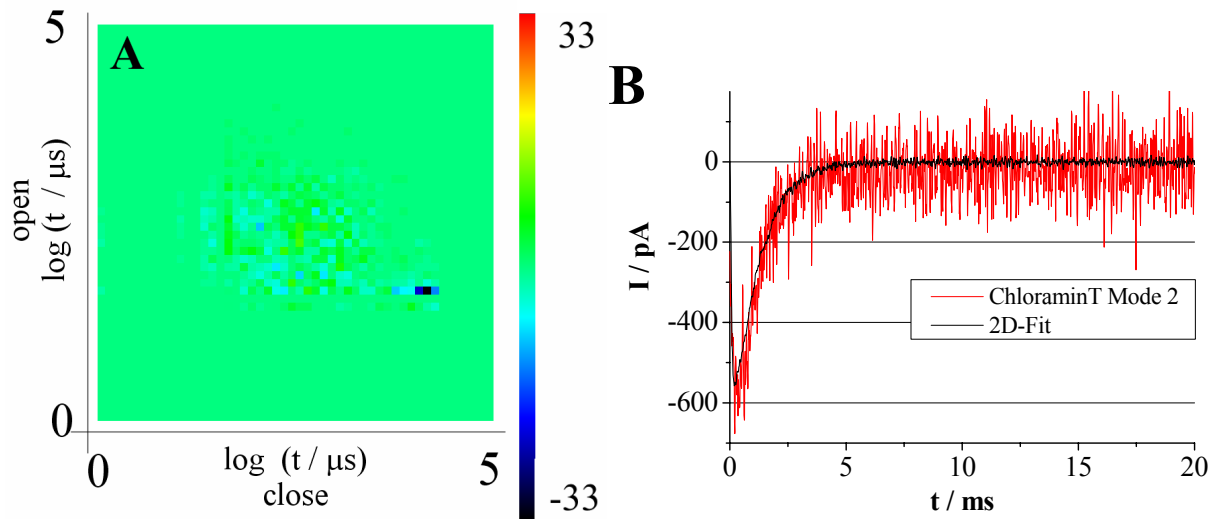


Abbildung 10.17 Anpassung der Zeitreihen mit ChloraminT im Mode 2 (220803b) durch den 2D-Fit (A) Differenzenhistogramm der Anpassung, (B) Stromkurven

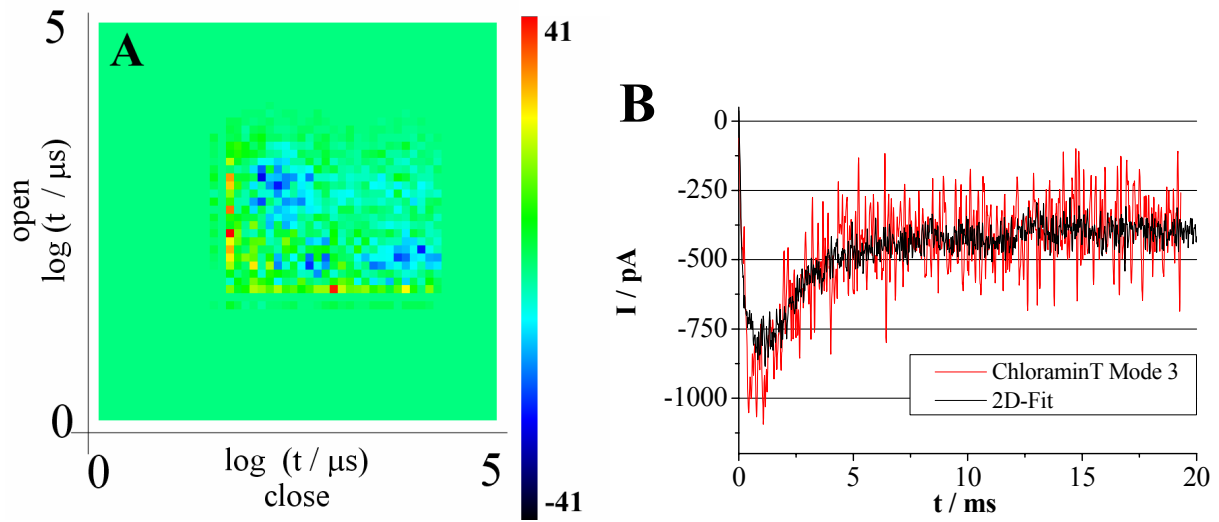


Abbildung 10.18 Anpassung der Zeitreihen mit ChloraminT im Mode 3 (220803b) durch den 2D-Fit (A) Differenzenhistogramm der Anpassung, (B) Stromkurven



Zum Vergleich das in Abschnitt 10.3 gefundene Markov-Modell (10.8)

Gift - Kanal	k_{12} /Hz	k_{21} /Hz	k_{23} /Hz	k_{32} /Hz	k_{34} /Hz	k_{43} /Hz	k_{45} /Hz	k_{54} /Hz	k_{16} /Hz	k_{61} /Hz
Nav1.2a WT Kontrolle	5698	10580	19701	9519	16877	581	6395	8	4578	18793
Nav1.2a F1489Q 1	5838	1787	19445	18708	19183	1893	3786	8	6215	11078
Nav1.2a F1489Q 2	3555	688	4673	15381	9270	216	12933	14	6607	7208
Nav1.2a F1489Q 3	3965	577	2552	2199	10580	14134	18784	9	3288	12720
ChloraminT, Mode 1 (N1E115, 220803b)	3223	19551	16319	1429	16629	642	10457	26	3941	9182
ChloraminT, Mode 2 (N1E115, 220803b)	7171	836	3755	424	3102	19870	18738	3	11638	5351
ChloraminT, Mode 3 (N1E115, 220803b)	2722	19798	6826	11670	19836	2192	672	19973	1567	179
ChloraminT, Mode 3 (Nav1.2a, 210803b)	6828	1361	314	4590	9786	11935	2588	15749	7367	50

Tabelle 10.5 Ergebnisse der Anpassung der gemessenen Zeitreihen

Die Ratenkonstanten der jeweils besten 2D-Fitergebnisse (in den Fehlersummen und den Stromaverages) sind eingetragen. Die absorbierenden Übergänge sind rot dargestellt.

Gift - Kanal	$P(C_1)$	$P(O_2)$	$P(C_3)$	$P(O_4)$	$P(C_5)$	$P(I_6)$	$\sum P(O_i)$
Nav1.2a	0,016	0,0041	0,0033	0,0090	0,96	0,0040	0,013
Nav1.2a F1489Q 1	0,011	0,0065	0,0041	0,015	0,96	0,0059	0,022
Nav1.2a F1489Q 2	0,020	0,029	0,0055	0,0049	0,92	0,018	0,034
Nav1.2a F1489Q 3	0,017	0,027	0,0089	0,0031	0,94	0,0043	0,030
ChloraminT, Mode 1 (N1E115)	0,036	0,0034	0,0033	0,0071	0,93	0,015	0,011
ChloraminT, Mode 2 (N1E115)	0,0090	0,017	0,034	0,0028	0,92	0,019	0,020
ChloraminT, Mode 3 (N1E115)	0,12	0,016	0,0088	0,078	0,0026	0,78	0,094
ChloraminT, Mode 3 (Nav1.2a)	0,013	0,062	0,0042	0,0035	0,00057	0,92	0,066

Tabelle 10.6 Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten: Ergebnisse der Anpassung der gemessenen Zeitreihen aus Tabelle 10.5

Ermittlung der Besetzungs-Wahrscheinlichkeiten durch Simulation wie in Abschnitt 10.5 beschrieben: 20 ms / Spur, 10^6 Spuren

Absorbierende Zustände sind rot dargestellt, die Gesamt-Offen-Wahrscheinlichkeit blau.

Folgende Zusammenhänge lassen sich aus den Ratenkonstanten k_{ij} aus Tabelle 10.5 und den Offen-Wahrscheinlichkeiten $P(Z_i)$ aus Tabelle 10.6 im Markov-Modell (10.8) erkennen:

a) Absorbierender Zustand

Der unvergiftete Natriumkanal, die Mutante F1489Q und die Vergiftung mit ChloraminT im Mode 1 und 2 zeigen den absorbierenden Zustand bei C_5 mit einer Besetzungswahrscheinlichkeit $> 0,90$. Dazu gehört die durchgehend langsame Ratenkonstante $k_{54} < 30$ Hz, die bewirkt das dieser Zustand absorbierend wirkt.

Die Vergiftung mit ChloraminT im Mode 3 wird anders angepasst. Hier ist der absorbierende Zustand I_6 (in der Messung an N1E115 geht ein Teil der Besetzungswahrscheinlichkeit auf C_1 über). Die zugehörige langsame Ratenkonstante ist jetzt k_{61} . Sie ist allerdings schon deutlich schneller als bei den unvergifteten Messungen, so dass der Zustand I_6 nicht absolut absorbierend ist.

b) Austauschbarkeit von O_2 und O_4

Die Austauschbarkeit von O_2 und O_4 ist ein erstaunliches Phänomen. Denn das Motiv $O_2 \rightleftharpoons C_3 \rightleftharpoons O_4$ aus dem Modell (10.8) ist auf beiden Seiten „angebunden“. Von links erfolgt die Aktivierung des Kanals aus C_1 , nach rechts geht der Kanal (nicht ChloraminT Mode 3) in den absorbierenden Zustand über. O_2 und O_4 sind in diesem Motiv über den sehr kurzlebigen Zustand C_3 verbunden ($P(C_3) < 0,01$).

Dennoch sind die beiden Offen-Zustände nach der Interpretation des 2D-Fits austauschbar. Dieses wird durch die Offen-Wahrscheinlichkeiten $P(O)$ angezeigt. Bei einem Teil der Anpassungen wird O_2 , bei einem anderem Teil O_4 bevorzugt. An die Länge der Offen-Wahrscheinlichkeiten $P(O_2)$ und $P(O_4)$ sind die Ratenkonstanten k_{23} und k_{45} gebunden. Für jeden Fit ist eine dieser Konstanten jeweils deutlich größer als die andere mit der größeren Offen-Wahrscheinlichkeiten bei dem Zustand mit der langsameren Konstante.

Würde man das Modell entsprechend der k_{23} und k_{45} sortieren und nicht nach ihrer Anordnung im Modell, ergäbe sich ein deutlich homogeneres Bild der 2D-Anpassung ergeben. Aussagen aus diesem Befund werden in der Diskussion erörtert (Abschnitt 11.6).

Das für die Anpassung benutzte Markov-Modell (10.8) wird für die Vergiftung mit ChloraminT im Mode 3 ausgewählt (Abschnitt 10.3). Man könnte an dieser Stelle vermuten, dass der unvergiftete Kanal nur einen Offen-Zustand bei der Aktivierung durchläuft. Dagegen spricht, dass der Kanal in der Modellanpassung bei dem Übergang von der Aktivierung zur Inaktivierung auch im unvergifteten Zustand mindestens zwei Offen-Zustände durchlaufen muss.

Um weiterhin zu überprüfen, ob die vorgeschlagenen Fitergebnisse wirklich 2 Offen-Zustände beinhalten, werden die Originalspuren der unvergifteten Zeitreihe und die dazugehörigen Simulationen auf das Auftreten von Mehrfachereignissen untersucht.

Die in den simulierten Ergebnissen häufig auftretenden Doppelereignisse finden sich auch regelmäßig in der unvergifteten Messreihe. Die Auszählung von 480 Messspuren der unvergifteten Messung an Nav1.2a (Die Zeitreihe 100703h+g enthält sehr sicher nur einen aktiven Natriumkanal.) zeigt, dass mit einem Anteil von 26% Doppel- oder Mehrfachereignisse bei der Aktivierung des Kanals auftreten, in den meisten Fällen Doppelereignisse, die schnell aufeinander folgen.

Die Dominanz des Auftretens nur eines Offen-Ereignisses in Tabelle 10.7 bedeutet nicht, dass nur ein Offen-Zustand vorhanden ist. Bei den „Einzelereignissen“ kann aufgrund des Rauschens in den Messspuren oft nicht ausgeschlossen werden, dass nicht auch Doppelereignisse zugrunde liegen. Außerdem erreichen viele Ereignisse, die im Verhältnis zur Filterfrequenz kurz sind, nicht das volle Stromniveau. Auch dieses spricht dafür, dass diese Ereignisse aus Mehrfachereignissen zusammengesetzt sind.

Wenn man nur einen Offen-Zustand annimmt, der durch Hin- und Herspringen in einen benachbarten Closed-Zustand mehrfache Öffnungen erzeugt so müssten auch viele Vielfach-Ereignisse auftreten, die jedoch in den Zeitreihen nicht zu beobachten sind. Der

Natriumkanal durchläuft also bei der Aktivierung auch unvergiftet sehr wahrscheinlich zwei Offen-Zustände, wie in dem für die Anpassung benutzten Markov-Modells (10.8).

Messung an Nav1.2a unvergiftet, 480 ausgewertete Spuren	Anteil
1 Offen-Ereignis	56%
sicher 2 Offen-Ereignisse	26%
wahrscheinlich 2 Offen-Ereignisse	18%

Tabelle 10.7 Anteil der zweifachen Ereignisse bei Aktivierung des unvergifteten Natriumkanals

c) schnelle Aktivierung

Die schnelle Aktivierung des Kanals ist in den aufaddierten Zeitreihen an dem schnellen Anstieg des Stroms bis zum Maximum zu erkennen. Die größte Schwierigkeit bei der Anpassung mit dem 2D-Fit ist die Modellierung dieser schnellen Aktivierung. Die meisten Filtergebnisse (Daten nicht gezeigt) können die Aktivierung in den Stromkurven nicht nachbilden.

Die Aktivierung resultiert aus dem Übergang $C_1 \xrightarrow{k_{12}} O_2$ (Modell 10.8). Dieser Übergang ist mit Ratenkonstanten um 4000 Hz bei den guten 2D-Anpassungen relativ schnell. Etwa gleich schnell erfolgt ein Übergang in den Zustand $C_1 \xrightarrow{k_{12}} I_6$, wodurch der effektive Übergang in O_2 verlangsamt wird $C_1 \xrightarrow{k_{16}} I_6 \xrightarrow{k_{61}} C_1 \xrightarrow{k_{12}} O_2$. Es müssen für die Aktivierung also alle 3 Ratenkonstanten betrachtet werden.

Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll, dass Übergänge in einem Mehrzustandsmodell zum Teil nicht einfach zu interpretieren sind. Außerdem wird dadurch erklärt, warum die Ratenkonstante k_{12} im 2D-Fit nicht homogener berechnet wird, obwohl die Aktivierung in den Messungen etwa gleich schnell erfolgt. Die Übergänge $C_1 \xrightarrow{k_{12}} I_6$ müssen miteinbezogen werden.

Zusammenfassung der Modelluntersuchung am unvergifteten, mutierten und vergifteten Natriumkanal (die Diskussion in Abschnitt 11.6 erläutert die Zusammenhänge zum Inaktivierungsmechanismus):

unvergifteter Natriumkanal:

k_{23} , k_{34} und k_{45} sind relativ schnell, die Rückreaktionen dagegen sind im Verhältnis langsam. Das bedeutet, dass der unvergiftete Kanal nach der Aktivierung die Kette der Zustände relativ schnell durchläuft. Nach mindestens zwei Öffnungen, die evtl. vom Filter nicht getrennt aufgelöst werden können (siehe oben), geht der Kanal schnell in den Zustand C_5 über, der aufgrund der absorbierenden Ratenkonstante k_{45} nicht mehr verlassen wird. Der Kanal befindet sich dann in einem inaktivierten Zustand.

Mutante Nav1.2a F1489Q:

Die Modellinterpretation des mutierten Natriumkanals ist qualitativ dem unvergifteten Kanal sehr ähnlich. Dieses bestätigt das Ergebnis der Einzelkanalmessungen aus Abschnitt 9.5.

Quantitativ betrachtet ist an den Ratenkonstanten im Bereich $O_2 \rightleftharpoons C_3 \rightleftharpoons O_4$ des Markov-Modells wegen der Vertauschung der O-Zustände (siehe oben) nur sehr schwer ein Zusammenhang abzulesen. Die Summe der Aufenthalts-Wahrscheinlichkeiten $P(O_2) + P(O_4)$ gibt hier mehr Aufschluss. Die Summe ist größer als beim unvergifteten Kanal, was die

Mehrfachereignisse nach der Aktivierung und die etwas verlangsamte Inaktivierung gegenüber dem Wildtyp erklärt (Abschnitt 9.5).

ChloraminT im Mode 1:

Auch der vergiftete Natriumkanal im Mode 1 unterscheidet sich kaum von dem unvergifteten Kanal. Die absorbierende Konstante k_{54} ist jedoch 3-mal schneller als beim unvergifteten Kanal. Hierdurch können die Unterschiede zum Wildtyp ausreichend erklärt werden, die sich durch die seltenen singulären Öffnungen nach der Aktivierung bemerkbar machen (Tabelle 9.8).

ChloraminT im Mode 2:

Auch in Mode 2 ist wie bei der Mutante F1489Q die Interpretation anhand der Ratenkonstanten wegen der austauschbaren Offen-Zustände schwierig. Der Natriumkanal im Mode 2 unterscheidet sich von dem unvergifteten Kanal und Mode 1 durch die vergrößerte Ratenkonstante k_{43} in Bezug auf k_{45} . Dieses führt zu einer erhöhten Gesamt-Offen-Wahrscheinlichkeit und der Erhöhung der Besetzungs-Wahrscheinlichkeit $P(C_3)$ um den Faktor 10. An der Zeitreihe kann man das an den anfänglichen Bursts bei der Aktivierung des Kanals im Mode 2 ablesen. Die Bursts gehen dann von dem Zustand C_3 aus.

ChloraminT im Mode 3:

Im Mode 3 ist im Gegensatz zu allen anderen Anpassungen die Ratenkonstante k_{54} schnell, damit ist der Zustand C_5 nicht mehr absorbierend. Dafür ist die Ratenkonstante k_{61} relativ langsam, womit die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von I_6 groß wird. Allerdings ist die Ratenkonstante des Rücksprungs k_{61} zu schnell, so dass der Zustand I_6 nicht mehr völlig absorbierend wirkt.

Für die Interpretation der Messergebnisse bedeutet dies nun, dass der Kanal in den Interburstintervallen im Zustand I_6 verweilt, der immerhin so durchlässig ist, dass unablässig weitere Bursts erfolgen.

Eine interessante Frage bleibt, aus welchem Geschlossen-Zustand die Bursts auftreten. Diese erfolgen entweder über C_3 , mit $O_2 \rightleftharpoons C_3$ oder mit $C_3 \rightleftharpoons O_4$, wie in Mode 2. Die andere Möglichkeit wäre ein Burst, der von C_5 aus erfolgt: $C_5 \rightleftharpoons O_4$, da k_{54} schnell ist. Dieses ist aufgrund der kleinen Besetzungs-Wahrscheinlichkeit $P(C_5)$ und der relativ kleinen Konstante k_{45} jedoch nicht sehr wahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist der gleiche Burstmechanismus wie in Mode 2 (anfängliche Bursts). Denkbar ist, dass der $C_5 \rightleftharpoons O_4$ Übergang für seltene singuläre Offen-Ereignisse wie in Mode 1 benutzt wird, die auch in Mode 3 zu beobachten sind.

ChloraminT im Mode 4:

ChloraminT wird, wie in Abschnitt 10.2 besprochen, nur mit einem verkürzten Modell angepasst, um das schnelle Schalten zu ermitteln. Abgesehen von den schnellen Schaltereignissen zeigt der Mode 4 jedoch ein ähnliches Schaltverhalten wie in Mode 3 bezogen auf die Interburstintervalle und die Länge der Bursts. Dieses lässt sich an den sequentiellen Dwell-Time-Histogrammen in Abbildung 9.20 ablesen.

ATX II:

Abbildung 10.19 zeigt 5 Stromkurven von insgesamt 13 2D-Fits für Zeitreihen, die mit ATXII vergiftet worden sind. In Tabelle 10.8 sind die zugehörigen Ratenkonstanten abgebildet. In keinem der 13 Fälle kann eine weitgehende Übereinstimmung mit den gemessenen Stromkurven erzielt werden.

Die drei 2D-Anpassungen aus Abbildung 10.19A ergeben eine zu schwache Aktivierung. Die Ratenkonstanten k_{ij} zeigen das gleiche Muster wie die der Anpassung im Mode 3 (Tabelle 10.5), insbesondere einen asymmetrischen Übergang k_{61} , der für den Mode 3 typisch ist.

Abbildung 10.19B zeigt die Stromkurven und zugehörigen Ratenkonstanten einer zu starken Aktivierung. Das Muster der Ratenkonstanten ist von den Messungen von ChloraminT im Mode 1 und 2 bekannt. Besonders gilt das für die absorbierende Ratenkonstante k_{54} . Aber auch das Muster der anderen k_{ij} stimmt hervorragend überein.

In Abschnitt 10.1 wurde bereits gezeigt, dass die reversible Vergiftung mit den Seeanemonotoxinen sehr wahrscheinlich auf einer Mischung aus den Modes 1-4 zurückzuführen ist. Diese Theorie wird nun durch den 2D-Fit erhärtet. Der Fit versucht entweder die Zeitreihe im Mode 1-2 anzupassen (zu starke Aktivierung) oder im Mode 3 (zu schwache Aktivierung). Beides kann jedoch nicht gelingen, weil das zugrunde liegende Markov-Modell jeweils nur einen Mode gleichzeitig darstellen kann.

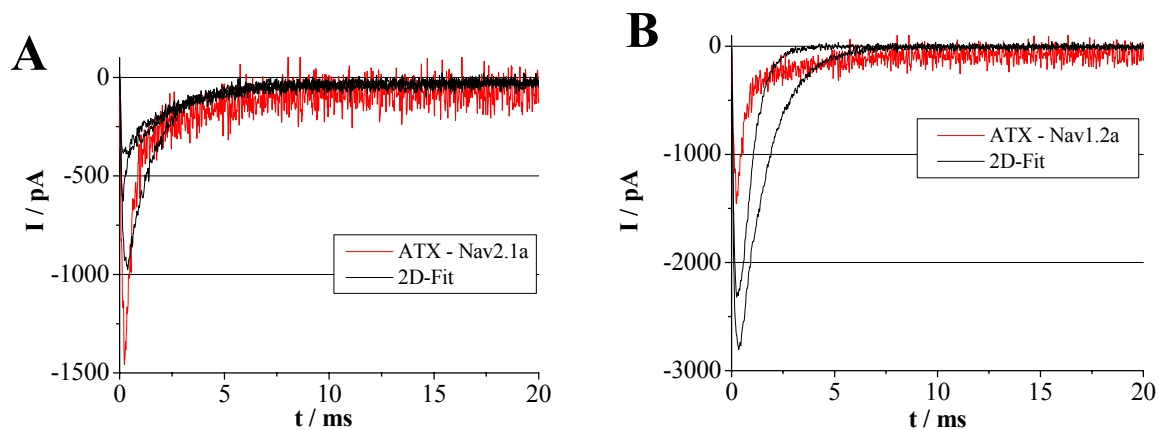


Abbildung 10.19 Stromkurven: Anpassung der Zeitreihen mit ATX II (100703m, deutliche Wirkung) durch den 2D-Fit

(A) zu schwache Aktivierung im 2D-Fit

(B) zu starke Aktivierung im 2D-Fit

ATX deutlich (Nav1.2a)	k_{12} /Hz	k_{21} /Hz	k_{23} /Hz	k_{32} /Hz	k_{34} /Hz	k_{43} /Hz	k_{45} /Hz	k_{54} /Hz	k_{16} /Hz	k_{61} /Hz
Abbildung 10.19A zu schwache Aktivierung	2705	3779	4011	14404	10679	3796	251	5645	3667	18
	2791	9711	18360	17314	8504	1495	2254	16249	9855	37
	4740	12237	7399	19938	19933	1743	2333	8621	9324	32
Abbildung 10.19B zu starke Aktivierung	13212	1118	2505	16867	12819	2843	17560	12	9329	6686
	8382	479	2510	18454	11169	3676	18752	12	7319	10708

Tabelle 10.8 Ergebnisse der Anpassung der gemessenen Zeitreihe mit ATX aus Abbildung 10.19, Ratenkonstanten der 2D-Fitergebnisse

Die absorbierenden Übergänge sind rot dargestellt.

11 Diskussion

11.1 Expression der Na⁺-Kanäle in einem heterologen System

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Untersuchung von Natriumkanälen die Methode der heterologen Expression in diesem Labor etabliert. rNav1.2a und die Mutante F1489Q werden in der humanen Zelllinie HEK293 transient exprimiert. Weiterhin sind die Grundlagen für eine stabile Transfektion entwickelt worden (siehe Abschnitt 3.7). Zwei Fragen ergeben sich hieraus:

- 1.) Ist der Aufwand im Vergleich zur Untersuchung der N1E115-Zellen, die bereits über intrinsische Natriumkanäle verfügen, gerechtfertigt?
- 2.) Wurde das richtige Expressionssystem gewählt, da z.B. auch ein Oozytensystem in Frage gekommen wäre?

Beide Fragen können abschließend positiv bewertet werden, wenn man die folgenden Argumente zu Grunde legt:

N1E115-Neuroblastomzellen haben sich bereits in sehr vielen Arbeiten (z.B. Benzinger et al., 1999; Huth, 1999; Alberts et al., 2000; Schmidt, 2000) zur Untersuchung von Natriumkanälen bewährt. Die leichte Handhabung in der Zellkultur und in Patch-Clamp-Experimenten ist dafür verantwortlich. Sie haben jedoch auch einige entscheidende Nachteile. Die Expressionsrate der Natriumkanäle ist nicht konstant, in den meisten Fällen nimmt sie nach dem Auftauen stetig ab (siehe Abschnitt 3.1).

Bei hoher Kanaldichte ist es fast unmöglich, in Einzelkanaluntersuchungen 1-2 Kanäle zu patchen. Dieses ist aber für die kinetische Modell-Analyse entscheidend. Bei schwacher intrinsischer Expression hingegen sind die Whole-Cell-Ströme so klein, dass der Signal-Rauschabstand für diese Messungen sehr schlecht ist.

Wenn es mit pharmazeutischen und elektrophysiologischen Methoden bei N1E115-Zellen gelingt, Natriumkanäle aus dem Background der anderen Kanäle, vor allem spannungsabhängiger K⁺- und Ca²⁺-Kanäle, zu isolieren, sind immer noch mindestens zwei Natriumkanal-Subtypen, Nav1.2a und Nav1.3a beteiligt (Benzinger et al., 1999). Auch die Messungen dieser Arbeit zeigen auf, dass zumindest zwei verschiedenen Kanaltypen in den Einzelkanalmessungen vorkommen (siehe Abschnitt 8.1 und 9.4).

Alberts et al. (2000) konnten zeigen, dass in neuronalen Zelllinien wie den Neuroblastomzellen Interaktionen mit weiteren regulatorischen Proteinen auftreten können. In N1E115 kann also in elektrophysiologischen Untersuchungen weder der Natriumkanaltyp bestimmt werden, noch kann man ausschließen, dass an den betrachteten Mechanismen weitere Proteine beteiligt sind.

Oozytensysteme haben immer dann Vorteile, wenn eine große Anzahl an Kanalmutanten oder Wirkstoffen gescreent werden soll. Beides ist in dieser Arbeit aber nicht der Fall.

Ein schwerwiegender Nachteil der Oozyten gegenüber dem HEK293-System ist, dass Proteinfunktionen im Oozytensystem anders sein können als in mammalischen Systemen. Ein gutes Beispiel für eine unterschiedliche Funktion ist die bereits in Abschnitt 2.3 erwähnte Koexpression der β 1-Untereinheit von Natriumkanälen. Während die Kinetiken des Nav1.2a

ohne β 1-Untereinheit im Oozytenexperiment deutlich verlangsamt sind, bestehen keine Unterschiede in HEK-Zellen. Moran et al. (2003) können nachweisen, dass die Unterschiede nicht auf einer intrinsischen Expression von β -Untereinheiten in HEK-Zellen beruhen. In dieser Arbeit kann ebenfalls gezeigt werden, dass die in den HEK-Zellen exprimierte α -Untereinheit der Natriumkanäle eine genauso schnelle Inaktivierung zeigt wie die Natriumkanäle der Neuroblastomzellen, die mit intrinsischen β -Untereinheiten assoziiert sind (Abschnitt 9.4).

Ein weiterer Nachteil des Oozytensystems ist, dass es sich um ein Tierexperiment handelt, welches aus ethischen und auch technischen Gründen problematisch ist.

Das HEK293 Expressionssystem (transiente Transfektion) bietet für die Untersuchungen dieser Arbeit folgende Vorteile:

1.) Das zu untersuchende Protein ist bekannt und die Population ist relativ homogen, so dass Ergebnisse von Messung zu Messung besser zu übertragen sind als bei N1E115-Zellen. Die Homogenität wird z.B. in Abbildung 8.2A bestätigt.

2.) Dieses Expressionssystem wird sehr häufig verwendet, d.h. es existieren relativ viele Informationen über z.B. intrinsische Proteine. Die Existenz von intrinsischen Natriumkanälen und Proteininteraktionen mit dem Nav1.2a sind sehr unwahrscheinlich, zumal es sich nicht um neuronale Zellen handelt.

Der Hintergrund von anderen intrinsischen Kanälen in HEK-Zellen ist klein und bezieht sich hauptsächlich auf Kaliumkanäle, die mit TEA gut zu blockieren sind (siehe Abschnitt 7.1).

3.) Die Expressionsrate ist über die Menge der transfizierten cDNA einstellbar. Für Whole-Cell-Untersuchungen kann eine große Kanaldichte mit einem großen Gesamtstrom und für Einzelkanaluntersuchungen eine geringe Kanaldichte erreicht werden (Abbildung 7.3).

Insgesamt sind bei gleicher cDNA-Menge die Whole-Cell-Ströme relativ gut reproduzierbar. Deswegen bietet auch eine stabil transfizierte Zelllinie gegenüber der transienten in dieser Hinsicht keine wesentlichen Vorteile.

4.) Die gemessenen Whole-Cell-Kinetiken (Abschnitt 8.1) und die Kinetiken der Einzelkanalmessungen (Abschnitt 9.4) sind für Kanäle der N1E115-Zellen und Nav2.1a in HEK-Zellen relativ ähnlich. Insbesondere zeigt sich unvergiftet bei beiden eine schnelle komplette Inaktivierung. Dieses spricht dafür, dass in den HEK-Zellen voll funktionsfähige Kanäle exprimiert werden.

5.) Das Expressionssystem bietet die Möglichkeit, Mutanten des Natriumkanals, hier Nav1.2a F1489Q, zu testen.

6.) Nicht zuletzt zeichnen sich die HEK293-Zellen durch die leichte Handhabung in der Zellkultur, die gute Qualität der Seals bei Patch-Clamp-Experimenten und die einfache Transfektion mit relativ hohen Expressionsraten aus.

Schwierigkeiten ergeben sich mit diesem System bei der Expressionsrate der Mutante F1489Q, die im Vergleich zu der Rate des Wildtyps relativ niedrig ist (siehe Abschnitt 8.4). Dieses bekannte Problem (Auskunft von T. Scheuer, Pharmakologie, Seattle) lässt sich mit

den hier getesteten Methoden nicht beheben. Allerdings können trotzdem Messungen erzielt werden, die im Rahmen dieser Arbeit hinreichend für die Untersuchung sind.

Sowohl die HEK293 Zelllinie als auch die Neuroblastomzellen sind immortale Zelllinien. Die Genregulation läuft nicht wie in „normalen“ Zellen ab. Deswegen lassen sich Ergebnisse aus diesen artifiziellen Systemen im Gegensatz zu Gewebeschnitten oder Primärkulturen nicht uneingeschränkt auf elektrophysiologische Vorgänge in Säugetierzellen übertragen.

Im Gegensatz zu physiologischeren Systemen können mit der Expression der Nav1.2a in HEK-Zellen aber die Proteinfunktionen isoliert betrachtet werden, so dass für die Modellierung sehr viele Störfaktoren (z.B. Untereinheiten, second-messenger Kaskaden,...) ausgeschlossen werden können. Außerdem überwiegen die Vorteile der Expression in HEK-Zellen deutlich, wie oben besprochen, trotz des höheren Aufwandes in Bezug auf die Transfektionsexperimente (siehe Abschnitt 3.6) gegenüber der Zellkultur von N1E115-Zellen.

11.2 Beschichtung und Trocknung der Pipetten

Wie bei vielen Messmethoden ist eine hohe Signal-Bandbreite bei einem guten Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) auch für Einzelkanalaufzeichnungen von größter Bedeutung. Vorausgesetzt, dass die Patch-Anlage optimal abgeschirmt ist, bleiben Quellen des Rauschens, die nicht zu vermeiden sind. Neben dem Verstärker sind der Elektrodenhalter, die Pipette und das Seal die größten Quellen (Benndorff, 1995).

Viele Versuche werden unternommen, die Rauschquellen zu optimieren. Dieses kann durch den Einsatz spezieller Elektrodenhalter und den Einsatz von Quarzglas (Levis & Rae, 1993; Parzefall et al., 1998; Hansen et al., 2003) für die Pipetten erreicht werden.

Viele methodische Verbesserungen zielen auf die Kapazität der Pipettenspitze, die als Teil des Spannungsteilers / Rückkopplungsimpedanz / Eingangskapazität die Verstärkung des Eingangsrauschen der Verstärkerstufe mitbestimmt. Einer dieser Ansätze ist die Verkleinerung der Pipettenspitze bis auf 200 nm Durchmesser (Benndorff, 1994), wodurch auch sehr hohe Sealwiderstände für geringeres Rauschen sorgen. Hierdurch werden aber auch neue Probleme erschaffen, z.B. die fehlende Linearität der Strom-Spannung-Beziehung bei sehr kleinen Pipetten, die durch die Interaktion von Glasoberflächen mit der Messlösung entstehen können.

Allen Methoden gemeinsam ist aber die Beschichtung der Pipetten. Sie verhindert das Hochkriechen eines dünnen Flüssigkeitsfilms auf der Pipette, der die Kapazität vergrößert und das Rauschen erhöht. In der Standardbehandlung werden die Pipetten von außen mit Sylgard (Dow Corning, Midland) behandelt und anschließend unter dem Mikroskop abgeflammt.

Die Kieler Biophysik-Gruppe führte die Beschichtung der Pipette von innen mit Sigmacote (Sigma, Taufkirchen) ein. Bei wesentlich geringerem Arbeitsaufwand lassen sich vergleichbare Werte für die Rauschreduktion erreichen (Keunecke, 1995; Farokhi et al., 2000).

Eine wesentliche Verbesserung, die in dieser Arbeit entwickelt wird, ergibt sich durch die Hitzebehandlung der mit Sigmacote beschichteten Pipetten im Trockenschrank (siehe Abschnitt 4.8). So lassen sich auch ohne die Verwendung von sehr aufwändigen Methoden wie der Arbeit mit Quarzglaselektroden technisch hochwertige Einzelkanal-Messungen erreichen. Fünf entscheidende Vorteile ergeben sich durch dieses Verfahren:

- 1.) Der Sealwiderstand ist mindestens um den Faktor 10 höher. Das Rauschen ist dadurch zusammen mit der verminderten Kapazität um den Faktor ≥ 2 geringer (Abschnitt 9.2).
- 2.) Die Pipette besitzt eine geringere Kapazität, wodurch bei Spannungssprüngen das kapazitive Artefakt deutlich verringert ist (Abbildung 9.4). Dieses trägt neben 1. zu einer deutlichen Verbesserung der Rohdaten bei.
- 3.) Im Gegensatz zu Keunecke (1995) wird das Rauschen beim Heranziehen des Patches in der Inside-Out-Konfiguration (siehe Abbildung 4.1) an die Oberfläche der Messlösung nicht kleiner, sondern nimmt zu (Daten nicht gezeigt), d.h. nach der Exzision aus der Zellmembran ist mit der neuen Methode die optimale Konfiguration erreicht.
Weiterhin ist die Methode von Keunecke (1995) beim Einsatz von Mikroperfusionssystemen (Takigawa & Alzheimer, 1999) mit Applikation der Lösung direkt an die Zelle nicht anwendbar, da ein sicheres Umspülen des Patches beim Heranziehen an die Oberfläche nicht gewährleistet ist. Außerdem nimmt zum Beispiel der Flüssigkeitspegel während der Messung mit solchen Perfusionssystemen zu, so dass bei der Arbeit an der Oberfläche wie bei Keunecke die Bedingungen nicht konstant sind.
- 4.) Die Sealbildung erfolgt in über 90% der Versuche und auch wesentlich schneller als bei nicht getrockneten Pipetten. Hierdurch wird vor allem die Effizienz und Motivation der Experimentatoren gesteigert.
- 5.) Die Herstellung der Pipetten (Abschnitt 4.8) ist im Vergleich zu anderen Methoden (siehe oben) schnell und einfach.

Abschließend bleibt die Frage zu klären, inwieweit diese guten Pipetteneigenschaften auf andere Zellsysteme zu übertragen sind als die hier benutzen N1E115- und HEK-Zellen. Hierzu liegen leider noch keine Daten von anderen Zelltypen vor. Allerdings kann damit gerechnet werden, dass die Beschichtung zumindest bei vielen Säugetierzellen funktioniert, da sich die in dieser Arbeit benutzten Zellen nicht wesentlich von anderen Zellsystemen unterscheiden.

Die zweite interessante Frage besteht darin, ob sich durch die Kombination von Quarzglas Elektroden und der hier verwendeten Beschichtungsmethode ein noch besseres Signal-Rauschverhältnis erzielen lässt. Sollte hier ein ähnlicher Effekt wie in 1-2 zu beobachten sein, würde man in eine Größenordnung des SNRs kommen, die bisher noch nicht erreicht worden ist.

11.3 Sequentielle Dwell-Time-Histogramme

In Abschnitt 5.7 wird die Methode der sequentiellen Dwell-Time-Histogramme sortiert nach Ereignisabfolge eingeführt. Entsprechende Histogramme können aus ereignisgesteuerten Zeitreihen automatisch mit dem Kiel-Patch-Programm erstellt werden. Soweit bekannt, wurde diese Methode in der Patch-Clamp-Analyse vorher noch nicht angewendet.

In Abschnitt 5.7 wird gezeigt, dass mit diesen speziellen Dwell-Time-Histogrammen die Abfolge von Zuständen im Hidden-Markov-Modell unterschieden werden können. Weiterhin lassen sich Größen, die in der Patch-Clamp-Analyse häufig verwendet werden, wie

First-Latency, Burst- Offen- und Geschlossen-Zeiten und Interburst-Geschlossen-Zeiten direkt ablesen.

Somit bietet diese Methode im Vergleich zu normalen 1D-Histogrammen ein wesentlich größeres Spektrum, da die Information über die zeitliche Abfolge erhalten bleibt und die genannten abgeleiteten Größen direkt bestimmt werden können.

Die Anwendung dieser Methode auf simulierte Zeitreihen (siehe Abschnitt 5.7) und auf gemessene Daten (Abschnitt 9.4-9.7) zeigt, dass die Erfassung der 5. Ordnung (d.h. die ersten fünf Geschlossen- und Offen-Zustände) ausreichend ist. Die Veränderungen von der 4. auf die 5. Ordnung sind bereits sehr gering und die Anzahl der Ereignisse pro Bin in dieser Ordnung für Zeitreihen des unversehrten Natriumkanals klein.

Die Auswertung der Messdaten (Abschnitt 9.4-9.7) zeigt, dass ein interessantes neues Werkzeug entstanden ist, das die Betrachtung der 2-D-Histogramme ergänzt, insbesondere für ereignisgesteuerte Zeitreihen.

Eine Weiterentwicklung dieser Methode könnte zu einem Fit-Programm wie dem 2D-Fit (Abschnitt 5.8) führen, in dem die 2D-Dwell-Time-Histogramme durch sequentielle Dwell-Time-Histogramme ersetzt sind. Für nicht stationäre Zeitreihen wie den Aufnahmen der Natriumkanäle dieser Arbeit ist eine Verbesserung der Anpassung zu erwarten, da sequentielle Dwell-Time-Histogramme im Gegensatz zu 2D-Histogrammen die Kinetik mehrerer benachbarter Zustände (n-Zustände) konservieren. Im Gegensatz zu N-Dimensionalen Histogrammen, die dazu auch in der Lage sind, zeigen sequentielle Histogramme eine wesentlich größere Besetzung der Bins, wodurch die Anwendung auf gemessene Zeitreihen praktikabel bleibt.

11.4 2-Dimensionaler-Dwell-Time-Fit

Der in dieser Arbeit erstellte Algorithmus für den 2-Dimensionalen-Dwell-Time-Fit ist eine Weiterentwicklung der von Magleby und Weiss (1990a) vorgestellten Methode. Der Fit-Algorithmus kann erfolgreich an simulierten Daten getestet werden und wird für die Anpassung von Markov-Modellen an gemessene Zeitreihen des Natriumkanals verwendet.

Der Algorithmus dieser Arbeit ist dem bisherigen Goldstandard bei der Analyse von Patch-Clamp-Daten, dem Direkten-Zeitreehenfit (Abschnitt 5.9), in allen getesteten Disziplinen mindestens gleichwertig. Eine deutlich bessere Leistungsfähigkeit ergibt sich für das Signal-Rausch-Verhältnis und die Mehrkanalanalyse (Abschnitt 6.4 und 6.6). Außerdem ist eine Modellunterscheidung (Abschnitt 6.5) mit dem 2D-Fit möglich, ein zentraler Punkt dieser Arbeit. Die Fähigkeit der Modellunterscheidung ist in der Theorie zwar auch für den Direkten-Zeitreehenfit beschrieben (Akaike, 1974; Zheng et al., 2001), kann hier aber praktisch nicht bestätigt werden (Abschnitt 6.5).

Mit dieser Version des 2D-Fits können ereignisgesteuerten Daten, wie die Natriumkanalaufzeichnungen in dieser Arbeit, angepasst werden. Trotz entsprechender Modifikation und erfolgreichem Test an simulierten Daten (Abschnitt 6.1) kann der Direkte-Zeitreehenfit die Natriumkanaldaten nicht vernünftig anpassen (Abschnitt 10.4). Durch Vorfilterung können Michalek et al. (1999) auch mit einem Direkten-Zeitreehenfit Natriumkanaldaten modellieren. Jedoch geht dieses Verfahren zu Lasten der Zeitauflösung.

Eine besondere Fähigkeit des 2D-Fits ist die Erkennung von Ereignissen, die jenseits der Filtergrenze des analogen Tiefpassfilters liegen, eine Eigenschaft, die bereits von Magleby und Weiss (1990a) erkannt wird. Die Neuerung besteht hier in der Rekonstruktion des durch

das Filter reduzierten Stromniveaus (Abschnitt 6.7). Bei der Bestimmung der Ratenkonstanten mit dem ermitteltem Stromniveau (Abschnitt 6.7) zeigt der 2D-Fit eine gute Übereinstimmung mit dem Beta-Fit (Abschnitt 9.1).

Dieser Algorithmus kann in bestimmten Grenzen langsame und schnelle Ratenkonstanten bei der Modellierung gemeinsam bestimmen wie z.B. bei der Anwendung als Leveldetektor (Abschnitt 9.1 und 10.2). Zu überprüfen bleibt, ob der 2D-Fit eine Alternative zu der Kombination aus Direktem-Zeitreihenfit und Beta-Fit (Schröder et al., 2005) sein könnte.

Die Leistungsfähigkeit des 2D-Fits ist durch das einfache Prinzip zu erklären, dass sich Unzulänglichkeiten in den Messreihen (z.B. Tiefpassfilter, Rauschen, Artefakte) und in den Auswerteroutinen (z.B. Tiefpassfilter im Leveldetektor) durch den Vergleich mit den simulierten Daten gegenseitig aufheben.

Drei Kriterien sind zu fordern, damit ein Algorithmus durch Simulation erfolgreich ist:

- 1) Die Simulation der Messdaten muss hinreichend genau erfolgen.
- 2) Es muss ein Fehlerkriterium existieren, das die Zeitreihen hinreichend genau abbildet.
- 3) Es muss ein Fit-Algorithmus angewendet werden, der das gewählte Fehlerkriterium bezüglich eines globalen Minimums auswerten kann.

Punkt 2) und 3) werden durch den 2D-Fit-Algorithmus erfüllt. Dieses kann anhand von simulierten Daten gezeigt werden (siehe Abschnitt 6.4). Um den Punkt 1 zu erfüllen, werden Daten durch die Erzeugung einer rauschfreien Zeitreihe mittels Markov-Modellen und anschließender Überlagerung durch eine gemessene Rauschreihe generiert. Hier scheint eine hinreichende Übereinstimmung mit den Messdaten erreicht worden zu sein, da die am Natriumkanal gemessenen Daten gut angepasst werden können.

Ein Vergleich des 2D-Fits dieser Arbeit mit Magleby und Weiss (1990a) anhand dieser 3 Kriterien zeigt, warum sich ein 2-Dimensionaler-Dwell-Time-Fit bisher nicht bei der Modellierung von Einzelkanal-Aufzeichnungen etablieren konnte und nur in Ausnahmefällen (Hirano et al., 2002) verwendet wurde:

zu 1:

Das weiße simulierte Rauschen, das auch von Magleby und Weiss (1990a) benutzt wurde, wird in dem Algorithmus von Rießner (1998) gegen gemessenes Rauschen ausgetauscht. Besonders bei schlechtem Signal-Rauschverhältnis und bei der Analyse von schnellem Schalten (Daten nicht gezeigt) werden durch die Überlagerung mit gemessenem Rauschen bessere Ergebnisse erzielt.

zu 2:

Drei wesentliche Änderungen gegenüber Magleby und Weiss (1990a) werden an dem 2D-Algorithmus vorgenommen, um die Trennschärfe zu erhöhen. Dazu gehört die Umstellung der Normierung auf die simulierte Zeit (anstelle der Anzahl der Ereignisse), die Berechnung der Gauss-Fehlersumme und nicht der Loglikelihood und die Mittelung über mehrere Bins.

zu 3:

Die wichtigste Verbesserung ist der Einsatz eines genetischen Algorithmus (Wall, 1996) der den Simplex-Algorithmus ersetzt. Magleby und Weiss (1990a) haben hierfür einen vergleichbaren Algorithmus verwendet (Colquhoun, 1971), der in der Performance mit dem Simplex verglichen werden kann.

Der Simplex-Algorithmus ist Gegensatz zum genetischen Fit deutlich anfälliger gegenüber der statistischen Verteilung der Fehlersummen. Damit ist der Einsatz des Simplex auf einfache Modelle und eine große Anzahl von Events begrenzt. Man muss allerdings Magleby und Weiss zugute halten, dass der Einsatz eines genetischen Algorithmus auf Grund der Computerleistungen Anfang der 90er Jahre nicht möglich war.

Ausblick:

Durch die auch in Zukunft anzunehmende Verbesserung der Computerleistung, bzw. eines Multiprozessor- oder multiplen Rechner-Einsatzes kann die Leistungsfähigkeit des 2D-Fit nochmals gesteigert werden. Die Anpassung der gemessenen Daten (Abschnitt 10.6) hat gezeigt, dass die Grenze der Leistungsfähigkeit des genetischen Fit-Algorithmus noch nicht erreicht und durch die Computerleistung vorgegeben ist.

Dann ist auch eine sinnvolle Anpassung von noch komplexeren Markov-Modellen möglich, die unter anderen Bedingungen auftreten können.

Eine Überlegung für die Zukunft ist, das Fehlerkriterium durch einen anderen Algorithmus als den Ansatz über 2-Dimensionale-Dwell-Time-Histogramme zu ersetzen. Hier wäre der Einsatz von sequentiellen Dwell-Time-Histogrammen denkbar (siehe Abschnitt 11.3).

11.5 4-Mode-Gating Modell: Bindungsstellen

Die wichtigste Erkenntnis dieser Arbeit ist die Entdeckung von 4 Gating-Modes am Natriumkanal, die durch ChloraminT hervorgerufen werden (Abschnitte 9.6 und 10.6). Dieses kann als Hypothese auch auf die Seeanemonentoxine übertragen werden (Abschnitt 10.1). Die Anzahl von 4 Bindungsstellen führt zu der Erwartung, dass auf jeder der 4 Domänen des Natriumkanals jeweils eine Bindungsstelle liegt.

Bis jetzt ist die Vorstellung von 4 interagierenden Bindungsstellen am Natriumkanal ein neues Konzept. Keynes und Elinder (1998) haben wie auch andere Autoren ein Modell der Interaktion der 4 Domänen vorgeschlagen. Allerdings bezieht sich dieses Modell auf die spannungsabhängige Aktivierung und Inaktivierung und beinhaltet keine Liganden. Starke Unterstützung erfährt die Annahme der 4-fachen Symmetrie aber durch eine größere Anzahl von ähnlichen Entdeckungen bei anderen Kanälen.

Yellen et al. (1994) schlagen 4 Bindungsstellen an der Shaker-Mutante T449C vor, die mit Zink oder Cadmium und TEA interagieren. Rosenmund et al. (1998) finden eine 4-fach-Symmetrie des Glutamatrezeptors im Gehirn. Magleby (2001) schlägt ein Modell mit 4 Bindungsstellen für die Einstellung der Calcium-Sensitivität am MaxiK vor. Die interessanteste Entdeckung für diese Arbeit ist ein allosterisches Modell mit 4 Bindungsstellen für einen nucleotide-gated-channel (Ruiz & Karpen, 1997, 1999). Durch eine kovalente Modifikation der Ligandenbindung können 4 verschiedene Gating-Modes in Abhängigkeit von der Anzahl der gebundenen Liganden sichtbar gemacht werden. Das Gating der nucleotide-gated-channels hat sogar eine gewisse Ähnlichkeit mit den 4-Gating-Modes der Natriumkanäle wie es in Abbildung 11.1 zu sehen ist.

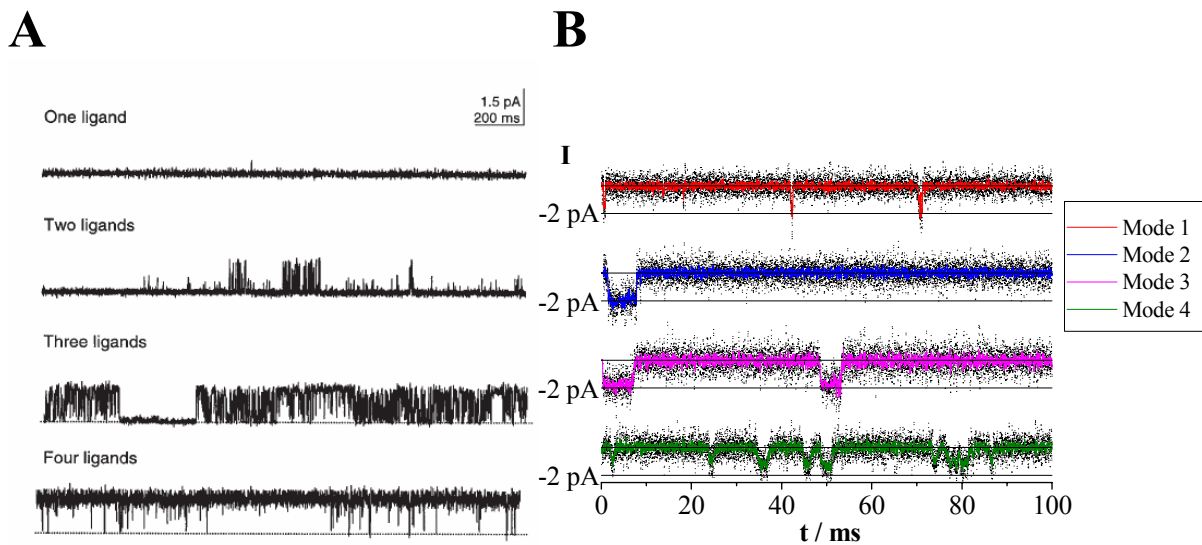


Abbildung 11.1 Vergleich des Gating-Modes abhängig von der Anzahl der gebundenen Liganden
(A) nucleotide-gated-channels (Ruiz & Karpen, 1999)
(B) Natriumkanäle in dieser Arbeit, die mit ChloraminT vergiftet sind

Um die Kinetik des 4-Mode-Gating-Modells auf die Funktion des Kanalsproteins zu übertragen, wäre es von großem Nutzen die Bindungsstellen am Protein zu kennen, die aufgrund der Seeanemontoxine extrazellulär gelegen sein müssen. Folgende Überlegungen führen auf eine Vorstellung dieser Bindungsstellen am Natriumkanal.

a) Für ChloraminT sind keine konkreten Hinweise auf Bindungsstellen zu erhalten:

ChloraminT ist ein mildes Oxidants und soll die Methionin- und eventuell Cystin-Reste spezifisch angreifen (Shechter et al., 1975; Wang, 1984; Quinonez et al., 1999; Hoshi & Heinemann, 2001). So könnte das IFM-Motiv des Inaktivierungsmechanismus ein Ziel für ChloraminT sein (Hoshi & Heinemann, 2001). Jedoch wirken weder UVA-Licht noch H_2O_2 auf das Methionin im IFM-Motiv. Das Schaltverhalten wird durch diese beiden mittelbaren Oxidantien nicht verändert (Wang & Wang, 2002). Auch die Messungen an der Mutante F1489Q (IFM \rightarrow IQM), zeigen, dass sich die Wirkung von ChloraminT und der Mutante unabhängig überlagern, so dass die Wirkung im Bereich des Hinged-Lid unwahrscheinlich wird.

Weiterhin können Rack et al. (1986) mit anderen Oxidantien zeigen, dass Methionin sehr wahrscheinlich kein Target ist. Sie schlagen eine unspezifische Wirkung an Membranlipiden oder eine Modifikation von Histidin vor.

Durch die Daten dieser Arbeit, insbesondere durch die determinierte Abfolge der Modes ist eine unspezifische Bindung sehr unwahrscheinlich. Für die Modifikation von Histidin können keine weiteren Befunde in der Literatur erhoben werden.

Ein wichtiger Hinweis lässt sich aus den Messungen mit ChloraminT aber doch gewinnen. Schmidtmayer (1985) kann zeigen, dass die Wirkung von ChloraminT auf den Natriumkanal spannungsabhängig ist. Eine Assoziation zu dem Spannungssensor im Kanal wie bei den Seeanemontoxinen (siehe unten) ist also wahrscheinlich.

b) Natriumkanäle grenzen die in Frage kommenden Bindungsstellen für Seeanemonentoxine ein. In der Literatur sind aber nur zwei Bindungsstellen beschrieben (Site 3 und 4):

Für die Seeanemonen- und andere Toxine, die von extrazellulär an den Kanal binden, existieren spezifische Befunde über Bindungsstellen. Allerdings kann, soweit mir bekannt, keine Studie 4 Bindungsstellen am Kanal beschreiben wie es für das 4-Mode-Gating-Modell nötig ist.

Für die Bindung der Seeanemonentoxine und einiger Skorpiontoxine (α -Skorpiontoxine) wird die so genannte Site 3, die extrazellulär zwischen der S3 und S4 Helix in Domäne 4 lokalisiert ist, identifiziert (siehe Abbildung 2.4, Chen et al., 1996; Rogers et al., 1996, Sheets et al., 1999). Eine kritische Rolle bei der Bindung im Nav1.2a spielt ein Glutamin an Position 1613 (Rogers et al., 1996).

Für β -Skorpiontoxine, die ebenfalls die Inaktivierung beeinflussen, kann der zur Site 3 analoge Linker in Domäne 2 (Site 4) bestimmt werden (Cestèle et al., 1998, 2001).

c) Detaillierte Informationen der Wirkung von Hanatoxin auf Kaliumkanäle führen auf die Bindungsstellen am Natriumkanal:

Interessante Rückschlüsse über Bindungsstellen ergeben sich aus Untersuchungen an Hanatoxin, das das Gating von spannungsabhängigen Kaliumkanälen verändert. Vier Hanatoxin-Moleküle können an ein Kanalprotein andocken (Swartz & McKinnon, 1997a), wobei der Porenblocker Agitoxin₂ zusätzlich binden kann (Swartz & McKinnon, 1997b). Aus sterischen Gründen indiziert dies eine Bindung entfernt von der Pore. Als Bindungsstellen können I273, F274 und E277 zwischen S3 und S4 für den drk1 K⁺-Kanal identifiziert werden (Swartz and McKinnon, 1997b; Li-Smerin & Swartz, 2000).

Die Struktur des Hanatoxins kann mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (Takahashi et al., 2000). Basierend auf einem Vergleich mit sehr ähnlich aufgebauten Seeanemonentoxinen und Skorpiontoxinen wird vorgeschlagen, dass ein großer hydrophober Bereich im Toxin mit den Aminosäuren I273 und F274 interagiert, während E277 mit einer basischen Aminosäure am Rand des Bereiches wechselwirkt (Takahashi et al., 2000, Li-Smerin & Swartz 2000).

Die Brücke zum Natriumkanal und auch zum Calciumkanal wird dadurch gespannt, dass äquivalente Bindungsstellen vorhanden sind (E1613, in der Site 3 im rNav2.1: Roger et al., 1996; E1658 im α 1A spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanal: Winterfield & Swartz, unpublizierte Daten). Abgerundet wird dieses Bild durch die Bindung mehrerer Toxine an jeweils verschiedene Kationen-Kanäle an korrespondierende Sites (siehe Tabelle 11.1). Das bedeutet, dass sich auf der einen Seite die Bindungsmotive der verschiedenen Gifte stark ähneln und auf der anderen Seite die Andockstellen an den Kanälen ein gemeinsames Motiv aufweisen.

Toxin	Interaktion mit	Interaktion mit
Grammotoxin	drk1 K ⁺	α 1A Ca ²⁺
Hanatoxin	drk1 K ⁺	α 1A Ca ²⁺
Kurtoxin (α -Skorpiontoxin)	Nav1.2a	T-type Ca ²⁺

Tabelle 11.1 Interaktion eines Toxins mit verschiedenen Kationen-Kanälen (nach Li-Smerin & Swartz 2000)

d) Sequenzanalysen des Natriumkanals zeigen die wahrscheinlichsten Bindungsstellen in den 4 Domänen an:

Anhand der Aminosäuresequenz des Nav1.2a lässt sich die 4-fach Symmetrie der Hanatoxin-Bindungsstellen des Kaliumkanals auch beim Natriumkanal nachvollziehen (Abbildung 11.2). Im Bereich des extrazellulären Linkers zwischen S3 und S4 befindet sich jeweils eine negative Glutaminsäure und in Richtung N-Terminus im Abstand von 2 Aminosäuren zwei hydrophobe Aminosäuren, wie bei der Bindungsstelle des Hanatoxins (siehe oben). Unter diesen Bindungsstellen sind die Site 4 in Domäne 2 und die Site 3 in Domäne 4 des Natriumkanals.

Diese Befunde lassen die Annahme von 4 Bindungsstellen im Bereich des extrazellulären Linkers zwischen der S3- und S4-Helix jeweils in den Domänen 1-4 (Abbildung 11.3) sehr wahrscheinlich werden.

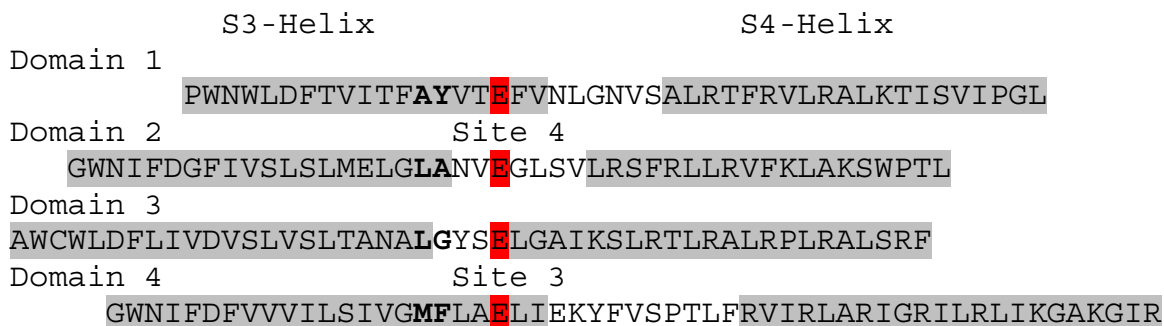


Abbildung 11.2 S3- und S4-Helices der Domänen 1-4 des Natriumkanals Nav1.2a (SwissProt P04775)
Die Membran-Helices sind grau unterlegt und die negativ geladene Aminosäure Glutaminsäure rot. Hydrophobe Aminosäuren in analoger Position sind fett gedruckt (Erklärung siehe Text).

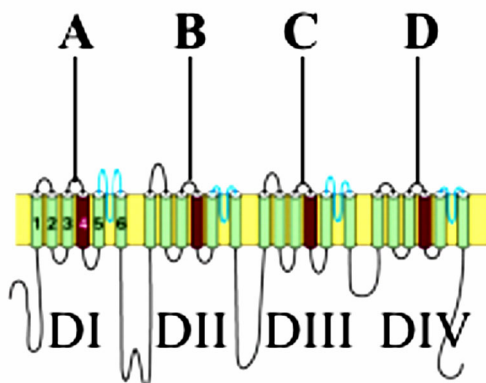


Abbildung 11.3 Bindungsstellen (A-D) des 4-Mode-Gating-Modells in den Domänen I-IV
Die S4-Helices sind rot dargestellt, die Domänen mit D1-DIV beschriftet

11.6 4-Mode-Gating Modell: Inaktivierungsmechanismen

Hier muss mit der Überlegung begonnen werden, welche Mechanismen, mit denen Seeanemonentoxine die Inaktivierung beeinflussen, in Frage kommen. Drei mögliche Kandidaten sind bekannt:

1. N-Typ-Inaktivierung (Ball and Chain, Hinged-Lid beim Na⁺-Kanal)
2. C-Typ-Inaktivierung (Pore-Loop-Inaktivierung)
3. Intrazelluläre Mechanismen (Inner Gate)

Der am besten bekannte Mechanismus ist die N-Typ-Inaktivierung. Armstrong und Bezanilla (1973) schlagen das Verschließen der inneren Pore durch einen Anteil des N-Terminus des Kanalproteins vor (Ball and Chain). In Kaliumkanälen wird daraus später ein „Finger“ (Bentrop et al., 2001; Wissmann et al., 2003), in Natriumkanälen der Linker zwischen der 3. und 4. Domäne, der Hinged-Lid-Mechanismus (Catterall, 2000). Von Kaliumkanälen ist als weiterer Mechanismus die C-Typ-Inaktivierung bekannt. Dieser Mechanismus hat mit dem Engstellen oder Verschließen des Selektivitätsfilters zu tun, ausgelöst durch die Bewegung der S4 -Helix (Kiss et al., 1999; Larsson & Elinder, 2000; Zheng et al., 2001). Der 3. Mechanismus schließlich hängt mit dem intrazellulären Überkreuzen der S6-Helices zusammen (Bundle-Crossing), wodurch der Kanal verschlossen wird (Liu et al., 2001; Kuo et al., 2003; Xie et al., 2004; Zhao et al., 2004).

Für die ersten beiden Mechanismen ist gezeigt, dass sie mit der spannungsabhängigen Bewegung der S4-Helices verknüpft sind, beim dritten gibt es keine experimentellen Befunde.

Mehrere Arbeiten können zeigen, dass die S4-Helix aus Domäne 4 die Hauptrolle bei der Kopplung zwischen Aktivierung und schneller Inaktivierung spielt (Chen et al., 1996; Kontis & Goldin, 1997; Sheets et al., 1999; Chanda & Bezanilla, 2002). Die Bewegung der S4DIV-Helix wird durch Mutationen (Chen et al., 1996) oder die Bindung von Site 3-Toxinen gestört (Rogers et al., 1996; Sheets et al., 1999) und damit die Inaktivierung beeinflusst.

Chanda et al. (2004) können mit Fluoreszenzmarkierungen und Veränderungen der positiven Ladungen in den S4-Helices zeigen, dass eine starke Kooperativität zwischen den Helices des Natriumkanals besteht. Besonders ausgeprägt ist dies zwischen S4DI und S4DIV, aber auch die S4DII und S4DIII sind mit S4DIV gekoppelt. Diese Kopplung könnte einen Hinweis darauf geben, warum Toxine an 4 verschiedenen Bindungsstellen andocken können wie in dem Modell in Abbildung 11.3, aber trotzdem die Site 3 eine herausragende Rolle einnimmt.

Die im vorherigen Absatz beschriebene Kopplung zwischen Aktivierung und Inaktivierung lässt die Frage offen, welcher Typ der Inaktivierung involviert ist. Mit der Shaker-Mutante T449C können Yellen et al. (1994) einen Zusammenhang zwischen C-Typ-Inaktivierung und Bindungsstellen herstellen. TEA kann z.B. verhindern, dass die 4 Cysteine (siehe Yellen et al., 1994) sich nahe kommen und so die S4 induzierte C-Typ Inaktivierung verhindern.

Nach diesen Vorüberlegungen folgt nun der wichtigste Teil. Wie hängt das Binden der Liganden mit den Gating-Mechanismen der Natriumkanäle zusammen?

Dieser Frage soll mit Hilfe der Ergebnisse der Modelluntersuchung in den Abschnitten 10.3 und 10.6 nachgegangen werden.

Einige Autoren haben das durch die gebundenen Liganden induzierte Gating mit Hilfe von sehr großen Modellen untersucht (Keynes & Elinder, 1998; Karpen & Ruiz, 2002;

Magleby, 2001). Das Beispiel eines allosterischen Modells ist in Abbildung 11.4A dargestellt. Im Gegensatz zu diesen Ansätzen kann mit dem relativ einfachen Modell (10.8) der Kanalstrom angepasst werden. Die entscheidende Aussage aus der Modellierung ist, dass die Bindung des ChloraminT die Ratenkonstanten beeinflusst, aber nicht die Anordnung der Zustände.

Die gleiche Trennung zwischen einem Liganden-Bindungsmodell und dem Gating-Modell mit den Ratenkonstanten und Zuständen im Markov-Modell (A-O-G-C-Z, A und O sind Offen-Zustände, G, C, Z Closed-Zustände) können Hansen et al. (2003) für den K^+/TI^+ -AMFE finden. Der experimentelle Befund ist der, dass im Gating Modell keine Ratenkonstante signifikant von der Ligandenkonzentration abhängt, wohl aber davon, ob TI^+ oder K^+ bindet.

Dieses führt zu einer Trennung des Markov-Modells der Ligandenbindung und des Gating-Modells. In Abbildung 11.4B ist dieser Zusammenhang dargestellt. Das Modell der Bindung verändert die Proteinkonformation, womit ein parametrischer Einfluss auf das Markov-Modell des Gatings ausgeübt wird.

Für die Modellierung der Bindung des ChloraminT und der Seeanemontoxine folgt aus Hansen et al.(2003) das Modell in Abbildung 11.5, bei dem durch die Ligandenbindung auch nur ein parametrischer Einfluss auf die Ratenkonstanten ausgeübt wird, aber die Abfolge der Zustände gleich bleibt.

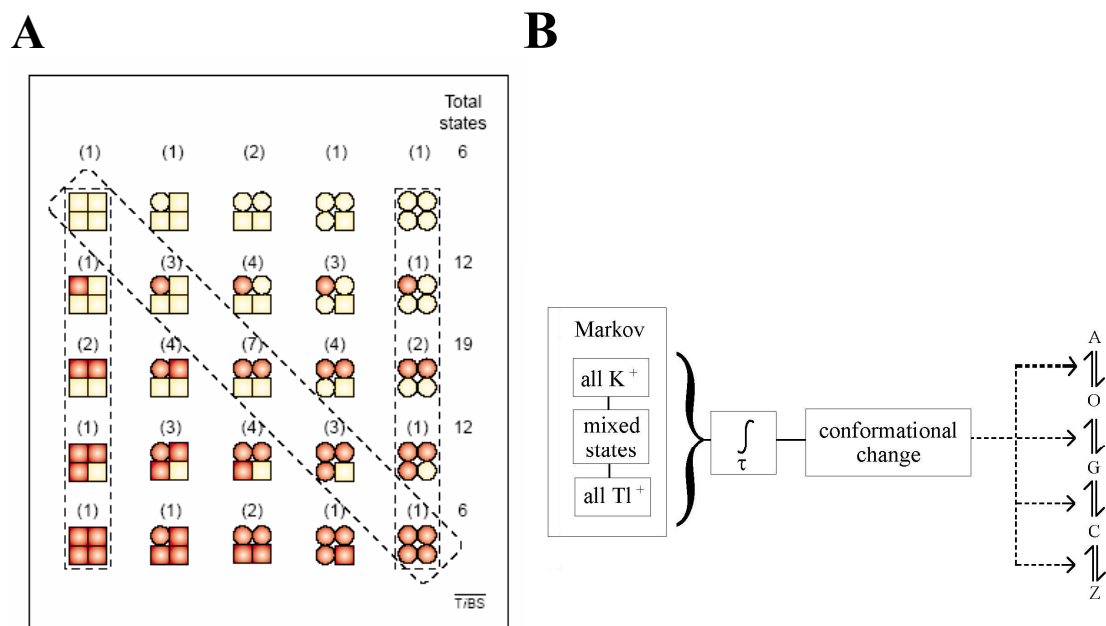


Abbildung 11.4 (A) Allgemeines Allosterisches-Modell (gesamte Abbildung) für ein Kanal mit einer 4-fach Symmetrie (Karpen & Ruiz, 2002)

In diesem Modell kann jede Untereinheit einen Liganden binden (rot) und durch eine Konformationsänderung aktiviert werden (Quadrat -> Kreis).

Concerted-Modell (vertikaler Rahmen), sequentielles Modell (diagonaler Rahmen)

(B) Gating-Modell, Erklärung im Text (Hansen et al., 2003)

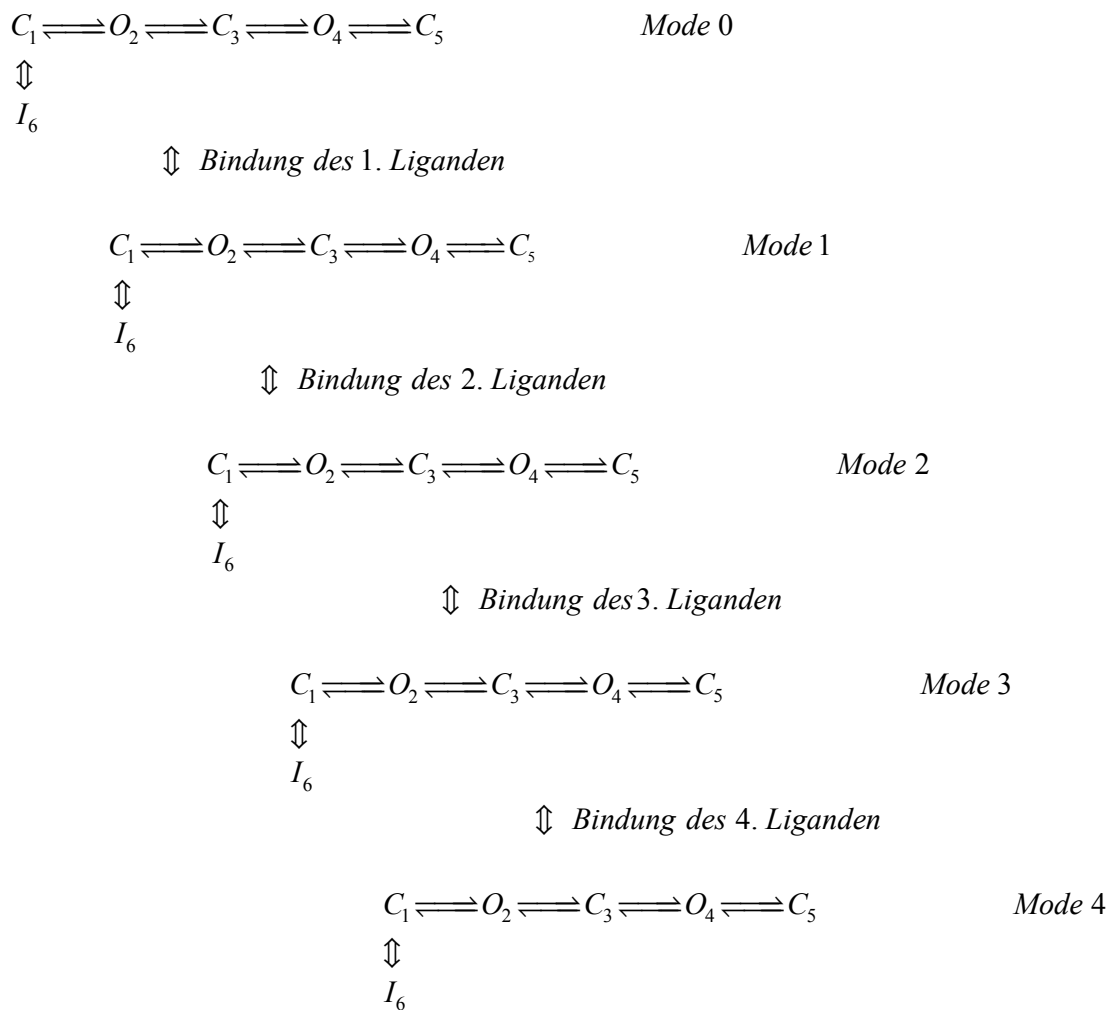


Abbildung 11.5 Modellierung der Inaktivierung in dieser Arbeit mit dem Modell (10.8), erweitert auf die Ligandenbindung
Die Wirkung der gebundenen Liganden erfolgt parametrisch auf die Ratenkonstanten im Modell (10.8).

Mit den folgenden Überlegungen soll versucht werden, eine Beziehung zwischen dem Einfluss auf die Ratenkonstanten im Markov-Modell (10.8) und den Inaktivierungsmechanismen herzustellen. Die Diskussion geschieht pro Mode, zusammengefasst in Tabelle 11.2 (Schaltverhalten) und Tabelle 11.3 (Mechanismen):

Mode 0 (unvergiftet):

Es ist bekannt (Catterall, 2000), dass der inaktive Zustand durch das Schließen des Hinged-Lid-Mechanismus eintritt. Damit ist zu erwarten, dass der asymmetrische Übergang zwischen O_4 und C_5 dem Schließen entspricht.

Mode 1:

Verspätete kurze Öffnungen treten in Mode 1 auf (Abbildung 11.1B). Das bedeutet, dass das Hinged-Lid sich wieder öffnen muss. Dies spiegelt sich in einer leicht erhöhten Ratenkonstanten k_{54} wieder. Die Erhöhung von k_{54} kann nicht durch einen anderen der oben genannten Gating-Mechanismen hervorgerufen werden, denn der Mode 1 tritt bei der Mutante

F1489Q (unvergiftet) in sehr ähnlicher Form auf. Bei der Mutante wird dieses Aufgehen durch ein fehlerhaftes Einrasten des Hinged-Lid bewirkt.

Man könnte ein sehr unwahrscheinliches Gegenmodell vorschlagen, dass bei ChloraminT schon im Mode 1 das Hinged-Lid ganz offen bliebe. Dann würde das Öffnen und Schließen in der Zeitreihe von einem der anderen Gates herrühren. Es ist aber bekannt, dass bei der Mutante IFMQ3 (West et al., 1992) oder beim Binden von Site 2-Toxinen am Hinged-Lid-Mechanismus (Blumenthal & Seibert, 2003) ein großer persistierender Strom auftritt, der in Mode 1 nicht zu beobachten ist. Das heißt, die anderen Gates erzeugen wesentlich häufigere Öffnungen als im Mode 1 zu sehen ist.

Mode 2:

Es treten zusätzliche Bursts am Anfang auf (Abbildung 11.1B). Die Wirkung des Liganden auf die Ratenkonstanten des $O_4 \rightleftharpoons C_5$ -Überganges ist nicht signifikant verschieden von der im Mode 1. Was neu auftritt, ist eine Erhöhung der Ratenkonstante k_{43} (jetzt ungefähr gleich k_{45}). Dadurch springt das System zwischen den Offenzuständen und C_3 hin und her und erzeugt damit die anfänglichen Burst, bis es von C_5 eingefangen wird. Die Identität der beiden Offen-Zustände wird weiter unten getrennt diskutiert.

Insgesamt ist zu folgern, dass der Kanal am Ende wieder in C_5 einrastet, das Hinged-Lid also schließt, davor gibt es aber Vorgänge, die dieses Schließen verzögern. Dazu passt, dass der Mode 2 auch in der unvergifteten Mutante (selten) auftreten kann.

Mode 3:

Der Mode 3 ist gekennzeichnet durch die andauernden Bursts (Abbildung 11.1B). Dies spiegelt sich in einer drastischen Erhöhung der Ratenkonstante k_{54} wieder. Der Hinged-Lid-Mechanismus rastet in der geschlossenen Stellung nicht mehr ein und ist damit so gut wie immer offen. Jetzt werden andere Gating-Mechanismen sichtbar.

Die Veränderung der Ratenkonstanten im Mode 3 bewirkt, dass jetzt Zustand C_5 kaum angenommen wird (entsprechend der obigen Feststellung, dass das Hinged-Lid nicht schließt), dafür aber $C_1 \rightleftharpoons I_6$ eine stärkere Besetzung erhält. Die Abnahme der Besetzung von C_5 liegt an der Erhöhung von k_{54} . Die dadurch bewirkte Verschiebung der Besetzungswahrscheinlichkeiten konzentriert sich auf I_6 , weil k_{61} sehr stark sinkt. $C_1 \rightleftharpoons I_6$ übernimmt also die Rolle von C_5 , allerdings sind die Aussprünge aus I_6 (k_{61}) im Mode 3 häufiger als die Aussprünge aus C_5 (k_{54}) in den Moden 0 bis 2. Dadurch kommt es zu den häufigen Bursts im Mode 3.

Dieser Mechanismus spiegelt sich auch in den sequentiellen Dwell-Time-Histogrammen für Mode 3 (und Mode 4) wider. Betrachtet man in Abbildung 9.20 das sequentielle Dwell-Time-Histogramm von C_1 so fällt der Doppelpeak bei 1 und 10 ms auf. Der erste entsteht durch den direkten Sprung von C_1 in O_2 nach Depolarisation. Beim Peak bei 10 ms ist der Weg wahrscheinlich $C_1 \longrightarrow I_6 \longrightarrow C_1 \longrightarrow O_2$. Interessant ist nun, dass die Lebensdauer der späteren C-Zustände (also der Pausen zwischen den Bursts) auch bei 10 ms ihren Peak haben. Das bedeutet, dass das System immer wieder den Weg $C_1 \longrightarrow I_6 \longrightarrow C_1 \longrightarrow O_2$ wiederholt. Diese Peaks bei 10 ms treten aber in den sequentiellen Dwell-Time-Histogrammen von Mode 1 und 2 nicht auf. Das bedeutet, dass in Mode 3 und 4 ein neuer Inaktivierungsmechanismus zu sehen ist.

Über die physikalische Identität des zu I_6 gehörenden Mechanismus kann nur spekuliert werden. Die C-Typ-Inaktivierung im K^+ Kanal liegt ebenfalls im Zeitbereich von Sekunden. Es fragt sich, ob das Porentor bei den Versuchen zu Mode 3 vielleicht auf schnellere Weise bewegt wird. Andererseits könnte auch eine Beteiligung des Inneren Gates vorliegen. Eine Unterscheidung würde nur mit weiteren Versuchen gelingen.

Auf jeden Fall hat die Demaskierung der Inaktivierung durch das Hinged-Lid (C_5) durch ChloraminT oder die Seeanemontoxine bewirkt, dass dieser neue Inaktivierungs-Mechanismus überhaupt sichtbar wird.

Der hohe persistierende Strom im Mode 3 ist eine Folge der oben beschriebenen Wiederholung der Bursts und bedeutet, dass das System in einen stationären Zustand übergeht. Dies entspricht in gewisser Weise den stationär schaltenden Zeitreihen von vielen K^+ -Kanälen. Interessant ist, dass z.B. den MaxiK-Kanälen von Natur aus das Äquivalent zum Hinged-Lid fehlt. Der sonst die Pore verschließende N-Terminus liegt bei ihnen außen, da die MaxiK-Kanäle 7 transmembrane Helices pro Untereinheit besitzen. Aber auch bei diesem Kanal ist die Rolle der beiden Gating-Mechanismen (Pore-Loop oder inneres Gate) nicht im Detail geklärt.

Mode 4:

Im Mode 4 ist die auffälligste Erscheinung die Stromreduktion durch schnelles Schalten in den Bursts (Abbildung 11.1B) und die komplett fehlende Inaktivierung, was dazu führt, dass das System nicht mehr in absorbierende Zustände läuft. Beim Mode 4 gelingt keine vollständige Modellanpassung in dem 6-Zustandsmodell (Modell 10.8), weil die schnellen Prozesse so stark dominieren, dass die langsamen kein statistisches Gewicht mehr im Fit-Algorithmus erreichen. Allerdings kann man einige Aussagen aus den sequentiellen Dwell-Time-Histogrammen (Abb. 9.20) ableiten. Das Interburstverhalten ist geblieben wie im Mode 3, ersichtlich an dem Peak bei 10 ms. Der 1-ms Peak verschwindet, weil keine schnelle Aktivierung entsprechend dem $C_1 \longrightarrow O_2$ -Übergang mehr vorhanden ist. Der Hauptunterschied zum Mode 3 liegt also darin, dass das Gating im Burst sehr viel schneller geworden ist und deshalb auf eine scheinbare Stromreduzierung führt. Es ist nahe liegend, dass der C_3 -Zustand hierbei eine Rolle spielt. Weitere Details werden im Abschnitt über schnelles Schalten diskutiert.

	Mode 0	Mode 1	Mode 2	Mode 3	Mode 4
singuläre Ereignisse im Verlauf der Zeitreihe	nein	ja	ja	selten	selten
Burst-Ereignisse nach Aktivierung	nein	nein	ja	ja	selten
Burst-Ereignisse im Verlauf der Zeitreihe	nein	nein	nein	ja	ja
verlangsamte Inaktivierung	nein	nein	ja	ja	ja
persistierender Strom	nein	nein	nein	ja	ja
reduzierte Leitfähigkeit durch schnelles Schalten	nein	nein	nein	nein	ja

Tabelle 11.2 Zusammenfassung der Beobachtungen der einzelnen Modes (siehe auch Definitionen der Modes in Tabelle 9.7)

	Mode 0	Mode 1	Mode 2	Mode 3	Mode 4
gebundene Liganden (gleichberechtigte Bindungsstellen)	-	1	2	3	4
Einrasten des Hinged-Lid-Mechanismus	ja	ja	erschwert	nein	nein
Lösen des Hinged-Lid-Mechanismus nach Einrasten	nein	ja	ja	---	---
weiterer Inaktivierungsmechanismus sichtbar	nein	nein	nein	ja	ja

Tabelle 11.3 Zusammenfassung der zugrunde liegenden Mechanismen der einzelnen Modes, die aus der Modellierung abgeleitet werden können

2 Offen-Zustände:

In Hinblick auf die verbreitete Meinung in der Literatur (Horn & Vandenberg 1984, Patlak, 1991; Michalek et al., 1999), dass nur ein Offenzustand existiert, sei hier noch einmal hervorgehoben, dass die Analysen des Abschnitts 10.6 ergeben haben, dass der Natriumkanal nach der Aktivierung 2 Offen-Zustände durchläuft, die durch einen Closed-Zustand getrennt sind ($O_2 \rightleftharpoons C_3 \rightleftharpoons O_4$). In den Modes 2 und 3 gehen die Bursts vom Zustand C_3 aus, der die beiden Offen-Zustände trennt. Allerdings lassen sich auch für unvergiftete Zeitreihen zwei Offen-Zustände nachweisen.

Hierdurch wird gezeigt, dass durch die Giftwirkung in den höheren Modes kein „neuer Kanalzustand“ hinzukommt, sondern eine bereits bei unvergifteten Kanälen vorhandene Konformation durchlaufen wird.

Gekoppelt an den Nachweis der zwei Offen-Zustände ist auch der intermittierende Geschlossen-Zustand C_3 . In der Literatur lässt sich kein direkter Hinweis auf diesen Zustand finden. Denkbar wäre, den Zustand C_3 mit einer Konformationsänderung in Verbindung zu bringen, die die Inaktivierung einleitet.

11.7 4-Mode-Gating Modell: schnelles Schalten

Einzelkanalaufnahmen des Natriumkanals in Mode 4 können nicht mit dem kompletten Modell (10.8) angepasst werden. Der Grund dafür ist die Dominanz der schnellen Ereignisse, die die Kinetiken der langsameren Übergänge verdecken. Deswegen wird die Zeitreihe mit einem verkürzten Modell $C \rightleftharpoons O \rightleftharpoons C$ angepasst (Abschnitt 10.2). Die Frage bleibt aber, welchen Zuständen im Modell (10.8) dieses verkürzte Modell entspricht.

Ein wichtiger Hinweis lässt sich aus der Morphologie der Schaltereignisse in Mode 4 gewinnen, da das schnelle Schalten sich lediglich auf das Gating-Verhalten in den Bursts bezieht. Die Bursts sind in Mode 3, der bis auf das schnelle Schalten dem Mode 4 sehr ähnlich ist, mit dem Zustand C_3 im Modell (10.8) verknüpft (Abschnitt 10.6). Der zweite wichtige Hinweis folgt daraus, dass die Bursts in Mode 3 aus I_6 / C_1 erfolgen (Abschnitt 10.6). Die wahrscheinlichste Interpretation ist also, dass das verkürzte Modell den Zuständen $C_1 \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} O_2 \xrightleftharpoons[k_{32}]{k_{23}} C_3$ zugeordnet werden kann. Die relativ langsamen Ratenkonstanten für

die Einleitung des Burst von ca. 100 Hz (Tabelle 10.2) würden k_{12} und k_{21} entsprechen, die schnellen von 500 kHz für das Fast-Gating den Übergängen k_{23} und k_{32} .

Mit dieser Modellanpassung kann gezeigt werden, dass die Stromreduktion beim Natriumkanal im Mode 4 (siehe 10.2) und die so genannte negative Kennlinie bei dem MaxiK-Kanal (siehe Abschnitt 9.1) durch die Annahme von schnellem Schalten zu modellieren ist.

Die Reduktion ist dabei annähernd konstant (ein Sublevel). Dies deutet darauf hin, dass sich der Kanal in einem metastabilen Zustand befindet, in dem das Gating zwar verändert, aber relativ konstant ist.

Die zugrunde liegenden Ratenkonstanten der Übergänge zwischen Offen- und Geschlossen-Zuständen können beim Natriumkanal auf ca. 500 kHz bestimmt werden (siehe Abschnitt 10.2). Sie liegen dabei in der gleichen Größenordnung wie die beim MaxiK-Kanal festgestellten Ratenkonstanten von bis zu 2000 kHz (siehe Abschnitt 9.1; Schröder et al., 2004, 2005). Ein Schalten von 500 kHz bedeutet, dass nur wenige Ionen den Natriumkanal bei einer Öffnung passieren (ca. 30 Ionen). Für den MaxiK-Kanal mit der größeren Leitfähigkeit und dem schnelleren Schalten ergibt sich ein in etwa vergleichbarer Wert.

An dieser Stelle soll klargestellt werden, dass es sich beim schnellen Schalten nicht um das in der Literatur benutzte fast Gating für „normale“ Bursts handelt, die beim vergifteten Natriumkanal und auch bei anderen Kanaltypen auftritt. Diese Bursts führen bei der in dieser Arbeit benutzten Messtechnik nicht zu einer wesentlichen Stromreduktion und können durch Ratenkonstanten der Übergänge bis 20 kHz beschrieben werden (siehe Abschnitt 10.2).

Zusammen mit den Untersuchungen des Anormalen Molfraktionseffektes dieser Arbeitsgruppe (Farokhi et al., 2000; Hansen et al., 2003) ergibt sich ein Bild, bei dem die Reduktion der scheinbaren Einzelkanalleitfähigkeit generell durch schnelles Schalten hervorgerufen werden könnte.

Dieses Bild ist aber nur ein kleiner Ausschnitt aus der großen Anzahl der in der Literatur beschriebenen Sublevel bei Ionenkanälen, z.B. ist die funktionell sehr wichtige Einwärts-Gleichrichtung durch Mg^{2+} -Ionen beim Kaliumkanal ebenfalls mit Sublevel assoziiert (Hille, 2001). Ein genereller Beweis für schnelles Schalten steht aber noch aus.

Für den Natriumkanal haben bereits mehrere Autoren das Auftreten von Unterleitfähigkeiten beschrieben, im Zusammenhang mit Substanzen, die die Inaktivierung beeinträchtigen. Das gilt für Site 3-Toxine, die von extrazellulär binden (ScTX: Mozhayeva et al., 1990; ATX: Nagy, 1987; Castillo et al., 1996) und auch Oxidantien (DPI: Patlak, 1988; ChloraminT: Nagy, 1987), für die die Bindungsstellen nicht bekannt sind (siehe Abschnitt 11.5).

Das Hauptproblem bei der Analyse der Sublevel ist die im Vergleich zu anderen Ionenkanälen sehr geringe Einzelkanalleitfähigkeit des Natriumkanals. Die meisten Autoren haben die Daten stark filtern müssen, um Sublevel nachzuweisen (z.B. 50 Hz bei Messungen an Membran-Bilayern) oder mussten auf Ganzzellableitungen ausweichen.

Townsend und Horn (1999; Townsend et al., 1997) können mit Whole-Cell-Messungen bei einem kardialen Natriumkanal nicht lineare Stromverläufe nachweisen. Diese Stromverläufe entstehen immer dann, wenn ein Gate den Strom durch die Pore asymmetrisch reguliert. Die Versuche sind so angelegt, dass die Stromverläufe abhängig von der Interaktion mit dem Selektivitätsfilter betrachtet werden (intrazelluläre Porenblocker, extrazelluläre impermeable Kationen und Mutationsexperimente im Bereich der Pore). Sie schlagen eine enge Beziehung

zwischen dem Selektivitätsfilter und dem Gating-Mechanismus vor, das für die nichtlinearen Verläufe verantwortlich ist, unabhängig von dem Aktivierungs-Gate des Kanals. Wie beim Kaliumkanal könnten polyvalente Kationen (Lopatin et al., 1994, 1995), der Hinged-Lid-Mechanismus oder aber auch eine intrinsische Eigenschaft des Proteins die Ursache sein.

Für den Versuch einer mechanistischen Erklärung können Untersuchungen am Kaliumkanal herangezogen werden.

Abbildung 11.6 zeigt das Modell eines Kaliumkanals, der aus einem Homotetramer besteht und keine Spannungsaktivierung zeigt. Jede Untereinheit besteht aus 2 Transmembran-Helices die mit den Helices 5 und 6 des Natriumkanals korrespondieren (Kir-Familie, siehe Abbildung 11.6). Das Selektivitätsfilter und die so genannte Bundle-Crossing sind für den Kaliumkanal die wahrscheinlichsten Kandidaten für das Fast-Gating, das im Burstmodus des Kanals auftritt (Lu et al., 2001; Bichet et al., 2003; Phillips et al., 2003; Phillips & Nichols, 2003; Proks et al., 2003; Xiao et al., 2003). Als Bundle-Crossing wird das Überkreuzen der M2-Helices am Ende der Pore auf der zytoplasmatischen Seite bezeichnet (Doyle et al. 1998; Jiang et al., 2002; Kuo et al., 2003).

Studien am Kir3 und Kir6 haben gezeigt, dass das Fast-Gating durch ein Tor am Selektivitätsfilter kontrolliert wird (Proks et al., 2001; Yi et al., 2001), während die vergleichsweise langsamen Öffnungen zur Initiierung der Bursts eher an der Bundle-Crossing stattfinden (Trapp et al., 1998; Tucker et al., 1998; Loussouarn et al., 2000). Am Kir 2.1 scheint dagegen das langsame Schalten mit dem Selektivitätsfilter zusammenzuhängen (Choe et al., 1999; Lu et al., 2001; So et al., 2001). Xie et al. (2004) können zum ersten Mal zeigen, dass Fast-Gating beim Kir2.1 im Bereich der Bundle-Crossing oder noch darunter stattfindet.

Messungen am MaxiK und am Kir 3.1/2 (Klose et al., 2005) deuten darauf hin, dass das Fast-Gating auch durch den C-Terminus des Kanals gesteuert werden könnte. Die Substanz U73122 blockiert sowohl die Ströme des MaxiK als auch die des Kir3.1/2. Außerdem hebt diese Substanz das Fast Gating beim MaxiK auf. Sequenzanalysen deuten stark darauf hin, dass der Angriffspunkt für diese Substanz im C-Terminus des MaxiK liegt, im Bereich der RCK 1-Einheit (Jiang et al., 2002; Magleby, 2003).

Insgesamt sind diese Befunde nicht einheitlich. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur können die Messungen am Kaliumkanal nicht direkt auf den Natriumkanal übertragen werden. Dadurch, dass aber im Mode 4 der Hinged-Lid-Mechanismus ausgeschaltet ist (Abschnitt 11.6), ist die wahrscheinlichste Annahme, dass das schnelle Schalten beim Natriumkanal im Bereich der Pore zu suchen ist. In Frage käme der Selektivitätsfilter, der von Townsend und Horn (1999) an erster Stelle vorgeschlagen wird.

Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit wird ein neues Feld für die Betrachtung des schnellen Schaltens durch Einzelkanalmessungen am Natriumkanal eröffnet.

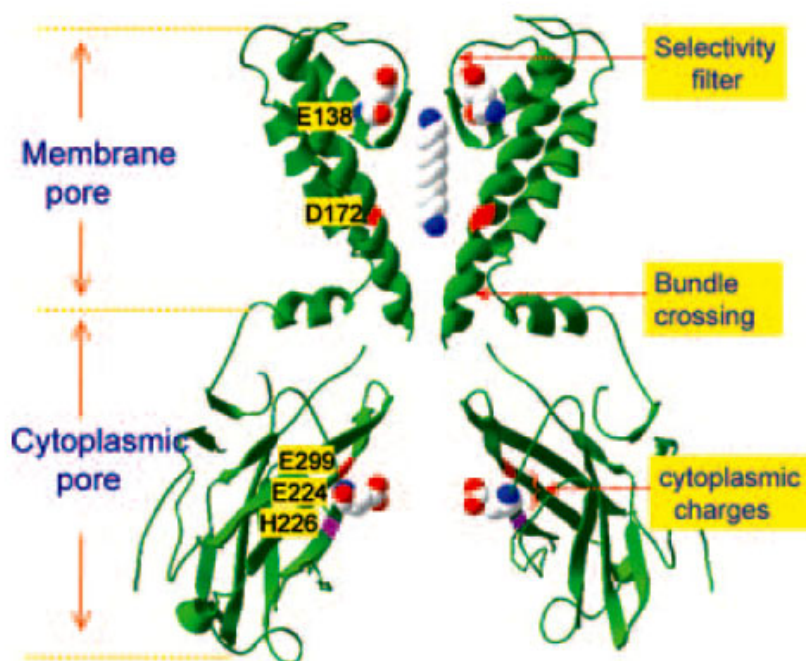


Abbildung 11.6 Struktur des KirBac1.1

Die für das Gating funktionellen Abschnitte sind dargestellt. Äquivalente Aminosäuren des Kir2.1, die für einen Polyaminblock und Fast-Gating verantwortlich sein sollen, sind hervorgehoben.

E138: Selektivitätsfilter, E224: zytoplasmatische „Pore“ (Xie et al., 2004)

11.8 4-Mode-gating-Modell: Anwendung auf Literaturbeispiele

Quinonez et al. (1999) können für zeitabhängige ChloraminT-Messungen an Muskelfasern von *Bufo marinus* einen ähnlichen Verlauf für die Aufhebung der Inaktivierung finden wie in Whole-Cell-Messungen dieser Arbeit (Abbildung 8.6). Wenn man von einigen 100-1000 Kanälen ausgeht, die nacheinander die Modes durchlaufen, aber immer eine Mischung verschiedener Modes im Kanalsembles vorliegt so müssen sich genau die beobachteten Kurvenverläufe ergeben. Erst verlangsamt sich die Inaktivierung (Mode 2) und der Spitzenstrom der Aktivierung nimmt zu (Mode 2). Dann nimmt der persistierende Strom zu (Mode 3). Schließlich nehmen sowohl der Spitzenstrom und der persistierende Strom wieder ab (Mode 4). Zum Schluss ist der Spitzenstrom gleich dem persistierenden Strom (nur noch Mode 4).

Schmidtmayer (1985) kann zeigen, dass die Wirkung einiger Substanzen, die die Inaktivierung beeinflussen, additiv ist. Dieses impliziert das Vorhandensein mehrerer Bindungsstellen.

Insbesondere beeinflusst Trinitrophenol nur die Zeitkonstanten der Inaktivierung, ruft aber per se keinen persistierenden Strom hervor. Sind aber die Natriumkanäle mit ChloraminT vorbehandelt so wird der persistierende Strom durch Trinitrophenol vergrößert (Schmidtmayer, 1985). Dieser lässt sich sehr gut durch das 4-Mode-Gating-Modell erklären. Trinitrophenol kann nur 2 von 4 Bindungsstellen besetzen, wodurch nur die Inaktivierung beeinträchtigt ist (Mode 2). Sind Bindungsstellen durch ChloraminT schon besetzt, erhöht

sich durch die Gabe von Trinitrophenol die Anzahl der besetzten Bindungsstellen (Mode 3 und 4), der persistierende Strom wird größer.

Ferner existieren in der Literatur Befunde für Site 3-Toxine, die miteinander auf unterschiedliche Weise wechselwirken. Die Site 3- α -Skorpiontoxine BomIII und BomIV (*Buthus occitans mardochei*) kompetetieren nicht messbar mit AaH II (*Androctonus australis Hector*), obwohl sie in nanomolarer Konzentration die Inaktivierung verlängern und obwohl sie mit anderen Site 3-Toxinen interagieren (Gordon et al., 1996; Benzinger et al., 1997). Die Toxine sind immerhin so groß, dass sie sich bei der benachbarten Bindung an einer Bindungsstelle sterisch behindern würden (Swartz & McKinnon, 1997b).

Auch diese Ergebnisse könnten durch die Annahme mehrerer Bindungsstellen für diese Toxine am Natriumkanal gut erklärt werden.

11.9 4-Mode-Gating-Modell: Physiologische Bedeutung

Abschließend stellt sich die Frage, ob das 4-Mode-Gating-Modell eine physiologische Bedeutung hat.

Wang & Wang (2002) führen an, dass der Alteration der Inaktivierung in ischämischen Gewebe, z.B. nach einem Herzinfarkt oder Schlaganfall, eine wichtige Bedeutung zukommt. Durch die in diesem Gewebe vorhandenen reaktiven Oxidantien (ROS) kann es zu einer Zunahme des persistierenden Stroms kommen (Hammarstrom & Gage, 2002) wie beim ChloraminT. Die Folge wäre eine veränderte Erregungsleitung mit evtl. fatalen Folgen.

Einige Studien haben sich mit der Erregbarkeit von komplexen neuronalen Netzwerken im Zusammenhang mit einem persistierenden Natriumstrom beschäftigt (siehe Abschnitt 2.3). Brand et al. (2000) konnten z.B. zeigen, dass durch ATX die Erregbarkeit von hippocampalen CA1-Neuronen zwar heraufgesetzt wird, die Erregbarkeit des umliegenden Netzwerkes aber abnimmt.

Die Kontrolle über die Generation von Aktionspotentialen ist in neuronalen Netzwerken kritisch. Die Rolle von persistierenden Natriumströmen im noch unterschweligen Potentialbereich ist dabei von Bedeutung für die Erregungsbildung, Rhythmusgeneration, Verstärkung von IPSPs und EPSPs (inhibitorisches / exzitatorisches postsynaptisches Potential), aber auch für epileptische Erregungsbildung (Schwindt & Crill, 1995; Stuart & Sakmann, 1995; Pennartz et al., 1997; Parri & Crunelli, 1998; Stuart, 1999; Washburn et al., 2000; Lee & Heckman, 2001; Kearney et al., 2001; Do & Bean 2003).

Spekulativ könnte dieses neuronale Tuning der Natriumkanäle über die oben identifizierten Bindungsstellen durch einen extrazellulären Transmitter gesteuert werden.

12 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit können anhand von Einzelkanal Patch-Clamp-Messungen neue Erkenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehung neuronaler Natriumkanäle gewonnen werden. Die wesentlichen Grundlagen sind unter anderem eine deutliche Verbesserung der Messtechnik durch eine neue Pipettenbehandlung und die Weiterentwicklung des 2-Dimensionalen-Dwell-Time-Fits für die Markov-Modellierung der nichtstationären Natriumströme.

Durch die Etablierung der transienten Transfektion von Nav1.2a sowie der Mutante Nav1.2a F1489Q in HEK293-Zellen für die Messungen besteht ein direkter Bezug zu den schon bekannten molekularen Mechanismen des Natriumkanals.

Aus dem defektem Hinged-Lid-Mechanismus der Mutante F1489Q, dem stufenweise und irreversibel die Inaktivierung beeinflussenden ChloraminT sowie den reversibel bindenden Seeanemonotoxine kann das 4-Mode-Gating-Modell entwickelt werden. Dieses Modell gibt Aussagen über die vier gleichberechtigten Bindungsstellen und die zugrunde liegenden Mechanismen der Inaktivierung, abgesichert durch eine umfangreiche Modellierung mit Markov-Modellen.

Dieser Arbeit liegen somit vier Ziele zugrunde:

1. Die Etablierung von Patch-Clamp-Messungen für nicht stationäre Einzelkanalaufnahmen der Natriumkanäle
2. Die Etablierung der molekularbiologischen Methoden zur Expression von Kanalproteinen in heterologen Systemen
3. Entwicklung und Weiterentwicklung von Methoden zur Modellierung nicht stationärer Einzelkanalaufnahmen der Natriumkanäle
4. Untersuchung und Modellierung der Inaktivierung des Natriumkanals

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die vorhandene Messanlage erweitert sowie die Verarbeitung und Analyse von nicht stationären Zeitreihen im Kiel-Patch-Programm implementiert. Das Programm erlaubt nun die interaktive Aufbereitung fast beliebig langer Zeitreihen der Natriumkanäle für die folgende Modelluntersuchung. Ein sehr effektives Werkzeug für die Untersuchung der Messreihen sind dabei die neu eingeführten sequentiellen Dwell-Time-Histogramme, aus denen sich viele Parameter der Zeitreihe direkt ablesen lassen.

Eine wesentliche Verbesserung gegenüber früheren Arbeiten gelingt schon bei der Messmethode durch die Entdeckung einer neuen Beschichtung der Patch-Pipetten mit Sigmacote und der anschließenden Trocknung bei 50-60°C. Diese Vorbehandlung führt zu einer deutlichen Abnahme der Pipettenkapazität und zu einem um den Faktor 10 größeren Sealwiderstand. Hierdurch lassen sich regelmäßig ereignisgesteuerte Einzelkanalaufnahmen von sehr guter Qualität erzielen, die für die Analyse der kleinen Ströme von Natriumkanälen (1-2 pA) sehr wichtig sind.

Der zweite wichtige Teil der Methoden umfasst die Etablierung eines heterologen Expressionssystems im ZBM, Kiel. Der neuronale Natriumkanal Nav1.2a und die abgeleitete Mutante F1489Q können transient in HEK293-Zellen für die Patch-Clamp-Experimente exprimiert werden.

Der entscheidene Vorteil der Wildtyp-Expression des Nav1.2a gegenüber den zum Vergleich benutzten N1E115-Zellen ist, dass der Einzelkanal genau klassifiziert ist und in

HEK-Zellen keine akzessorischen β -Untereinheiten vorhanden sind. Die beobachteten Ergebnisse können auf die vorhandenen Erkenntnisse über die Proteinstruktur des Nav1.2a übertragen werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass man mit dieser Methode genetisch veränderte Natriumkanäle untersuchen kann. In dieser Arbeit gilt das für die Mutante F1489Q, bei der im Bereich der N-Typ-Inaktivierung (Hinged-Lid) eine Aminosäure ausgetauscht wurde.

Den größten methodischen Anteil in dieser Arbeit nimmt die Weiterentwicklung des 2-Dimensionalen-Dwell-Time-Fits ein. Der von Magleby und Weiss (1990a) vorgestellte Algorithmus simuliert Patch-Clamp-Daten anhand eines Markov-Modells und variiert die zugehörigen Ratenkonstanten so lange, bis simulierte und gemessene Daten am besten übereinstimmen.

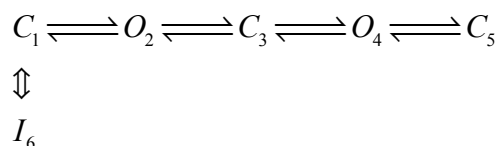
Das in der Literatur vorgeschlagene Programm wird durch mehrere wesentliche Veränderungen soweit verbessert, dass die Natriumkanalaufzeichnungen dieser Arbeit angepasst werden können. Die wichtigsten Neuerungen sind die Einführung eines genetischen Algorithmus, die Verbesserung der Fehlerberechnung durch die Normierung auf die Zeit, die Benutzung der quadratischen Abweichung statt der vorgeschlagenen LogLikelihood sowie die Einbindung von gemessenen Rauschreihen für die Simulation von Zeitreihen.

An simulierten Zeitreihen mit bekannten Parametern des Markov-Modells wird die theoretische Leistungsfähigkeit des neuen Algorithmus unter Beweis gestellt. Gegenüber dem zum Vergleich benutzten Direkten-Zeitreehenfit kann der 2D-Fit schnelle Ratenkonstanten bis zu einem Faktor 10 über der Filterfrequenz anpassen. Außerdem ist er sehr robust gegenüber verrauschten Zeitreihen bis zu einem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) von 0,5 und kann Mehrkanal-Aufzeichnungen im Gegensatz zu dem Direkten-Zeitreehenfit mit einem nur geringfügig höherem Rechenaufwand (10% pro Kanal) anpassen. Die wichtigste Eigenschaft des 2D-Fits ist aber die Unterscheidung von nicht äquivalenten Markov-Modellen, so dass für gemessene Zeitreihen die Aussicht besteht, das am besten passende Modell zu ermitteln.

Ein neues Werkzeug, welches auf den 2D-Fit aufbaut, ist die Rekonstruktion des Stromniveaus bei schnellem Schalten. Es ermöglicht die Bestimmung des wahren Einzelkanalstroms, wenn der Strom durch die Mittelung über schnelle Schaltereignisse im Anti-Aliasing Filter reduziert erscheint.

In den Messungen dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass ChloraminT zeitabhängig die Inaktivierung des Natriumkanals nach Depolarisation durch die fortschreitende Anzahl gebundener Liganden in 4 Stufen verändert. Die 4 Stufen, im Folgenden als Gating-Modes bezeichnet, können der Funktion des Kanalproteins zugeordnet werden (siehe unten).

Im ersten Schritt wird anhand einer Zeitreihe des Nav1.2a im Mode 3 eine Modelluntersuchung durchgeführt. Unter den 19 getesteten Modellen kann nur das folgende lineare Modell (10.8) die Messdaten anpassen:



Hansen et al. (2003) haben für den anormalen Molfraktionseffekt (AMFE) gezeigt, dass die Ligandenbindung nur einen parametrischen Einfluss auf die Übergangsraten hat und nicht die Zustände im Markov-Modell verändert. Dieser Ansatz erweist sich auch in dieser

Arbeit als gültig und ermöglicht mit dem gleichen Modell (10.8) die Anpassung der Zeitreihen des Wildtyps, der Mutante und den unter ChloraminT auftretenden Modes 1-3.

Aus den Ratenkonstanten der Modellierung kann folgendes abgeleitet werden: In den Zeitreihen des unbehandelten Wildtyps, kommt es wie in der Literatur beschrieben (Catterall, 2000) zu einem schnellen Schließen des Kanals durch das Einrasten des Inaktivierungsmechanismus (Hinged-Lid). Nach ChloraminT-Applikation ist in Mode 1 dann ein kurzes Lösen dieses Mechanismus möglich, wodurch singuläre Ereignisse nach der Inaktivierung auftreten. In Mode 2 ist das Einrasten des Hinged-Lid erschwert und es kommt zu Bursts, die an die Aktivierung des Kanals gekoppelt sind. In Mode 3 ist der Hinged-Lid-Mechanismus schließlich völlig aufgehoben und andauernde Bursts können beobachtet werden. Nun wird ein anderer Inaktivierungsmechanismus sichtbar, der dem der Kaliumkanäle (z.B. MaxiK) ähnelt und mit einem inneren Gate oder der Pore verknüpft ist.

Der Mode 4 zeichnet sich im Wesentlichen durch eine sichtbare Stromreduktion in den Bursts gegenüber dem Mode 3 aus. Außerdem ist die schnelle Aktivierung aufgehoben, wodurch die Zeitreihen stationär werden. Die Modellierung des Mode 4 erfolgt wegen der Dominanz der schnellen Übergänge mit einem reduzierten Modell, das den Zuständen $C_1 \rightleftharpoons O_2 \rightleftharpoons C_3$ im Modell (10.8) zuzuordnen ist. Die schnellen Übergänge können durch die Annahme des Ausgangsniveaus in Mode 3 und Ratenkonstanten im Bereich von 500 kHz beschrieben werden. Der Hinged-Lid-Mechanismus kommt dabei als Ursache für das schnelle Schalten nicht in Frage. Am wahrscheinlichsten ist die Ursache im Bereich des Selektivitätsfilters zu suchen. Dieses würde zu den wenigen Messungen passen (Townsend & Horn, 1999), die bisher zu diesem Mechanismus am Natriumkanal durchgeführt worden sind.

Den Schluss auf mögliche Bindungsstellen, die die oben beschriebenen Mechanismen in den Modes steuern, erhält man durch die reversibel von außen bindenden Seeanemontoxine. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die Toxine die gleichen Mechanismen wie das ChloraminT bedienen.

Die Zahl von vier Modes führt zu der Annahme, dass die Bindungsstellen aus Symmetriegründen der 4-fach-Geometrie des Kanals folgen. Die sehr detaillierten Vorstellungen, die in der Literatur zu dem am Kaliumkanal bindenden Hanatoxin existieren, lassen sich auf der einen Seite wegen der Ähnlichkeit zu den Seeanemontoxinen und auf der anderen Seite zu den Bindungsstellen ausnutzen. Eine Sequenzanalyse am Natriumkanal identifiziert 4 Bindungsstellen im Bereich der S3-S4 Linker in allen 4 Domänen, die zu dem Bindungsmotiv des Hanatoxins am Kaliumkanal homolog sind. Auch die am Natriumkanal bekannten extrazellulären Bindungsstellen für Toxine, Site 3 und Site 4, die die Inaktivierung steuern, gehören zu den identifizierten Bereichen am Natriumkanal, wodurch die Sequenzanalyse noch mehr Gewicht erhält.

Die in der Literatur vorherrschende Meinung, dass für verschiedene extrazellulär bindende Toxine und andere die Inaktivierung beeinflussende Substanzen nur jeweils eine Bindungsstelle am Natriumkanal existiert, muss nun revidiert werden. Das fehlende Verständnis für den Zusammenhang zwischen Bindung und Inaktivierung erklärt sich hauptsächlich daraus, dass sich die Parameter der Inaktivierung in Bezug auf eine Dosis-Wirkungs-Kurve nur sehr schwer quantifizieren lassen. Außerdem muss wegen der nicht exakten Homologie der 4 Domänen des Natriumkanals angenommen werden, dass die Affinität zu den Bindungsstellen unterschiedlich ist, wodurch ebenfalls die Interpretation von Daten erschwert wurde.

Mit der so gewonnenen Modellvorstellung des 4-Mode-Gating-Modells lassen sich zeitabhängige Messungen mit ChloraminT (Quinonez et al., 1999), die Addition von Giftwirkungen (Schmidtmayer, 1985) oder auch Toxin-Toxin Interaktionen (Gordon et al., 1996; Benzinger et al., 1997) sehr einfach erklären.

Literatur

Agnew, W. S., Moore, A. C., Levinson, S. R. and Raftery, M. A. (1980) Identification of a large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding protein from the electroplax of *Electrophorus electricus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 92: 860-866.

Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automatic Control*, 19: 716-723.

Alberts, G. L., Pregoner, J. F. and Im, W. B. (2000) Advantages of heterologous expression of human D2 long dopamine receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y over human embryonic kidney 293 cells. *Br J Pharmacol*, 131: 514-520.

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 - Schnelle Datenerfassung von Patch-Clamp Daten und kinetische Analyse von Mehrkanalaufzeichnungen. Dissertation, Kiel.

Albertsen, A. and Hansen, U. P. (1994) Estimation of kinetic rate constants from multi-channel recordings by a direct fit of the time series. *Biophys J*, 67: 1393-1403.

Aldrich, R. W., Corey, D. P. and Stevens, C. F. (1983) A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature*, 306: 436-441.

Amano, T., Richelson, E. and Nirenberg, M. (1972) Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69: 258-263.

Apell, H. J., Marcus, M. M., Anner, B. M., Oetliker, H. and Lauger, P. (1985) Optical study of active ion transport in lipid vesicles containing reconstituted Na,K-ATPase. *J Membr Biol*, 85: 49-63.

Armstrong, C. M. (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev*, 61: 644-683.

Armstrong, C. M. and Bezanilla, F. (1977) Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol*, 70: 567-590.

Armstrong, C. M. and Hille, B. (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*, 20: 371-380.

Armstrong, C. M., Bezanilla, F. and Rojas, E. (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J Gen Physiol*, 62: 375-391.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. and Seidmann, J., Smith, J. A., Struhl, K. (1999) Short protocols in molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.

Ball, F. G. and Sansom, M. S. (1989) Ion-channel gating mechanisms: model identification and parameter estimation from single channel recordings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 236: 385-416.

Balsler, J. R., Nuss, H. B., Orias, D. W., Johns, D. C., Marban, E., Tomaselli, G. F. and Lawrence, J. H. (1996) Local anesthetics as effectors of allosteric gating. Lidocaine effects on inactivation-deficient rat skeletal muscle Na channels. *J Clin Invest*, 98: 2874-2886.

Beneski, D. A. and Catterall, W. A. (1980) Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 639-643.

Benndorf, K. (1994) Properties of single cardiac Na channels at 35 degrees C. *J Gen Physiol*, 104: 801-820.

Benndorf, K. (1995). Low noise Recording. In *Single Channel Recording*, 2nd ed. (Eds: Sakmann, B., Neher, E.) Plenum Press, New York, pp. 129-145.

Bennett PB, J. r., Makita, N. and George AL, J. r. (1993) A molecular basis for gating mode transitions in human skeletal muscle Na⁺ channels. *FEBS Lett*, 326: 21-24.

- Bennett, P. B., Yazawa, K., Makita, N. and George AL, J. r. (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*, 376: 683-685.
- Bentrop, D., Beyermann, M., Wissmann, R. and Fakler, B. (2001) NMR structure of the "ball-and-chain" domain of KCNMB2, the beta 2-subunit of large conductance Ca²⁺- and voltage-activated potassium channels. *J Biol Chem*, 276: 42116-42121.
- Benzinger, G. R., Drum, C. L., Chen, L. Q., Kallen, R. G., Hanck, D. A. and Hanck, D. (1997) Differences in the binding sites of two site-3 sodium channel toxins. *Pflugers Arch*, 434: 742-749.
- Benzinger, G. R., Tonkovich, G. S. and Hanck, D. A. (1999) Augmentation of recovery from inactivation by site-3 Na channel toxins. A single-channel and whole-cell study of persistent currents. *J Gen Physiol*, 113: 333-346.
- Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev*, 80: 555-592.
- Bezanilla, F. and Armstrong, C. M. (1977) Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol*, 70: 549-566.
- Bichet, D., Haass, F. A. and Jan, L. Y. (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci*, 4: 957-967.
- Biskup, C., Zimmer, T. and Benndorf, K. (2004) FRET between cardiac Na⁺ channel subunits measured with a confocal microscope and a streak camera. *Nat Biotechnol*, 22: 220-224.
- Blatt, M. R. and Gradmann, D. (1997) K(+)-sensitive gating of the K⁺ outward rectifier in *Vicia guard* cells. *J Membr Biol*, 158: 241-256.
- Blatz, A. L. and Magleby, K. L. (1986) Correcting single channel data for missed events. *Biophys J*, 49: 967-980.
- Blaustein, R. O. and Miller, C. (2004) Ion channels: shake, rattle or roll? *Nature*, 427: 499-500.
- Blumenthal, K. M. and Seibert, A. L. (2003) Voltage-gated sodium channel toxins: poisons, probes, and future promise. *Cell Biochem Biophys*, 38: 215-238.
- Blunck, R., Kirst, U., Riessner, T. and Hansen, U. (1998) How powerful is the dwell-time analysis of multichannel records? *J Membr Biol*, 165: 19-35.
- Brand, S., Seeger, T. and Alzheimer, C. (2000) Enhancement of persistent Na⁺ current by sea anemone toxin (ATX II) exerts dual action on hippocampal excitability. *Eur J Neurosci*, 12: 2387-2396.
- Bruhn, T., Schaller, C., Schulze, C., Sanchez-Rodriguez, J., Dannmeier, C., Ravens, U., Heubach, J. F., Eckhardt, K., Schmidtmayer, J., Schmidt, H., Aneiros, A., Wachter, E. and Beress, L. (2001) Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon*, 39: 693-702.
- Budker, V., Hagstrom, J. E., Lapina, O., Eifrig, D., Fritz, J. and Wolff, J. A. (1997) Protein/amphipathic polyamine complexes enable highly efficient transfection with minimal toxicity. *Biotechniques*, 23: 139, 142-7.
- Cantrell, A. R., Ma, J. Y., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1996) Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron*, 16: 1019-1026.
- Cantrell, A. R., Smith, R. D., Goldin, A. L., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1997) Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel alpha subunit. *J Neurosci*, 17: 7330-7338.
- Castillo, C., Piernavieja, C. and Recio-Pinto, E. (1996) Anemone toxin II unmask two conductance states in neuronal sodium channels. *Brain Res*, 733: 231-242.
- Catterall, W. A. (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science*, 242: 50-61.
- Catterall, W. A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26: 13-25.

- Cestele, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1998) Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*, 21: 919-931.
- Cestele, S., Scheuer, T., Mantegazza, M., Rochat, H. and Catterall, W. A. (2001) Neutralization of gating charges in domain II of the sodium channel alpha subunit enhances voltage-sensor trapping by a beta-scorpion toxin. *J Gen Physiol*, 118: 291-302.
- Chahine, M., George AL, J. r., Zhou, M., Ji, S., Sun, W., Barchi, R. L. and Horn, R. (1994) Sodium channel mutations in paramyotonia congenita uncouple inactivation from activation. *Neuron*, 12: 281-294.
- Chanda, B. and Bezanilla, F. (2002) Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *J Gen Physiol*, 120: 629-645.
- Chanda, B., Asamoah, O. K. and Bezanilla, F. (2004) Coupling interactions between voltage sensors of the sodium channel as revealed by site-specific measurements. *J Gen Physiol*, 123: 217-230.
- Charbonneau, P. (2002) *An Introduction to Genetic Algorithms for Numerical Optimization.*, High Altitude Observatory, Boulder, Colorado.
- Chen, C. and Cannon, S. C. (1995) Modulation of Na⁺ channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis. *Pflugers Arch*, 431: 186-195.
- Chen, H. and Heinemann, S. H. (2001) Interaction of scorpion alpha-toxins with cardiac sodium channels: binding properties and enhancement of slow inactivation. *J Gen Physiol*, 117: 505-518.
- Chen, L. Q., Santarelli, V., Horn, R. and Kallen, R. G. (1996) A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol*, 108: 549-556.
- Choe, H., Palmer, L. G. and Sackin, H. (1999) Structural determinants of gating in inward-rectifier K⁺ channels. *Biophys J*, 76: 1988-2003.
- Choi, J. K., Holtzer, S., Chacko, S. A., Lin, Z. X., Hoffman, R. K. and Holtzer, H. (1991) Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. *Mol Cell Biol*, 11: 4473-4482.
- Chung, S. H., Krishnamurthy, V. and Moore, J. B. (1991) Adaptive processing techniques based on hidden Markov models for characterizing very small channel currents buried in noise and deterministic interferences. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 334: 357-384.
- Clancy, C. E. and Rudy, Y. (2002) Na⁽⁺⁾ channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation*, 105: 1208-1213.
- Colquhoun, D. (1971) *Lectures of Biostatistics*. Oxford University Press, London pp. 425
- Colquhoun, D. and Hawkes, A. G. (1982) On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and of clusters of bursts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 300: 1-59.
- Colquhoun, D. and Sigworth, F. J. (1995). Analysis of single ion channel data. In *Single Channel Recording*, 2nd ed. (Eds: Sakmann, B., Neher, E.) Plenum Press, New York, pp. 483-587.
- Corey, D., Stevens, C.F (1983) Science and technology of patch-recording electrodes. In: B. Sakmann, Neher, E (Eds.), *Single-Channel Recording*, Plenum Press, New York, pp. 53-68.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173: 33-38.
- Crouzy, S. C. and Sigworth, F. J. (1990) Yet another approach to the dwell-time omission problem of single-channel analysis. *Biophys J*, 58: 731-743.
- Del Giudice, P., Fusi, S. and Mattia, M. (2003) Modelling the formation of working memory with networks of integrate-and-fire neurons connected by plastic synapses. *J Physiol Paris*, 97: 659-681.
- Do, M. T. and Bean, B. P. (2003) Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation. *Neuron*, 39: 109-120.

- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280: 69-77.
- Draber, S. (1994) Methods for analyzing fast single-channel data and studies on the K⁺ channel under Cs⁺ blockade and under control conditions. Dissertation, Kiel.
- Draber, S. and Schultze, R. (1994a) Correction for missed events based on a realistic model of a detector. *Biophys J*, 66: 191-201.
- Draber, S. and Schultze, R. (1994b) Detection of jumps in single-channel data containing subconductance levels. *Biophys J*, 67: 1404-1413.
- Eaholtz, G., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1994) Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron*, 12: 1041-1048.
- Farokhi, A. (2002) Nachweis und Modellierung des Gatingmechanismus beim anomalen TI⁺/K⁺-Molfraktionseffekt im Vergleich zu spontanen Stromänderungen in Na⁺/K⁺-Lösung. Dissertation, Kiel.
- Farokhi, A., Keunecke, M. and Hansen, U. P. (2000) The anomalous mole fraction effect in Chara: gating at the edge of temporal resolution. *Biophys J*, 79: 3072-3082.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 7413-7417.
- Filatov, G. N., Nguyen, T. P., Kraner, S. D. and Barchi, R. L. (1998) Inactivation and secondary structure in the D4/S4-5 region of the SkM1 sodium channel. *J Gen Physiol*, 111: 703-715.
- FitzHugh, R. (1983) Statistical properties of the asymmetric random telegraph signal with application to single channel analysis. *Mathematical Bioscience*, 64: 75-89.
- Fredkin, D. R. and Rice, J. A. (1992) Maximum likelihood estimation and identification directly from single-channel recordings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 249: 125-132.
- Fredkin, D.R., Montal, M., Rice, J.A. (1985) Identification of aggregated Markovian models: application to the nicotinic acetylcholine receptor. In *Proceedings of the Berkely Conference in Honor of Jerzy Neyman and Jack Kiefer*, Le Cam, L M & Olshen, R.A., Wadsworth, Monterey , pp. 269-289.
- Ganesan, R. and Sherman, A. T. (1994) Statistical techniques for language recognition: an empirical study using real and simulated English. *Cryptologia*, 18: 289-332.
- Garny, A., Noble, D. and Kohl, P. (2005) Dimensionality in cardiac modelling. *Prog Biophys Mol Biol*, 87: 47-66.
- Gassen, H.G., Schrimpf, G. (Hrg.) (1999) *Gentechnische Methoden*, Spektrum Akad. Vlg., Heidelberg.
- Glauner, K. S., Mannuzzu, L. M., Gandhi, C. S. and Isacoff, E. Y. (1999) Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature*, 402: 813-817.
- Goldin, A. L. (2002) Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J Exp Biol*, 205: 575-584.
- Goldin, A. L. (2003) Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol*, 13: 284-290.
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N. and Catterall, W. A. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28: 365-368.
- Goldin, A. L., Snutch, T., Lubbert, H., Dowsett, A., Marshall, J., Auld, V., Downey, W., Fritz, L. C., Lester, H. A., Dunn, R. and et, a. l. (1986) Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 7503-7507.
- Gordon, D., Martin-Eauclaire, M. F., Cestele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Khalifa, R. B., Pelhate, M. and Rochat, H. (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J Biol Chem*, 271: 8034-8045.

- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36: 59-74.
- Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18: 2714-2723.
- Guy, H. R. and Seetharamulu, P. (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 508-512.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391: 85-100.
- Hammarstrom, A. K. and Gage, P. W. (1998) Inhibition of oxidative metabolism increases persistent sodium current in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol*, 510 (Pt 3): 735-741.
- Hammarstrom, A. K. and Gage, P. W. (1999) Nitric oxide increases persistent sodium current in rat hippocampal neurons. *J Physiol*, 520 Pt 2: 451-461.
- Hammarstrom, A. K. and Gage, P. W. (2000) Oxygen-sensing persistent sodium channels in rat hippocampus. *J Physiol*, 529 Pt 1: 107-118.
- Hammarstrom, A. K. and Gage, P. W. (2002) Hypoxia and persistent sodium current. *Eur Biophys J*, 31: 323-330.
- Hansen, U. P., Cakan, O., Abshagen-Keunecke, M. and Farokhi, A. (2003) Gating models of the anomalous mole-fraction effect of single-channel current in *Chara*. *J Membr Biol*, 192: 45-63.
- Hansen, U., Keunecke, M., Blunck, R. (1997) Gating and permeation models of plant channels. *J. Exp. Bot.*, 48: 365-382.
- Harlfinger, P. (2003) Detektion schneller Übergangsraten in Markov-Prozessen durch kombinierte Auswertung von Amplitudenhistogramm und Zeitreihe. Dissertation Kiel.
- Hartshorne, R. P. and Catterall, W. A. (1981) Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 4620-4624.
- Hartshorne, R. P., Messner, D. J., Coppersmith, J. C. and Catterall, W. A. (1982) The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *J Biol Chem*, 257: 13888-13891.
- Hawkes, A. G., Jalali, A. and Colquhoun, D. (1992) Asymptotic distributions of apparent open times and shut times in a single channel record allowing for the omission of brief events. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 337: 383-404.
- Head, C. and Gardiner, M. (2003) Paroxysms of excitement: sodium channel dysfunction in heart and brain. *Bioessays*, 25: 981-993.
- Heinemann, S. (1995) *Guide to Data Acquisition and Analysis*. 2nd ed. (Eds: Sakmann, B., Neher, E.) Plenum Press, New York, pp. 53-90.
- Heinemann, S. H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K. and Numa, S. (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356: 441-443.
- Hilber, K., Sandtner, W., Kudlacek, O., Glaaser, I. W., Weisz, E., Kyle, J. W., French, R. J., Fozzard, H. A., Dudley, S. C. and Todt, H. (2001) The selectivity filter of the voltage-gated sodium channel is involved in channel activation. *J Biol Chem*, 276: 27831-27839.
- Hilber, K., Sandtner, W., Kudlacek, O., Schreiner, B., Glaaser, I., Schutz, W., Fozzard, H. A., Dudley, S. C. and Todt, H. (2002) Interaction between fast and ultra-slow inactivation in the voltage-gated sodium channel. Does the inactivation gate stabilize the channel structure? *J Biol Chem*, 277: 37105-37115.
- Hille, B. (1984) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, First Edition, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Hille, B. (2001) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Third Edition, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.

- Hinkley, D. (1971) Inference about the change point from cumulative-sum tests. *Biometrika*, 57: 1-17.
- Hirano, J., Nakamura, K., Itazawa, S., Sohma, Y., Kubota, T. and Kubokawa, M. (2002) Modulation of the Ca²⁺-activated large conductance K⁺ channel by intracellular pH in human renal proximal tubule cells. *Jpn J Physiol*, 52: 267-276.
- Hirschberg, B., Rovner, A., Lieberman, M. and Patlak, J. (1995) Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels. *J Gen Physiol*, 106: 1053-1068.
- Hodgkin and Huxley, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117: 500-544.
- Holland, J. (1975) *Adaptation in Natural and Artificial Systems.*, The University of Michigan Press.
- Horn, R. and Lange, K. (1983) Estimating kinetic constants from single channel data. *Biophys J*, 43: 207-223.
- Horn, R. and Vandenberg, C. A. (1984) Statistical properties of single sodium channels. *J Gen Physiol*, 84: 505-534.
- Hoshi, T. and Heinemann, S. (2001) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol*, 531: 1-11.
- Huang, X., Ariki, Y. and M.A., J. (1990) *Hidden Markov Models for Speech Recognition.* pp. 276: Edingburgh University Press.
- Huth, T. (1999) *Entwicklung und Erprobung von Methoden zur Analyse des schnellen Schaltens beim Na⁺-Kanal von N1E115 Neuroblastomzellen.* Diplomarbeit, Kiel.
- Irvine, L. A., Jafri, M. S. and Winslow, R. L. (1999) Cardiac sodium channel Markov model with temperature dependence and recovery from inactivation. *Biophys J*, 76: 1868-1885.
- Isom, L. L., De Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A. L. and Catterall, W. A. (1992) Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*, 256: 839-842.
- Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1995) Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*, 83: 433-442.
- Jackson, M. B. (1997) Inversion of Markov processes to determine rate constants from single-channel data. *Biophys J*, 73: 1382-1394.
- Jiang, Q. X., Wang, D. N. and MacKinnon, R. (2004) Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature*, 430: 806-810.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 417: 515-522.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423: 33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. and MacKinnon, R. (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423: 42-48.
- Karpen, J. W. and Ruiz, M. (2002) Ion channels: does each subunit do something on its own? *Trends Biochem Sci*, 27: 402-409.
- Kearney, J. A., Plummer, N. W., Smith, M. R., Kapur, J., Cummins, T. R., Waxman, S. G., Goldin, A. L. and Meisler, M. H. (2001) A gain-of-function mutation in the sodium channel gene *Scn2a* results in seizures and behavioral abnormalities. *Neuroscience*, 102: 307-317.
- Kellenberger, S., West, J. W., Catterall, W. A. and Scheuer, T. (1997b) Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. *J Gen Physiol*, 109: 607-617.
- Kellenberger, S., West, J. W., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1997a) Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. *J Gen Physiol*, 109: 589-605.

- Keunecke, M. (1995) Der anomale Molfraktionseffekt im K⁺Kanal bei Chara. Diplomarbeit, Kiel.
- Keunecke, M. (1999) Untersuchungen zum Ionentransport aus dem Xylem in den Symplasten des Maisblattes. Dissertation, Kiel.
- Keynes, R. D. (1994) The kinetics of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys*, 27: 339-434.
- Keynes, R. D. and Elinder, F. (1998) Modelling the activation, opening, inactivation and reopening of the voltage-gated sodium channel. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 265: 263-270.
- Kieffer, B. L. (1991) Optimised cDNA size selection and cloning procedure for the construction of representative plasmid cDNA libraries. *Gene*, 109: 115-119.
- Kirst, U. (1997) Modellierung und Softwareentwicklung für die statistische Analyse von Patch-Clamp-Daten. Diplomarbeit, Kiel.
- Kiss, L., LoTurco, J. and Korn, S. J. (1999) Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys J*, 76: 253-263.
- Klein, S., Timmer, J. and Honerkamp, J. (1997) Analysis of multichannel patch clamp recordings by hidden Markov models. *Biometrics*, 53: 870-884.
- Klose, A., Huth, T., Alzheimer, C. (2005) PLC-independent suppression of potassium channels by the PLC inhibitor U73122. *Pflugers Arch*, 449: 81.
- Kontis, K. J. and Goldin, A. L. (1997) Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges. *J Gen Physiol*, 110: 403-413.
- Korn, S. J. and Horn, R. (1988) Statistical discrimination of fractal and Markov models of single-channel gating. *Biophys J*, 54: 871-877.
- Kostyuk, P. G., Krishtal, O. A., Pidoplichko, V. I. and Veselovsky, N. S. (1978) Ionic currents in the neuroblastoma cell membrane. *Neuroscience*, 3: 327-332.
- Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T. and Doyle, D. A. (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science*, 300: 1922-1926.
- Lai, J., Porreca, F., Hunter, J. C. and Gold, M. S. (2004) Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44: 371-397.
- Larsson, H. P. and Elinder, F. (2000) A conserved glutamate is important for slow inactivation in K⁺ channels. *Neuron*, 27: 573-583.
- Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S. and Isacoff, E. Y. (1996) Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4. *Neuron*, 16: 387-397.
- Lee, R. H. and Heckman, C. J. (2001) Essential role of a fast persistent inward current in action potential initiation and control of rhythmic firing. *J Neurophysiol*, 85: 472-475.
- Lehmann-Horn, F. and Jurkat-Rott, K. (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*, 79: 1317-1372.
- Lerche, H., Peter, W., Fleischhauer, R., Pika-Hartlaub, U., Malina, T., Mitrovic, N. and Lehmann-Horn, F. (1997) Role in fast inactivation of the IV/S4-S5 loop of the human muscle Na⁺ channel probed by cysteine mutagenesis. *J Physiol*, 505 (Pt 2): 345-352.
- Levis, R. A. and Rae, J. L. (1993) The use of quartz patch pipettes for low noise single channel recording. *Biophys J*, 65: 1666-1677.
- Liebovitch, L. S., Fischbarg, J., Koniarek, J. P., Todorova, I. and Wang, M. (1987) Fractal model of ion-channel kinetics. *Biochim Biophys Acta*, 896: 173-180.
- Li-Smerin, Y. and Swartz, K. J. (2000) Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J Gen Physiol*, 115: 673-684.
- Liu, Y. S., Sompornpisut, P. and Perozo, E. (2001) Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nat Struct Biol*, 8: 883-887.

- Lopatin, A. N., Makhina, E. N. and Nichols, C. G. (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372: 366-369.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N. and Nichols, C. G. (1995) The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol*, 106: 923-955.
- Löptien, U. (1999) Modellidentifikation bei der Untersuchung von Ionenkanälen. Diplomarbeit, Kiel.
- Loussouarn, G., Makhina, E. N., Rose, T. and Nichols, C. G. (2000) Structure and dynamics of the pore of inwardly rectifying K(ATP) channels. *J Biol Chem*, 275: 1137-1144.
- Lu, T., Ting, A. Y., Mainland, J., Jan, L. Y., Schultz, P. G. and Yang, J. (2001) Probing ion permeation and gating in a K⁺ channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nat Neurosci*, 4: 239-246.
- Ma, J. Y., Catterall, W. A. and Scheuer, T. (1997) Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein betagamma subunits. *Neuron*, 19: 443-452.
- Magleby, K. L. (2001) Kinetic gating mechanisms for BK channels: when complexity leads to simplicity. *J Gen Physiol*, 118: 583-587.
- Magleby, K. L. (2003) Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J Gen Physiol*, 121: 81-96.
- Magleby, K. L. and Song, L. (1992) Dependency plots suggest the kinetic structure of ion channels. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 249: 133-142.
- Magleby, K. L. and Weiss, D. S. (1990a) Estimating kinetic parameters for single channels with simulation. A general method that resolves the missed event problem and accounts for noise. *Biophys J*, 58: 1411-1426.
- Magleby, K. L. and Weiss, D. S. (1990b) Identifying kinetic gating mechanisms for ion channels by using two-dimensional distributions of simulated dwell times. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 241: 220-228.
- Makita, N., Bennett, P. B. and George AL, J. r. (1996) Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels. *J Neurosci*, 16: 7117-7127.
- Mantegazza, M., Yu, F. H., Powell, A. J., Clare, J. J., Catterall, W. A. and Scheuer, T. (2005) Molecular determinants for modulation of persistent sodium current by G-protein betagamma subunits. *J Neurosci*, 25: 3341-3349.
- Marks, T. N. and Jones, S. W. (1992) Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. An allosteric model for calcium channel activation and dihydropyridine agonist action. *J Gen Physiol*, 99: 367-390.
- Marmont, G. (1949) Studies on the axon membrane; a new method. *J Cell Physiol*, 34: 351-382.
- McClatchey, A. L., Van den, B. e. P., Pericak-Vance, M. A., Raskind, W., Verellen, C., McKenna-Yasek, D., Rao, K., Haines, J. L., Bird, T., Brown RH, J. r. and et, a. l. (1992) Temperature-sensitive mutations in the III-IV cytoplasmic loop region of the skeletal muscle sodium channel gene in paramyotonia congenita. *Cell*, 68: 769-774.
- McCormick, K. A., Isom, L. L., Ragsdale, D., Smith, D., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1998) Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *J Biol Chem*, 273: 3954-3962.
- McManus, O. B., Blatz, A. L. and Magleby, K. L. (1987) Sampling, log binning, fitting, and plotting durations of open and shut intervals from single channels and the effects of noise. *Pflugers Arch*, 410: 530-553.
- McPhee, J. C., Ragsdale, D. S., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1995) A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J Biol Chem*, 270: 12025-12034.
- McPhee, J. C., Ragsdale, D. S., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1998) A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. *J Biol Chem*, 273: 1121-1129.

- Michalek, S., Lerche, H., Wagner, M., Mitrovic, N., Schiebe, M., Lehmann-Horn, F. and Timmer, J. (1999) On identification of Na⁺ channel gating schemes using moving-average filtered hidden Markov models. *Eur Biophys J*, 28: 605-609.
- Milescu, L. S., Akk, G. and Sachs, F. (2005) Maximum likelihood estimation of ion channel kinetics from macroscopic currents. *Biophys J*, 88: 2494-2515.
- Miller, C. (1991) 1990: annus mirabilis of potassium channels. *Science*, 252: 1092-1096.
- Mitrovic, N., George AL, J. r. and Horn, R. (2000) Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation. *J Gen Physiol*, 115: 707-718.
- Mittmann, T. and Alzheimer, C. (1998) Muscarinic inhibition of persistent Na⁺ current in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 79: 1579-1582.
- Moolenaar, W. H. and Spector, I. (1978) Ionic currents in cultured mouse neuroblastoma cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol*, 278: 265-286.
- Moran, O., Conti, F. and Tammaro, P. (2003) Sodium channel heterologous expression in mammalian cells and the role of the endogenous beta1-subunits. *Neurosci Lett*, 336: 175-179.
- Motoike, H. K., Liu, H., Glaaser, I. W., Yang, A. S., Tateyama, M. and Kass, R. S. (2004) The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol*, 123: 155-165.
- Mozhayeva, G. N., Naumov, A. P., Kuryshev, Y. u. and Nosyreva, E. D. (1990) Some properties of sodium channels in neuroblastoma cells modified with scorpion toxin and chloramine-T. Single channel measurements. *Gen Physiol Biophys*, 9: 3-17.
- Nagy, K. (1987) Subconductance states of single sodium channels modified by chloramine-T and sea anemone toxin in neuroblastoma cells. *Eur Biophys J*, 15: 129-132.
- Nagy, K., Kiss, T. and Hof, D. (1983) Single Na channels in mouse neuroblastoma cell membrane. Indications for two open states. *Pflugers Arch*, 399: 302-308.
- Naren, A. P. and Kirk, K. L. (2000) CFTR Chloride Channels: Binding Partners and Regulatory Networks. *News Physiol Sci*, 15: 57-61.
- Nedler, J. and Mead., R. (1965) A simplex method for function minimization. *Computer J.*, 7: 308.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260: 799-802.
- Nguyen, T. P. and Horn, R. (2002) Movement and crevices around a sodium channel S3 segment. *J Gen Physiol*, 120: 419-436.
- Niemann, P., Schmidtmayer, J. and Ulbricht, W. (1991) Chloramine-T effect on sodium conductance of neuroblastoma cells as studied by whole-cell clamp and single-channel analysis. *Pflugers Arch*, 418: 129-136.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H. and Numa, S. (1986a) Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature*, 320: 188-192.
- Noda, M., Ikeda, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S. (1986b) Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature*, 322: 826-828.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N. and et, a. I. (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, 312: 121-127.
- Noda, M., Suzuki, H., Numa, S. and Stuhmer, W. (1989) A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett*, 259: 213-216.
- Nonner, W. (1980) Relations between the inactivation of sodium channels and the immobilization of gating charge in frog myelinated nerve. *J Physiol*, 299: 573-603.

- Norton, R. S. (1991) Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon*, 29: 1051-1084.
- Numberger, M. and Draguhn, A. (1996) Patch-Clamp-Technik, Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Opsahl, L. R. and Webb, W. W. (1994) Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes. *Biophys J*, 66: 75-79.
- O'Reilly, J. P., Wang, S. Y. and Wang, G. K. (2001) Residue-specific effects on slow inactivation at V787 in D2-S6 of Na(v)1.4 sodium channels. *Biophys J*, 81: 2100-2111.
- Page, E. (1954) Continuous inspection schemes. *Biometrika*, 41: 100-115.
- Page, E. (1955) A test for a change in parameter occurring at an unknown point. *Biometrika*, 42: 523-527.
- Parlow, B. and Schmoll, D.S., Transfection of H4IIE and HEK293 cells with Metafectene, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Greifswald.
- Parri, H. R. and Crunelli, V. (1998) Sodium current in rat and cat thalamocortical neurons: role of a non-inactivating component in tonic and burst firing. *J Neurosci*, 18: 854-867.
- Parzefall, F., Wilhelm, R., Heckmann, M. and Dudel, J. (1998) Single channel currents at six microsecond resolution elicited by acetylcholine in mouse myoballs. *J Physiol*, 512 (Pt 1): 181-188.
- Patlak, J. (1991) Molecular kinetics of voltage-dependent Na⁺ channels. *Physiol Rev*, 71: 1047-1080.
- Patlak, J. B. (1988) Sodium channel subconductance levels measured with a new variance-mean analysis. *J Gen Physiol*, 92: 413-430.
- Paysan, J. and Breer, H. (2001) Molecular physiology of odor detection: current views. *Pflugers Arch*, 441: 579-586.
- Peitsch, M. C. (1995) Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology*, 13: 658-660.
- Pennartz, C. M., Bierlaagh, M. A. and Geurtsen, A. M. (1997) Cellular mechanisms underlying spontaneous firing in rat suprachiasmatic nucleus: involvement of a slowly inactivating component of sodium current. *J Neurophysiol*, 78: 1811-1825.
- Phillips, L. R. and Nichols, C. G. (2003) Ligand-induced closure of inward rectifier Kir6.2 channels traps spermine in the pore. *J Gen Physiol*, 122: 795-804.
- Phillips, L. R., Enkvetchakul, D. and Nichols, C. G. (2003) Gating dependence of inner pore access in inward rectifier K(+) channels. *Neuron*, 37: 953-962.
- Plieth (1996) Untersuchungen zur Bestimmung von Ionenkanälen und ihrer Änderung in grünen pflanzlichen Zellen und Geweben mit Hilfe bildverarbeitender radiometrischer Fluoreszenz-Mikroskopie und der Laser-Doppler-Anemometrie. Dissertation, Kiel.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111: 229-233.
- Press, W., Flannery, B., Teukolsky, S. and Vetterling, W. (1989) Numerical recipes in pascal. In: anonymous (Eds.), Cambridge University Press, pp. 326-330.
- Proks, P., Antcliff, J. F. and Ashcroft, F. M. (2003) The ligand-sensitive gate of a potassium channel lies close to the selectivity filter. *EMBO Rep*, 4: 70-75.
- Proks, P., Capener, C. E., Jones, P. and 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.
- Ptacek, L. J., George AL, J. r., Barchi, R. L., Griggs, R. C., Riggs, J. E., Robertson, M. and Leppert, M. F. (1992) Mutations in an S4 segment of the adult skeletal muscle sodium channel cause paramyotonia congenita. *Neuron*, 8: 891-897.
- Ptacek, L. J., George AL, J. r., Griggs, R. C., Tawil, R., Kallen, R. G., Barchi, R. L., Robertson, M. and Leppert, M. F. (1991) Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell*, 67: 1021-1027.

- Qu, Y., Rogers, J. C., Chen, S. F., McCormick, K. A., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1999) Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel alpha subunit in voltage-dependent gating and modulation by beta1 subunits. *J Biol Chem*, 274: 32647-32654.
- Quinonez, M., DiFranco, M. and Gonzalez, F. (1999) Involvement of methionine residues in the fast inactivation mechanism of the sodium current from toad skeletal muscle fibers. *J Membr Biol*, 169: 83-90.
- Rack, M., Rubly, N. and Waschow, C. (1986) Effects of some chemical reagents on sodium current inactivation in myelinated nerve fibers of the frog. *Biophys J*, 50: 557-564.
- Radomski, O. (2000) Programmwurf zur modellgestützten Analyse von Zeitreihen mit ein- und zweidimensionalen Dwell Time Histogrammen. Diplomarbeit, Kiel.
- Rechenberg, I. (1973) Evolutionsstrategie, Fromman-Hozboog Verlag.
- Richelson, E. (1973) Regulation of tyrosine hydroxylase activity in mouse neuroblastoma clone N1E-115. *J Neurochem*, 21: 1139-1145.
- 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. Dissertation, Kiel.
- Riessner, T., Woelk, F., Abshagen-Keunecke, M., Caliebe, A. and Hansen, U. P. (2002) A new level detector for ion channel analysis. *J Membr Biol*, 189: 105-18.
- Rogers, J. C., Qu, Y., Tanada, T. N., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1996) Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. *J Biol Chem*, 271: 15950-15962.
- Rohl, C. A., Boeckman, F. A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W. A. and Klevit, R. E. (1999) Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry*, 38: 855-861.
- Rojas, C. V., Wang, J. Z., Schwartz, L. S., Hoffman, E. P., Powell, B. R. and Brown RH, J. r. (1991) A Met-to-Val mutation in the skeletal muscle Na⁺ channel alpha-subunit in hyperkalaemic periodic paralysis. *Nature*, 354: 387-389.
- Rose, R. C. and Juang, B. H. (1996) Hidden Markov models for speech and signal recognition. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, 45: 137-152.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y. and Stevens, C. F. (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science*, 280: 1596-1599.
- Rothberg, B. S. and Magleby, K. L. (1999) Gating kinetics of single large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in high Ca²⁺ suggest a two-tiered allosteric gating mechanism. *J Gen Physiol*, 114: 93-124.
- Rothberg, B. S. and Magleby, K. L. (2000) Voltage and Ca²⁺ activation of single large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels described by a two-tiered allosteric gating mechanism. *J Gen Physiol*, 116: 75-99.
- Rothberg, B. S. and Magleby, K. L. (2001) Testing for detailed balance (microscopic reversibility in ion channel gating. *Biophys J*, 80: 3025-3026.
- Ruiz, M. and 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.
- Ruiz, M. L. and Karpen, J. W. (1997) Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states. *Nature*, 389: 389-392.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Sakmann, B. and Neher, E. (1995) Single-Channel Recordings, Plenum Press New York and London.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. (1998) Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanchez, J., Bruhn, T., Aneiros, A., Wachter, E. and Beress, L. (1996) A simple biochemical method in the search for bioactive polypeptides in a sea anemone (*Anemonia sulcata*). *Toxicon*, 34: 1361-1366.
- Schlief, T., Schonherr, R., Imoto, K. and Heinemann, S. H. (1996) Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *Eur Biophys J*, 25: 75-91.
- Schmidt, G., Transfection of HeLA and HEK293-cells with Metafectene, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Freiburg.
- Schmidt, H. (2000) Seeanemontoxine verändern das Schaltverhalten neuronaler Natriumkanäle - eine Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen. Dissertation, Kiel.
- Schmidtmayer, J. (1985) Behaviour of chemically modified sodium channels in frog nerve supports a three-state model of inactivation. *Pflugers Arch*, 404: 21-28.
- Schreibmayer, W., Wallner, M. and Lotan, I. (1994) Mechanism of modulation of single sodium channels from skeletal muscle by the beta 1-subunit from rat brain. *Pflugers Arch*, 426: 360-362.
- Schröder, I. (2003) Überprüfung von Vorhersagen und Ergänzungen zum Markov-Modell des Anomalen Molfraktionseffektes in Chara. Diplomarbeit, Kiel.
- Schröder, I., Harlfinger, P., Huth, T., Hansen, U. P. (2005) A Subsequent Fit of Time Series and Amplitude Histogram of Patch-Clamp Records Reveals Rate Constants up to 1 per Microsecond. *J Membr Biol*, 202: in press.
- Schröder, I., Huth, T., Suitchmezian, V., Jarosik, J., Schnell, S. and Hansen, U. P. (2004) Distributions-per-level: a means of testing level detectors and models of patch-clamp data. *J Membr Biol*, 197: 49-58.
- Schultze, R. and Draber, S. (1993) A nonlinear filter algorithm for the detection of jumps in patch-clamp data. *J Membr Biol*, 132: 41-52.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31: 3381-5.
- Schwindt, P. C. and Crill, W. E. (1995) Amplification of synaptic current by persistent sodium conductance in apical dendrite of neocortical neurons. *J Neurophysiol*, 74: 2220-2224.
- Shechter, Y., Burstein, Y. and Patchornik, A. (1975) Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry*, 14: 4497-4503.
- Sheets, M. F., Kyle, J. W., Kallen, R. G. and Hanck, D. A. (1999) The Na channel voltage sensor associated with inactivation is localized to the external charged residues of domain IV, S4. *Biophys J*, 77: 747-757.
- Siepel, A. and Haussler, D. (2004) Combining phylogenetic and hidden Markov models in biosequence analysis. *J Comput Biol*, 11: 413-428.
- Sigworth, F. J. and Sine, S. M. (1987) Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys J*, 52: 1047-1054.
- Singh, A. C. and Sutradhar, B. C. (1989) Testing proportions for Markov dependent Bernolli trials. *Biometrika*, 76: 809-813.
- Smith, M. R. and Goldin, A. L. (1997) Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophys J*, 73: 1885-1895.
- So, I., Ashmole, I., Davies, N. W., Sutcliffe, M. J. and Stanfield, P. R. (2001) The K⁺ channel signature sequence of murine Kir2.1: mutations that affect microscopic gating but not ionic selectivity. *J Physiol*, 531: 37-50.
- Song, L. and Magleby, K. L. (1994) Testing for microscopic reversibility in the gating of maxi K⁺ channels using two-dimensional dwell-time distributions. *Biophys J*, 67: 91-104.
- Sorensen, J. B., Cha, A., Latorre, R., Rosenman, E. and Bezanilla, F. (2000) Deletion of the S3-S4 linker in the Shaker potassium channel reveals two quenching groups near the outside of S4. *J Gen Physiol*, 115: 209-222.

- Spafford, J. D., Spencer, A. N. and Gallin, W. J. (1999) Genomic organization of a voltage-gated Na⁺ channel in a hydrozoan jellyfish: insights into the evolution of voltage-gated Na⁺ channel genes. *Receptors Channels*, 6: 493-506.
- Spector, I. (1981) Electrophysiology of clonal nerve cell lines. In: P. Nelson and M. Lieberman (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 247-274.
- Srinivasan, J., Schachner, M. and Catterall, W. A. (1998) Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 15753-15757
- Starace, D. M. and Bezanilla, F. (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, 427: 548-553.
- Starace, D. M., Stefani, E. and Bezanilla, F. (1997) Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, 19: 1319-1327.
- Stryer, L. (1996) *Biochemie* 4. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Stuart, G. (1999) Voltage-activated sodium channels amplify inhibition in neocortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, 2: 144-150.
- Stuart, G. and Sakmann, B. (1995) Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. *Neuron*, 15: 1065-1076.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H. and Numa, S. (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339: 597-603.
- Sun, Y. M., Favre, I., Schild, L. and Moczydlowski, E. (1997) On the structural basis for size-selective permeation of organic cations through the voltage-gated sodium channel. Effect of alanine mutations at the DEKA locus on selectivity, inhibition by Ca²⁺ and H⁺, and molecular sieving. *J Gen Physiol*, 110: 693-715.
- Surmeier, D. J. and Kitai, S. T. (1993) D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. *Prog Brain Res*, 99: 309-324.
- Swartz, K. J. and MacKinnon, R. (1997a) Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron*, 18: 665-673.
- Swartz, K. J. and MacKinnon, R. (1997b) Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels. *Neuron*, 18: 675-682.
- Takahashi, H., Kim, J. I., Min, H. J., Sato, K., Swartz, K. J. and Shimada, I. (2000) Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K(+) channels: common surface features of gating modifier toxins. *J Mol Biol*, 297: 771-780.
- Tagigawa, T. and Alzheimer, C. (1999) Variance analysis of current fluctuations of adenosine- and baclofen-activated GIRK channels in dissociated neocortical pyramidal cells. *J Neurophysiol*, 82: 1647-1650.
- Tang, L., Chehab, N., Wieland, S. J. and Kallen, R. G. (1998) Glutamine substitution at alanine1649 in the S4-S5 cytoplasmic loop of domain 4 removes the voltage sensitivity of fast inactivation in the human heart sodium channel. *J Gen Physiol*, 111: 639-652.
- Terlau, H., Heinemann, S. H., Stühmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K. and Numa, S. (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett*, 293: 93-96.
- Townsend, C. and Horn, R. (1999) Interaction between the pore and a fast gate of the cardiac sodium channel. *J Gen Physiol*, 113: 321-332.
- Townsend, C., Hartmann, H. A. and Horn, R. (1997) Anomalous effect of permeant ion concentration on peak open probability of cardiac Na⁺ channels. *J Gen Physiol*, 110: 11-21.
- Trapp, S., Proks, P., Tucker, S. J. and Ashcroft, F. M. (1998) Molecular analysis of ATP-sensitive K channel gating and implications for channel inhibition by ATP. *J Gen Physiol*, 112: 333-349.

- Tucker, S. J., Gribble, F. M., Proks, P., Trapp, S., Ryder, T. J., Haug, T., Reimann, F. and Ashcroft, F. M. (1998) Molecular determinants of KATP channel inhibition by ATP. *EMBO J*, 17: 3290-3296.
- Ulbricht, W. and Schmidtmyer, J. (1981) Modification of sodium channels in myelinated nerve by *Anemonia sulcata* toxin II. *J Physiol (Paris)*, 77: 1103-1111.
- Ulbricht, W., Wagner, H. H. and Schmidtmyer, J. (1986) Kinetics of TTX-STX block of sodium channels. *Ann N Y Acad Sci*, 479: 68-83.
- Vandenberg, C. A. and Bezanilla, F. (1991) A sodium channel gating model based on single channel, macroscopic ionic, and gating currents in the squid giant axon. *Biophys J*, 60: 1511-1533.
- Vassilev, P. M., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*, 241: 1658-1661.
- Vassilev, P., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (1989) Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 8147-8151.
- Venkataramanan, L., Kuc, R., Sigworth, F.J. (1998a) Identification of Hidden Markov Models for Ion Channel Currents—Part I: Colored Background Noise. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 46: 1901-1915.
- Venkataramanan, L., Kuc, R., Sigworth, F.J. (1998b) Identification of Hidden Markov Models for Ion Channel Currents—Part II: State-Dependent Excess Noise. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 46: 1916-1929.
- Venkataramanan, L., Kuc, R., Sigworth, F.J. (2000) Identification of Hidden Markov Models for Ion Channel Currents—Part III: Bandlimited, Sampled Data. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 48: 376-385.
- Vilin, Y. Y., Fujimoto, E. and Ruben, P. C. (2001) A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na⁺ channel slow inactivation. *Biophys J*, 80: 2221-2230.
- Wall, M. B. (1996) A Genetic Algorithm for Resource-Constrained Scheduling. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology.
- Wang, G. K. (1984) Irreversible modification of sodium channel inactivation in toad myelinated nerve fibres by the oxidant chloramine-T. *J Physiol*, 346: 127-141.
- Wang, G. K. and Wang, S. Y. (2002) Modifications of human cardiac sodium channel gating by UVA light. *J Membr Biol*, 189: 153-165.
- Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J. L., Moss, A. J., Towbin, J. A. and Keating, M. T. (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, 80: 805-811.
- Washburn, D. L., Anderson, J. W. and Ferguson, A. V. (2000) A subthreshold persistent sodium current mediates bursting in rat subfornical organ neurones. *J Physiol*, 529 Pt 2: 359-371.
- Weiss, D. S. and Magleby, K. L. (1989) Gating scheme for single GABA-activated Cl⁻ channels determined from stability plots, dwell-time distributions, and adjacent-interval durations. *J Neurosci*, 9: 1314-1324.
- West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L. and Catterall, W. A. (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 10910-10914.
- Wissmann, R., Bildl, W., Oliver, D., Beyermann, M., Kalbitzer, H. R., Bentsen, D. and Fakler, B. (2003) Solution structure and function of the "tandem inactivation domain" of the neuronal A-type potassium channel Kv1.4. *J Biol Chem*, 278: 16142-16150.
- Woelk, F. (2000) Signaldetektion bei verrauschten Markov-Prozessen. Diplomarbeit, Kiel.
- Xiao, J., Zhen, X. G. and Yang, J. (2003) Localization of PIP2 activation gate in inward rectifier K⁺ channels. *Nat Neurosci*, 6: 811-818.

- Xiao, Z. C., Ragsdale, D. S., Malhotra, J. D., Mattei, L. N., Braun, P. E., Schachner, M. and Isom, L. L. (1999) Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem*, 274: 26511-26517.
- Xie, L. H., John, S. A., Ribalet, B. and Weiss, J. N. (2004) Regulation of gating by negative charges in the cytoplasmic pore in the Kir2.1 channel. *J Physiol*, 561: 159-168.
- Yang, N., George AL, J. r. and Horn, R. (1996) Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 16: 113-122.
- Yellen, G. (1998) The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys*, 31: 239-295.
- Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T. Y. and 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.
- Yi, B. A., Lin, Y. F., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2001) Yeast screen for constitutively active mutant G protein-activated potassium channels. *Neuron*, 29: 657-667.
- Zhao, Y., Scheuer, T. and Catterall, W. A. (2004) Reversed voltage-dependent gating of a bacterial sodium channel with proline substitutions in the S6 transmembrane segment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 17873-17878.
- Zheng, J., Vankataramanan, L. and 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: 547-564.

Abkürzungen

2D-Fit	2-Dimensionaler-Dwell-Time-Fit
AMFE	Anomalous Mole Fraction Effect
APE	<i>Anthopleura elegantissima</i> Toxin
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ATCC	American Type Culture Collection
ATX	<i>Anemonia sulcata</i> Toxin
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalovirus
DAC	Digital-to-Analog Converter
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
E_{Na}	Gleichgewichtspotential für Natriumionen
FACS	Fluorescence Assisted Cell Sorting
FCS	Fetal-Calf-Serum
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
$G_{\beta\gamma}$	G-Protein $_{\beta\gamma}$
G418	Geneticin
HEK	Human Embryonic Kidney, HEK293: Nieren-Zelllinie des Menschen
HMM	Hidden Markov Modell
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I_{NaP}	persistierender Natriumstrom
LB	Luria Broth Base
LPS	Lipopolysaccharide
MEM	Modified Eagle Medium
N1E115	Neuroblastomzelllinie der Maus
Nav1.2a F1489Q	Mutante des Natriumkanal-Proteins 1.2a,
Nav1.2a	Natriumkanal-Protein-Alpha-Untereinheit 1.2
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PS	Penicillin / Streptomycin
RCK	Regulatory of Conductance for K^+
RNA	Ribonucleic Acid
rtPCR	reverse Transkriptase PCR
$SNR = I / \sigma$	Signal-Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio), mit I: Einzelkanalstrom und σ : Standardabweichung der Rauschverteilung
TBE	Tris-Borate-EDTA-Puffer
TEA	Tetraethylammoniumchloride
TMRM	Tetramethylrhodamine
ZBM	Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie (Universität Kiel)

Anhang

Anhang: Chemikalien, Enzyme und Kits, Primer

Substanz	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
1 kb DNA-Ladder	#G5711	Promega (Mannheim)
37% HCl	#100317	Merck (Darmstadt)
Agarose	#11380.03	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	#A0104	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Tetracyclin	#35866	Serva (Heidelberg)
Bacto™ Agar	#214010	Difco (Heidelberg)
Ethanol (absolut)	#510	Walter (Kiel)
Ethanol (vergällt)	#642	Walter (Kiel)
Ethidium Bromid	#E8751	Sigma (Taufkirchen)
Kanamycin	#k0126	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Luria Broth Base, Miller Medium	#241420	Difco (Heidelberg)
Natriumacetat	#6267	Merck (Darmstadt)
NaCl	#6400	Merck (Darmstadt)
KCl	#P9333	Sigma (Taufkirchen)
Na ₂ HPO ₄	#6559	Merck (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	#4877	Merck (Darmstadt)
GENETICIN® (G-418 Sulfate)	#11811-031	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin / Streptomycin	#2213	Biochrom (Berlin)
Trypsin-EDTA	#L2163	Biochrom (Berlin)
Trypsin-EDTA	#25200-056	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	#T4049	Sigma (Taufkirchen)
Minimum Essential Medium (MEM)	#41090-028	Invitrogen (Karlsruhe)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	#D2650	Sigma (Taufkirchen)
Trypan Blau	#15250-061	Invitrogen (Karlsruhe)
fötales Kälberserum - Charge 431B	#S0115	Biochrom (Berlin)
CO ₂ -4,5 37,5 kg	#0474	Messer (Krefeld)
Glycerin	#104092	Merck (Darmstadt)
TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	#106029	Merck (Darmstadt)
HEPES	#H3375	Sigma (Taufkirchen)
NaOH	#6498	Merck (Darmstadt)
CaCl ₂	#2382	Merck (Darmstadt)
MgCl ₂	#5833	Merck (Darmstadt)
D-Glucose	#G-7528	Sigma (Taufkirchen)
D-Saccharose	#7653	Merck (Darmstadt)
TEA-Chlorid	#T5634	Sigma (Taufkirchen)
ChloraminT	#C7080	Sigma (Taufkirchen)
Sigmatocote	#SI2	Sigma (Taufkirchen)
Sylgard	#184	Dow Corning (Midland)
Enzyme, Kits und DNA	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
Hind III	#R6041	Promega (Mannheim)

Cla I	#R6551	Promega (Mannheim)
Sac I	#R6065	Promega (Mannheim)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	#27104	Qiagen (Hilden)
Omniscript RT Kit	#20511	Qiagen (Hilden)
Rneasy Plant Mini Kit	#74904	Qiagen (Hilden)
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	#12262	Qiagen (Hilden)
Maxiprep Kit	#NA0300S	Sigma (Taufkirchen)
Superfect™	#301305	Qiagen (Hilden)
Metafectene™	#T020-0.2	Biontix (München)
Geneporter™2	#250207	Biozym (Hamburg)
One Shot Top10/P3 kompetente Zellen	#C505003	Invitrogen (Karlsruhe)
DH5alpha kompetente Zellen	#18263-012	Invitrogen (Karlsruhe)
Lambda DNA/Hind III Markers	#G1711	Promega (Mannheim)
1 kb DNA Ladder	#G5711	Promega (Mannheim)
PCR Master Mix	#M7505	Promega (Mannheim)
Nuclease-Free Water	#P1193	Promega (Mannheim)
Primer		MWG-Biotech (Ebersberg)
Primer – Sequenzierung		Sigma (Taufkirchen)
Sequenzierkit – Dyanamic ET-Kit	#US81090	Amersham (Braunschweig)

Anhang: Verbrauchsmaterialien

Gegenstände	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
Petrischale für Bakterien 100 mm	#82.1473.001	Sarstedt (Nümbrecht)
weitere Verbrauchsmaterialien: Pipettenspitzen, Reagiergefäße, PCR-Tubes,...		Sarstedt (Nümbrecht)
Lämpchen für CO ₂ -Sensor 28V	#32G658	Bürklin (Düsseldorf)
Gewebekulturplatten-96 Well	#83.1835	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturplatten-24 Well	#83.18356	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturplatten-6 Well	#83.1839	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten 10 ml	#86.1254.001	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten 10 ml	#9380135	Eydam (Kiel)
Serologische Pipetten 25 ml	#4251	Costar (Bodenheim)
250 ml Kulturflasche	#156499	Nunc (Wiesbaden)
50 ml Kulturflasche	#83.1810.002	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischale für Zellkultur 35 mm	#430165	Corning (Acton, USA)
96-Well-Platte half arrier für UV	#3679	Corning (Acton, USA)
sterile Filtrationsvorsätze 0,20 µm	#90491	Eydam (Kiel)
Filtrationsvorsätze 0,20 µm	#9049934	Eydam (Kiel)
sterile Tubes 50 ml	#62.547.254	Sarstedt (Nümbrecht)
sterile Tubes 15 ml	#62.554.001	Sarstedt (Nümbrecht)
Kryotubes	#72.694.005	Sarstedt (Nümbrecht)
Mira cloth	#475855	Calbiochem (Darmstadt)
Spritzenfilamente - Microfil 34AWG	#MF34G-5	World Precision Instruments

		(Sarasota, USA)
Borosilikatglas-Rohlinge	#1155150	Hilgenberg (Malsfeld)
Borosilikatglas-Rohlinge	#Kimax-51	Kimble (Sussex, England)

Anhang: Geräte

iCycler	BIO-RAD (München)
Elektrophoreseeinheit - PowerPac 300	BIO-RAD (München)
Gel Doc 2000™	BIO-RAD (München)
UV-Transilluminator 2000	BIO-RAD (München)
Biofuge fresco	Heraeus (Langenselbold)
Multifuge 3S-R	Heraeus (Langenselbold)
Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Inkubator (innova™ 4230)	New Brunswick (Nürtingen)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Vortex (REAX top)	Heidolph (Schwabach)
Inverses Mikroskop Axiovert 25 mit Phasenkontrast für Zellkultur	Zeiss (Jena)
Inverses Mikroskop CKX41 mit Hg-Lampe Fluoreszenzfilterset HQ-EGFP	Olympus (Hamburg) AHF Analysentechnik (Tübingen)
Inverses Mikroskop (DIAPHOT-TMD) mit Xenonbrenner CCD-Kamera, Imago-QE Fluoreszenzfilterset 500SPEC- C23341	Nikon (Düsseldorf) TILL-Photonics (Gräfelfing) AHF Analysentechnik (Tübingen)
CO ₂ -Brutschrank für Zellkultur	Tritec (nicht mehr im Handel)
3-Wege-Magnetventil - Z110A	Sirai (Steinhöring)
Drucksensor - CTE80016R0	Sensortechncis (Puchheim)
Neubauer Zählkammer (improved)	Assistent (Sondheim)
Microplate Reader (Photometer) - GENios	TECAN (Crailsheim)
Photometer - U2001	Hitachi (Cambridge, UK)
Pipettierhilfe - Pipetus standard	Eydam (Kiel)
Cleanbench - HeraSafe	Heraeus (Langenselbold)
Bunsenbrenner mit Fußschalter - flammyS	Schütt (Göttingen)
Autoklave	Webecke & Co (Bad Schwartau)
konfokales Mikroskop - LSM510	Zeiss (Jena)
Patch-Clamp-Verstärker - 3900A Whole-Cell-Expander - 3911A	Dagan (Minneapolis) Dagan (Minneapolis)
Schwingungsgedämpfter Tisch-Vibraplane 9101	Kinetic Systems (Boston, USA)
Hydraulischer Mikromanipulator - 188	Narishige (London, UK)
D/A-Karte - PCI-BASE 300	BMCM Messsysteme (Maisach)
A/D-Karte - Model 25	Dalanco Spry (Rochester, USA)
Klimaanlage - Pingoino eco	DeLonghi (Seligenstadt)
Oszilloskop - PM3215	Philips (Hamburg)

Pipettenpuller - L/M-3P-A	List-Medical (Heka, Lambrecht)
Pipettenpuller - PIP5	Heka (Lambrecht)
Kapillarsequenzierer - Megabace 1000	Amersham (Freiburg)
Tetradencycler - PTC-225	MJ-Research (Reno, USA)

Anhang: Gensequenz Nav1.2a

Basensequenz (6018 Basen) des rNav1.2a von 5' nach 3' (die Basen für das IFM Motiv sind rot markiert)

```

1  L L S N S A L Q K R K L R D P N R N A R T K T M K M A Q S Q
1  CTGCTATCGAACAGCGCATTGCAGAAAGAAAGCTAAGAGACCCAAACAGGAACGCAAGGACGAAAGACGATGAAAAATGGCCCAAAGCCAA

31  I V T W K Q E N P F L L F M E T F L Q R W C Q N H W R T W T
91  ATAGTGACTTGAAGCAGGAAAAATCCCTTCCTTTTATTATGGAGACATTCCAGAGATGGTGTGCAAGCACTGGAGGACCTGGACC

61  P T I S I R K P L - Y - I R G K Q S R G S A P P L P C T F -
181 CCTACTATATCAATAAGAAAAACCTTTATAGTATTGAATAAGGGGAAAGCAATCTCGCGGTTACGCGCCACCTCGCCTGTACATTTTAA

91  L P S T P L E N - L L R F W Y I L Y S M C L S C A Q F L P T
271 CTCCCTCAACCCCATAGAAAAATTAGCTATTAAGATTTTGGTACATCTTTATTCAATGTGCTTATCATGTGCACAATTCTTACCAACT

121 V C L - P - V T L Q T G Q R M W S I L L Q E F I L L N H L L
361 GTGTGTTTATGACCATGAGTAACCCCTCCAGACTGGACAAAGAATGTGGAGTATACCTTTACAGGAATTTATACTTTTGAATCACTTATTA

151 K S L Q G A F M A R S V L V P P G P D S F R F F T R E S L G
451 AAATCCTTGCAAGGGGCTTTTATGGCACGGTCAGTGCTGGTACCTCCAGGACCTGACAGCTTCCGCTTCTTTACCAGGGAATCCCTTGGT

181 L E D F T F L R D P W N W L D F T V I T F A Y V T E F V D L
541 CTAGAAGATTCACATTTCTACGGGATCCCTGGAATTTGGTGGATTTACAGTCACTACTTTTGCATATGTGACAGAGTTTGTGGACCTG

211 G N V S A L R T F R V L R A L K T I S V I P G L K T I V G A
631 GGCAATGTCTCAGCGCTGAGAACGTTTCCAGAGTTCTCCGAGCATGAAAACAATATCAGTCATTCCAGGCTGAAGACCATCGTGGGGGCG

241 L I Q S V K K L S D V M I L T V F C L S V F A L I G L Q L F
721 CTGATCCAGTCAGTGAAGAAGCTCTCTGACGTCATGATCCTCACCGTGTCTGTCTCAGTGTCTTTGTCTAATCGGGCTGCAGCTCTTC

271 M G N L R N K C L Q W P P D N S T F E I N I T S F F N N S L
811 ATGGGCAACCTGAGGAATAAATGCTTGCAGTGGCCCCAGACAATTTACCTTTGAAATAAATATCACTTCTCTTTAATAACTCATTG

301 D W N G T A F N R T V N M F N W D E Y I E D K S H F Y F L E
901 GATTGGAATGTACTGCCTTCAATAGGACGGTGAACATGTTAACTGGGACGAATATATTGAAGATAAAAAGTCACTTTTATTTTTTGGAA

331 G Q N D A L L C G N S S D A G Q C P E G Y I C V K A G R N P
991 GGACAAAACGATGCTCTGCTTTGTGGAACAGCTCGGATGCTGGACAGTGTCCAGAAGGATACATCTGTGTGAAGGCTGGGAGAAACCCC

361 N Y G Y T S F D T F S W A F L S L F R L M T Q D F W E N L Y
1081 AACTACGGCTACACAAGTTTGTACACCTTCCAGCTGGGCTTCTTGTCTTATTTTCGTCTCATGACTCAAGACTTCTGGGAAAACCTTTAT

391 Q L T L R A A G K T Y M I F F V L V I F L G S F Y L I N L I
1171 CAGCTGACCTTGGTGTCTGCCGGGAAAAACATACATGATATTTTTTGTGTCTGGTCACTTTTCTGGGCTCATTCTACCTGATAAATTTGATC

421 L A V V A M A Y E E Q N Q A T L E E A E Q K E A E F Q Q M L
1261 CTGGCTGTGGTGGCCATGGCCTACGAGGAACAGAACAGGCCACACTGGAGGAGGCTGAACAGAAGGAGGCAGAGTTTACAGAGATGCTG

451 E Q L K K Q Q E E A Q A A A A A A S A E S R D F S G A G G I
1351 GAGCAACTGAAGAAGCAGCAGGAGGAAGCTCAGGCAGCAGCTGCGAGCGTCCGAGAATCCAGAGACTTACGCGGGCAGGCGGGATA

481 G V F S E S S S V A S K L S S K S E K E L K N R R K K K K Q
1441 GGTGTTTTCTCGGAGAGTTCTGTCAGTAGCCTCAAAGTTAAGTTCCAAAAGTGAAGGAGTTGAAAAACAGAGAAGAAAAGAAACAG

511 K E Q A G E E E K E D A V R K S A S E D S I R K K K G F R F S
1531 AAAGAACAGGCTGGGAGGAAGAGAAGGAAGACGCGGTGCGGAAATCTGCCTCTGAGGACAGCATAACGAAAGAAAGGCTTCCGGTTTTCC

541 L E G S R L T Y E K R F S S P H Q S L L S I R G S L F S P R
1621 CTGGAAGGAAGTAGATTGACCTACGAGAAGAGATTTCTCTCCGCACCAGTCTCTCTTGAGCATCCGAGGCTCCCTATTTTCTCCAAGA

571 R N S R A S L F S F K G R V K D I G S E N D F A D D E H S T
1711 CGCAACAGTAGAGCAAGCCTTTTTCAGCTTCAAAGGTCGAGTGAAGGATATTGGTTCCGAAAATGACTTTCAGACGATGAACACAGCACA

601 F E D N D S R R D S L F V P H R H G E R R P S N V S Q A S R

```

1801 TTTGAGGACAACGACAGCAGAAGAGACTCTCTATTTGTACCACACAGACATGGAGAAAGCGTCTTAGCAATGTCCAGCCAGGCCAGCCGT
631 A S R G I P T L P M N G K M H S A V D C N G V V S L V G G P
1891 GCCTCCCGGGGATAACCCACTTACCCATGAATGGGAAGATGCACAGTGCAGTGGACTGCAACGGTGTGGTGTCCCTGGTTGGAGGCCCC

661 S A L T S P V G Q L L P E G T T T E T E I R K R R S S S Y H
1981 TCTGCCTCACATCGCCTGTGGGGCAGCTGTGCCGGAGGGCACAACACTAGAGACAGAAATAAGGAAGAGGAGATCCAGTTCTTACCAC

691 V S M D L L E D P S R Q R A M S M A S I L T N T M E E L E E
2071 GTCTCTATGGACTTGTGGAAGACCCCTCAAGGCCAAAGGGCAATGAGTATGGCCAGTATTTTGACGAACACTATGGAAGAACTTGAAGAA

721 S R Q K C P P C W Y K F A N M C L I W D C C K P W L K V K H
2161 TCCAGACAGAAATGCCACCCTGCTGGTATAAAATTTGCTAATATGTGCCTGATTTGGGACTGTGTAAGCCATGGCTAAAGGTAACAC

751 V V N L V V M D P F V D L A I T I C I V L N T L F M A M E H
2251 GTTGTCAATCTGGTAGTGTGGATCCATTTGTTGACCTGGCCATCACCATCTGCATTGTGTTAAATACGCTCTTCATGGCCATGGAGCAC

781 Y P M T E Q F S S V L S V G N L V F T G I F T A E M F L K I
2341 TACCCATGACTGAGCAGTTCAGCAGTGTGTCTGTGTTGGAAATTTGGTCTTACTGGGATCTTCACGGCAGAAATGTTTCTCAAGATA

811 I A M D P Y Y Y F Q E G W N I F D G F I V S L S L M E L G L
2431 ATAGCCATGGATCCATATATTACTTCCAAGAAGCTGGAATATCTTTGATGGCTTTATAGTGAGCCTTAGTTAATGGAAGCTCGGCTTG

841 A N V E G L S V L R S F R L L R V F K L A K S W P T L N M L
2521 GCGAATGTGGAAGGATTGTCAAGTCTCCGATCATTCCGGCTGTTAGAGTCTTCAAGTTGGCAAAGTCTGGCCCACACTGAACATGCTC

871 I K I I G N S V G A L G N L T L V L A I I V F I F A V V G M
2611 ATTAAGATCATCGGCAACTCGGTGGGTGCACTGGGCAACCTGACCCTGGTGTGGCCATCATCGTCTTCATTTTGGTGTGGTCCGCATG

901 Q L F G K S Y K E C V C K I S N D C E L P R W H M H H F F H
2701 CAGCTGTTTGGAAAGAGCTACAAGGAGTGTGTCTGTAAGATTTCCAATGATTGTGAGCTCCCGCGTGGCAGATGCACCACTTCTTCCAC

931 S F L I V F R V L C G E W I E T M W D C M E V A G Q T M C L
2791 TCCTTCTGATCGTGTTCGAGTGTGTGGGGAGTGGATAGAGACCATGTGGGACTGCATGGAGGTCGCGGGCCAGACCATGTGCCTT

961 T V F M M V M V I G N L V V L N L F L A L L L S S F S S D N
2881 ACTGTCTTCATGATGGTGTGATGGGAACCTTGTGTCTGAACTCTTCTTGGCCTTGCTCCTCAGTCTTTCAGCTCAGACAAAC

991 L A A T D D D N E M N N L Q I A V G R M Q K G I D F V K R K
2971 CTGGCTGCCACAGATGACGATAACGAAATGAACAACCTCCAGATAGCCGTGGGAAGGATGCAGAAGGAAATGATTTGTTAAAAGGAAAG

1021 I R E F I Q K A F V R K Q K A L D E I K P L E D L N N K K D
3061 ATACGTGAATTCATTAGAAAGCCTTTGTGCAAGAGCAGAAAGCTTTAGATGAAATCAAACCGCTGGAAGATCTGAATAACAAGAAAGAC

1051 S C I S N H T T I E I D K D L N Y L K D G N G T T S G I G S
3151 AGTTGTATCTCCAACCACAGCCATAGAAATAGACAAGGACCTCAATTACCTCAAAGATGGAAACGGGACGACCAAGTGGCATAGGCAGC

1081 S V E K Y V V D E S D Y M S F I N N P S L T V T V P I A L G
3241 AGTGTGGAGAAGTATGTGGTAGATGAGAGTATTACATGTCGTTCAAAAACCCAGCCTCACCGTACTGTGCCCATCGCCCTTGGAA

1111 E S D F E N L N T E E F S S E S D M E E S K E K L N A T S S
3331 GAGTCTGACTTTGAAACTTAAACACGGAAGAATTCAGTAGTGTGATGATGATGAAAGAAAGCAAGGAGAAATGAAATGCAACTAGCTCA

1141 S E G S T V D I G A P A E G E Q P E A E P E E S L E P E A C
3421 TCTGAGGGCAGTACGGTTGATATAGGCGCTCCGGCAGAGGGAGAGCAGCCAGAGGCCAAACCGGAAGAATCGCTTGAACCAGAAAGCGTGT

1171 F T E D C V R K F K C C Q I S I E E G K G K L W W N L R K T
3511 TTCACAGAAGACTGTGTGAGAAAGTTCAAGTGTGTGATAGATAAGCATAGAAGAGGGCAAAGGCAAGCTCTGGTGGAACTTGAGGAAAACG

1201 C Y K I V E H N W F E T F I V F M I L L S S G A L A F E D I
3601 TGCTACAAGATAGTAGAGCATAACTGGTTTGAACCTTTCATCGTCTTATGATTTGCTCAGCAGTGGTGTCTGGCCTTGAAGACATT

1231 Y I E Q R K T I K T M L E Y A D K V F T Y I F I L E M L L K
3691 TATATTGAGCAGCGAAAGACCATCAAGACCATGCTGGAGTATGCTGACAAGGTTTCACTTATATCTTCATCCTGGAGATGCTTCTAAAG

1261 W V A Y G F Q M Y F T N A W C W L D F L I V D V S L V S L T
3781 TGGGTGGCCTATGGTTTCCAATGTATTTCAACCAATGCCTGGTGTGGTGGACTTCTGATCGTTGATGTCTCCTGGTTAGCTTAACT

1291 A N A L G Y S E L G A I K S L R T L R A L R P L R A L S R F
3871 GCAAATGCCTTGGCTATTCCGAACTTGGTGCCATCAAGTCCCTCCGAACGTTAAGAGCTCTGAGACCTTACGAGCCTTATCCCGATT

1321 E G M R V V V N A L L G A I P S I M N V L L V C L I F W L I
3961 GAAGGAATGAGGGTGTGTTGTAACGCTCTCTTAGCGCCATCCCTCCATAATGAACGTAAGTCTGGTGTGCTGATCTTTGGCTAATA

1351 F S I M G L N L F A G K F Y H C I N Y T T G E M F D V S V V
4051 TTCAGTATCATGGGGTGAATCTCTTTGCTGGCAAGTCTTACCATTGCATCAACTACACCACGGGGAAATGTTTGTGATGTGAGCGTGGTCT

1381 N N Y S E C Q A L I E S N Q T A R W K N V K V N F D N V G L

4141 AACAACTACAGTGAATGCCAAGCTCTCATTGAGAGCAATCAGACGGCCAGGTGGAAGAACGTGAAGGTCAACTTCGATAACGTGGGACTC
1411 G Y L S L L Q V A T F K G W M D I M Y A A V D S R N V E L Q
4231 GGATACCTTTCTCTGCTCCAAGTAGCCACCTTTAAAGGATGGATGGATATCATGTATGCAGCTGTTGACTCAAGAAATGTAGAAGTGCAG
1441 P K Y E D N L Y M Y L Y F V I F I I F G S F F T L N L F I G
4321 CCCAAATACGAAGACAATCTCTACATGTACCTTTACTTTGTCTATCTTCATCATCTTCGGCTCATCTTCACCTGAACCTGTTTCATTGGT
1471 V I I D N F N Q Q K K K F G G Q D I F M T E E Q K K Y Y N A
4411 GTCATCATAGACAACCTTCAACCAGCAGAAGAAGTGGAGGTCAAGACATCTTTATGACAGAAGAACAGAAGAAATACTACAATGCA
1501 M K K L G S K K P Q K P I P R P A N K F Q G M V F D F V T K
4501 ATGAAGAAGCTCGGCTCCAAGAAACCGCAGAACCCATTCTCGCCTGCAAACAATTTCAAGGGATGGTCTTTGATTTTGTAAACAAA
1531 Q V F D I S I M I L I C L N M V T M M V E T D D Q S Q E M T
4591 CAAGTCTTTGACATCAGCATCATGATCCTCATCTGCCTCAACATGGTGACCATGATGGTGGAACAGACGACCAGAGTCAAGAGATGACC
1561 N I L Y W I N L V F I V L F T G E C V L K L I S L R H Y Y F
4681 AACATCTGTACTGGATCAACCTGGTGTTCATTGTCTGTTCACGGGCGAGTGTGTGCTGAAGCTCATCTCCCTCCGCATTATTATTTTC
1591 T I G W N I F D F V V V I L S I V G M F L A E L I E K Y F V
4771 ACCATCGGCTGGAATATTTTGTATTTTGTGGTAGTCATCTCTCCATGTAGGAATGTTTCTCGCGGAGCTGATAGAGAAGTATTTCTGTC
1621 S P T L F R V I R L A R I G R I L R L I K G A K G I R T L L
4861 TCCCTACCTGTTCCGAGTCATCCGCCTGGCCAGGATTGGACGAATCTACGCCTGATCAAAGCGCCAAGGGATCCGCACTCTGCTC
1651 F A L M M S L P A L F N I G L L L F L V M F I Y A I F G M S
4951 TTTGCTCTGATGATGTCCTTCTGCGCTGTTCAACATCGGCCTCTGCTTTTCTGGTCATGTTTCATCTACGCCATCTTTGGGATGTC
1681 N F A Y V K R E V G I D D M F N F E T F G N S M I C L F Q I
5041 AACTTTGCCTACGTTAAGAGGGAAGTTGGAATTGATGACATGTTCAACTTTGAGACTTTTGGCAACAGCATGATCTGCCTGTTCCAAATC
1711 T T S A G W D G L L A P I L N S G P P D C D P E K D H P G S
5131 ACCACCTCTGCGGGTGGGACGGACTGCTGGCCCCATACTAAATAGCGGACCTCCGACTGTGACCTGAAAAAGATCACCTGGAAGC
1741 S V K G D C G N P S V G I F F F V S Y I I I S F L V V V N M
5221 TCGGTGAAGGGGACTGTGGGAACCCATCCGTGGGGATTTCTTTTTTGTGCTAGCTACATCATATATCTTCTGTTGGTGGTGAACATG
1771 Y I A V I L E N F S V A T E E S A E P L S E D D F E M F Y E
5311 TACATCGCTGTCATCTGGAGAACTTCAGCGTCGCCACCGAAGAAAGTGCAGAGCCCTGAGTGAGGACGACTTTGAGATGTTCTACGAG
1801 V W E K F D P D A T Q F I E F C K L S D F A A A L D P P L L
5401 GTCTGGGAGAAGTTGACCCCTGACGCCACTCAGTTCATAGAGTCTGCAAGCTTTCTGACTTTGACAGTGCCTGGATCTCCCTCTCTC
1831 I A K P N K V Q L I A M D L P M V S G D R I H C L D I L F A
5491 ATCGCAAAGCCAAACAAAGTCCAGCTCATTGCCATGGACCTGCCATGGTGTGAGTGAGACCGCATCCACTGCCTGGACATCTTGTGTTGCT
1861 F T K R V L G E S G E M D A L R I Q M E E R F M A S N P S K
5581 TTTACAAAGCGGGTCTGGGCGAGAGTGGAGAGATGGACGCTCTTGAATCCAGATGGAAGAAAGGTTTCATGGCTTCCAACCCCTCCAAG
1891 V S Y E P I T T T L K R K Q E E V S A I V I Q R A Y R R Y L
5671 GTCTCTTATGAGCCATTACCACCACCTGAAACGGAAACAAGAGGAGGTGTCTGCTATTGTCTATCCAGCGAGCATACAGGCGGTATCTC
1921 L K Q K V K K V S S I Y K K D K G K E D E G T P I K E D I I
5761 CTGAAGCAGAAAGTTAAGAAAGTTTCGTCTATCTATAAAAAAGACAAAGGTAAGAAGACGAGGGAACGCCATCAAAGAAGACATCATC
1951 T D K L N E N S T P E K T D V T P S T T S P P S Y D S V T K
5851 ACAGATAAATGAACGAGAATTCAACTCCAGAGAAGACTGATGTGACACCTTCCACAACCTTCCACCTTCTACGATAGCGTGACGAAA
1981 P E K E K F E K D K S E K E D K G K D I R E S K K -
5941 CCGGAGAAGGAAAAATTTGAAAAGGCAAAATCAGAAAAAGAGGACAAAGGGAAAGATATCAGGGAAAGTAAAAAGTAA

Anhang: Programmcode des Zufallsgenerators

Der KISS-Generator ist folgendermaßen in C definiert:

```
#define znew ((randz=36969*(randz&65535)+(randz>>16))<<16)
#define wnew ((randw=18000*(randw&65535)+(randw>>16))&65535)
#define MWC (znew+wnew)
#define SHR3 (jsr=(jsr=(jsr=jsr^(jsr<<17))^(jsr>>13))^(jsr<<5))
#define CONG (jcong=69069*jcong+1234567)
#define KISS ((MWC^CONG)+SHR3)
```

mit der Initialisierung über die Systemzeit:

```
long int nu = 0;
srand(time(&nu));
randz      = 362436069 * rand()%20000;
randw      = 521288629 * rand()%20000;
jsr        = 123456789 * rand()%20000;
jcong      = 380116160 * rand()%20000;
```

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

- meinem Doktorvater Ulf-Peter Hansen für seine Inspiration und die kontinuierliche fachliche und organisatorische Präsenz. Huth ab!

- meiner Frau Sieke für ... das wissen wir beide schon

- unserer TA Steffi für ihre unermüdliche freundschaftliche Hilfe und Zuwendung!

Mein herzlicher Dank gilt auch

- Johann Schmidtmayer für die Idee zu dieser Arbeit und die freundliche Betreuung.

- Christian Alzheimer für seine großzügige Unterstützung, seine Hilfestellungen und ein neues "Zuhause".

Außerdem danke ich

- Christoph Plieth für die Einführung in die Molekularbiologie.

- Andra Schromm für die Transfektionsmethoden.

- Heidrun Liebegang für die Hilfen beim Aufbau der Zellkultur.

- L. Béress für die großzügige Bereitstellung der Seeanemonentoxine.

- Horst Schlüter für den Bau des Druckumschalters.

- Werner Ulbricht für die umfangreichen Hilfen bei der noch umfangreicheren Literatur zum Natriumkanal.

- W. Catterall für die Natriumkanalvektoren.

- Indra für die spielerische Zusammenarbeit in den letzten Jahren :)

- Afshin, Alex, Angelika, Anne, Birte, Christoph, Didier, Elke, Enno, Fang, Harald, Inken, Karoline, Markus, Mitsuru, Maïke, Nina, Ogün, Philipp & Phillip und Sabine für eine Umgebung zum Wohlfühlen und die Bewältigung der alltäglichen kleinen und großen Hürden.

- meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre moralische und kulinarische Unterstützung, besonders meiner Mutter für das Korrekturlesen der Arbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Ausarbeitung hat noch keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Ergebnisse dieser Arbeit sind zum Teil bereits veröffentlicht worden.

Kiel, den

(Tobias Huth)