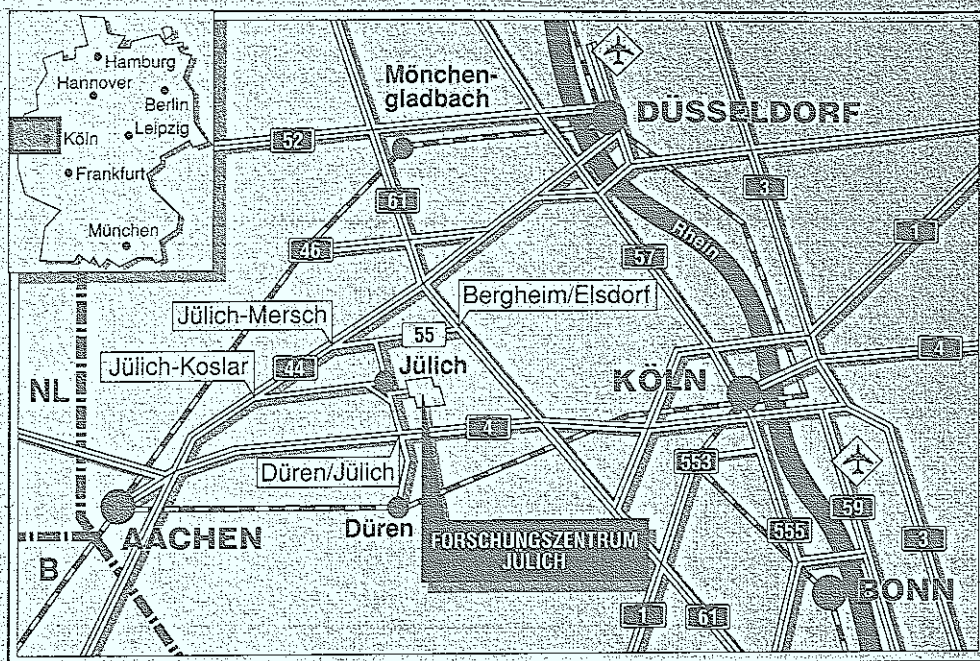


Institut für Biologische Informationsverarbeitung

**Aktivierung heterolog exprimierter
 α -Untereinheiten zyklisch-Nukleotid
gesteuerter Ionenkanäle durch
Agonisten**

Wolfram Altenhofen



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2916

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jüli-2916

D 21 (Diss. Universität Tübingen)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon : 024 61 / 61 - 61 02 · Telefax : 024 61 / 61 - 61 03 · Telex : 833 556-70 kfa d

Aktivierung heterolog exprimierter α -Untereinheiten zyklisch-Nukleotid gesteuerter Ionenkanäle durch Agonisten

Wolfram Altenhofen

"If all the enzymes found within cells were working at top speed, the result would be chaos, and many mechanisms have evolved that control the speed at which these enzymes function."

Ira Pastan

"Die wahre Logik dieser Welt liegt in der Wahrscheinlichkeitsrechnung"

James Clerk Maxwell

4. The fourth part of the document discusses the implications of the findings. It highlights the potential applications of the research in various fields and the need for further investigation.

5. The fifth part of the document provides a conclusion and summarizes the key points of the study. It also includes a list of references and a bibliography of the sources used.

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	11
2 Zielsetzung.....	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Das Xenopus-Oozyten Expressionssystem.....	17
3.2 Tierhaltung.....	20
3.3 Die Entnahme von Oozyten.....	24
3.4 Elektrophysiologische Methoden.....	28
3.5 Durchführung der Messungen.....	35
3.6 Entwicklung von Meß- und Auswertesoftware	37
3.7 Einzelkanalmessungen	40
3.8 Verwendete Lösungen.....	43
3.9 Strukturvorhersage und Modeling	44
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Expression der Wildtypkanäle.....	49
4.2 Blockade der CNG-Kanäle aus dem Rind durch l-cis-Diltiazem und Amilorid.....	60
4.3 Ionenselektivität der Wildtypkanäle.....	62
4.4 Ligandenselektivität der CNG-Kanäle des Rinds.....	69
4.5 Der Unterschied der absoluten Ligandempfindlichkeit von ROD und OLF für cGMP.....	75
4.6 Variabilität der CNG-Kanalantworten von Patch zu Patch	90
4.7 Zeitabhängige Veränderung der CNG-Kanalantworten eines Patches.....	97
4.8 Effekt von NEM auf die Kooperativität	110
4.9 Einzelkanaldaten	112
4.10 Sekundärstrukturvorhersage für CNG-Kanäle.....	127
5 Diskussion.....	141
6 Summary.....	158
Literaturverzeichnis.....	163
Anhang A: Bestimmung der makroskopischen Aktivierungsparameter nach der Hill-Gleichung.....	191
Anhang B: Molekularbiologie	201
Anhang C: Zusammenfassung der Ergebnisse aus makroskopischen Messungen	210
Anhang D: Farbtafeln.....	264

1944-1945

1946-1947

1948-1949

1950-1951

1952-1953

1954-1955

1956-1957

1958-1959

1960-1961

1962-1963

1964-1965

1966-1967

1968-1969

1970-1971

1972-1973

1974-1975

1976-1977

1978-1979

1980-1981

1982-1983

1984-1985

1986-1987

1988-1989

1990-1991

1992-1993

1994-1995

1996-1997

1998-1999

2000-2001

2002-2003

2004-2005

2006-2007

2008-2009

2010-2011

2012-2013

2014-2015

2016-2017

2018-2019

2020-2021

2022-2023

2024-2025

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Hypothetisches Modell einer CNG-Kanal α -Untereinheit	14
Abb. 3.1	Schematische Darstellung eines Voltage-Clamp Verstärkers.....	29
Abb. 3.2	Membrankonfigurationen der Patch-Clamp Technik	30
Abb. 3.3	Schematische Skizze des Patch-Clamp Meßstandes	31
Abb. 3.4	Schematischer Schaltplan des Patch-Clamp Meßstandes.....	32
Abb. 3.5	Manipulator zur Steuerung der Perfusionsspipette	33
Abb. 3.6	Messung von I/V-Kurven.....	38
Abb. 3.7	On-Line Kontrolle der laufenden Messungen.....	39
Abb. 3.8	Analyse einer amphipathischen β -Faltblattstruktur mit dem Programm POWER	46
Abb. 4.1	I/V-Kurven von ROD und OLF in Gegenwart von cGMP	49
Abb. 4.2	Dosis-Wirkungskurve des ROD für cGMP bzw. cAMP.....	50
Abb. 4.3	Aktivierungseigenschaften von ROD und OLF in Gegenwart von cGMP	51
Abb. 4.4	Aktivierungseigenschaften von ROD und OLF in Gegenwart von cAMP	52
Abb. 4.5	Unterschied der Aktivierbarkeit des ROD durch cGMP bzw. cAMP.....	53
Abb. 4.6	I/V-Kurven von ChCone und ChRod in Gegenwart von cGMP	54
Abb. 4.7	Aktivierungseigenschaften von ChCone und ChRod	55
Abb. 4.8	I/V-Kurven von Herz153 in Gegenwart von cGMP bzw. cAMP.....	56
Abb. 4.9	I/V-Kurven von Herz357 in Gegenwart von cGMP bzw. cAMP.....	57
Abb. 4.10	Aktivierungseigenschaften von Herz153 und Herz357 (cGMP).....	57
Abb. 4.11	Aktivierungseigenschaften von Herz153 und Herz357 (cAMP).....	58
Abb. 4.12	Blockade des ROD durch l-cis-Diltiazem	60
Abb. 4.13	Blockade von ROD und OLF durch Amilorid.....	61
Abb. 4.14	Spannungsabhängigkeit der Blockade durch Amilorid	61
Abb. 4.15	Ionenselektivität von ROD bzw. OLF	63
Abb. 4.16	Ionenselektivität von ChCone bzw. Herz153	63
Abb. 4.17	Aktivierungseigenschaften des ROD in Gegenwart unterschiedlicher Kalium- Konzentrationen	65
Abb. 4.18	Aktivierungseigenschaften des OLF in Gegenwart unterschiedlicher Kalium- Konzentrationen	65
Abb. 4.19	Aktivierungseigenschaften des ROD in Gegenwart unterschiedlicher Lithium- Konzentrationen	66
Abb. 4.20	Aktivierungseigenschaften des OLF in Gegenwart unterschiedlicher Lithium- Konzentrationen	67
Abb. 4.21	Effekt unterschiedlicher Ionensorten auf die Aktivierungseigenschaften des ROD.....	68

Abb. 4.22	Modell der Wechselwirkungen zwischen Ligand und Bindestelle in CNG-Kanälen.....	70
Abb. 4.23	Aktivierungskonstanten der Bindestellenmutanten des ROD bzw. des OLF	71
Abb. 4.24	Aktivierungseigenschaften der T560A bzw. T560S Mutanten (cGMP)	73
Abb. 4.25	Aktivierungseigenschaften der T537A bzw. T537S Mutanten (cGMP)	73
Abb. 4.26	Aktivierungseigenschaften der T560A bzw. T560S Mutanten (cAMP)	74
Abb. 4.27	Aktivierungseigenschaften der T537A bzw. T537S Mutanten (cAMP)	74
Abb. 4.28	Schematischer Konstruktionsplan der Kanalchimären	76
Abb. 4.29	Aktivierungseigenschaften von R6O bzw. O6R	77
Abb. 4.30	Aktivierungseigenschaften von R5O bzw. O5R	78
Abb. 4.31	Aktivierungseigenschaften von R5O6R bzw. O5R6O	79
Abb. 4.32	Aktivierungseigenschaften von D1O bzw. D1R	80
Abb. 4.33	Aktivierungseigenschaften von R1O bzw. O1R	81
Abb. 4.34	Aktivierungseigenschaften von DRod bzw. R23O	82
Abb. 4.35	Aktivierungseigenschaften von R1O6R bzw. O1R6O	83
Abb. 4.36	Vergleich der Aktivierungseigenschaften von O1R6O und OLF in Gegenwart unterschiedlicher Kalium-Konzentrationen	84
Abb. 4.37	Aktivierungseigenschaften von R23O4R bzw. O23R4O	85
Abb. 4.38	Aktivierungseigenschaften von D1 bzw. MRODO1	87
Abb. 4.39	Ionenselektivität des O1R6O	89
Abb. 4.40	Variabilität der Kanaleigenschaften von Patch zu Patch	90
Abb. 4.41	Variabilität der Gleichrichtungseigenschaften des ROD von Patch zu Patch....	91
Abb. 4.42	Inaktivierung des ROD	92
Abb. 4.43	Inaktivierung des ROD	93
Abb. 4.44	Dosis-Wirkungskurven in Gegenwart steigender bzw. sinkender Ligandkonzentration	95
Abb. 4.45	Zeitliche Veränderung der Aktivierungseigenschaften des ROD.....	97
Abb. 4.46	Zeitliche Veränderung der Gleichrichtungseigenschaften des ROD	98
Abb. 4.47	Zeitliche Veränderung der Stromamplitude des ROD	100
Abb. 4.48	Zeitliche Veränderung von Hill-Koeffizient und Aktivierungskonstante des ROD.....	101
Abb. 4.49	Zeitliche Veränderung der Aktivierungseigenschaften des OLF	102
Abb. 4.50	Zeitliche Veränderung der Hill-Koeffizienten und der K_a/V -Kurven von ROD und OLF	103
Abb. 4.51	Zeitliche Veränderung der Stromamplitude des OLF	104
Abb. 4.52	Zeitliche Veränderung von Hill-Koeffizient und Aktivierungskonstante des OLF.....	105

Abb. 4.53	Zeitliche Veränderung des Hill-Koeffizienten bei Kanälen der OLF-Gruppe in Gegenwart von cGMP bzw. cAMP	106
Abb. 4.54	Zeitliche Veränderung der Aktivierungskonstanten bei Kanälen der OLF-Gruppe in Gegenwart von cGMP bzw. cAMP	107
Abb. 4.55	Aktivierungseigenschaften der C573S Mutante des ROD	110
Abb. 4.56	Einfluß von NEM auf den Hill-Koeffizienten des ROD und der C537S Mutante.....	111
Abb. 4.57	Einzelkanalspur des OLF bei +80 mV	113
Abb. 4.58	Amplitudenhistogramm einer Einzelkanalspur des OLF bei +80 mV	114
Abb. 4.59	Einzelkanalspur des OLF bei -80 mV	114
Abb. 4.60	Verteilung der Geschlossenzeiten einer Einzelkanalspur des OLF bei -80 mV.....	115
Abb. 4.61	Verteilung der Geschlossenzeiten einer Einzelkanalspur des OLF bei -80 mV.....	115
Abb. 4.62	i/V-Kurve des OLF	116
Abb. 4.63	i/V-Kurve des O23R4O	117
Abb. 4.64	i/V-Kurve des mechanosensitiven Kanals aus Oozyten	117
Abb. 4.65	i/V-Kurve des O5R.....	118
Abb. 4.66	I/V- und i/V-Kurven des O6R.....	119
Abb. 4.67	Normierte i/V-Kurve des O6R, O5R, O23R4O, OLF (cGMP), R1O6R (cAMP)	121
Abb. 4.68	Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix einer Einzelkanalspur des OLF 1 Minute nach Abziehen des Patches	123
Abb. 4.69	Amplitudenhistogramm der Datenspur aus Abb. 4.68.....	124
Abb. 4.70	Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix einer Einzelkanalspur des OLF 13 Minuten nach Abziehen des Patches	125
Abb. 4.71	Amplitudenhistogramm der Datenspur aus Abb. 4.70	125
Abb. 4.72	Strukturelle und funktionelle Verwandtschaft der CNG-Kanäle zu anderen Kanalfamilien	127
Abb. 4.73	Bipolar amphipathische Analyse	129
Abb. 4.74	α -helikaler Charakter und bipolar amphipathische Sekundärstrukturvorhersage der Sequenzen von ROD und OLF	137
Abb. A1	Bedeutung des Hill-Koeffizienten.....	192
Abb. A2	Berechnung der Aktivierungsparameter aus I/V-Kurven.....	193
Abb. A3	Dosis-Wirkungskurve in der Darstellung des Hill-Plots	194
Abb. A4	Fehlerabschätzung beim Fitalgorithmus	195
Abb. A5	Doppelt logarithmische Darstellung von Dosis-Wirkungskurven.....	195
Abb. A6	Ausgewertete Parameter der gefitteten Daten.....	196

Abb. A7	χ^2 -Abweichungen eines Fit-Beispiels.....	199
Abb. A8	Minimierung der χ^2 -Abweichungen von n und K_a	199
Abb. B1	Sequenzalignment der Wildtypkanäle	206
Abb. C1-C49	Übersicht und Statistik der Originaldaten	215-263
	(Abbildungsverzeichnis der Abb. C1-C49 vgl. S. 215ff.)	
Abb. D1	Narkotisierter <i>Xenopus</i> während der Operation	268
Abb. D2	Oozyten im Ovargewebe	268
Abb. D3	Oocyte umgeben von Follikelzellen	269
Abb. D4	Patchpipette mit Oocyte	269
Abb. D5	Meßstand	270
Abb. D6	Meßkammer	270
Abb. D7	Perfusionskapillaren mit Patchpipette	271
Abb. D8	Computermodeil des cGMP-Moleküls in <i>anti</i> -Konformation	272
Abb. D9	Computermodeil des cGMP-Moleküls in <i>syn</i> -Konformation	272
Abb. D10	Röntgenstruktur des CAP	273
Abb. D11	Computermodeile von Nukleotid-Bindestellen	273
Abb. D12	Computermodeil der Nukleotid-Bindestelle des ROD	274
Abb. D13	Computermodeil der Nukleotid-Bindestelle des ROD	274
Abb. D14	Computermodeil der Nukleotid-Bindestelle des ROD	275
Abb. D15	Wechselwirkungen zwischen Ligand und Bindestelle im ROD	275

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	elektrischer Strom, angegeben in Ampere (mA = Milliampere, nA = Nanoampere, pA = Picoampere)
cAMP	Adenosin-3',5'-monophosphat
CAP	catabolite activator protein aus <i>E.coli</i>
cAPK	cAMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	Guanosin-3',5'-monophosphat
cGPK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cIMP	Inositol-3',5'-monophosphat
CNG	cyclic nucleotide gated
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
H1 - H6	Bezeichnung putativ transmembranaler Segmente in CNG-Kanälen
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
i	Stromamplitude bezogen auf Einzelkanalmessungen
I	Stromamplitude bezogen auf makroskopische Messungen
K _a	Ligandkonzentration halbmaximaler Aktivierung (Aktivierungskonstante)
n	Hill-Koeffizient
S	elektrischer Leitwert, angegeben in Siemens (pS = Picosiemens, fS = Femtosiemens)
S1 - S6	Bezeichnung putativ transmembranaler Segmente in Kaliumkanälen
S4	Bezeichnung des "voltage-sensor" Motivs
SIS	standard intracellular solution (vgl. Abs. 3.8)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
V	elektrische Spannung, angegeben in Volt (mV = Millivolt)

BEZEICHNUNG DER WILDTPYKANÄLE (vgl. dazu auch Anhang B):

ROD	CNG-Kanal aus Rindersehstäbchen
OLF	CNG-Kanal aus olfaktorischen Neuronen des Rinds
ChRod	CNG-Kanal aus Sehstäbchen des Huhns
ChCone	CNG-Kanal aus Sehzapfen des Huhns
Herz153	CNG-Kanal aus Aortengewebe des Kaninchens
Herz357	CNG-Kanal aus Aortengewebe des Kaninchens

BEZEICHNUNG DER PUNKTMUTANTEN (vgl. Anhang B):

Zur Bezeichnung der Punktmutanten wurde der Buchstaben-Ziffer-Buchstaben-Code verwendet: Die Buchstaben folgen dem Einbuchstabencode für Aminosäuren; der vor der Ziffer stehende Buchstabe bezeichnet die Aminosäure des Wildtypproteins, der auf die Ziffer folgende Buchstabe die Aminosäure des mutierten Proteins. Die Ziffer gibt die Position in der Primärsequenz, beginnend am N-Terminus wieder. Kursiv gedruckte Positionsangaben beziehen sich auf das Alignment in Anhang B.

BEZEICHNUNG DER EXPRIMIERTEN KANALCHIMÄREN (vgl. Anhang B):

Die Chimären wurden aus komplementären Sequenzabschnitten des ROD und des OLF gebildet. Die Buchstaben bezeichnen den jeweiligen Spender (R steht für ROD, O für OLF), die Zahlenangaben dazwischen beziehen sich auf die relative Lage der Schnittstellen zu den putativen transmembranalen Segmenten nach dem in Kaupp *et al.* vorgeschlagenen 6-Helix Modell (Kaupp *et al.*, 1989).

1. EINLEITUNG

Ionenkanäle sind Membranproteine, die den kontrollierten Austausch von Ionen über die Zellmembran ermöglichen. Je nach stimulierendem Reiz, der die Kanäle öffnet, unterscheidet man spannungsabhängige Kanäle (z.B. Kalium-, Natrium-, Kalziumkanäle), ligandaktivierte Kanäle (z.B. Azetylcholin Rezeptor), Kanäle, die durch Phosphorylierung geöffnet werden (z.B. sekretorische Chloridkanäle) und mechanosensitive Kanäle (z.B. zur Regulierung des Turgors)¹.

Photorezeptoren und olfaktorische Neurone von Vertebraten bedienen sich bei der Verarbeitung der Reizinformation einer besonderen Familie von Ionenkanälen, die funktionell zu den ligandaktivierten Ionenkanälen gehören. Auf die Anregung durch Licht bzw. Duftstoffe reagieren Photorezeptoren und olfaktorische Neurone von Vertebraten mit einer Veränderung der Konzentration von 3',5'-cGMP (s. Abb. D8 und D9) bzw. 3',5'-cAMP (Lagnado & Baylor, 1992; Reed, 1992). Die zyklischen Nukleotide öffnen zyklisch-Nukleotid gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle) in der Plasmamembran dieser Zellen. Durch den Transport der Ionen verändert sich das Membranpotential. Die Veränderung des Membranpotentials löst Nervenimpulse aus, durch die die Reizinformation an das zentrale Nervensystem weitergeleitet wird (als Übersicht s. Schnapf & Baylor, 1987).

CNG-Kanäle werden direkt und kooperativ durch Anbinden der Nukleotide an eine intrazelluläre Bindestelle geöffnet. Der Transport der Ionen erfolgt durch eine wäßrige Pore (Zimmerman & Baylor, 1986) von etwa 4 x 5 Å Durchmesser (Picco & Menini, 1993). Die Pore wird wahrscheinlich durch mehrere Untereinheiten gebildet. Bislang wurde jedoch noch kein Ionenkanal in seiner Tertiärstruktur aufgeklärt, so daß die Vorstellungen über die Struktur und Funktionsweise von Ionenkanälen Modellcharakter haben. Man nimmt an, daß bei CNG-Kanälen jeweils fünf Untereinheiten eine zentrale Pore bilden (J. Vetter, IBI, KFA, persönliche Mitteilung). Die genaue Stöchiometrie der Untereinheiten ist jedoch noch unklar.

Die Amplitude des Stroms, der durch Ionenkanäle fließt, hängt von den Selektivitätseigenschaften der Pore, vom elektrischen Feld über der Membran, vom chemischen Gradienten der transportierten Ionen sowie von der Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle ab. Typischerweise liegt die Transportrate von Ionenkanälen bei etwa 10^6 Ionen pro Sekunde.

CNG-Kanäle wurden zuerst in der Zellmembran des Außensegments von Sebstäbchen (Fesenko *et al.*, 1985) und -zapfen (Haynes & Yau, 1985), sowie in Neuronen des olfaktorischen Epithels (Nakamura & Gold, 1987) identifiziert. Der CNG-Kanal aus Rindersebstäbchen wurde isoliert und die Primärstruktur seiner α -Untereinheit durch Klonierung von cDNA aufgeklärt (Cook *et al.*, 1987; Kaupp *et al.*, 1989). Die elektrophysiologischen Eigenschaften der in *Xenopus* Oozyten exprimierten α -Untereinheit des CNG-Kanals aus Rindersebstäbchen (ROD) sind beinahe identisch mit den *in situ* gemessenen Eigenschaften. Unterschiede bestehen

¹ Als Einführung s. Hille, 1992.

bezüglich der Blockierbarkeit durch l-cis-Diltiazem und im Einzelkanalschaltverhalten. Es wurde daher zunächst angenommen, daß nur eine Untereinheit an der Ausbildung der Pore beteiligt ist.

1993 haben Chen *et al.* ein zu etwa 30 % homologes Protein kloniert, dessen elektrophysiologische Eigenschaften nach Koexpression mit CNG-Kanal α -Untereinheiten noch genauer mit dem *in situ* gemessenen Kanal übereinstimmen (Chen *et al.*, 1993). Die zuerst klonierte Gruppe wird als α -Untereinheit und die neue Gruppe als β -Untereinheit bezeichnet. Allein injiziert, ist die β -Untereinheit nicht in der Lage, funktionelle CNG-Kanäle zu bilden. Es ist noch unklar, ob die β -Untereinheit die Membran durchspannt und direkt am Aufbau der Pore beteiligt ist, oder ob sie lediglich intrazellulär an das Kanalprotein gebunden ist. Der porenbildende Sequenzteil ist in beiden Proteinen jedoch gut konserviert.

Später wurden Kanäle, die direkt durch zyklische Nukleotide geöffnet werden, auch in einer Reihe anderer Gewebe nachgewiesen (Nakamura & Gold, 1987; Nawy & Jahr, 1990; Light *et al.*, 1990; DiFrancesco & Tortora, 1991; Bacigalupo *et al.*, 1991; Zufall & Hatt, 1991; Kolesnikov *et al.*, 1991; Dryer & Henderson, 1991; Delgado *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 1992a; Ahmad *et al.*, 1992b). Einige dieser *in situ* untersuchten Kanäle weichen in ihren Eigenschaften deutlich von den Eigenschaften der CNG-Kanäle ab, die in den letzten vier Jahren in ihrer Primärstruktur aufgeklärt wurden (Kaupp *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1990a,b; Dhallan *et al.*, 1990; Goulding *et al.*, 1992; Pittler *et al.*, 1992; Dhallan *et al.*, 1992; Bönigk *et al.*, 1993). Es ist daher unwahrscheinlich, daß nur eine einzige genetische Familie von CNG-Kanälen existiert (Kaupp & Altenhofen, 1992).

STRUKTURELLE MERKMALE VON CNG-KANÄLEN

Die bisher in ihrer Primärstruktur bekannten α -Untereinheiten sind zwischen 645 und 735 Aminosäuren lang. 54 bis 92 % der Aminosäurepositionen sind identisch (W. Bönigk, IBI, KFA, persönliche Mitteilung). Die Ähnlichkeit der Proteinsequenzen ist im Bereich um die Pore am stärksten ausgeprägt und nimmt an den Enden des Polypeptids ab.

CNG-Kanäle zeigen Sequenzähnlichkeiten mit anderen Proteinfamilien, die bei der Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen hilfreich sind. In der C-terminalen Region wurde durch Sequenzähnlichkeit eine Nukleotid-Bindestelle von etwa 80 bis 100 Aminosäuren identifiziert. Wichtige, strukturbestimmende Aminosäuren der Nukleotid-Bindestellen von CNG-Kanälen, cGMP- bzw. cAMP-abhängigen Proteinkinasen (cGPK, cAPK) und der Nukleotid-Bindestelle des Catabolite Activator Proteins aus *E. coli* (CAP) (Zubay *et al.*, 1970) sind konserviert (Kaupp *et al.*, 1989; Kaupp *et al.*, 1992, s. Abs. 4.10). Die Tertiärstruktur der Binde-stelle des CAP ist aufgeklärt (Weber & Steitz, 1987, vgl. Abb. D10).

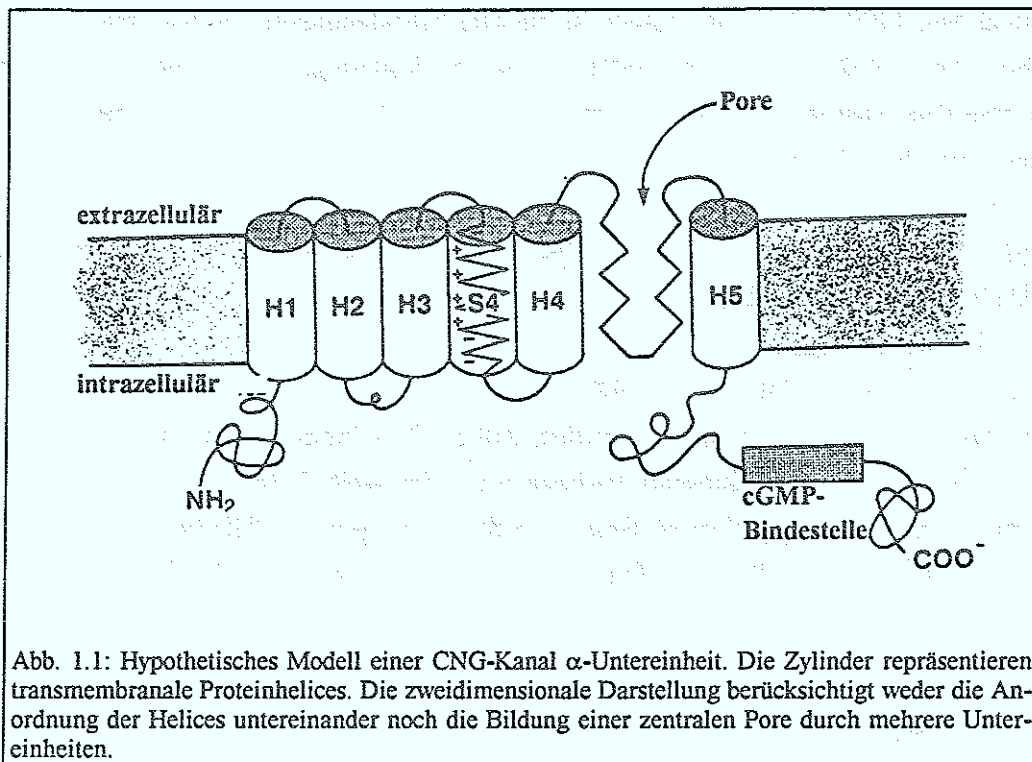
Im mittleren Sequenzbereich von CNG-Kanälen werden aus Hydropathievorhersagen vier bis sechs transmembranale Segmente angenommen (Kaupp *et al.*, 1989)². Ein zusätzliches Segment, das in spannungsabhängigen Kanälen S4-Segment genannt wird und dort für die spannungsabhängige Aktivierung verantwortlich gemacht wird, ist auch in CNG-Kanälen vorhanden (Jan & Jan, 1990). Für Kaliumkanäle ist die Membranständigkeit des S4-Segments bewiesen (Chua *et al.*, 1992; Isacoff *et al.*, 1991). Außerdem konnte gezeigt werden, daß H1 in Kaliumkanälen eine wichtige Rolle beim Einbau des Kanalpolypeptids in die Zellmembran spielt. Bei Kaliumkanälen wird die Schleife zwischen S1 und S2 glykosyliert, sie muß daher extrazellulär lokalisiert sein (Shen *et al.*, 1993).

Im Sequenzabschnitt zwischen H4 und H5 liegt ein Bereich von 16 Aminosäuren, der ebenfalls hohe Ähnlichkeit zu Kaliumkanälen aufweist. Für Kaliumkanäle konnte gezeigt werden, daß diese Region an der Auskleidung der Porenwand beteiligt ist (Yellen *et al.*, 1991; Yool & Schwarz, 1991; Heginbotham *et al.*, 1992).

Immunchemisch konnte nachgewiesen werden, daß der N-Terminus des CNG-Kanals aus Rindersehtäbchen *in situ* bei Aminosäure 93 beginnt und intrazellulär lokalisiert ist. Der in *Xenopus* Oozyten exprimierte Kanal ist im Gegensatz dazu nicht posttranslational verkürzt (Molday *et al.*, 1991). Die intrazelluläre Lokalisation der Bindestelle ist funktionell bewiesen. Die Anzahl der zwischen N- und C-Terminus liegenden Membrandurchgänge muß daher gerade sein. Der CNG-Kanal aus Sehtäbchen des Rindes wird an der Aminosäureposition N327 glykosyliert (Wohlfahrt *et al.*, 1989). Die Aminosäure liegt nach dem Modell in einer Schleife zwischen H4 und H5. Ausgehend von N327 muß es demnach zu beiden Enden des Proteins hin mindestens einen Membrandurchgang geben.

² Die ursprüngliche Nomenklatur (s. Kaupp *et al.*, 1989) bezieht sich auf 6 transmembranale Segmente. Im Gegensatz zu der bei Kaliumkanälen üblichen Bezeichnung S1 - S6 wurden die CNG Kanal Segmente mit H1 - H6 bezeichnet. Die Bezeichnung für das S4 Segment wurde nachträglich aus der Kaliumkanal Nomenklatur adoptiert.

Abb. 1.1 zeigt ein Modell der α -Untereinheit von CNG-Kanälen.



FUNKTIONELLE MERKMALE VON CNG-KANÄLEN

"Physiologically, the cGMP-dependent conductance is a strange channel." M. L. Applebury

CNG-Kanäle sind Kationenkanäle. Sie unterscheiden sich nur schwach zwischen unterschiedlichen Alkaliionen (Hodgkin *et al.*, 1985) und transportieren unter physiologischen Bedingungen sogar ca. 15 % Kalzium (Yau & Baylor, 1989). Der normalerweise im Bereich von 20 bis 40 pS liegende Einzelkanalleitwert (Haynes *et al.*, 1986; Matthews, 1987; Matthews & Watanabe, 1987) wird in Gegenwart von divalenten Kationen bis auf wenige fS reduziert (Gray & Attwell, 1985; Baylor & Nunn, 1986). Der Aktivierungsmechanismus durch zyklische Nukleotide ist kooperativ (Fesenko *et al.*, 1985; Yau & Nakatani, 1985; Fesenko *et al.*, 1986; Haynes *et al.*, 1986; Zimmerman & Baylor, 1986; Cook *et al.*, 1987). Die makroskopische I/V-Kurve zeigt eine leichte Auswärtsgleichrichtung mit geringster Spannungsabhängigkeit im Bereich des physiologischen Ruhepotentials der Photorezeptorzelle um -30 bis -65 mV. CNG-Kanäle inaktivieren oder desensibilisieren nicht (Watanabe & Matthews, 1990, vgl. dazu jedoch Abs. 4.6).

Bei Beginn der Arbeit (November 1989) war das erste Mitglied der Familie der CNG Kanäle kloniert. Durch heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten war bewiesen, daß das klonierte Protein bezüglich seiner Empfindlichkeit für cGMP und seines Einzelkanalleitwerts mit den Eigenschaften des *in situ* gemessenen Kanals übereinstimmt (Kaupp *et al.*, 1989), als Übersicht über die Eigenschaften des *in situ* gemessenen Kanals von unterschiedlichen Spezies siehe Yau & Baylor, 1989.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Daten stammen von CNG-Kanal α -Untereinheiten, die in *Xenopus* Oozyten exprimiert wurden. Das Oozytenexpressionssystem bietet im Vergleich zum nativen Kanal wichtige Vorteile: Das exprimierte Protein ist zugänglich für gezielte Mutationen, und es kann isoliert von der biochemischen Kaskade untersucht werden, die die Eigenschaften *in situ* moduliert.

2. ZIELSETZUNG

Es wurden vier neu klonierte CNG-Kanäle sowie eine Reihe von Mutanten und Chimären in *Xenopus* Oozyten exprimiert und mit Hilfe der Patch-Clamp Technik elektrophysiologisch charakterisiert. Insgesamt wurden etwa 70 unterschiedliche Transkripte von gezielt mutierten CNG-Kanalproteinen untersucht. Die hier gezeigten Mutationsstudien sind die ersten, die an CNG-Kanälen durchgeführt wurden.

Der auffälligste Unterschied in den funktionellen Eigenschaften von CNG-Kanälen aus verschiedenen Geweben und Spezies liegt in der unterschiedlichen Empfindlichkeit und Aktivierbarkeit durch cGMP bzw. cAMP. Anhand von Punktmutationen in der Bindestelle von CNG-Kanälen sollte die strukturelle Grundlage für die unterschiedliche Aktivierbarkeit durch cGMP bzw. cAMP aufgeklärt werden.

Durch den Austausch von Proteindomänen zwischen zwei CNG-Kanal Spezies unterschiedlicher Empfindlichkeit wurden Sequenzbereiche identifiziert, die an der Regulierung der Ligandempfindlichkeit beteiligt sind.

Neben dem Aufbau eines elektrophysiologischen Meßstandes und des *Xenopus* Expressionssystems umfaßt die Arbeit Entwicklung von Hard- und Software zur Meßwerterfassung und -auswertung sowie die Entwicklung und Erprobung neuer Auswertemethoden elektrophysiologischer Messungen an CNG-Kanälen.

Die Sequenzähnlichkeiten zwischen der Bindestellendomäne von CNG-Kanälen und den zyklisch-Nukleotid Bindestellen von zyklisch-Nukleotid abhängigen Proteinkinasen sowie die Sequenzähnlichkeiten der transmembranalen Segmente zu Kaliumkanälen wurden mittels Strukturvorhersage- und modeling Methoden zur strukturellen Interpretation der funktionellen Daten ausgenutzt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 DAS *XENOPUS*-OOZYTEN EXPRESSIONSSYSTEM

XENOPUS LAEVIS

"Bei all seinen Fehlern und Schwächen war er doch ein ausgesprochener Charakter. Er wußte genau, was er wollte, und das war in erster Linie fressen, recht viel fressen, wobei er weniger auf die Qualität als auf die Quantität Wert legte. [...] Vieler Menschen Achtung, Bewunderung, ja Liebe hatte er sich erworben. Gegenstand der Achtung war seine zielbewußte, wenn auch etwas einseitig auf's Materielle gerichtete Persönlichkeit. Gegenstand der Bewunderung waren seine Waden und Schwimmhäute. Gegenstand der Liebe - ja, wie man ein lebendes Wesen im Laufe der Zeit halt lieb gewinnt. [...] Ein ausgezeichnete Schwimmer, und an Gestalt und Wesen ein Menschen-Frosch. Es gibt Leute, die ich nicht essen sehen kann, ohne an meinen Xenopus selig zu denken. Und etwas menschenähnliches hatte sein ganzes Gebaren. Sein Geist war, wie erwähnt, auf den Stoicismus gestimmt. Kein Wandel in seinem äußeren Geschick oder in seinen Lebensumständen vermochte seine abgeklärte Ruhe zu stören." (Kraft, 1910)

"Zu den Attraktionen im Zirkus gehören ohne Zweifel die Clowns. Wer Attraktionen im Aquarium liebt, der halte sich Xenopus". (Filek, 1967)

Die Verwendung von Fröschen für elektrophysiologische Versuche ist geschichtlich nicht neu. Leonardo da Vinci demonstrierte an Fröschen die Koppelung zwischen mechanischer Stimulierung des Rückenmarks und nachfolgender Muskelkontraktion. Galvani wird nachgesagt, mit einem Froschexperiment die Elektrophysiologie begründet zu haben, in dem er Froschmuskeln mit einem Blitzableiter verband... (De Viribus Electricitatis in Motu Musculari, 1791). Der Südafrikanische Krallenfrosch, *Xenopus laevis* (Daudin, 1803), ist jedoch eher ein Quereinsteiger. Er verdankt seine Verbreitung in wissenschaftlichen Laboratorien hauptsächlich den außergewöhnlichen Eigenschaften seines Ovars. Der Name ist halb Griechisch halb Latein, und bedeutet frei übersetzt "Der Schlüpfrige mit den merkwürdigen Füßen". In Südafrika sind Krallenfrösche als "Platannas" bekannt, von Plathander (Flachhänder), umgangssprachlich "Platie". Elkan (Elkan, 1939) bietet eine abweichende Deutung des Namens an: *"The farmers children in S. A., however, call it 'platanna', a name the etymology of which puzzled me completely, and I wonder if one of our readers guesses that this strange looking word, which does not seem to fit either into Greek or Latin, is nothing but Dutch for 'flat Anna'. That is exactly how Xenopus looks."* Die deutsche Bezeichnung "Krallenfrosch" spielt auf die Krallen an je drei Zehen der Hinterfüße an.

Xenopus gehört zur Familie der zungenlosen Frösche (Pipida). Sie sind der Ordnung der Froschlurche (Anura) in der Klasse der Amphibien (Amphibia) zugeordnet. Es werden sieben Arten unterschieden (Deuchar, 1975)³.

Nach anfänglichen Untersuchungen zum Energiestoffwechsel bei Kaltblütern durch Zwarenstein Anfang der 30er Jahre dieses Jahrhunderts, nahm die wissenschaftliche Karriere des Krallenfroschs 1934 einen sprunghaften Aufschwung: Bellerby führte den Krallenfrosch als Vorläufer der heutigen Streifentests zum Schwangerschaftsnachweis beim Menschen ein (Bellerby, 1934, parallel mit Zwarenstein). Im Gegensatz zur diskontinuierlichen Entwicklung der Oozyten bei den heimischen Froscharten liegen im *Xenopus*-Ovar Oozyten aller Entwicklungsstufen nebeneinander vor (Dumont, 1972, vgl. Abb. D2). *Xenopus* Weibchen können daher während des ganzen Jahres durch Injektion von Steroidhormonen oder humanem choriogonadotropem Hormon (HCG) zur Ovulation gebracht werden. Der Test beruhte auf Injektion des Urins der Testperson. Bei Anwesenheit von HCG laicht der Frosch ab. Der Test erreichte eine 87 %ige Sicherheit (Deuchar, 1975).

Nach umfangreichen entwicklungsbiologischen Untersuchungen über die Regulierung von Zellteilungsreaktionen und Translationsprozessen zeigte Gurdon 1971 erstmals die erfolgreiche Translation von Fremd-mRNA (Gurdon *et al.*, 1971). 1981 wurde eine Untereinheit des Azetylcholin-Rezeptors als erster exogener Ionenkanal exprimiert und 1982 erstmals elektrophysiologisch nachgewiesen (Sumikawa *et al.*, 1981; Barnard *et al.*, 1982). Seither wurde die Expression unterschiedlichster Kanalproteine in *Xenopus* Oozyten beschrieben⁴.

Die Expression von Proteinen in *Xenopus* Oozyten umfaßt folgende Schritte:

- Dem narkotisierten Frosch werden operativ Oozyten entnommen.
- Die entnommenen Oozyten werden von umgebenden Zellen befreit.
- Den isolierten Oozyten wird mRNA (ins Zytoplasma) oder cDNA (in den Kern) injiziert.
- Die synthetisierten Proteine können nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden bis Tagen immunchemisch, elektrophysiologisch oder biochemisch nachgewiesen werden.

³ Für weitere Einführung siehe auch Nieuwkoop & Faber, 1956; Brown, 1970; Cochran, 1961; Goldin, 1992; Elkan, 1957; Elkan, 1939; Filek, 1967; Gurdon & Woodland, 1975; Gurdon, 1967; Nieuwkoop & Faber, 1956; Kalk, 1960; Hey, 1949; Nace, 1968; Ochsé, 1948; Ruddock & Ruffle, 1972; Rugh, 1962; Zwarenstein *et al.*, 1946.

⁴ Zur Übersicht siehe Boyle & Kaczmarek, 1991; Colman, 1987a; Colman, 1987b; Dascal, 1987; Kushner *et al.*, 1989; Gurdon & Wickens, 1983; Lane, 1983; Lane, 1976; Leonard, 1989; Marcus-Sekura & Hitchcock, 1987; Miledi *et al.*, 1989; Seidman & Soreq, 1990; Soreq & Seidman, 1992; Yellen, 1984b; Stühmer, 1992; Snutch, 1988; Straub *et al.*, 1989; Sumikawa *et al.*, 1986; Sumikawa *et al.*, 1989; Sigel, 1990; Wang *et al.*, 1991; Melton, 1987; Swanson & Folander, 1992; Wickens & Laskey, 1981; Krafe & Lester, 1992. In methodischen Fragen sei besonders auf die Artikel von Goldin, Colman und Sigel verwiesen.

Vorteile des *Xenopus* Expressionssystems:

- Die Oozyten sind relativ groß (Durchmesser bis zu 1,5 mm). Es läßt sich daher individuell verfolgen, welchen Zellen Nukleinsäure injiziert wurde.
- Sie verfügen im Vergleich zu somatischen Zellen über ein erheblich leistungsfähigeres Translationssystem. Der Vorrat an RNA Polymerasen z. B. reicht zur Ausstattung von mehr als 30.000 neuen Zellen des Embryos (Colman, 1987b). Die Oozyte verfügt über ca. 10^{12} Ribosomen und ca. 2×10^{11} mRNA Moleküle. Etwa 2 % davon liegen in der ausgewachsenen Oozyte als Polysomenkomplex vor, der Rest der maternalen mRNA ist z.B. durch Bindung an Proteine inhibiert, so daß hinreichend Translationskapazität zur Verfügung steht (Woodland, 1974; Marella *et al.*, 1992; Sommerville, 1990).
- Posttranslationale Modifikationen der Proteine erfolgen vielfach in physiologischer Weise.
- Die Zellen können einfach in antibiotikahaltiger physiologischer Salzlösung in Kultur gehalten werden⁵.

Nachteile des *Xenopus* Expressionssystems:

- Größter Nachteil des Systems sind die bisher nicht zuverlässig kontrollierbaren saisonalen Veränderungen der Membraneigenschaften, möglicherweise auch der Expressionsleistung und posttranslationaler Prozesse.
- Bei elektrophysiologischen Ganzzellmessungen ist die Zeitauflösung durch die hohe Membrankapazität beschränkt. Je nach fließendem Strom kann es schwierig sein, an großen Zellen ein räumlich und zeitlich konstantes elektrisches Feld anzulegen.

Der Versuch, die mitunter zu monatelangen Ausfallszeiten führenden saisonalen Schwankungen zu Überwinden, hat im Laufe der Arbeit zu einer Reihe von Variationen in den Haltungsbedingungen geführt. Die individuellen Schwankungen von Tier zu Tier blieben jedoch immer größer als die Schwankungen von Jahreszeit zu Jahreszeit.

⁵ Eppig *et al.* haben ein Medium mit annähernd 40 Komponenten entwickelt (Eppig & Dumont, 1976). Sie halten uninjizierte Oozyten darin bis zu drei Wochen. Uninjizierte Oozyten können jedoch auch in sehr viel einfacheren Salzlösungen über vergleichbare Zeit gehalten werden. Es wurde hauptsächlich Barth Medium (Barth & Barth, 1959; modifiziert nach Elsdale *et al.*, 1960) verwendet (vgl. Abs. 3.8). Einige Autoren setzen dem Inkubationsmedium Natriumpyruvat (550 mg/l) oder Theophyllin zu. Ersteres dient als Kohlenstoffquelle, letzteres soll die Phosphodiesterase hemmen, um die Konzentration an cAMP hoch zu halten (s. Seite 22). Ferner kann es sinnvoll sein, den Kalziumgehalt des Inkubationsmediums oder den Anteil an anderen zweiwertigen Kationen je nach Saison zu verändern, um die Haltbarkeit zu verbessern (Cohen-Armon *et al.*, 1989). Die erzielten Verbesserungen lagen in der Regel unter dem Maß an Variabilität von Tier zu Tier und Woche zu Woche. Kanaleigenschaften können durch zugesetzte Antibiotika und wechselnden Gehalt an divalenten Kationen verändert werden.

3.2 TIERHALTUNG

WASSER

Die Haltung der 8 - 10 cm großen Tiere (s. Abb. D1) ist unproblematisch. Im Labor werden sie 10 bis 14 Jahre alt (Cameron, 1947). Sie sind nach 3 - 4 Jahren ausgewachsen, die Weibchen sind nach circa 2 Jahren geschlechtsreif. Da die Zusammenhänge zwischen Haltungsbedingungen und Zustand des Ovars noch nicht hinreichend verstanden sind, findet man eine Reihe widersprüchlicher Ratschläge⁶. Die Qualität der Oozyten schwankt im Laufe des Jahres und die individuellen Unterschiede von Tier zu Tier sind beträchtlich. Für eine eindrucksvolle Dokumentation der beobachtbaren Schwankungen vgl. Shapiro & Zwarenstein (1933).

Krallenfrösche leben rein aquatisch. Es werden Wassertemperaturen zwischen 10 und 28 °C (Optimum um 20 - 23 °C) toleriert (Andres *et al.*, 1948). Der Stoffwechsel der poikilothermen Tiere ist bei niedrigen Temperaturen reduziert, was sich negativ auf den Zustand des Ovars auswirken kann, bei höheren Temperaturen hingegen steigt die Infektionsgefahr. Sie stellen keine hohen Anforderungen an die Wasserqualität; einige der ersten Funde wurden im Schlamm von Klärbecken gemacht (Friese, 1933). Sie sind jedoch empfindlich gegenüber Chlorzusätzen. Je nach Grad der Chlorierung sollte das Wasser daher vorher abstehen oder gut durchlüftet werden. Jedes Aquarium mit etwa 75 l Wasser beherbergte maximal 10 Tiere. Der Wasserstand sollte 10 bis 15 cm betragen⁷. Außerdem sollte die Populationsdichte nicht zu hoch sein, da sich dann der Zustand des Ovars verschlechtert (Landgrebe, 1939; Alexander & Bellerby, 1937).

Das Wasser wird durch Watte und poröse Tonmaterialien gefiltert und permanent mit einem 300 l Vorrat ausgetauscht. Die Wasserkreisläufe der Aquarien sind getrennt, um die Ausbreitung von Infektionen zu verhindern. Etwa alle sechs Wochen werden Becken und Filter gereinigt und das Wasser erneuert.

LICHT UND FUTTER

Nachdem Zwarenstein und Shapiro (Zwarenstein & Shapiro, 1933; Shapiro & Shapiro, 1934) berichtet haben, daß die Tiere nach halbjähriger Gefangenschaft kaum noch Oozyten enthielten,

⁶ Die natürlichen Lebensbedingungen der Frösche sind periodischen Schwankungen unterworfen. In Südafrika wurden sogar aus Statistiken mit 500 Tieren pro Versuch widersprüchliche Schlüsse gezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 35 Tiere über einen Zeitraum von drei Jahren beobachtet. Es konnten maximal zwei Tiere pro Woche operiert werden. Die Dokumentation dieser Beobachtungen soll daher nicht den Eindruck statistischer Absicherung erwecken.

⁷ Wenn möglich graben sich die Tiere bei Trockenheit im Sommer ein und erwarten den nächsten Regen. Bei niedrigem Wasserstand entwickeln sie einen starken nächtlichen Wandertrieb.

Hogben jedoch keinen Einfluß der Gefangenschaft fand (Hogben *et al.*, 1931), wurde zunächst vermutet, daß Licht der unterscheidende Faktor zwischen wild lebenden und in Gefangenschaft gehaltenen Tieren sei. Bellerby konnte jedoch 1938 zeigen, daß die Beleuchtung höchstens eine untergeordnete Rolle spielt. Er schloß, daß ausreichende Ernährung die wichtigste Rolle spiele (Bellerby, 1938a). Dieses Ergebnis wurde 1975 durch Holland bestätigt, der eine positive Korrelation zwischen Nahrungsangebot und Gonadotropinkonzentration annimmt (Bellerby, 1938b; Holland & Dumont, 1975).

Krallenfrösche sind Fleischfresser. Die Tiere werden zweimal pro Woche mit aufgeweichtem Trockenfertigfutter gefüttert (Kähler, Hamburg). Bezüglich der Verwendung von Frischfleisch gegenüber Trockenfutter wurde kein Vorteil gefunden. Die Infektionsgefahr scheint durch die Verwendung von Frischfleisch erhöht zu sein, da häufig mehrfach aufgetautes Fleisch verwendet wird. Manche Züchter setzen dem Futter Vitaminpräparate bei.

Es wurde sowohl die Intensität als auch die spektrale Zusammensetzung des Lichts (Vanderplank, 1939) variiert. Starkes Licht scheint eher negative Auswirkungen zu haben. Der Kontraktionszustand der Melanophoren in der Haut variiert mit der Lichtintensität und der Farbe der Umgebung. Es gibt Hinweise auf eine Korrelation zwischen Pigmentierungsgrad und hormonellem Zustand, bzw. Gesamtkonstitution des Tieres (Shapiro, 1937; Nieuwkoop & Faber, 1956; Dern, 1953; Toivonen, 1952). Die Tiere werden bei 13/11 h Licht/Dunkel Perioden in Neonlicht gehalten, die jährlichen Temperaturschwankungen betragen 2 - 5 °C. Die Glasaquarien (100 x 50 x 40 cm) sind nach oben geschlossen und dunkel unterlegt. Ein Teil des Beckens ist als Unterschlupf mit einem dunklen Tuch abgedeckt.

Bezüglich der Temperatur- und der Lichtzyklen gibt es widersprüchliche Vorschläge. Einige Autoren weisen darauf hin, daß möglichst konstante Licht- und Temperaturzyklen vorteilhaft zur Überwindung des internen Zeitgebers seien (Goldin, 1992). Andere Autoren empfehlen, die natürlichen Schwankungen zu simulieren (Bles, 1905), um durch stärkere Stimulierung des saisonalen Zeitgebers bessere Oozyten zu erhalten.

In Südafrika werden die Eier zwischen Juni und September, je nach regionalem Klima aber auch erst zwischen Oktober und Dezember abgelaicht. Stimuli für das Ablaichen sind sowohl Temperatur als auch Feuchtigkeit. Der Gewichtsanteil des Ovars am Gesamtgewicht des Tieres sinkt in der Zeit zwischen September und Februar und steigt dann bis September wieder an (Gitlin, 1939; Gitlin, 1941; Berk, 1938).

Es wurden Kontrollversuche mit direkt aus Südafrika eingeflogenen Wildfängen durchgeführt, um den zeitlichen Verlauf der Angleichung des internen Zeitgebers zu untersuchen. Es wurden keine Vorteile direkt importierter Tiere gefunden. Dieser Befund wird auch von anderen Autoren bestätigt (Stühmer, 1992). Laborhaltung von Wildfängen ist zudem nach deutschem Recht umstritten. Persönlicher Kontakt zum Lieferanten und verlässliche Information bezüglich der Herkunft der Tiere ist auf jeden Fall zu empfehlen (Adressen siehe Literaturhinweise zu Krallenfröschen und Expressionssystem). Die verwendeten Frösche wurden von Kähler, Inst. f.

Entwicklungsbiologie, Hamburg, und De Rover, Turnhout, Belgien bezogen. Die Frösche werden nach Lieferanten und Lieferdaten getrennt gehalten.

Ein zuverlässiger Vergleich von Haltungsbedingungen in verschiedenen Laboratorien wird oft durch unterschiedliche Bewertungskriterien je nach Art der durchgeführten Versuche bzw. der exprimierten Proteine erschwert. Erfahrungen zur Verwendung von Oozyten zu Patch-Clamp Experimenten liegen erst seit etwa 8 Jahren vor. In den meisten Laboratorien wird weder Zeit noch Systematik zur Stabilisierung des Expressionssystems verwendet.

Die besten experimentellen Ergebnisse wurden in der Regel zwischen Anfang November und Ende Mai erzielt. Stühmer berichtet, daß nördlich des Äquators die Expression von Kanälen im Winter, die von Ionenpumpen im Sommer erfolgreicher sei (Stühmer, 1992).

BEEINFLUSSUNG DES REIFUNGSZUSTANDS DURCH HORMONGABEN UND BIOCHEMISCHE FAKTOREN

Bei Amphibien unterscheidet man die in der Prophase I der ersten meiotischen Teilung arre- tierte Oozyte vom ablaichbereiten Ei. Das reife Ei liegt in der Metaphase II vor und entwickelt sich nach Aktivierung durch Befruchtung weiter zum Embryo. Während Eier einfach durch In- jektion von Hormon erhalten werden, müssen Oozyten operativ entnommen werden. Die Rei- fung zum Ei führt zu einer Reihe biochemischer Veränderungen in der Oozyte: Die cAMP- Konzentration sinkt, das Zytoplasma wird alkalischer, die Synthese eigener Proteine erhöht sich um etwa das Doppelte (Woodland, 1974), Proteinphosphorylierung nimmt stark ab (Karsenti *et al.*, 1987), der Ionenfluß über die Zellmembran ändert sich und die Membran des Zellkerns löst sich auf (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD, erkennbar am hellen Kreis in der sonst stark pigmentierten, dunklen Hälfte der Oozyte). Die vorher stark von Microvilli zerklüf- tete Zellmembran wird glatt. Stimulation des GVBD durch Progesteronzusatz zum Inkuba- tionsmedium verbesserte jedoch die Patchbarkeit der Membran nicht.

Nach Befruchtung tritt innerhalb von 90 Minuten die erste Teilung ein, 11 weitere Zellzyklen folgen in den nächsten 7 Stunden (Newport & Kirschner, 1982). Während unbefruchtete Eier oft nur für Stunden überlebensfähig sind, können operativ entnommene Oozyten über Tage und Wochen verwendet werden⁸. Mitunter wird empfohlen, Ablai- chen durch Hormongaben zu sti- mulieren, da die daraufhin nachwachsenden Oozyten bessere Eigenschaften hätten (s. z.B. Ber- trand *et al.*, 1991). Andere Autoren berichten hingegen, daß nach Hormongabe keine Verbes- serung beobachtet wurde (s. z.B. Goldin, 1992).

Der normale Reifungsprozeß umfaßt etwa 8 Wochen, nach dieser Zeit sollten neu herangereifte Oozyten vorhanden sein. Das Alter der Oozyten (soweit bestimmbar) ist nicht zwangsweise mit

⁸ Für weitere Einzelheiten zur Neubildung, Reifung und Resorption von Oozyten und Ovargewebe vgl. Masui & Clarke, 1979; 1978; Schuetz, 1969; Schuetz, 1972; Smith, 1975.

der Qualität der Membran verknüpft. Da zur Rückresorption von Oozytengewebe bei konstantem Futterangebot keine Daten vorliegen, läßt sich dieser Parameter kaum beurteilen. Ebenso ist unklar, wie stark die Neubildung von Oozytengewebe allein durch regelmäßige operative Entnahme stimuliert wird (Jones, 1978). Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist die stark schwankende Hormonempfindlichkeit von Tier zu Tier bzw. von Jahreszeit zu Jahreszeit (Shapiro, 1939).

Es wurden drei Tiere dreimal im Abstand von 8 Wochen durch intraperitoneale Injektion von Primogonyl (500 I.E., Schering) zur Ovulation gebracht (zur Technik vergleiche Bellerby, 1933). Anschließend waren weder mehr, noch bessere Oozyten vorhanden.

Die Aktivierung der Oozyten kann durch Einstechen oder Anlegen eines elektrischen Feldes induziert werden (Bataillon, 1911). Unterschiedliche Reifungszustände während des Jahreszyklus führen offenbar auch zu unterschiedlicher Verträglichkeit der Injektion.

Kalziumsignale sind an den zur Aktivierung führenden Schritten beteiligt (Baulieu *et al.*, 1978). Injektion in Gegenwart von Kalziumpuffer (10 mM EGTA) im Medium brachte keinen Vorteil, die Verletzung des Eis an der Einstichstelle schließt sich langsamer.

Elektrophysiologisch relevant ist der "Zustand" der Oozyte bezüglich der Membranstabilität und der Expressionsleistung. Beide sind zeitlich nicht miteinander und mit dem Ablasszyklus des Frosches korreliert. Ein guter Parameter zur Beurteilung des "elektrophysiologischen Zustandes" der Zellen ist die Bestimmung des Ruhepotentials. Es sollte zwischen -50 und -70 mV liegen.

BEHANDLUNG KRANKER TIERE

Dank der reichhaltigen Ausstattung mit Antibiotika (Moore *et al.*, 1991; Berkowitz *et al.*, 1990; Zasloff, 1987; Cruciani *et al.*, 1992) sind infektiöse Komplikationen (auch postoperativ) selten⁹. Kranke Tiere sollten unverzüglich isoliert werden.

Krallenfrösche sind empfindlich gegen Sulfonamide. Goldin empfiehlt 500 mg/ml Streptomycin und Penicillin als Immersion für einige Tage (nicht injizieren!). Deuchar schlägt eine Lösung einiger Tropfen 1 %iger Mercurochrom-Lösung bei "red leg" vor. Die gefürchtete Infektionskrankheit geht mit teilweiser Lyse der Gefäße einher und führt in der Regel zum Tod. Bewährt hat sich auch eine Lösung von 1 mg/ml Gentamycin. Wenn ein Drittel der Körperoberfläche mit der Lösung benetzt ist, werden innerhalb von 12 Stunden therapeutische Serumkonzentrationen erreicht. Alternativ ist ein ein- bis zweimal tägliches Bad in Colistin (50 mg/100 ml)

⁹ Die wichtigsten Hinweise zur Identifizierung und Behandlung von Infektionen und Parasitenbefall s. Fantham, 1919; Fantham, 1923; Brown, 1970; Grobbelaar, 1922; Elkan & Muray, 1952; Miles, 1950; Mohr, 1942; Nigrelli & Maraventano, 1944; Filek, 1967; Rodriguez, 1939; Sandon, 1941; Simpson, 1980; Wood, 1991; Schrire, 1928; Schrire & Greenfield, 1929; Smith, 1950; Southwell & Kirshner, 1931; Brayton, 1992.

möglich. Bei Pilzinfektionen wird ein 30-minütiges Bad in 0,002 %iger Lösung KMnO_4 empfohlen. Nach eigenen Beobachtungen eignen sich Aquafuran® und Furamor P® (beide Aquarium Münster, Telgte).

3.3 DIE ENTNAHME VON OOZYTEN

OVAR UND OOZYTEN

Wie alle Keimzellen besitzt auch die Oozyte eine ausgeprägte Polarität. Äußerlich spiegelt sie sich in der ästhetischen Zweiteilung in eine dunkle (animale) und eine helle (vegetative) Hälfte wider (s. Abb. D2, D4). Die dunkle Färbung wird von unter der Membran liegenden Pigmentgranula hervorgerufen. Die animale Hälfte enthält den Kern und den Hauptteil der Replikationsenzyme, die vegetative Hälfte enthält hauptsächlich die zur Ernährung des Embryos erforderlichen Dotterbestandteile. Die Membraneigenschaften unterscheiden sich geringfügig, über Unterschiede in der Kanaldichte gibt es widersprüchliche Angaben.

Dumont hat das Wachstum der Oozyte in 6 Stadien eingeteilt (Dumont, 1972). Die einzelnen Stadien lassen sich äußerlich durch Größe und Pigmentierungsgrad unterscheiden. In der Regel liegen alle Stadien deutlich erkennbar nebeneinander vor. Obwohl auch die kleineren Oozyten im Stadium II und III für Expressionsversuche verwendet werden können¹⁰ (Krafte & Lester, 1992; Krafte & Lester, 1989), werden für Patch-Clamp Experimente wegen der in der Regel höheren Expressionsleistung ausgereifte Oozyten im Stadium V oder VI bevorzugt. Diese Oozyten haben bei ausgewachsenen Fröschen einen Durchmesser von etwa 1 - 1,2 mm.

Es wurde das Abblanchen von bis zu 15.000 reifer Oozyten durch ein einziges Tier innerhalb eines Tages beobachtet (Elkan, 1957). Typischerweise enthält das Ovar in den 48 Ovarlappen etwa 30.000 reife Oozyten. Pro Eingriff werden etwa 2 Lappen entnommen. Colman empfiehlt das Abbinden des Sackes an der Schnittstelle, in der Regel verläuft aber sowohl das Öffnen der Bauchdecke als auch die Entnahme unblutig¹¹. Die Ovarsäcke liegen im unteren Drittel des Bauchraumes. Der Entwicklungsstand des Ovars ist in allen Teilen homogen.

¹⁰ Wegen des geringeren Zellvolumens kann man bei Ganzzellableitungen leichter ein homogenes elektrisches Feld erreichen.

¹¹ Gute Darstellungen zur Anatomie auch des vaskulären Systems zur Vermeidung der Verletzung größerer Aderbahnen und der Seitenlinienorgane siehe Grobbelaar, 1924; Millard, 1941; Deuchar, 1975; Brown, 1970.

NARKOSE UND OPERATION

Die Operation erfolgt nach Tauchbadnarkose in 1 %iger Lösung von MS222 (Tricain, 3-Aminobenzoessäurebutylester, Sandoz)¹². Die Empfindlichkeit der Tiere für die Narkose variiert, normalerweise reichen 20 bis 25 Minuten aus¹³. Die Aufwachperiode ist entsprechend variabel; üblicherweise wacht das Tier innerhalb von 1 - 2 Stunden wieder auf, wenn es in klarem Leitungswasser liegt. Während der Aufwachphase ist darauf zu achten, daß die Nase über Wasser bleibt - die Tiere sind Lungenatmer und können ertrinken. Der Eingriff wird zur Herabsetzung der Herzrate und des Stoffwechsels zusätzlich auf Eis durchgeführt (Taylor, 1930; Taylor, 1931, s. Abb. D1). Über die Zulässigkeit der Kältestarre als alleinige Narkosemethode gibt es keine ausreichend fundierten Untersuchungen¹⁴.

Der knapp 1 cm lange Einschnitt wird getrennt für Muskelschicht und Haut mit je drei Stichen genäht (NC-Seide, Braun Melsungen). Der Eingriff wird in der Regel von der Bauchseite aus vorgenommen und dauert etwa 15 Minuten. Anschließend bleibt das Tier einige Stunden im "Intensivbecken" (geringer Wasserstand, Nase über Wasser gehalten). Einige Autoren empfehlen, dem Wasser 0,5 % Seesalz zuzusetzen.

Operiert wird abwechselnd rechts und links, der Zustand der frischesten Narbe reicht als Indikator für die Wiederverwendbarkeit eines Tieres aus. Die Narben heilen nach etwa 4-6 Wochen ab. Die Versuchsgenehmigung sah 10 Eingriffe pro Tier vor, es sind jedoch durchaus auch mehr Operationen pro Frosch möglich¹⁵. Es wurden möglichst zwei Frösche gleichzeitig operiert, da keine sichere Vorhersage über die voraussichtliche Qualität der Oozyten möglich ist. Sigel empfiehlt Markierung der Tiere und möglichst häufige und regelmäßige Operation produktiver Tiere (Sigel, 1990). Zur Markierung wird Beschneiden der Krallen, Tätowierung oder Markierung der Schwimmhäute mit farbigen Perlen empfohlen (Wolf & Hedrick, 1971; Gurdon, 1967). Die Perlen werden nach etwa drei Monaten abgestoßen. Die Tätowierung erwies sich bei dunklen Tieren als zu kontrastarm um eine zuverlässige Identifizierung zu gewährleisten. Krallen müssen ebenfalls alle 2 - 3 Monate nachgeschnitten werden. Angesichts dieser Unsicherheiten scheint es einfacher, schlechte Tiere möglichst früh auszusondern.

¹² Konzentrationen über 3,5% sollten vermieden werden (Goldin, 1992)

¹³ Ausreichendes Zeichen für erreichte Narkosetiefe ist das Ausbleiben des Reflexes bei Berühren des Kehlkopfs. Colman warnt vor Kanzerogenität des Narkotikums (Colman, 1987a), diese Befürchtung ist jedoch weder von der Fa. Sandoz noch vom BGA bestätigt worden.

¹⁴ Für weitere Hinweise zur Narkose siehe (Hobson & Townsend, 1967; Parker, 1939; van Leeuwen & van der Made, 1916; Stefanová *et al.*, 1962; Bové, 1992; Unger, 1918; Kaplan, 1969; Bonath, 1977).

¹⁵ Das Nahtmaterial wird abgestoßen, teilweise findet man jedoch noch recht lange Reste im Inneren des Frosches. Dieses Nahtmaterial wurde eher aus traditionellen als aus rationellen Gründen verwendet; Versuche mit resorbierbarem Nahtmaterial wurden nicht unternommen.

VEREINZELUNG DER OOZYTEN

Nach der Entnahme werden die Oozyten in antibiotikahaltiger Barthlösung (vgl. Abs. 3.8) aufbewahrt. Zunächst werden sie durch Zusatz von Kollagenase (1 - 2 mg/ml, Typ IA, Sigma, je nach Aktivität, die Behandlung sollte nicht länger als drei Stunden dauern) unter leichtem Schütteln aus dem Bindegewebsverband gelöst. Anschließend werden die Oozyten gründlich in Barthlösung gespült und die verwendbaren Oozyten des Stadiums V und VI heraussortiert (Abb. D2). Die Oocyte ist von innen nach außen von der Vitellinmembran, einer Lage von hormonspendenden Follikelzellen, Bindegewebszellen und Epithelzellen des Ovars umgeben (Abb. D3). Die Oozyten können auch manuell mit Pinzetten oder einer Platindrahtschleife vereinzelt werden. Die Injektion durch die dann noch vorhandenen, umgebenden Zellschichten hindurch erfordert kräftigere Pipetten und die Verletzungsrate der Oozyten ist höher. Wird in Anwesenheit von Follikelzellen injiziert, schließt sich die Kollagenasebehandlung am zweiten Tag an. Die Follikelzellschicht wird in diesem Fall nur angedaut und ebenfalls manuell mit Pinzetten entfernt.

Neben dem Argument, die Kollagenase könne die Zellmembran destabilisieren, scheint es kaum Vorteile des aufwendigen manuellen Verfahrens zu geben. Soreq berichtet allerdings von deutlichen Nachteilen bei Expression von Cholinesterase, wenn die Oocyte vor der Injektion mit Kollagenase behandelt wurde (Seidman & Soreq, 1990). Einige Autoren legen großen Wert auf kalziumfreie Lösungen während der Kollagenasebehandlung, um die Aktivierung von Proteasen zu verhindern. Je nach Saison kann der Aufenthalt in kalziumfreier Lösung die Zellmembran aber schon merklich schwächen.

Speziell das Lösen der durch gap junctions verbundenen Follikelzellen (Browne & Werner, 1984), führt zu einem mehr oder weniger ausgeprägten Zusammenbruch des Ruhepotentials der Zelle. Einige Autoren empfehlen daher, die Injektion erst am nächsten Tag durchzuführen. In der Regel haben die injizierten Oozyten 5 bis 8 Tage in Kultur überlebt. In Ausnahmefällen konnten Ströme auch noch nach 21 Tagen nachgewiesen werden. Eine ausreichende Expressionsdichte wurde innerhalb von 2 bis 3 Tagen nach Injektion erreicht.

INJEKTION DER MRNA

Die Injektionspipetten bestehen aus unfilamentiertem Glas (Außendurchmesser 1,3 mm, Innendurchmesser 0,8 mm, Hilgenberg, Malsfeld). Sie werden mit einem Vertikalpuller (Elektrodenziehgerät; L/M-3P-A, List Medical, Darmstadt) zu einer möglichst langen und parallel verlaufenden Spitze (etwa 0,8 cm) ausgezogen¹⁶. Die Spitze wird unsymmetrisch ge-

¹⁶ In einer möglichst lang ausgezogenen Spitze kann das Injektionsvolumen besser abgeschätzt werden. Soll das Injektionsvolumen genau dosiert werden, bieten sich Schrittmotor-getriebene Spritzen an.

brochen (Öffnungsdurchmesser etwa 18 μm) und zu einer glatten Spitze geschmolzen (Mikroschmiede, L/M-CP2101, List Medical, Darmstadt). Der Öffnungsdurchmesser der fertigen Spitze betrug circa 5 μm ¹⁷.

Die mRNA wurde aus einem Hämatokritröhrchen von vorne in die Injektionspipette eingesogen. Die Injektionspipetten wurden vorher nicht autoklaviert. Ein Kontrollversuch zur mRNA-Konzentrationsbestimmung vor und nach simulierter Injektion zeigte minimale Verluste durch enzymatischen Abbau.

Zur Injektion werden die Oozyten in eine Plexiglasschablone mit einer linearen Reihe von etwa 40 vorgefertigten Mulden gelegt. Da ein die Oozyte umgebender Flüssigkeitsfilm die Injektion erschwert, wird die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die Injektionspipette mit einem Manipulator ins Ei geführt. Bei ungestörtem Ablauf (saubere RNA Präparation) kann die Injektion von etwa 40 Oozyten¹⁸ innerhalb einer viertel Stunde abgeschlossen werden. Der Injektionsrhythmus sollte so abgestimmt sein, daß die Membran nicht zu stark austrocknet.

Die Injektion erfolgt durch Anlegen eines Überdrucks (etwa 800 - 1200 hPa, Stickstoff, Injektionsdauer etwa 1 Sekunde für 50 nl; Mikroinjektor 5242, Eppendorf, Hamburg). Das Injektionsvolumen wurde visuell nach Volumenzunahme der Oozyte bemessen.

Nach Injektion werden die Oozyten bei 19 °C inkubiert (Kühlbrutschrank Serie BFEK, WTB Binder, Tuttlingen). Temperaturen um 25 °C erhöhen die Syntheserate, vermindern aber auch die Lebensdauer der Oozyte. Ab 30 °C produziert die Oozyte Hitzeschock-Proteine (Colman, 1987a).

¹⁷ Der erforderliche Öffnungsdurchmesser hängt entscheidend von der Reinheit der Nukleinsäurepräparation ab; besonders während kritischer Saisonphasen kann Sorgfalt bei der Herstellung der Pipettenspitze und bei der Abstimmung des Injektionsdrucks die Überlebensrate entscheidend erhöhen.

¹⁸ Normalerweise wurden zwischen 30 und 40 Oozyten pro mRNA injiziert.

3.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE METHODEN

DIE ELEKTRISCHEN EIGENSCHAFTEN DER ZELLMEMBRAN

"In the mid 1970s two significant events occurred. First, the basic problem of feedback circuit design was addressed in a simple and understandable way by Katz and Schwartz. Until then, constructing voltage-clamp amplifiers was largely a cut-and-try affair. Afterwards scientists and engineers knew what was required for success and a thousand clamps grew. Second, a commercially available and successful voltage-clamp amplifier for clamping with microelectrodes was produced by the Dagan Corporation. Stories abounded of scientists from all over the world going home from Minneapolis with (literally and figuratively) little black boxes under their arms.

Because of these developments, interest in voltage clamping and the voltage-clamp literature have flowered enormously. The results have not all been beautiful (because innocents with black boxes do not always know what they are doing), but they have been mainly positive and will continue to be so." (Smith & Lecar, 1985)

Hodgkin und Huxley entwickelten in ihren wegweisenden Arbeiten zur Theorie der Membranleitfähigkeiten ein Modell, das die Zellmembran als Parallelschaltung von ionenspezifischen RC-Gliedern darstellt (Hodgkin & Huxley, 1952)¹⁹. Der Widerstand des RC-Glieds ist durch die kanalvermittelte Leitfähigkeit der Lipidmembran, die Kapazität durch die dielektrischen Eigenschaften des Lipidisolators, der die Elektrolyte trennt, bestimmt. Eine reine Lipidmembran besitzt eine spezifische Kapazität von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und einen spezifischen Widerstand von $10 \text{ G}\Omega/\text{cm}^2$ (Auerbach & Sachs, 1984). Die Impedanz der RC-Glieder ist frequenzabhängig, bei hochfrequenten Messungen sind die Antwortzeiten der einzelnen Komponenten der Meßapparatur zu beachten.

DIE PATCH-CLAMP TECHNIK

Leitfähigkeitsänderungen in Nervenzellen durch Öffnen von Ionenkanälen in der Zellmembran führen zu einer Veränderung des Membranpotentials. Cole und Marmont entwickelten Ende der 40er Jahre die Idee, die Membranspannung auf einem konstanten Wert zu halten, um so den zeitlichen Verlauf der Leitfähigkeitsänderungen direkt durch die Änderung des Membranstroms verfolgen zu können (Cole, 1949; Marmont, 1949).

Abb. 3.1 gibt eine schematische Darstellung der Verstärkerschaltung wieder. Das Membranpotential wird gemessen und ein Operationsverstärker vergleicht das aktuelle Potential mit dem

¹⁹ Da sich der Gesamt Widerstand von Parallelschaltungen aus der Summe der Kehrwerte der Einzelwiderstände (Leitfähigkeiten) ergibt, ist die Verwendung der Leitfähigkeit in der elektrophysiologischen Literatur gebräuchlicher als die des Widerstandes.

Sollwert. Besteht zwischen beiden eine Differenz, fließt solange Strom durch die Meßelektrode, bis das gewünschte Potential wieder erreicht ist. Öffnen sich Ionenkanäle in der Membran, wird der fließende Strom mit möglichst geringer Zeitverzögerung durch den Verstärker kompensiert. Der Begriff des "voltage clamps" bezeichnet das Konstanthalten der Spannung bei sich ändernder Membranleitfähigkeit.

Mit der Zeit wurde die Rauschcharakteristik und der Frequenzgang des Feedback-Verstärkers soweit verbessert, daß die Messung von pA-Strömen im kHz-Bereich möglich wurde. Parallel

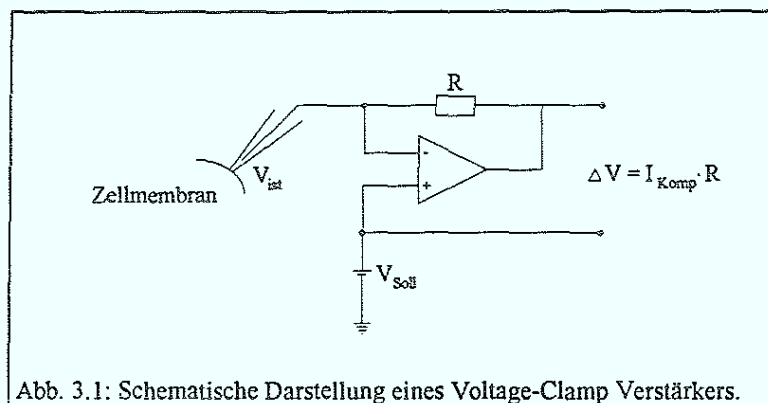


Abb. 3.1: Schematische Darstellung eines Voltage-Clamp Verstärkers.

konnten die Leckströme zwischen Membran und Pipettenglas vermindert werden, so daß das Signal-Rauschverhältnis verbessert wurde²⁰. Die technischen und methodischen Fortschritte, die heute die Auflösung von Einzelkanalströmen erlauben, wurden 1991 mit dem Nobelpreis für Sakmann und Neher bedacht.

Traditionell wurden für Ganz-Zell ("whole-cell", s. Abb. 3.2) Ableitungen Verstärker mit getrennter Strom- und Spannungselektrode eingesetzt. Verwendet man Verstärkersysteme, die zur Strom- und Spannungskontrolle die gleiche Elektrode benutzen, kann man mit der Meßelektrode einen Teil der Membran (Patch, einige μm^2) von der Zelle abziehen ("excised Patch", s. Abb. 3.2, erstmals beschrieben in Horn & Patlak, 1980, verbessert in Hamill *et al.*, 1981). Voraussetzung ist, daß sich zuvor durch Anlegen eines leichten Unterdrucks und sorgfältiges Design der Pipettenspitze eine mechanisch stabile und elektrisch dichte Verbindung (seal) zwischen Membran und Elektrodenglas gebildet hat.

Da nur ein kleines, isoliertes Membranstück untersucht wird (vgl. Abb. D4 und D7), ist das elektrische Feld über der untersuchten Membran homogener als bei Ableitungen in der whole-cell Konfiguration. Außerdem ist die Kontrolle und Veränderung des ionischen Milieus auf der intrazellulären Seite erleichtert. Unterschiedliche Meßlösungen können direkt an die Membran gespült werden (s. Abb. D7). Die Gefahr undefinierter Meßbedingungen durch unkontrollierten

²⁰ Bei einem Widerstand von 100 G Ω betrüge das mittlere thermische Rauschen 0.13 pA, das entspricht bei 10 kHz Filterbandbreite 0,8 pA "peak to peak". Die kleinsten auflösbaren Ströme hätten somit Amplituden von mindestens 1,6 pA. Zudem wird das Signal durch das Rauschen des Verstärkers überlagert, das ungefähr linear mit der Aufnahmefrequenz zunimmt (Auerbach & Sachs, 1984).

Austausch von intrazellulärem Medium gegen die Meßlösung in der Elektrode besteht im Gegensatz zur Ganzzelleableitung nicht. Die maximal gemessenen Ströme sind entsprechend geringer als bei whole-cell Messungen ($< 25 \text{ nA}$ im Vergleich zu μA).

Man unterscheidet zwei unterschiedliche Patch-Clamp Konfigurationen: ist die Membranınnen-seite der Pipettenöffnung zugewandt, spricht man von "inside-out" Patchen, ist die Membranaußenseite der Pipettenöffnung zugewandt, spricht man von "outside-out" Patchen (vgl. Abb. 3.2).

Weiter unterscheidet man makroskopische Messungen mit unbestimmter Anzahl von Kanälen im Patch von Einzelkanalmessungen. Makroskopische Messungen eignen sich zur Bestimmung

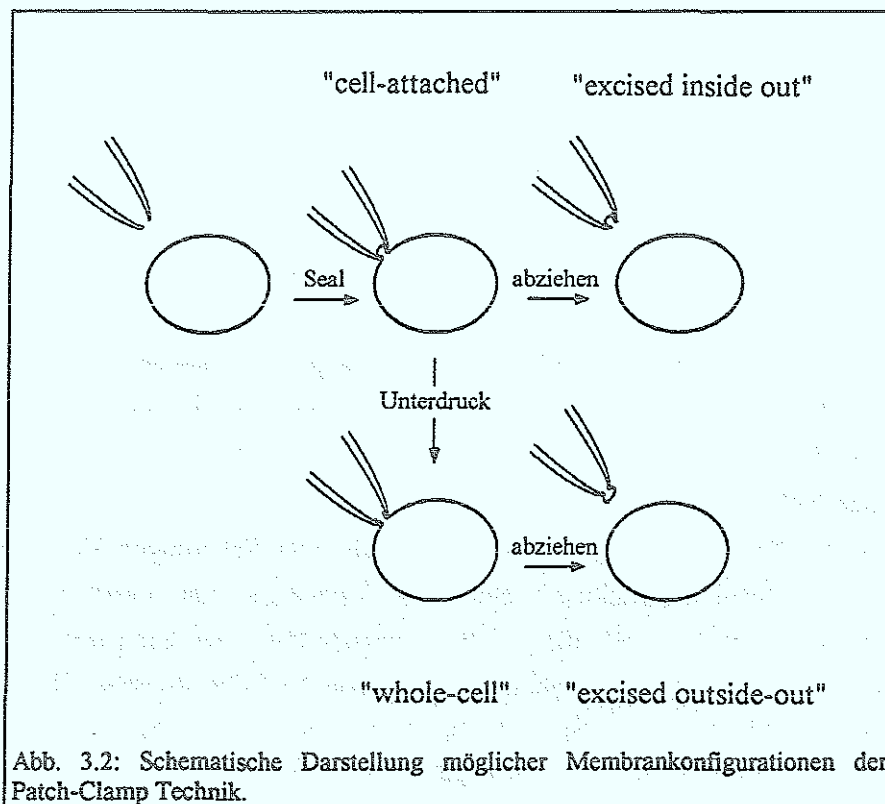


Abb. 3.2: Schematische Darstellung möglicher Membrankonfigurationen der Patch-Clamp Technik.

von Parametern, die hohe Genauigkeit in der Amplitude und geringe Zeitauflösung erfordern, z.B. Dosis-Wirkungskurven. Die hierfür verwendeten Pipetten haben Widerstände zwischen $0,8$ und $4 \text{ M}\Omega$ in 100 mM Kaliumchloridlösung.

Einzelkanalmessungen erlauben im Gegensatz dazu die Bestimmung kinetischer Parameter mit einer Zeitauflösung von mehreren kHz , so daß einzelne Öffnungs- und Schließereignisse aufgelöst werden können. Pipetten für Einzelkanalmessungen haben Widerstände $> 10 \text{ M}\Omega$ und ergeben Sealwiderstände um $50 \text{ G}\Omega$. Die extrem kleinen Ströme (einige pA) erfordern große Sorgfalt bezüglich der Minimierung des Leckstroms und des Hintergrundrauschens²¹.

AUFBAU DES PATCH-CLAMP MEßSTANDES

Abb. 3.3 und 3.4 (vgl. auch Abb. D5 und D6) geben eine schematische Skizze des Meßstandes und der elektrischen Schaltung wieder²². Der Meßstand basiert auf einem Luigs und Neumann LN-PCT-2 "Patch Clamp Tower" (Luigs und Neumann, Ratingen)[1]. Zur Dämpfung niederfrequenter Schwingungen ruht die Apparatur auf einer Luftpolster-gedämpften Steinplatte (Stabilisator Phoenix SPZB 07 R, Reiff, Reutlingen).

Die AgCl-Meßelektrode [7] ist über einen BNC Stecker mit dem Vorverstärker [8] des EPC-7 Patch-Clamp Verstärkers (List electronic, Darmstadt) verbunden [17]. Der Vorverstärker ist

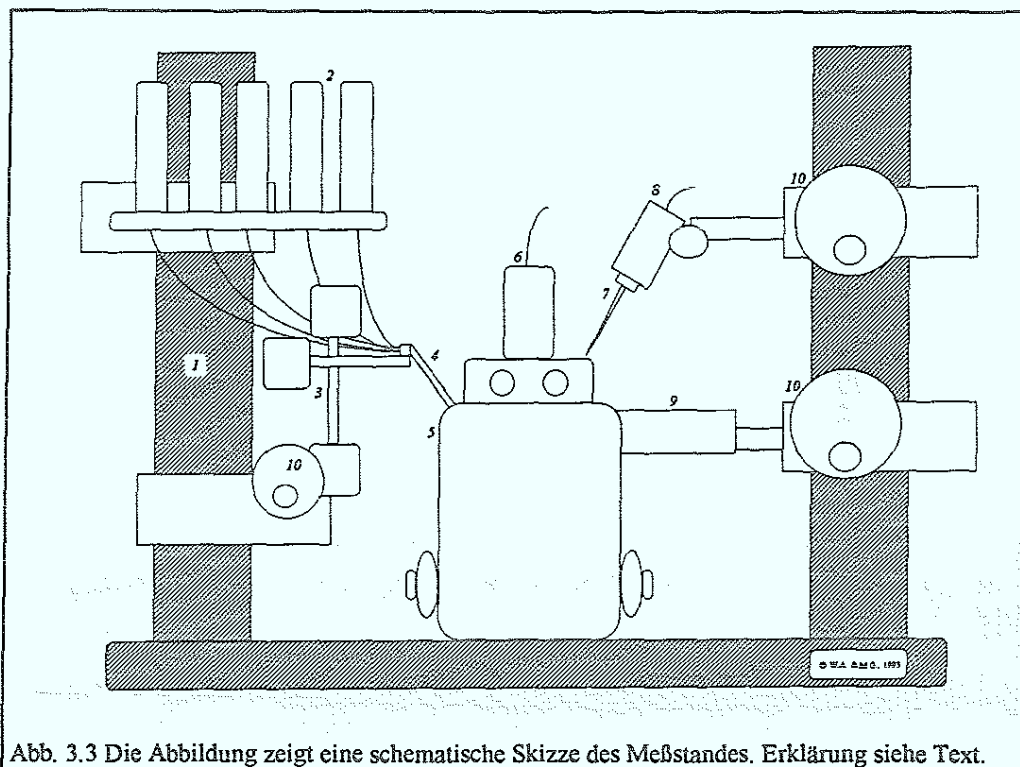


Abb. 3.3 Die Abbildung zeigt eine schematische Skizze des Meßstandes. Erklärung siehe Text.

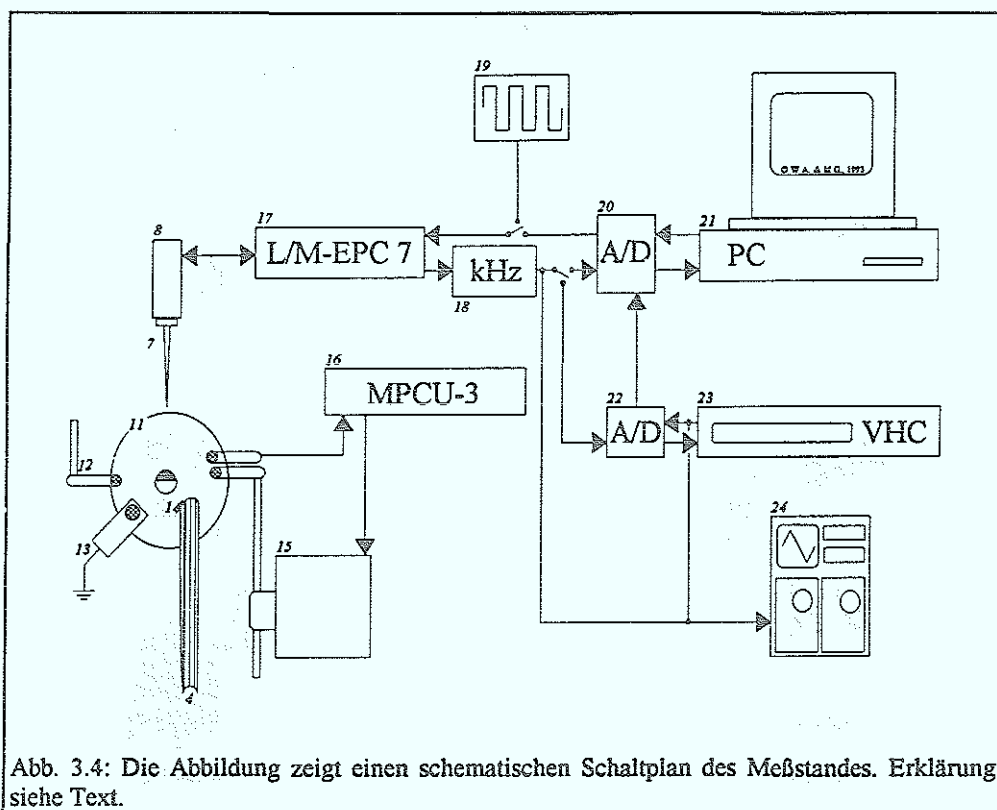
durch piezo- und manuelle Manipulatoren [10] am Gerüst des Standes angebracht. Die Halterung [9] für die Meßkammer [11] erlaubt die Kontrolle der Temperatur über einen externen Regler (LN Temperature Controller, Luigs und Neumann, Ratingen). Alle Messungen wurden

²¹ Einführungs- und Übersichtsartikel zu unterschiedlichen Möglichkeiten der Patch-Clamp Technik siehe Smith, 1985; Hamill *et al.*, 1981; Fenwick *et al.*, 1982; 1983; Auerbach & Sachs, 1985; Auerbach & Sachs, 1984; Fishman, 1981; Neher & Sakmann, 1992; Neher, 1988; Neher, 1986; Sachs & Auerbach, 1983).

²² Die Ziffern in eckigen Klammern beziehen sich auf die Darstellung in Abb. 3.3 und 3.4, die Großbuchstaben auf Abb. 3.5. Vgl. auch Abb. D5 und D6.

bei Raumtemperatur durchgeführt (18 - 23 °C). Als optische Bestandteile wurde ein Invertmikroskop [5], (IM 35, Zeiss, Oberkochen), sowie eine CCD-Kamera [6], (FK-6712-IQ, Pieper), verwendet.

Die Perfusionspipette [4, G] wird über einen Schrittmotor-gesteuerten Manipulator [3 und Abb. 3.5] positioniert. Neben der Perfusionspipette ist eine Harzkugel [H] (Durchmesser ca. 50 µm, Harz: RTV 615 A+B, General Electric, Waterford, NY, USA) befestigt, die das Öffnen von geschlossenen Membranvesikeln in der Patchelektrode erleichtert [14, H] (Hamill *et al.*, 1981). Die Flußrate der Meßlösungen wird durch den hydrostatischen Druck zwischen Vor-



ratsbehältern [2, A] und Perfusionsöffnung reguliert. Die Messungen wurden mit Flußraten von ca. 0,3 ml/min durchgeführt²³. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, das Medium in der Meßkammer [11] durch einen separaten Zulauf mit ca. 1 ml/min auszutauschen [12], um die Oozyte gegen eventuelle Beeinflussung durch Perfusionslösungen zu schützen. Der Flüssigkeitspegel in der Meßkammer wird elektronisch reguliert (MPCU-3, List-electronics, Darmstadt) [Absaugpumpe 15, Steuergerät 16].

²³ Es wurden alternative Systeme zur Steuerung der Fließgeschwindigkeit über Gleichstrommotoren oder das Mischen kontinuierlicher Konzentrationsgradienten entwickelt, die jedoch in den hier gezeigten Messungen nicht zum Einsatz kamen.

Alle Messungen wurden mit Ag/AgCl Elektroden unter Verwendung von Chloridlösungen durchgeführt. Die Referenzelektrode [13] ist über eine Agarbrücke (3 % in 2 M KCl) mit der Badlösung verbunden (für weitere Hinweise siehe Ives & Janz, 1961; Janz & Ives, 1968; Barry, 1989; Barry & Diamond, 1970; Alvarez-Leefmans, 1992).

Die Aufzeichnung der Signale erfolgt nach Verstärkung in Vor- [8] und Hauptverstärker [17], ggf. Filterung (8-Pol Bessel Filter, Frequency Devices, Haverhill, MA, USA) [18] und A/D-Wandlung (TL-1, DMA Interface, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) [20] durch einen 386er PC [21], oder alternativ durch einen Videorecorder [23] (RTV-750 HiFi, Blaupunkt, Hildesheim, mit VR-10A Wandler (List-electronics, Darmstadt) [22]). Zur Online Kontrolle der Signale wurde parallel ein Oszilloskop (Typ 1425, Gould, Hainault, England) [24] verwendet. Die Aufzeichnung und ein Teil der Auswertung der Daten wurden durch das Programm pClamp (Version 5.5, Axon Instruments) gesteuert. Zur Abschirmung gegen elektrische Felder im Meßlabor ist die Apparatur von einem Faradayschen Käfig umgeben²⁴.

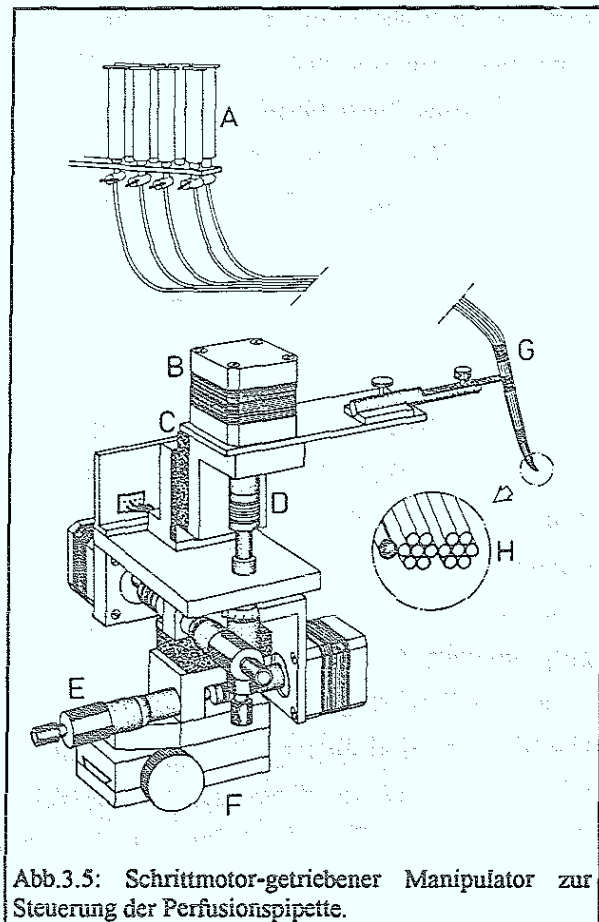


Abb.3.5: Schrittmotor-getriebener Manipulator zur Steuerung der Perfusionspipette.

DAS PERFUSIONSSYSTEM

Ein abgezogener Membranpatch ist in der Regel nicht planar, sondern liegt im Randbereich je nach Pipettendurchmesser und Form der Spitze omega-förmig an der Innenwand der Pipette an (Ruknudin *et al.*, 1991). Perfundierte Lösungen dürfen daher nicht zu langsam an den Patch gespült werden, wenn die gesamte Fläche gleichmäßig und mit geringen Totzeiten von der Messlösung erreicht werden soll. Perfusionsysteme, bei denen die Messlösung durch Austausch der Badlösung an den Patch gespült wurde, zeigten Antwortzeiten von etwa 10 Minuten bis zur Einstellung der neuen Gleichgewichtsbedingungen. Es wurde daher ein

²⁴ Für Literaturhinweise zu Patch-Clamp Meßständen vgl. Levis & Rae, 1992; Hille, 1992; Dempster, 1988; Smith, 1985; Sakmann, 1983.

Perfusionssystem entwickelt, das den Patch in einem kräftigen, laminaren Strom von Meßlösung hält (vgl. Abb. D7) und totvolumenfreie Lösungswechsel erlaubt. Zur optimalen Reproduzierbarkeit der Strömungsbedingungen wurde eine Schrittmotorsteuerung für die Perfusionspipette entwickelt. Die Steuerbefehle wurden in das Meßmodul von Clampex integriert, so daß die Information über die jeweils verwendete Messlösung zusammen mit den Ergebnissen abgespeichert wird (s. Seite 38).

Die Perfusionspipette besteht aus einem ausgezogenen Bündel von zweimal 7 konzentrisch angeordneten Borosilikatglaskapillaren (1,3 mm Außendurchmesser, 0,3 mm Wandstärke, Hilgenberg, Malsfeld) [G, H]. Die Vorderseite wird über einer Bunsenbrennerflamme ausgezogen und auf einen offenen Durchmesser von ca. 30 μm pro Öffnung geschnitten. Auf der Rückseite werden sie über Polyethylenschläuche mit den Vorratsbehältern (Einmal-Plastikspritzen) verbunden [A]. Der Fluß der Lösungen kann einzeln über manuelle Ventile an- und abgeschaltet werden.

Die Glaskapillaren werden mit einem Schrittmotor-getriebenen Mikromanipulator positioniert. Die Motoren [B] (16 Ncm) werden über eine CNC 10 Steuerung mit Interfacekarte 4.0 für drei Achsen (alle Isert electronics, Eiterfeld) angesteuert. Die Steuerbefehle werden aus dem Meßprogramm über eine RS232 Schnittstelle an die CNC-Steuerung übergeben. Die x,y,z-Koordinaten der einzelnen Öffnungen sind relativ zur Position der Öffnung für die Kontrollösung programmiert. Die Positionierung der Patchpipette vor der Kontrollösungskapillare nach Abziehen des Patches von der Oozyte erfolgt manuell.

Die Motoren sind über Kupplungen [D] (MK1, Serie 5, R+W, Erlenbach) und Mikrometerschrauben [E] (0-25, #150-192, Mitutoyo) mit Kreuzrollenführungsschlitten [C] (NK 2-50, Schneeberger, Höfen/Enz) verbunden. Das System wird mit einem manuellen Trieb grob positioniert [F]. Der Fahrweg ist auf 2,5 cm ausgelegt; die kleinste Verfahreinheit ist 1,25 μm , die maximale Geschwindigkeit 1,25 cm/s. Typische Wechselzeiten zwischen einzelnen Öffnungen liegen bei 100 ms. Für weitere Details siehe (Altenhofen *et al.*, 1993).

Die Kosten der Bauteile des Systems betragen etwa 1000,- DM für den Manipulator und 1600,- DM für die Steuerung. Vergleichbare käufliche Systeme liegen bei etwa 15.000,- DM und bieten nicht den Komfort der integrierten Ansteuerung aus dem Meßwerterfassungsprogramm.

3.5 DURCHFÜHRUNG DER MESSUNGEN

Es wurde ausschließlich an "inside-out" (s. Abb. 3.2) Patchen gemessen. Für alle Messungen wurden Patchelektroden aus filamentiertem Borosilikatglas, Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm (Hilgenberg, Malsfeld) verwendet. Die Elektroden wurden mit einem DMZ-Universal Puller gezogen und feuerpoliert (Zeitz-Instrumente, Augsburg). Teilweise wurden die Spitzen zusätzlich manuell poliert (L/M-3P-A, List Medical, Darmstadt). Einige der Elektrodenspitzen für Einzelkanalmessungen wurden zur Verminderung des Rauschens an der Spitze mit Harz (RTV, s. o.) überzogen²⁵. Die Meßlösung wurde von hinten mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette eingefüllt.

Unmittelbar vor der Messung wurde die Vitellinmembran der Oozyte mit feinen Pinzetten (Dumont Pinzette Nr. 5, Biologie) in hypertonischer Kaliumaspartat Lösung (s. Abs. 3.8) (Methfessel *et al.*, 1986) entfernt. Anschließend wurde die Oozyte mit einer abgebrochenen, glatt geschmolzenen Pasteurpipette in die Meßkammer überführt²⁶. Als Meßkammer dienten Deckel von Gewebekulturschalen (35 x 10 mm, Nunclon Delta, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland), mit einem Plexiglaseinsatz. Die Meßkammer war mit SIS (s. Lösungen, Abs. 3.8) gefüllt.

Nach 5 bis 10 Minuten haftet die Oozytenmembran am Kunststoff der Schale, so daß sie einen behutsamen Transport zum Meßstand übersteht ohne sich zu lösen. Es ist erheblich schwieriger, von frei treibenden Oozyten seals zu erhalten. Vermutlich liegt das jedoch nicht an der Technik des Sealens sondern am Zustand der Membran dieser Oozyten. Probleme beim Absetzen treten gehäuft während der generell schwierigen Sommerperiode bei Oozyten auf, die in hypertonischer Lösung nicht oder nur wenig schrumpfen.

MAKROSKOPISCHE STROMMESSUNGEN

Bei CNG-Kanälen wird das Maß der Aktivierung in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration und der Spannung gemessen. Der Meßparameter für die Aktivierung ist der Strom, der durch den Kanal fließt.

Die digital vom Computer vorgegebenen Spannungswerte des Meßprotokolls werden über einen Wandler in ein analoges Spannungssignal umgewandelt. Gleichzeitig wird über einen zweiten Kanal des Wandlers die analoge Stromantwort der Kanäle in ein digitales Signal umgewandelt und als Datenvektor gegen die Zeit im Computer gespeichert.

²⁵ Durch Isolierung der Grenzschicht zwischen Glas und Wasser wird kapazitives Rauschen vermindert.

²⁶ Die von der Vitellinmembran befreite Oozyte ist mechanisch empfindlich. Luftkontakt führt in der Regel zur Zerstörung der Membran.

Zur Aufnahme der Dosis-Wirkungskurven wurden die Stromantworten in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Ligand gemessen (s. Abb. 3.6) und vom jeweils ohne Ligand erhaltenen Leckstrom abgezogen.

IONENSELEKTIVITÄTSMESSUNGEN

Makroskopische Ionenselektivitätsmessungen wurden unter bilionischen, symmetrischen Bedingungen mit jeweils 100 mM einwertiger Kationen und sättigenden cGMP-Konzentrationen durchgeführt. Das Kation auf der Membranninnenseite wurde ausgetauscht. Die Patchpipette war jeweils mit 100 mM Kaliumchlorid Lösung gefüllt. Es wurden wie zuvor Stromantworten auf Spannungsrampen gemessen und das Umkehrpotential nach Abzug des Leckstroms bestimmt.

Am Umkehrpotential ist der Nettofluß der Ionen über die Membran gleich Null. Es kann gleich dem Nernst-Potential werden, wenn der Kanal nur für eine Ionensorte permeabel ist, bzw. wenn nur eine Ionensorte für den Transport angeboten wird. Die Bestimmung der Selektivität aus der Permeabilität beruht auf der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Gleichung 3.1, Goldman, 1943; Hodgkin & Katz, 1949).

$$E_{\text{rev}} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{P_K [K]_a}{P_X [X]_i} \quad \text{Gl. 3.1}$$

E_{rev} = Umkehrpotential in V

$$R = 8,314 \frac{\text{J}}{\text{Mol} \cdot \text{K}}$$

z = Wertigkeit des permeablen Ions (hier immer 1)

$$F = 96485 \frac{\text{C}}{\text{Mol}}$$

$[\]$ = Konzentration des betrachteten Ions²⁷, a steht für Membranaußenseite, i für Membranninnenseite

P = Permeabilität des betrachteten Ions

²⁷ Die Formel verwendet Aktivitätskoeffizienten. Da die Aktivitätskoeffizienten alle sehr ähnlich sind (zwischen 0,77 und 0,75), wurden die Konzentrationswerte nicht in Aktivitätswerte umgerechnet.

Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung geht von einer konstanten Feldstärke über der Membran und unabhängiger Wanderung der einzelnen Ionen aus. Beide Annahmen sind stark vereinfachend, eine exakte physikalische Beschreibung des Transportvorgangs durch Ionenkanäle ist jedoch nicht verfügbar.

Die gemessenen Umkehrpotentiale wurden nicht um Diffusionspotentiale korrigiert, nachdem die unter experimentellen Bedingungen gemessenen Diffusionspotentiale nicht hinreichend reproduzierbar waren und mitunter bis zu 30 % von den theoretisch zu erwartenden Werten abwichen (Daten nicht gezeigt). Als Leckstrom wurde der in Abwesenheit von cGMP gemessene Strom mit gleicher KCl Konzentration auf beiden Seiten der Membran abgezogen. Dieses Verfahren ist zulässig, wenn der Leckstrom nicht selektiv ist und alle Leitfähigkeiten über die gemessene Zeit konstant bleiben. Es wurden nur Versuche ausgewertet, bei denen diese Einschränkungen hinreichend erfüllt sind.

Insgesamt schwanken die Werte für die Ionenselektivitätsmessungen stärker als die Aktivierungsparameter. Es ist wahrscheinlich, daß die verschiedenen Ionen nicht nur in unterschiedlicher Weise mit dem "Selektivitätsfilter" in der Pore wechselwirken, sondern über eine Vielzahl von Bindestellen, die über das Protein verteilt sind und seine Funktion beeinflussen.

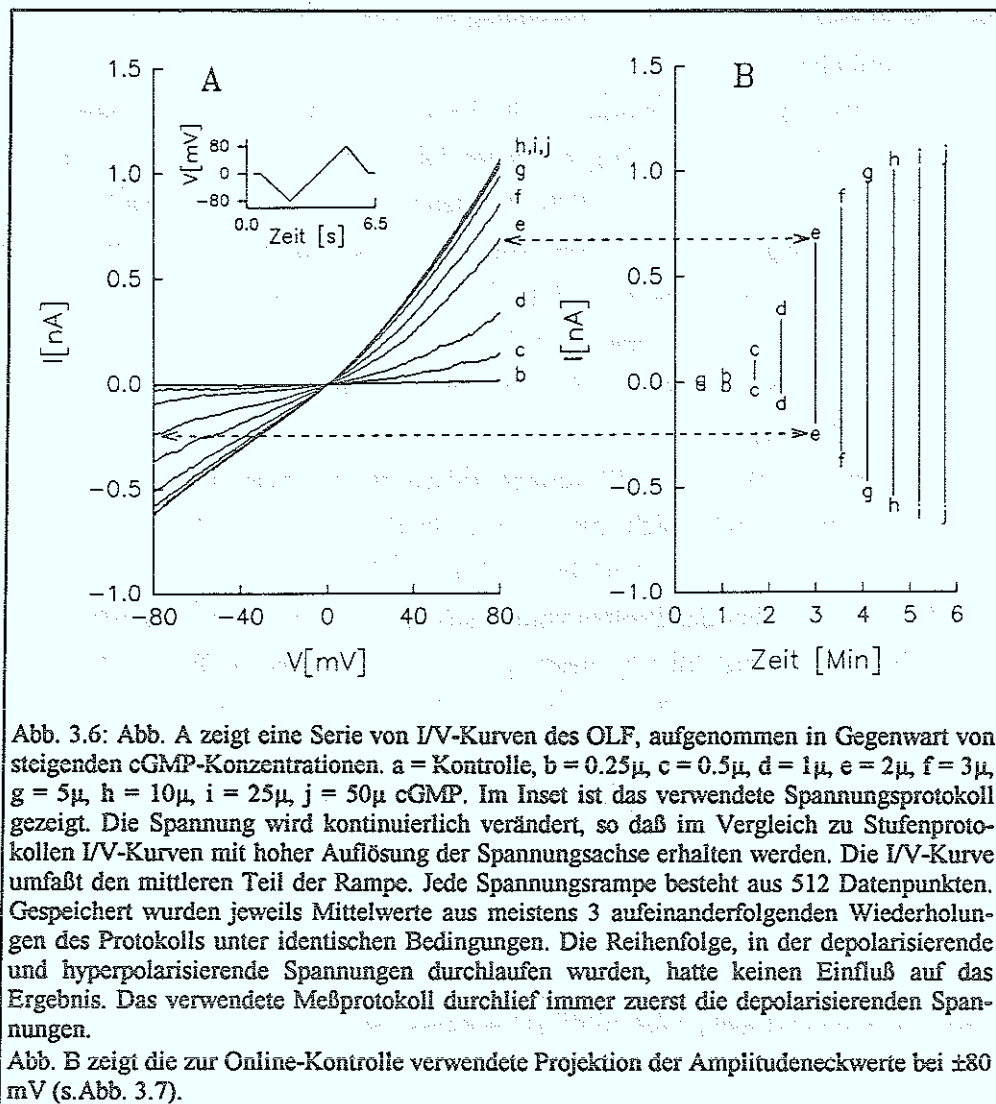
Manchmal wurde bei Ionenselektivitätsmessungen ein "artifizieller" Offset beobachtet: Nach Korrektur des Offsets bei offener Pipette (ohne Membran) zu Beginn des Experiments trat oft nach Bildung eines hochohmigen Seals ein erneuter Offset auf. Ähnliche Beobachtungen werden auch von Rae berichtet (Rae & Levis, 1984). Für diesen Effekt gibt es bislang keine einleuchtende Erklärung (Rae *et al.*, 1988). Der Offsetabgleich wurde daher nach Bildung eines seals bei geöffneten Kanälen vorgenommen.

3.6 ENTWICKLUNG VON MEß- UND AUSWERTESOFTWARE

Die Möglichkeit zur direkten Bewertung von Meßergebnissen durch pClamp ist sehr begrenzt. Vom Meßmodul des Programms aus ist lediglich die visuelle Beurteilung einzelner I/V-Kurven möglich. Außerdem kann je ein Meßwert einer Datenspur in ein separates ASCII Ergebnisfile ausgelesen werden.

Vor allem die schnelle, zeitabhängige Veränderung der Eigenschaften der Kanäle und die Variabilität der Ergebnisse von Patch zu Patch machten Erweiterungen der Meß- und Auswertesoftware notwendig.

DIE ONLINE AUSWERTUNG

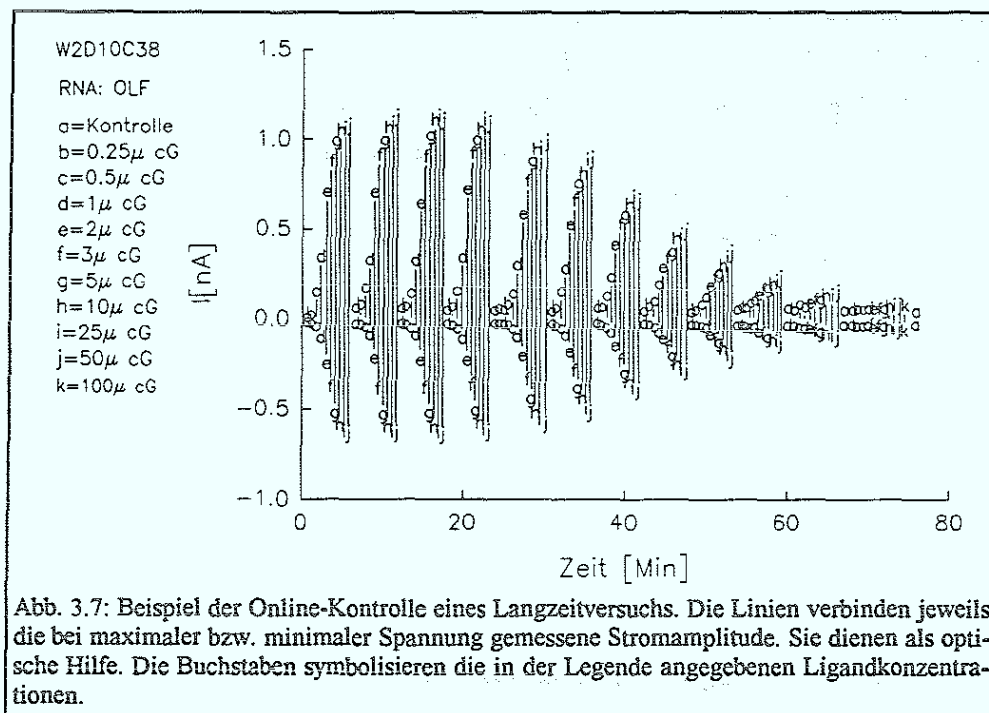


Um wichtige Versuchsparameter auch bei längeren Versuchsreihen (z.B. Stromamplitude in Gegenwart verschiedener Ligandkonzentrationen) sofort auf dem Bildschirm vergleichen zu können, wurde Clampex um zwei Module erweitert. Das Erste übernimmt die Speicherung und den Ausdruck einer Zusammenfassung der wichtigsten Parametervorgaben und Ergebnisse (Zusammensetzung der Bad- und Perfusionslösung, Zeit seit Abziehen des Patches, Anzahl der gemittelten Rampen, Soll- und Ist-Spannungswerte unter Berücksichtigung der Kompensation des Serienwiderstands, maximale Stromamplituden).

Das zweite Modul dient dem direkten graphischen Vergleich der Versuche, die an einem Patch durchgeführt wurden. Die Darstellung der Stromwerte erfolgt dabei nicht wie üblich gegen die Spannung. Die 512 Datenpunkte eines Files werden auf die maximale und minimale Stromamplitude reduziert und gegen die Zeit seit Abziehen des Patches aufgetragen (vgl. Abb. 3.6).

Da beide Module die Ergebnisse patchweise auf Grundlage der zeitlichen Abfolge der Messungen gruppieren, können alle Ergebnisse zusätzlich in Beziehung zum Alter und zur "Geschichte" des jeweiligen Patches gesetzt werden²⁸. Außerdem erlaubt die vereinfachte Form der Darstellung noch während eines Versuches festzustellen, ob die Antworten des Patches einheitlich sind, Perfusionslösungen gleichmäßig strömen oder Korrekturen am Verlauf des Experiments vorgenommen werden müssen.

Abb 3.7 zeigt das Ergebnis eines Langzeitversuchs am OLF²⁹. Die Abnahme der Amplitude und der Verlust der Kooperativität fallen sofort ins Auge (vgl. dazu auch Seite 101).



DIE OFFLINE AUSWERTUNG

Die Bestimmung der Aktivierungsparameter makroskopischer Messungen wurde in Anlehnung an die Hill-Gleichung durchgeführt (s. Anhang A).

²⁸ pClamp wird über einen externen Zeitgeber gesteuert (Kegel *et al.*, 1985). Während der Zeit der Datenaufnahme ist daher die Abfrage der internen Interrupts verzögert. Um Verfälschungen in der Zeitachse zu umgehen, wird die interne Computerzeit nach jedem Versuch durch Zugriff auf ein institutsinternes Netz aktualisiert.

²⁹ Die Art der Darstellung entspricht der Bildschirmanzeige während des laufenden Versuchs, aus drucktechnischen Gründen wurde auf die Abbildung einer Hardcopy verzichtet.

3.7 EINZELKANALMESSUNGEN

Einzelkanalereignisse können eine Vielzahl unterschiedlicher Charakteristika aufweisen. Typischerweise sind es rechteckige Pulse mit diskreter Amplitude von einigen pA und einer Dauer von Millisekunden bis Sekunden. Beide Parameter, Zeit und Amplitude, hängen u. a. von der Ionensorte, der Ionenkonzentration und vom Membranpotential ab. Im Vergleich zur Aufnahme zeitlich konstanter oder sogar gemittelter makroskopischer Daten erfordert die Digitalisierung von Einzelkanalmeßwerten besondere Aufmerksamkeit. Zeit- und Amplitudenverlauf sind nicht mehr kontinuierlich, sondern, bedingt durch die Aufnahmefrequenz und die Wandlerstufen des A/D-Wandlers, diskret. Die Verstärkungsstufe wurde jeweils so gewählt, daß die Auflösung des 12-bit A/D-Wandlers möglichst vollständig ausgenutzt wurde. Die Aufnahmefrequenz lag zwischen dem 2- und dem 5fachen der -3dB Eckfrequenz des Analogfilters (Wilkison, 1991; Oppenheim & Schafer, 1975; Horowitz & Hill, 1980). Die Eckfrequenz des Filters wurde auf das Rauschen des Patches abgestimmt, typischerweise lag sie bei 2 kHz. Das Signal wurde zusätzlich im Verstärker durch den eingebauten 3-Pol Bessel Filter mit 10 kHz gefiltert. Das ergibt eine effektive Filterraten von 1,96 kHz (Colquhoun & Sigworth, 1983). Während digitalisierungsbedingte Fehler in der Zeitdomäne leicht berücksichtigt werden können, da die Aufnahmefrequenz bekannt ist³⁰, setzt sich das Rauschen der Stromamplitude aus mehreren, in ihren Anteilen unbekannten Komponenten zusammen (Rauschen des Verstärkers, der Membran, des Proteins). Zusätzlich wird die Amplitude des Signals durch den Filter verfälscht.

AUSWERTEPARAMETER

"There comes a time in the life of a scientist when he must convince himself either that his subject is so robust from a statistical point of view that the finer points of statistical inference are irrelevant, or that the precise mode of inference he adopts is satisfactory. [...] I have been unable to accept any philosophy in which a probability, subjective or not, can be associated with every uncertain proposition. After prolonged consideration of the various schemes advanced, I have been forced to conclude that they will reflect the true complexity of inductive inference, representing the many-dimensioned substance by its one-dimensioned shadow." A. W. F. Edwards

Die Ladung, die durch einen einzelnen Kanal fließt, ist das Integral der Stromamplitude über die Zeit, die der Kanal offen ist. Es wird angenommen, daß das Kanalprotein diskrete Konformationen annimmt und die Zustände in der Stromamplitude bzw. in der Verteilung der Zeit-

³⁰ Vgl. hierzu Korn & Horn, 1988; Sigworth & Sine, 1987; McManus *et al.*, 1987; Ball & Sansom, 1988; Blatz & Magleby, 1986; Crouzy & Sigworth, 1990; Roux & Sauve, 1985; Ball *et al.*, 1992; Ball *et al.*, 1990; Hawkes *et al.*, 1992; Magleby & Weiss, 1990.

konstanten unterschieden werden können. Das Schalten zwischen Zuständen erfolgt in zufälliger Reihenfolge und kann als Markov-Prozeß beschrieben werden (Colquhoun & Sigworth, 1983; Colquhoun & Hawkes, 1981; 1983)³¹. Ratenkonstanten beschreiben die Wahrscheinlichkeit des Übergangs zwischen einzelnen Zuständen pro Zeiteinheit. Sie hängen im Markov-Prozeß allein vom augenblicklichen Zustand ab und sind unabhängig von der Zeit, die der Kanal zuvor in anderen Zuständen verbracht hat. Das Protein hat kein "Gedächtnis".

Die resultierende Wahrscheinlichkeits-Dichtefunktion der Verweilzeiten für die einzelnen Zustände wird als Summe von Exponentialtermen beschrieben. Die Anzahl der Exponentialterme entspricht den auflösbaren Offen- und Geschlossenzuständen. Die mittlere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in einem Zustand ist umgekehrt proportional zur Summe aller möglichen Übergangsraten aus diesem Zustand heraus.

Die Stromamplitude eines Kanals kann einfach aus wenigen Ereignissen bestimmt werden. Bei eindeutigen Übergängen kann man die Amplitude direkt als Differenz der Amplitude des Offen- und des Geschlossenzustands bestimmen. Bei stärker verrauschten Signalen wird die Bestimmung der Amplitudenstufen durch verschiedene Methoden der Mittelwertbildung innerhalb festgelegter Fenster angenähert. Üblicherweise werden Amplitudenhistogramme (all point histograms, Auftragung der Häufigkeit des Auftretens einzelner Ereignisse gegen die Amplitude) durch die Summe mehrerer Gauss-Funktionen gefittet³². Den Einzelkanalleitwert erhält man nach dem Ohmschen Gesetz, indem die mittlere Stromamplitude durch die Haltespannung dividiert wird.

Als kinetische Parameter werden Verteilungen von Offen- und Geschlossenzeiten untersucht. Es wird die Häufigkeit des Auftretens einer Zeitklasse gegen ihre Dauer aufgetragen. Das Histogramm wird als Summe von Exponentialtermen gefittet. Jeder Term entspricht dabei einem kinetischen Zustand³³. Logarithmierung der Zeitachse kann vorteilhaft sein, die Zeitkonstanten

³¹ Die Interpretation nach Markov ist am weitesten verbreitet, es werden jedoch auch alternative Modelle diskutiert (Millhauser *et al.*, 1988; Sansom *et al.*, 1989; Liebovitch *et al.*, 1987; Croxton, 1988).

³² Die Verwendung der Gaussfunktion ist gerechtfertigt, wenn alle Komponenten des Rauschens normalverteilt sind. Eigentlich müßte man für die konstant bleibende Wahrscheinlichkeit des Eintretens des Offen- bzw. Geschlossenzustandes eine Bi- oder Multinomialverteilung annehmen. Für eine große Grundgesamtheit bei nicht zu extremer Verteilung zwischen beiden Zuständen kann die Binomialverteilung jedoch gut durch eine Normalverteilung angenähert werden. Seltene Ereignisse hingegen können besser durch eine Poissonverteilung beschrieben werden. Bei Kanalflickern kann eine β -Funktion besser geeignet sein (Fitzhugh, 1983; Yellen, 1984a). Schlecht aufgelöste Maxima können mitunter durch Logarithmierung der Häufigkeiten getrennt werden.

³³ Die Standardabweichung eines einfach exponentiellen Terms entspricht der mittleren Lebensdauer des Zustandes (Colquhoun, 1971), wodurch die Auswertung kinetisch langsamer Prozesse exzessiv lange Datenspuren verlangt. Die Standardabweichung des Mittels von n Beobachtungen ist gleich $\frac{\tau}{\sqrt{n}}$. 100 Ereignisse geben 10%

Genauigkeit, für 90% sind schon etwa 5000 Ereignisse notwendig. Bei einem Zustand mit einer mittleren Offenzeit von 2 Sekunden entspricht das etwa 3 Stunden Aufenthalt im zu identifizierenden Niveau... (vgl. Absatz 4.9).

können dann direkt als lokale Maxima der Verteilung abgelesen werden (Sigworth & Sine, 1987).

Die meisten automatisierten Computerprogramme zur Analyse kinetischer Parameter (incl. pClamp) bewerten die Amplitude in diskreten Klassen. Die Einteilung der Klassen erfolgt entweder nach Augenmaß durch den Anwender oder nach mathematischen Wahrscheinlichkeitskriterien (z.B. level crossing optimization, Sachs *et al.*, 1982). Einige Programme erlauben interaktive Korrekturen der automatischen Prozessierung.

Obwohl "state of the art", ist die Methode in mehrfacher Hinsicht unzulänglich, da in beiden Dimensionen (Zeit und Amplitude) durch die auswertungsbedingte Zusammenfassung in Datenklassen Information verloren geht.

Die Behandlung von Abweichungen des Kanalverhaltens in der Zeitdomäne (z.B. kurze Perioden raschen Flickerns bei überwiegend langsamer Schaltkinetik) oder in der Amplitude (z.B. kurzzeitiges Auftreten von Zwischenleitwerten) ist problematisch (Zimmerman & Baylor, 1986; Haynes *et al.*, 1986)³⁴.

Es wurde daher ein neuer Ansatz zur Auswertung von Einzelkanalparametern erprobt. Er umgeht sowohl die Beschränkung auf wenige Amplitudenstufen, als auch das Problem der automatischen Klassifizierung der Zeitintervalle (Wachtel, 1991), erfordert jedoch ein Vielfaches an Rechenaufwand.

Die Methode basiert auf der Maximierung der Likelihood eines Modells für einen gegebenen Datensatz. Die Likelihood $L(R|H)$ einer statistischen Hypothese (H) für einen Datensatz (R) unter Annahme eines bestimmten Modells ist proportional zur Wahrscheinlichkeit $P(R|H)$. Der Proportionalitätsfaktor ist willkürlich. In den traditionellen Ansätzen zur Betrachtung der Wahrscheinlichkeit ist R variabel und H konstant. Die Likelihood hingegen geht von konstantem R bei variablem H aus, das Modell wird dem Datensatz angepaßt.

Es wird angenommen, daß das Schaltverhalten des Kanals als Markov Prozeß mit n (max. 100) diskreten Zuständen beschrieben werden kann und iterativ das kinetische Modell gesucht, das die Daten am besten beschreibt. Das Programm wurde freundlicherweise von Dr. S. H. Chung (Australian National University, Canberra, Australien) zur Verfügung gestellt³⁵. Die Rechnungen wurden auf verschiedenen Sun Workstations durchgeführt.

³⁴ Auftreten von Bursts weist auf mindestens zwei Zeitkonstanten für den geschlossenen Kanal hin. Bursts wurden bei allen ligandgesteuerten Kanälen und auch bei CNG Kanälen beobachtet (vgl. z. B. Karpen *et al.* 1988).

³⁵ Zur Einführung in die Theorie siehe Chung *et al.*, 1990; Chung & Kennedy, 1991.

3.8 VERWENDETE LÖSUNGEN

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Messungen in SIS (standard intracellular solution) durchgeführt. cGMP und cAMP wurden als Natriumsalze zugesetzt. Bei hohen Ligandkonzentrationen (ab 10 mM) wurde freie Säure verwendet und mit KOH titriert. Die entsprechende Menge zugesetzten Kaliums wurde beim Zusammenmischen der SIS berücksichtigt. Bei Messungen mit Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke und bei Permeabilitätsmessungen wurde statt des HEPES/KOH Puffers TRIS/HCl verwendet. In diesem Fall wurde EGTA nicht mit KOH sondern mit Tris neutralisiert. Die Konzentrationen an EGTA und HEPES bzw. TRIS betrugen jeweils 10 mM. Für Selektivitätsmessungen wurden 100 mM KCl gegen 100 mM des entsprechenden Chloridsalzes ausgetauscht.

	[mM]
SIS	
KCl	100
EGTA	10
HEPES	10
pH	7,2 (KOH)
Kaliumaspartatlösung zum Häuten der Oozyten	
Kaliumaspartat	200
KCl	20
MgCl ₂	1
EGTA	10
HEPES	10
pH	7,4 (KOH)
Barth Lösung	
NaCl	88
KCl	1
NaHCO ₃	2,4
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,82
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	0,3
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,41
HEPES	15
pH	7,4 (NaOH)

Der Barthlösung wurde vor Gebrauch 1 ml Penicillin (10.000 U)/Streptomycin (10.000 µg/ml, Seromed, Biochrom, Berlin), 0,4 mg Zinazef 750[®] sowie 10 mg Gentamycinsulfat zugesetzt.

3.9 STRUKTURVORHERSAGE UND MODELING

"The possibility of determining a relationship among species based on structural similarities has been a subject of philosophical and scientific speculation dating from Aristotle, Lamarck and Darwin to the present day." (Rossmann & Argos, 1976)

Das Ziel der durchgeführten Mutationsstudien ist, die Funktionsweise von CNG-Kanälen zu verstehen. Da einerseits Strukturdaten von CNG-Kanälen nicht verfügbar sind, CNG-Kanäle aber andererseits Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen aufweisen, sind sie ein dankbares "Opfer" für Sekundärstrukturvorhersagen.

Seit Anfinsen 1973 nachwies, daß sich Ribonuclease eigenständig aus einem denaturierten in einen funktionellen Zustand zurückfaltet (Anfinsen, 1973), hat die Idee, daß das Faltungsmuster von Proteinen in ihrer Primärstruktur kodiert ist, eine Flut von mehr oder weniger erfolgreichen Vorhersagealgorithmen hervorgebracht. Obwohl Strukturdaten von mehr als 800 globulären Proteinen als Trainingsset verfügbar sind, liegt die Erfolgsquote von Vorhersagealgorithmen bei 70 - 80 %. α -Helices lassen sich im allgemeinen genauer vorhersagen, u.a. weil die Programme Mittelwerte wandernder Fenster berechnen und α -Helices im Durchschnitt länger sind.

Im wesentlichen verwenden alle gängigen Vorhersagealgorithmen wandernde Sequenzfenster, über die die jeweiligen Berechnungen gemittelt werden. Die Konformation von Aminosäureresten wird jedoch nur zum Teil durch die in der linearen Sequenz direkt benachbarten Aminosäuren bestimmt. Letztlich entscheidend ist die räumliche Umgebung im gefalteten Protein. Kabsch und Sander zeigten, daß sich identische Pentapeptide sowohl in β -Faltblättern als auch in α -Helices wiederfinden (Kabsch & Sander, 1985; Kabsch & Sander, 1984). Andererseits können auch kürzere Peptide ausreichen, um definierte Sekundärstrukturen (z.B. β -turns) zu formen. Wechselwirkungen, die nicht in direkt benachbarten Sequenzbereichen kodiert sind, spielen eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Tertiärstruktur (Rackovsky, 1993).

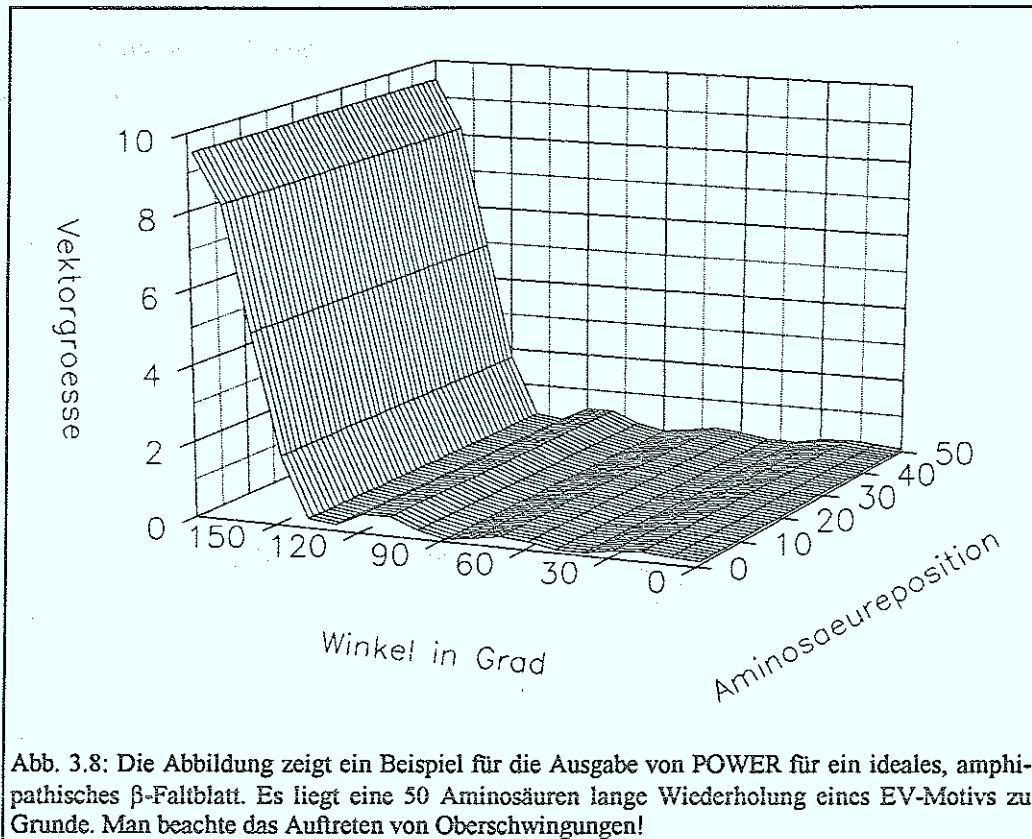
Andererseits können Proteine mit weniger als 10 % identischen Seitenketten an vergleichbaren Positionen in ihrer dreidimensionalen Struktur bemerkenswert konserviert sein (Lesk & Chothia, 1982). Bei stark ausgeprägter Ähnlichkeit der Sequenz (70 % und mehr) kann man in der Regel von weitgehend identischen Tertiärstrukturen ausgehen. Proteine mittlerer Ähnlichkeit (30 - 70 %) unterscheiden sich hauptsächlich in Bereichen undefinierter Sekundärstruktur. Bei 0 - 30 % Homologie sind die strukturellen Implikationen unsicher, die Homologie kann auf konvergente oder divergente Evolution zurückgehen.

Der Vergleich von Sequenzen unbekannter Struktur mit verwandten, in ihrer Struktur bekannten Proteinen oder der Sequenzvergleich in ihrer Funktion homologer Proteine ("knowledge based prediction", vgl. Blundell *et al.*, 1987; Moult, 1989) ist daher eine weitere wichtige Stütze zur Strukturvorhersage.

Die Vorhersagekriterien von transmembranalen Proteinen im allgemeinen und von Ionenkanälen im Besonderen weichen in wichtigen Punkten von den Regeln ab, die für globuläre Proteine gefunden wurden. In gewissem Sinne sind transmembranale Proteine "inside out" Proteine. Neben der Möglichkeit - nach "innen" orientiert - mit anderen Proteindomänen zu wechselwirken, können lipophile Seitenketten auch - nach "außen" weisend - mit der Lipiddoppelschicht wechselwirken. Im normalerweise hydrophoben "Kern" des Proteins befindet sich bei Ionenkanälen eine wassergefüllte Pore.

Beiden Proteingruppen gemein ist, daß konservierte Aminosäurepositionen entweder in funktionell wichtigen Positionen (katalytische Zentren...) sitzen oder an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Methoden der Sekundärstrukturvorhersage kombiniert und verglichen. Da bislang nur wenige Membranproteine in ihrer Struktur aufgelöst sind, gibt es kaum orientierende Regeln. Wegen der Interaktion mit der Lipiddoppelschicht wurden Hydrophobizität und amphipathischer Charakter untersucht. Es kann angenommen werden, daß α -Helices ebenso wie in globulären Proteinen eine strukturtragende Rolle spielen. Daher wurde zusätzlich die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von α -Helices berücksichtigt.



Die Hydrophobizität wurde als Mittelwert eines wandernden Fensters über 19 Aminosäuren nach Kyte-Doolittle bestimmt. Der amphipathische Charakter wurde mit dem Programm POWER und der Hydrophobizitätsskala nach Kyte-Doolittle berechnet (Eisenberg *et al.*, 1982a; Eisenberg *et al.*, 1982b; Eisenberg *et al.*, 1984; Eisenberg *et al.*, 1989). Es ist Teil des PREDICT Programmpakets des EMBL, Heidelberg. Die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von α -Helices wurde mit einer von J. Brünjes veränderten Version des Programms PRONET berechnet (Folkers, 1993; Quian & Sejnowski, 1988; Holley & Karplus, 1989; Pascarella & Bossa, 1989).

POWER ermittelt in Anlehnung an Fourier-Frequenz-Analysen Periodizitäten im polaren Charakter der Aminosäuren. Der Methode liegt die Beobachtung zu Grunde, daß viele Proteine Sekundärstrukturen ausbilden, die den amphipathischen Charakter maximieren. Amphipathische Helices spielen eine wichtige funktionelle Rolle bei Lipoproteinen, Peptidtoxinen, Peptidhormonen und vermutlich auch für die porenbildende Region des Azetylcholinrezeptors (Oiki *et al.*, 1988; Villarroel *et al.*, 1991; Leonard *et al.*, 1988; Cohen *et al.*, 1992).

Die Suche nach periodischen amphipathischen Mustern in der Sequenz kann daher Aufschluß über die Sekundärstruktur geben. Jeder Aminosäure wird ähnlich der Kyte-Doolittle Vorhersage ein Wert als Maß für die Hydrophobizität zugeordnet. Über ein Fenster vorgewählter Länge wird die Summe des Betragsquadrats der Hydrophobizitätswerte in Richtung des betrachteten Winkels " δ " analysiert (vgl. Gleichung 3.3).

$$\mu = \sqrt{\left[\sum_{n=1}^N H_n \sin(\delta n) \right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \cos(\delta n) \right]^2} \quad \text{Gl. 3.3}$$

μ = hydrophobes Moment

H_n = numerischer Wert der Hydrophobizität (je nach verwendeter Skala)

δ = Winkelangabe, bezeichnet die Richtung, in der die betrachtete Seitenkette vom virtuellen Mittelpunkt des Rückgrats der Peptidkette wegweist. Bei Winkelangaben in Bogenmaß wird δ als $\frac{2\pi}{m}$ berechnet,

wobei m die Periodizität des betrachteten Strukturelements angibt (180° für ein β -Faltblatt, 120° für eine 3₁₀ Helix (z.B. das S4-Segment mit einer Periode von 3 Aminosäuren, vgl. Abb. 4.73) und 100° für eine α -Helix).

Abweichungen von den idealisierten Winkeln können sich durch Quartärstrukturen wie umeinander gewundene α -Helices oder verdrehte β -Faltblätter ergeben (Eisenberg *et al.*, 1984). Kehren Hydrophobizitätsmuster in Abständen wieder, die der betrachteten Frequenz entsprechen, verstärkt sich das Signal. Einige Algorithmen zur Berechnung des bipolaren Charakters normieren das Ergebnis auf den Mittelwert der Hydrophobizität des betrachteten Fensters oder des gesamten Proteins.

Im direkten Vergleich zu den α -helikalen Vorhersagewerten von PRONET wurde in einem "eindimensionalen" Ansatz nur das hydrophobe Moment für α -Helices bei 100° betrachtet. Daneben wurde eine zweidimensionale Auswertung vorgenommen, bei der die Analyse für alle Winkel zwischen 5° und 180° durchgeführt wird (Finer-Moore *et al.*, 1989). Die Relativierung der α -helikalen Werte durch die Betrachtung aller möglichen Zustände erleichtert die Bewertung der Signale.

PRONET basiert auf einem neuronalen Netzwerk. Neuronale Netzwerk-Algorithmen sind in unterschiedlichen Ebenen organisiert. Die erste Ebene ist die Eingabeebene, die letzte Ebene die Ausgabebene. Dazwischen liegt eine unterschiedliche Anzahl verdeckter Schichten, in denen das Signal nach vorgegebenen, "erlernten" Mustern über Wichtungsfaktoren verarbeitet wird. Interessanterweise sind Netzwerke mit verdeckten Ebenen in der Vorhersage von Proteinstrukturen nicht erfolgreicher als Netzwerke mit lediglich zwei Ebenen (Quian & Sejnowski, 1988). Andernfalls könnte man von einer Art fraktaler Selbstähnlichkeit ausgehen. PRONET arbeitet ohne verdeckte Ebenen.

Im Gegensatz zur Analyse des bipolaren Charakters hängt der Erfolg der Methode von der Art und Verwandtschaft der Trainingssequenzen ab. PRONET wurde mit einem Satz von ca. 90 Sequenzen geringer Homologie trainiert. Alle Sequenzen stammen von löslichen Proteinen. Es

werden jeweils wandernde Fenster von 17 Aminosäuren analysiert. Primär werden α -Helix und β -Faltblatt unterschieden. Wenn keiner der beiden Schwellwerte erreicht wird, nimmt das Programm "random coil" an. Das Ergebnis der Vorhersage wird in der von J. Brünjes modifizierten Version des Programms numerisch ausgegeben.

Zusätzlich wurde das Sequenzalignment³⁶ farbig gedruckt (vgl. Abb. B1), so daß Ladungsverteilungen, sturkturbrechende Aminosäuren oder lipophile Aminosäuren visuell einfacher mit den Strukturvorhersagen korreliert werden können. Die Sequenzalignments wurden mit MULTALIGN (Corpet, 1988) erstellt. Wenn nötig wurden die Alignments manuell korrigiert. Die Kombination dieser Methoden wurde erfolgreich bei der Entwicklung eines Modells der Thymidinkinase eingesetzt (Folkers *et al.*, 1993). Bei der Anwendung auf transmembranale Proteine kann die Bewertung der Signale abweichen: Ausgeprägt amphipathischer Charakter eines Sequenzbereichs schließt nicht aus, daß das Segment transmembranal ist. Es wird jedoch nach dem Hydropathievorhersagewert nicht mehr erkannt. Dagegen stimmen ausgeprägt amphipathisch- α -helikale Signale in der Regel mit den PRONET Vorhersagewerten überein. Die Betrachtung des α -helikalen Charakters allein wiederum reicht nicht aus, um mögliche transmembranale Durchgänge zu identifizieren.

Ein weiterer Schritt der Strukturvorhersage ist die Einbindung von Computer modeling Methoden, da hierbei die räumliche Orientierung der Segmente zueinander optimiert werden kann. Da für die Ligandenbindestelle ein homologes Protein in seiner Struktur aufgelöst ist, konnte für die Nukleotid-Bindestelle der CNG-Kanäle ein Homologiemodell erarbeitet werden, indem die Aminosäuren der CAP Bindestelle unter Beibehaltung der Faltung des Proteinrückgrats in die Bindestelle der CNG-Kanäle überführt und unter SHAKE-Bedingungen lokal minimiert wurden. Es wurde das Programm SYBYL, Version 5.5, (Tripos Associates, St. Louis, Missouri, USA) auf einer ESV30 Grafikworkstation verwendet. Unterstützend wurden Modelle der Bindestellen von Proteinkinasen untersucht. Die Brookhaven Einträge der cAPK Modelle stammen von I. Weber³⁷, die inzwischen auch ein analoges Modell der Kanalbindestelle veröffentlicht hat (Kumar & Weber, 1992).

Die in dieser Arbeit gezeigten Grafiken wurden mit MICROSOFT DRAW (Microsoft), SIGMAPLOT (Jandel) und SURFER (Golden Software, Colorado, USA) erstellt, die Moleküldarstellungen wurden direkt vom Computerbildschirm abfotografiert.

³⁶ Matrixdarstellung von Aminosäuresequenzen, bei der konservierte Aminosäurepositionen in identischen Spalten erscheinen.

³⁷ Die Strukturdaten sind in der Brookhaven Protein Datenbank unter folgenden Zugangsbezeichnungen abgelegt: CAP: 3gap, erste Bindestelle Typ I cAPK: 1apk, zweite Bindestelle Typ I cAPK: 1bpk, erste Bindestelle Typ II cAPK: 2apk, zweite Bindestelle Typ II cAPK: 2bpk.

4. ERGEBNISSE

4.1 EXPRESSION DER WILDTPYKANÄLE

EXPRESSION DER CNG-KANÄLE AUS DEM RIND (ROD, OLF)

Während die Expression des ROD Kanals ohne weitere Modifikation der klonierten cDNA möglich war, konnten der OLF Kanal sowie die beiden CNG-Kanäle aus dem Huhn nur nach Veränderung der nicht kodierenden Sequenzbereiche exprimiert werden (s. Anhang B). Im Vergleich aller exprimierten Wildtypen erreichten die CNG-Kanäle des Rinds die höchsten Expressionsdichten.

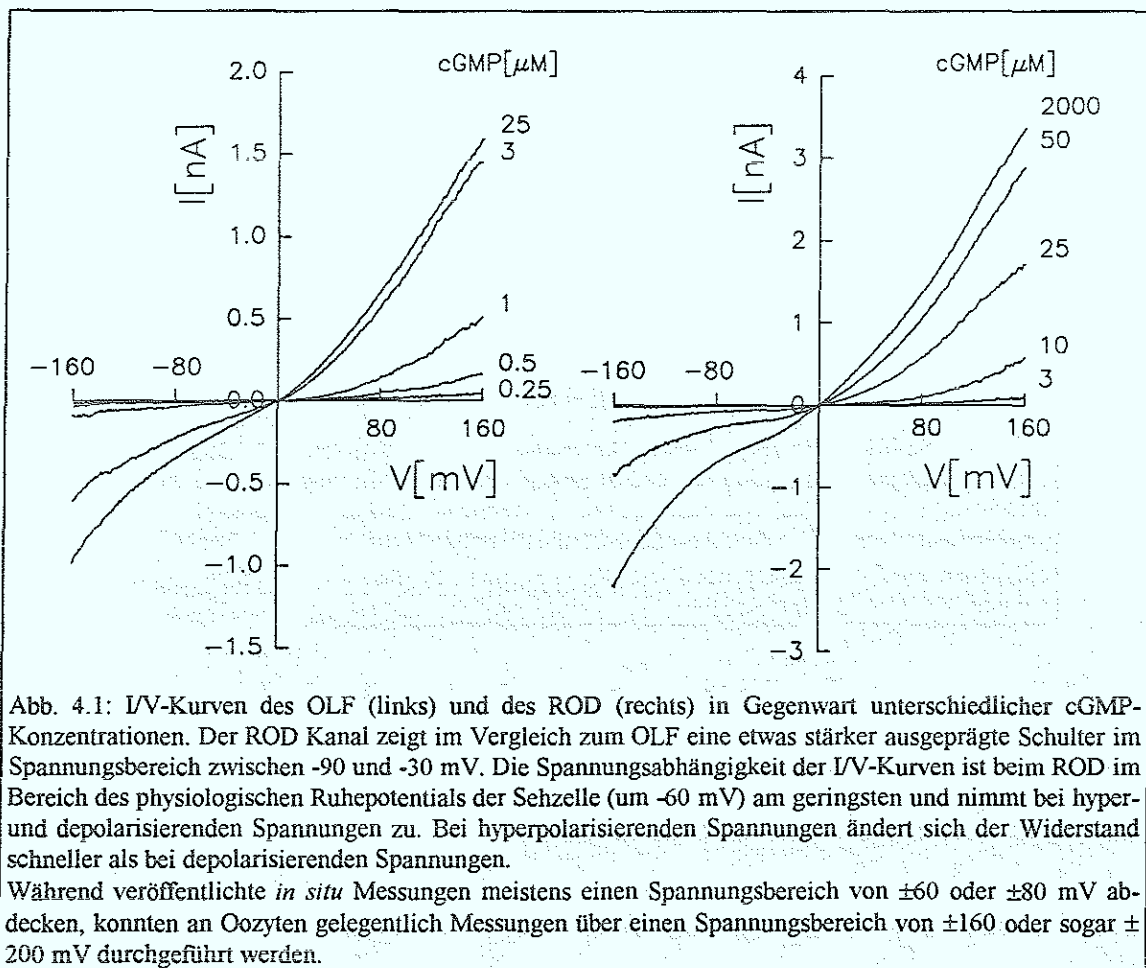


Abb. 4.1 zeigt typische I/V-Kurven der beiden CNG-Kanäle des Rinds. Die Stromantwort der Kanäle auf eine lineare Spannungsrampe ist nicht ohmsch: Die Amplitude hängt von der angelegten Spannung und der Ligandkonzentration ab. Abb. 4.2 gibt die Dosis-Wirkungskurven des

ROD für cGMP und cAMP wieder, die entsprechenden Aktivierungskonstanten für den OLF sind angedeutet. Beide Kanäle reagieren etwa 10- bis 15fach empfindlicher auf cGMP als auf cAMP. Der olfaktorische CNG-Kanal ist für beide Nukleotide 15- bis 30fach empfindlicher als der Sebstäbchenkanal (jeweils bezogen auf -80 mV). Die Amplitude der maximal durch cGMP bzw. cAMP aktivierbaren Ströme des OLF sind gleich groß (Daten nicht gezeigt, identisch zu Abb. 4.8). Der ROD erreicht in Gegenwart von cAMP maximal 5 - 17 % des durch cGMP aktivierbaren Stroms (Abb. 4.5).

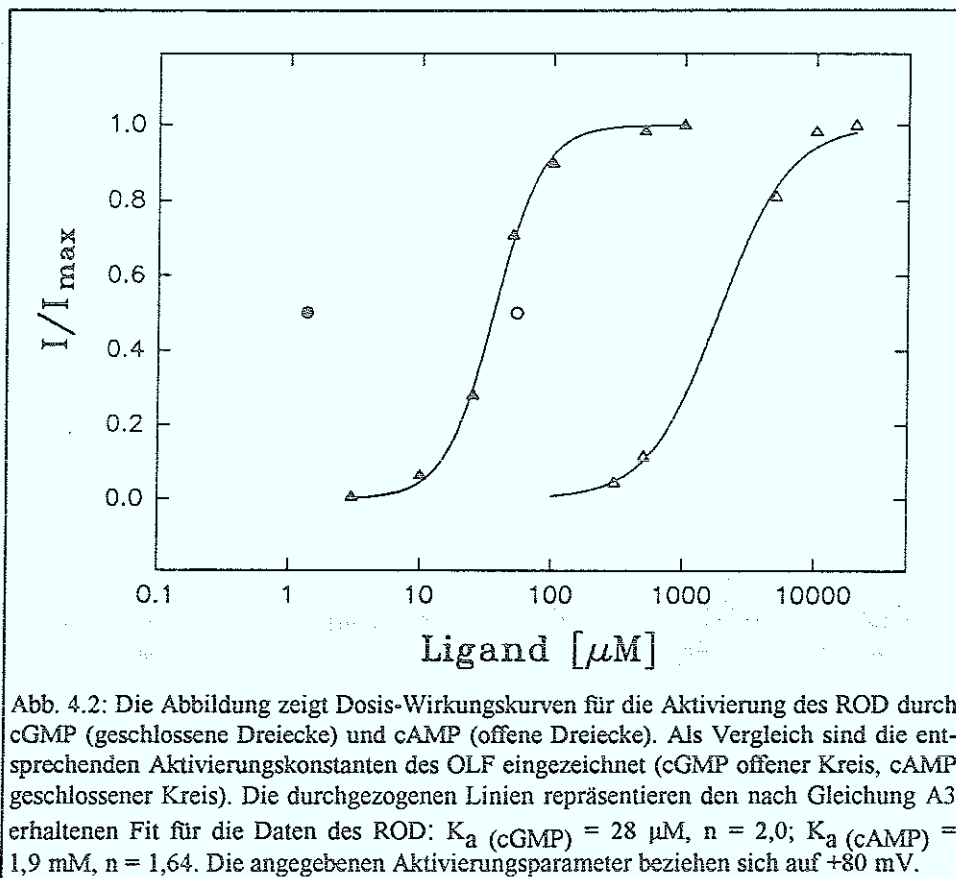


Abb. 4.3 faßt die untersuchten Aktivierungsparameter für ROD und OLF zusammen:

- Im oberen rechten Bildteil wird die Gleichrichtung der in Gegenwart sättigender cGMP-Konzentration aufgenommenen I/V-Kurven verglichen. Abb. 4.41 zeigt, daß die Gleichrichtung stark von Patch zu Patch variiert. Die in dieser und den folgenden Übersichten der Aktivierungsparameter gezeigten I/V-Kurven wurden daher über alle auswertbaren Versuche gemittelt, die unter vergleichbaren Bedingungen (gleiche Ionensorte und -konzentration, maximal 10 bis 15 Minuten nach Abziehen des Patches) aufgenommen wurden. Die I/V-Kurven von ROD und OLF unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Die I/V-Kurve des OLF verläuft bei negativen Potentialen linearer als die des ROD und die I/V-Kurve des ROD verläuft bei positiven Potentialen linearer als die des OLF.

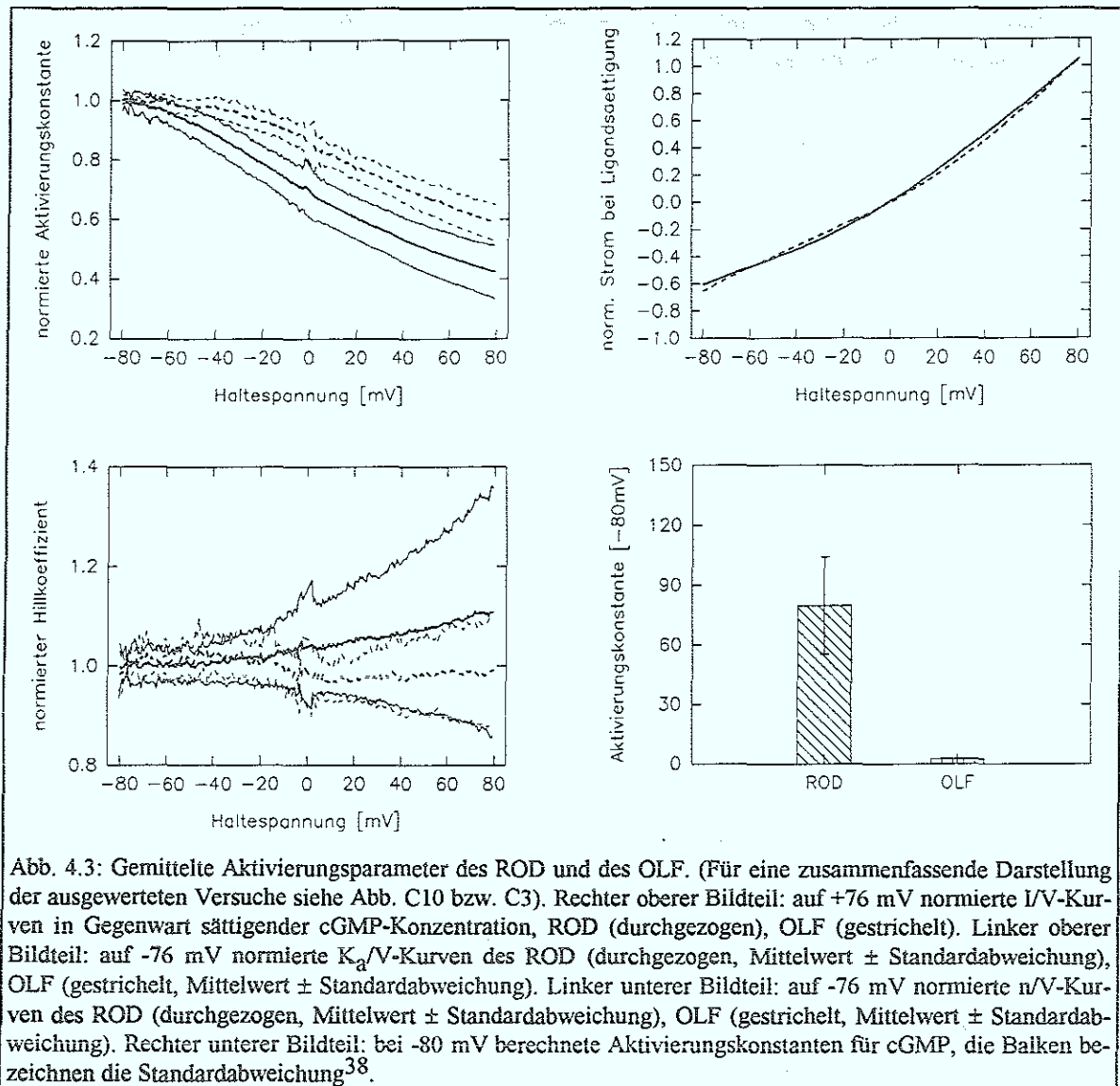


Abb. 4.3: Gemittelte Aktivierungsparameter des ROD und des OLF. (Für eine zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Versuche siehe Abb. C10 bzw. C3). Rechter oberer Bildteil: auf +76 mV normierte I/V-Kurven in Gegenwart sättigender cGMP-Konzentration, ROD (durchgezogen), OLF (gestrichelt). Linker oberer Bildteil: auf -76 mV normierte K_a/V -Kurven des ROD (durchgezogen, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung), OLF (gestrichelt, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Linker unterer Bildteil: auf -76 mV normierte n/V -Kurven des ROD (durchgezogen, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung), OLF (gestrichelt, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Rechter unterer Bildteil: bei -80 mV berechnete Aktivierungskonstanten für cGMP, die Balken bezeichnen die Standardabweichung³⁸.

- Die beiden linken Abbildungen geben die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante (oben) und
- des Hill-Koeffizienten (unten) wieder. Die durchgezogenen Linien bezeichnen die Daten des ROD, die gestrichelten Linien die Daten des OLF. Es ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus allen ausgewerteten Versuchen (vgl. Anhang C) angegeben. Die K_a/V -Kurven (oben) von ROD und OLF unterscheiden sich deutlich voneinander. Die K_a/V -Kurve des ROD zeigt im Spannungsbereich zwischen ± 80 mV einen leicht sigmoiden Verlauf. Sie geht zwischen -100 und -140 mV durch ein Maximum und fällt zwischen -140

³⁸ Die Mittelwerte des ROD und OLF sind in den folgenden Abbildungen für Chimären und Mutanten jeweils dünn als Vergleich angegeben.

und -220 mV wieder ab (Daten nicht gezeigt). Die K_a/V -Kurve des OLF erreicht ihr Maximum bereits bei etwa -40 mV. Bei positiveren Spannungen fällt sie mit gleicher Steigung ab, wie die des ROD. Der Hill-Koeffizient ist bei beiden Kanälen annähernd spannungsunabhängig.

- Die untere rechte Abbildung zeigt die für -80 mV berechneten Aktivierungskonstanten, die Balken bezeichnen die Standardabweichung.

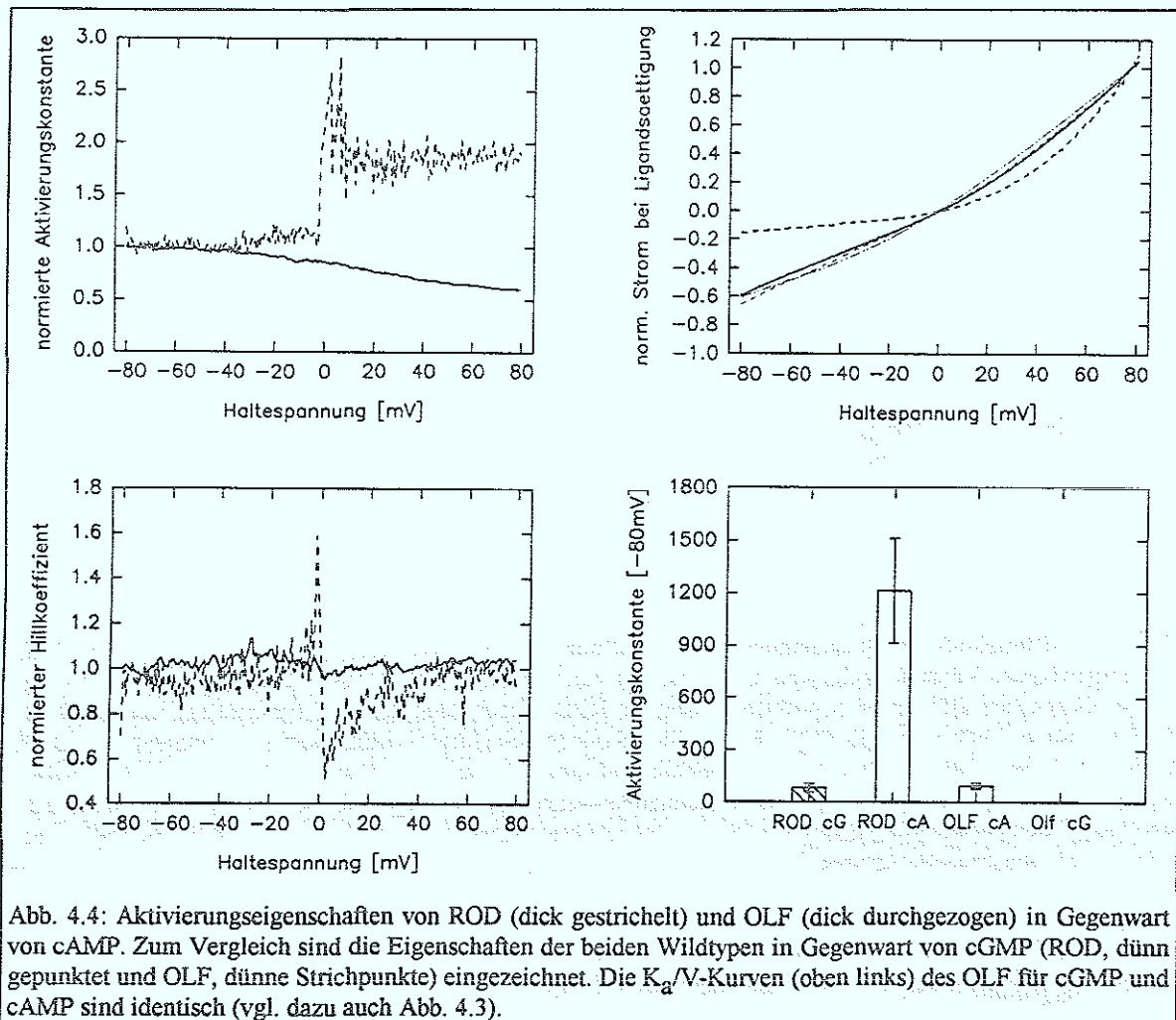


Abb. 4.4 zeigt die entsprechenden cAMP-Aktivierungsparameter für OLF (durchgezogen) und ROD (gestrichelt). Besonders auffällig ist die starke Gleichrichtung der I/V-Kurve des ROD in Gegenwart von cAMP. Die Aktivierungskonstante des ROD verliert in Gegenwart von cAMP ihre Spannungsabhängigkeit, die Spannungsabhängigkeit des OLF verändert sich dagegen in Gegenwart von cAMP nicht. Der plötzliche Anstieg in der K_a/V -Kurve des ROD für cAMP beim Null-Durchgang ist durch die kleinen Ströme bedingt (vgl. Abb. 4.5).

Abb. 4.5 zeigt den Unterschied der I/V-Kurven des ROD bei Aktivierung durch cGMP bzw. cAMP.

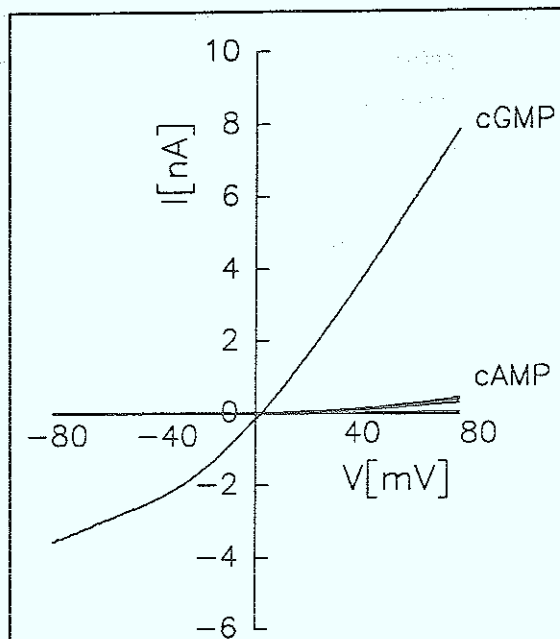
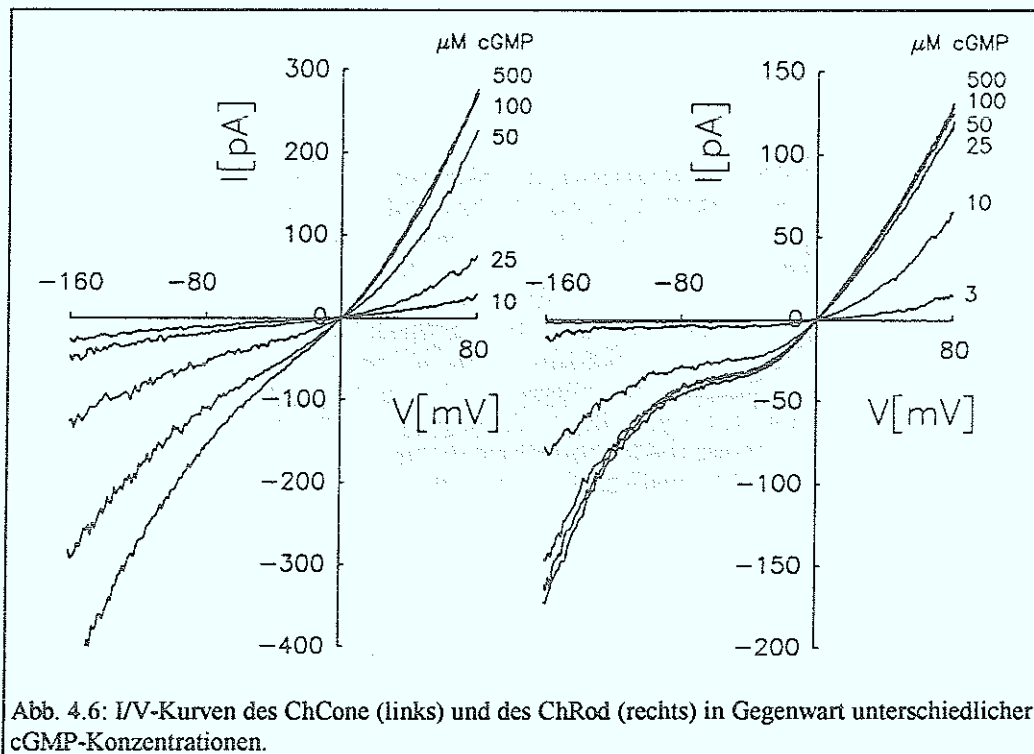


Abb. 4.5: Unterschied der Aktivierung des ROD durch cAMP bzw. cGMP. Die cAMP-aktivierten Ströme wurden in Gegenwart von 0,5, 1, 3, 5 und 10 mM aufgenommen. Zum Vergleich ist eine am selben Patch aufgenommene I/V-Kurve in Gegenwart von 1 mM cGMP eingezeichnet. Der durch cAMP aktivierbare Strom nimmt nach vorübergehender Perfusion des Patches mit cGMP von etwa 5 % zu Beginn des Experiments auf etwa 17 % des cGMP-aktivierbaren Stroms bei späteren Wiederholungen zu (Daten nicht gezeigt)

EXPRESSION DER CNG-KANÄLE AUS DER HÜHNERNETZHAUT (CHCONE, CHRÖD)

Es wurden zwei CNG-Kanäle aus Zapfen- (ChCone) bzw. Stäbchenzellen (ChRod) der Netzhaut des Huhns exprimiert. Im Gegensatz zur hohen Expressionsdichte der CNG-Kanäle des Rinds (etwa 2500 Kanäle pro Patch) war die Expressionsdichte der beiden Hühnerkanäle wesentlich niedriger (5- bis 20fach größer als der Leckstrom). Beide Kanäle konnten erst nach Modifikation der 3'- und 5'-nicht kodierenden DNA-Sequenzbereiche exprimiert werden (vgl. Anhang B und Bönigk *et al.*, 1993). Abb. 4.6 zeigt typische I/V-Kurven des ChRod und ChCone. Die Aktivierungskonstanten für cGMP liegen mit $65,3 \mu\text{M}$ für den ChCone und $34,1 \mu\text{M}$ für den ChRod zwischen denen der beiden CNG-Kanäle des Rinds. Auch die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante liegt zwischen der des ROD und der des OLF (vgl. Abb. 4.7). Aktivierungskonstanten für cAMP wurden nicht bestimmt, der maximal mit cAMP aktivierbare Strom betrug für beide Kanäle zwischen 0 und 20 % der mit cGMP aktivierbaren Amplitude (Daten nicht gezeigt).



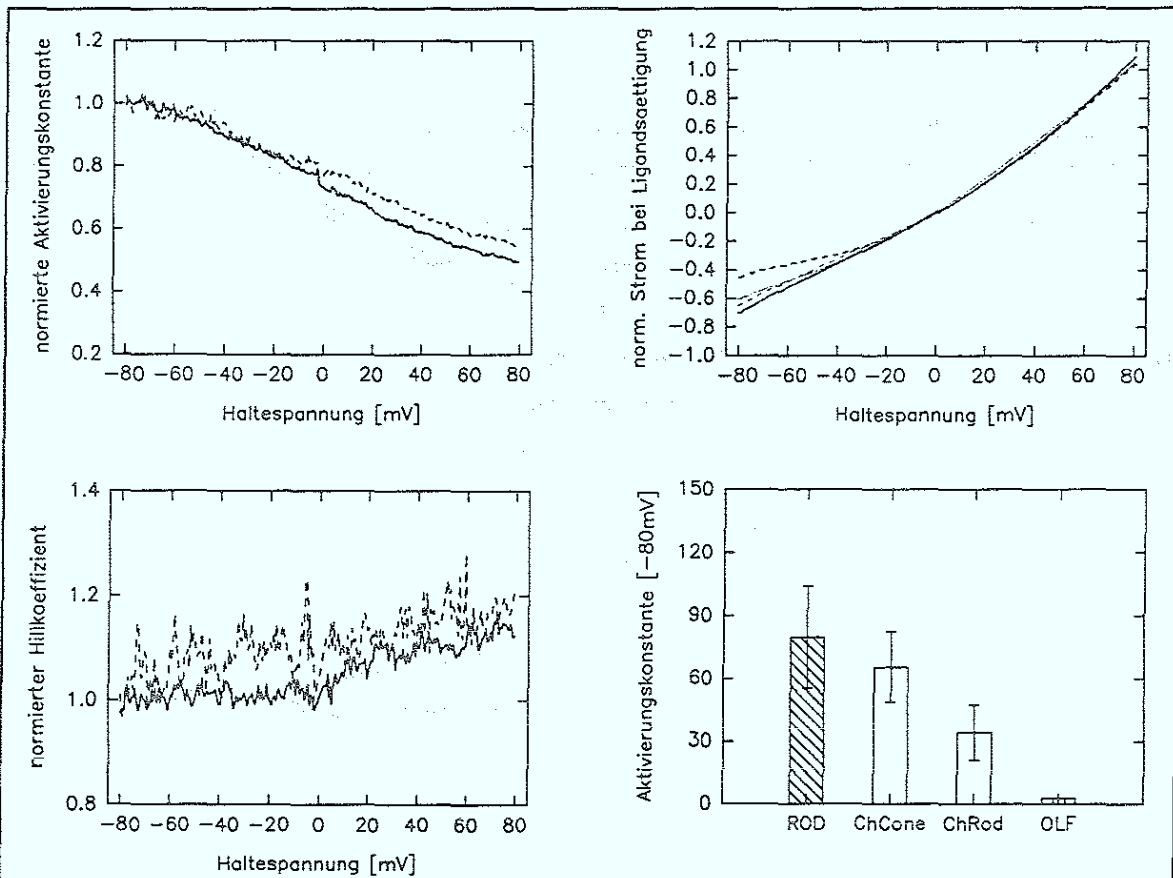
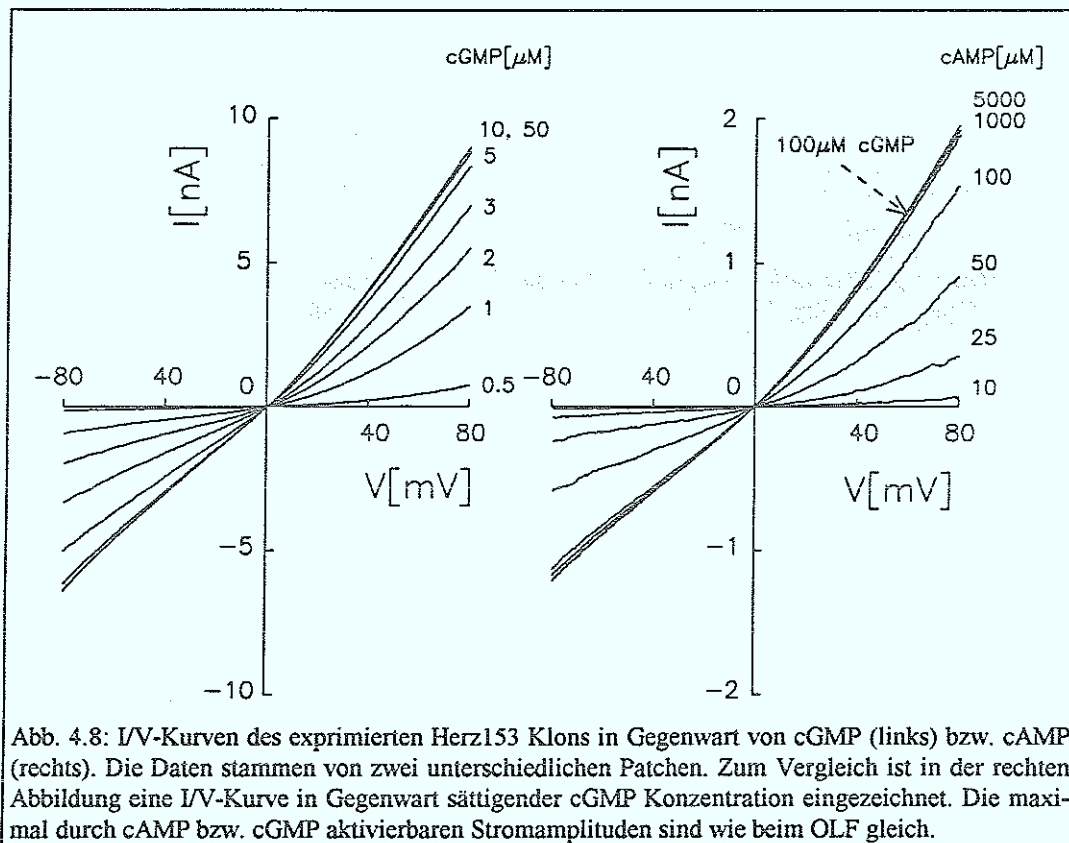


Abb. 4.7: Aktivierungseigenschaften des ChCone (dick durchgezogen) und des ChRod (dick gestrichelt) in Gegenwart von cGMP. Zum Vergleich sind (dünn gezeichnet) die Eigenschaften der beiden ROD- und OLF-Wildtypen angegeben (vgl. dazu auch Abb. 4.3).

DIE EXPRESSION EINES CNG-KANALS AUS AORTENGeweBE DES KANINCHENS (HERZ153, HERZ357)

Die Expressionsdichte des CNG-Kanals aus Aortengewebe des Kaninchens ist vergleichbar mit der der beiden CNG-Kanäle des Rinds (ROD, OLF). Der CNG-Kanal des Kaninchens gleicht in der Sequenz und in den Eigenschaften dem OLF. Wie der OLF ist er 25- bis 40fach empfindlicher für cGMP als für cAMP, die maximal aktivierbare Amplitude ist bei beiden Nukleotiden gleich (vgl. Abb. 4.8). Von diesem Kanal wurden zwei unterschiedliche Transkripte untersucht (Herz153 und Herz357, s. Anhang B), die sich durch die Lage des Translationsstarts unterscheiden. Die cDNA des Herz153 kodiert für ein Polypeptid, das N-terminal um 68 Aminosäuren länger ist. Ansonsten ist die Sequenz beider Kanäle identisch (Biel *et al.*, 1993).

Abb. 4.8 zeigt I/V-Kurven des "langen" Transkripts (Herz153), Abb. 4.9 die entsprechenden I/V-Kurven des "kurzen" Transkripts (Herz357), links jeweils für cGMP, rechts für cAMP.



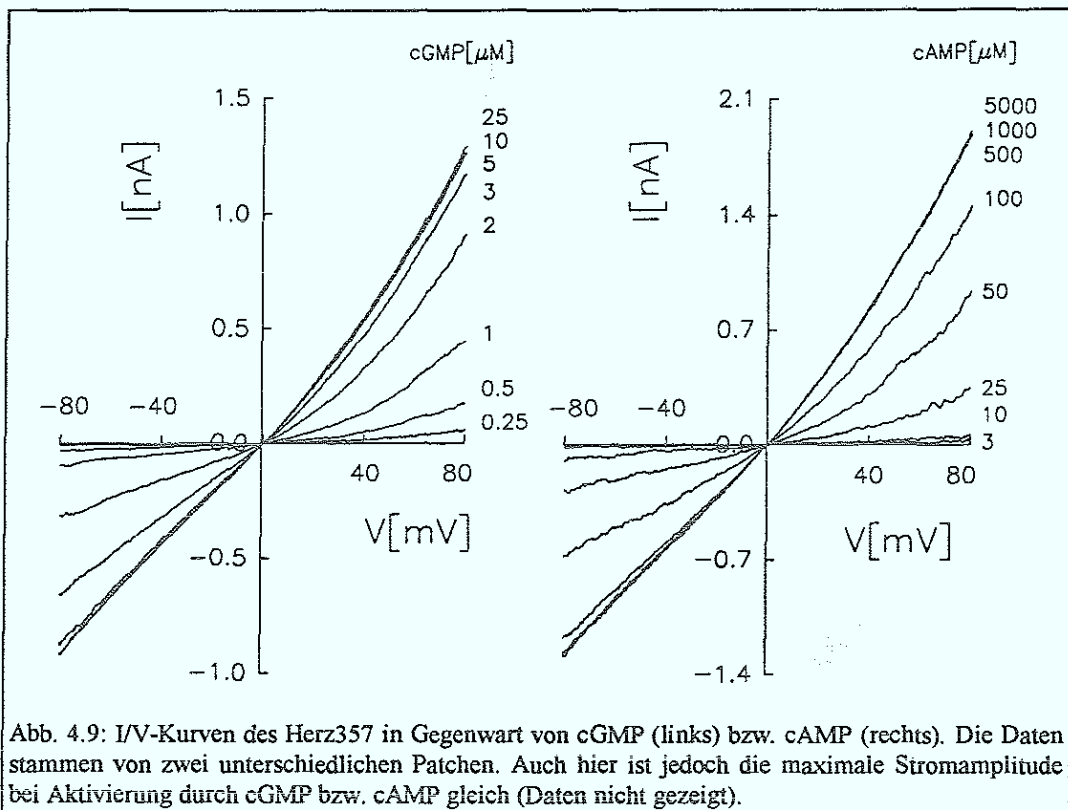


Abb. 4.9: I/V-Kurven des Herz357 in Gegenwart von cGMP (links) bzw. cAMP (rechts). Die Daten stammen von zwei unterschiedlichen Patches. Auch hier ist jedoch die maximale Stromamplitude bei Aktivierung durch cGMP bzw. cAMP gleich (Daten nicht gezeigt).

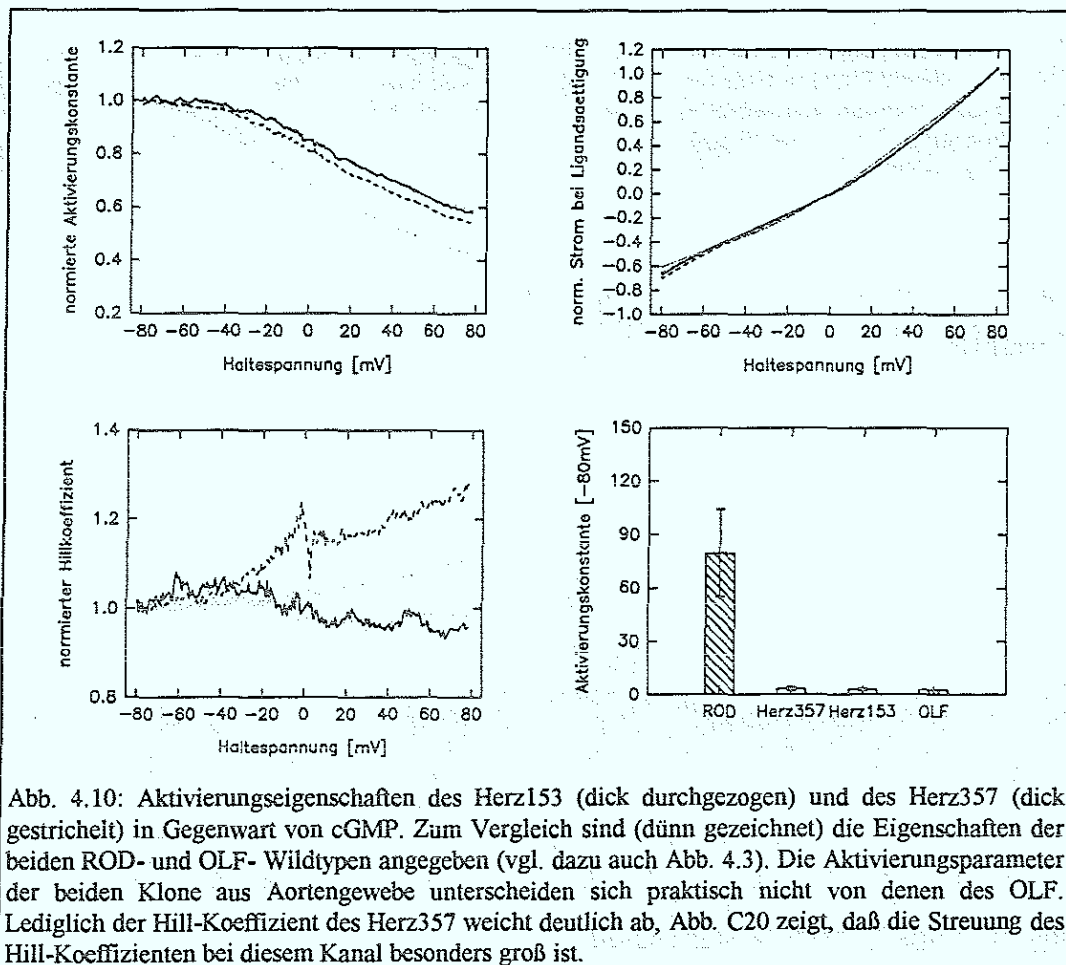


Abb. 4.10: Aktivierungseigenschaften des Herz153 (dick durchgezogen) und des Herz357 (dick gestrichelt) in Gegenwart von cGMP. Zum Vergleich sind (dünn gezeichnet) die Eigenschaften der beiden ROD- und OLF- Wildtypen angegeben (vgl. dazu auch Abb. 4.3). Die Aktivierungsparameter der beiden Klone aus Aortengewebe unterscheiden sich praktisch nicht von denen des OLF. Lediglich der Hill-Koeffizient des Herz357 weicht deutlich ab, Abb. C20 zeigt, daß die Streuung des Hill-Koeffizienten bei diesem Kanal besonders groß ist.

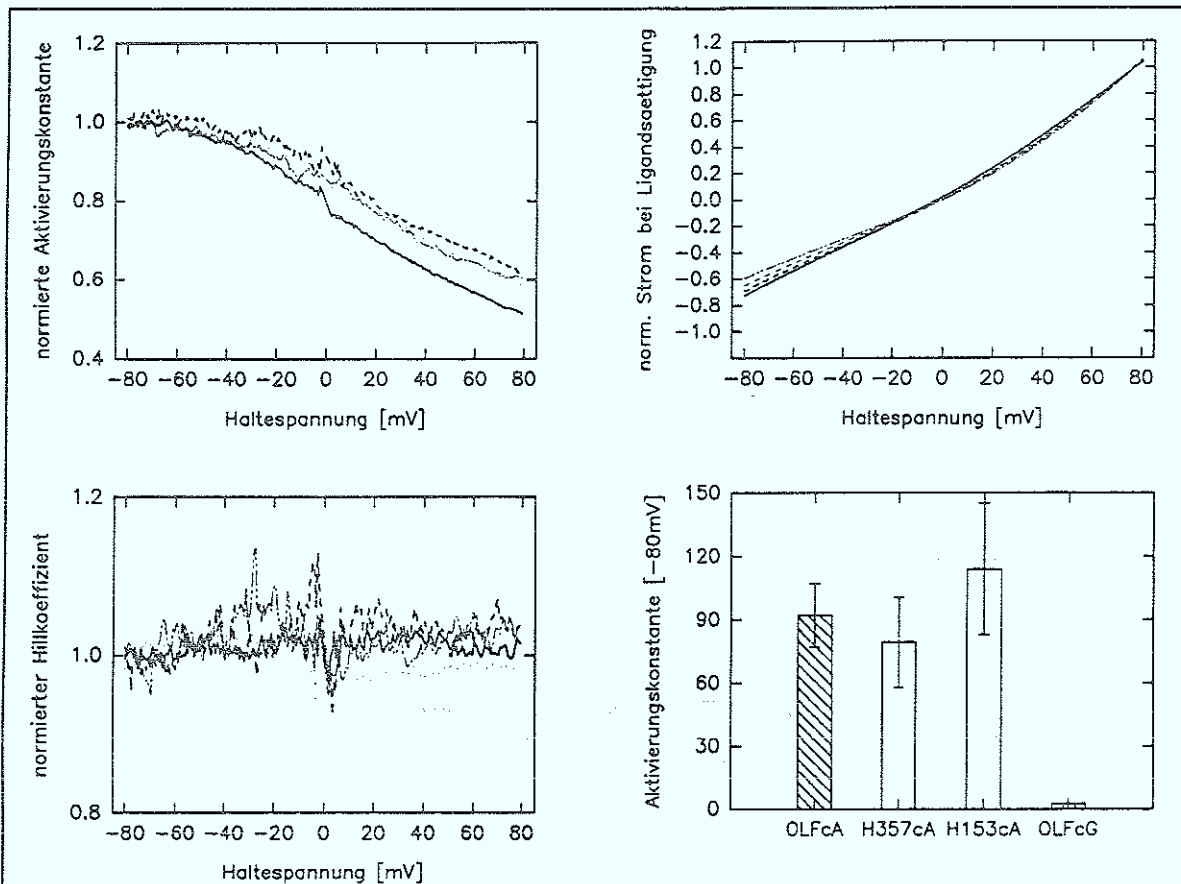


Abb. 4.11: Aktivierungseigenschaften des Herz153 (dick durchgezogen), des Herz357 (dick gestrichelt) und des OLF (dünne Strichpunktlinie) in Gegenwart von cAMP. Zum Vergleich sind (dünn gepunktet) die Eigenschaften des OLF in Gegenwart von cGMP angegeben (vgl. dazu auch Abb. 4.3). Die K_2/V -Kurve des Herz153 weicht deutlich ab, für die anderen Transkripte unterscheiden sich die Aktivierungseigenschaften in Gegenwart von cGMP bzw. cAMP nicht voneinander.

Abb. 4.11 zeigt die Aktivierungseigenschaften der beiden CNG-Kanäle aus Aortengewebe in Gegenwart von cAMP.

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Aktivierungsparameter der exprimierten Wildtypkanäle zusammengefaßt. Angegeben ist jeweils der Hill-Koeffizient, die Aktivierungskonstante, der Faktor um den sich der maximal aktivierbare, nukleotidabhängige Strom vom Leckstrom unterscheidet sowie in der letzten Spalte die Gleichrichtung, berechnet als Quotient der Stromamplituden bei +80 mV und -80 mV in Gegenwart sättigender Ligandkonzentrationen.

Tab. 4.1:

		+80 mV			-80 mV			Rektif.
		n	Ka	Faktor	n	Ka	Faktor	
ChCone	Mittel	2,73	33,98	19,74	2,27	65,28	12,78	0,63
cGMP	Stdabw.	1,05	9,11	21,44	0,74	16,88	14,17	0,11
	Anzahl	14	14	14	14	14	14	14
ChRod	Mittel	2,32	15,39	10,02	2,14	34,14	4,87	0,49
cGMP	Stdabw.	0,57	7,57	7,27	0,52	13,24	2,78	0,16
	Anzahl	8	8	9	8	8	8	8
OLF	Mittel	2,29	1,56	104,69	2,44	2,45	129,91	0,70
cGMP	Stdabw.	0,53	0,44	143,50	0,53	0,73	224,40	0,14
	Anzahl	24	24	24	24	24	24	24
OLF	Mittel	2,47	57,86	39,81	2,42	92,02	23,74	0,57
cAMP	Stdabw.	0,61	8,05	24,48	0,49	14,88	15,31	0,04
	Anzahl	12	12	12	12	12	12	12
ROD	Mittel	1,99	34,60	87,98	2,00	79,54	79,89	0,58
cGMP	Stdabw.	0,51	11,32	100,70	0,55	24,44	130,57	0,13
	Anzahl	30	30	30	34	34	34	28
ROD	Mittel	1,81	1215	13,30	n.d.	n.d.	3,57	0,15
cAMP	Stdabw.	0,93	296	9,92	n.d.	n.d.	0,12	0,06
	Anzahl	3	3	3			2	4
Herz153	Mittel	2,28	1,72	83,36	2,40	2,92	97,27	0,62
cGMP	Stdabw.	0,32	0,39	115,43	0,26	0,56	155,77	0,05
	Anzahl	9	9	9	9	9	9	9
Herz153	Mittel	1,71	57,94	37,59	1,79	113,91	29,29	0,70
cAMP	Stdabw.	0,28	8,52	18,41	0,37	31,13	15,12	0,10
	Anzahl	7	7	7	7	7	7	7
Herz357	Mittel	2,66	1,91	39,80	2,49	3,25	33,61	0,64
cGMP	Stdabw.	0,61	0,51	42,74	0,54	0,99	43,23	0,08
	Anzahl	15	16	16	16	16	16	13
Herz357	Mittel	1,61	45,52	93,46	1,59	79,31	85,94	0,70
cAMP	Stdabw.	0,27	12,76	81,17	0,22	21,36	131,96	0,14
	Anzahl	10	11	11	8	9	9	9

4.2 BLOCKADE DER CNG-KANÄLE AUS DEM RIND DURCH L-CIS-DILTIAZEM UND AMILORID

ROD und OLF sind *in vivo* durch mikromolekulare l-cis-Diltiazem-Konzentrationen blockierbar (Stern *et al.*, 1986; Haynes, 1992; Frings *et al.*, 1992). Der in *Xenopus* Oozyten exprimierte ROD ist hingegen mäßig (Abb. 4.12), der heterolog exprimierte OLF praktisch nicht durch l-cis-Diltiazem blockierbar. 100 μM l-cis-Diltiazem blockieren den OLF etwa zu 10 % (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu werden beide Kanäle in *Xenopus* Oozyten in stark spannungsabhängiger Weise durch den Na-Kanal Blocker Amilorid blockiert (Abb. 4.13). Während der Effekt von l-cis-Diltiazem sich auf Auswärts- und Einwärtsstrom erstreckt, blockiert Amilorid nur den Auswärtsstrom. Beide Blocker sind nur von der zytoplasmatischen Seite wirksam³⁹.

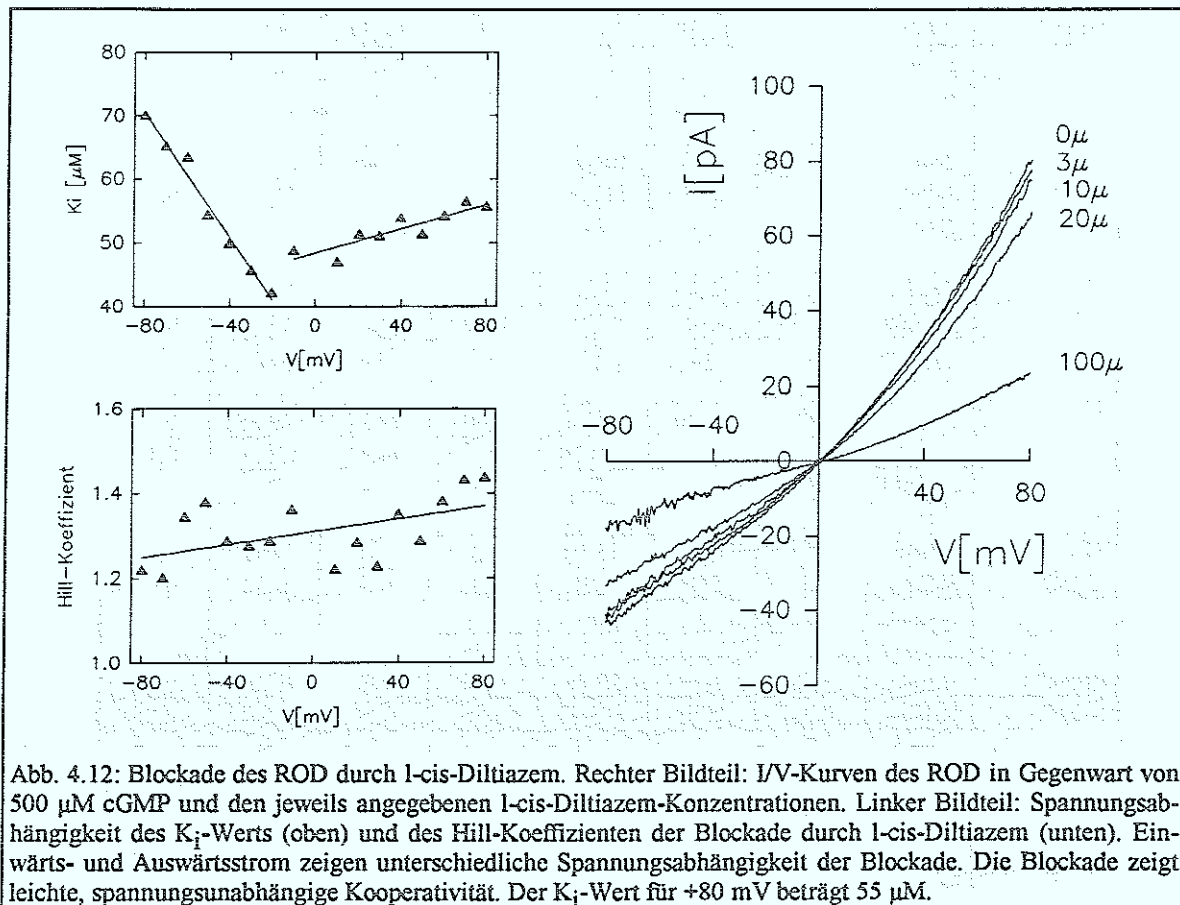
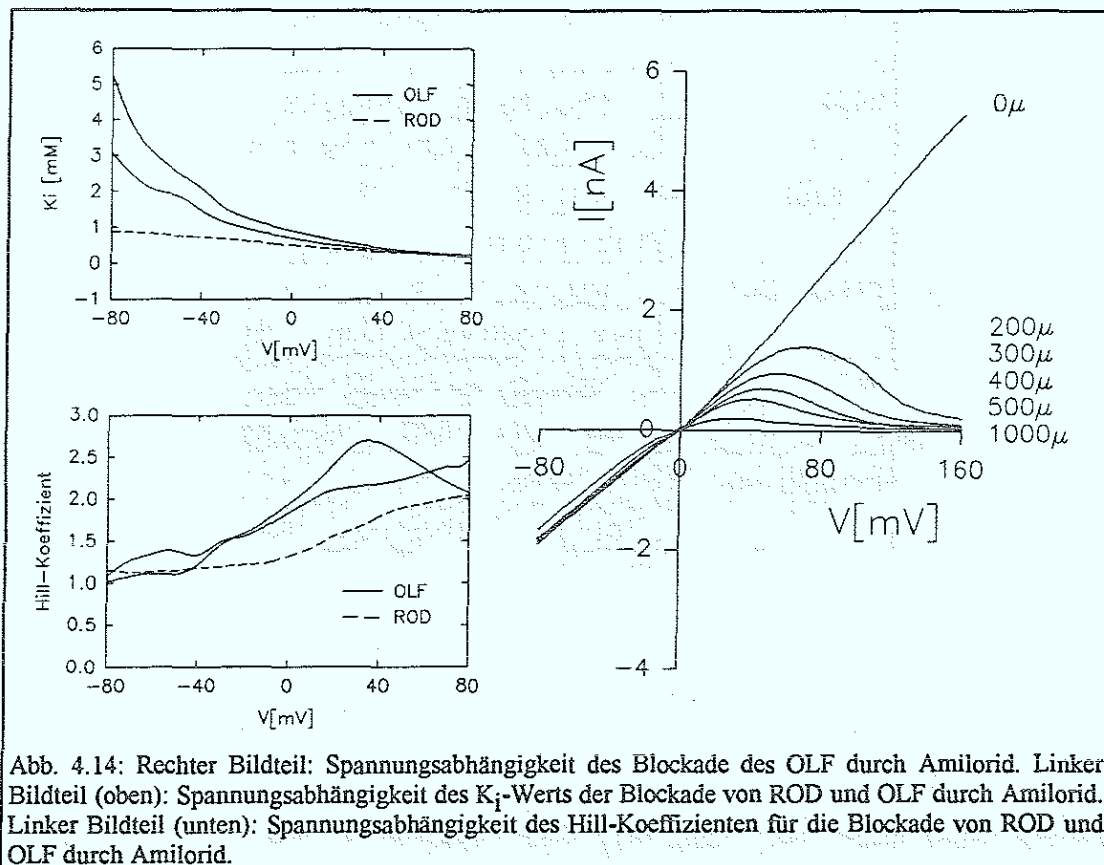
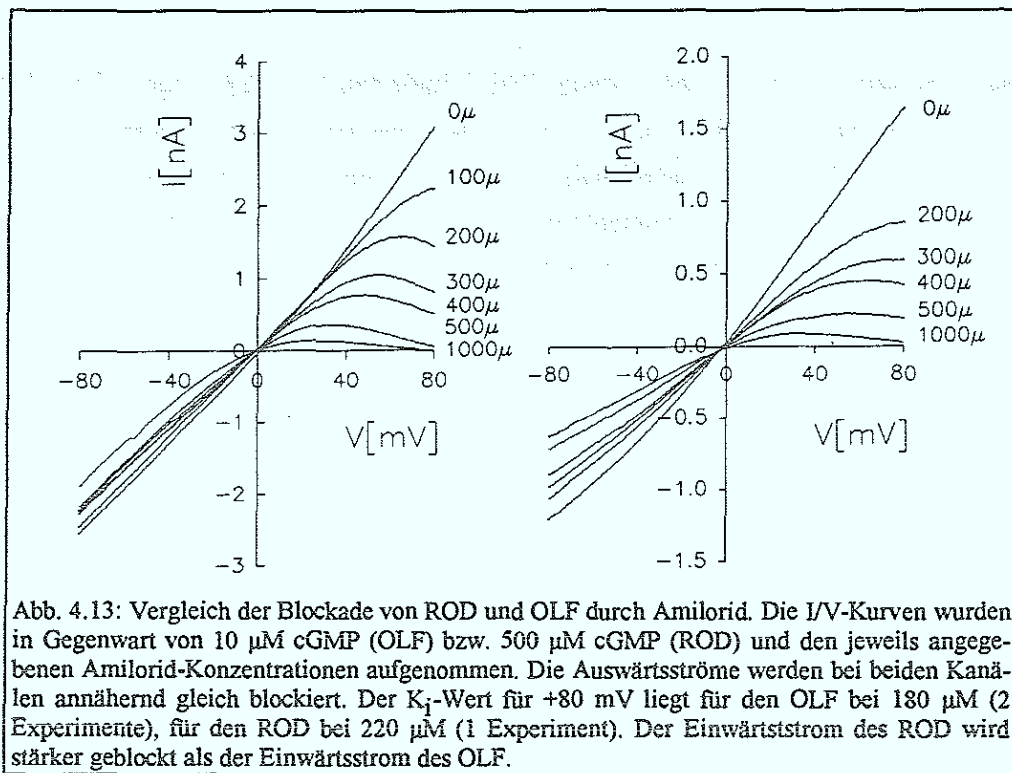


Abb. 4.12: Blockade des ROD durch l-cis-Diltiazem. Rechter Bildteil: I/V-Kurven des ROD in Gegenwart von 500 μM cGMP und den jeweils angegebenen l-cis-Diltiazem-Konzentrationen. Linker Bildteil: Spannungsabhängigkeit des K_i -Werts (oben) und des Hill-Koeffizienten der Blockade durch l-cis-Diltiazem (unten). Einwärts- und Auswärtsstrom zeigen unterschiedliche Spannungsabhängigkeit der Blockade. Die Blockade zeigt leichte, spannungsunabhängige Kooperativität. Der K_i -Wert für +80 mV beträgt 55 μM .

³⁹ l-cis-Diltiazem ist als Blocker von CNG-Kanälen *in situ* bekannt (Stern *et al.*, 1986; Quandt *et al.*, 1988; Haynes & Yau, 1988; McLatchie & Matthews, 1992; Kaupp *et al.*, 1989), die Versuche mit Amilorid wurden auf Anregung von Dr. S. Frings (KFA. IBI), durchgeführt (Frings & Lindemann, 1988). Das dem Amilorid verwandte 3',4'-Dichlorbenzamil ist als Blocker des olfaktorischen Kanals beschrieben (Kolesnikov *et al.*, 1990).



4.3 IONENSELEKTIVITÄT DER WILDTPYKANÄLE

Heterolog exprimierte wie *in situ* gemessene CNG-Kanäle zeigen eine geringe Selektivität für monovalente Kationen (Hodgkin et al., 1985). Funktionell gehören CNG-Kanäle somit zur Gruppe der nicht selektiven Kationenkanäle. Die Abbildungen 4.15 und 4.16 zeigen je eine Reihe von I/V-Kurven, die unter symmetrischen, biionischen Bedingungen gemessen wurden. Die cGMP-aktivierten Ströme des ChRod waren im Mittel so klein, daß keine typische I/V-Kurvenschar aus einem Patch gezeigt werden kann. Auch die Umkehrpotentiale des ChRod sind daher mit größerem Fehler behaftet als die Daten der anderen Kanäle.

Tab. 4.2 gibt eine Übersicht über die Permeabilitätskoeffizienten der untersuchten Wildtypkanäle. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Tab. 4.2	Selektivitätsreihenfolge
ROD (8)	NH ₄ : Na : K : Li : Rb : Cs
	3,72 : 1,04 : 1 : 0,71 : 0,69 : 0,34
OLF (6)	NH ₄ : K : Na : Li : Rb : Cs
	3,12 : 1 : 0,94 : 0,81 : 0,73 : 0,37
ChCone (4-10)	NH ₄ : K : Na : Li : Rb : Cs
	2,53 : 1 : 0,93 : 0,85 : 0,77 : 0,73
ChRod (3-8)	NH ₄ : K : Na : Li : Rb : Cs
	1,97 : 1 : 0,85 : 0,78 : 0,76 : 0,65
Herz153 (10-13)	NH ₄ : K : Na : Li : Rb : Cs
	3,04 : 1 : 0,99 : 0,97 : 0,79 : 0,48

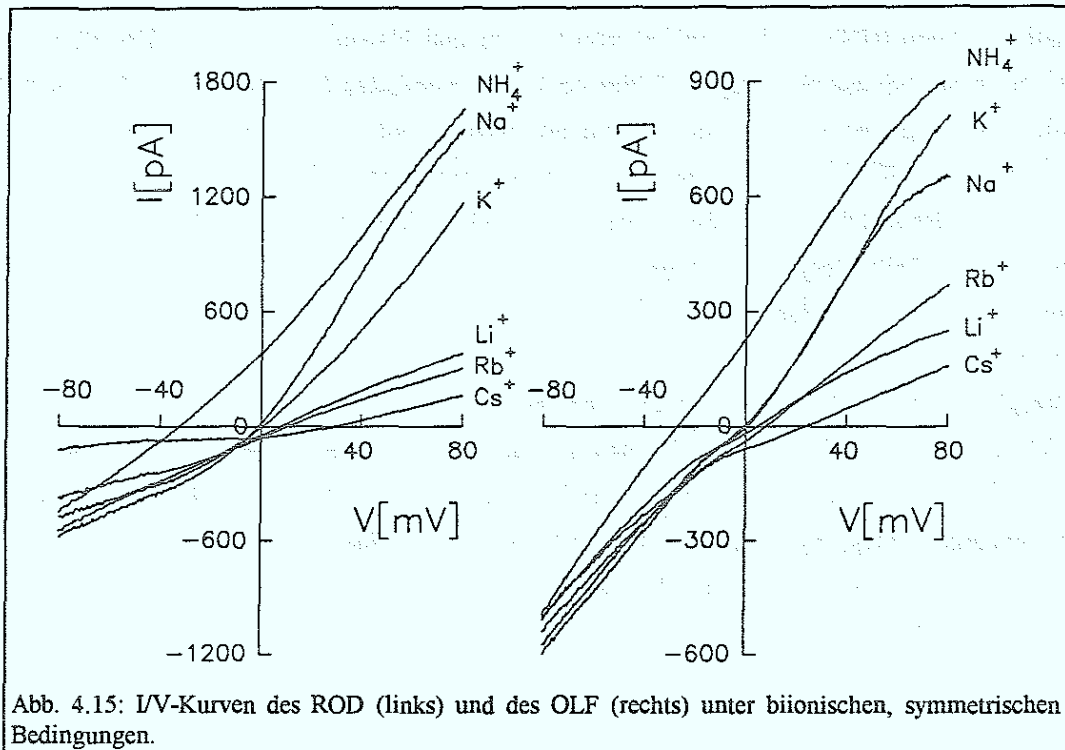


Abb. 4.15: I/V-Kurven des ROD (links) und des OLF (rechts) unter biionischen, symmetrischen Bedingungen.

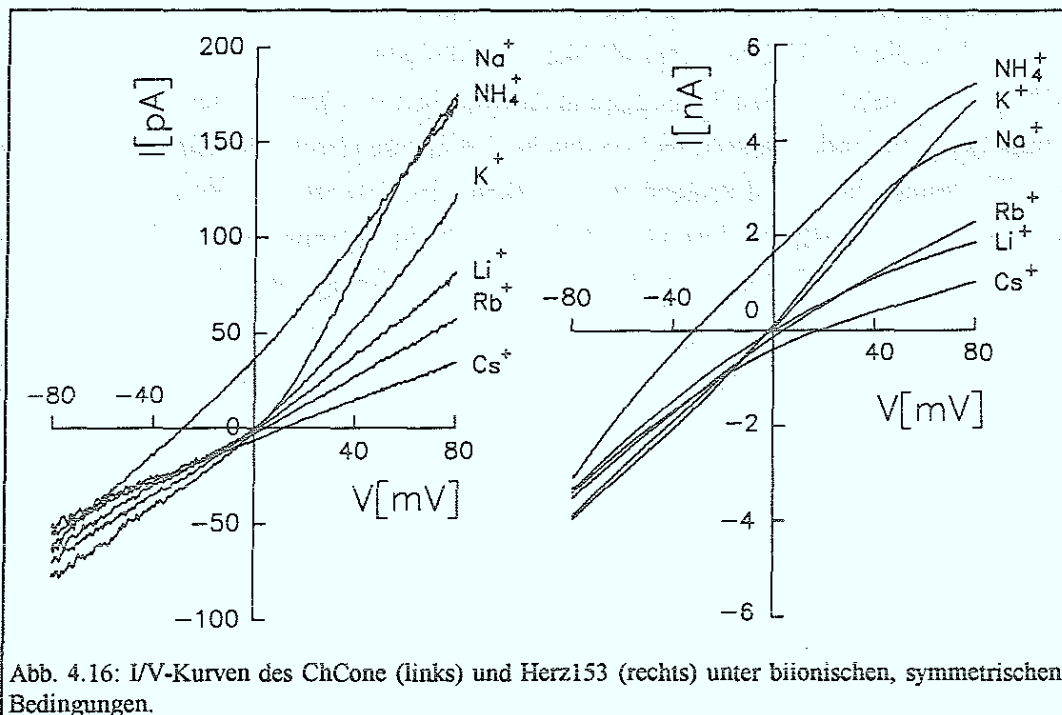
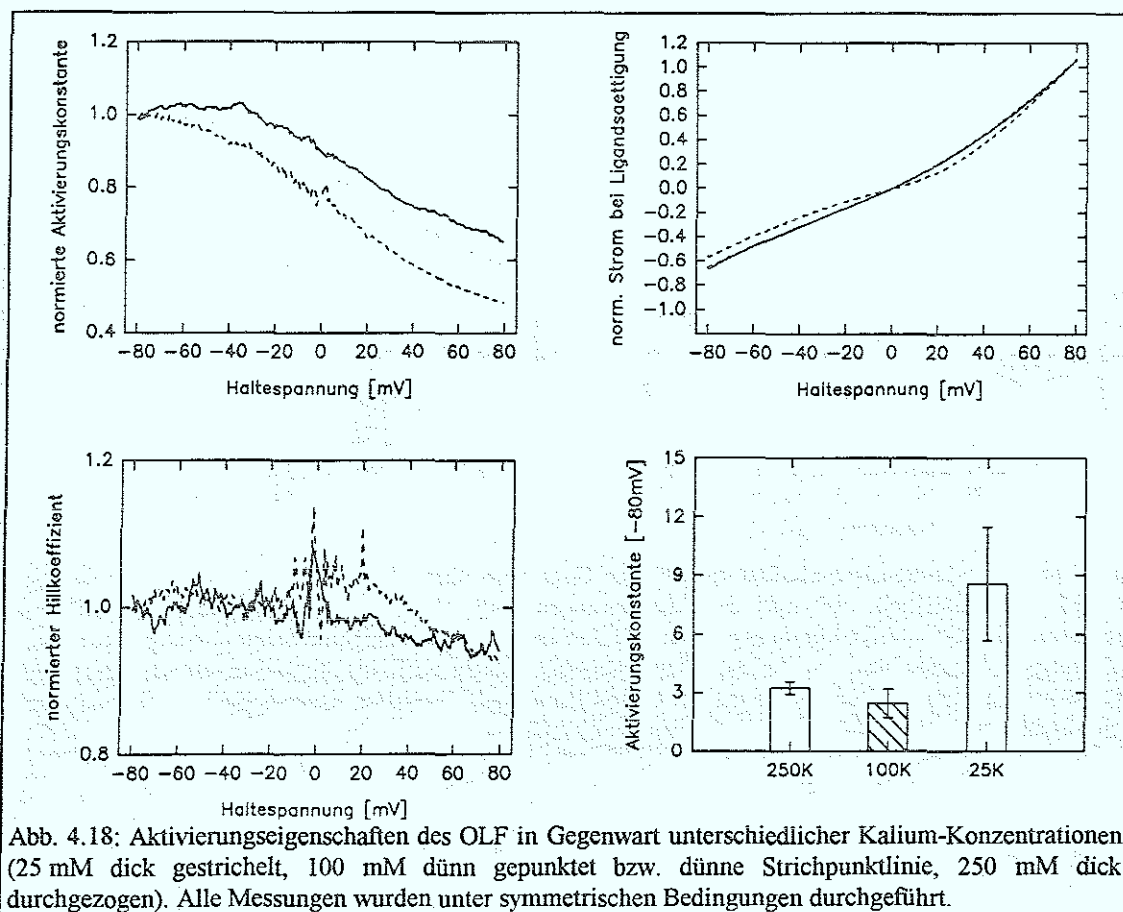
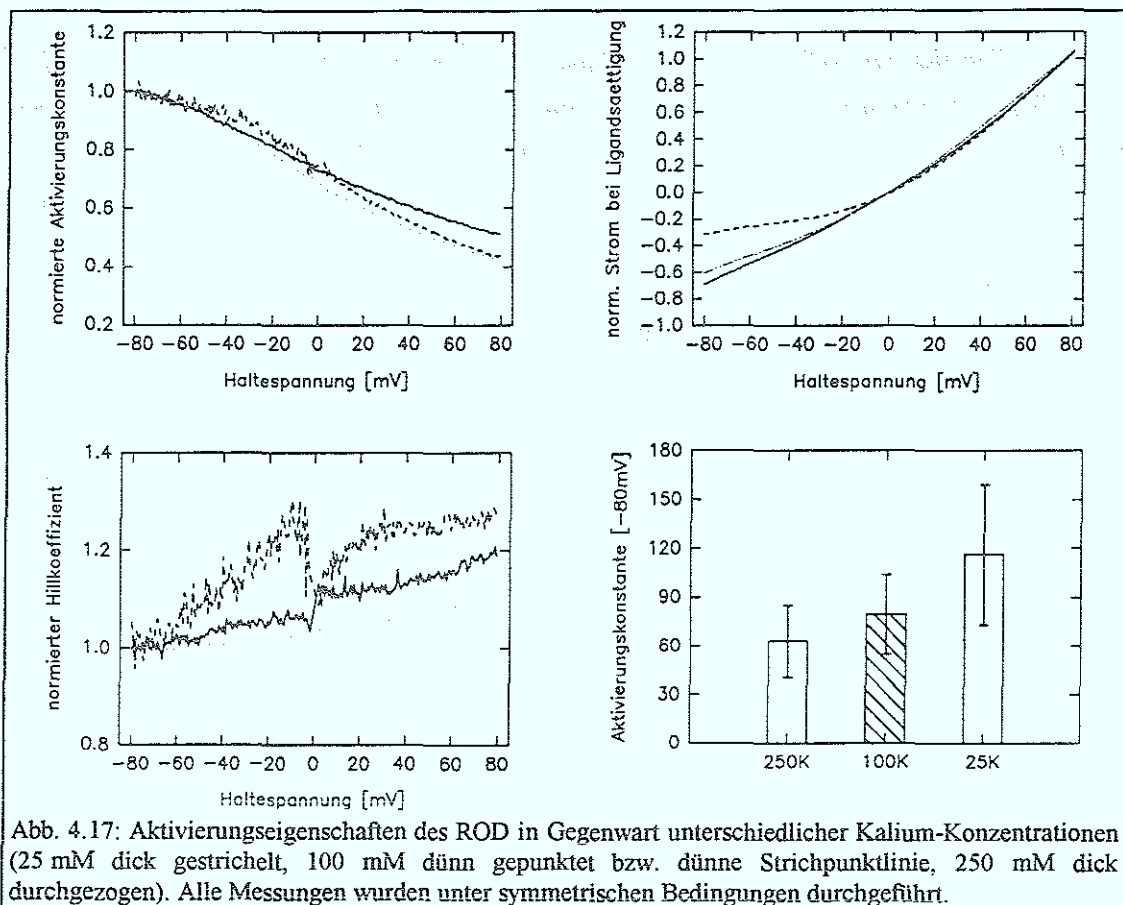


Abb. 4.16: I/V-Kurven des ChCone (links) und Herz153 (rechts) unter biionischen, symmetrischen Bedingungen.

Die Selektivitätsreihe, bestimmt aus dem Umkehrpotential, lautet $\text{NH}_4 > \text{K} > \text{Na} > \text{Li} > \text{Rb} > \text{Cs}$, lediglich beim ROD ist die Position von Kalium und Natrium vertauscht. Die Permeabilitätsreihen, bestimmt aus der Amplitude des vom entsprechenden Ion getragenen Stroms, unterscheiden sich dagegen stärker: Ammonium permeiert in allen Fällen am besten, Cäsium am schlechtesten. Im ROD und ChCone permeiert Natrium besser als Kalium und Litium besser als Rubidium. Beim OLF und in den beiden untersuchten Transkripten des Kanals aus Aortengewebe ist die Reihenfolge jeweils umgekehrt. Das Einknicken der Amplitude des Natriumstroms bei depolarisierenden Spannungen deutet auf einen Permeationsblock nahe der extrazellulären Seite des Kanalproteins.

Der Vergleich der I/V-Kurve des Cäsiums bei ROD und OLF (Abb. 4.15) weist auf einen weiteren Unterschied zwischen beiden Kanälen hin: Bei Messungen unter biionischen Bedingungen wird der Einwärtsstrom jeweils von einer anderen Ionensorte getragen als der Auswärtsstrom. In den gezeigten Messungen ist der Einwärtsstrom von Kalium getragen, der Auswärtsstrom von wechselnden Ionensorten. Trotzdem weicht z.B. der in Gegenwart intrazellulären Cäsiums gemessene Kaliumeinwärtsstrom deutlich von dem in Gegenwart intrazellulären Kaliums gemessenen Kaliumeinwärtsstrom ab. Der Effekt ist beim ROD deutlicher ausgeprägt als beim OLF. Neben einer vermutlich zu vernachlässigenden Kontamination der unperfundierten Lösung in der Meßpipette durch die im Auswärtsstrom geflossenen Fremdionen kann das Phänomen durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklärt werden: Fremdionen können Bindestellen in der Kanalpore besetzen und den Kaliumstrom blockieren, oder sie wirken auf intrazelluläre Bindestellen, die die Offenwahrscheinlichkeit beeinflussen.

Mit einigen Ionensorten wurden Messungen in Abwesenheit von Kalium durchgeführt. Zusätzlich wurde die Ionenstärke variiert, da von den beiden anderen Proteinfamilien mit homologer Nukleotidbindestelle (CAP und Proteinkinasen) bekannt ist, daß der Funktionszustand des Proteins auch von der Ionenstärke abhängt. Abb. 4.17 zeigt die Ergebnisse unterschiedlicher Kaliumkonzentrationen für den ROD, Abb. 4.18 die entsprechenden Experimente am OLF.



Die Gleichrichtung des ROD ändert sich je nach Kaliumkonzentration: Sie nimmt bei abnehmender Kaliumkonzentration zu. Die Aktivierungskonstante des ROD wird mit zunehmender Kaliumkonzentration kleiner ($116,1 \mu\text{M}$ für 25 mM, $79,5 \mu\text{M}$ für 100 mM, $62,9 \mu\text{M}$ für 250 mM). Das Rauschen des Kaliumeinwärtsstromes nimmt bei kleinen Konzentrationen deutlich stärker zu als das Rauschen der Auswärtsströme. Es weist darauf hin, daß die unterschiedliche Gleichrichtung in erster Linie durch eine Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit hervorgerufen wird (vgl. Abb. C12, C10 und C13). Die Gleichrichtung wird demnach möglicherweise durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst, die durch Erhöhung der Kalium-Konzentration abgeschirmt werden können.

Beim OLF erkennt man für niedrige Kaliumkonzentration (25 mM) ebenfalls eine verstärkte Gleichrichtung, bei Erhöhung der Kaliumkonzentration (250 mM) hingegen tritt keine merkliche Veränderung der Gleichrichtung ein. Auch die Aktivierungskonstante ist in 250 mM KCl nicht niedriger als in 100 mM KCl Lösung.

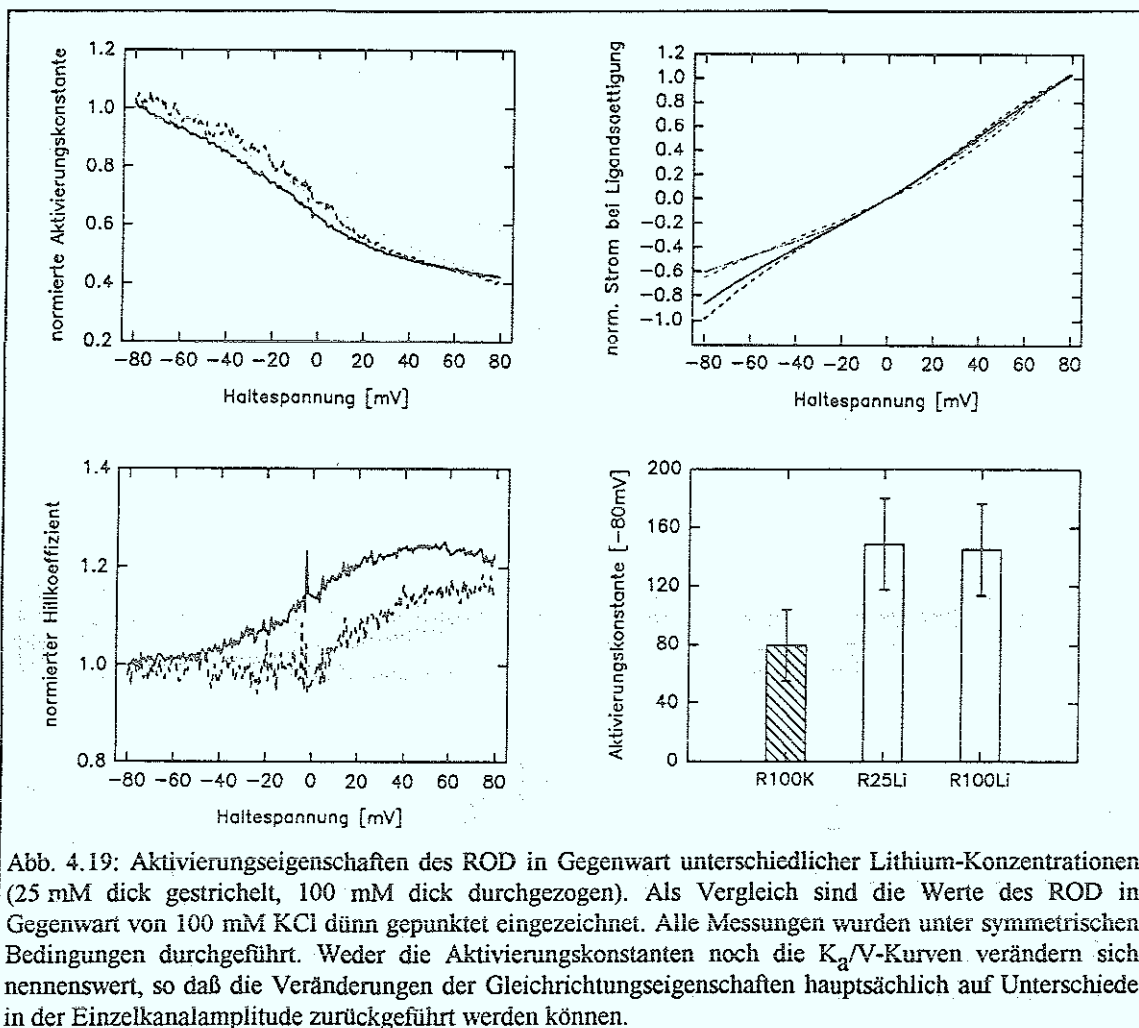


Abb. 4.19: Aktivierungseigenschaften des ROD in Gegenwart unterschiedlicher Lithium-Konzentrationen (25 mM dick gestrichelt, 100 mM dick durchgezogen). Als Vergleich sind die Werte des ROD in Gegenwart von 100 mM KCl dünn gepunktet eingezeichnet. Alle Messungen wurden unter symmetrischen Bedingungen durchgeführt. Weder die Aktivierungskonstanten noch die K_a/V -Kurven verändern sich nennenswert, so daß die Veränderungen der Gleichrichtungseigenschaften hauptsächlich auf Unterschiede in der Einzelkanalamplitude zurückgeführt werden können.

Abb. 4.19 (ROD) und 4.20 (OLF) zeigen I/V-Kurven für 25 und 100 mM Lithium. Lithium beeinflusst die Aktivierungskonstante und die K_a/V -Kurve im Vergleich zu Kalium kaum. Die I/V-Kurve wird weniger auswärtsgleichrichtend, beim OLF wird sie sogar einwärtsgleichrichtend. Das stimmt mit dem in den Ionenselektivitätsmessungen beobachteten Block des Auswärtsstroms durch Lithium überein. Die in Gegenwart von Lithium beobachteten Veränderungen der I/V-Kurve scheinen demnach eher auf unterschiedlichen Permeationseigenschaften als auf veränderten Schalteigenschaften des Kanals zu beruhen.

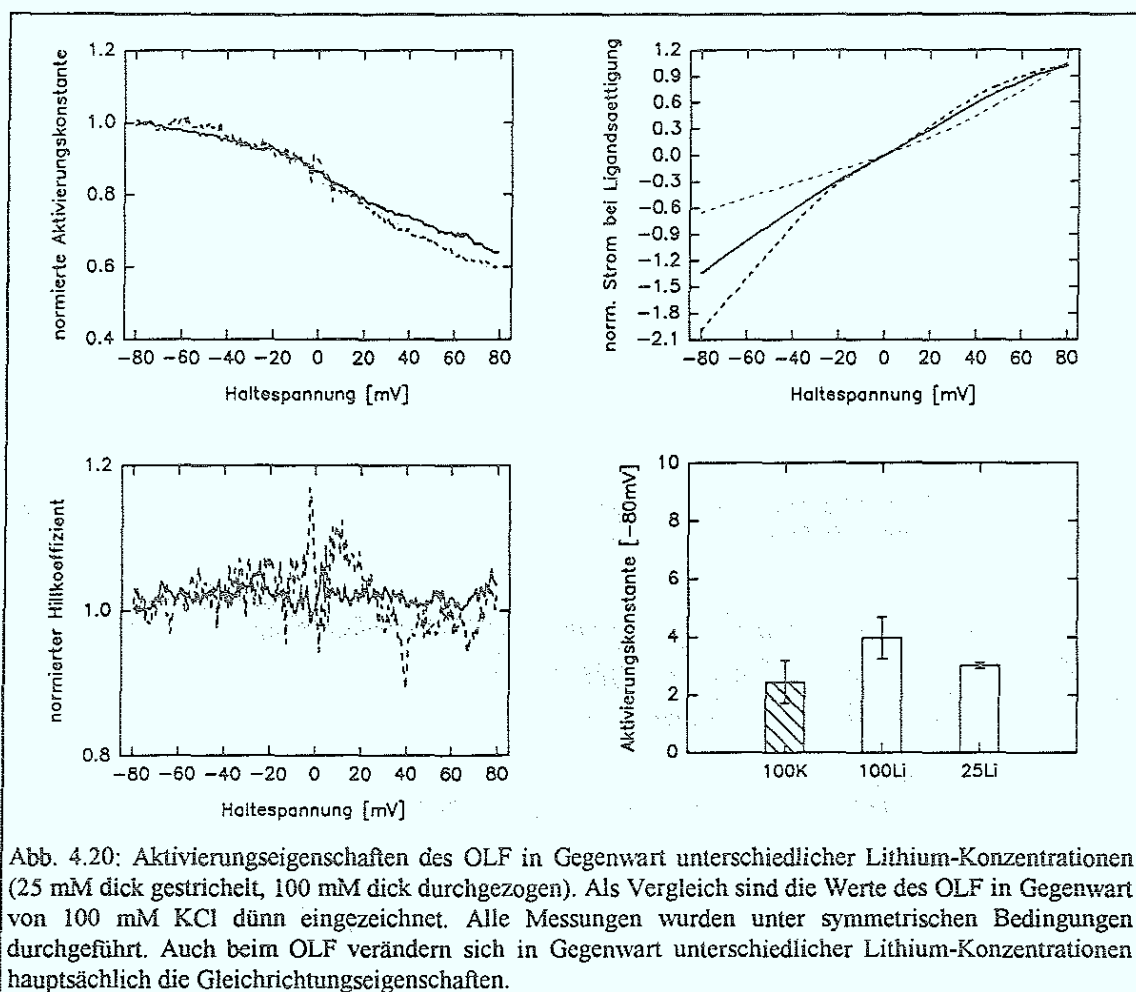
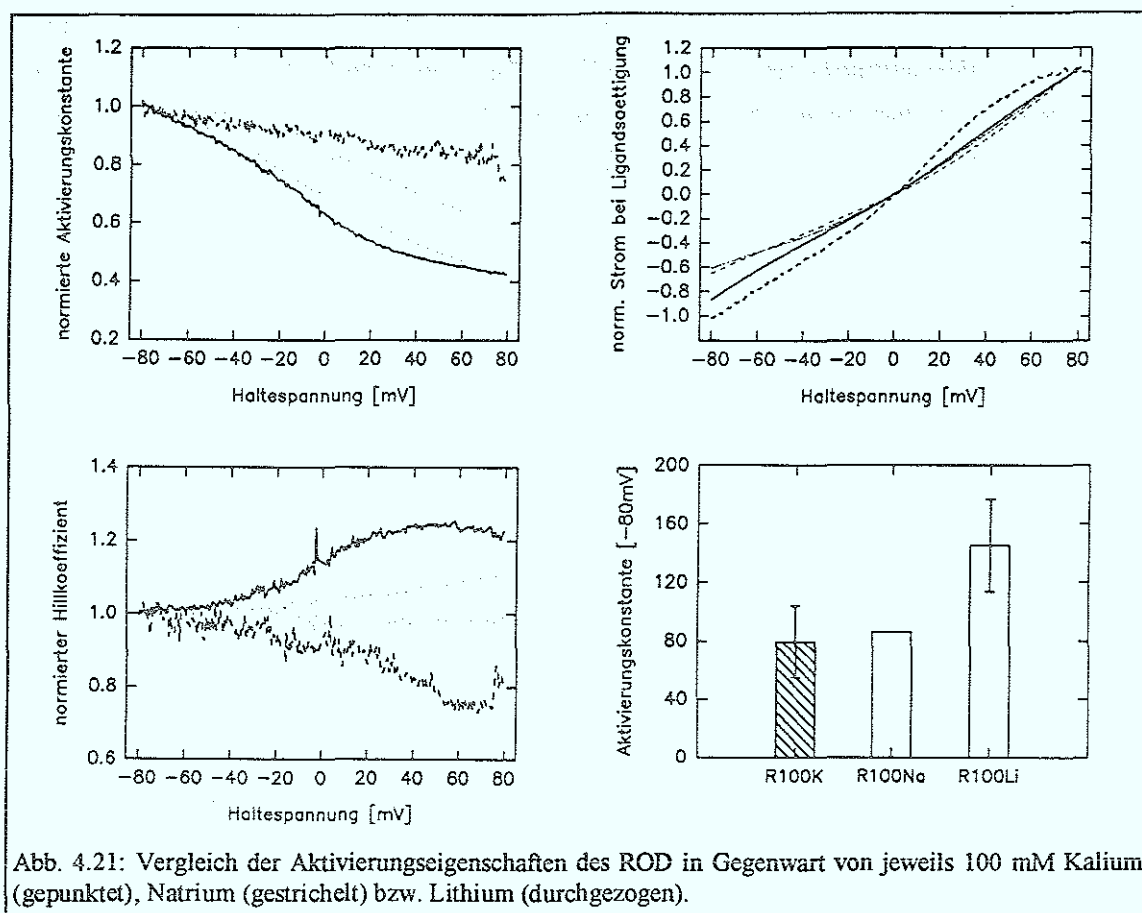


Abb. 4.21 zeigt einen Vergleich der Aktivierungseigenschaften des ROD durch je 100 mM Kalium, Lithium oder Natrium unter symmetrischen Bedingungen. In Gegenwart von Natrium wird die Aktivierungskonstante des ROD nahezu spannungsunabhängig.



Anhang C zeigt Meßdaten, die in Gegenwart von Ammonium aufgenommen wurden. Messungen in Gegenwart von Ammonium waren, ähnlich wie Messungen in Gegenwart von Natrium schwierig, da die Variabilität der Ergebnisse stark zunahm.

Die Analyse der Veränderung von Permeations- bzw. Gatingeigenschaften kann jedoch erst nach Abschluß der Einzelkanalmessungen vorgenommen werden.

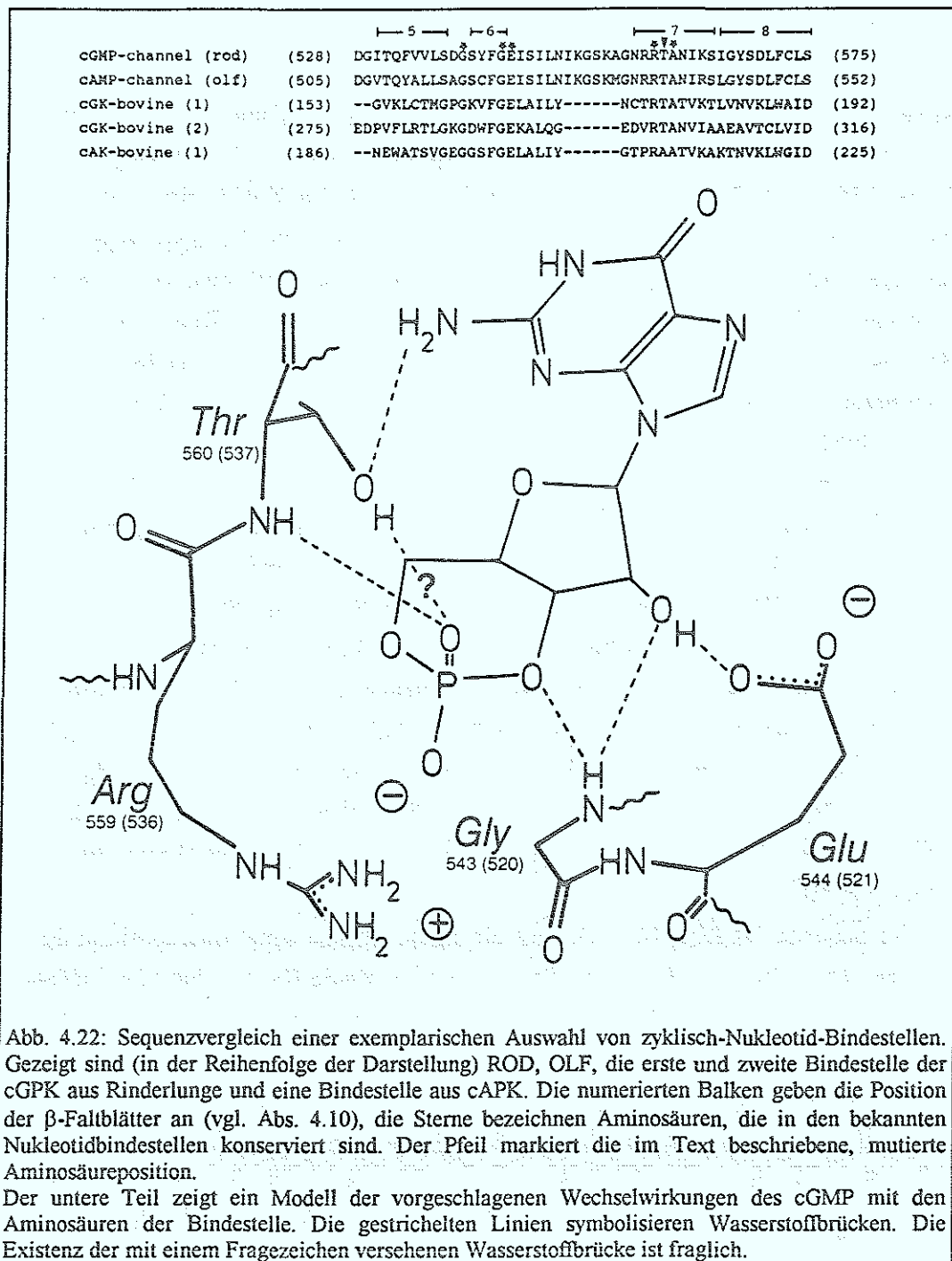
4.4 LIGANDENSELEKTIVITÄT DER CNG-KANÄLE DES RINDS

Die Nukleotidempfindlichkeit der CNG-Kanäle des Rinds (ROD, OLF) wird auf mindestens zwei Ebenen reguliert: Der in *Xenopus* Oozyten exprimierte OLF ist 30fach empfindlicher für cGMP und 15fach empfindlicher für cAMP als der ROD. Beide Kanäle sind außerdem empfindlicher für cGMP als für cAMP (ROD 15fach, OLF 40fach; K_a ROD(cGMP): 79 μ M; K_a ROD(cAMP): 1,2 mM; K_a OLF(cGMP): 2,4 μ M; K_a OLF(cAMP): 92 μ M; vgl. Abb. 4.2; alle Werte bezogen auf -80 mV). cAMP ist für den OLF ein voller, für den ROD hingegen nur ein partieller Agonist. Der Unterschied der Aktivierbarkeit des ROD durch cGMP bzw. cAMP geht zumindest teilweise auf eine in Gegenwart von cAMP verminderte Offenwahrscheinlichkeit zurück (Ildefonse *et al.*, 1992).

Weber *et al.* haben eine Hypothese aufgestellt, die die entwicklungsgeschichtliche Trennung von cGMP-abhängigen und cAMP-abhängigen Proteinkinasen durch den Austausch einer einzigen Aminosäure erklärt (Weber *et al.*, 1989): 38 von 40 Bindestellen in cAMP-abhängigen Proteinkinasen enthalten ein Alanin an einer spezifischen Sequenzposition (die Position ist in Abb. 4.22 im oberen Bildteil mit einem Pfeil markiert, s. Pos. 678 in Abb. B1), während die Aminosäureposition in allen 10 bekannten Bindestellen cGMP-abhängiger Proteinkinasen durch ein Threonin besetzt ist. Das Modell erklärt die höhere Affinität der cGPK-Bindestellen zum cGMP durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe des Threonins und der 2-Aminogruppe des Guanosins. Eine entsprechende Wechselwirkung zwischen Threonin und cAMP ist nicht möglich, da beim cAMP lediglich ein Wasserstoff an Position 2 sitzt (vgl. Abb. 4.22).

Auch in der Sequenz des ROD bzw. OLF ist die entsprechende Aminosäureposition durch ein Threonin besetzt (T560 im ROD bzw. T537 im OLF). Beide Kanäle sind empfindlicher für cGMP als für cAMP. Im CAP ist die entsprechende Aminosäureposition durch ein Serin besetzt. Es wurden daher Mutanten untersucht, in denen das Threonin entweder durch ein Alanin oder durch ein Serin ersetzt ist.

Abb 4.23 faßt die Aktivierungskonstanten der Mutanten zusammen. Der Unterschied der Wildtyp-Aktivierungskonstanten für cAMP und cGMP verschwindet in beiden T/A-Mutanten (K_a (ROD cGMP) 79 μ M, K_a (ROD cAMP) 1,2 mM, K_a (T560A cGMP) 1,4 mM, K_a (T560A cAMP) 2,6 mM, K_a (OLF cGMP) 2,5 μ M, K_a (OLF cAMP) 92 μ M, K_a (T537A cGMP) 95,6 μ M, K_a (T537A cAMP) 26,89 μ M). Die T/A Mutante des OLF (T537A) wird sogar etwa 3fach empfindlicher für cAMP als für cGMP (27 μ M für cAMP, 96 μ M für cGMP).



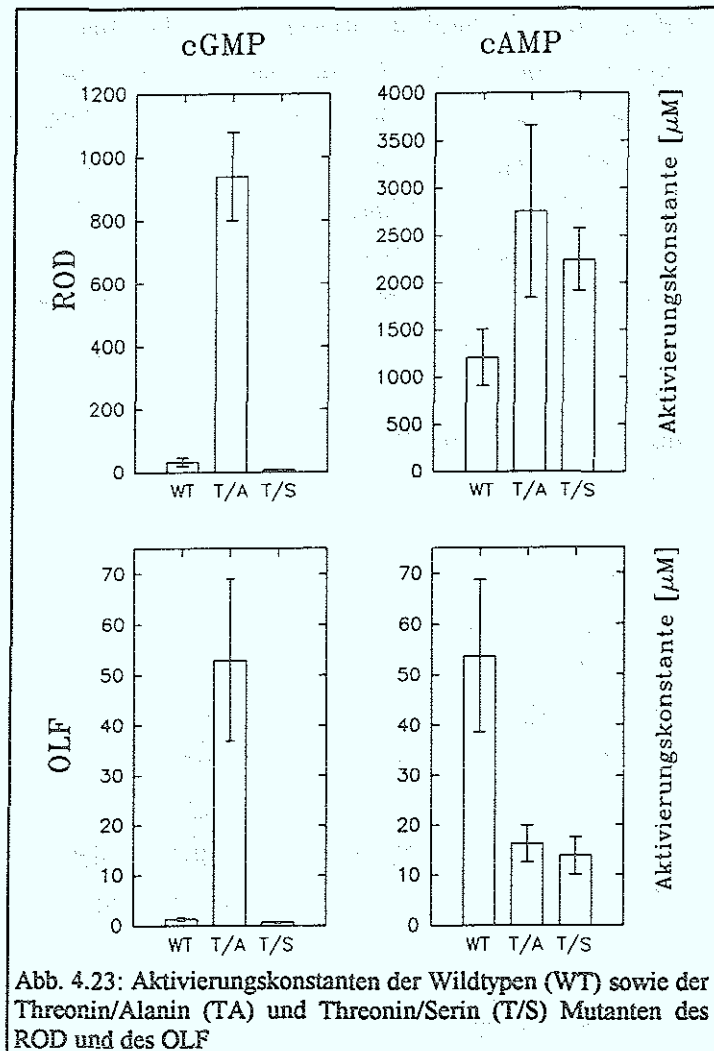
Die T/S Mutanten von ROD und OLF sind beide empfindlicher für cGMP als der ROD- bzw. OLF-Wildtyp (K_a (ROD cGMP) 79 μ M, K_a (T560S cGMP) 15,4 μ M, K_a (OLF cGMP) 2,5 μ M, K_a (T537S cGMP) 0,95 μ M). Die Aktivierungskonstanten der T/S bzw. T/A Mutanten für cAMP unterscheiden sich nur unwesentlich (K_a (T560S cAMP) 2,3 mM, K_a (T560A cAMP) 2,6 mM, K_a (T537S cAMP) 31,1 μ M, K_a (T537A cAMP) 26,9 μ M).

Die Stromamplitude in Gegenwart von cAMP bzw. cGMP blieb in den OLF Mutanten unverändert gleich. Im ROD erreicht die T560A Mutante 12-16 % und die T560S Mutante 25-33 % der maximal mit cGMP aktivierbaren Ströme (im Vergleich zu 5-17 % im Wildtyp).

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese von Weber *et al.* teilweise:

OH-Gruppen-tragende Aminosäuren (Serin, Threonin), die zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der OH-Gruppe und der 2-Aminogruppe des Guanosins fähig sind, erhöhen die Empfindlichkeit der Bindestelle für cGMP. Alanin, das nicht zur Ausbildung der Wasserstoffbrücke fähig ist, bewirkt eine etwa gleiche Empfindlichkeit für cGMP und cAMP. Die cAMP-Aktivierungskonstanten der Mutanten verändern sich uneinheitlich beim ROD und beim OLF. Im ROD sind die cAMP-Aktivierungskonstanten der T/A bzw. T/S Mutante etwa 2fach höher als im Wildtyp, im OLF etwa 3fach niedriger. Die Wasserstoffbrücke verbessert spezifisch die cGMP-Bindung im Vergleich zur cAMP-Bindung. Der umgekehrte Schluß, daß Bindestellen mit Alanin in der entsprechenden Position empfindlicher für cAMP als für cGMP seien, gilt für die Bindestelle der CNG-Kanäle nicht. Es ist zu vermuten, daß die etwa 200fach größere Affinität der cAPK für cAMP gegenüber cGMP durch die Beteiligung anderer Wechselwirkungen reguliert wird.

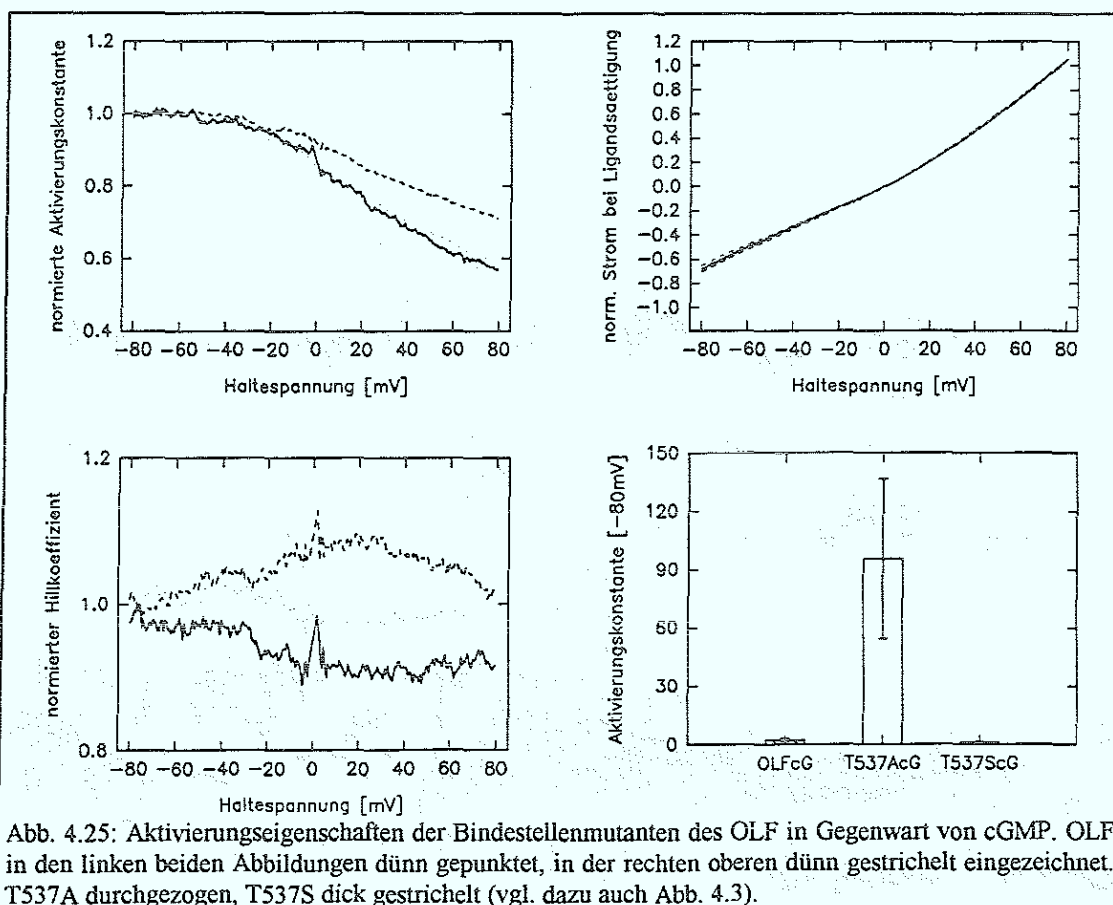
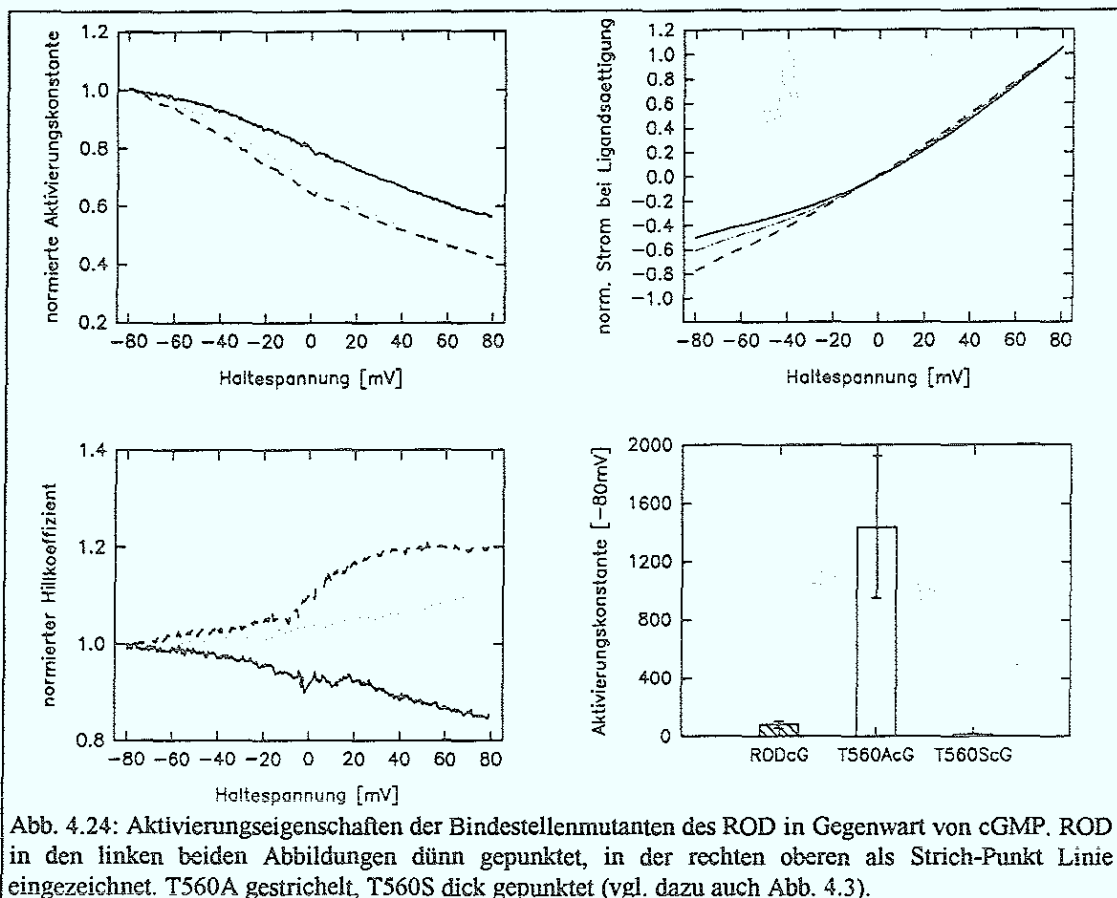
Im Vergleich zum Serin verfügt Threonin über eine zusätzliche Methylgruppe. Möglicherweise wird die Ausbildung der relevanten Wasserstoffbrücke zwischen Aminosäure 560 bzw. 537



und dem Liganden durch die freiere Drehbarkeit der Hydroxylgruppe in der T/S Mutante begünstigt. Der aus den Aktivierungskonstanten berechnete Unterschied der freien Energie zwischen der "besseren" T/S Mutante und der zur Ausbildung der H-Brücke unfähigen T/A Mutante ergibt einen Unterschied von 3 kcal/Mol (Altenhofen *et al.*, 1991). Dieser Wert stimmt gut mit der freien Energie einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung überein.

Mutationen, die die Wechselwirkung des R559 (ROD) bzw. R536 (OLF) und dem negativ geladenen Phosphatrest betreffen (RODCG1-4, vgl. Anhang B), führen zum Funktionsverlust der Bindestelle. Wie in den verwandten Bindestellen der Proteinkinasen scheint auch in den Bindestellen der CNG-Kanäle der Hauptanteil der zur Aktivierung führenden Konformationsänderung aus der ionischen Wechselwirkung des Phosphatrests zu stammen, während die Wechselwirkungen des Guanosinrests mit der Bindestelle hauptsächlich modulatorische Wirkung haben. Wenn die Orientierung der Phosphatgruppe jedoch mit der des Nukleotids in der CAP-Bindestelle übereinstimmt, muß das cGMP-Molekül in *syn*-Konformation (vgl. Abb. D8 und D9) gebunden werden, bzw. die zusätzliche Wasserstoffbrücke muß die *syn*-Konformation gegenüber der *anti*-Konformation stabilisieren.

Die Veränderungen der K_a/V -Kurven für die cGMP-aktivierten T/S und T/A Mutanten (Abb. 4.24 für den ROD, Abb. 4.25 für den OLF) lassen sich nicht eindeutig interpretieren. Bei jeweils einer Mutante ist die Spannungsabhängigkeit der K_a/V -Kurve vermindert, während die andere Wildtypeigenschaften zeigt: Beim ROD weicht die T560A Mutante ab, beim OLF die T537S Mutante. Die K_a/V -Kurven der cAMP-aktivierten T/S und T/A Mutanten (Abb. 4.26 für den ROD, Abb. 4.27 für den OLF) stimmen dagegen jeweils beide mit dem entsprechenden Wildtyp überein: Die K_a/V -Kurve des ROD und der T560A bzw. T560S Mutante für cAMP sind linear. Die K_a/V -Kurven des OLF und der T537A bzw. T537S Mutante verlaufen genau wie die K_a/V -Kurve des cGMP-aktivierten OLF.



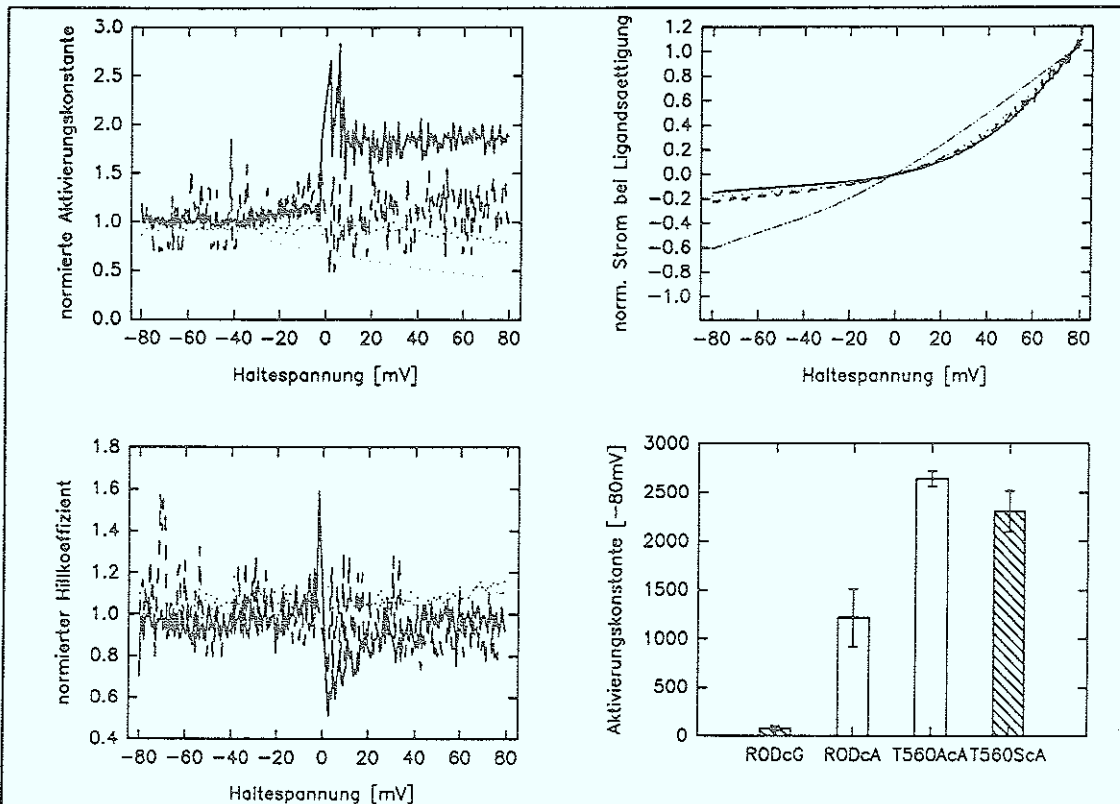


Abb. 4.26: Aktivierungseigenschaften der Bindestellenmutanten des ROD in Gegenwart von cAMP. ROD (cGMP) in den linken beiden Abbildungen dünn gepunktet, in der rechten oberen als Strich-Punkt Linie eingezeichnet. ROD (cAMP) durchgezogene Linie; T560A gestrichelt, T560S dick gepunktet (vgl. dazu auch Abb. 4.3).

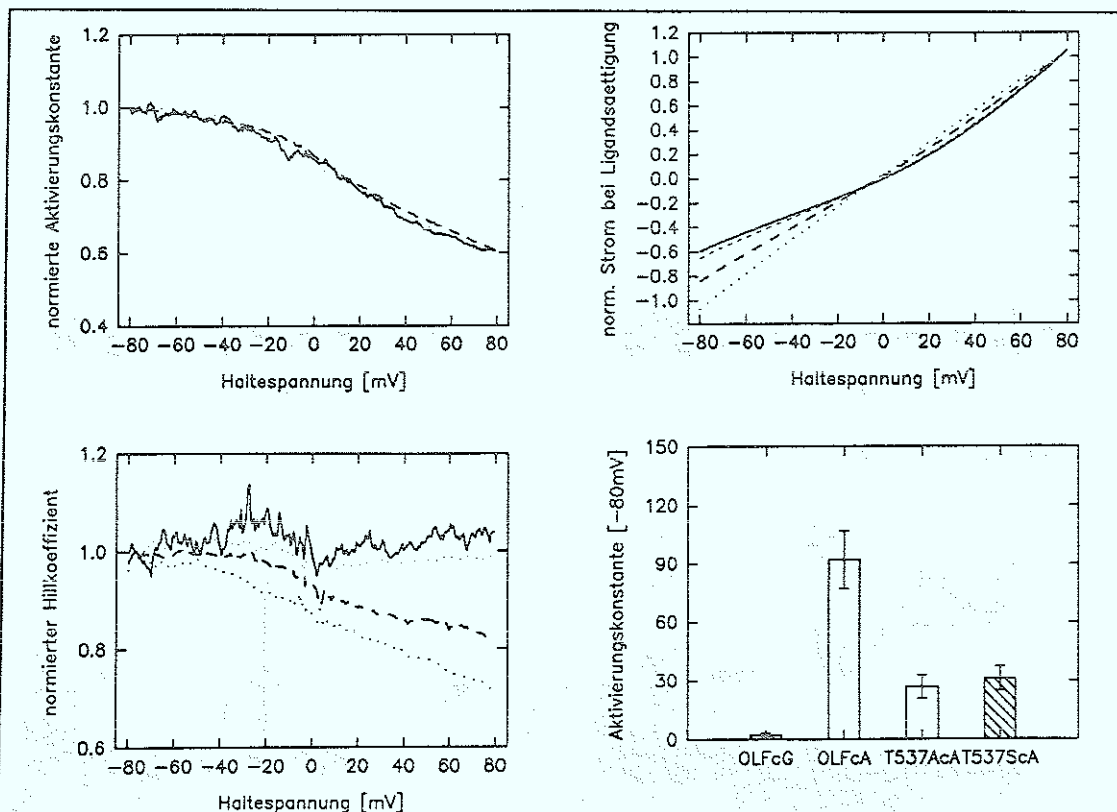


Abb. 4.27: Aktivierungseigenschaften der Bindestellenmutanten des OLF in Gegenwart von cAMP. OLF (cGMP) in den linken beiden Abbildungen dünn gepunktet, in der rechten oberen dünn gestrichelt eingezeichnet. OLF (cAMP) dick durchgezogen, T537A dick gestrichelt, T537S dick gepunktet (vgl. dazu auch Abb. 4.3).

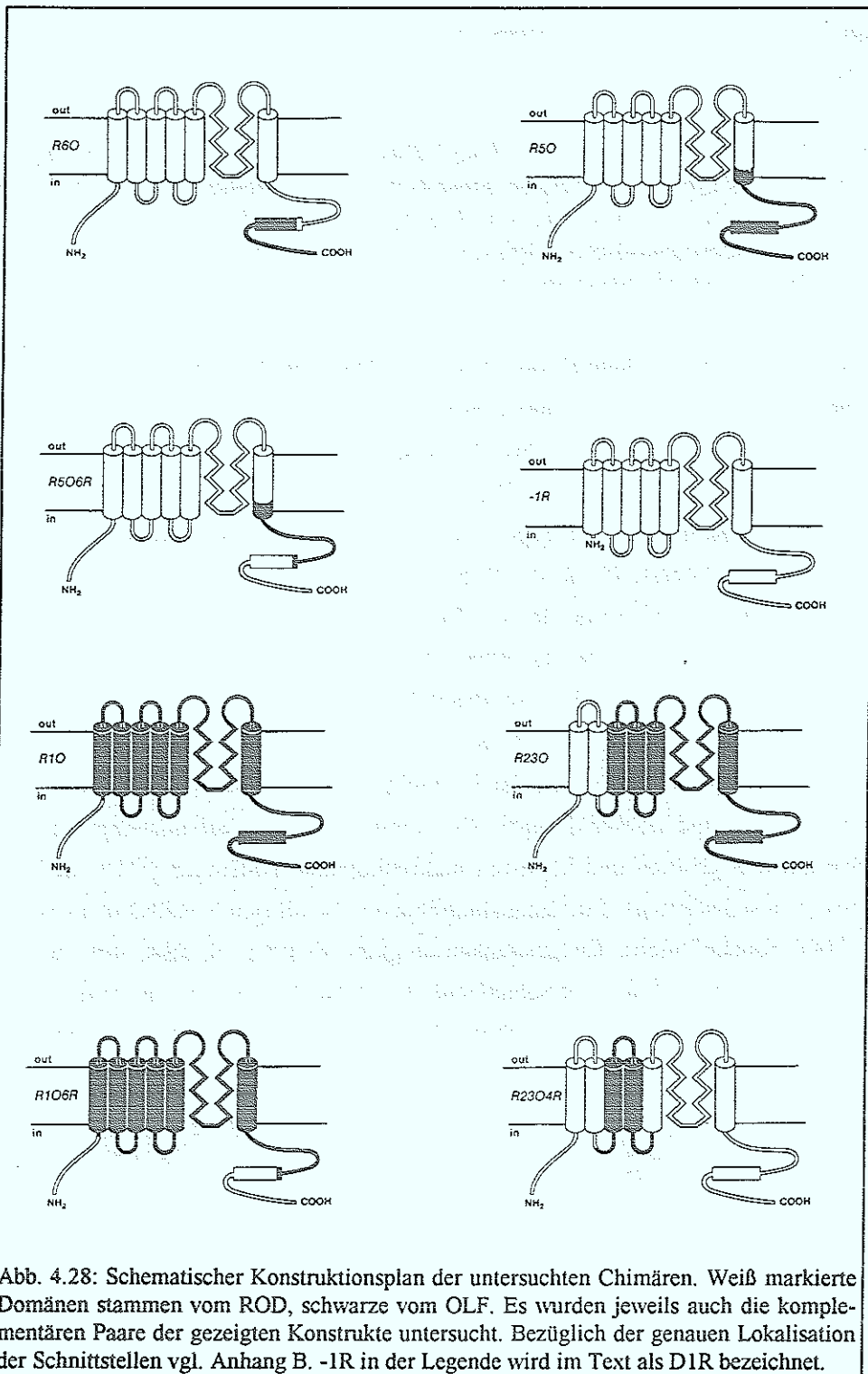
4.5 DER UNTERSCHIED DER ABSOLUTEN LIGANDEMPFINDLICHKEIT VON ROD UND OLF FÜR cGMP

"It is certain that all bodies whatsoever, though they have no sense, yet they have perception; for when one body is applied to another, there is a kind of election to embrace that which is agreeable, and to exclude or expel that which is ingrate; and whether the body be alterant or altered, evermore a perception precedeth operation; for else all bodies would be like one to another." (F. Bacon nach Monod et al., 1965)

Die größere absolute Empfindlichkeit des OLF gegenüber dem ROD für beide Nukleotide blieb in den untersuchten Bindestellenmutanten im wesentlichen erhalten. Nachdem gezeigt werden konnte, daß die C-terminale, intrazelluläre Domäne, die die Bindestelle enthält, nicht für diesen Unterschied verantwortlich ist (s. Seite 77), wurde eine Reihe weiterer Chimären aus komplementären Teilen von ROD und OLF (vgl. Abb. 4.28 und B1) konstruiert und getestet, um die Aminosäuren zu identifizieren, die an der Regulation der Empfindlichkeit beteiligt sind. Bezüglich der Lage der Schnittstellen und der zur Bezeichnung der Chimären verwendeten Nomenklatur vgl. Anhang B bzw. Abkürzungsverzeichnis.

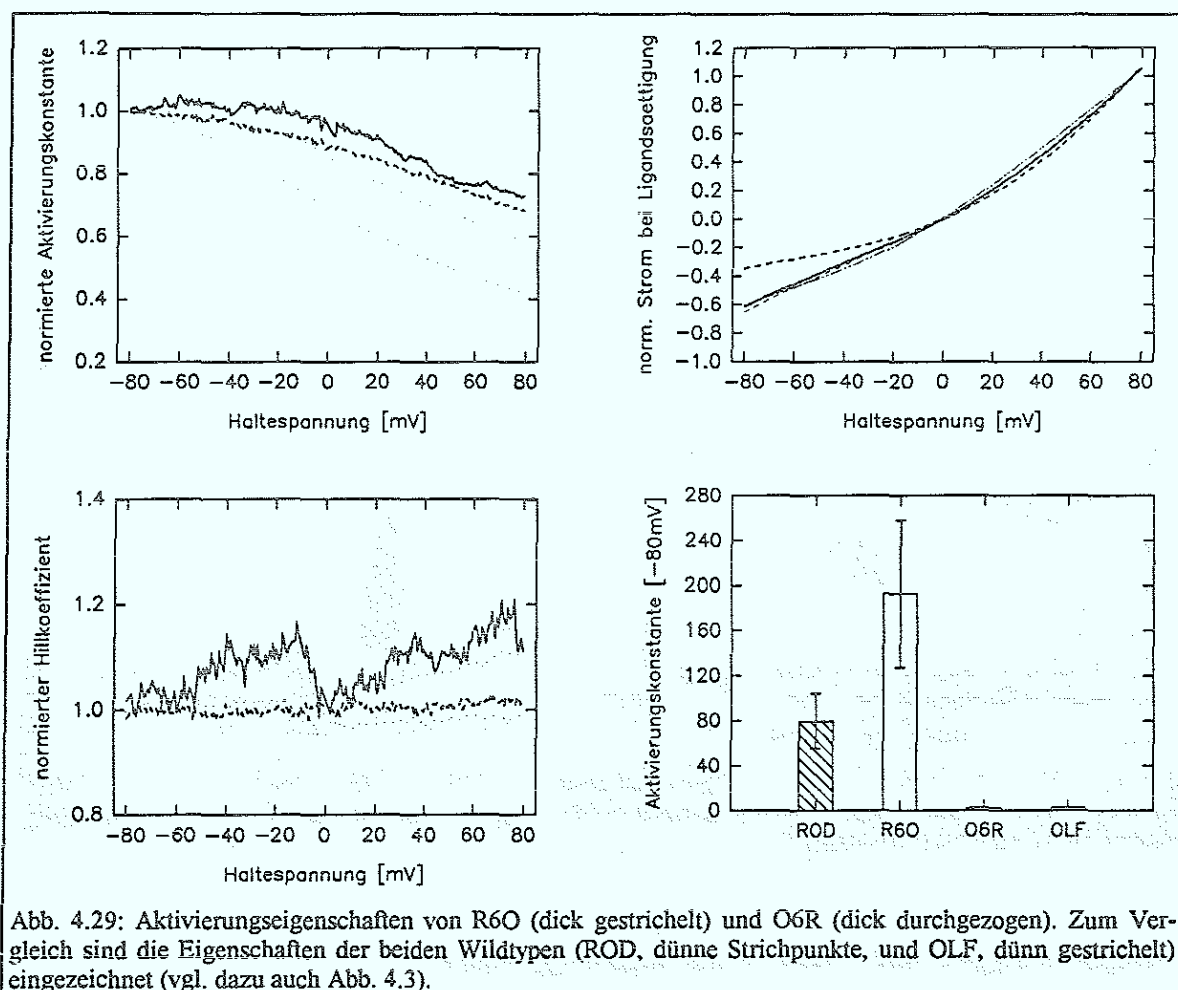
Die Chimären sind jeweils als reziproke Paare konstruiert. Von 21 untersuchten Chimären konnten 16 bisher funktionell exprimiert werden. Die maximal aktivierbare Amplitude der im abgezogenen Patch gemessenen Ströme lag im Mittel zwischen 30 pA und 7,9 nA im Vergleich zu ca. 4 nA im ROD- und OLF-Wildtyp⁴⁰. Der Vergleich der Einzelkanalamplituden zwischen der Chimäre mit den größten und kleinsten makroskopischen Strömen (D1R, makroskopisch 24 pA (etwa 10 Kanäle/Patch), Einzelkanalleitfähigkeit 34 pS (s.u.); R23O makroskopisch 7,9 nA (etwa 3000 Kanäle/Patch), Einzelkanalleitfähigkeit 33 pS (vgl. Abs. 4.9) zeigt, daß die Unterschiede vorwiegend auf unterschiedliche Expressionsdichte zurückzuführen sind. Es wurden jedoch noch nicht von allen Chimären Einzelkanaldaten aufgenommen (vgl. Abs. 4.9).

⁴⁰ Im Einzelnen betrugen die mittleren Amplituden in Gegenwart sättigender Ligandkonzentration 4,3 nA beim OLF, 4,1 nA beim ROD, 90 pA beim O6R, 400 pA beim R6O, 2,2 nA beim O5R, 4,1 nA beim R5O, 2,8 nA beim O5R6O, 1,5 nA beim R5O6R, 0,5 nA beim D1O, 24 pA beim D1R, 3,7 nA beim R1O, 2,3 nA beim O1R, 1,9 nA beim R1O6R, 1,5 nA beim O1R6O, 300 pA beim DRod, 7,9 nA beim R23O, 100 pA beim O23R4O und 300 pA beim R23O4R (Anzahl der Versuche s. Anhang C).



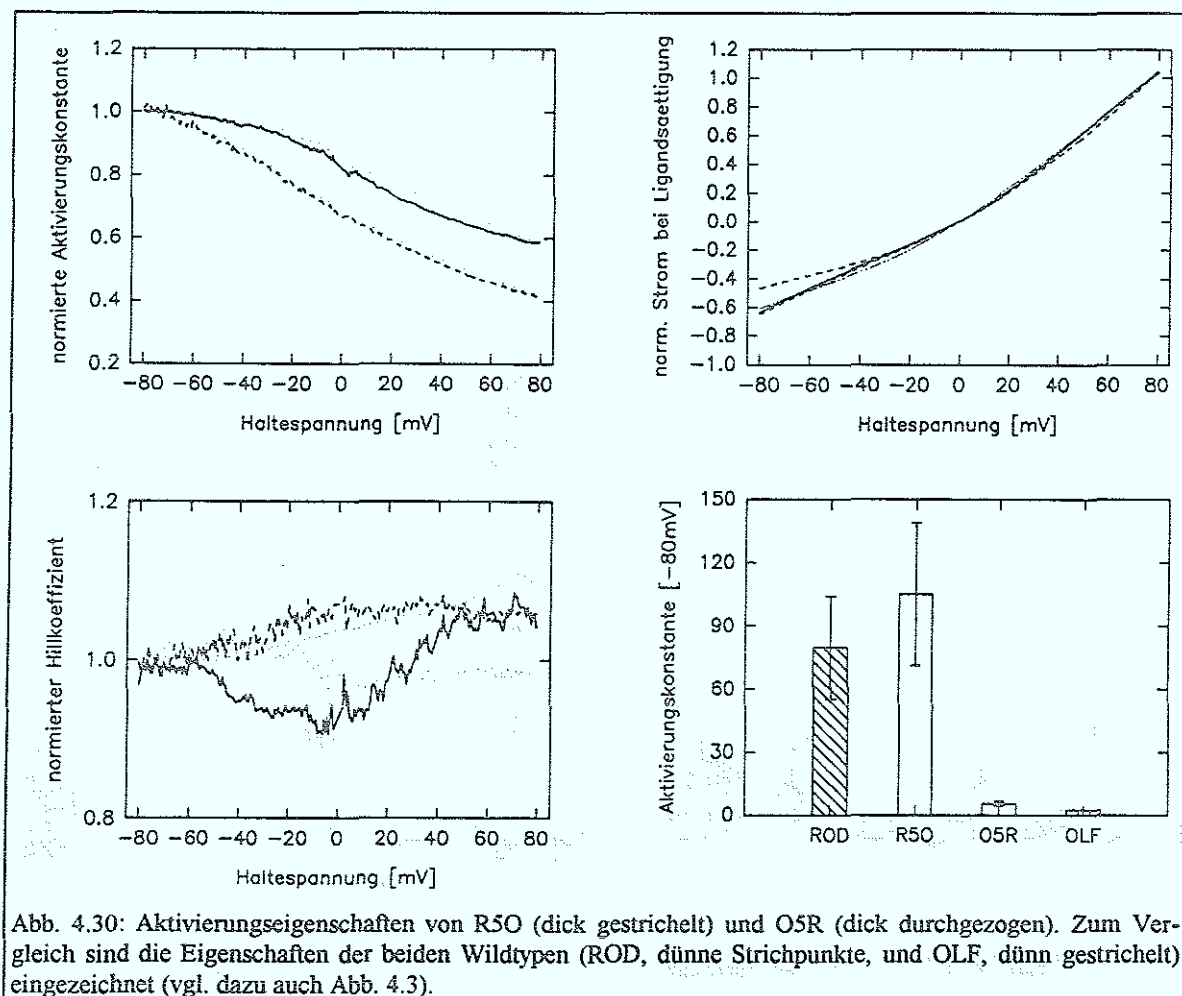
CHIMÄREN ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER C-TERMINALEN INTRAZELLULÄREN DOMÄNE

Es wurden drei Chimärenpaare untersucht, bei denen Domänen im Sequenzbereich C-terminal von H5 ausgetauscht sind. Beim Chimärenpaar O6R und R6O sind die Bindestellen einschließlich der etwa 80 bis zum C-Terminus folgenden Aminosäuren ausgetauscht. Die Chimäre, die die Bindestelle des OLF mit der N-terminalen Region des ROD vereint (R6O), hat eine etwa 2fach größere Aktivierungskonstante als der ROD ($192 \mu\text{M}$ für den R6O gegenüber $79,54 \mu\text{M}$ im ROD), während die Aktivierungskonstante des O6R gegenüber dem OLF-Wildtyp leicht erniedrigt ist ($2 \mu\text{M}$ für den O6R gegenüber $2,45 \mu\text{M}$ im OLF). Der die Bindestelle umfassende C-Terminus ist somit *nicht* für die unterschiedliche Ligandempfindlichkeit der beiden Kanäle verantwortlich (vgl. Abb. 4.29).



Um den Einfluß einer möglichen Störung der Bindestellenstruktur zu testen (die Schnittstelle des O6R/R6O Chimärenpaares liegt bereits innerhalb des Sequenzbereichs, der Ähnlichkeit mit der Nukleotidbindestelle des CAP aufweist), wurde ein zweites Chimärenpaar (R5O, O5R)

konstruiert, in dem der C-terminale Bereich bereits hinter der fünften transmembranalen Domäne ausgetauscht ist. Die Aktivierungskonstante der R5O Chimäre wird dem ROD-Wildtyp wieder ähnlicher ($104,9 \mu\text{M}$ beim R5O gegenüber $79,54 \mu\text{M}$ beim ROD). Die Aktivierungskonstante des O5R ist gegenüber dem OLF zweifach vergrößert ($5,7 \mu\text{M}$ im O5R gegenüber $2,5 \mu\text{M}$ im OLF). Insgesamt sind die Abweichungen der Aktivierungskonstanten von denen der Wildtypen in beiden Chimärenpaaren vergleichbar (O6R und R5O weichen jeweils um etwa das 1,25fache vom OLF bzw. ROD ab, R6O und O5R jeweils um etwa das 2,4fache vom ROD bzw. OLF), es kann jedoch keiner der ausgetauschten Domänen ein eindeutiger Effekt auf die Aktivierungskonstante zugeordnet werden (vgl. Abb. 4.30).



Wird nur die Domäne hinter H5 bis einschließlich H6 ausgetauscht, die die beiden vorherigen Chimären voneinander unterscheidet, ändert sich die Aktivierungskonstante beider Chimären etwa 3,5fach. R5O6R ist mit $28,3 \mu\text{M}$ etwa dreieinhalbmals empfindlicher als der ROD, O5R6O mit $7,5 \mu\text{M}$ etwa dreieinhalbmals unempfindlicher als der OLF (s. Abb. 4.31).

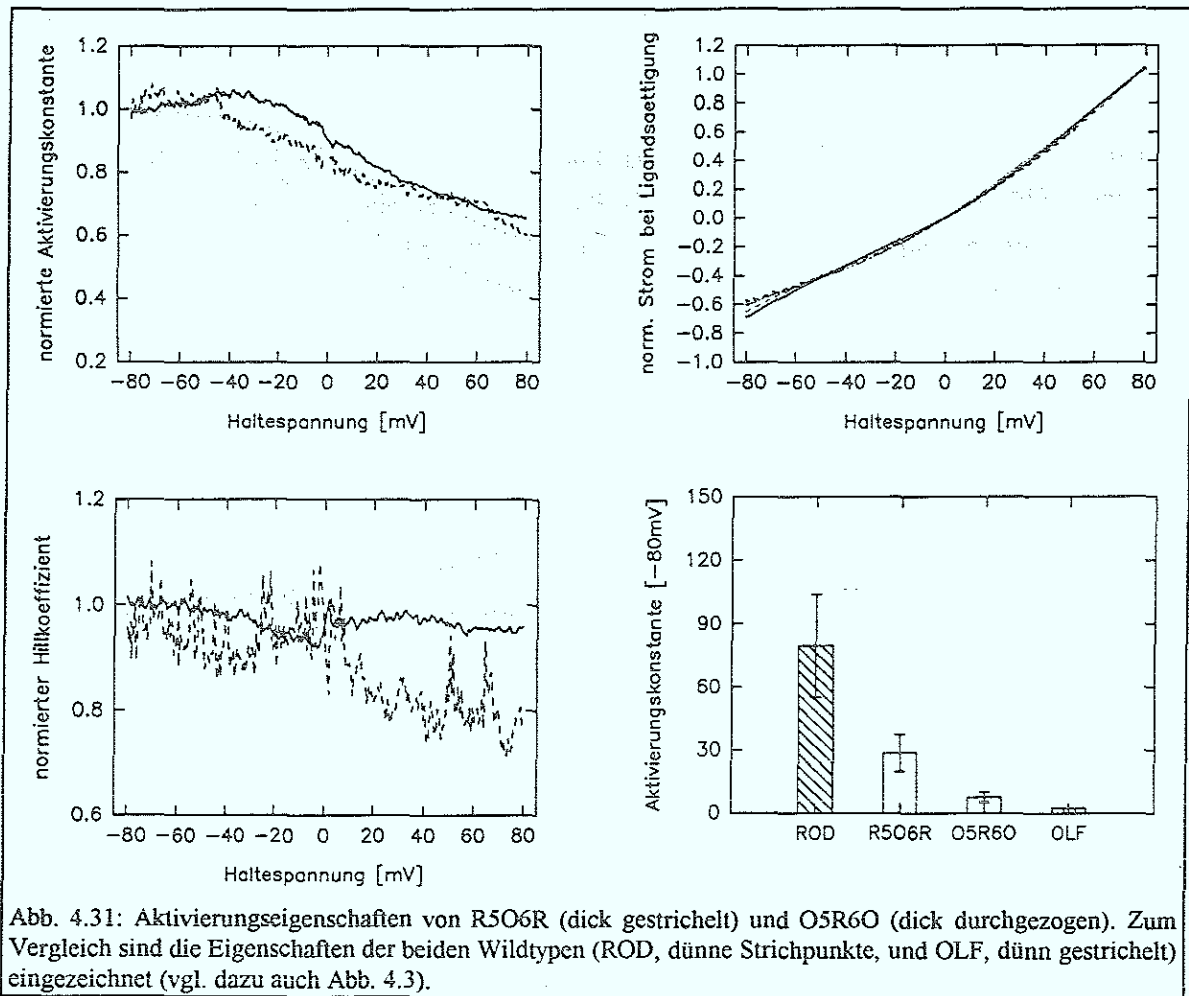
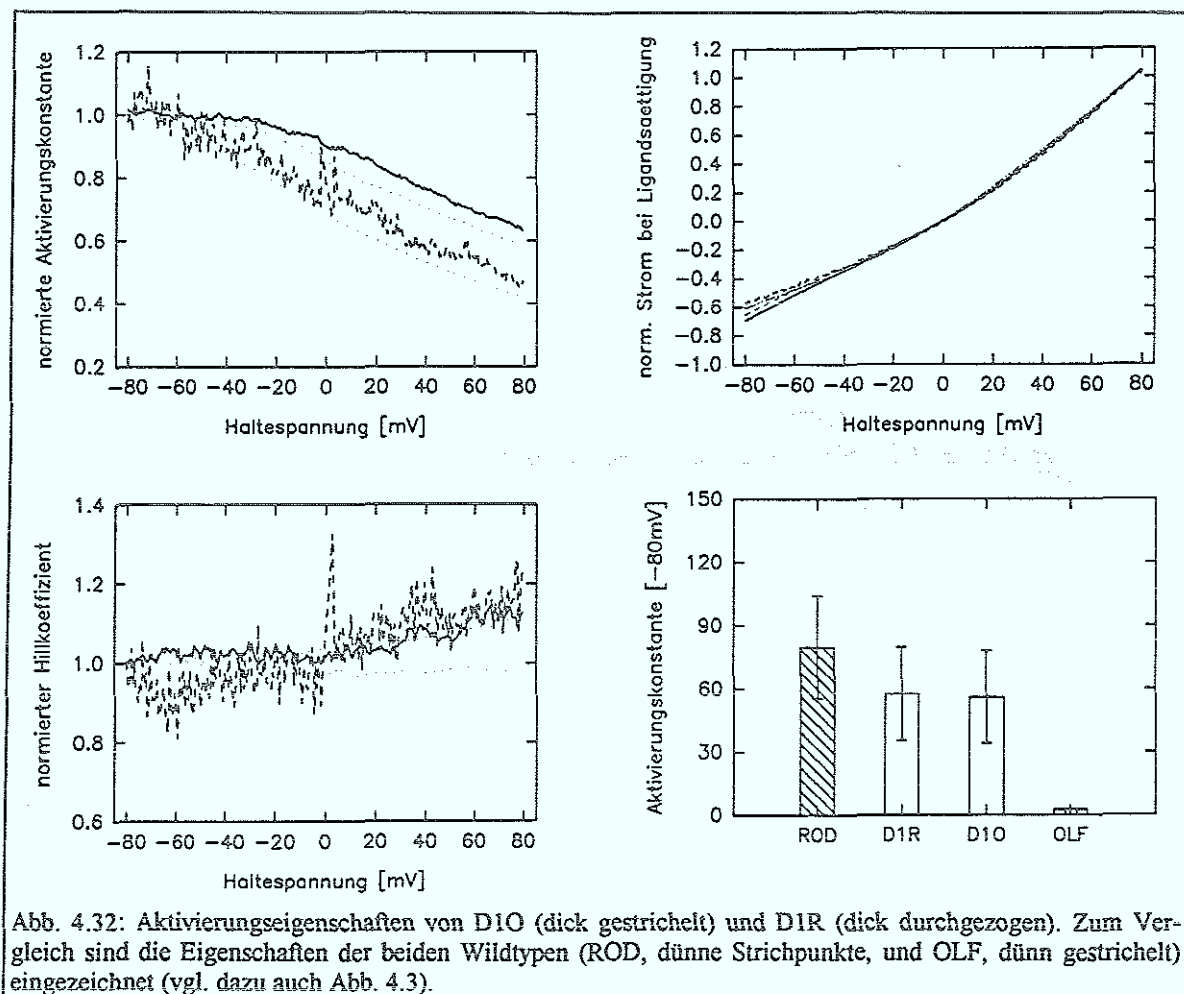


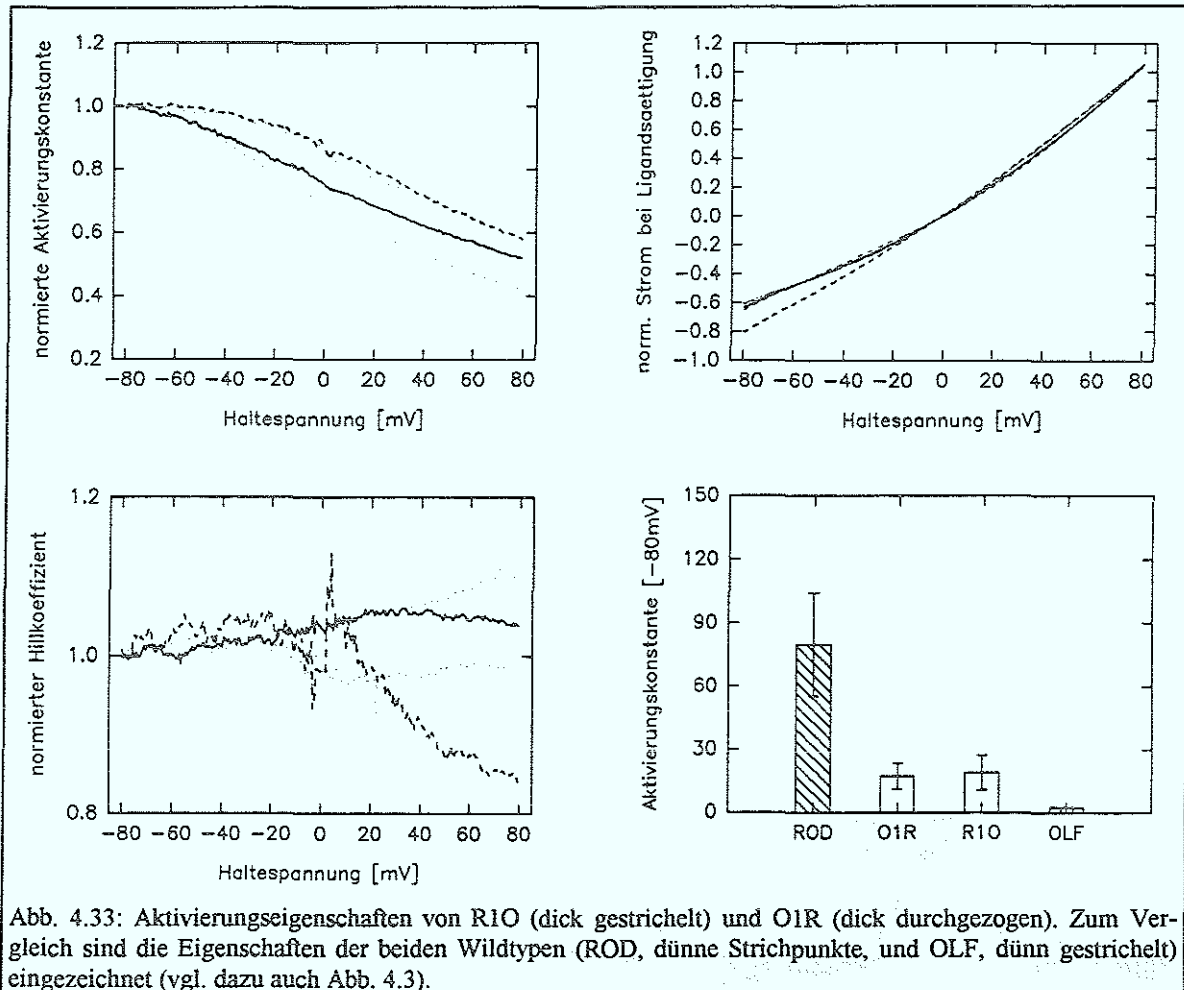
Abb. 4.31: Aktivierungseigenschaften von R506R (dick gestrichelt) und O5R6O (dick durchgezogen). Zum Vergleich sind die Eigenschaften der beiden Wildtypen (ROD, dünne Strichpunkte, und OLF, dünn gestrichelt) eingezeichnet (vgl. dazu auch Abb. 4.3).

CHIMÄREN ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER N-TERMINALEN INTRAZELLULÄREN DOMÄNE

In einer zweiten Serie von Chimären wird der Einfluß der N-terminalen, intrazellulären Domäne untersucht. Werden die Aminosäuren N-terminal von H1 abgeschnitten (D1O/D1R, vgl. Abb. 4.32), werden die Aktivierungskonstanten gleich (D1R 57,5 μM , D1O 55,9 μM). Daraus kann geschlossen werden, daß die intrinsische Ligandempfindlichkeit des C-terminal von H1 gelegenen Sequenzbereichs ohne die zusätzlichen Wechselwirkungen des N-Terminus für beide Kanäle gleich ist.



Diese Vermutung wird durch ein zweites Chimärenpaar bestätigt, in dem die N-terminalen Aminosäuren bis H1 ausgetauscht sind (R1O/O1R, vgl. Abb. 4.33). Auch in diesem Fall werden die Aktivierungskonstanten gleich (17,3 μM für O1R; 19,1 μM für R1O).



Die N-terminale, intrazelluläre Domäne ist somit offenbar für die Modulation der Ligandempfindlichkeit zur Anpassung des Kanalproteins an unterschiedliche physiologische Erfordernisse verantwortlich. Der N-Terminus wechselwirkt spezifisch mit anderen Domänen des Proteins. Abschneiden der N-Termini verhindert die Interaktion, gegenseitiger Austausch des N-Terminus führt zu "unspezifischen" Wechselwirkungen, die nicht zur Ausprägung unterschiedlicher Aktivierungskonstanten führen. Durch die C-terminal veränderten Chimären kann jedoch ausgeschlossen werden, daß es sich um Wechselwirkungen handelt, die auf den N-Terminus und die Bindestelle (incl. der C-terminal liegenden 80 Aminosäuren) bzw. auf den N-Terminus und die H5-H6 Domäne beschränkt sind.

Ein auffälliger Unterschied der beiden N-terminalen Sequenzen ist die Ansammlung geladener Aminosäuren im ROD, die beim OLF durch entsprechend lipophilere Aminosäuren ersetzt sind (Position 163-270 in Abb. B1). Wird diese ladungsreiche Region im ROD herausgeschnitten (DRod, vgl. Abb. 4.34), ändert sich die Aktivierungskonstante nicht signifikant ($63,9 \mu\text{M}$ im DRod gegenüber $83,6 \mu\text{M}$ im ROD).

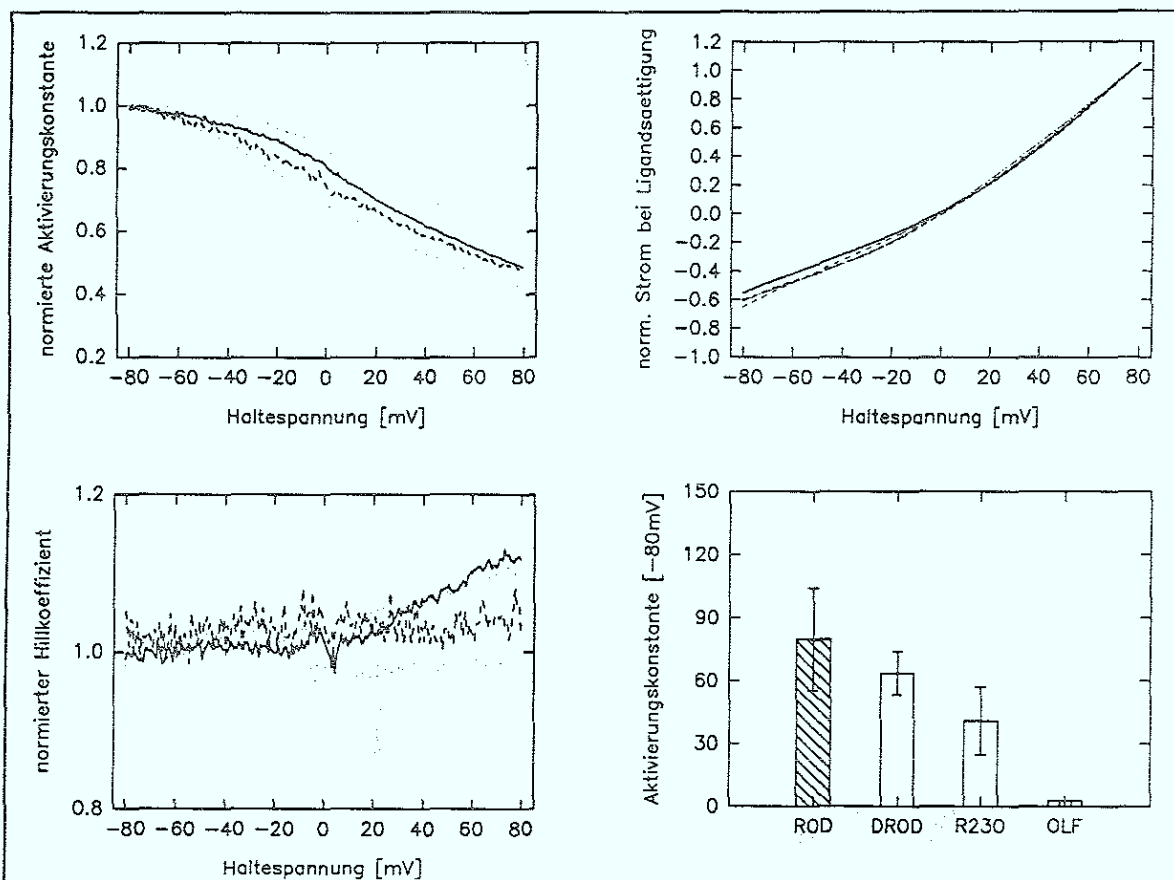


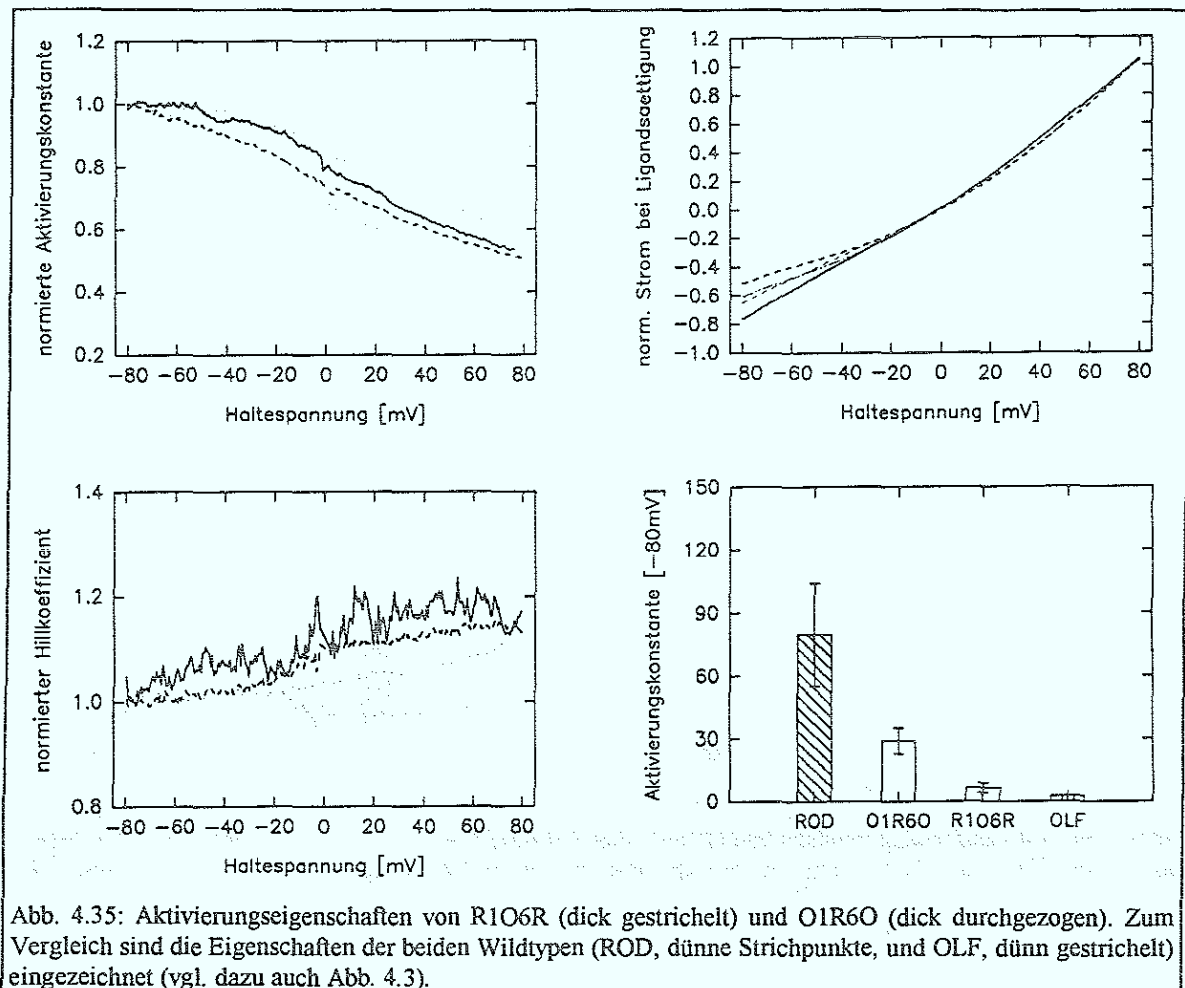
Abb. 4.34: Aktivierungseigenschaften von DRod (dick gestrichelt) und R23O (dick durchgezogen). Zum Vergleich sind die Eigenschaften der beiden Wildtypen (ROD, dünne Strichpunkte, und OLF, dünn gestrichelt) eingezeichnet (vgl. dazu auch Abb. 4.3).

In der R23O Chimäre ist die N-terminal ausgetauschte Sequenzdomäne um zwei putative transmembranale Durchgänge länger als beim R1O. Die Aktivierungskonstante des R23O ist mit 40 μM im Vergleich zu 19 μM des R1O überraschend groß (vgl. Abb. 4.34). Wenn H1 und H2 die Membran durchspannen, kommen nur wenige Aminosäuren zur Erklärung des Effekts in Frage, falls nur intrazellulär lokalisierte Aminosäuren zur Regulation der Ligandempfindlichkeit beitragen. Als zusätzlicher Hinweis auf die Wichtigkeit dieses Segments kann gewertet werden, daß die O23R Chimäre nicht funktionell exprimiert werden konnte.

CHIMÄREN ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER TRANSMEMBRANALEN DOMÄNEN

Zur Untersuchung möglicher Wechselwirkungspartner im Bereich zwischen H1 und H6 wurden Chimären untersucht, in denen unterschiedlich große Bereiche des C- und N-Terminus

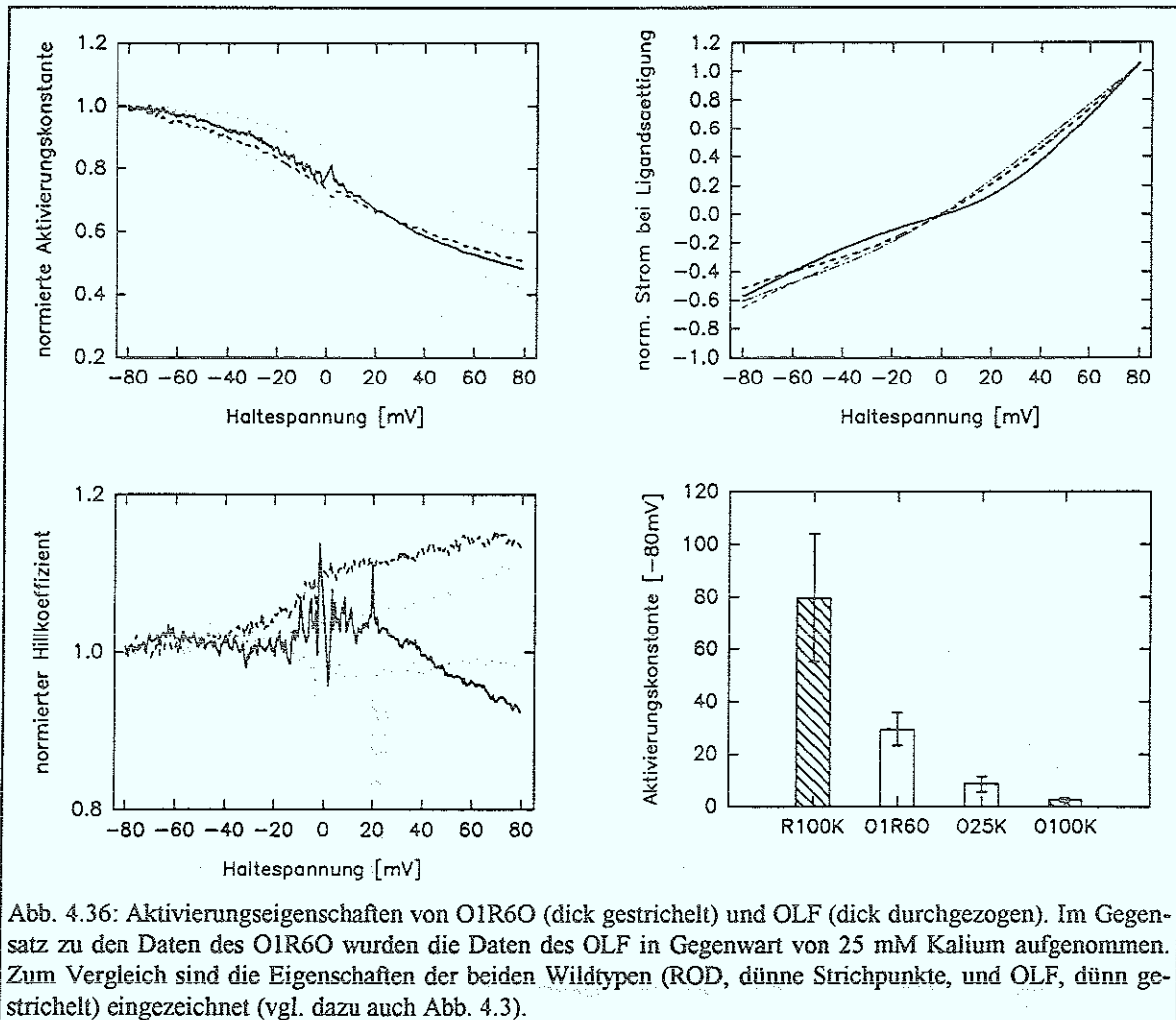
ausgetauscht sind. Im Chimärenpaar R1O6R/O1R6O (vgl. Abb. 4.35) sind die intrazellulären Domänen N-terminal von H1 und C-terminal von H6 des einen mit den transmembranalen Domänen (H1-H6) des anderen Kanals kombiniert. Die Aktivierungskonstanten sind in beiden Fällen etwa um den Faktor drei verändert ($6,3 \mu\text{M}$ beim R1O6R, $29 \mu\text{M}$ beim O1R6O).



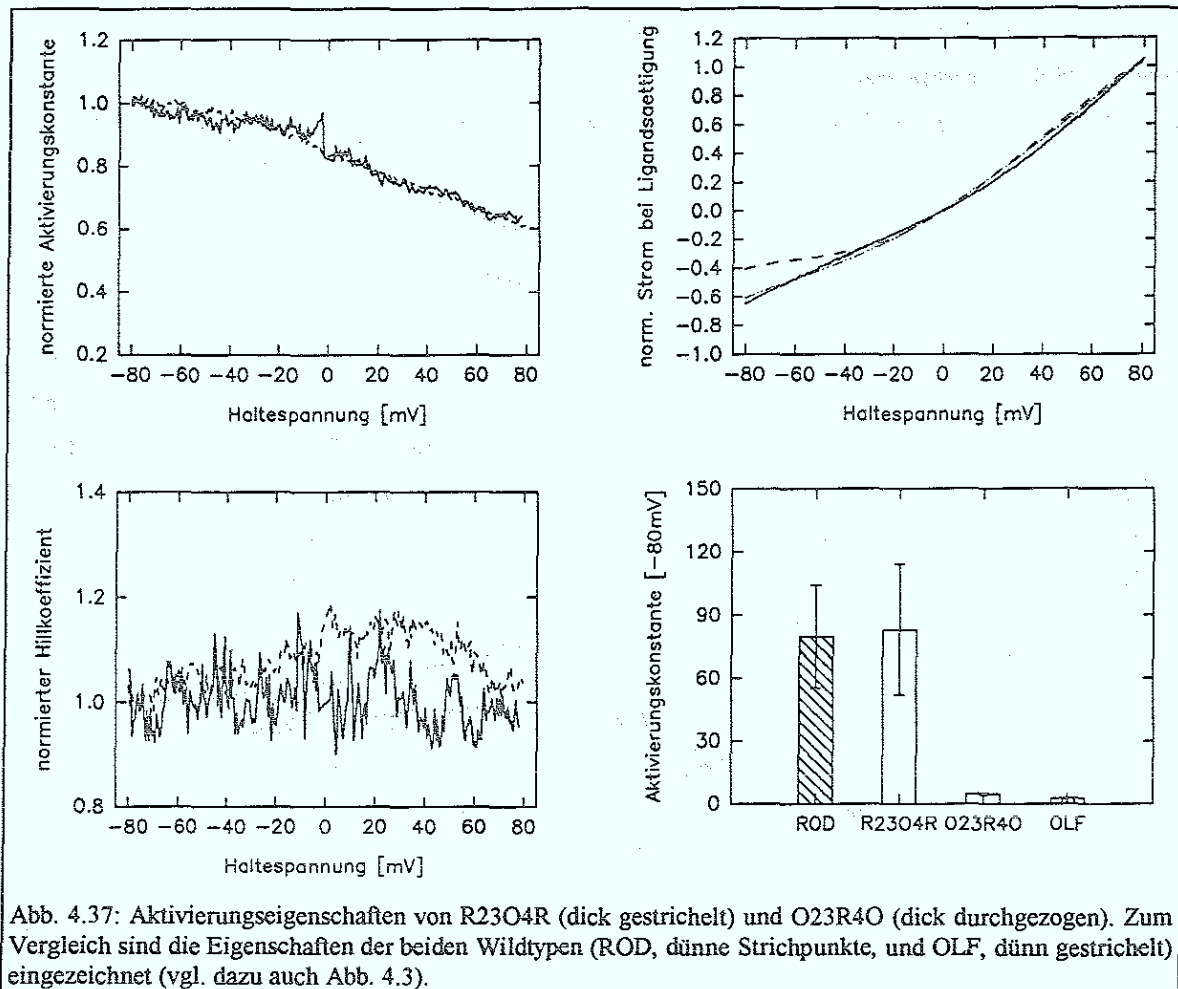
Das Ergebnis stimmt numerisch mit den R5O6R/O5R6O Chimären überein (vgl. Abb. 4.31): R5O6R ist mit $28,3 \mu\text{M}$ praktisch genauso empfindlich wie O1R6O ($29 \mu\text{M}$) und O5R6O ist mit $7,5 \mu\text{M}$ dem R1O6R ($6,3 \mu\text{M}$) vergleichbar. Abgesehen vom transmembranalen Teil unterscheiden sich beide Chimärenpaare nur durch den jeweils unterschiedlichen Donor der H5-H6 Domäne. Der Austausch der H5-H6 Domäne alleine hatte ebenfalls zu einer annähernd dreifachen Veränderung der Aktivierungskonstante geführt.

In Abb. 4.36 werden die Aktivierungseigenschaften der O1R6O Chimäre (gemessen in Gegenwart von 100 mM KCl) mit denen des OLF-Wildtyps (gemessen in Gegenwart von 25 mM KCl) verglichen. Die Veränderung der Ionenstärke (und damit die Veränderung der elektrosta-

tischen Wechselwirkungen) hat phänomenologisch eine ähnliche Auswirkung auf die K_a/V -Kurve wie die Störung der Wechselwirkungen zwischen den beiden Termini und dem Rest des Proteins.



Beim Chimärenpaar R23O4R/O23R4O wurde hauptsächlich der Einfluß der intrazellulären Schleifen zwischen den transmembranalen Segmenten als mögliche Partner für Wechselwirkungen mit intrazellulären Domänen untersucht. Die Aktivierungskonstante des R23O4R ist mit 83 μM identisch zum ROD-Wildtyp, die des O23R4O mit 4,6 μM etwa zweifach höher als die des OLF (vgl. Abb. 4.37).



Die Ligandempfindlichkeit von CNG-Kanälen wird allosterisch reguliert. Die H5-H6 Domäne und der N-terminal von H3 gelegene Sequenzbereich tragen den Hauptanteil an der Regulation der Ligandempfindlichkeit. Aus der Veränderung der Aktivierungskonstante kann jedoch noch nicht eindeutig geschlossen werden, in welcher Weise die Domänen miteinander wechselwirken. Über die Aktivierungskonstante können nur solche Kontakte identifiziert werden, die die Ligandempfindlichkeit beeinflussen. Der Beitrag der einzelnen Domänen ist im ROD und OLF unterschiedlich, so daß die Erwartung sich nicht bestätigt hat, durch die Konstruktion jeweils reziproker Chimärenpaare "spezifische" von "unspezifische" Wechselwirkungen unterscheiden zu können.

DIE VERÄNDERUNG DER SPANNUNGSABHÄNGIGKEIT DER AKTIVIERUNGSKONSTANTE BEI DEN KANALCHIMÄREN

Da bei einer Auswertung der Aktivierungskonstante alleine eine eindeutige Zuordnung der wechselwirkenden Domänen nicht möglich ist, wurde als weiterer Aktivierungsparameter die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante untersucht. Abb. 4.3 zeigt, daß sich neben

der unterschiedlichen Ligandempfindlichkeit auch die K_a/V -Kurve des ROD- und OLF-Wildtyps deutlich unterscheidet.

Die Chimären, in denen C-terminale Sequenzbereiche ausgetauscht wurden, zeigen, daß der Unterschied in der Ligandempfindlichkeit zwischen ROD und OLF nicht durch die Nukleotid-Bindestelle verursacht wird. Eine Aussage über die Art der Interaktionen zwischen den wechselseitig ausgetauschten C-terminalen Domänen ist jedoch nicht möglich.

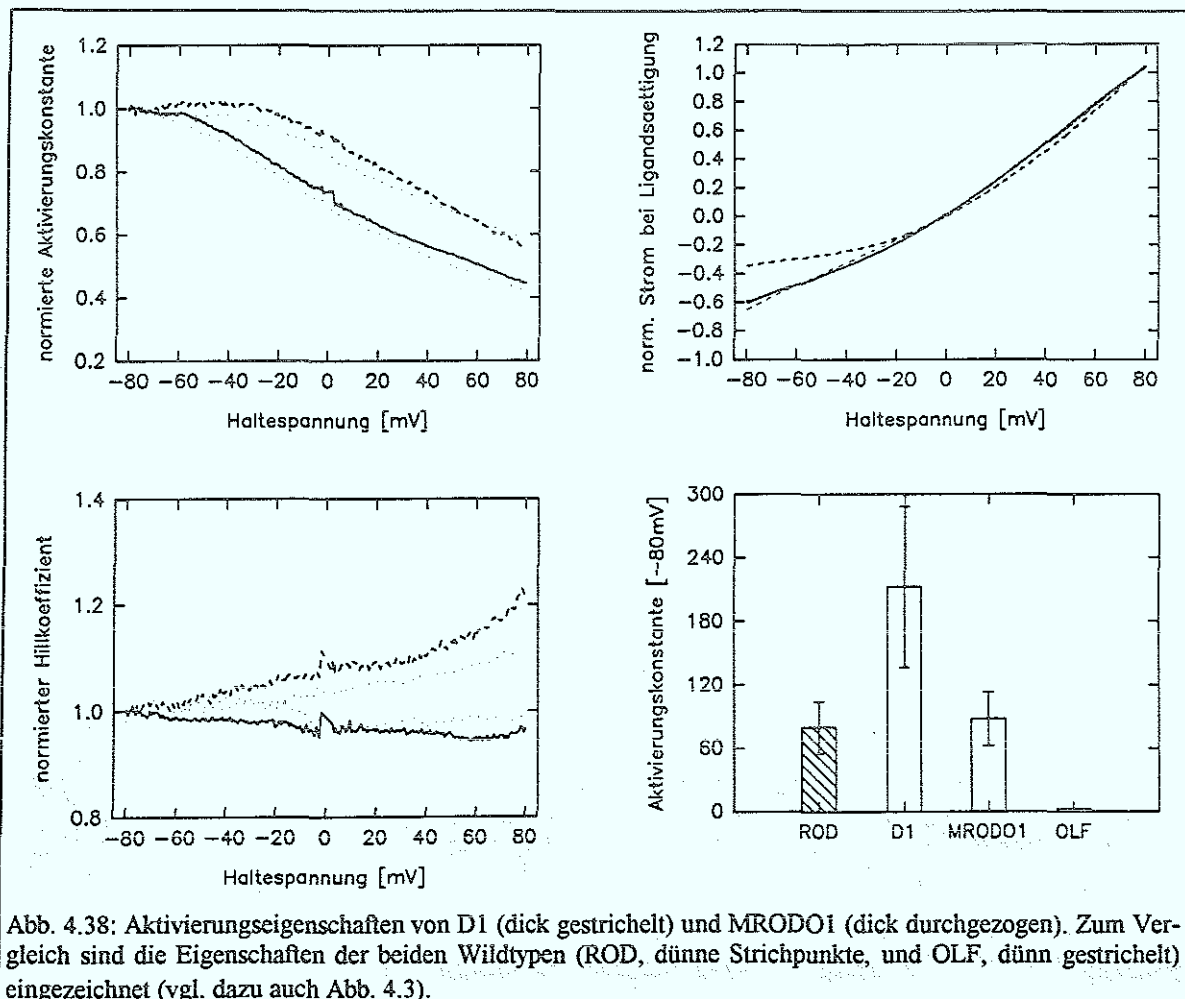
Der Vergleich der K_a/V -Kurven der C-terminal veränderten Chimären läßt diesbezüglich klarere Rückschlüsse zu: Die Veränderung der K_a/V -Kurven des O5R6O (Abb. 4.31) bzw. des O6R (Abb. 4.29) gegenüber dem OLF sowie die Veränderung der K_a/V -Kurven des R5O6R (Abb. 4.31) bzw. des R6O (Abb. 4.29) gegenüber dem ROD sind nicht voneinander zu unterscheiden. Auf der anderen Seite verläuft die K_a/V -Kurve des R5O wie die des ROD, und die K_a/V -Kurve des O5R ist mit der des OLF identisch (Abb. 4.30). Die Abweichung der K_a/V -Kurve kann somit durch eine Wechselwirkung zwischen der H5-H6 Domäne und dem C-Terminus erklärt werden.

Die bei den N-terminal veränderten Chimären auftretenden Abweichungen der K_a/V -Kurve bieten keine eindeutigen Anhaltspunkte zur Identifizierung der wechselwirkenden Domänen. Es müssen noch weitere Chimären unter Berücksichtigung des Wechselspiels zwischen der H5-H6 Domäne und der H1-H2 Domäne konstruiert und untersucht werden. Die Analyse der K_a/V -Kurven schließt jedoch ebenso wie die Untersuchung der Aktivierungskonstante aus, daß spezifische Kontakte zwischen nur zwei der ausgetauschten Domänen zur Erklärung der beobachteten Veränderungen ausreichen.

Aufschlußreich ist die Analyse der K_a/V -Kurve dagegen wieder beim R23O4R/O23R4O Chimärenpaar (vgl. Abb. 4.37). Während die K_a/V -Kurve des O23R4O im Vergleich zum OLF-Wildtyp unverändert ist, verhält sich der R23O4R nicht wie der ROD, sondern ebenfalls wie der OLF. Die Aktivierungskonstante des R23O4R ist jedoch identisch mit dem ROD (83 μM beim R23O4R gegenüber 79 μM beim ROD). Die Interpretation wird durch den Vergleich mit der K_a/V -Kurve der D1 Mutante erleichtert; die Aminosäuresequenz des D1 ist bis auf drei Aminosäuren mit der des ROD identisch. Es wurden Aminosäurepositionen im Bereich des S4-Motivs mutiert, die sich bei ROD und OLF unterscheiden: R393H, I394F und S395A. Besonders auffällig ist der Austausch des Arginin 393 gegen Histidin, da die geladenen Aminosäuren des S4-Segments auch zwischen verschiedenen Kanalfamilien konserviert sind. Der Vergleich der Sequenzen des S4-Segments spannungsabhängiger Kanäle zeigt besonders hohe Konservierung der ersten vier geladenen Aminosäuren. In Kaliumkanälen sind 118 von 124 geladenen Aminosäuren dieses Sequenzbereichs Arginine, Lysin und Histidin kommen nie vor. In Natriumkanälen sind 93 von 112 geladenen Aminosäuren dieses Bereichs Arginine, Lysine treten 18mal und Histidin einmal auf, und in CNG-Kanälen tritt der Austausch des Arginins gegen Histidin spezifisch in Sequenzen der OLF-Gruppe auf.

Abb. 4.38 zeigt die Aktivierungsparameter der D1 Mutante. Die K_a/V -Kurve der D1 Mutante ist ebenfalls der des OLF sehr ähnlich, obwohl die Sequenz bis auf drei Aminosäuren dem ROD entspricht. Die Abweichung der K_a/V -Kurve des R23O4R vom Verlauf der K_a/V -Kurve des ROD kann somit überwiegend durch den Austausch des R393 erklärt werden. Es ist noch zu prüfen, wieweit die lipophilen Aminosäuren des S4-Segments ebenfalls einen Einfluß auf den Verlauf der K_a/V -Kurve haben. Ein Einfluß lipophiler Aminosäuren auf die Spannungsabhängigkeit wurde bei Kaliumkanälen gezeigt (Lopez *et al.*, 1991). Die deutliche Abweichung der Aktivierungskonstante der D1 Mutante ($212 \mu\text{M}$ gegenüber $79 \mu\text{M}$ im ROD) weist auf die Komplexität des Zusammenspiels transmembranaler und intrazellulärer Domänen bei der Regulierung der Ligandempfindlichkeit hin: Die Aktivierungskonstante der R23O4R-Chimäre, die ebenfalls das S4-Segment des OLF besitzt, hat eine zum ROD-Wildtyp identische Aktivierungskonstante (ROD $79 \mu\text{M}$, R23O4R $83 \mu\text{M}$).

Zum Vergleich ist in Abb. 4.38 eine Mutante gezeigt, in der ebenfalls drei Aminosäuren, die sich spezifisch zwischen ROD und OLF unterscheiden, ausgetauscht sind: D656A, Y569C, A673M (MRODO1); Alle drei Aminosäuren liegen im Bereich der Bindestelle. Es wurden die Aminosäuren des OLF in den ROD eingesetzt. Aktivierungskonstante und K_a/V -Kurve unterscheiden sich nicht wesentlich vom ROD-Wildtyp.



DIE VERÄNDERUNG DER GLEICHRICHTUNGSEIGENSCHAFTEN BEI DEN KANALCHIMÄREN

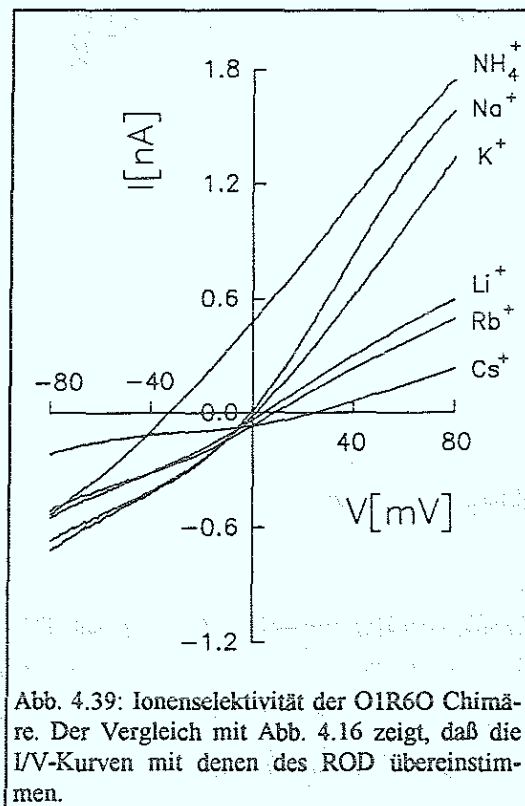
An der Veränderung des Gleichrichtungsverhaltens läßt sich noch deutlicher als bei der Analyse der Aktivierungskonstante bzw. K_a/V -Kurve erkennen, daß die Wechselwirkungen einzelner Domänen in ROD und OLF nicht nur quantitativ sondern möglicherweise auch qualitativ unterschiedlich sind. Die Gleichrichtungseigenschaften der C-terminal veränderten Chimären und Mutanten des ROD (R5O (Abb. 4.30), R6O (Abb. 4.29), C573S (Abb. 4.55)) sowie der beiden das S4-Segment betreffenden Mutationen R23O4R (Abb. 4.37) und D1 (Abb. 4.38) im ROD führen zu einer stärkeren Gleichrichtung der makroskopischen I/V-Kurve.

Beim OLF tritt bei den R1O (Abb. 4.33) und R1O6R (Abb. 4.35) Chimären eine Verringerung der Gleichrichtung auf.

Die Chimären O4R, R4O, R3O, O3R und O23R konnten noch nicht funktionell exprimiert werden. Möglicherweise ist die Empfindlichkeit des Bereichs zwischen H2 und H4 gegenüber Veränderungen der Aminosäuresequenz ein Hinweis auf die Beteiligung am Öffnungsmechanismus der Pore.

IONENSELEKTIVITÄT DER CHIMÄREN

Die Ionenselektivität der Chimären wurde nicht systematisch untersucht. Abb. 4.39 zeigt am Beispiel der O1R6O Chimäre, daß die Selektivitätseigenschaften durch den transmembranalen Proteinteil, wahrscheinlich sogar ausschließlich durch die Porenregion bestimmt werden. Die I/V-Kurven der unterschiedlichen Ionensorten sind identisch mit denen des ROD (vgl. Abb. 4.15). Die C- und N-terminal ausgetauschten Domänen des Kanals haben demnach keinen Einfluß auf die Permeationseigenschaften.



4.6 VARIABILITÄT DER CNG-KANALANTWORTEN VON PATCH ZU PATCH

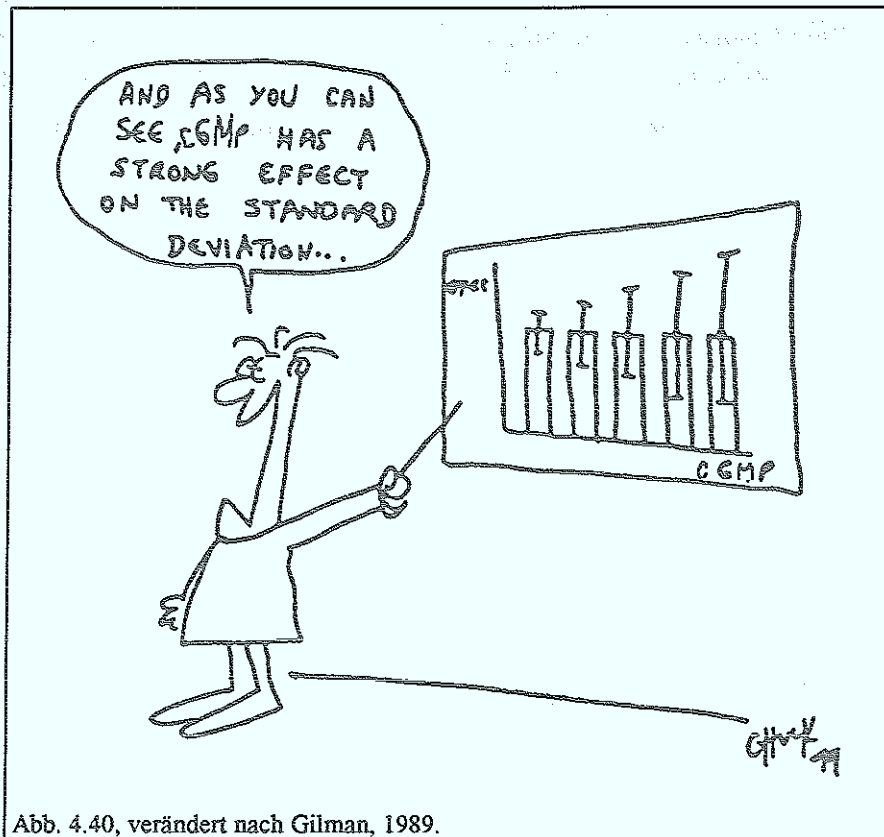


Abb. 4.40, verändert nach Gilman, 1989.

Die Meßergebnisse variieren stark von Experiment zu Experiment. Diese Variabilität wird auch in der Literatur für CNG-Kanäle beschrieben. Furman *et al.* z.B. erwähnen, daß die Gleichrichtung, die Aktivierungskonstante und der Hill-Koeffizient stärker variieren als man durch die Meßungenauigkeit erwartet (Furman & Tanaka, 1989).

Abb. 4.41 zeigt in Gegenwart sättigender cGMP-Konzentration aufgenommene I/V-Kurven des ROD. Die I/V-Kurven stammen von 37 cGMP-Konzentrationsreihen aus 22 Patches. Es wurden jeweils nur die Daten berücksichtigt, die innerhalb der ersten 10 Minuten nach Abziehen des Patches gemessen wurden. Die Versuche wurden zwischen Juni 1990 und Februar 1992 aufgenommen. Man erkennt eine starke Variabilität der Gleichrichtungseigenschaften. Trotzdem wird der Verlauf der makroskopischen I/V-Kurve häufig als Grundlage zur modellhaften Berechnung von Einzelkanaleigenschaften und Aktivierungsmechanismen verwendet (Bader *et al.*, 1979; Haynes & Yau, 1985; Tanaka *et al.*, 1989; Miller & Korenbrot, 1993). Auch der Hill-Koeffizient und die Aktivierungskonstante variieren in ähnlicher Weise (Daten nicht gezeigt).

Die maximale Amplitude, die Gleichrichtung, die Aktivierungskonstante, der Hill-Koeffizient sowie die Spannungsabhängigkeit von Aktivierungskonstante und Hill-Koeffizient wurden kreuzweise auf lineare Korrelation untersucht. Alle untersuchten Parameter verändern sich von Patch zu Patch unabhängig voneinander und unabhängig von der Jahreszeit der Messung. Artifizelle Veränderungen des Gleichrichtungsverhaltens könnten auf unterschiedlichen Diffusionsbedingungen im Einwärts- bzw. Auswärtsstrom beruhen. Der Effekt sollte bei größeren Strömen stärker ausgeprägt sein als bei kleinen Strömen. Da Stromamplitude und Gleichrichtung nicht korrelieren, kann angenommen werden, daß diffusionsbedingte Artefakte nicht zur Variabilität der I/V-Kurven beitragen. Ebenso kann ausgeschlossen werden, daß unterschiedliche Konzentrationen divalenter (vgl. z.B.

Dhallan *et al.*, 1990) oder Schwermetall-Kationen (Furman & Tanaka, 1988) für die beobachteten Veränderungen verantwortlich sind, da alle Messungen in Gegenwart von 10 mM EGTA durchgeführt wurden.

Die Variabilität der Spannungsabhängigkeit der I/V-Kurven ist vergleichbar mit der Variabilität der Spannungsabhängigkeit der K_a/V -Kurven (die prozentuale Standardabweichung der I/V-Kurven der in Abb. 4.41 gezeigten Versuche vom Mittelwert beträgt 24 %, die prozentuale Standardabweichung der K_a/V -Kurven beträgt 21 % (berechnet für +80 mV)). Die prozentuale Standardabweichung der Aktivierungskonstante beträgt 36 % und ist damit deutlich größer (die Werte bei -80 mV schwanken zwischen 12 und 150 μ M, die Werte bei +80 mV zwischen 3 und 54 μ M).

Die Veränderungen des Kanalproteins, die für die Variabilität der Ergebnisse von Patch zu Patch verantwortlich sind, werden wahrscheinlich während der Bildung des Seals zwischen Membran und Glas bzw. beim Abziehen des Patches von der Oozyte verursacht (vgl. dazu auch Sokabe *et al.*, 1991). Sie beeinflussen die nukleotidabhängigen Aktivierungsschritte (Aktivierungskonstante) stärker als die spannungsabhängigen Aktivierungsschritte (K_a/V -Kurve und I/V-Kurve). Die spannungsabhängigen Prozesse, die für die Variabilität der I/V-Kurve verantwortlich sind unterscheiden sich von den spannungsabhängigen Prozessen, die für die Variabilität der K_a/V -Kurve verantwortlich sind: Es besteht keine Korrelation zwischen ausgeprägter Gleichrichtung und starker Spannungsabhängigkeit der K_a/V -Kurve.

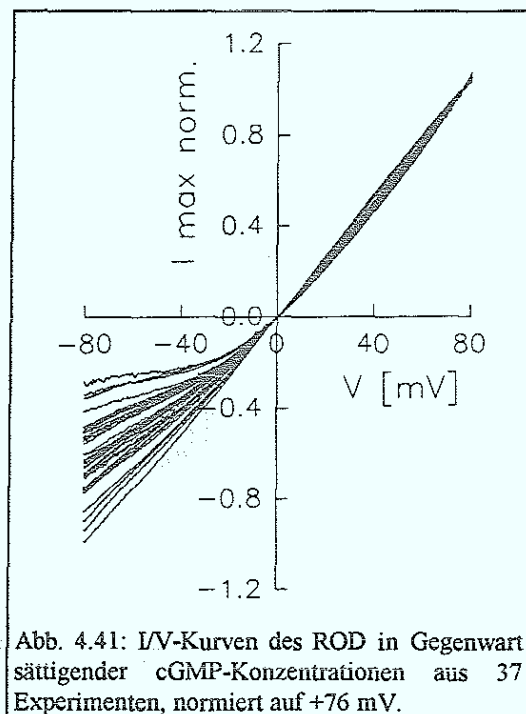


Abb. 4.41: I/V-Kurven des ROD in Gegenwart sättigender cGMP-Konzentrationen aus 37 Experimenten, normiert auf +76 mV.

Zimmerman *et al.* haben beobachtet, daß der cGMP-aktivierte Strom nach einem Spannungssprung innerhalb von wenigen Millisekunden auf eine etwas niedrigere Amplitude abfällt (Zimmerman *et al.*, 1988). Sie haben diese Beobachtung auf behinderte Diffusion von Ionen in der Nähe der Membranoberfläche zurückgeführt. Durch lokale Konzentrationsänderungen baut sich ein Diffusionspotential V_D auf, das dem angelegten Pipettenpotential V_P entgegengesetzt ist. Unter symmetrischen Ionenbedingungen dürfte bei einem Pipettenpotential von 0 mV kein Strom fließen. Setzt sich jedoch das Membranpotential aus Pipettenpotential und Diffusionspotential zusammen ($V_m = -V_P + V_D$), läuft der Strom der Pipettenspannung "hinterher".

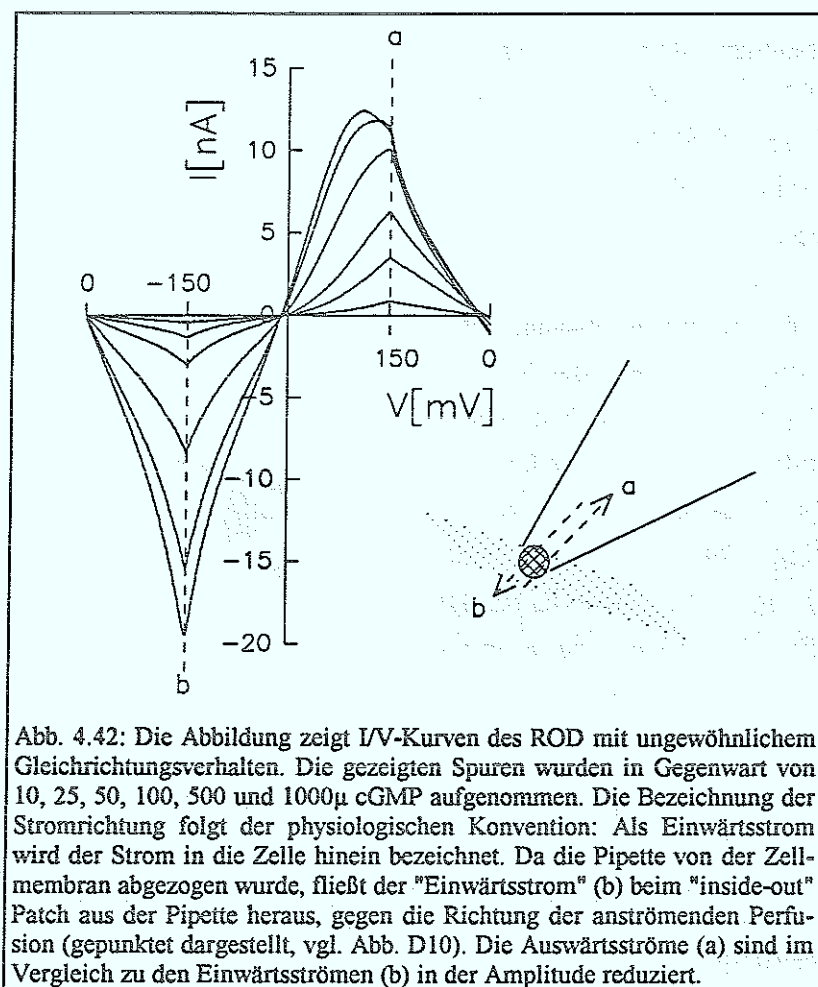
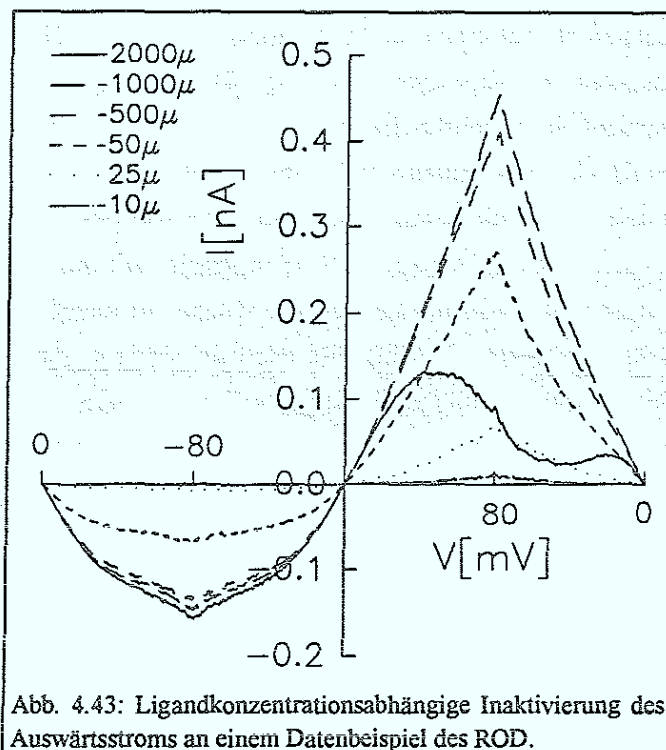


Abb. 4.42: Die Abbildung zeigt I/V-Kurven des ROD mit ungewöhnlichem Gleichrichtungsverhalten. Die gezeigten Spuren wurden in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 500 und 1000 μ cGMP aufgenommen. Die Bezeichnung der Stromrichtung folgt der physiologischen Konvention: Als Einwärtsstrom wird der Strom in die Zelle hinein bezeichnet. Da die Pipette von der Zellmembran abgezogen wurde, fließt der "Einwärtsstrom" (b) beim "inside-out" Patch aus der Pipette heraus, gegen die Richtung der anströmenden Perfusion (gepunktet dargestellt, vgl. Abb. D10). Die Auswärtsströme (a) sind im Vergleich zu den Einwärtsströmen (b) in der Amplitude reduziert.

Eine in *Xenopus* Oozyten häufig beobachtete "Anomalie" der I/V-Kurven von CNG-Kanälen ist in Abb. 4.42 gezeigt. Die I/V-Kurven sind in zwei Punkten auffällig: Die makroskopischen Auswärtsströme brechen spannungs- und konzentrationsabhängig ein und die Umkehrpotentiale sind verschoben: Beim ersten Nulldurchgang der Spannungsrampe (Mitte der Spannungsrampe) ist das Umkehrpotential zu negativen Potentialen verschoben, am Ende der Rampe zu positiven Potentialen. Bedingt durch den Einwärtsstrom reichern sich Kaliumionen auf der Membraninnenseite an. Trotz des insgesamt geringeren Auswärtsstroms ist das Umkehrpoten-

tial am Ende der Spannungsrampe um etwa den doppelten Betrag verschoben (gleiche absolute Abweichung wie beim ersten Nulldurchgang, jedoch mit umgekehrtem Vorzeichen). Da die Anreicherung der Ionen keine Funktion der Anzahl der transportierten Ladungen ist, kann angenommen werden, daß die Konzentrationszunahme durch behinderte Ionendiffusion auf membrannähe Lösungsschichten beschränkt ist. In diesem Fall sollte der Ausgleich beim Wechsel der Stromrichtung innerhalb von Millisekunden erfolgen (Zimmerman *et al.*, 1988), und nicht innerhalb von Sekunden, wie im gezeigten Beispiel (zum Zeitverlauf der Spannungsrampe vgl. Abb. 3.6 Inset). Quantitativ läßt sich aus der Verschiebung des Umkehrpotentials schließen, daß im gezeigten Beispiel die Lösungsschicht, in der die Ionendiffusion behindert ist, auf der "ungerührten", nicht perfundierten Seite der Membran dicker ist als auf der perfundierten Seite.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird in der Literatur überwiegend davon ausgegangen, daß CNG-Kanäle nicht inaktivieren. Lediglich Zhainazarov und Kolesnikov beschreiben eine manchmal zu beobachtende, cGMP-abhängige Inaktivierung als charakteristische Eigenschaft der *in situ* gemessenen CNG-Kanäle aus Sehtäbchen des Froschs (Zhainazarov & Kolesnikov, 1990), aus Haarzellen der Cochlea des Meerschweinchens (Kolesnikov *et al.*, 1991) und aus olfaktorischen Sinneszellen des Frosches (Kolesnikov *et al.*, 1990). Diese Ergebnisse werden von anderen Gruppen weder zitiert noch bestätigt.



In Einzelkanalmessungen beschreiben Zhainazarov *et al.* drei unterschiedliche Typen von CNG-Kanälen:

- Kanäle, deren Offenwahrscheinlichkeit mit der Ligandkonzentration zunächst zu- und bei weiter steigender Ligandkonzentration wieder abnimmt.
- Kanäle, die in Gegenwart hoher cGMP-Konzentrationen eine leicht verminderte Offenwahrscheinlichkeit zeigen, jedoch selbst bei sehr hohen Konzentrationen nie ganz inaktiv werden und
- Kanäle, die keine cGMP-abhängigen Inaktivierungsercheinungen zeigen.

Obwohl das in Abb. 4.42 gezeigte konzentrations- und spannungsabhängige Einbrechen der Auswärtsströme nicht auf Einzelkanalebene untersucht werden konnte, bietet die von Zhainazarov *et al.* beschriebene cGMP-abhängige Inaktivierung eine plausible Erklärung des beobachteten Effekts. Das in Abb. 4.43 gezeigte Datenbeispiel des ROD ist noch eindeutiger. Der Patch ist nicht von behinderter Diffusion betroffen (die Umkehrpotentiale liegen bei 0 mV) und eine spannungsabhängige Veränderung der cGMP-Bindung kann in diesem Beispiel ausgeschlossen werden: Während das Einbrechen der Amplitude in Abb. 4.42 bereits bei 100 μ M cGMP einsetzte, bricht die in Abb. 4.43 gezeigte Reihe von I/V-Kurven erst in Gegenwart von 2 mM cGMP ein. Das zweite Beispiel zeigt auch eindeutiger, daß der Effekt wahrscheinlich auf einer Veränderung der Wechselwirkungen zwischen der Bindestelle und dem Öffnungsmechanismus der Pore und nicht auf einem konzentrationsabhängigen Block des Stroms durch das cGMP-Molekül direkt beruht. Der Unterschied zwischen den in Gegenwart von 1 bzw. 2 mM cGMP aufgenommenen Kurven läßt sich nicht durch Bindung von cGMP im Bereich der Pore erklären.

Wie bei Zhainazarov beschrieben, ist die Stärke des Einbrechens an die cGMP-Empfindlichkeit gekoppelt. Patche, die bereits bei geringer Ligandkonzentration zur Inaktivierung neigen, zeigen in Gegenwart höherer Ligandkonzentration stärkere Inaktivierung. Da sich in erster Linie die Offenwahrscheinlichkeit mit der Ligandkonzentration verändert, sprechen die Ergebnisse für eine mit der Offenwahrscheinlichkeit zunehmende mechanische Instabilität der geöffneten Pore. Möglicherweise geht auch der Block durch Amilorid (vgl. Abb. 4.13f) eher auf eine Veränderung von Protein-Protein-Wechselwirkungen als auf einen direkten Block der Pore durch das Amiloridmolekül zurück. Die Zweiphasigkeit der Blockade durch l-cis-Diltiazem (Abb. 4.12) spricht demgegenüber eher für unterschiedliche Wechselwirkung mit den intrazellulären Domänen im Einwärtsstrom und für direkten Block der Ionenpermeation im Auswärtsstrom. Patche, bei denen die Inaktivierung erst mit hoher Ligandkonzentration beobachtet wurde (wie z.B. in Abb. 4.44), zeigten häufig in einem nachfolgenden Versuch völlig "normale" I/V-Kurven, wenn der Patch zwischenzeitlich mit ligandfreier Lösung perfundiert wurde. In einigen Versuchen reichte auch eine Verminderung der Fließgeschwindigkeit der Perfusionslösung, um die Inaktivierung zu beheben. Die Inaktivierung trat sowohl bei Wildtypkanälen als auch bei Chimären auf. Wegen der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung wurden die Aktivierungskonstanten für negative Spannungen berechnet.

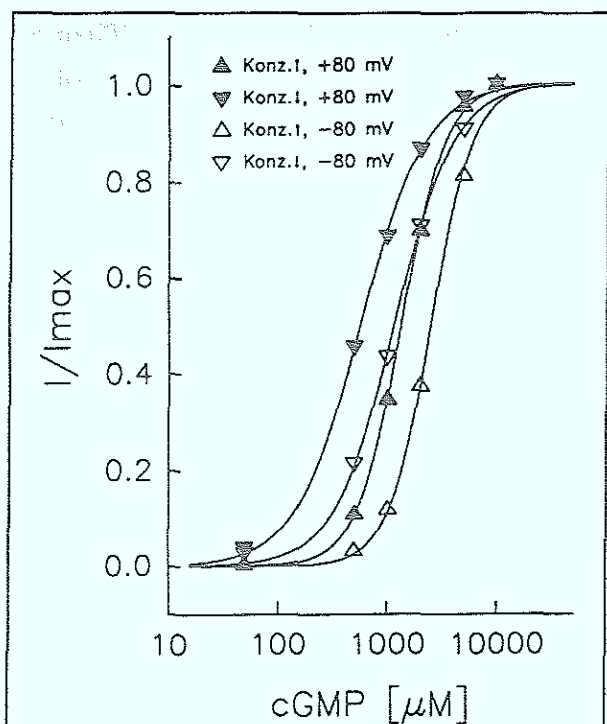


Abb. 4.44: Dosis-Wirkungskurven der T560A Mutante in Gegenwart steigender (aufwärts weisende Dreiecke) bzw. fallender (abwärts weisende Dreiecke) cGMP-Konzentration. Ausgefüllte Symbole gelten für +80 mV, offene für -80 mV. Die mit kleiner werdenden Ligand-Konzentrationen gemessenen Aktivierungskonstanten betrugen jeweils nur etwa 45 % der bei steigenden Konzentrationen gemessenen. Die Hill-Koeffizienten waren um etwa 70 % kleiner. Der Effekt kann mehrfach an einem Patch wiederholt werden und ist nicht spezifisch für die T560A Mutante.

Abb. 4.44 demonstriert eine weitere Ursache der Variabilität von Aktivierungskonstante und Hill-Koeffizient. Im Gegensatz zum zufälligen Auftreten der in Abb. 4.41 - 4.43 gezeigten Variabilität ist die Ursache der in Abb. 4.44 gezeigten "Variabilität" methodisch bedingt: Die Dosis-Wirkungskurven wurden aus zwei Reihen von I/V-Kurven berechnet, die nacheinander am gleichen Patch gemessen wurden. Die Messungen unterscheiden sich lediglich in der Reihenfolge, in der die Ligandkonzentrationen durchlaufen wurden. Bei Aufnahme der I/V-Kurven in Gegenwart fallender Ligandkonzentrationen weicht die Aktivierungskonstante um etwa 55 %, der Hill-Koeffizient um 70 % ab. Die Abweichung kann nicht auf einer lokalen Konzentrationserhöhung des Liganden auf Grund behinderter Diffusion beruhen, da gezeigt werden kann, daß die Kanäle in Gegenwart cGMP-freier Kontrollösung innerhalb von Sekundenbruchteilen schließen. Es handelt sich also jeweils um Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen.

Das eingestellte Gleichgewicht ist jedoch in beiden Fällen unterschiedlich.

Weit gestreute Verteilungen von Offenzeiten in Einzelkanalmessungen deuten auf die Existenz von "lazy states" beim Übergang aus Zuständen höherer Offenwahrscheinlichkeit in Zustände geringerer Offenwahrscheinlichkeit hin (Daten nicht gezeigt). In makroskopischen Messungen treten langsame kinetische Übergänge mit zunehmender Versuchsdauer gehäuft auf und manchmal wurde in Langzeitversuchen eine Zunahme des cGMP-unabhängigen Stroms beobachtet. Da dieser Strom im Gegensatz zum unspezifischen Leckstrom die Gleichrichtungseigenschaften von CNG-Kanälen zeigt, kann angenommen werden, daß sich einige Kanäle in lazy states "verhaken" und nicht mehr schließen. Einige der langsam schaltenden Zustände lassen sich in cGMP-freier Kontrollösung bei positiven Potentialen über Minuten erhalten, während ein kurzer Wechsel (< 1 Sekunde) zu negativen Potentialen ausreicht, um die Kanäle wieder zu schließen (Daten nicht gezeigt).

Korenbrots Hypothese, daß CNG-Kanäle auch in Abwesenheit von cGMP aktiv sind (Picones & Korenbrot, 1992), scheint auf ähnliche Beobachtungen zurückzugehen. Ihre Interpretation ist jedoch nicht schlüssig zu beweisen, da experimentell nicht gezeigt werden kann, daß alle Bindestellen tatsächlich unbesetzt sind.

4.7 ZEITABHÄNGIGE VERÄNDERUNG DER CNG-KANALANTWORTEN EINES PATCHES

Die Variabilität der Kanaleigenschaften von Patch zu Patch legt nahe, Meßreihen möglichst an einem Patch zu messen. Messungen, die mehrfach an einem Patch wiederholt wurden zeigen jedoch, daß sich die Eigenschaften der Kanäle eines Patches auch während der Meßzeit ändern.

Im Gegensatz zur Variabilität von Patch zu Patch sind die zeitlichen Veränderungen reproduzierbar und kanalspezifisch. Da der zeitliche Verlauf der Messungen in der Regel nicht dokumentiert wird, trägt diese systematische Fehlerquelle zur Variabilität der Literaturdaten bei.

Der obere Teil von Abb. 4.45 zeigt das Protokoll eines Versuchs am ROD, in dem 26 Reihen von I/V-Kurven aufgenommen wurden. Als deutlichste, zeitabhängige Veränderung ist die Abnahme der Amplitude nach etwa 25 bis 30 Minuten zu erkennen. Der Vergleich der Gleichrichtungseigenschaften (Abb. 4.45 unten) zeigt, daß sich die Amplitude von Auswärts- und Ein-

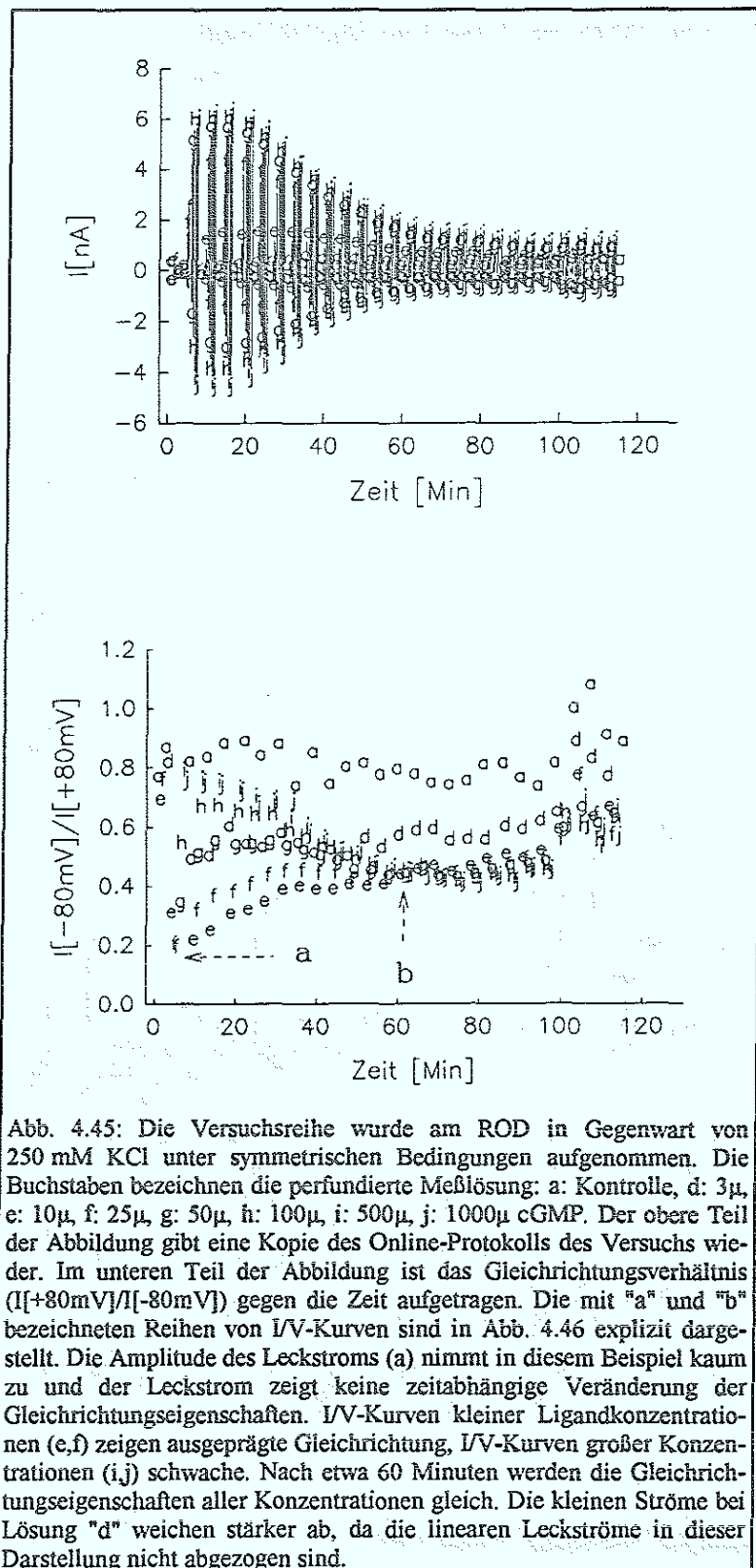


Abb. 4.45: Die Versuchsreihe wurde am ROD in Gegenwart von 250 mM KCl unter symmetrischen Bedingungen aufgenommen. Die Buchstaben bezeichnen die perfundierte Meßlösung: a: Kontrolle, d: 3μ , e: 10μ , f: 25μ , g: 50μ , h: 100μ , i: 500μ , j: 1000μ cGMP. Der obere Teil der Abbildung gibt eine Kopie des Online-Protokolls des Versuchs wieder. Im unteren Teil der Abbildung ist das Gleichrichtungsverhältnis ($I[+80\text{mV}]/I[-80\text{mV}]$) gegen die Zeit aufgetragen. Die mit "a" und "b" bezeichneten Reihen von I/V-Kurven sind in Abb. 4.46 explizit dargestellt. Die Amplitude des Leckstroms (a) nimmt in diesem Beispiel kaum zu und der Leckstrom zeigt keine zeitabhängige Veränderung der Gleichrichtungseigenschaften. I/V-Kurven kleiner Ligandkonzentrationen (e,f) zeigen ausgeprägte Gleichrichtung, I/V-Kurven großer Konzentrationen (i,j) schwache. Nach etwa 60 Minuten werden die Gleichrichtungseigenschaften aller Konzentrationen gleich. Die kleinen Ströme bei Lösung "d" weichen stärker ab, da die linearen Leckströme in dieser Darstellung nicht abgezogen sind.

wärtsströmen unabhängig voneinander ändert. Während zu Beginn des Versuchs I/V-Kurven bei kleinen Ligandkonzentrationen (h,i,j) starke Gleichrichtung zeigen ($I_{[-80 \text{ mV}]} / I_{[+80 \text{ mV}]} \approx 0,7$) und I/V-Kurven hoher Ligandkonzentration (e,f) beinahe linear verlaufen ($I_{[-80 \text{ mV}]} / I_{[+80 \text{ mV}]} \approx 0,2$), zeigen die I/V-Kurven nach 60 Minuten einheitliches Gleichrichtungsverhalten für alle Ligandkonzentrationen ($I_{[-80 \text{ mV}]} / I_{[+80 \text{ mV}]} \approx 0,55$).

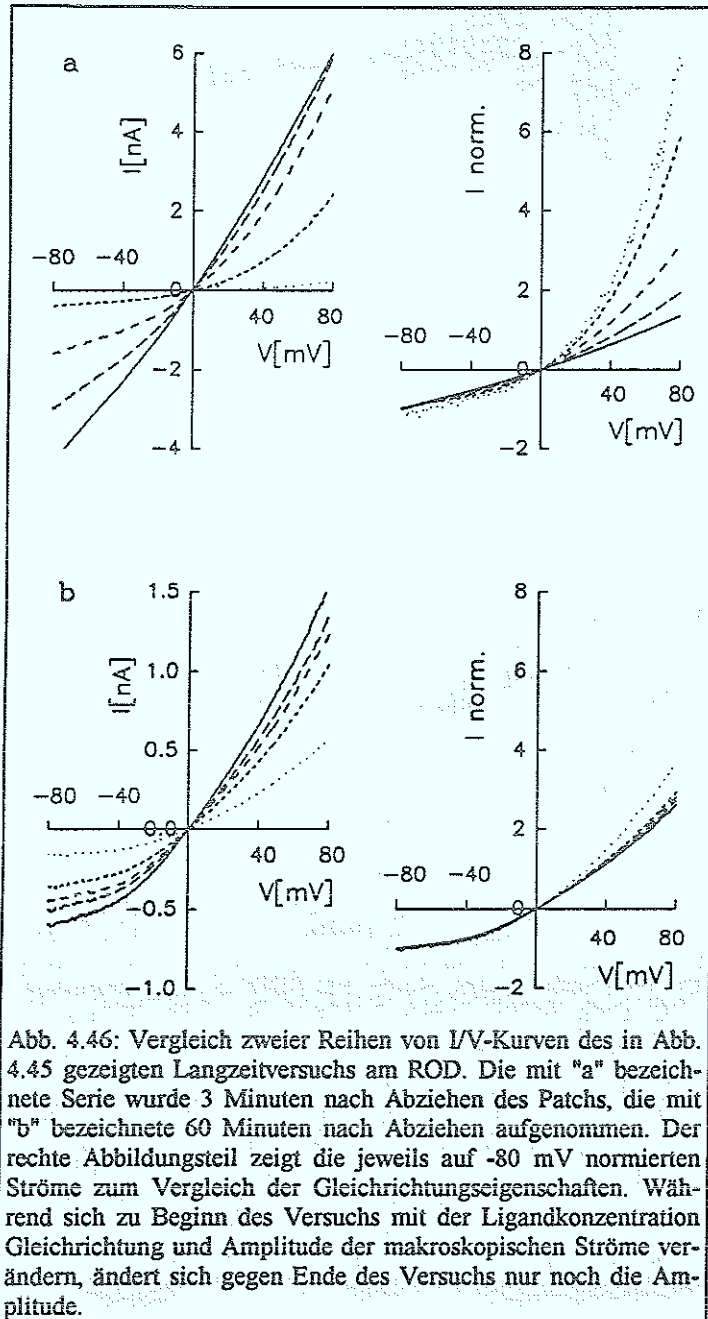


Abb. 4.46: Vergleich zweier Reihen von I/V-Kurven des in Abb. 4.45 gezeigten Langzeitversuchs am ROD. Die mit "a" bezeichnete Serie wurde 3 Minuten nach Abziehen des Patches, die mit "b" bezeichnete 60 Minuten nach Abziehen aufgenommen. Der rechte Abbildungsteil zeigt die jeweils auf -80 mV normierten Ströme zum Vergleich der Gleichrichtungeigenschaften. Während sich zu Beginn des Versuchs mit der Ligandkonzentration Gleichrichtung und Amplitude der makroskopischen Ströme verändern, ändert sich gegen Ende des Versuchs nur noch die Amplitude.

Abb. 4.46 zeigt zwei Reihen von I/V-Kurven, die zu Beginn des Experiments bzw. 60 Minuten später aufgenommen wurden. Während sich die I/V-Kurven beim "nativen" Kanal mit Konzentration und Spannung ändern, ändern sie sich beim "gealterten" Kanal nur noch mit der Konzentration.

Abb. 4.47 zeigt die Änderung von Stromamplitude (oberer Bildteil) und Gleichrichtung (unterer Bildteil) der jeweils in Gegenwart sättigender Ligandkonzentration aufgenommenen und auf +80 mV normierten I/V-Kurven des in Abb. 4.45 gezeigten Versuchs am ROD. Die deutlichsten Unterschiede im Zeitverlauf zeigen sich bei der Aktivierungskonstante und beim Hill-Koeffizienten (Abb. 4.48). Der Hill-Koeffizient (oberer Bildteil) fällt in diesem Beispiel linear mit einer Zeitkonstante von etwa 40 Minuten ab⁴¹ und sinkt gegen Ende des Versuchs unter eins, d.h. die Kooperativität geht verloren bzw. wird sogar negativ. Die Veränderung des Hill-Koeffizienten ist unabhängig von der Ionenstärke (Daten nicht gezeigt). Die

⁴¹ Der Mittelwert des zeitlichen Abfalls des Hill-Koeffizienten aus fünf Experimenten am ROD lag bei etwa 70 Minuten.

Aktivierungskonstante des ROD fällt dagegen exponentiell mit einer Zeitkonstante von etwa 20 Minuten ab. (Im Mittel aus 4 Versuchen beträgt die Zeitkonstante 25 Minuten, sie ist unabhängig von der Ionenkonzentration.) Während die Aktivierungskonstante bei Beginn dieses Versuchs bei 68 μM lag, beträgt sie nach etwa 80 Minuten nur noch 12 μM . Der zwischen 12 und 70 μM liegende, an der Kanalpopulation eines einzigen Patches gemessene Unterschied würde ausreichen, die Variabilität zu erklären, die sich beim Vergleich der Ergebnisse von unterschiedlichen Spezies und Laboratorien für den CNG-Kanal aus Sehtäbchen ergibt.

Je nach verwendetem Perfusionssystem werden in der Literatur Meßzeiten von 15 Minuten für eine Dosis-Wirkungskurve angegeben. Da sich K_a und n unterschiedlich schnell verändern, ist vor allem der aus der Steigung der Kurve bestimmte Hill-Koeffizient je nach Meßmethode leicht manipulierbar. Trotzdem wird der Hill-Koeffizient häufig zur Abschätzung der Mindestanzahl der zur Aktivierung notwendigen Liganden (und damit der Zahl der Untereinheiten pro Kanalpore) verwendet⁴².

Die frühe Veränderung der Aktivierungskonstante ist nicht von einer Veränderung der makroskopischen I/V-Kurve begleitet: Sowohl die Gleichrichtung als auch der maximal aktivierbare Strom bleiben in den ersten 20 bis 30 Minuten unverändert. Auch der Hill-Koeffizient ändert sich sehr viel langsamer. Über die Beziehung $\Delta G = RT \cdot \ln K_a$ ist die Aktivierungskonstante ein Maß für den Betrag der aufzuwendenden Energie, die den unligandierten Kanal in einen offenen Kanal überführt. Eine Abnahme der Aktivierungskonstante kann sowohl bedeuten, daß cGMP-Moleküle gebunden bleiben und der Übergang zum offenen Kanal energetisch leichter, mit weniger Bindeschritten erreicht werden kann. In diesem Fall würde der im Vergleich zur raschen Veränderung der Aktivierungskonstante langsame Abfall des Hill-Koeffizienten bedeuten, daß die Kooperativität nichts über den Bindungszustand, sondern ausschließlich etwas über das Zusammenspiel von Untereinheiten beim Öffnen der Pore aussagt (vgl. dazu auch Abb. 4.50). Alternativ kann der rasche Abfall der Aktivierungskonstante auch durch gebrauchsunabhängige Veränderungen der Wechselwirkungen zwischen Bindestelle und Öffnungsmechanismus bedingt sein.

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante und die konzentrationsabhängigen Veränderungen der Gleichrichtungseigenschaften beschreiben hingegen dasselbe Phänomen. Sie ändern sich zeitgleich. Eine Spannungsabhängigkeit von K_a kann nicht mehr auftreten, wenn die in Gegenwart unterschiedlicher cGMP-Konzentrationen gemessenen I/V-Kurven durch einfache Multiplikation aufeinander abgebildet werden können (vgl. Abb. 4.46). Auch bei der Aktivierung des ROD durch cAMP ist K_a spannungsunabhängig, und die normierten I/V-Kurven sind deckungsgleich (vgl. Abb. 4.4).

⁴² Zum Teil läßt sich aus den Veröffentlichungen erkennen, daß in Abbildungen gezielt Versuche mit hohen Hill-Koeffizienten ausgewählt wurden. Vgl. dazu auch Anhang A.

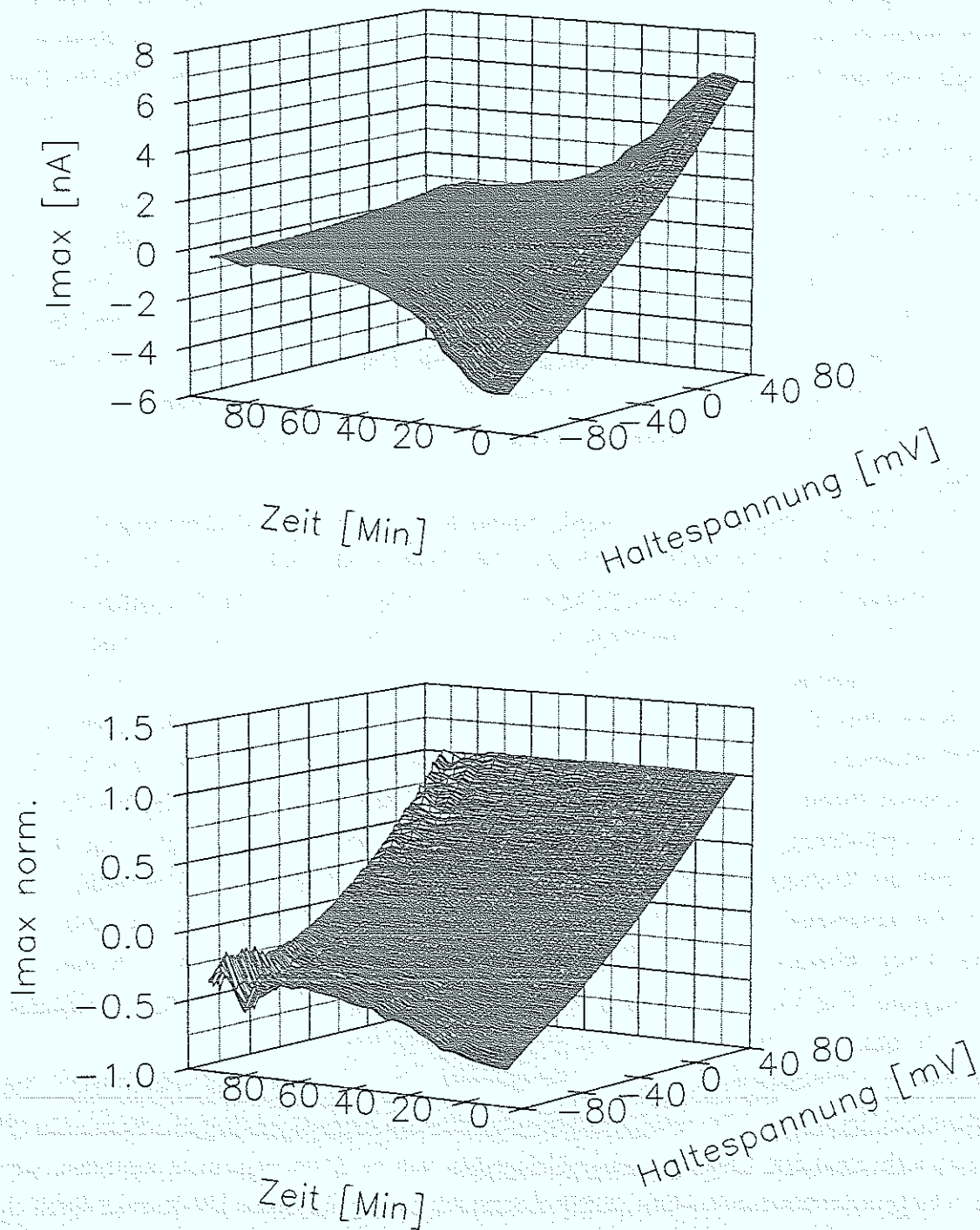
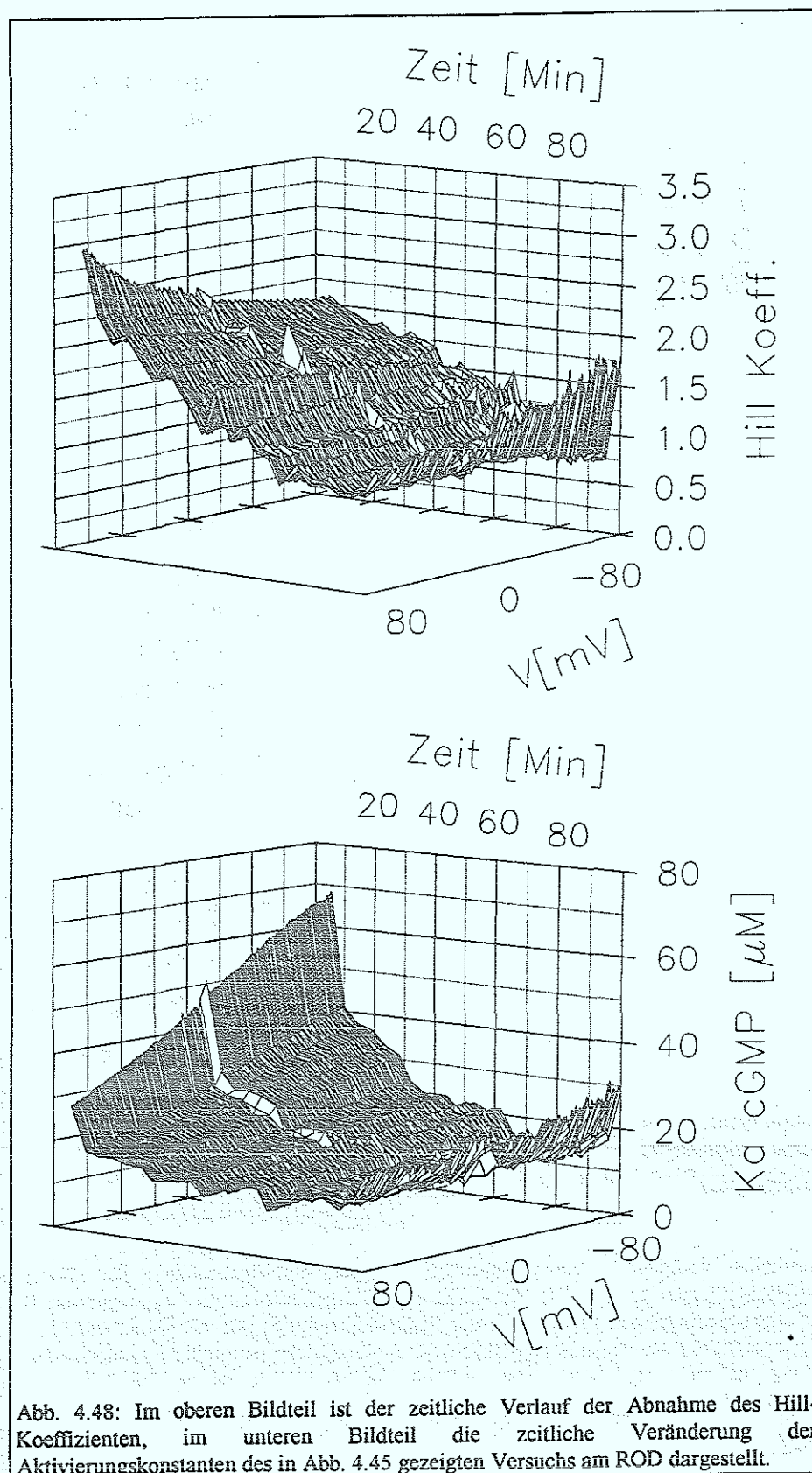


Abb. 4.47: Maximal aktivierbare Stromamplituden des ROD Kanals in einem typischen Langzeitversuch. Im oberen Bildteil ist die Abnahme der Amplitude gegen die Zeit aufgetragen, die untere Abbildung zeigt die Veränderung der Gleichrichtungs-eigenschaften der in Gegenwart sättigender Ligandkonzentration aufgenommenen I/V-Kurven. Die Kurven wurden auf -80 mV normiert.



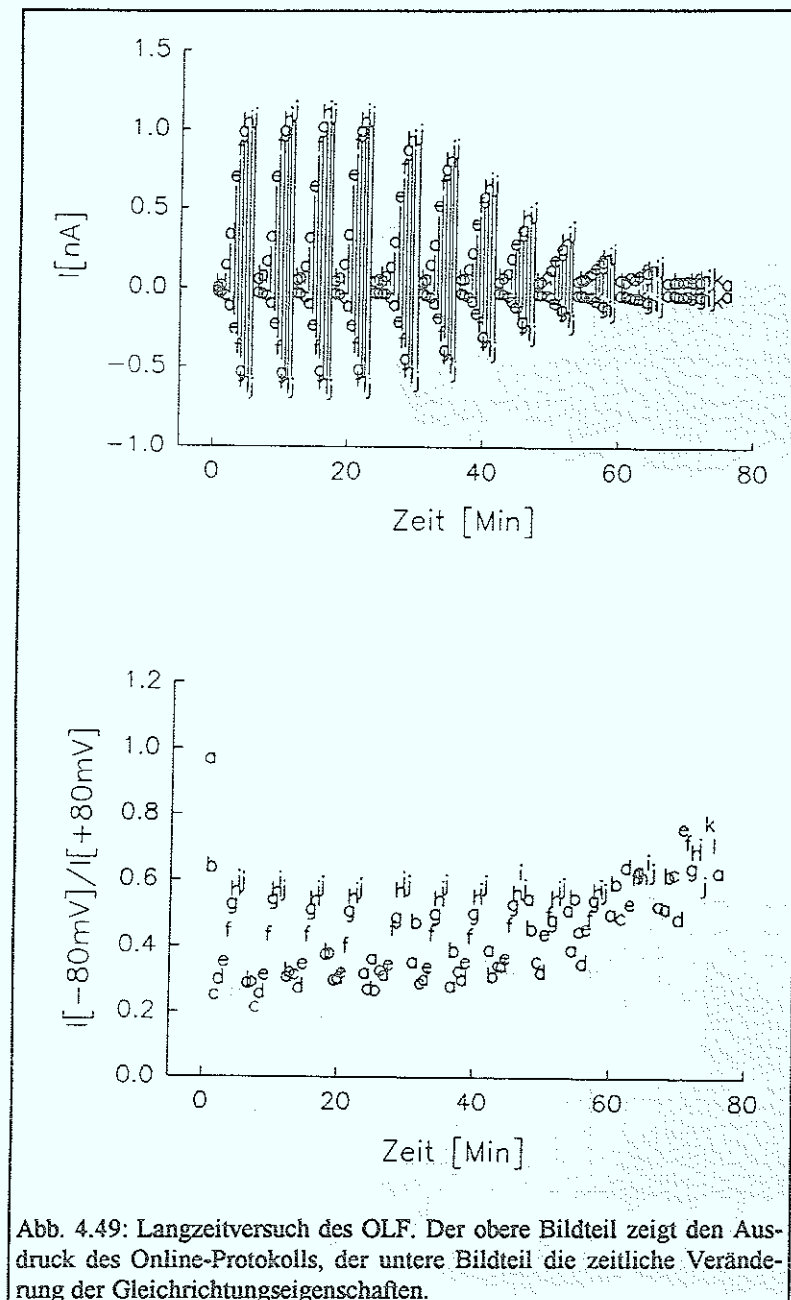


Abb. 4.49: Langzeitversuch des OLF. Der obere Bildteil zeigt den Ausdruck des Online-Protokolls, der untere Bildteil die zeitliche Veränderung der Gleichrichtungseigenschaften.

Abb. 4.49 zeigt einen Langzeitversuch des OLF. Oberflächlich betrachtet unterscheiden sich die beiden Versuche an ROD und OLF nicht. Die Stromamplitude nimmt ebenfalls nach etwa 30 Minuten ab und die Gleichrichtungseigenschaften verändern sich in ähnlicher Weise wie beim ROD⁴³ (vgl. Abb. 4.51). Auch beim OLF werden die normierten I/V-Kurven unterschiedlicher cGMP-Konzentration nach 60 Minuten deckungsgleich (Abb. 4.49 unten) und die zeitliche Veränderung des Hill-Koeffizienten ist der des ROD vergleichbar (Abb. 4.52). Die Veränderung der Aktivierungskonstante unterscheidet sich dagegen deutlich (s. Abb. 4.52)⁴⁴. Während die Aktivierungskonstante beim ROD exponentiell mit der Zeit abnimmt, bleibt sie beim OLF

⁴³ Bei der zeitlichen Veränderung der Gleichrichtung bleiben die Eigenschaften der I/V-Kurven hoher Ligandkonzentrationen relativ unverändert, die der kleinen gleichen sich an. In Gegenwart von 100 mM KCl unter symmetrischen Bedingungen verhält sich der ROD diesbezüglich wie der OLF. Die in Abb. 4.45 zu erkennende Gegenläufigkeit der Veränderung Gleichrichtungseigenschaften großer und kleiner Ligandkonzentrationen bei Versuchsbeginn ist möglicherweise auf eine Veränderung der Permeationseigenschaften bei größerer Ionenstärke zurückzuführen.

⁴⁴ Im Gegensatz zu den Abbildungen der Langzeitversuche des ROD wurde die letzte Phase des Versuchs in der Abbildung nicht abgeschnitten. Die Zunahme des Rauschens beider Parameter gegen Ende des Versuchs wurde bei allen Langzeitversuchen beobachtet, und kann als unspezifisches Zeichen des Verfalls der Kanalfunktion gewertet werden.

über 30 bis 50 Minuten unverändert.

Abb. 4.50 faßt die zeitlichen Veränderungen des Hill-Koeffizienten und der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante der beiden Experimente für ROD und OLF zusammen. In beiden Fällen verläuft die zeitliche Abnahme des Hill-Koeffizienten ähnlich zur zeitlichen Änderung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante.

Der Verlust der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante nach 60 Minuten ist in beiden Kanälen gleich.

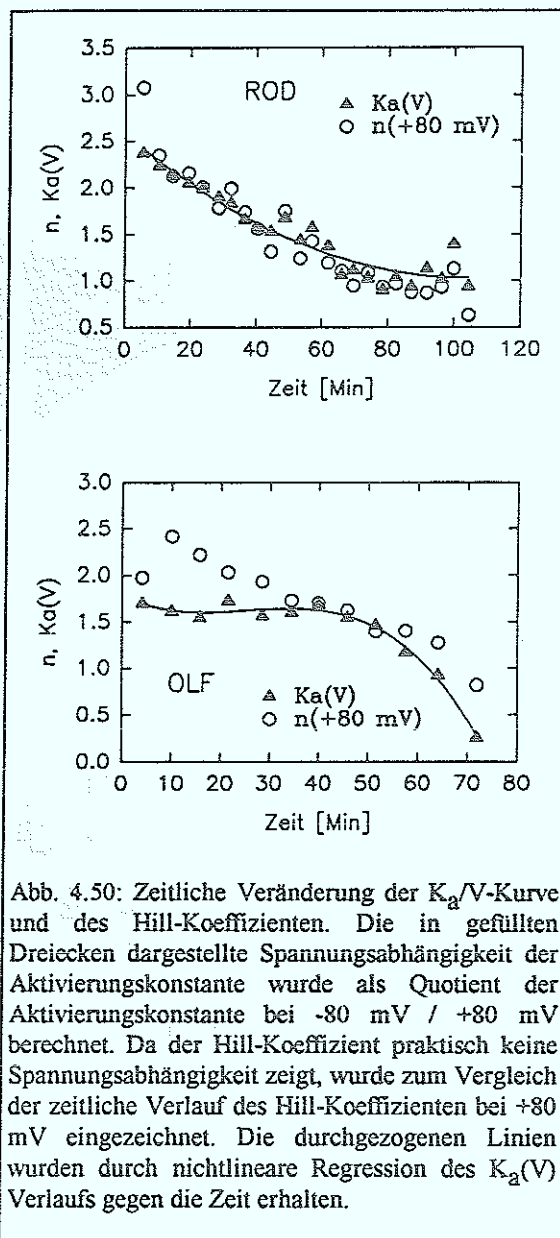


Abb. 4.50: Zeitliche Veränderung der K_a/V -Kurve und des Hill-Koeffizienten. Die in gefüllten Dreiecken dargestellte Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante wurde als Quotient der Aktivierungskonstante bei $-80 \text{ mV} / +80 \text{ mV}$ berechnet. Da der Hill-Koeffizient praktisch keine Spannungsabhängigkeit zeigt, wurde zum Vergleich der zeitliche Verlauf des Hill-Koeffizienten bei $+80 \text{ mV}$ eingezeichnet. Die durchgezogenen Linien wurden durch nichtlineare Regression des $K_a(V)$ Verlaufs gegen die Zeit erhalten.

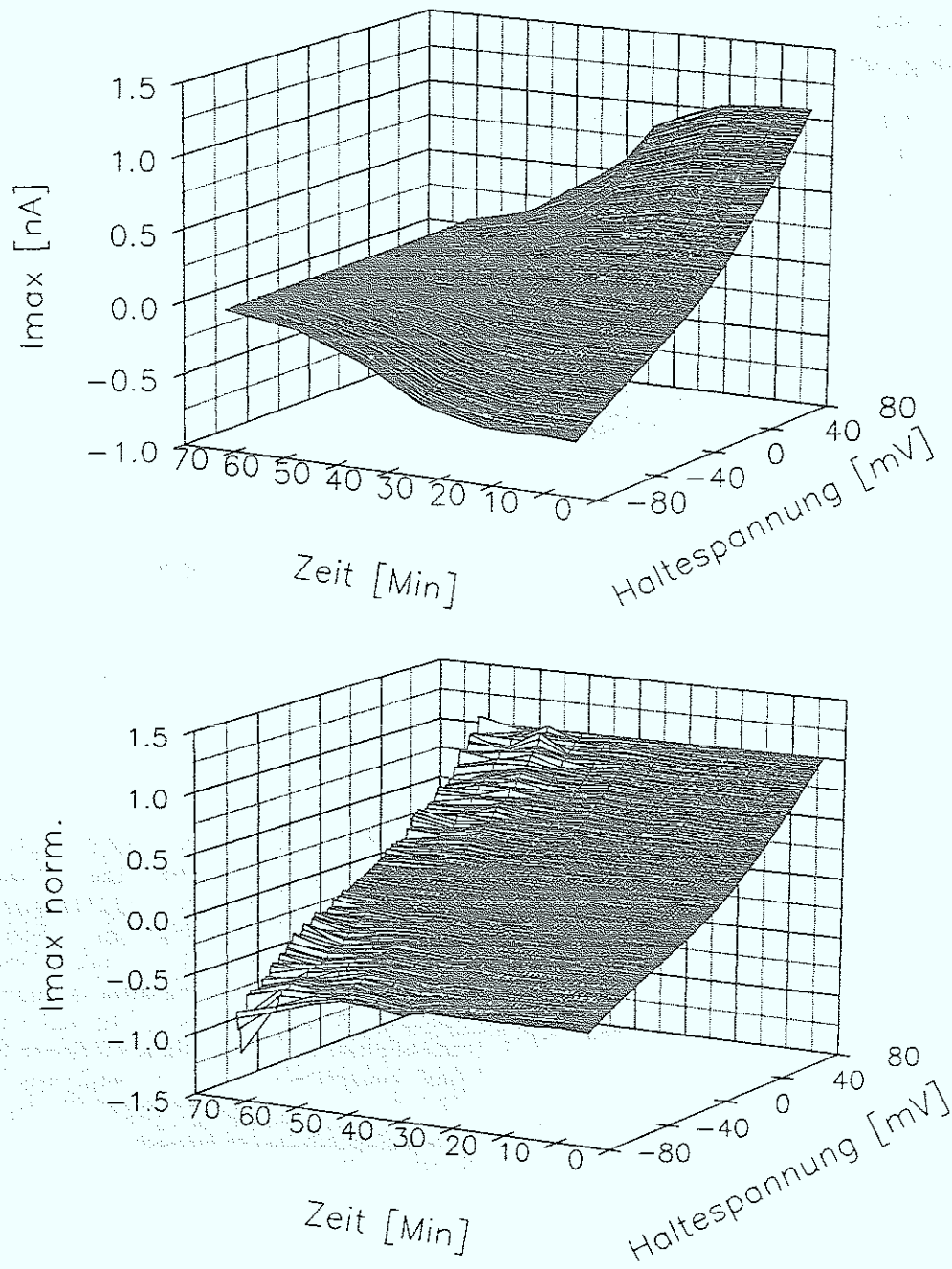
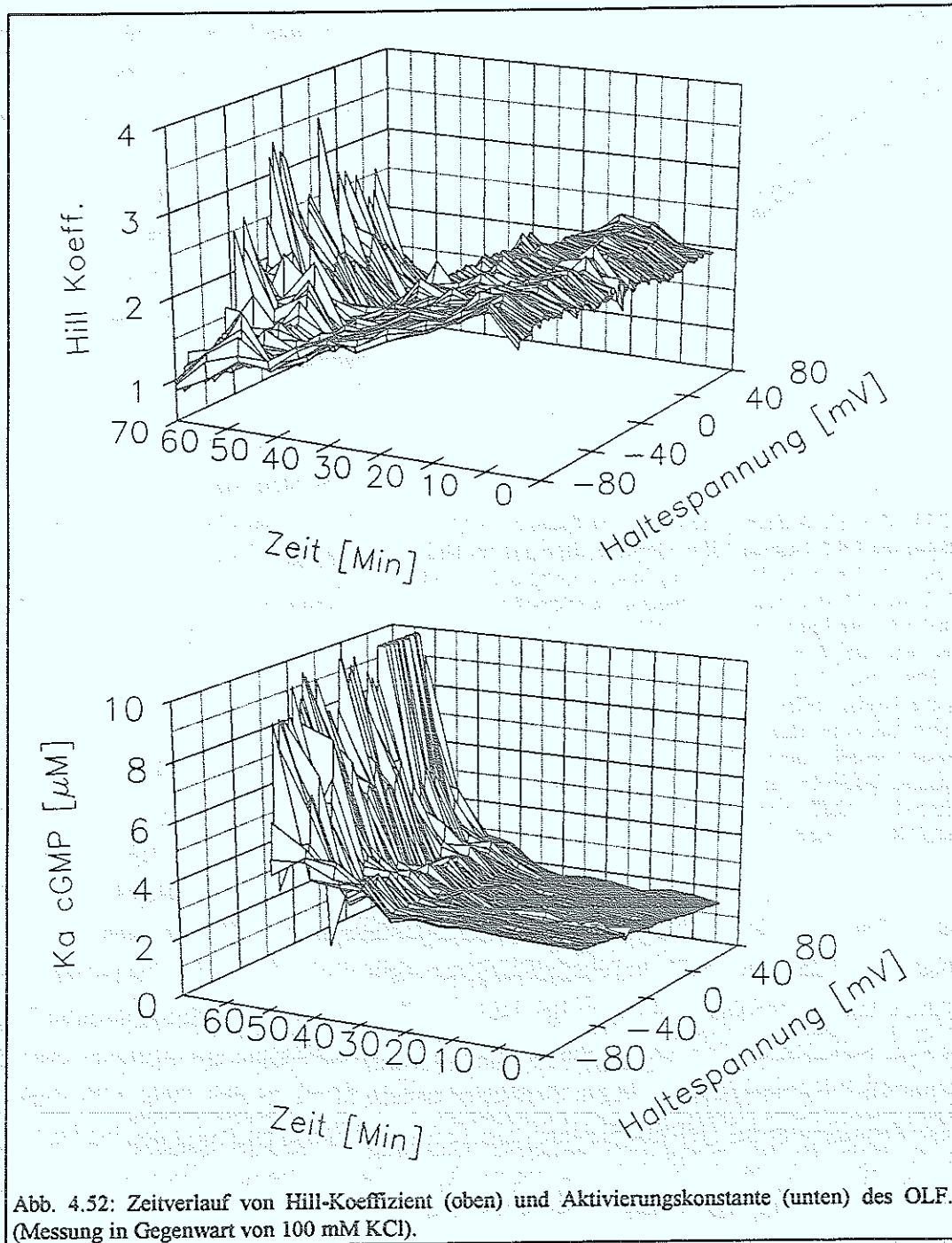


Abb. 4.51: Zeitverlauf der maximal aktivierbaren Amplitude des OLF, oben absolut, unten auf +80 mV normiert.



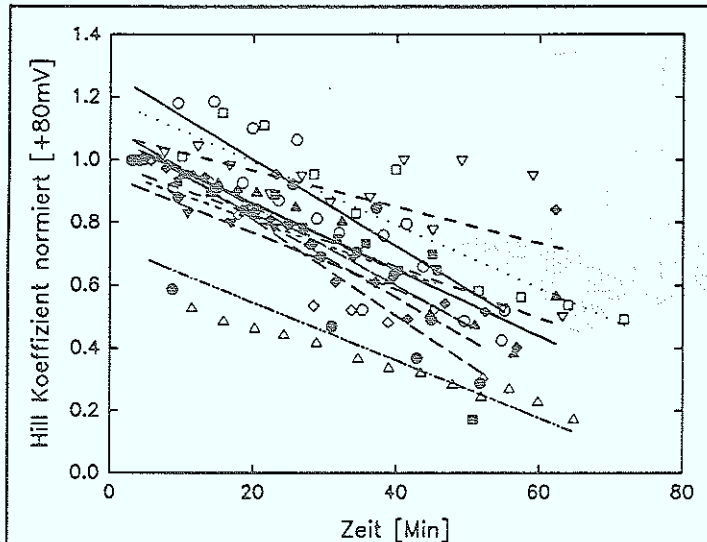


Abb. 4.53: Zeitliche Änderung des Hill-Koeffizienten (+80 mV) der Kanäle der OLF Gruppe (OLF, Herz153, Herz351, in Gegenwart von cGMP bzw. cAMP). Es ist kein Unterschied zwischen cGMP- bzw. cAMP-aktivierten Kanälen zu erkennen. Der Hill-Koeffizient nimmt linear mit einer mittleren Zeitkonstante von 83 Minuten ab, die Zeitkonstante ist spannungsunabhängig. Die Grafik faßt etwa 10^6 Meßpunkte zusammen. Offene Kreise, geschlossene Kreise, offene Dreiecke (abwärts), geschlossene Dreiecke (abwärts), offene Vierecke: OLF cGMP; geschlossene Vierecke, offene Dreiecke (aufwärts): Herz153 cAMP; geschlossene Dreiecke (aufwärts): Herz153 cGMP; offene Rauten: Herz357 cAMP; geschlossene Rauten, offene Kreise, geschlossene Kreise: Herz 357 cGMP.

Der deutliche und reproduzierbare Unterschied in der zeitlichen Veränderung der Aktivierungskonstante zwischen ROD und OLF läßt vermuten, daß die zeitliche Veränderung der Aktivierungskonstante ein kanalspezifischer Parameter ist. Während sich der absolute Wert der Aktivierungskonstante durch Überlagerung unterschiedlicher Effekte in einem gewissen Rahmen von Patch zu Patch neu einstellt (vgl. Abs. 4.6), läßt die zeitliche Veränderung der Aktivierungsparameter zusätzliche Rückschlüsse auf die thermodynamische Stabilität der zur Aktivierung führenden Wechselwirkungen zu. Dieser Parameter könnte sich als hilfreich erweisen, da aus der Veränderung der Aktivierungskonstanten alleine

nicht geschlossen werden kann, welche Domänen direkt miteinander wechselwirken.

Zunächst wurde daher die zeitliche Veränderung der Aktivierungsparameter der beiden CNG-Kanalklone aus Herzgewebe mit denen des OLF verglichen. Wenn es sich um strukturell bedingte Eigenschaften handelt, sollten die Ergebnisse der CNG-Kanäle aus Aortengewebe mit denen des OLF übereinstimmen, da die Sequenzen nahezu identisch sind. Abb. 4.53 zeigt die zeitliche Veränderung des Hill-Koeffizienten aus 12 Versuchen am OLF und den beiden Kanälen aus Herzgewebe. Wie in den zuvor gezeigten Versuchen wurden die Daten durch wiederholte Messung von Ligandkonzentrationsreihen an einem Patch erhalten.

Die zeitabhängigen Veränderungen des Hill-Koeffizienten des OLF und der beiden CNG-Kanäle aus Herzgewebe sind wie erwartet identisch. Der Hill-Koeffizient und die zeitliche Änderung des Hill-Koeffizienten ist spannungsunabhängig. Die Zeitkonstante des Abfalls beträgt im Mittel 83 Minuten.

Die Aktivierungskonstante bleibt für die Dauer des auswertbaren Zeitraums konstant (Abb. 4.54, der manchmal beobachtete Anstieg gegen Ende der Messungen ist auf unspezifische Veränderungen kurz vor Zerstörung des Patches zurückzuführen). Messungen in Gegenwart von cGMP und cAMP unterscheiden sich hinsichtlich der zeitabhängigen Veränderungen nicht.

Neben den Langzeitversuchen an Kanälen der OLF-Gruppe wurden 24 Experimente an anderen Kanalmutanten ausgewertet: ROD (4 Experimente), R5O (7 Experimente), R6O (2 Experimente), D1R (1 Experiment), O5R6O (2 Experimente), O1R6O (4 Experimente), O5R (1 Experiment), D1O (1 Experiment), C537S (2 Experimente). Die Aktivierungskonstante des ROD fällt bei -80 mV im Mittel aus 4 Experimenten nach etwa 25 Minuten auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes. Die R5O Chimäre ist mit etwa 40 Minuten thermodynamisch etwas stabiler, D1R, R6O und C537S mit etwa 20 Minuten ungefähr gleich wie der ROD. Die

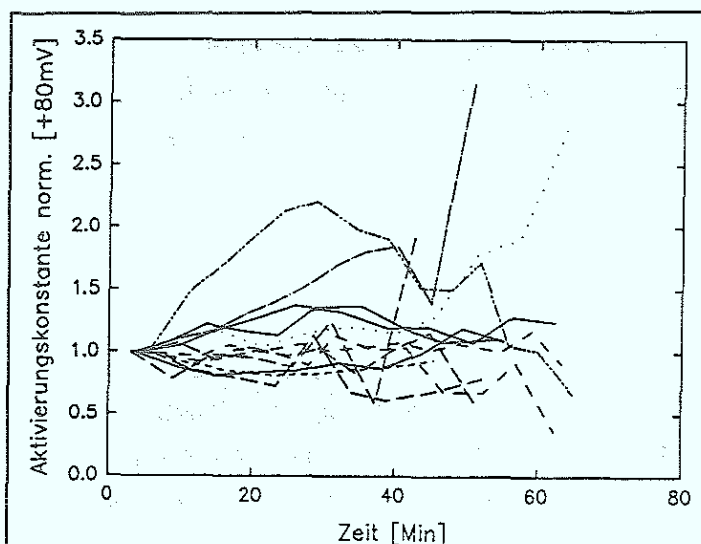


Abb. 4.54: Zeitliche Veränderung der Aktivierungskonstanten (+80 mV) der Kanäle der OLF-Gruppe (OLF, Herz153, Herz375). Die beiden schnell ansteigenden Kurven (—•— und —•—) wurden in Gegenwart von cAMP am Herz153 gemessen. Die zeitlichen Änderungen der Aktivierungskonstante unterscheiden sich bei den anderen beiden Kanälen jedoch nicht bei Aktivierung durch cAMP bzw. cGMP.

O5R6O und O1R6O Chimären nehmen mit einer Halbwertszeit von etwa 60 Minuten eine Mittelstellung zwischen dem raschen Abfall in der ROD-Gruppe und der Zeitkonstanz der OLF-Gruppe ein. Die Aktivierungskonstanten des D1O und O5R nehmen mit der Zeit zu (2fach in 15 Minuten) (Daten nicht gezeigt). Vergleichbar zur Veränderung der K_a/V -Kurve und der Aktivierungskonstante bei den O5R6O und O1R6O Chimären ist die Zeitkonstante des Abfalls der Aktivierungskonstante bei diesen beiden Chimären um etwa den gleichen Betrag in Richtung des ROD-Wildtyps verschoben. Die Zunahme der Aktivierungskonstante beim D1O im Vergleich zu Wildtypeigenschaften beim D1R deutet auf eine stärkere thermodynamische Stabilisierung der OLF-Wildtypeigenschaften durch Wechselwirkungen zwischen N- und C-Terminus als das beim ROD der Fall ist. Entsprechend verändert sich die Aktivierungskonstante des ROD zeitlich rascher als die des OLF.

Der zeitliche Abfall des Hill-Koeffizient verläuft für alle untersuchten Kanalmutanten unverändert mit einer mittleren Zeitkonstante von 70 bis 80 Minuten. In vereinzelten Messungen gab es jedoch einen deutlich schnelleren Abfall.

Der normalerweise nach 30 Minuten einsetzende Verfall der Amplitude ist ebenfalls einheitlich für die untersuchten Wildtypen und Chimären. Trotzdem gab es an manchen Tagen deutliche Abweichungen in beide Richtungen: sofort beginnender Abfall bzw. länger anhaltende Konstanz der Stromamplitude.

Bei einer bestimmten Gruppe von Shaker-Kaliumkanälen (ShakerB) wurde nachgewiesen, daß Inaktivierung auf der Wechselwirkung eines N-terminalen Peptids mit Domänen nahe der Pore beruht (Hoshi *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1990; Isacoff *et al.*, 1991). Die Pore wird möglicherweise mechanisch "verstopft". Da die Kinetik der Inaktivierung durch Variation der Länge des Peptids verändert werden kann, mit der der N-terminale "Ball" am Rest des Proteins hängt, wird das Modell als "chain and ball" Mechanismus diskutiert. Das Modell setzt voraus, daß sich funktionell wichtige Teile des Kanalproteins relativ frei bewegen können und trotzdem sicher erkennen.

Die Veränderung der Gleichrichtungseigenschaften durch wechselnde Ionenstärken bei CNG-Kanälen (vgl. Abs. 4.3) erinnert an Versuche, mit denen Anderson *et al.* gezeigt haben, daß sich die Blockade von Kaliumkanälen durch Charybdotoxin in Abhängigkeit von der Ionenstärke modulieren läßt. Die Veränderung der Kinetik der Blockade deutet darauf hin, daß das blockierende Molekül aus der Pore "herausgeblasen" wird (Anderson *et al.*, 1988).

Zusammen mit den zunächst aus Chimärenversuchen abgeleiteten Interaktionen des C-Terminus mit zentralen Domänen des Proteins (die Vermutung ließ sich bei Analyse der K_a/V -Kurven nicht mehr aufrecht erhalten, vgl. Abs. 4.5), haben diese Ergebnisse zu einem Modell der CNG-Kanalaktivierung geführt, bei dem angenommen wird, daß die Bindestelle als "Ball" die Pore möglicherweise mechanisch verschließt, und daß die mit der Ligandbindung einhergehenden Konformationsänderungen die Pore öffnen. Ein vergleichbares Modell wurde unabhängig auch von Goulding *et al.* aus Veränderungen des Schaltverhaltens von CNG-Kanälen in Abhängigkeit vom pH (unterschiedlich starke Wechselwirkungen geladener Aminosäuren) abgeleitet (Goulding *et al.*, 1992).

"Lazy states", die dazu führen, daß der Kanal permanent offen ist, würden dann als Funktionsverlust der Wechselwirkung zwischen "Ball" und Pore interpretiert. Unterschiedliche Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bei ROD und OLF würde in dem Modell durch unterschiedlich starke Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen Bindestelle und Pore durch das transmembranale elektrische Feld erklärt, die Bindestelle des ROD läge demnach weiter innerhalb der Membran als die des OLF.

Um die Hypothese zu testen, daß die intrazellulären, an der Aktivierung beteiligten Kanaldomänen ähnlich dem Hin- und Herschlagen des Inaktivierungspeptids im "Chain and Ball" Modell der Kaliumkanäle zur Öffnung der Pore führen, wurden Langzeitversuche durchgeführt, in denen der Kanal nur in hyper- bzw. depolarisierender Richtung geöffnet wurde. Wenn die zeitlichen Veränderungen in erster Linie "gebrauchsabhängig" sind, sollte man einen Unterschied im Zeitverlauf der Veränderungen erkennen können. Es wurden keine Hinweise gefunden, die

darauf schließen lassen, daß sich große Domänen des Proteins gegeneinander bewegen, daß diese Bewegung unterschiedlich für hyper- bzw. depolarisierende Spannungen ist oder zu einer gebrauchungsbedingten "Abnutzung" des Proteins führt. Der Abfall der Stromamplitude setzt sich unverändert fort, wenn der Kanal nicht durch Öffnen und Schließen oder durch wechselnde cGMP-Konzentrationen in seinem Funktionszustand verändert wird. Es spielt ebenfalls keine Rolle, ob der Kanal nur in de- oder hyperpolarisierender Richtung geöffnet wird.

Eine Deletionsmutante des ROD (R6D, vgl. Anhang B), bei der der C-Terminus inklusive der Bindestelle abgeschnitten ist, ist weder permanent offen noch funktionell aktivierbar. Vorausgesetzt, daß das Protein mit funktioneller Pore in die Membran eingebaut wird, kann ausgeschlossen werden, daß die Pore durch die Bindestelle direkt verschlossen wird.

Die zeitliche Abnahme der Stromamplitude in Langzeitversuchen erinnert an die deutliche Abnahme der Aktivität von mechanosensitiven Kanälen in der Oozyte nach etwa 20 Minuten (Hamill & McBride, 1992). Die Aktivität von mechanosensitiven Kanälen hängt hauptsächlich von der durch die Membran auf das Protein ausgeübten Kraft ab (Ruknudin *et al.*, 1991). Der Zeitverlauf von 20 - 30 Minuten bei der Aktivitätsabnahme von mechanosensitiven- und CNG-Kanälen könnte vergleichbare Ursachen haben.

4.8 EFFEKT VON NEM AUF DIE KOOPERATIVITÄT

Bisher gibt es kaum Hinweise auf den Mechanismus, der die Kooperativität des Kanalproteins erzeugt. Beim ROD wurde *in situ* ein Verlust an Kooperativität nach Inkubation des Patches mit N-Ethyl-Maleimid (NEM) beobachtet (H. Lühring, J. Vetter, unveröffentlichte Ergebnisse). NEM reagiert mit SH-Gruppen von Cysteinen. Cystine werden jedoch wahrscheinlich nicht modifiziert. Es ist daher anzunehmen, daß der in Gegenwart von NEM beobachtete Effekt auf sterischen Wechselwirkungen beruht.

Die Bindestelle des ROD enthält zwei Cysteine. Mit der C573S Mutante des ROD (entspricht Position 691 im Alignment in Anhang B) sollte geprüft werden, ob dieses in der Bindestelle lokalisierte Cystein für den Effekt verantwortlich ist. Abb. 4.55 zeigt einen Überblick über die Aktivierungseigenschaften der C573S Mutante. Bis auf die 2- bis 3fach höhere Aktivierungskonstante und die starke Rektifizierung entspricht sie den Eigenschaften des ROD. Abb. 4.56 zeigt den Effekt von NEM auf den Hill-Koeffizienten des ROD und der C573S Mutante. Im Gegensatz zur Halbwertszeit von etwa 70 Minuten in der Kontrolle fällt die Kooperativität im Durchschnitt nach NEM Behandlung in 10 Minuten auf die Hälfte ab. Der Abfall zeigt zwei

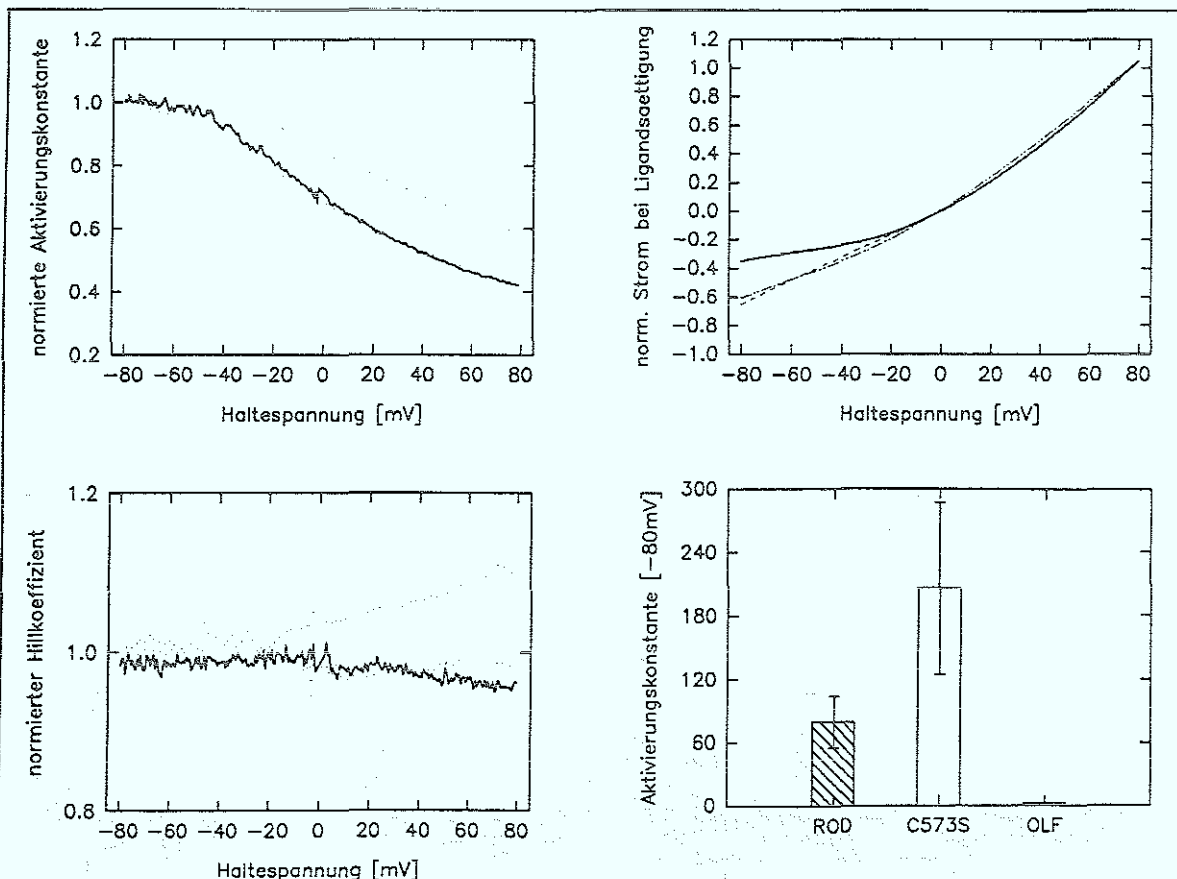
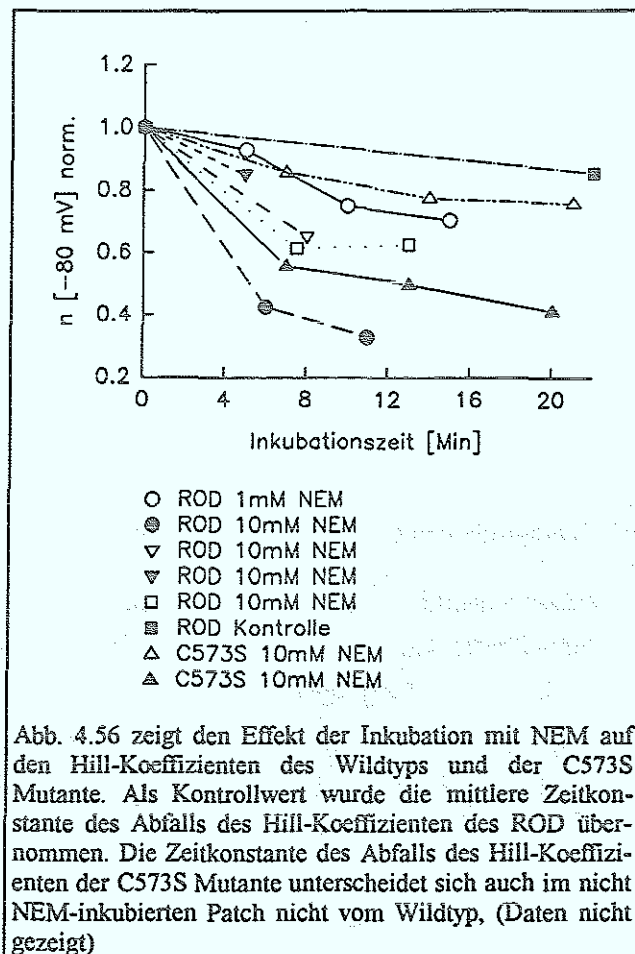


Abb. 4.55: Aktivierungseigenschaften der C573S Mutante (dick, durchgezogen). Zum Vergleich sind die Eigenschaften der beiden Wildtypen (ROD, dünne Strichpunkte, und OLF, dünn gestrichelt) eingezeichnet (vgl. dazu auch Abb. 4.3). Erklärung siehe Text, vgl. auch Text zu Abb. 4.3 und Anhang C.

Phasen. Die erste, schnelle Phase tritt nur bei Inkubation mit NEM auf, die zweite, langsame zeigt gleiche Zeitabhängigkeit wie der nicht inkubierte ROD-Wildtyp. Die Ergebnisse der C573S Mutante weichen bezüglich des Einflusses von NEM auf den Hill-Koeffizienten nicht vom Wildtyp ab. Während der Verlust der Kooperativität beim nicht inkubierten ROD-Wildtyp mit einem Verlust der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante einhergeht, ändert sich die K_a/V -Kurve während der schnellen Phase des Kooperativitätsverlusts in Gegenwart von NEM nicht (Daten nicht gezeigt). Es kann daher angenommen werden, daß die Kooperativität - ähnlich der Ligandempfindlichkeit - durch ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Protein-Protein-Wechselwirkungen zustande kommt.



4.9 EINZELKANALDATEN

Die Analyse der Spannungsabhängigkeit erlaubt nicht zu unterscheiden, ob sich Bindeeigenschaften des Liganden in Abhängigkeit von der Spannung ändern, oder ob sich die Isomerisierungsenergie beim Übergang vom Geschlossen- in den Offenzustand ändert. Karpen *et al.* haben versucht, die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante dem Übergang vom Geschlossen- in den Offenzustand zuzuschreiben (Spannungsabhängigkeit des Öffnungsschritts, Karpen *et al.*, 1988), während Tanaka *et al.* eine Beteiligung der nukleotidabhängigen Schritte fordern (Spannungsabhängigkeit der Bindung, Tanaka *et al.*, 1989).

Die Spannungsabhängigkeit des Übergangs vom Geschlossen- in den Offenzustand wird modellhaft bei spannungsabhängigen Kalium-, Natrium- oder Kalziumkanälen durch die Anzahl von Elementarladungen (in Form geladener Aminosäuren) beschrieben, die beim Öffnen des Kanals von der Innenseite der Membran über das transmembranale elektrische Feld zur Außenseite befördert werden. Je mehr Ladungen transportiert werden müssen, desto stärker hängt der Prozeß von der Spannung ab.

Die Wahrscheinlichkeit des Übergangs vom Geschlossen- in den Offenzustand läßt sich als Boltzmann-Term angeben:

$$\frac{O}{C} = \exp\left(-\frac{w - z_g E}{kT}\right) \quad \text{Gl. 4.1}$$

$\frac{O}{C}$ = Verhältnis von Offen- und Geschlossenzeit

w = aufzuwendende Isomerisierungsenergie

z_g = modellhafte Anzahl der über die gesamte Membran verschobenen Ladungen

E = Potentialunterschied zwischen Membraninnenseite und Membranaußenseite

k = Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K)

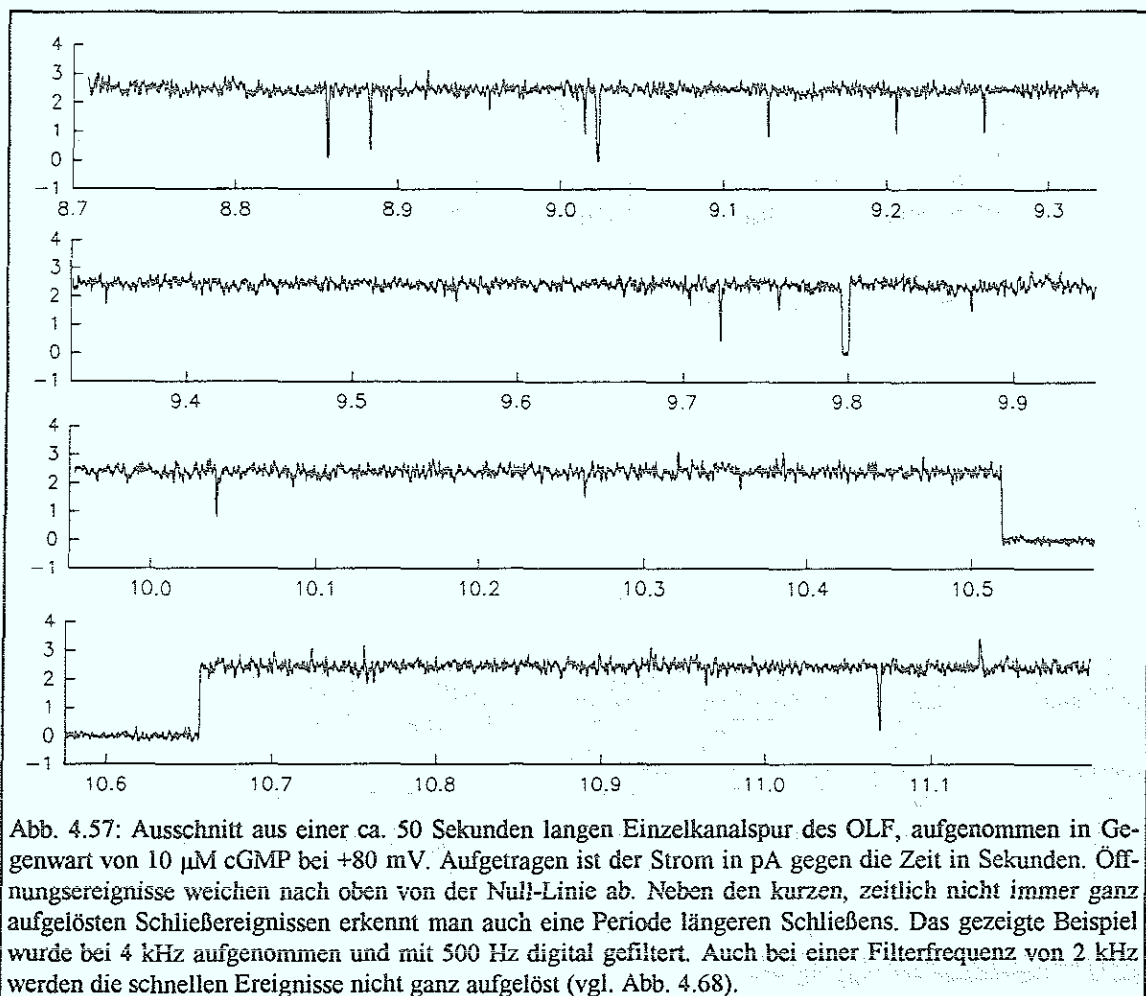
T = Temperatur

Für die Familie der spannungsabhängigen Kanäle liegt z_g bei 6, für CNG-Kanäle wurden Werte von 0,25 (Goulding *et al.*, 1992), 0,3 (Hanke *et al.*, 1988) und 0,4 (Ildefonse & Bennett, 1991) beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur wenige, kinetisch auswertbare Daten erhalten werden. Einzelkanalpatche in kalziumfreier Lösung waren über maximal 20 bis 30 Minuten stabil. Anhand der aus I/V- und i/V-Kurven gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch einige Rückschlüsse auf das kinetische Verhalten bei unterschiedlichen Spannungen und Konzentrationen möglich.

EINZELKANALDATEN DES OLF

Abb. 4.57 zeigt einen Ausschnitt einer Einzelkanalspur des OLF bei +80 mV in Gegenwart von 10 μ M cGMP. Die Darstellung folgt der physiologischen Konvention: Kanalöffnungen bei positiven Spannungen weichen nach oben von der Null-Linie ab. Der Kanal zeigt zwei unterscheidbare Geschlossenenzustände (c_1 und c_2) mit einer mittleren Geschlossenzeit von $\tau_{c1} = 1.74$ ms und $\tau_{c2} = 389$ ms. τ_{c1} ist zeitlich bereits nicht mehr ganz aufgelöst. In Abb. 4.57 erkennt man häufig Schaltereignisse, die das Geschlossenniveau nicht erreichen (vgl. dazu auch Abb. 4.68). Die Offenzeiten konnten mit einer einzigen Zeitkonstante $\tau_{o1} = 406$ ms gefittet werden.



In Abb. 4.58 ist das zugehörige Amplitudenhistogramm dargestellt. Aus den Flächenanteilen der beiden Zustände ergibt sich eine Offenwahrscheinlichkeit von 98 %. Die ausgewertete Spur war insgesamt 23 Sekunden lang. Die Daten wurden ungefähr eine Minute nach Abziehen des Patches aufgenommen.

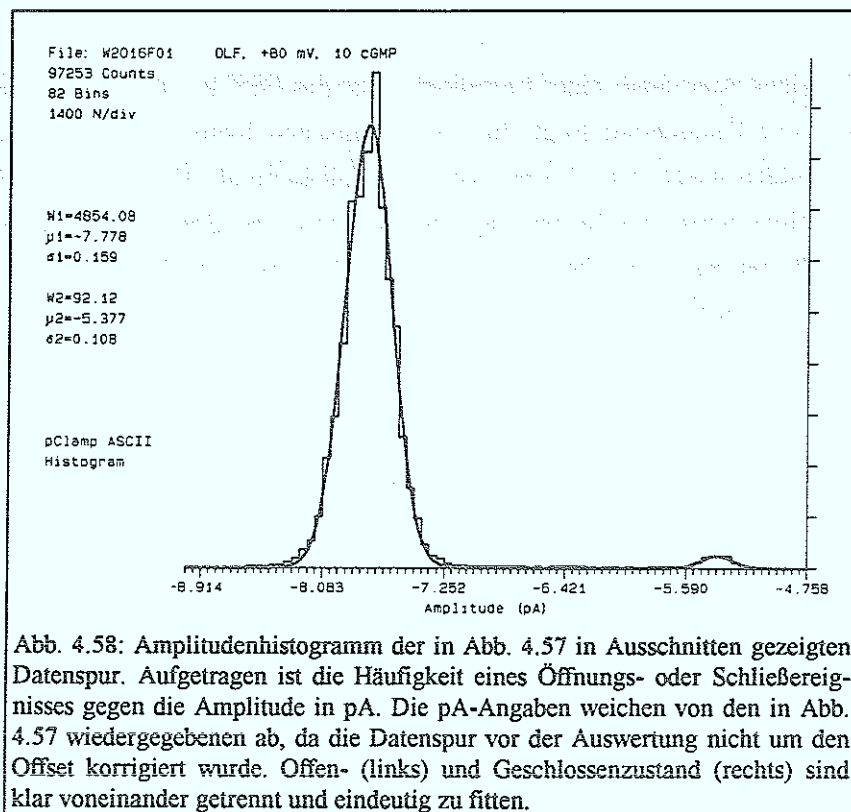


Abb. 4.58: Amplitudenhistogramm der in Abb. 4.57 in Ausschnitten gezeigten Datenspur. Aufgetragen ist die Häufigkeit eines Öffnungs- oder Schließereignisses gegen die Amplitude in pA. Die pA-Angaben weichen von den in Abb. 4.57 wiedergegebenen ab, da die Datenspur vor der Auswertung nicht um den Offset korrigiert wurde. Offen- (links) und Geschlossen Zustand (rechts) sind klar voneinander getrennt und eindeutig zu fitten.

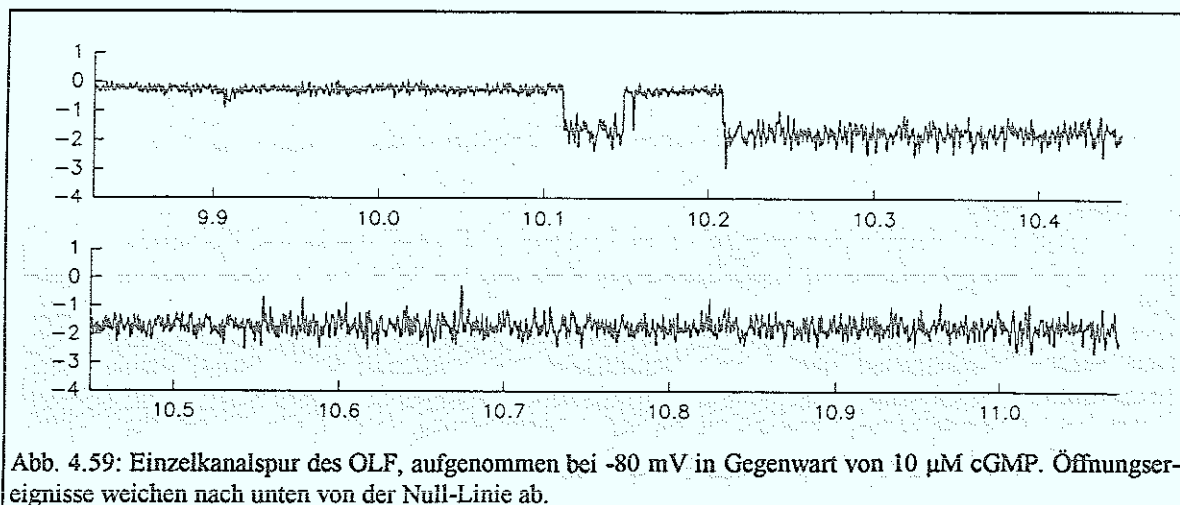


Abb. 4.59: Einzelkanalspur des OLF, aufgenommen bei -80 mV in Gegenwart von 10 μ M cGMP. Öffnungsergebnisse weichen nach unten von der Null-Linie ab.

Abb. 4.59 zeigt zum Vergleich einen Ausschnitt aus einer etwa 35 Sekunden langen Datenspur von Einwärtsströmen des OLF, aufgenommen bei -80 mV. Die Daten stammen vom gleichen Patch. Der Offenzustand des Kanals rauscht bei hyperpolarisierenden Spannungen stärker als

bei depolarisierenden Spannungen. Die Zeitkonstanten der Offen- und Geschlossenzustände ließen sich im gezeigten Beispiel nicht bestimmen, da die Spur im Vergleich zu den relativ großen Zeitkonstanten zu kurz ist und die Verteilung der Offen- bzw. Geschlossenzeiten nicht sinnvoll durch einen bzw. mehrere Exponentialterme wiedergegeben werden kann. Die Verweildauern betragen für den Geschlossenzustand bis zu 450 ms, für den Offenzustand bis zu 5 Sekunden. Abb. 4.60 und 4.61 zeigen exemplarisch die Verteilung der Offen- und Geschlossenzeiten. Die aus dem Amplitudenhistogramm berechnete Offenwahrscheinlichkeit beträgt 98 %.

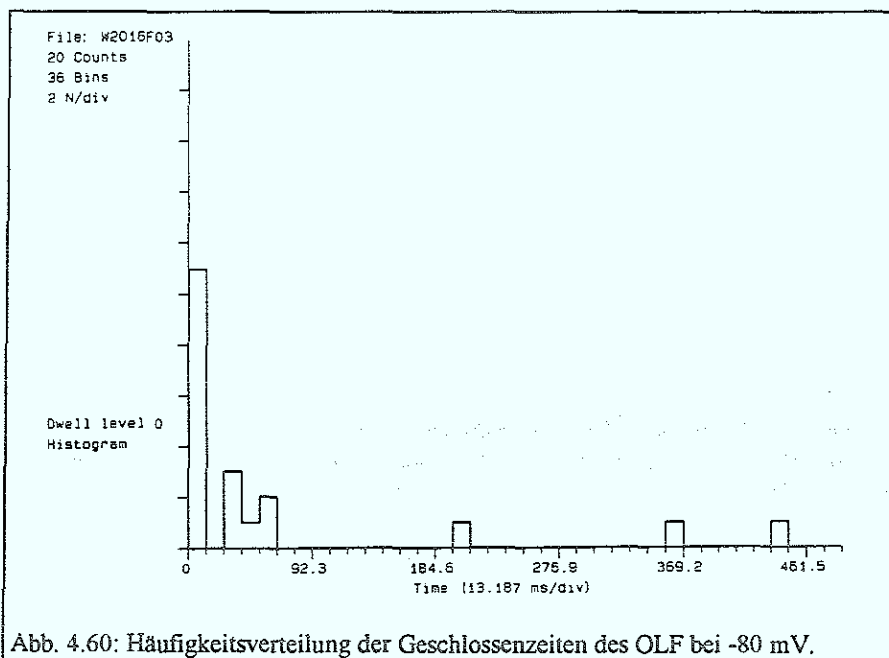


Abb. 4.60: Häufigkeitsverteilung der Geschlossenzeiten des OLF bei -80 mV.

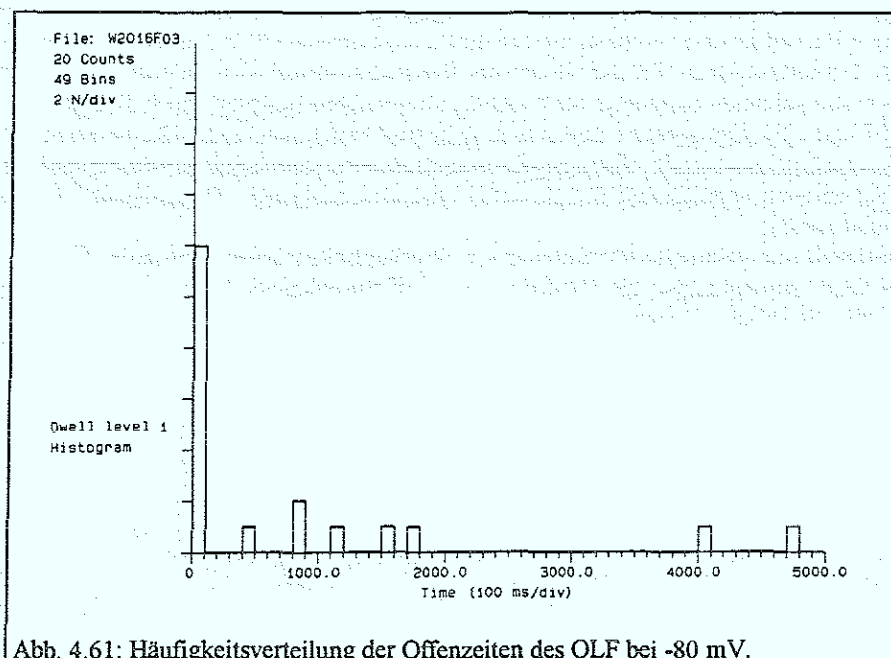
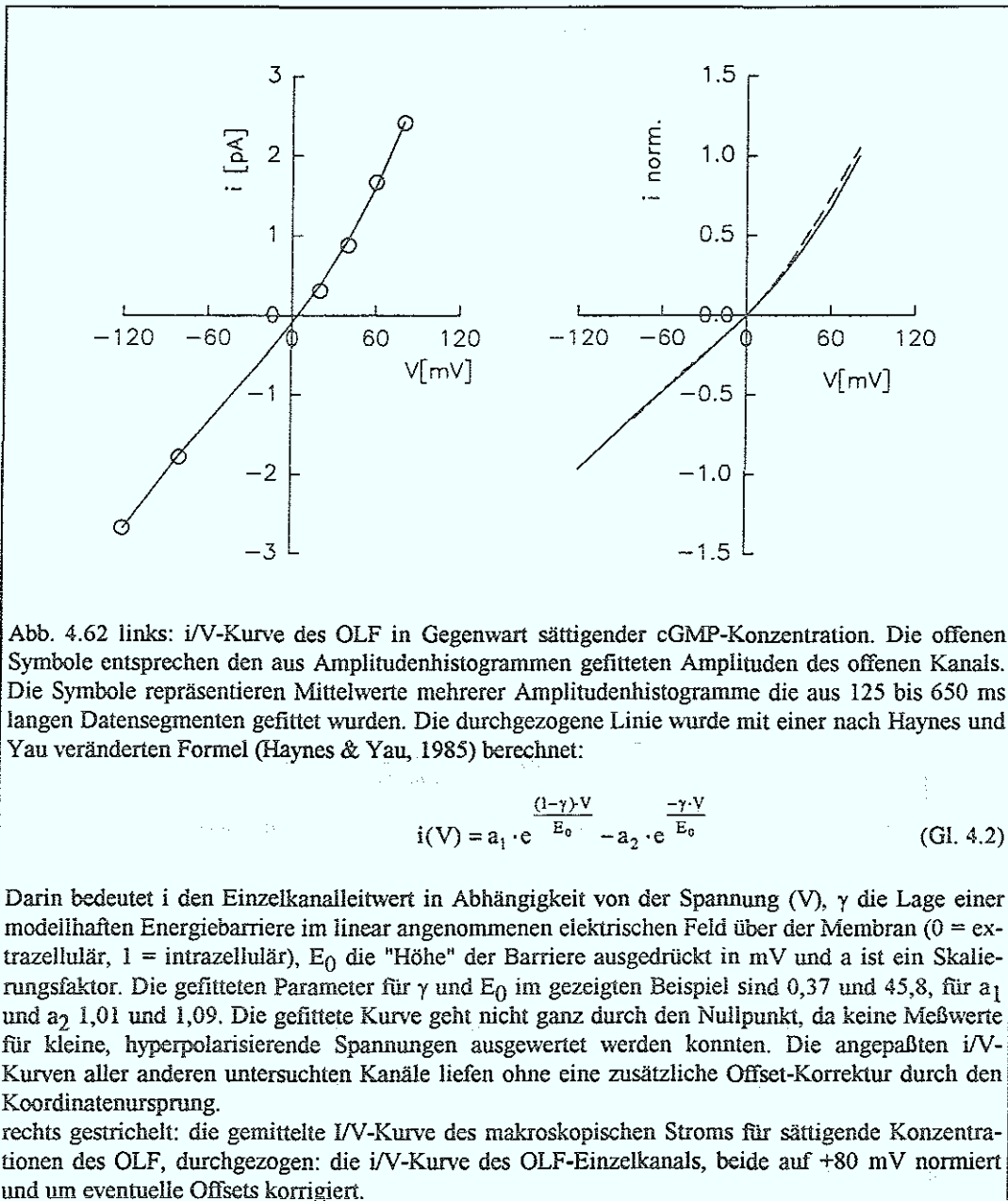


Abb. 4.61: Häufigkeitsverteilung der Offenzeiten des OLF bei -80 mV.

Die makroskopisch in Gegenwart sättigender Ligandkonzentrationen gemessenen I/V-Kurven des OLF (dargestellt als Mittelwert aller ausgewerteten Versuche am OLF) lassen sich gut mit der i/V-Kurve des OLF zur Deckung bringen (vgl. Abb. 4.62).



EINZELKANALDATEN VON CHIMÄREN, EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER LIGANDKONZENTRATIONEN AUF AMPLITUDE UND OFFENWAHRSCHEINLICHKEIT DES EINZELKANALS

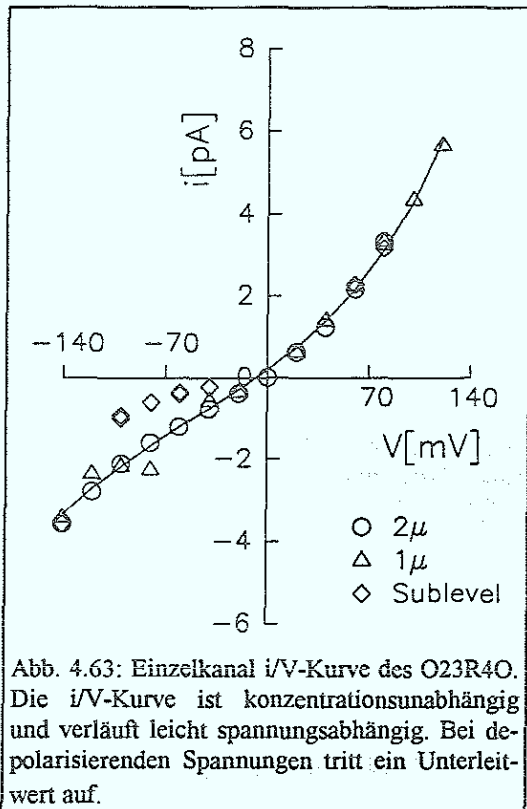


Abb. 4.63: Einzelkanal i/V -Kurve des O23R4O. Die i/V -Kurve ist konzentrationsunabhängig und verläuft leicht spannungsabhängig. Bei depolarisierenden Spannungen tritt ein Unterleitwert auf.

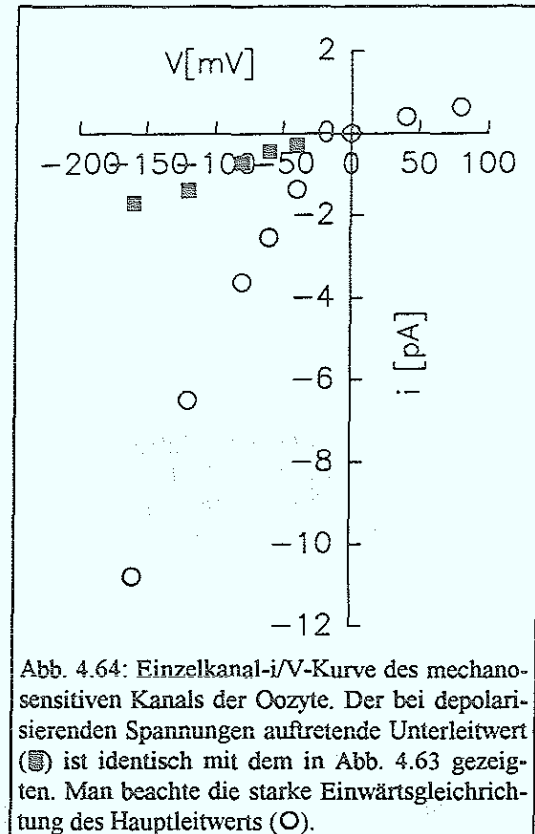


Abb. 4.64: Einzelkanal- i/V -Kurve des mechanosensitiven Kanals der Oozyte. Der bei depolarisierenden Spannungen auftretende Unterleitwert (●) ist identisch mit dem in Abb. 4.63 gezeigten. Man beachte die starke Einwärtsgleichrichtung des Hauptleitwerts (○).

Eine entsprechende Übereinstimmung zwischen den I/V -Kurven bei sättigender Ligandkonzentration und der i/V -Kurve wurde auch bei O5R, O6R und O23R4O gefunden. Zusätzlich konnte an einem Beispiel des O6R gezeigt werden, daß der Verlauf der i/V -Kurve konzentrationsunabhängig ist.

Abb. 4.63 gibt die i/V -Kurve des O23R4O wieder. Bei hyperpolarisierender Spannung wurde ein Unterleitwert von etwa 6 pS beobachtet. Dieser Unterleitwert wurde gelegentlich auch bei anderen Kanalspezies beobachtet und stammt wahrscheinlich von mechanosensitiven Kanälen der Oozyte. Abb. 4.64 zeigt als Vergleich eine an uninjizierten Oozyten gemessene i/V -Kurve des mechanosensitiven Kanals aus Oozyten. Die Datenspur wurde in der cell-attached Konfiguration an einer uninjizierten Oozyte bei einem Unterdruck von 14 cm Wassersäule aufgenommen. Die Offenwahrscheinlichkeit nahm über einen Zeitraum von 20 Minuten deutlich ab, während die Amplitude unverändert blieb. Die Amplituden der in Abb. 4.63 und 4.64 gezeigten Unterleitwerte sind identisch. Trotzdem ist das Auftreten des Unterleitwerts bemerkenswert, da nur solche Messungen ausgewertet wurden, die in Abwesenheit von cGMP keine Kanalaktivität zeigten.

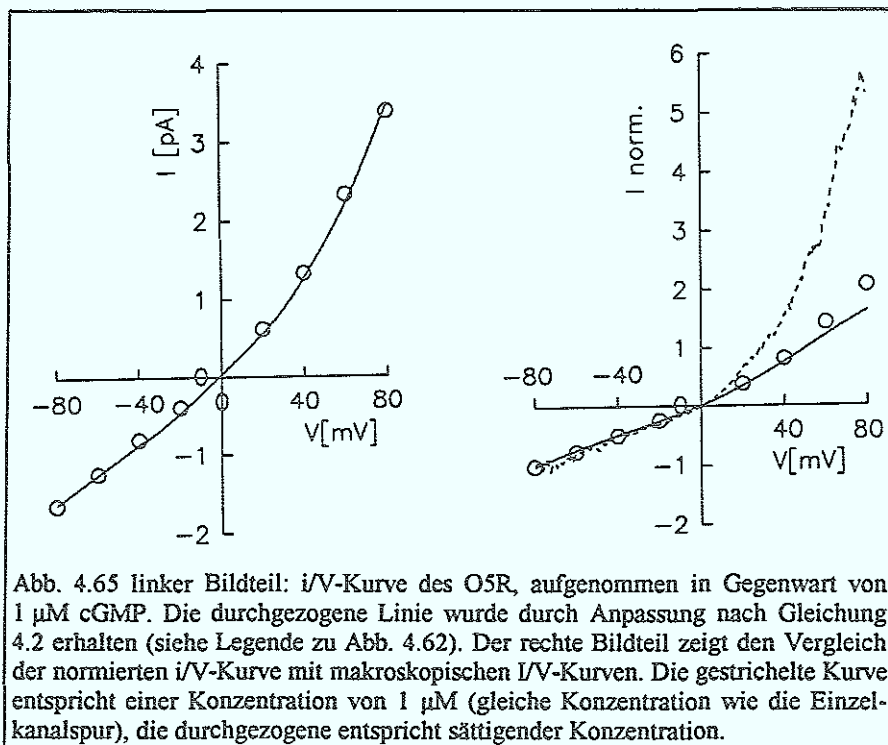


Abb. 4.65 zeigt den Vergleich von I/V - und i/V -Kurve des O5R. Die i/V -Kurve (linker Bildteil), wurde in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ cGMP aufgenommen und nach Gl. 4.2 gefittet. Im rechten Abbildungsteil ist die makroskopische- (gestrichelte Linie) und die Einzelkanal I/V -Kurve des O5R (offene Symbole), jeweils aufgenommen in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ cGMP, miteinander verglichen. Die I/V -Kurven wurden auf -80 mV normiert. Die makroskopische I/V -Kurve sättigender Konzentration ist als durchgezogene Linie dargestellt. Die i/V -Kurve kleiner Ligandkonzentration ist fast deckungsgleich mit der in Gegenwart sättigender Konzentration aufgenommenen I/V -Kurve. Die Offenwahrscheinlichkeit des Einzelkanals muß bei sättigender Konzentration wie beim OLF spannungsunabhängig sein. Die in Gegenwart gleicher Ligandkonzentration aufgenommenen I/V -Kurven des makroskopischen und des Einzelkanalstroms weichen jedoch in ihren Gleichrichtungseigenschaften deutlich voneinander ab.

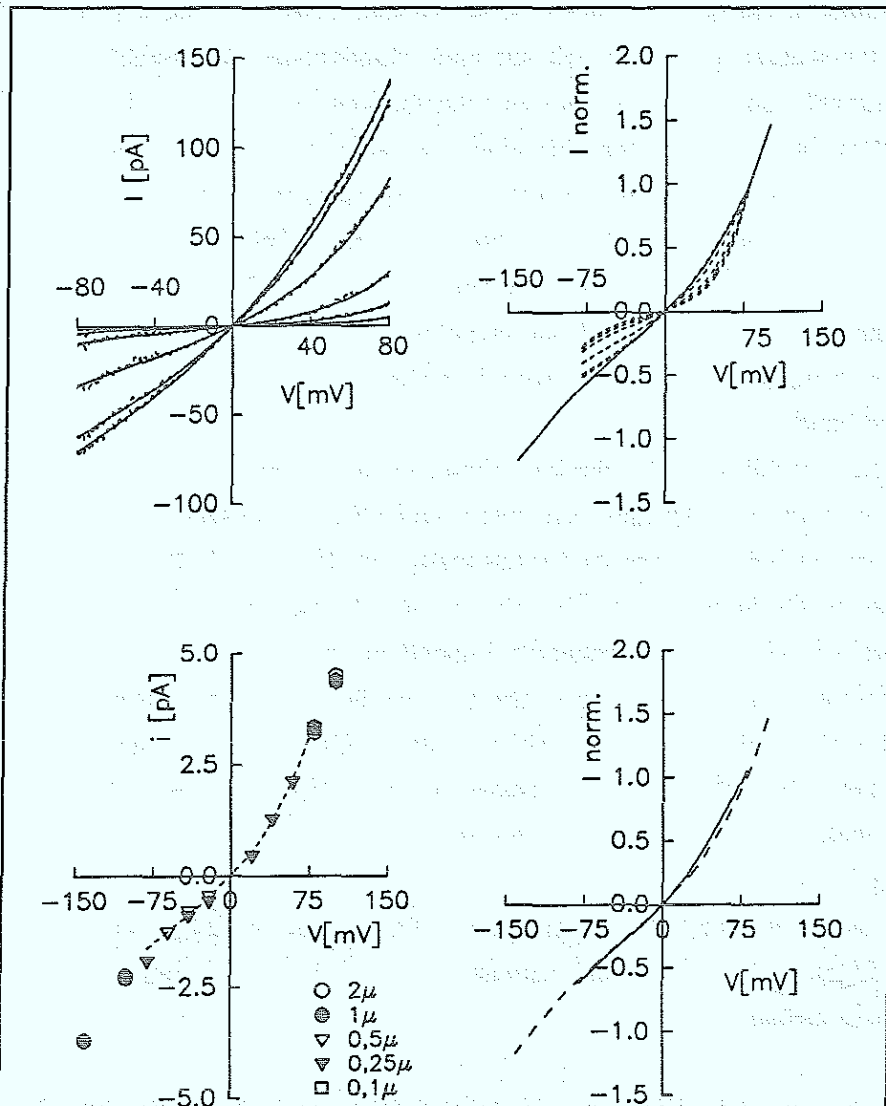


Abb. 4.66: Vergleich von Einzelkanal- und makroskopischen I/V -Kurven des O6R. Oben links ist eine Reihe makroskopischer I/V -Kurven in Gegenwart von 0,25, 0,5, 1, 2, 10 und 25 μM cGMP gezeigt. Die Meßdaten (gestrichelte Linie) wurden nach Gl. 4.2 gefittet, da die normierten I/V -Kurven (oben rechts) wegen des starken Rauschens bei kleinen Ligandkonzentrationen sonst nicht miteinander vergleichbar wären. Unten links ist die Einzelkanalkurve des O6R dargestellt, die unterschiedlichen Symbole entsprechen unterschiedlichen cGMP-Konzentrationen, die gestrichelte Linie gibt den Fit nach Gleichung 4.2 wieder. Die i/V -Kurve ist unabhängig von der Ligandkonzentration. Die untere rechte Abbildung vergleicht die gefittete i/V -Kurve (gestrichelte Linie) mit der aus allen Versuchen gemittelten makroskopischen I/V -Kurve des O6R (durchgezogene Linie). In der oberen rechten Abbildung werden die auf +80 mV normierten makroskopischen I/V -Kurven unterschiedlicher Ligandkonzentration (gestrichelte Linie) auf die gefittete i/V -Kurve (durchgezogene Linie) projiziert. Da die Einzelkanalamplitude konzentrationsunabhängig ist, geben die Abweichungen der gestrichelten Kurven von der durchgezogenen Kurve die Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit wieder. Die Veränderung ist konzentrations- und spannungsabhängig.

Abb. 4.66 zeigt am Beispiel des O6R, daß die i/V -Kurve über einen weiten Bereich unabhängig von der Ligandkonzentration ist. Die unterschiedliche Gleichrichtung der normierten makroskopischen I/V -Kurven geht demnach auf eine ligandkonzentrationsabhängige Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit zurück. Die Einzelkanaldaten stammen von einem Patch. Sie wurden über einen Zeitraum von etwa 25 Minuten aufgenommen. Ein direkter Vergleich der zeitabhängigen Veränderungen in Einzelkanalmessungen und makroskopischen Messungen ist wegen der unterschiedlichen Meßbedingungen (konstante Haltespannung im Vergleich zu Rampenprotokollen) nicht möglich. Die zeitliche Konstanz der Einzelkanalamplitude unterstützt jedoch die Hypothese, daß es sich bei den zeitlichen Veränderungen der makroskopischen Kanalantwort in erster Linie um Veränderungen der Offenwahrscheinlichkeit handelt.

Abb. 4.67 zeigt abschließend den direkten Vergleich der normierten i/V -Kurven der untersuchten OLF-verwandten Kanalspezies. Alle untersuchten Kanäle besitzen die Pore des OLF. Die in Gegenwart von cGMP gemessenen Einzelkanalspuren lassen sich über den gesamten Spannungsbereich zur Deckung bringen. Der Verlauf der i/V -Kurven läßt sich zudem mit dem Verlauf der jeweils in Gegenwart sättigender Ligandkonzentration aufgenommenen makroskopischen I/V -Kurve zur Deckung bringen. Die Ursache der deutlichen Abweichungen der in Gegenwart von cAMP aufgenommenen i/V -Kurve des R1O6R ist unklar, möglicherweise geht sie wegen der geringen Offenwahrscheinlichkeit auf unzureichende Zeitauflösung zurück. Messungen von makroskopischen I/V -Kurven des R1O6R in Gegenwart von cAMP wurden noch nicht durchgeführt.

Da sich die aus dem Hauptleitwert ermittelten Einzelkanalamplituden auf die in Gegenwart sättigender Ligandkonzentration aufgenommenen I/V -Kurven abbilden lassen, kann man folgende Schlüsse ziehen:

- Die Gleichrichtung der I/V -Kurve des OLF in Gegenwart einer sättigenden Ligandkonzentration kann auf die Gleichrichtung der Einzelkanal i/V -Kurve des Hauptleitwerts zurückgeführt werden.
- Es können im OLF Domänen rechts und links der Pore ausgetauscht werden, ohne die Einzelkanalleitwerte zu verändern.
- Die Offenwahrscheinlichkeit wird in erster Linie durch die Nukleotidkonzentration reguliert. In Gegenwart sättigender Ligandkonzentration ist sie für die hier gezeigten Kanäle spannungsunabhängig ($z_g=0$). Beim OLF beträgt sie in Gegenwart sättigender Ligandkonzentration 98 %. Die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit hängt von der Nukleotidkonzentration ab. Eine Verwendung von Gl. 4.1 zur Bestimmung der "gating charge" ist somit nicht sinnvoll.

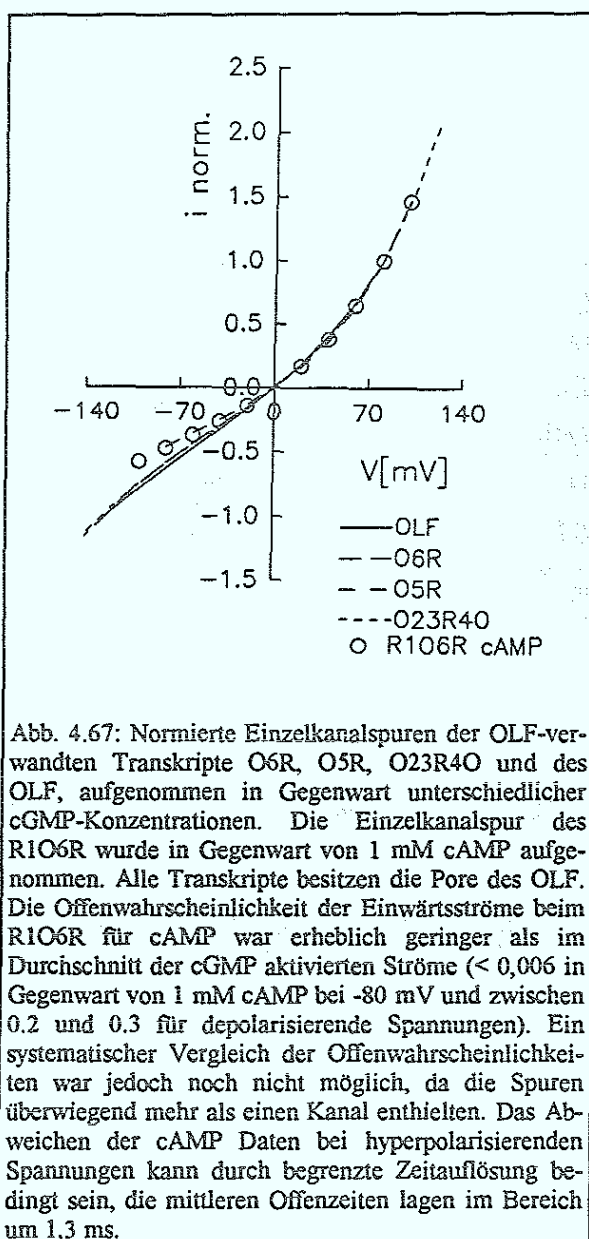


Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die Leitwerte der analysierten Kanäle. Alle Leitwerte beziehen sich auf +80 mV. Die Datenspuren waren in der Regel insgesamt zwischen 30 und 60 Sekunden lang.

Tab. 4.3:

ChCone	17,5 pS
OLF	35,88 pS
O6R	35 pS
O5R	35 pS
O23R4O	36 - 40 pS
R23O	33 pS
D1R	34,2 pS
R1O6R (cAMP)	35 pS

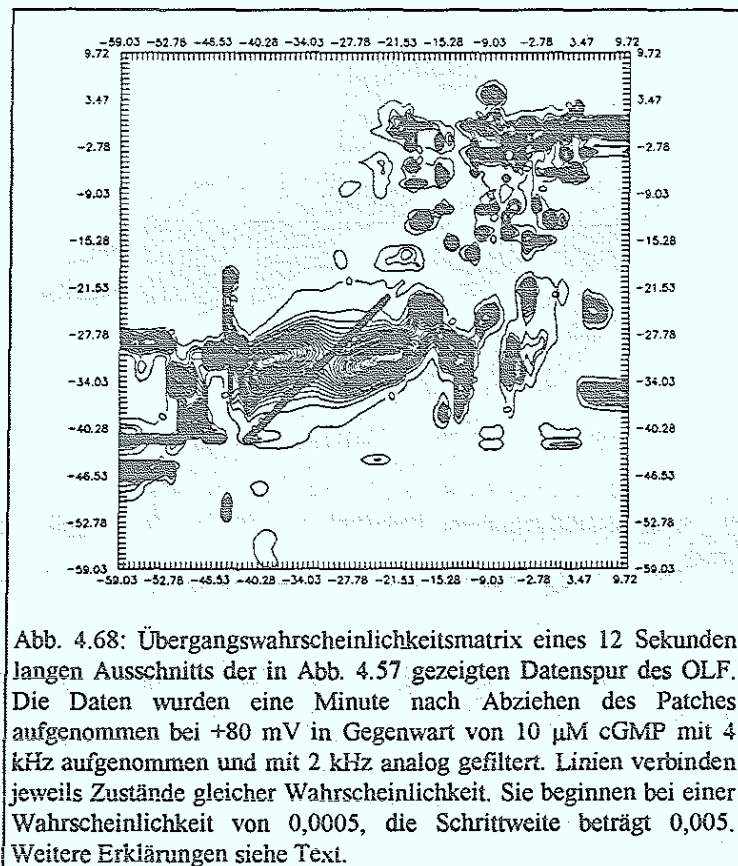
Bis auf den ChCone und den D1R besitzen die Kanalproteine die Pore des OLF. Da anzunehmen ist, daß die Amplitude des Einzelkanals in erster Linie durch die Permeationseigenschaften der Pore bestimmt wird, ist die Übereinstimmung der Leitwerte nicht überraschend. Der ROD hat in *Xenopus* Oozyten einen Leitwert von 20 bis 25 pS (Kaupp *et al.*, 1989). Die Abweichung des D1R vom ROD (die beide die Pore des ROD besitzen), würde demnach auf eine Veränderung der Permeationseigenschaften durch N-terminale Domänen schließen lassen. Eine genaue Untersuchung steht noch aus.

AUFTRETEN VON UNTERLEITWERTEN

Das Auftreten von Unterleitwerten bei CNG-Kanälen wird sowohl bei *in situ* Messungen, am rekonstituierten Kanal als auch im heterolog exprimierten Kanal beschrieben (vgl. z.B. Zimmerman & Baylor, 1986; Hanke *et al.*, 1988; Kaupp *et al.*, 1989; Ildefonse & Bennett, 1991). Einige Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Unterleitwerten und unterschiedlichen Ligandierungszuständen des Kanals.

Die im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten Daten deuten darauf hin, daß das Auftreten von Unterleitwerten beim heterolog exprimierten CNG-Kanal hauptsächlich eine Funktion der Zeit ist. Zusammen mit den anderen beobachteten zeitlichen Änderungen der makroskopischen I/V-Kurven wären Unterleitwerte dann als zumindest teilweise "pathologische" Anzeichen des Verlusts "nativer" Eigenschaften zu deuten.

Abb. 4.68 zeigt eine aus Daten des in Abb. 4.57 gezeigten Versuchs des OLF berechnete Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix. Die Matrix geht von 100 möglichen Zuständen aus. Die



Spalten addieren sich zu eins und geben die Wahrscheinlichkeit des Übergangs aus Zustand x in Zustand y wieder, die Zustände werden durch ihre Leitfähigkeit (in pS) bezeichnet. Um physiologischer Konvention zu genügen, müssen die Angaben der Achsenskalierung mit Minus eins multipliziert werden. Die von unten links nach oben rechts verlaufende Diagonale gibt die

Wahrscheinlichkeit des Verbleibens in einem Zustand an (Übergang von Zustand x in Zustand x). Der Geschlossenzustand liegt beim gezeigten Beispiel in der oberen rechten Ecke um 0 pS, der Offenzustand zwischen 21 und 40 pS. Man erkennt eine Reihe definierter Übergänge im Bereich des Geschlossenzustands (oben rechts). Die Streuung von Ereignissen um den Geschlossenzustand ist im Einklang mit der Beobachtung nicht vollständig schließender Schaltevents in Abb. 4.57. Der Offenzustand (bei etwa 30 pS) ist homogen, die beiden Flächen rechts und links der Diagonalen geben die statistische Verteilung des Rauschens wieder. Es gibt keine definierten Übergänge in Richtung der Spalten. Der Übergang aus dem geschlossenen in den offenen Zustand ist zeitlich nicht aufgelöst.

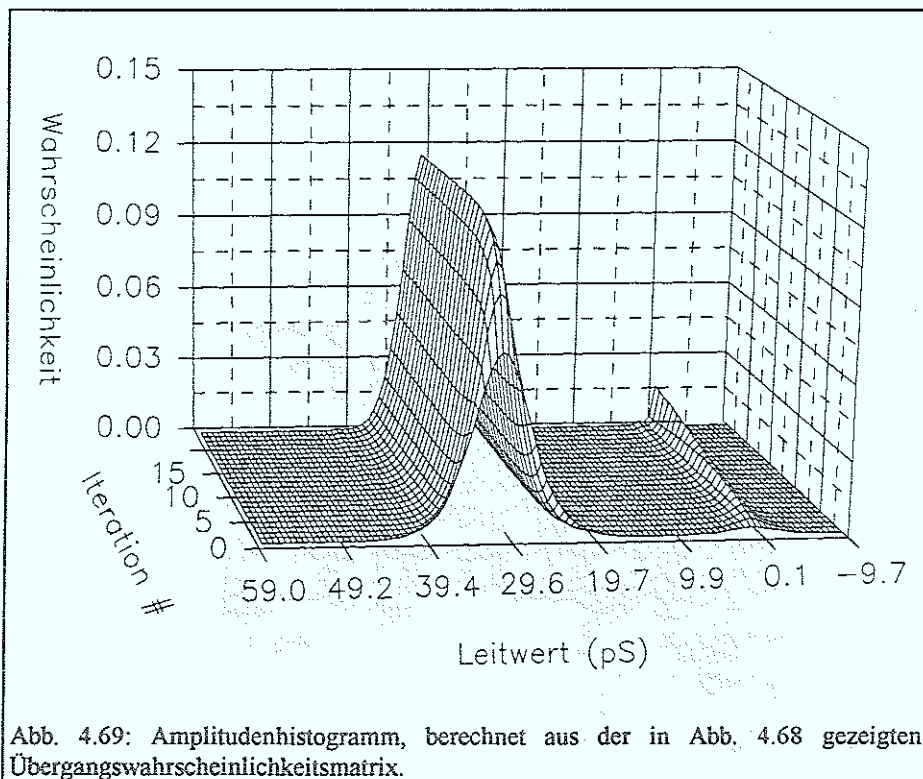


Abb. 4.71 zeigt das aus der Matrix berechnete Amplitudenhistogramm. Es unterscheidet sich nicht von dem in Abb. 4.58 gezeigten. Aufgetragen ist die Wahrscheinlichkeit des Zustands gegen den Leitwert und die Anzahl der Iterationen zur Optimierung der Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix.

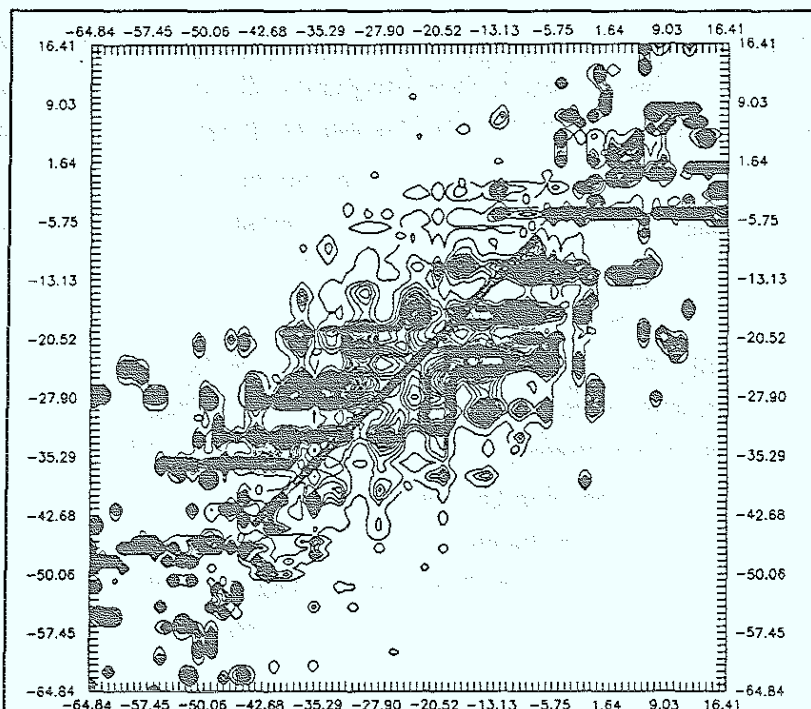


Abb. 4.70: Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix eines 12 Sekunden langen Ausschnitts einer Datenspur, die 13 Minuten später am gleichen Patch wie die in Abb. 4.57 gezeigten Daten aufgenommen wurden.

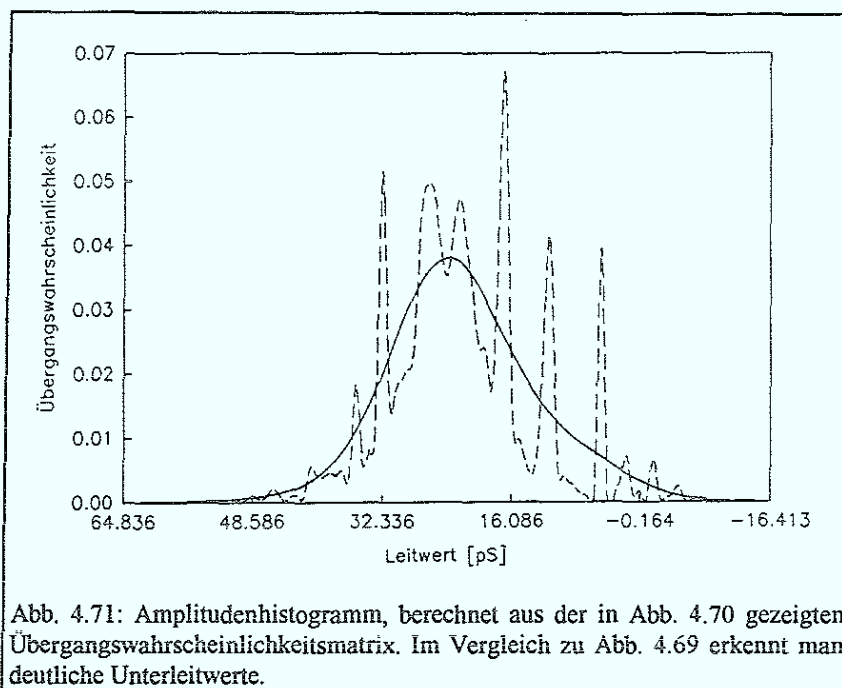


Abb. 4.71: Amplitudenhistogramm, berechnet aus der in Abb. 4.70 gezeigten Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix. Im Vergleich zu Abb. 4.69 erkennt man deutliche Unterleitwerte.

Abb. 4.70 zeigt die Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix der vom selben Patch unter identischen Bedingungen 13 Minuten später aufgenommenen Datenspur. Der Geschlossen-

kann nicht mehr eindeutig identifiziert werden, die Angaben der Leitwerte sind daher nicht direkt mit denen in Abb. 4.68 vergleichbar. Im Vergleich zum Versuchsbeginn ist der Offenzustand jetzt deutlich in Unterleitwerte aufgesplittert, sie liegen etwa 5 pS auseinander.

Abb. 4.71 zeigt das zugehörige Amplitudenhistogramm, die durchgezogene Linie gibt das Histogramm des ersten, die gestrichelte Linie das des 38. Iterationsschrittes wieder. Das Histogramm der durchgezogenen Linie entspricht dem, das man nach herkömmlicher Auswertungsmethode mit pClamp bei einer Filterrate von 2 kHz erhalten würde. Im Vergleich zu Abb. 4.69 hat die Anzahl der Unterleitwerte deutlich zugenommen, die Zuordnung des Geschlossenzustands ist nicht möglich.

Die analysierten Datenspuren waren in beiden Fällen gleich lang (12 Sekunden). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß Unterleitwerte mit entsprechend geringer Wahrscheinlichkeit auch zu Beginn eines Experiments auftreten. Die wesentliche Aussage dieses Vergleichs liegt in der relativen Zunahme des Auftretens von Unterleitwerten mit der Zeit. Der zeitliche Verlauf der Zunahme variiert stark von Patch zu Patch.

Es bleibt zu testen, ob sich aus dem Auftreten von 6 Unterleitwerten im gezeigten Beispiel strukturelle Deutungen (wie z.B. die Anzahl unabhängig voneinander schaltender Untereinheiten) ableiten lassen.

4.10 SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGE FÜR CNG-KANÄLE

"A good model, like good wine, should improve with age" (Guy & Hucho, 1987)

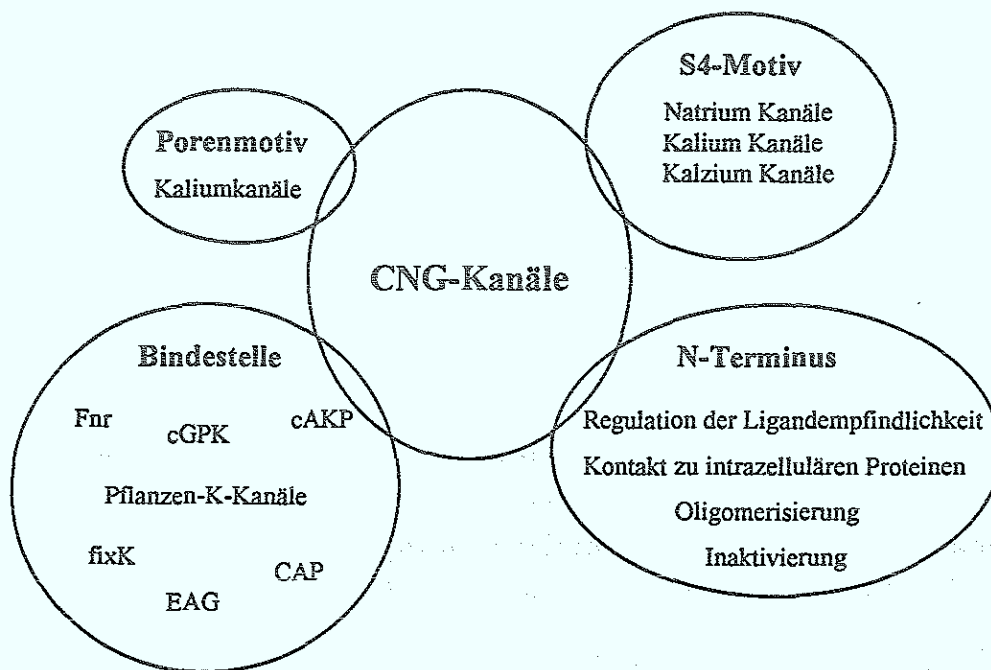


Abb. 4.72

CNG-Kanäle zeigen strukturelle Verwandtschaft zu einer Reihe funktionell unterschiedlicher Proteine (vgl. Abb. 4.72). Die Pore der CNG-Kanäle besitzt Sequenzähnlichkeit zu Kaliumkanälen, das S4-Motiv in CNG-Kanälen ist verwandt mit dem S4-Motiv aus spannungsabhängigen Kanälen (Jan & Jan, 1990), und die Bindestelle von CNG-Kanälen zeigt Ähnlichkeit zu Sequenzmotiven in zyklisch-Nukleotid abhängigen Proteinkinasen (Weber *et al.*, 1982; Weber *et al.*, 1989), in Kaliumkanälen (Guy *et al.*, 1991; Sentenac *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1992), in genregulatorischen Proteinen aus *E. coli* (Kaupp *et al.*, 1989; Altenhofen *et al.*, 1991; Batut *et al.*, 1989) und einem genregulatorischen Protein aus dem Steinklee (Shaw *et al.*, 1983).

Die in Abs. 4.5 vorgestellten Ergebnisse weisen ferner darauf hin, daß der N-Terminus der CNG-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Ligandempfindlichkeit spielt. Für den N-Terminus der cGPK wurde eine vergleichbare Funktion gefunden (Ruth *et al.*, 1991). Der N-Terminus der cGPK (Aminosäuren 1-39) hat eine leuzinzipperähnliche, α -helikale Struktur (Landgraf *et al.*, 1990; Atkinson *et al.*, 1991) und ist wie der N-Terminus der Kaliumkanäle (Li *et al.*, 1992) für die Oligomerisierung von Untereinheiten verantwortlich. In cAPK wird die Dimerisierung über den N-Terminus teilweise durch S-S Brücken stabilisiert (Zick & Taylor,

1982). Außerdem wurde gezeigt, daß der N-Terminus der cAPK für Kontakte zum Zytoskelett verantwortlich ist (Luo *et al.*, 1990).

Um Hinweise auf mögliche strukturelle Gemeinsamkeiten zu erhalten, wurden Sekundärstrukturvorhersagen für die Gruppe der Kaliumkanäle (34 Sequenzen), der cAPK (katalytische Untereinheit: 20 Sequenzen, regulatorische Untereinheit: 23 Sequenzen) sowie der cGPK (5 Sequenzen) berechnet und mit den für CNG-Kanäle erhaltenen verglichen. Es wurde die Hydrophobie, der amphipathische und der α -helikale Charakter untersucht (s. Abs. 3.9).

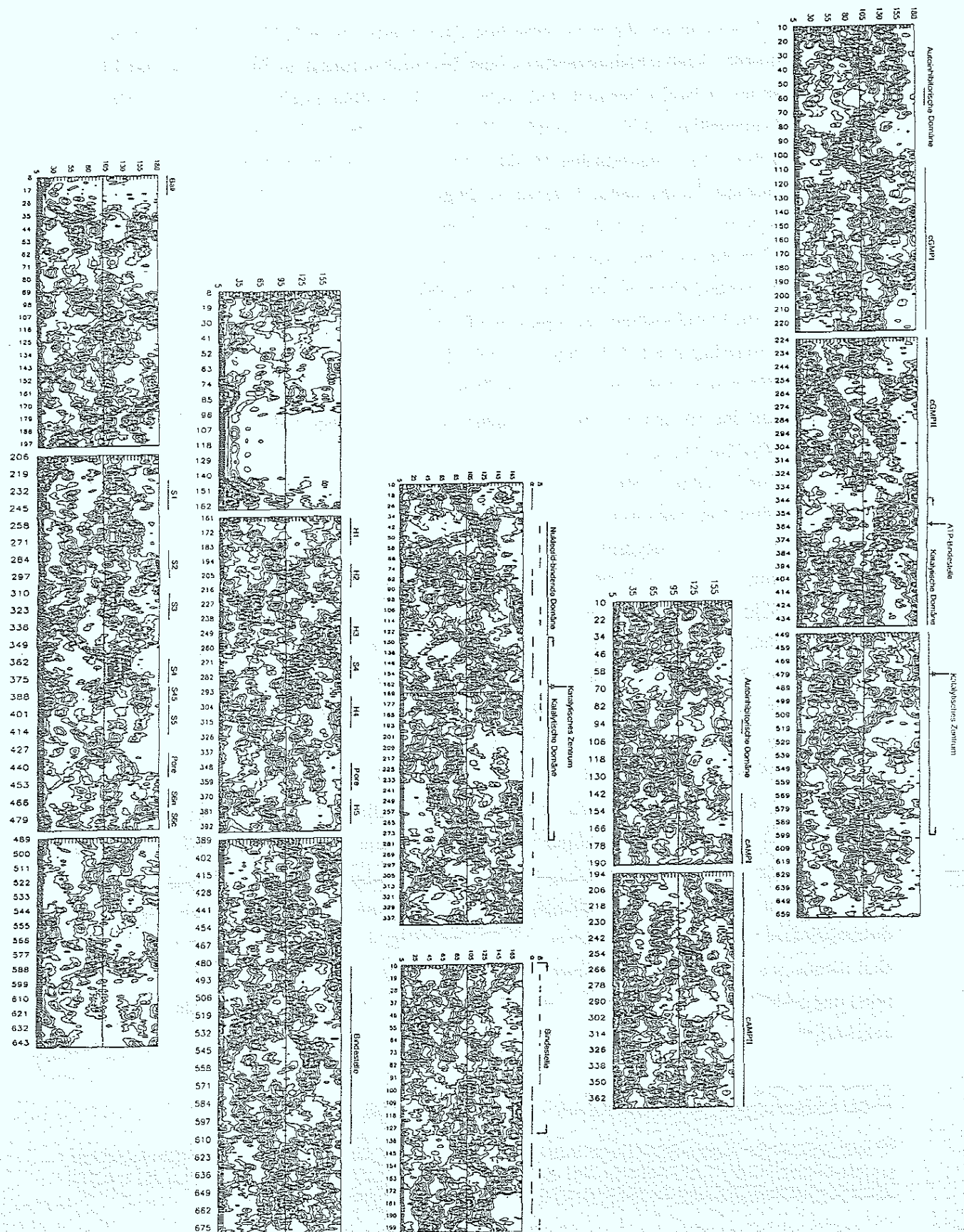
Abb. 4.73 zeigt exemplarisch den Vergleich der amphipathischen Plots jeweils eines Vertreters der genannten Proteinfamilien: Erste Bildreihe: cGPK (Takio *et al.*, 1984; Hofmann *et al.*, 1992), zweite Bildreihe: cAPK (regulatorische Domäne, Titani *et al.*, 1984; Weber *et al.*, 1982), dritte Bildreihe links: cAPK (katalytische Domäne, Uhler *et al.*, 1986; Knighton *et al.*, 1991b), dritte Bildreihe rechts: CAP (Weber & Steitz, 1987), vierte Bildreihe: ROD (Kaupp *et al.*, 1989), fünfte Bildreihe: Kaliumkanal (Tempel *et al.*, 1987; Pongs *et al.*, 1988; Durell & Guy, 1992). Die Tertiärstruktur der in der dritten Bildreihe gezeigten Proteine (der katalytischen Untereinheit der cAPK aus der Maus und das CAP aus *E. coli*) ist bekannt. Die in der Röntgenstruktur gefundenen Sekundärstrukturen sind als zusätzliche Balken am oberen Rand der dritten Bildreihe eingetragen (α -Helices in der unteren Reihe, β -Faltblätter in der oberen Reihe).

Die Abszisse gibt die Sequenzposition wieder, die Ordinate die Vorhersagewerte (angegeben als Vorhersagewinkel " δ ", s. Gl. 3.3). Der in Abb. 4.74 dargestellte α -helikale Wert ($\delta=100$) ist jeweils durch einen horizontalen Strich hervorgehoben. Die Maßstäbe wurden normiert, so daß sowohl die Intensität der Signale als auch die Flächen direkt vergleichbar sind. Um den optischen Eindruck nicht zu verzerren, wurden Lücken, die sich aus dem Sequenzalignment ergeben hätten, nicht berücksichtigt. Statt dessen wurden, soweit möglich, jene Domänen übereinander abgebildet, die direkt miteinander verglichen werden.

Aus den Vorhersagen der β -Faltblattstruktur der Bindestelle ergaben sich im Vergleich zur Röntgenstruktur des CAP keine zusätzlich verwertbaren Informationen. Der Schwerpunkt der Vorhersage wurde daher auf (transmembranale) α -Helices gelegt, und für alle untersuchten Proteine einheitlich jeweils Mittelwerte wandernder Fenster über 19 Aminosäuren berechnet.

Das Alignment der katalytischen Untereinheit der Kinase mit dem CNG-Kanal ist mehrdeutig. Sie wurde trotz der fraglichen Homologie (s. S. 139) in die Analyse einbezogen, da die Aktivierung der katalytischen Untereinheit der Kinasen durch die regulatorischen Untereinheiten möglicherweise ähnlich abläuft wie die Aktivierung der CNG-Kanäle durch die Nukleotid-Bindestelle.

Abb. 4.73: Bipolar amphipathische Analyse, Erläuterung siehe Text.



HOMOLOGIEMODELL DER NUKLEOTID BINDESTELLE VON CNG-KANÄLEN

Während die Aminosäuren, die in anderen ligandgesteuerten Ionenkanälen (z.B. γ -Aminobuttersäurerezeptoren, Azetylcholinrezeptoren oder Glyzinrezeptoren) an der Bindung des Liganden mitwirken nur teilweise bekannt sind, konnte die Ligandbindestelle von CNG-Kanälen auf Grund der Sequenzähnlichkeit zur Bindestelle des CAP identifiziert werden (Kaupp *et al.* 1989), die in ihrer dreidimensionalen Struktur bekannt ist (Weber & Steitz, 1987, vgl. Abb. D10). CNG-Kanäle haben dadurch einen wichtigen Vorsprung bei der Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen des Aktivierungsmechanismus. Anhand der in Abschnitt 4.4 dargestellten Ergebnisse kann angenommen werden, daß die dreidimensionale Struktur der Bindestelle im wesentlichen mit der des CAP übereinstimmt (Altenhofen *et al.*, 1991). Bis auf eine Deletion von 3 Aminosäuren zwischen den β -Faltblättern 4 und 5 und eine Insertion von 5 Aminosäuren zwischen den β -Faltblättern 6 und 7 lassen sich die für die Bindung des Liganden im CAP wichtigen Aminosäuren und die jeweils in den turns zwischen den β -Faltblättern lokalisierten Glyzine im Sequenzalignment mit denen der CNG-Bindestelle zur Deckung bringen (Abb. D11): Die Glyzine zwischen den β -Faltblättern 2 und 3 (vgl. Position 508⁴⁵), 3 und 4 (Pos. 520), 4 und 5 (Pos. 529), 5 und 6 (Pos. 539), 6 und 7 (Pos. 543, 556) sind konserviert. Auch die mit dem Liganden wechselwirkenden Aminosäuren sind konserviert. G543 und E544 wechselwirken mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose, R559 bildet das Gegenion zum negativ geladenen Sauerstoff des cGMP-Phosphatrests und T560 wechselwirkt mit der 2-Aminogruppe des cGMP. Die Aminosäuresequenz der Bindestellenregion des ROD (Pos. 484-610) ist zu 17 % identisch mit den Aminosäuren T10 bis N133 des CAP. Die Identität mit den Bindestellen der cGPK beträgt 21 % für die erste und 24 % für die zweite Bindestelle. Sowohl in der cGPK- als auch in der cAPK-Familie zeigen die zweiten Bindestellen eine höhere Verwandtschaft zur Bindestelle des CAP als die ersten.

Das Sequenzalignment der CAP Bindestelle mit der Bindestelle des CNG-Kanals ist eindeutig (vgl. S. 131), die bipolaren Vorhersagemuster des CAP stimmen wie erwartet jedoch nur in den helikalen Bereichen mit der gefundenen Röntgenstruktur überein, da die β -Faltblätter für die gewählte Fensterlänge zu kurz sind. Selbst bei kürzerer Fensterlänge werden sie mit dieser Methode nur unzuverlässig vorhergesagt, da sie nicht sehr ausgeprägt amphipatisch sind (vgl. dazu auch Diskussion). Die "Muster" der Vorhersagewerte der β -Faltblattstruktur in Abb. 4.73 sind demnach im Vergleich zu den beiden Kinasen (cGMP I und cGMP II in der oberen Bildreihe und cAMP I und cAMP II in der zweiten Bildreihe) mit CAP und ROD nicht sehr aussagekräftig⁴⁶.

⁴⁵ Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf das Alignment auf Seite 131.

⁴⁶ Die cAPK in der zweiten Reihe wurde so angeordnet, daß cAMP II, die zweite cAMP-Bindestelle der Kinase mit der Bindestelle des CAP überlappt. Die cGPK in der ersten Bildreihe ist so angeordnet, daß die katalytischen Zentren der cGPK und der cAPK in der dritten Bildreihe überlappen.

Das Signal der N-terminalen Helix A (Pos. 9-18 in Abb. 4.73) im CAP ist schwach, da der Algorithmus wegen der Mittelwertbildung über 19 Aminosäuren erst etwa bei Aminosäure 10 stabil wird. Die Signale der Helices B und C (Pos. 99-133) sowie der außerhalb der Bindestelle liegenden Helices D (Pos. 140-151), E (Pos. 168-176) und F (Pos. 180-191), sind dagegen deutlich. In der Bindestelle des ROD geben die der Helix B und C entsprechenden Sequenzbereiche schwache Signale. Auch die Signale der entsprechenden Bereiche der Kinase-Bindestellen sind stärker ausgeprägt als beim ROD (Position 254-270 in cAMP I, 354-368 in cAMP II, 210-230 in cGMP I, 314-343 in cGMP II). Da der α -helikale Vorhersagewert aus PRONET ein deutliches Signal im Bereich der C-Helix zeigt (vgl. Abb. 4.74), besteht an ihrer Existenz jedoch wenig Zweifel. Daß sie schwächeren bipolaren Charakter aufweist, kann auf unterschiedliche Umgebung oder auf unterschiedliche Oligomerisierungsmechanismen der einzelnen Untereinheiten hinweisen.

Die Kinase-Bindestellen sind jeweils als Dimere auf einem Gen kodiert. Das CAP liegt im Kristall auch als Dimer vor, die Hauptkontakte zwischen den beiden Monomeren werden über die Helix C gebildet. Wenn die CNG-Kanalpore jedoch aus einer ungeraden Anzahl von Untereinheiten gebildet wird, ist anzunehmen, daß sich auch die Bedeutung der Helix C ändert.

Im Bereich der Helices D, E und F zeigt sich deutliche Ähnlichkeit zwischen den amphipathischen Signalen von ROD und CAP. Die Bereiche sind im CAP und im ROD bis auf wenige Aminosäuren gleich lang (vgl. Abb. 4.73). Die Ähnlichkeit überrascht funktionell (der Bereich dient im CAP zur Anbindung an die DNA) und strukturell (eine Sequenzähnlichkeit in diesem Bereich ist bislang nicht beschrieben). Im CAP bilden α E und α F einen Anker, der die Kontakte zur DNA herstellt. Fast alle Aminosäuren, die im CAP mit der DNA interagieren, liegen im Bereich von α E und α F (Schultz *et al.*, 1991).

SEQUENZVERGLEICH DES C-TERMINUS VOM ROD MIT DEM CAP

	447		496
ROD	DEREVLKYLDPDKLRAEIAINVHLDTLKKVRI	FADCEAGLLVELVLKLOPO	
CAP		MVLGKPQTDPTLEWFLSHCHIH	21
		*****	---
		α A	β 1
	497		543
ROD	VYSPGDYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADD...	GITQFVVLSDGSYFG	
CAP	KYPSKSTLIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLKDEEGKEMILSYLNQGDFIG		71
	22		---
	β 2	β 3	β 4
		β 5	β 6

	544					593
ROD	EISILNIKSKAGNRRTANIKSIGYSDLFCLSKDDLMEALTEYPDAGML					
CAP	ELGLFEE.....GQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDIIMRL					
	72					116
		-----	-----	*****	*****	
		$\beta 7$	$\beta 8$	αB	αC	
	594					643
ROD	EEKGKQIILMKDGLLDINIANAGSDPKDLEEKVTRMESSVDLLQTRFARIL					
CAP	SAQMARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIK					
	117					166
	*****	*****		---	---	
	αC	αD	$\beta 9$	$\beta 10$		
	644					690
ROD	AEYESMQQKLKORLTKVEFLKPLIDTEFSAIEGSGTESGPTDSTQD					
CAP	ITRQEIGQIVGCSRETIVGRILKMLEDONLISAHGKTIVVYGR					
	167					209
	*****	*****	-----	-----		
	αE	αF	$\beta 11$	$\beta 12$		

Konservierte Aminosäurepositionen sind fett gedruckt, die Sekundärstrukturen des CAP sind eingezeichnet, "*" geben α -Helices, "-" β -Faltblätter wieder. Der Punkt markiert die Position des in Abs. 4.4 beschriebenen T/A-Austauschs.

Der Sequenzvergleich zwischen CAP und ROD bestätigt, daß es neben den beschriebenen konservierten Bereichen im Abschnitt zwischen $\beta 1$ und $\beta 4$ sowie um die direkt an der Nukleotidbindung beteiligten Aminosäuren in $\beta 7$ einen dritten relativ gut konservierten Bereich um αE und αF gibt. Der Bereich um die Helices B und C ist dagegen kaum konserviert. Der Befund überrascht, da die Röntgenstruktur des CAP suggeriert, daß die wichtigsten Kontakte zur Weitergabe der Konformationsänderung im Bereich der Helix C liegen. Ferner bestehen wichtige Kontakte zwischen Ligand und Helix (Position T127 und S128 wechselwirken mit der Aminogruppe der Base) sowie zwischen Helix und anderen, die Bindung des Liganden stabilisierenden Aminosäuren (E71 wechselwirkt mit der 2'-Hydroxylgruppe des Liganden und mit R123 in der αC). Im ROD ist die dem E71 vergleichbare Position ebenfalls durch eine Glutaminsäure besetzt (E544, s. Abb. 4.22). Das 1992 von I. Weber veröffentlichte Computermodell der CNG-Kanal Bindestelle (Kumar & Weber, 1992) des ROD bietet jedoch keinen Hinweis auf einen R123 im CAP entsprechenden Wechselwirkungspartner für E544. Nach den von Kumar & Weber veröffentlichten Modellen, ist die Bedeutung der Helix C ausgehend vom CAP über die cGPK zu den CNG-Kanälen immer weniger plausibel: Im Modell der cGPK Bindestelle wird eine fragwürdige Interaktion von E167 mit F214 (beide Zahlen beziehen sich auf die cGPK Bindestelle) vorgeschlagen und im Modell der CNG-Kanal Bindestelle fehlt die Gegenladung ganz.

Da sich auch aus dem in Abb. D10ff gezeigten Modell keine zufriedenstellende Aufklärung möglicher Wechselwirkungen zwischen Helix C und Ligand bzw. anderen Bereichen der Bin-

detasche ergab, wurde die Bedeutung der Helix C experimentell getestet, indem Deletionsmutanten mit C-terminal verkürzter Helix C exprimiert wurden: Die Bindestelle bleibt funktionell, solange die C-Helix in voller Länge vorhanden ist. Die Bindestelle verliert die Fähigkeit zur Aktivierung des Kanals, sobald die Helix C verkürzt wird (D. Henn, W.A., U.B.K., Daten nicht gezeigt). Wenn es tatsächlich keine Wechselwirkungen der Helix geben sollte, die zur Bindung des Liganden beitragen, ist die einzig mögliche Erklärung des Funktionsverlusts der C-terminal deletierten Mutanten, daß die Helix C eine wichtige Rolle bei der Weitergabe der Konformationsänderung nach Anbinden des Liganden spielt.

In einem zweiten, unabhängig entwickelten Modell der Bindestelle war es jedoch möglich, eine Funktion der C-Helix in der Beteiligung an Ligand-bindenden Wechselwirkungen zu erklären. K596 des ROD (Position 714 in Anhang B) ist zur Wechselwirkung mit E544 fähig (W.A., R.H. Guy, Daten nicht gezeigt). Es entfällt damit die Notwendigkeit, eine Rolle der αC in der Informationsübertragung zu suchen.

Statt dessen scheint es wahrscheinlicher, daß das erste Cluster konservierter Aminosäuren um $\beta 1$ bis $\beta 4$ eine Rolle bei der Informationsweitergabe spielt. Ein Vergleich von ca. 70 verfügbaren, homologen Bindestellensequenzen gibt Hinweise, daß der erste Bereich konservierter Aminosäuren ($\beta 1$ bis $\beta 4$) auch in solchen Bindestellen gut konserviert ist, bei denen keine Affinität zu zyklischen Nukleotiden nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da der C-terminale Teil hinter αC ohne Funktionsverlust abgeschnitten werden kann, scheidet die dritte konservierte Region für diese Funktion aus. Außerdem endet die zweite Bindestelle der regulatorischen Untereinheit der cAPK ebenfalls unmittelbar hinter αC . Für diese Hypothese spricht, daß der Sequenzbereich im Gegensatz zur Helix C in der dreidimensionalen Struktur nahe an der Bindetasche des cGMP-Phosphatrests liegt. Es kann angenommen werden, daß die Konformationsänderung im Zusammenhang mit der Bindung des Phosphatrests den größten Energiebeitrag zur Konformationsumwandlung liefert. Ferner ist durch Moleküldynamiksimulation gezeigt, daß die Beweglichkeit der Bindestelle im Bereich der Faltblätter am größten ist (Wittenberg, 1993), so daß die Weitergabe der Information dort am leichtesten gewährleistet werden könnte. In direkter Nähe dieser Bindetasche liegt ein Bereich geladener Aminosäuren, der sich über mehrere Faltblätter erstreckt (s. blau markierte Aminosäuren in Abb. D15). Eine dieser geladenen Aminosäuren, K506 des ROD (Position 624 in Anhang. B), ist spezifisch in cGMP-Bindestellen der CNG-Kanäle und der cGPK konserviert. In 27 von 27 untersuchten cGMP-Bindestellen ist diese Position durch eine positiv geladene Aminosäure besetzt, in 36 von 41 cAMP-Bindestellen sitzt an dieser Position eine negative oder ungeladene Aminosäure. Im Homologiemodell der Bindestelle weist diese Seitenkette zur Außenseite der Bindetasche. Wegen des hohen Grads der Konservierung erscheint es unwahrscheinlich, daß dieser Bereich der Bindetasche zytoplasmatisch lokalisiert ist. Bisher wurde versucht, den Unterschied der Aktivierbarkeit durch cGMP und cAMP durch direkte und spezifische Wechselwirkungen mit dem Liganden zu erklären. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß auch Aminosäuren, die an

der Weiterleitung der Information beteiligt sind, zur unterschiedlichen Aktivierbarkeit beitragen und daher konserviert sind.

STRUTURVORHERSAGE DES TRANSMEMBRANALEN BEREICHS

Der transmembranale Bereich des ROD ist in Abb. 4.73 mit dem transmembranalen Bereich eines Shaker Kaliumkanals verglichen. Der Vergleich beruht auf dem Hinweis von Jan *et al.* (Jan & Jan, 1990), daß es Sequenzhomologien zwischen CNG-Kanälen und Kaliumkanälen gibt. Nachdem bei Kaliumkanälen der Sequenzbereich identifiziert werden konnte, der die Pore bildet, wurden Alignments gefunden, die auch den porenbildenden Sequenzbereich in CNG-Kanälen vorhersagen konnten. Das Alignment auf Seite 134 zeigt einen Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich 47 verwandter Kalium- und CNG-Kanäle. "Shakb" entspricht der in Abb. 4.73 zu Grunde gelegten Sequenz. Die mit einem Punkt bezeichneten Aminosäuren sind in mindestens 44 der 47 Sequenzen identisch.

Während es N-terminal von H3 und C-terminal von H5 keine relevanten Übereinstimmungen gibt, findet man im Bereich von H3, S4, der Pore und H5 spezifisch konservierte Aminosäuren, die möglicherweise den Schlüssel zum Verständnis der Spannungsabhängigkeit der CNG-Kanäle liefern. Das Alignment ist im Bereich von H4 bzw. S5 nicht eindeutig.

Sequenzalignment eines Shaker-Kaliumkanals mit dem ROD

		H3 252

		.
ROD		KLIDKYKSTFQFKLDVLSVI
SHAKB	VPDITDPFFLIETLCIIWFTFELTVRFLACPNKLNFCRDVMNVIDIIAII	-----
272		S3 321

253		S4 278

		.
ROD	PTDLLYIKFGWNY.....	PEIRLNRLRLISR
SHAKB	PYFITLATVVAEEEDTLNLPKAPVSPQDKSSNQAMSLAILRVIRLVRF	-----
322		S4 371

	279	H4	328
ROD	MFEFFQRTETRTNYPNIFRISNLVMIHWNACVYFSISKAGFGND		
SHAKB	IFKLSRHSKGLQILGRTLKASMRELGLLIFFLFIGVVLFSsavYF.....		
	372	S5	416
	329	Pore	378
ROD	TWVYPDVNDPDFGRLARKYVYSLYWSLTTLTTIG..ETPPPVRDSEYFFV		
SHAKB	..AEAGSENSFFKSIPD...AFWWAVVTMTTVGYGDMTPVGFVGKIVGS		
	417	Pore	460
	379	H5	396
ROD	VADFLIGVLIFATIVGNIGS		
SHAKB	.LCAIAGVLTIALPVPVI		
	461	S6	477

In der Analyse amphipathischer α -Helices liefert S4 das stärkste bipolare Signal im transmembranalen Bereich beider Kanäle (s. Abb. 4.73). Das Signal erscheint als ideale 3₁₀ Helix bei 120°. Während das S4-Segment der Shaker Kaliumkanäle sich über sieben positiv geladene Aminosäuren erstreckt, findet man bei CNG-Kanälen nur vier positive Aminosäuren (R269, R272, R/H275, R278). Sie werden von einer negativen Ladung N-terminal (E267) und einem vom S4-Motiv abweichenden Muster positiver und negativer Ladungen C-terminal (Pos. 281-289) flankiert.

Das zweitstärkste Signal im ROD liefert H2. Ferner ist ein klares α -helikales Signal im N-terminalen Bereich der Pore (Pos. 340 bis 355) und N-terminal von H4 (Pos. 295-308) zu sehen. Das Signal im Bereich der Pore ist beim Shaker Kanal in Übereinstimmung mit dem hohen Grad an Sequenzkonservierung in diesem Bereich fast identisch. Der Befund steht jedoch im Widerspruch zum 1992 vorgeschlagenen β -Barrel Modell der Pore (Durell & Guy, 1992). Im Vergleich zum Shaker Kanal ergibt sich beim C-terminalen Ende der ROD-Pore ein klarerer Hinweis auf bipolar α -helikale Struktur. Der Sequenzvergleich zwischen Kaliumkanälen und CNG-Kanälen zeigt in diesem Bereich kaum Homologie, so daß angenommen werden kann, daß sich die Sekundärstruktur des extrazellulären Porenendes von der der Kaliumkanäle unterscheidet. Das Signal bei H5 (Pos. 370-392) und H4 (Pos. 295-308) ist dem des Shaker Kanals vergleichbar (dort als S5, Pos. 390-400, und S6 Pos. 450-475). Auch in diesem Bereich wird eine relativ große Zahl konservierter Aminosäuren zwischen beiden Proteinen gefunden.

Die Homologie in der Sequenz zwischen Kaliumkanälen und CNG-Kanälen hört ebenso wie die Übereinstimmung der amphipathischen Vorhersagewerte N-terminal von H3 auf. Das starke Signal um 0° im N-terminalen Bereich vom ROD weist auf das Fehlen jeder bipolaren Periodizität im ladungsreichen Segment N-terminal von H1 hin.

Die Sequenz des Kaliumkanals wurde ausgewählt, weil für diesen Kanal das "Chain & Ball" Modell (s. Seite 108) bewiesen wurde (Hoshi *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1990). Der Ball ist jedoch wegen der Einschränkungen des POWER Algorithmus zu Beginn der Sequenz nicht klar genug definiert. NMR und CD Untersuchungen legen nahe, daß er ein hohes α -helikales Potential besitzt (Lee *et al.*, 1992).

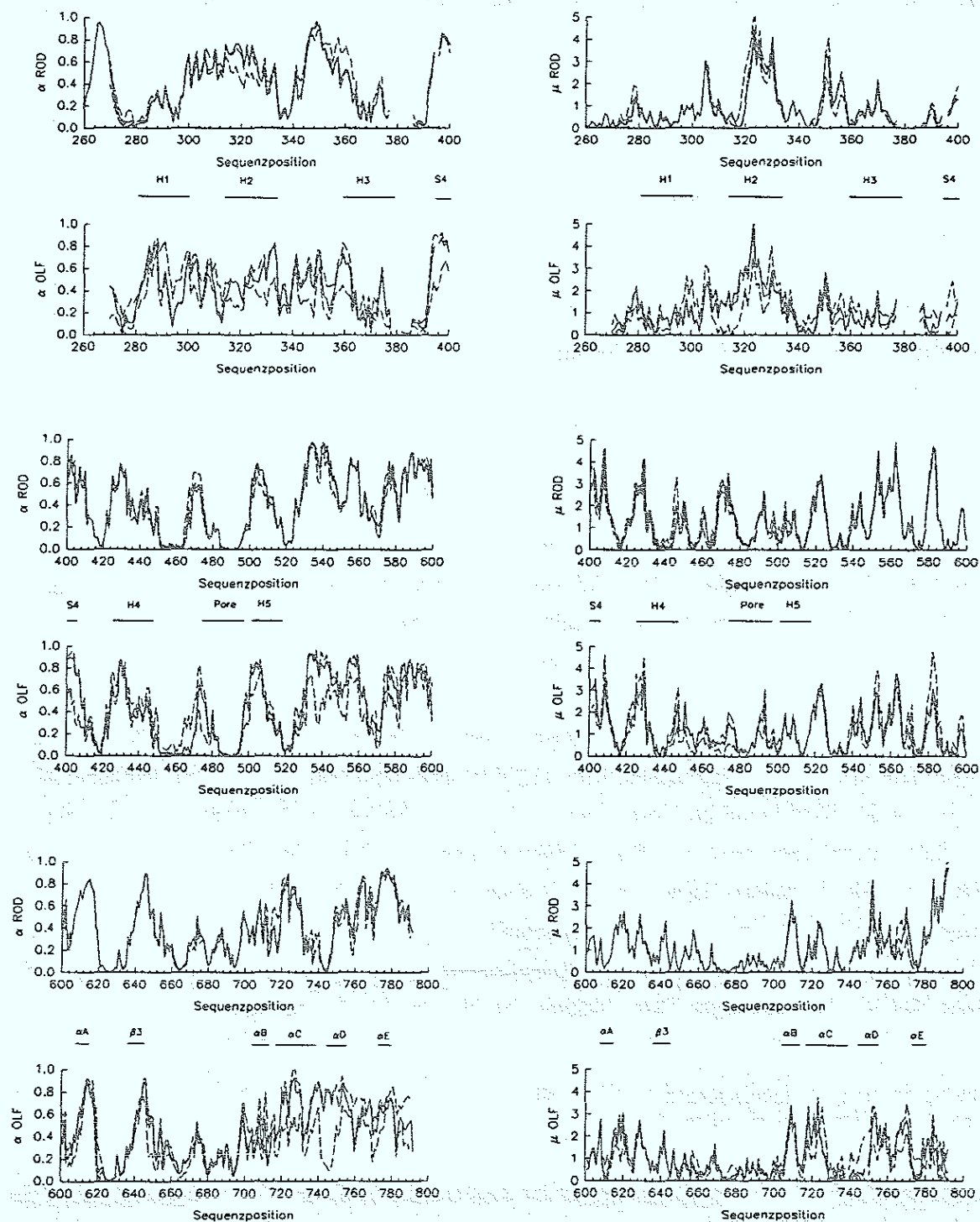
Im transmembranalen Bereich liefert die Auswertung der Netzwerkvorhersage α -helikalen Charakters weitere Unterstützung. Abb. 4.74 zeigt in der linken Hälfte die PRONET Analyse des α -helikalen Charakters, in der rechten Hälfte die "eindimensionale" POWER Analyse des bipolar-amphipathischen Charakters, bezogen auf α -Helices. Der jeweils obere Abbildungsteil zeigt die Daten für den ROD, der untere die des OLF. Im Gegensatz zu Abb. 4.73 wurden die Vorhersagewerte vor der Berechnung der Statistik entsprechend dem Sequenzalignment angeordnet, so daß die Linien gelegentlich durch Lücken unterbrochen sind⁴⁷.

Die durchgezogene Linie gibt die Vorhersagewerte der in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten Kanäle (ROD und OLF) wieder, die gestrichelten Linien die Standardabweichung aller verfügbarer CNG-Kanalsequenzen der jeweiligen Gruppe (Kanäle aus Sehtäbchen bzw. aus olfaktorischen Zellen). Als Maß für die strukturelle Mutabilität einer Position gibt die Standardabweichung Hinweise auf funktionell wichtige Segmente: Die Auswertung der Vorhersagewerte der Kinasen z.B. läßt sofort die Zuordnung des katalytischen Zentrums und anderer funktionell wichtiger Bereiche erkennen, da die Standardabweichung dort sehr klein wird (Daten nicht gezeigt).

Im wesentlichen finden sich vier Sequenzbereiche, in denen sich die Vorhersagewerte beider Gruppen deutlich unterscheiden: H1 (280 - 300), die Schleife zwischen H2 und H3 (im Bereich um 340), der Bereich um 550 in der H5-H6 Domäne und der Bereich um 730 - 745 im Übergang von Helix C zu Helix D C-terminal von der Bindestelle. Genau diese Bereiche wurden in den Versuchen mit Kanalchimären als entscheidend für die Regulierung der Ligandempfindlichkeit identifiziert (vgl. Abs. 4.5)

⁴⁷ Die Ziffern beziehen sich auf das Alignment. Da das Alignment unveröffentlichte Sequenzen enthält, kann es an dieser Stelle nicht gezeigt werden. Zur Orientierung wurden jeweils die vorhergesagten transmembranalen Domänen eingezeichnet.

Abb. 4.74: Vergleich des α -helikalen Charakters (links) und des amphipathisch-bipolaren Charakters (rechts) der Sequenz des ROD (jeweils oben) und des OLF (jeweils unten).



Das Signal für H1 ist in beiden Vorhersagen nicht sehr deutlich. Interessanterweise zeigt H1 jedoch mit H4 und H5 die einzigen eindeutigen Signale in der Hydropathievorhersage nach Kyte-Doolittle (Daten nicht gezeigt). H3 gibt ebenfalls schwache α -helikale Signale. H1 und H3 enthalten ein Prolin etwa in der Mitte der Helix. Finer-Moore *et al.* weisen darauf hin, daß Sequenzen, die den transmembranalen Helices des Bakteriorhodopsin und des photosynthetischen Reaktionszentrums aus *R. viridis* ähneln, in globulären Proteinen nicht helikal vorliegen (Finer-Moore *et al.*, 1989). Während z.B. Proline in wässriger Umgebung strukturbrechende Eigenschaften aufweisen, da sie das Eindringen von Wasser in die H-Brücken der Helixstruktur erleichtern, werden sie in transmembranalen Strukturen offenbar leichter toleriert, da hier kein Wasser um die Bindungen konkurriert.

Ein weiteres Argument für die Existenz von H1 als transmembranale Helix ist die eindeutig bipolare Verteilung konservierter und nicht konservierter Aminosäuren, die H1 als einen guten Kandidaten für den Kontakt zur Lipidumgebung erscheinen lassen (W.A., R.H. Guy, Daten nicht gezeigt). Es kann angenommen werden, daß die Protein-Lipid-Grenzschichten weniger konserviert sind als die Protein-Protein-Grenzschichten.

H2 ist durch beide Vorhersagemethoden als Helix identifiziert, sie muß jedoch, ebenso wie das S4-Segment nicht zwangsweise die Membran durchspannen, da amphipathische Strukturen auch an der Lipid-Wasser Grenzschicht liegen können. Die Verwandtschaft mit den Kaliumkanälen und die Notwendigkeit, Gegenladungen für das S4-Segment bereitzustellen, lassen es jedoch wahrscheinlich erscheinen, daß beide Segmente die Membran durchspannen. In Kaliumkanälen wurde die Membranständigkeit des S4-Segments bewiesen (Chua *et al.*, 1992; Isacoff *et al.*, 1991).

H3 ist der schwächste Kandidat für eine transmembranale Helix: schwache α -helikale Vorhersagewerte in beiden Kanalgruppen, kein amphipathisch bipolares Signal, kein deutlicher Hinweis aus der Kyte-Doolittle Vorhersage - *aber*: auffällig kleine Standardabweichung der α -helikalen Vorhersagewerte. Die Standardabweichung ist mit der der Bindestelle vergleichbar. Wie auch der Sequenzvergleich mit den Kaliumkanälen zeigt, sitzen im Bereich von H3 möglicherweise funktionell wichtige Sequenzteile.

H4 und H5 scheinen als transmembranale Helices relativ sicher, sowohl die α -helikale Vorhersage als auch die eindeutigen Kyte-Doolittle Signale sprechen für ihre Existenz.

VERGLEICH DER CNG-KANÄLE MIT DER KATALYTISCHEN UNTEREINHEIT DER NUKLEOTIDABHÄNGIGEN PROTEINKINASEN

Der Dot-Plot Matrix Vergleich zwischen der Sequenz des ROD und der cGPK zeigt neben der Übereinstimmung im Bereich der Nukleotidbindestelle einen zweiten konservierten Bereich, der in den CNG-Kanälen die Pore überdeckt (Kaupp *et al.*, 1992). Die Anordnung der katalytischen Domäne der cGPK (erste Bildreihe) und der cAPK (dritte Bildreihe) über der Pore der

CNG-Kanäle (vierte Bildreihe) in Abb. 4.73 beruht auf der Hypothese, daß es möglicherweise auch strukturelle Ähnlichkeiten in diesem Bereich geben könnte (Bönigk, 1993), die die Wechselwirkung der Pore mit der Bindestelle erklären können (vgl. Abs. 4.5). Weder der Vergleich der Vorhersagewerte noch ein direkter Vergleich der Position der konservierten Aminosäuren in der bekannten Struktur der katalytischen Domäne der cAPK (Knighton *et al.*, 1991b; Knighton *et al.*, 1991a) konnte den Verdacht erhärten. Der Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage zeigt jedoch interessante Parallelen im N-terminalen Bereich von Kinase und Kanal:

Sequenzvergleich der katalytischen Untereinheit der cAPK aus der Maus ("Almou", Uhler *et al.*, 1986) und dem ROD

	38	$\beta 1$		56

ALMOU	QLDQFDRIKTLGTGS.....FGR			
ROD	EEEKKEVVVIDPSGNTYYNWLFCITLPVMYNWTMIARACFDELQSDYLE			
	147			196
			H1	

	57	$\beta 2$		$\beta 3$		αB		αC		106

ALMOU	VMLVKHKESGNHYAMKILDKQKVVVLKQIEHTLNEKRILQAVNFPFLVKL									
ROD	YWLAFDYLSDVVYLLDMFVTRTRTGYLEQGLLVKEERKLIDKYKSTFQFKL									
	197									246
				H2						

	107	$\beta 4$		$\beta 5$		αD		αE		155

ALMOU	E.FSFKDNSNLYMMEYVAGGEMFSLRRIGRFSEPHARFYAAQIVLTFE									
ROD	DVLVSIPTDLLYIKFGWNYFEIRLNRLRLSRMFEFFORTETRTNYPN..									
	247									294
				H3				S4		

vgl. ab hier auch (Bönigk, 1993)

	katalytische Schleife						
	156	$\beta 6$		$\beta 7$	$\beta 8$	$\beta 9$	203

ALMOU	YLHSLDLIYRDLKPENLLIDQQGYIQVTDFGFAKRVK..GRTWTLCGTPE						
ROD	IFRISNLVMYIIIIHWNACVYFSISKAIGFGNDTWVY...PD						
	295						334
				H4			

	Substratbindestelle.....	
	204	α F
		α G 252
ALMOU	YLAPF.IILSKGYNKAVDWWALGVLIYEMAAGYPPFFADQPIQIYEKIVS	
ROD	VNDPDEGRLARKYVYSL.YWS.TLTLTTIGETPPPVR..DSEYFFVADF	
	335	Pore
		380
	253	α H
		α I 294
ALMOU	..GKVRFPSSHFS...SDLKDLLRNLLQVDLTKR..FGNLK.DGVNDIKNE	
ROD	LIGVLIFATIVGNIGSMISNMNAARAEFOARIDAIKQYMEFRNVSKDMEK	
	381	H5
		430

Die Grenzen der Sekundärstrukturelemente zwischen Kinase und Kanal stimmen im Bereich bis S4 auffällig überein. H2 überlappt mit β 2 und β 3, α B und α C überdecken die intrazelluläre Schleife zwischen H2 und H3, β 4 und β 5 passen zu H3 und der Beginn von S4 stimmt gut mit α D überein. Trotzdem wurden weder beim Vergleich möglicher Wechselwirkungen konservierter, geladener Aminosäuren der Kinase (z.B. im Bereich des S4-Segments), noch aus dem Vergleich der wechselwirkenden Aminosäuren im Kontakt zwischen katalytischer und regulatorischer Untereinheit der Kinasen, Hinweise auf mögliche Wechselwirkungen in CNG-Kanälen gefunden.

Die Vorhersagewerte lassen kaum Zweifel an der α -helikalen Struktur von H2. Bei H3 hingegen sprechen beide Algorithmen eher gegen eine α -Helix (s.o.). β 4 der Kinase überdeckt genau den Bereich zwischen den beiden in allen Kalium und CNG-Kanälen konservierten Aminosäuren in H3. Vor allem die deutlichen Unterschiede zwischen CNG-Kanälen der OLF-Gruppe und der ROD-Gruppe im N-terminalen Bereich von H3 sprechen eher für eine intrazelluläre Lokalisation. Eine intrazelluläre Lokalisation dieser Aminosäuren ergibt sich, wenn H3 die Membran nicht - oder als β -Faltblatt durchspannt.

Die Analyse des bipolar amphipathischen Charakters der cGPK stimmt im Bereich des N-Terminus mit der experimentell gefundenen α -Helix N-terminal von Position 40 überein (Atkinson *et al.*, 1991). Darüber hinaus erkennt man klare α -helikale Bereiche an den Übergängen der einzelnen Domänen. Zu Beginn der ersten cGMP-Bindestelle (Pos 70-85, 110-130), zwischen der ersten und der zweiten Bindestelle (220-240), am Ende der zweiten Bindestelle (315-335) und am Ende der katalytischen Untereinheit (580-610). Auch im ROD findet man im Bereich zwischen den transmembranalen Segmenten und der Bindestelle ein deutliches α -helikales Signal (zwischen 420 und 445), das durch die Netzwerkvorhersage bestätigt wird. Weder die Strukturvorhersage noch die Chimärenexperimente erlauben jedoch den Weg nachzuvollziehen, auf dem sich die Konformationsänderungen der Bindestelle bis zur Pore fortpflanzen.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit bestand erstmals die Möglichkeit, die elektrophysiologischen Eigenschaften von CNG-Kanal α -Untereinheiten aus drei verschiedenen Spezies (Rind, Huhn, Kaninchen) und vier verschiedenen Zelltypen (Sehstäbchen, Sehzapfen, olfaktorische Neurone sowie Aortengewebe) direkt miteinander zu vergleichen. Die Möglichkeit, mehrere unterschiedliche CNG-Kanalproteine unter gleichen Bedingungen zu untersuchen erhöht die Zuverlässigkeit, mit der Struktur-Funktionsbeziehungen untersucht werden können.

CNG-Kanäle werden kooperativ durch zyklische Nukleotide geöffnet, die an eine intrazelluläre Bindestelle des Proteins binden. Die Aktivierungseigenschaften der Wildtypkanäle wurden in Gegenwart von cGMP (teilweise auch in Gegenwart von cAMP) untersucht. Anhand von gezielt mutierten Proteinen wurden vor allem die strukturellen Ursachen für die unterschiedliche Empfindlichkeit von ROD bzw. OLF für cGMP und cAMP untersucht.

In erster Linie wurden Aktivierungskonstanten aus makroskopischen Strommessungen bestimmt. Im Sinne von Struktur-Funktionsbeziehungen hat die so bestimmte Aktivierungskonstante jedoch nur eine begrenzte Aussagekraft: Einerseits kann nicht zwischen Bindung und Aktivierung unterschieden werden. Andererseits ist die Regulierung der Aktivierungskonstante nicht unbedingt mechanistisch an die Wechselwirkungen geknüpft, durch die die Pore letztlich geöffnet wird. Bindungsstudien sind jedoch bei Proteinen mit mikro- bis millimolaren Aktivierungskonstanten wegen der geringen mittleren Verweilzeit des Liganden am Rezeptor wenig aussagekräftig, so daß Daten über die Bindungseigenschaften der Bindestelle nicht verfügbar sind.

In makroskopischen Messungen an CNG-Kanälen hängt die Stromamplitude hauptsächlich von der Nukleotidkonzentration ab. Außerdem wird die Stromamplitude auch durch die Membranspannung bestimmt. Die Veränderung der Membranspannung allein reicht jedoch in Abwesenheit von zyklischen Nukleotiden nicht aus, um die Kanäle zu öffnen. Eine zentrale Frage zum Verständnis der Funktionsweise von CNG-Kanälen ist, wie spannungs- und nukleotidabhängige Aktivierungsschritte zusammenspielen. Daher wurde jeweils auch die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante und des Hill-Koeffizienten ausgewertet. Die I/V- bzw. K_a /V-Kurven lassen sich zur Auswertung von Struktur-Funktionsbeziehungen verwenden. Die Spannungsabhängigkeit des Hill-Koeffizienten ist dagegen nur gering ausgeprägt und liefert keine zusätzlichen Hinweise auf spannungsabhängige Konformationsänderungen des Proteins.

AKTIVIERUNGSEIGENSCHAFTEN VON CNG-KANÄLEN

Die untersuchten Wildtypkanäle lassen sich funktionell zwei Gruppen zuordnen: Einer OLF-Gruppe und einer nicht-OLF-Gruppe, hier ROD-Gruppe genannt. Die Eigenschaften der Kanäle der ROD-Gruppe sind heterogener und nicht sinnvoll zu klassifizieren.

Die Eigenschaften des OLF und der beiden untersuchten CNG-Kanäle aus Aortengewebe unterscheiden sich praktisch nicht. Die wichtigsten hier untersuchten makroskopischen Merkmale zur Unterscheidung der Kanäle der OLF-Gruppe von den anderen sind:

- cGMP-Aktivierungskonstante um 2 μM
- gleiche maximal aktivierbare Stromamplitude für cGMP und cAMP
- 10 - 30fach höhere Empfindlichkeit für Aktivierung durch cGMP als durch cAMP
- die Aktivierungskonstante verändert sich in den ersten 30 bis 40 Minuten nach Abziehen des Patches nicht.

Die Aktivierungskonstanten der Kanäle der OLF-Gruppe für cGMP sind mit 2,4 μM (OLF), 2,9 μM (Herz135) und 3,3 μM (Herz 357) etwa 10- 30fach kleiner als die der übrigen CNG-Kanäle [79,5 μM (ROD), 65,28 μM (ChCONE), 34,14 μM (ChROD)]. Die Aktivierungskonstanten für cAMP unterscheiden sich zwischen den Kanälen der OLF-Gruppe [92 μM (OLF), 113,9 μM (Herz153) 79,3 μM (Herz357)] und dem ROD (1,2 mM) etwa 10- 15-fach (alle Werte bezogen auf -80 mV).

Die Gleichrichtung, die maximal aktivierbaren Ströme und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante unterscheiden sich bei den Kanälen der OLF-Gruppe in Gegenwart von cGMP bzw. cAMP nicht. Beim ROD wird die Gleichrichtung in Gegenwart von cAMP deutlich stärker, die K_a/V -Kurve wird linear und die Stromamplitude erreicht nur noch 5 - 17 % der durch cGMP-aktivierbaren Ströme. Wegen der geringen Expressionsdichte wurden für die CNG-Kanäle aus der Hühnernetzhaut keine cAMP-Aktivierungskonstanten bestimmt, die maximal aktivierbaren Ströme sind jedoch auch hier kleiner als in Gegenwart von cGMP.

Bei den Messungen zur Ionenselektivität ist der unterschiedlich stark ausgeprägte Trans-Effekt der nur von der intrazellulären Seite angespülten Fremdionen auf den jeweils von Kalium getragenen Einwärtsstrom bemerkenswert. Bereits 1983 wurden Hinweise gefunden, daß die in der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung angenommene Unabhängigkeit der Wanderung der einzelnen Ionen voneinander in CNG-Kanälen nicht gegeben ist (Capovilla *et al.*, 1983). Die gezeigten Messungen zur Bestimmung der Ionenselektivität demonstrieren, daß sich die Selektivitätseigenschaften der heterolog exprimierten α -Untereinheiten nicht wesentlich von denen der *in situ* gemessenen CNG-Kanäle unterscheiden (Kaupp & Altenhofen, 1992).

Es fällt auf, daß die Permeabilität der Kanäle der OLF-Gruppe für Rubidium und Lithium bzw. für Natrium und Kalium jeweils umgekehrt ist wie bei den Kanälen der ROD-Gruppe. Inter-

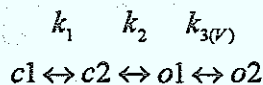
essant ist auch der fast völlige Verlust der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante des ROD in Gegenwart von Natrium auf beiden Seiten der Membran. 90 % der veröffentlichten Daten zu CNG-Kanälen wurden in Gegenwart von Natriumionen gemessen. Die Experimente in Gegenwart von Natrium auf beiden Seiten der Membran deuten darauf hin, daß Natrium unter den hier verwendeten Bedingungen destabilisierend auf das Kanalprotein wirkt. Die Messreihen unter symmetrischen Bedingungen in Gegenwart unterschiedlicher Kaliumkonzentrationen lassen beim ROD eine höhere Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der Ionenstärke erkennen als beim OLF. Beide Kanäle zeigen in Gegenwart von 25 statt 100 mM KCl eine verstärkte Auswärtsgleichrichtung.

HINWEISE AUF DEN AKTIVIERUNGSMECHANISMUS AUS DEN EINZELKANALVERSUCHEN

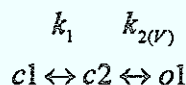
Die makroskopische I/V-Kurve ergibt sich aus dem Produkt der Offenwahrscheinlichkeit des Einzelkanals, der Einzelkanalamplitude und der Anzahl der Kanäle im Patch. Unterschiedliche Gleichrichtungseigenschaften können durch unterschiedliche Spannungsabhängigkeit der I/V-Kurve und/oder durch Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit verursacht werden. Für den OLF konnte gezeigt werden, daß die Spannungsabhängigkeit der makroskopischen I/V-Kurve in Gegenwart sättigender Ligandkonzentration allein durch die Spannungsabhängigkeit der Einzelkanalamplitude erklärt werden kann. Die Einzelkanalamplitude ist zudem unabhängig von der Ligandkonzentration. Die Offenwahrscheinlichkeit hängt von der Spannung und von der Nukleotidkonzentration ab. Beim OLF lag die maximal erreichte Offenwahrscheinlichkeit bei 98 %. Die Einzelkanalamplitude des OLF beträgt 35 pS (diese Arbeit) im Vergleich zu etwa 25 pS beim ROD (Kaupp *et al.*, 1989, bezogen auf +80 mV). Da der Hill-Koeffizient spannungsunabhängig und die i/V-Kurve unabhängig von der Nukleotidkonzentration ist, ist die Spannungsabhängigkeit der K_d /V-Kurve ein Maß für die Stärke der spannungsabhängigen Modulation der Offenwahrscheinlichkeit. Sie läßt sich graphisch durch den unterschiedlichen Verlauf der auf einen Spannungswert normierten I/V-Kurven in Gegenwart unterschiedlicher Ligandkonzentrationen darstellen.

Für die Erklärung der Spannungsabhängigkeit sind drei Modelle denkbar:

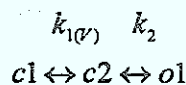
Fall A:



Fall B:



Fall C:



Es wird angenommen, daß der Kanal in einem geschlossenen Zustand mit unbesetzter Bindestelle vorliegt (c1), daß es einen geschlossenen Zustand mit besetzter Bindestelle gibt (c2), und daß es einen offenen Zustand gibt (o1), der ggf. durch die Membranspannung in einen zweiten Offenzustand (o2) überführt werden kann. Das Schema ist stark vereinfacht, auf die Mindestanzahl vor dem Öffnen zu bindenden Liganden wird ebenso wenig eingegangen wie auf die unterschiedlichen Möglichkeiten der Rückreaktionen.

Im ersten Fall ist der modulierende Einfluß der Spannung eine Funktion der Offenwahrscheinlichkeit. Kooperativität könnte dann zumindest teilweise durch das Zusammenspiel spannungs- und nukleotidabhängiger Effekte erklärt werden. Die Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit ist hier hauptsächlich durch eine Verlängerung der mittleren Offenzeit bedingt. Die Offenwahrscheinlichkeit des ROD in Gegenwart von cAMP ist kleiner als die Offenwahrscheinlichkeit in Gegenwart von cGMP (Ildefonse *et al.*, 1992). Gleichzeitig ist die K_d/V -Kurve des ROD für cAMP linear. Dieser Effekt könnte gut durch ein Modell nach Fall A erklärt werden. Auch die Inaktivierungseffekte im Auswärtsstrom bei Kanalzuständen mit hoher Offenwahrscheinlichkeit sprechen dafür, daß der offene Kanal möglicherweise mechanisch instabiler und damit anfälliger für eine zusätzliche Modulation der Konformation durch die Membranspannung ist.

Im Fall B wird angenommen, daß der Isomerisierungsschritt vom geschlossenen zum offenen Kanal spannungsabhängig erfolgt ("gating charge" $z_g \neq 0$). Für die Kanäle, bei denen gezeigt werden konnte, daß die Spannungsabhängigkeit der i/V -Kurve mit der I/V -Kurve maximaler Ligandsättigung übereinstimmt, kann in guter Näherung angenommen werden, daß $z_g = 0$ ist. Wenn man weiter annimmt, daß sich die Spannungsabhängigkeit des offen-geschlossen-Isomerisierungsschritts in Gegenwart submaximaler Ligandkonzentrationen nicht von der in Gegenwart maximaler Ligandkonzentration bestimmten unterscheidet, kann Fall B als mögliches Reaktionsschema ausgeschlossen werden. Die Spannungsabhängigkeit würde dann aus dem Bin-

zungsschritt resultieren (Fall C). In einer Reaktion nach Schema C ist anzunehmen, daß sich die Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit aus einer spannungsabhängigen Verkürzung der mittleren Geschlossenzeit ergibt.

Hanke *et al.* haben am rekonstituierten CNG-Kanal aus Rindersehhäutchen gezeigt, daß die mittleren Offenzeiten mit steigender cGMP-Konzentration nur leicht zunehmen. Der Haupteffekt der cGMP-abhängigen Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit resultiert aus einer Abnahme der mittleren Geschlossenzeiten (Hanke *et al.*, 1988). Eine vollständige Analyse der Spannungs- und Konzentrationsabhängigkeit des Einzelkanalverhaltens existiert bisher jedoch nicht.

HINWEISE AUF DEN AKTIVIERUNGSMECHANISMUS AUS DER VARIABILITÄT DER ERGEBNISSE

Die Faltung der Aminosäurekette in Tertiär- und Quartärstrukturen erfolgt nach hierarchischen Kriterien vom "ungeordneten" Proteinrückgrat bis hin zur spezifischen Zusammenlagerung von Domänen bzw. Untereinheiten (Jaenicke, 1987). Die Wechselwirkungen, die zur Erzeugung von Kooperativität zwischen Untereinheiten oder Domänen führen, werden dabei relativ spät eingeführt (Lecomte & Matthews, 1993). Es kann angenommen werden, daß die primär gebildeten Kontakte energetisch stabiler sind als die sekundär gebildeten. Wie aus der Zerstörung von Atomen unter definierten Bedingungen Aussagen über ihre Feinstruktur gemacht werden können, kann möglicherweise auch aus einer Analyse der zeitlichen Veränderlichkeit der Proteinfunktion Information über die Stabilität von Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten bzw. Domänen abgeleitet werden. Ionenkanäle bieten für die Untersuchung von Konformationsänderungen in Proteinen den Vorteil, daß ihre Bewegungen unter physiologischen Bedingungen zeitlich sehr viel genauer aufgelöst werden können als die globulärer Proteine. Prozesse mit Zeitkonstanten im Stundenbereich sind meines Wissens bislang an keinem Protein systematisch untersucht worden.

Bei den Veränderungen des Proteins müssen zwei unterschiedliche Ebenen berücksichtigt werden: Einige Veränderungen treten spontan auf und führen zur Variabilität der Ergebnisse von Patch zu Patch. Die Aktivierungskonstanten z.B. variieren relativ stark von Patch zu Patch. Für den ROD wurden in 37 Versuchen an 23 Patchen Aktivierungskonstanten zwischen 12 und 150 μM (cGMP, berechnet für -80 mV, Mittelwert 79 μM , Standardabweichung 36 %) gemessen. Gleichzeitig verändern sich die Gleichrichtungeigenschaften. Bei den oben genannten Versuchen wurden Quotienten des Einwärts- zum Auswärtsstrom (berechnet bei -80 mV bzw. +80 mV in Gegenwart sättigender cGMP-Konzentration) zwischen 0,28 und 0,98 gemessen (vgl. Abb. 4.41 Mittelwert 0,62, 24 % Standardabweichung). Die Spannungsabhängigkeit der K_a/V -Kurve (berechnet als Quotient der Aktivierungskonstante bei -80 mV zu +80 mV) schwankte zwischen 0,64 und 0,21 (Mittelwert 0,42, 21 % Standardabweichung). Der Hill-

Koeffizient schwankte zwischen 1,1 und 3,22 (Mittelwert 1,98, 25 % Standardabweichung). Die maximal aktivierbare Stromamplitude, als Funktion der Anzahl der Kanäle pro Patch, lag zwischen 185 und 13.052 pA (Mittelwert 2.827 pA, 91 % Standardabweichung). Die Variabilität der maximal aktivierbaren Stromamplitude ist jedoch kein Maß zur Beurteilung von Kanaleigenschaften, sie sagt lediglich etwas über die Variabilität der Expressionsdichte aus.

Die Veränderungen der Kanaleigenschaften von Patch zu Patch sind alle nicht miteinander korreliert. Zum einen kann man die Variabilität von Patch zu Patch durch gleichzeitiges Vorhandensein unterschiedlicher Kanalpopulationen in einem Patch erklären. Alternativ kann man davon ausgehen, daß die Kanäle jeweils einheitliche Eigenschaften haben, die jedoch je nach den beim Abziehen des Patches herrschenden Bedingungen (angelegte Spannung und Unterdruck...) moduliert werden. Möglicherweise hängen diese Veränderungen mit den in Abs. 4.6 beschriebenen "lazy states" zusammen. Goulding *et al.* messen am olfaktorischen CNG-Kanal aus dem Wels eine Variabilität der maximalen Offenwahrscheinlichkeit von Patch zu Patch zwischen 0,2 und 0,8 (Goulding *et al.*, 1992). Diese Schwankungen deuten darauf hin, daß es bei CNG-Kanälen wie bei anderen Ligand-gesteuerten Ionenkanälen Wechsel zwischen unterschiedlichen Aktivitätszuständen mit verschiedenen "duty"-Zyklen gibt. Da die Veränderung der einzelnen Aktivierungsparameter jedoch unabhängig voneinander erfolgt, muß es eine große Anzahl von Freiheitsgraden für die Wechselwirkung der Domänen bzw. Untereinheiten untereinander geben. Andererseits sind die langfristigen Veränderungen der Kanaleigenschaften bei wiederholten Messungen an einem Patch reproduzierbar und korrelieren eindeutig mit dem Zeitverlauf, so daß hier die Freiheitsgrade zur Entwicklung des Systems sehr begrenzt sind.

Folgende Veränderungen wurden in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Abziehen des Patches beobachtet:

- Die maximal aktivierbare Amplitude beginnt in etwa 90 % der Versuche nach 25 bis 30 Minuten abzunehmen. Der Abfall setzt sich unabhängig von der Art des "Gebrauchs" des Proteins (Unterschiede in der Ligandkonzentrationen und der Membranspannungen spielen keine Rolle) über etwa 60 Minuten fort. In dieser Zeit fällt die maximal aktivierbare Amplitude auf etwa 10 bis 20 % der ursprünglichen Stromamplitude ab. Der Parameter ist mechanistisch weniger interessant, da diese Veränderungen unabhängig von der untersuchten Kanalspezies auftreten. Eine direkte Untersuchung des Phänomens auf Einzelkanalebene ist nicht möglich, da Einzelkanalspuren bisher nicht lange genug vermessen werden konnten. Folgende Erklärungen sind denkbar: einige Kanäle der Kanalpopulation im Patch verlieren mit der Zeit ihre Funktionalität. Eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit ist dabei ebenso möglich wie eine Veränderung der Einzelkanalleitfähigkeit. Alternativ kann angenommen werden, daß Kanäle aus dem mittleren Bereich des Membranpatches in die Membran-Glas-Kontaktzone wandern und somit nicht mehr für den Ionentransport zur Verfügung stehen. Aus den veränderten Rauscheigenschaften kann geschlossen werden, daß es sich

wenigstens zu einem Teil um eine Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit handelt (Daten nicht gezeigt). Bennett *et al.* berichten, daß in planaren Lipidbilayern am CNG-Kanal aus Sebstäbchen des Rinds Kanalaktivität über zwei bis drei Stunden gemessen wurde (Bennett *et al.*, 1989). Es wird jedoch nicht erwähnt, ob und ggf. wie sich die Eigenschaften zeitlich verändern. Neben der unterschiedlichen Membran-Protein-Wechselwirkungen im Patch bzw. im planaren Bilayer könnten auch unterschiedliche Eigenschaften des nativen bzw. heterolog exprimierten Kanals bzw. biochemische Modifikationen eine Rolle spielen.

- Die maximal mit cAMP-aktivierbaren Ströme bei den Kanälen der OLF-Gruppe blieben auch nach Eintreten der oben genannten Veränderungen der Kanaleigenschaften gleich groß wie die cGMP-aktivierbaren Stromamplituden.
- Die beiden heterolog exprimierten CNG-Kanäle des Rinds (ROD und OLF) unterscheiden sich hinsichtlich der zeitlichen Veränderung der Aktivierungskonstante. Beim ROD fällt die Aktivierungskonstante exponentiell mit einer Halbwertszeit von etwa 20 Minuten ab, während die Aktivierungskonstante des OLF über etwa eine halbe Stunde konstant bleibt. Die Abnahme der Aktivierungskonstante beim ROD kann nicht durch teilweise besetzte Bindestellen erklärt werden, da sie unabhängig von der Veränderung des Hill-Koeffizienten erfolgt.
- Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante und der Hill-Koeffizient nehmen mit der Zeit ab. Nach etwa 60 Minuten ist die Kooperativität verloren und die Aktivierungskonstante ist spannungsunabhängig. Anschließend sinkt der Hill-Koeffizient unter eins. Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich um negative Kooperativität oder um nichtäquivalente, unabhängige Bindestellen handelt. Der zeitliche Abfall ist beim ROD von Beginn des Versuchs, beim OLF nach etwa 35 Minuten korreliert. Der unterschiedliche Verlauf der Abnahme der Kooperativität und der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante könnte beim OLF mit dem Konstantbleiben der Aktivierungskonstante zusammenhängen. Ein direkter Beweis für diese Vermutung läßt sich jedoch nicht ableiten.

Eine Veränderung von Kanaleigenschaften nach Abziehen des Patches wird von einer Reihe von Kanälen berichtet (Fenwick *et al.*, 1982; Cachelin *et al.*, 1983; Guharay, 1982; Trautmann & Siegelbaum, 1983). Auch bei *in situ* gemessenen CNG-Kanälen aus Sebstäbchen des Froschs wurden zwischenzeitlich zeitabhängige Veränderungen im abgezogenen Patch berichtet (Gordon *et al.*, 1992). Gordon *et al.* finden eine Abnahme der Aktivierungskonstante mit ähnlicher Zeitkonstante, die in Abs. 4.7 für den ROD beschrieben wird. Sie bestimmen die Aktivierungskonstante jedoch nur indirekt durch den Vergleich der zeitabhängigen Zunahme der Stromamplitude in Gegenwart submaximaler Ligandkonzentrationen. Ferner finden sie den Effekt ausschließlich in Gegenwart von Kalzium. Sie geben an, daß bereits 1-2 mM EGTA ausreichen, um die Abnahme der Aktivierungskonstante zu unterbinden. Alle hier gezeigten Experimente wurden in Anwesenheit von 10 mM EGTA durchgeführt. Gordon *et al.* erklären die

kalziumabhängige Abnahme der Aktivierungskonstante durch Dephosphorylierung des Kanals. Sie nehmen an, daß endogene Phosphatasen mit dem Patch abgezogen werden, da der Effekt in Gegenwart von Phosphatasehemmern aufgehalten werden kann. Phosphatasen sind jedoch nicht kalziumabhängig (S. Klumpp, Tübingen, persönliche Mitteilung) und erste Versuche in Gegenwart von 10 mM Phosphat (zur Hemmung eventuell vorhandener Phosphatasen) geben keinen Hinweis auf eine Bedeutung von Dephosphorylierungsreaktionen zur Erklärung der Abnahme der Aktivierungskonstante beim heterolog exprimierten ROD.

Es ist bekannt, daß Kalzium bzw. zweiwertige Ionen sowohl die Permeationseigenschaften als auch das Schaltverhalten von CNG-Kanälen beeinflussen (Zimmerman & Baylor, 1992; Hsu & Molday, 1993; Kramer & Siegelbaum, 1992; sowie Yau & Baylor, 1989 und Referenzen darin). Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß sich die lokale Kalziumkonzentration am Patch in Gegenwart von 10 mM EGTA über einen Zeitraum von einer Stunde verändert.

Erste Langzeitversuche an Kanalchimären (vgl. Abs. 4.7) deuten vielmehr darauf hin, daß die Veränderung der Aktivierungseigenschaften auf der zeitabhängigen Veränderung spezifischer Protein-Protein Wechselwirkungen beruht und die Zeitkonstante des Abfalls der Aktivierungskonstante somit zusätzlich zur Beurteilung der Wechselwirkung intrazellulärer Domänen miteinander oder mit transmembranalen Domänen verwendet werden kann.

HINWEISE AUF DEN AKTIVIERUNGSMECHANISMUS DURCH DIE MAKROSKOPISCHE AKTIVIERUNGSKONSTANTE

Die Chimärenversuche deuten darauf hin, daß es in CNG-Kanälen einen "Kernbereich" zwischen H3 und H5 gibt, der wenig Einfluß auf die Regulierung der Ligandempfindlichkeit hat. Andererseits ist dieser, die Pore umfassende Bereich wichtig für die Bestimmung der Permeationseigenschaften (Ionenselektivität, vgl. Abb. 4.39, und Einzelkanalleitfähigkeit vgl. Abs. 4.9) sowie der spannungsabhängigen Aktivierungsprozesse (S4-Motiv, vgl. D1 Mutante). Die Regulierung der Ligandempfindlichkeit erfolgt dagegen durch allosterische Wechselwirkungen zwischen den Sequenzdomänen N-terminal von H3 und C-terminal von H5. Den deutlichsten Einfluß auf die Regulierung der Ligandempfindlichkeit hat der Sequenzbereich N-terminal von H1, gefolgt von der zwischen H1 und H3 liegenden Domäne und der zwischen H5 und der Bindestelle liegenden Domäne. Die Bindestelle selber ist nicht entscheidend für den Unterschied der Ligandempfindlichkeit zwischen ROD und OLF.

Die K_a/V -Kurven liefern im Vergleich zu den Aktivierungskonstanten zusätzliche Entscheidungshilfen bei der Bewertung der Chimärenergebnisse: Die K_a/V -Kurven der R6O/O6R, R5O6R/O6R5O und R1O6R/O1R6O Chimärenpaare weichen auf vergleichbare Weise von den jeweiligen Wildtypen ab. Allen gemeinsam ist, daß N-Terminus und H5-H6 Domäne von unterschiedlichen Spendern stammen. Zunächst wurden die zwischen ROD und OLF liegenden Aktivierungskonstanten des R1O6R/O1R6O Paares durch eine mögliche Wechselwirkung der

Bindestelle mit dem zentralen Proteinbereich zwischen H3 und H5 interpretiert und ein Aktivierungsmechanismus ähnlich dem "Chain & Ball" Modell in Kaliumkanälen angenommen. Durch das Gleichwerden der K_a/V -Kurven ist es jedoch naheliegender, die einander sehr ähnlichen Aktivierungskonstanten der R5O6R/O5R6O bzw. O1R6O/R1O6R Paare auf die jeweils ausgetauschten H5-H6 Domänen zurückzuführen. Die R5O/O5R Chimären zeigen, daß es nicht ausreicht, wenn N-Terminus und H5-H6 Domäne von unterschiedlichen Spendern stammen, es muß zusätzlich auch die C-terminal von H6 liegende Domäne von dem gleichen Spender stammen wie der N-Terminus. Die R6O/O6R Chimären schließen demgegenüber aus, daß es sich um Wechselwirkungen ausschließlich zwischen dem N-Terminus und dem C-terminal von H6 liegenden Sequenzbereich handelt.

Bei ROD und OLF unterscheiden sich geladene Aminosäuren in der H5-H6 Domäne an folgenden Sequenzpositionen (bezogen auf Abb. B1, zuerst ist die Aminosäure des ROD genannt): N54/K, K548A, D575A, D588S, Q612R. Eine Identifizierung der entscheidenden Aminosäure(n) wäre hilfreich für die Absicherung des Computermodells im Bereich zwischen H5 und der Bindestelle. Für diesen Sequenzabschnitt kann bislang kein sinnvoller Strukturvorschlag gemacht werden.

Wenn diese Interpretation richtig ist, kann andererseits ausgeschlossen werden, daß es Kontakte zwischen der H3-H5 Region und den intrazellulären Domänen gibt, die die Aktivierungskonstante bzw. die K_a/V -Kurve verändern. Das stimmt mit den Ergebnissen der R23O4R bzw. O23R4O Chimären überein. Es ist daher unwahrscheinlich, daß es funktionell einen dem "Chain & Ball" Modell der Kaliumkanäle vergleichbaren Aktivierungsmechanismus gibt, bei dem die Bindestelle direkt mit einer Region nahe der Pore wechselwirkt. Zumindest kann eine solche Wechselwirkung experimentell mit den hier verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden.

Um genauer beurteilen zu können, wie die einzelnen intrazellulär lokalisierten Domänen miteinander wechselwirken, sind somit weitere Chimären, vor allem unter Berücksichtigung des H1-H2 Linkers bzw. der H5-H6 Domäne, notwendig.

HINWEISE AUF DEN AKTIVIERUNGSMECHANISMUS AUS DEN SEKUNDÄRSTRUKTURVORHERSAGEN UND DEM BINDESTELLENMODELL

WIE WIRD DER LIGAND IN DER BINDESTELLE GEBUNDEN?

- In der Kristallstruktur des CAP ist cAMP in *anti*-Konformation gebunden (Weber & Steitz, 1987). Die Zuordnung der Reflektionen des Liganden in der Kristallstruktur ist möglicherweise weniger eindeutig als von den Autoren zugegeben (Ebright, 1986). Zunächst wurde der Ligand so schlecht aufgelöst, daß die Zuordnung nach Augenmaß vorgenommen wurde (McKay *et al.*, 1982). Dabei wurde jedoch das falsche Enantiomorph eingepaßt, so daß die Wechselwirkungen der 2'OH Gruppe der Ribose falsch zugeordnet wurden (Ebright, 1986).
- NMR Daten lassen vermuten, daß cAMP in *syn* Konformation gebunden wird, cGMP in *anti* (Clore & Gronenborn, 1982; Gronenborn & Clore, 1982). Das widerspräche dem in Lösung vorherrschenden Gleichgewicht. cAMP liegt in Lösung wegen der sterischen Behinderung von Guanosin- und Phosphatrest in *anti*-Konformation vor, cGMP hingegen in *syn*-Konformation, da die zusätzlich mögliche Wasserstoffbrücke zwischen der 2-Aminogruppe des Guanosins und dem Phosphatrest die *syn*-Konformation stabilisiert (Yathindra & Sundaralingam, 1974).
- Die Fähigkeit der Bindestelle, zwischen unterschiedlichen Konformationen des Liganden zu unterscheiden, ist an die Gegenwart der Helix C gebunden (Clore & Gronenborn, 1982).

Die Fixierung des Liganden in der Bindetasche erfolgt in allen Fällen (CAP, cAPK, cGPK, CNG-Kanäle) hauptsächlich durch die Wechselwirkung der Phosphatgruppe des Liganden mit einem Arginin in der Bindestelle. Es kann jedoch angenommen werden, daß die Lage des Liganden nicht völlig rigide ist: Im CAP aktiviert das Rp-Phosphothioanaloge des cAMP (Rp-cAMP[S]: das äquatoriale, exozyklische Sauerstoffatom ist durch ein Schwefelatom ersetzt) besser als das Sp-Thioanaloge (das axiale O ist durch ein S ersetzt). Die Lokalisation der negativen Ladung des Phosphatrests im Rp-Thioanalogen ist ganz zum axialen Sauerstoffatom hin verschoben. Der Hauptanteil der Salzbrücke besteht somit im CAP wahrscheinlich zwischen der axialen Sauerstoffgruppe des Phosphats und R82 (Scholübbbers *et al.*, 1984).

Bei Typ I cAPK entscheidet Mg-ATP darüber, ob Rp-cAMP[S] ein Agonist ist oder nicht: In Abwesenheit von Mg-ATP ist Rp-cAMP[S] ein schwacher Agonist, in Anwesenheit ein Antagonist (Dostmann & Taylor, 1991). In Typ II cAPK ist Rp-cAMP[S] immer ein Antagonist. Das Sp-Analoge ist Agonist für beide cAPK Typen (de Wit *et al.*, 1984). Auch in der cGPK ist das Rp-Analoge ein Antagonist, das Sp-Analoge ein Agonist (Butt *et al.*, 1990).

Die Aktivierungskonstante des nativen CNG-Kanals aus Sechstäbchen des Tigersalamanders für Rp-cGMP[S] beträgt 210 μ M, die Aktivierungskonstante für das Sp-Analoge 1,2 mM

(verglichen mit 17 μM für cGMP). Die maximal aktivierbaren Amplituden sind jeweils vergleichbar (Zimmerman *et al.*, 1985).

Beim heterolog exprimierten CNG-Kanal aus olfaktorischen Neuronen des Wels wirkt Sp-cAMP[S] als voller Agonist ($K_a = 10 \mu\text{M}$), Rp-cAMP[S] hingegen nur als schwacher Agonist. In Gegenwart von Rp-cAMP[S] werden 25 % der maximalen Stromamplitude aktiviert ($K_a = 250 \mu\text{M}$, Kramer & Siegelbaum, 1992).

Falls diese Ergebnisse darauf hinweisen, daß die Bindung des Liganden in ROD und OLF nicht völlig gleich erfolgt, muß aus den Chimärenversuchen geschlossen werden, daß die zu unterschiedlicher Ligandbindung führenden Veränderungen der Bindestellen nicht primär durch die Faltung der Bindestellendomäne sondern sekundär durch Wechselwirkungen der Bindestellendomäne mit anderen Teilen des Proteins zustande kommen.

Wegen dieser Unsicherheiten wurde beim Modell der Ligandbindestelle der CNG-Kanäle nicht sehr viel Zeit auf die Einpassung des Liganden verwendet. Die Koordinaten des cGMP wurden nach (Watanpaugh *et al.*, 1968) aus den Modellen der cAPK übernommen. Während die in Abs. 4.4 vorgestellten Ergebnisse darauf hindeuten, daß cGMP in *syn*-Konformation gebunden wird, ist die Frage nach spezifischen Wechselwirkungen des Adenosinrings im cAMP noch ungeklärt.

Die Hypothese von Weber *et al.*, daß eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der 2-Aminogruppe des cGMP und der OH-Gruppe eines in cGMP-Bindestellen spezifisch konservierten Threonins ausreicht, um eine cGMP-spezifische Bindestelle in eine cAMP-spezifische Bindestelle zu überführen (Weber *et al.*, 1989), konnte insoweit bestätigt werden, als die Aktivierungskonstanten der T/A Mutanten für cGMP und cAMP im ROD bzw. im OLF gleich wurden. Es gelang jedoch nicht, durch den Austausch Bindestellen zu schaffen, die wesentlich empfindlicher für cAMP als für cGMP sind. Im Gegensatz zum 10- 15fachen Unterschied der Aktivierbarkeit durch cAMP bzw. cGMP in den CNG-Kanälen unterscheiden sich die Kinasen etwa 200fach in ihrer Ligandenselektivität (cAPK 20 nM für cAMP, K_a für cGMP 4,1 μM , Corbin *et al.*, 1986; Doskeland *et al.*, 1983). Vergleichbare Mutationsstudien an einer cAMP-spezifischen Bindestelle der cAPK bestätigen das Ergebnis: Ein Ersatz des Alanins durch ein Threonin in der cAPK erhöht die Affinität und die Aktivierbarkeit für cGMP, während die Empfindlichkeit für cAMP unverändert bleibt (Shabb *et al.*, 1990; Shabb *et al.*, 1991). Es ist bislang jedoch auch bei den Proteinkinasen noch nicht gelungen, eine cGMP-spezifische Bindestelle in eine cAMP-spezifische Bindestelle zu überführen, d.h. die an der Bindung des cAMP beteiligten Wechselwirkungen sind noch unverstanden.

Aufschlußreich ist der Befund von Tanaka *et al.*, daß der CNG-Kanal aus Sechstäbchen des Froschs in Gegenwart von 3',5'-zyklischem Inositol Monophosphat (cIMP) 80 % der durch cGMP aktivierbaren Ströme erreicht. Die maximale Amplitude in Gegenwart von cAMP wird in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen mit 12-25 % der cGMP- aktivierbaren Stromamplitude angegeben. cIMP verfügt nicht über die 2-Aminogruppe

des cGMP, hat jedoch wie cGMP in Position 6 eine Hydroxylgruppe (im Gegensatz zur Aminogruppe des cAMP in Position 6). Die Aktivierungskonstante des cIMP ist der des cAMP vergleichbar (cAMP: 1,5 mM, cIMP: 1,2 mM, cGMP 24 μ M, Tanaka *et al.*, 1989).

Aus Aktivierungsstudien mit Nukleotidanaloga wird geschlossen, daß die Liganden in den Bindestellen der Kinasen und der Kanäle in *syn*-Konformation gebunden werden (Tanaka *et al.*, 1989; Zimmermann *et al.*, 1985; de Wit *et al.*, 1984; OGREID *et al.*, 1989; Doskeland *et al.*, 1983; Corbin *et al.*, 1986). Wenn die Liganden, (cGMP, cAMP und cIMP) in *syn*-Konformation gebunden werden, dann unterscheiden sich die Bindungswechselwirkungen in der Ribosephosphathälfte wahrscheinlich nicht wesentlich, und die Aminosäuren, die zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der 6-OH Gruppe des cGMP bzw. cIMP oder der 6-NH₂ Gruppe des cAMP führen, müßten gemäß dem Bindestellenmodell im Bereich des β -Faltblattes 5 liegen. Wenn *syn*- und *anti*-Konformationen der drei Liganden im Gleichgewicht stehen, würde der Unterschied dadurch erklärt werden, daß die zusätzliche Wasserstoffbrücke die Bindung des cGMP in *syn*-Konformation stabilisiert, während die höhere Aktivierungskonstante im cAMP bzw. cIMP dadurch zustande kommt, daß cAMP und cIMP überwiegend in *anti*-Konformation gebunden werden, während im cGMP die *syn*-Konformation durch die zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert wäre. In diesem Fall wären Wechselwirkungen der 6-Aminogruppe der *anti* gebundenen Liganden mit der α -Helix C zu erwarten. Da in diesem Sequenzabschnitt jedoch keine spezifisch konservierten Aminosäuren liegen, kommen auch Wechselwirkungen mit Rückgratatomern der Helix in Betracht. Aus Bindungsstudien mit cAMP-Analoga an den cAPK Bindestellen wurde jedoch geschlossen, daß keine Wasserstoffbrücken an den Wechselwirkungen der Adenosinbase beteiligt sind. In beiden Fällen werden cAMP und cIMP in gleicher Konformation gebunden und der deutliche Unterschied in der maximal aktivierbaren Amplitude muß durch unterschiedliche Wechselwirkungen der 6-Aminogruppe des cAMP bzw. der 6-Hydroxygruppe des cIMP zustande kommen. Die Vielzahl sich teilweise widersprechender Deutungen über die an der Bindung des Liganden beteiligten Wechselwirkungen lassen Zweifel an der Verwertbarkeit von Bindungs- bzw. Aktivierungsstudien mit Nukleotidanaloga aufkommen.

Möglicherweise ist die Aminosäure in Position 560 des ROD nicht der einzige regulierende Faktor der Ligandenselektivität bei CNG-Kanälen. Goulding *et al.* finden für den CNG-Kanal aus olfaktorischem Gewebe des Wels bei *in situ* Messungen Aktivierungskonstanten von 42 μ M (cAMP) bzw. 40 μ M (cGMP). Der klonierte CNG-Kanal des Wels hat ebenfalls ein Threonin in der entsprechenden Position und müßte nach der Hypothese von Weber *et al.* empfindlicher für cGMP als für cAMP sein (Goulding *et al.*, 1992). Nakamura findet beim CNG-Kanal aus olfaktorischen Neuronen des Froschs Aktivierungskonstanten von 2-5 μ M für cAMP (in vier von fünf Versuchen, in einem 40 μ M) und von 1-2 μ M für cGMP (in vier von sechs Versuchen, in zweien 20 μ M, Nakamura & Gold, 1987). In allen Fällen sind die maximal

aktivierbaren Stromamplituden der CNG-Kanäle aus olfaktorischem Gewebe für cAMP bzw. cGMP gleich. Es ist auszuschließen, daß das Gleichwerden der Aktivierungskonstanten für cGMP bzw. cAMP in den Messungen von Goulding *et al.* auf möglicherweise unterschiedlichen Wechselwirkungen mit anderen Untereinheiten zurückzuführen ist, da sich der *in situ* gemessene Kanal diesbezüglich nicht von den heterolog exprimierten α -Untereinheiten des Kanals unterscheidet. Lediglich die gelegentlich bei Nakamura beobachtete parallele Verschiebung der Ligandempfindlichkeit für beide Nukleotide könnte auf Wechselwirkungen mit möglicherweise auswaschbaren Untereinheiten zurückgeführt werden. Der absolute Unterschied in der Ligandempfindlichkeit zwischen dem nativen und heterolog exprimierten CNG-Kanal aus olfaktorischen Neuronen des Wels könnte auf unterschiedlichen biochemischen Modifikationen des Proteins nach der Translation beruhen.

Erste Versuche zur Aktivierung der Chimären (s. Abs. 4.5) durch cAMP deuten darauf hin, daß die Regulierung der durch cAMP maximal aktivierbaren Amplitude ebenfalls allosterisch erfolgt.

WELCHE KONFORMATIONSÄNDERUNGEN FÜHREN NACH ANBINDEN DES LIGANDEN ZUR AKTIVIERUNG DES PROTEINS?

Es existieren vier verschiedene Röntgenstrukturen des CAP: Die Kristallstruktur des in Gegenwart von cAMP kristallisierten CAP (Weber & Steitz, 1987), ein Analog des CAP (CAP91) in dem A144 (auf der D-Helix) gegen Threonin ausgetauscht ist in Gegenwart von cAMP (Weber *et al.*, 1987) und in Gegenwart von Adenosin und cAMP (Vaney *et al.*, 1989). Die vierte Röntgenstruktur stammt von einem CAP-DNA-Komplex (Schultz *et al.*, 1991).

- Keine der Röntgenstrukturen kann Auskunft darüber geben, welche Konformationsänderungen zur Aktivierung führen, da die Bindestelle noch nicht ohne Ligand kristallisiert werden konnte.
- Möglicherweise gibt auch die Röntgenstruktur nicht die aktive Konformation wieder. In den ohne DNA kristallisierten Formen des CAP sind die Monomere in unterschiedlichen Konformationen zu einem Dimer zusammengelagert. Beide Konformationen unterscheiden sich im Winkel, der zwischen der großen, N-terminalen, Nukleotid-bindenden und der kleinen, mit der DNA wechselwirkenden C-terminalen Domäne gebildet wird. Unterschiedliche Konformationen von Homodimeren werden z.B. auch beim Insulin gefunden (Bentley *et al.*, 1976). Weder in NMR-Analysen noch in der DNA-gebundenen, aktiven Form des CAP werden zwei unterschiedliche Konformationen für die beiden Untereinheiten des Dimers gefunden.

- Die vorliegenden elektrophysiologischen Daten zur Aktivierung der CNG-Kanäle können nur sehr eingeschränkt Hinweise auf mögliche Konformationsänderungen geben, da die energetischen Anteile der Bindung nicht von denen der Aktivierung unterschieden werden können.
- CAP liegt als Dimer vor, als Monomer wird es nur unter denaturierenden Bedingungen gefunden (Anderson *et al.*, 1971; Riggs *et al.*, 1971). Im Dimer können eine oder zwei Bindestellen besetzt sein. Bei cAMP-Konzentrationen unterhalb von 100 μM liegt einfach ligandiertes CAP vor, in Gegenwart millimolarer cAMP-Konzentrationen werden beide Bindestellen besetzt.
- Die Struktur des CAP-Dimers mit einem bzw. zwei gebundenen Liganden ist unterschiedlich (Heyduk & Lee, 1990; Heyduk & Lee, 1989; Tan *et al.*, 1991; Heyduk *et al.*, 1992).
- Die Konformationsänderungen beim Übergang von der unligandierten zur einfach ligandierten Form sind gering (DeGrazia *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1991; Gronenborn & Clore, 1982; Butler *et al.*, 1993).
- Die Bindung des ersten Liganden führt zur Aktivierung (Fried & Crothers, 1984; Garner & Revzin, 1982; Heyduk & Lee, 1990; Heyduk & Lee, 1989).
- Die Konformationsänderungen des CAP sind allosterisch und lassen sich in unterschiedliche Klassen einteilen: (als Übersicht siehe Kolb *et al.*, 1993):
 - Freies CAP bindet DNA unspezifisch und mit geringer Affinität.
 - Der CAP-cAMP Komplex bindet DNA spezifisch und mit hoher Affinität.
 - Ohne cAMP ist das Protein unempfindlicher gegenüber Proteolyse.
 - Die beiden Cysteine in Aminosäureposition 178 können in Gegenwart von cAMP durch Dithiobis-2-nitrobenzoesäure kovalent verbunden werden, in Abwesenheit von cAMP nicht.
 - Die Bindung von Fluoreszenzmarkern gibt unterschiedliche Signale in Gegenwart bzw. Abwesenheit von cAMP.
- Es gibt drei Arten von Agonisten, die unterschiedliche Konformationsänderungen bewirken (Ebright *et al.*, 1985):
 - Volle Aktivierung (bis zur Initiierung der Transkription des regulierten Gens),
 - Konformationsänderungen, die nicht zur Aktivierung (im Sinne der Transkription) führen, sowie
 - Bindung ohne Konformationsänderungen.

Verschiedene zyklische Nukleotide binden an CAP, aktivieren es jedoch nicht (unter anderem auch cGMP, Anderson *et al.*, 1972; Ebright *et al.*, 1985; Scholubbers *et al.*, 1984). Experimentelle Hinweise auf die Art der allosterischen Konformationsänderungen ergeben sich hauptsächlich aus den Mutationsstudien von S. Garges und S. Adhya (Ryu *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1992; Garges & Adhya, 1985). Im wesentlichen handelt es sich um eine Reorientierung der Helices C und D, die sich aufeinander zu bewegen und damit die zur DNA-Bindung wichtige Helix F freigeben. Für die Reorientierung der C und D Helices ist der als "Gelenk-Region" bezeichnete Sequenzbereich zwischen Aminosäure 133 und 140 im CAP besonders wichtig (Ryu *et al.*, 1993).

Durch proteolytischen Abbau läßt sich ein Fragment des CAP erzeugen, daß bei Aminosäure 116 aufhört (in der ersten Windung der Helix C). Dieses Protein bindet nach wie vor cAMP und bildet Dimere, obwohl die Hauptkontakte zwischen den Dimeren in der Röntgenstruktur durch die Helix C gebildet werden (Ebright, 1986). Es ist fraglich, ob die Struktur der jeweils gebildeten Dimere gleich ist: Bei höherer Protein-Konzentration lagern sich CAP Dimere zu Multimeren zusammen. Diese Multimerisierung soll jedoch keinen Einfluß auf die Struktur haben (DeGrazia *et al.*, 1990). Es kann als sicher angesehen werden, daß der C-terminale Proteinteil des CAP nicht erforderlich ist, um die Struktur der Bindetasche zu erhalten (Clare & Gronenborn, 1982; A. Gronenborn, persönliche Mitteilung).

Wie in Abs. 4.10 diskutiert, bietet die Sekundärstrukturvorhersage keine zusätzlichen Anhaltspunkte für die Bindestelle. Die Vorhersagewerte weichen zu stark von der Röntgenstruktur ab (s. Abb. 4.73). Kypr *et al.* haben aus der deutlich unter dem statistischen Mittelwert liegenden Erfolgsquote (23 % Übereinstimmung zwischen der Röntgenstruktur und den Sekundärstrukturvorhersagen in der Nukleotid bindenden Domäne des CAP) geschlossen, daß die Sekundärstruktur ohne cAMP unterschiedlich von der in Gegenwart von cAMP sein muß. Sie finden in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten ein starkes α -helikales Signal zwischen Aminosäure 68 und 108 (β -Faltblatt 6 bis Helix B, Kypr & Mrázek, 1985). Sie gehen davon aus, daß Helix C den stabilsten Teil der Bindetasche bildet. Die Bindung des Liganden erfolgt nach ihrem Modell zunächst an Helix C, als nächsten Schritt nehmen sie eine Helix-Sheet Isomerisierung an. Das Modell von Kypr *et al.* steht jedoch im Widerspruch zu Gronenborn und Heyduk, die keine großen Konformationsänderungen beim Übergang CAP $\rightarrow$ CAP-cAMP I finden.

Bei CNG-Kanälen lassen sich unterschiedliche Modi der Aktivierung durch Konformationsänderungen in der Bindestelle vorstellen:

Zunächst muß geklärt werden, ob die Bindung des Nukleotids zu einer Konformationsänderung führt, die direkt die Pore öffnet (wenn z.B. die freie Bindestelle die Pore "verstopft", oder irgendeine Form autoinhibitorischer Wechselwirkung zum Schließen der Pore führt). Alternativ ist denkbar, daß Konformationsänderungen von der Bindestelle auf Aminosäuren in der Pore übertragen werden, und dadurch den Permeationsweg freigeben. Letztlich wäre denkbar, daß

die Bindestelle nur indirekt an der Aktivierung beteiligt ist, indem sie nach Binden von Ligand z.B. dem S4-Motiv eine größere Beweglichkeit erlaubt und diese (spannungsabhängigen) Bewegungen dann letztlich zur Öffnung der Pore führen.

Im Vergleich der allosterischen Aktivierungsschritte des CAP ist interessant, daß der ROD durch cGMP aktivierbar bleibt, wenn die Helix C am N-terminalen Ende abgeschnitten wird (die Position entspräche funktionell dem Beginn der im CAP essentiellen Gelenk-Region, vgl. Abs. 4.10).

Trotzdem ist noch nicht geklärt, ob die Helix C der CNG-Kanalbindestelle sich ähnlich dem CAP-Dimer mit einer zweiten Bindestelle zusammenlagert (dann wäre eine pentamere Struktur des Kanals äußerst unwahrscheinlich), oder ob sie sich möglicherweise an andere Proteindomänen des Kanals anlagert.

Die Helix C hat entfernte Sequenzähnlichkeit zur Calmodulin Bindestelle von calmodulinabhängigen Proteinkinasen (Daten nicht gezeigt). In calmodulinabhängigen Proteinkinasen liegt die Calmodulin Bindestelle in der Sequenz nahe bei einer autoinhibitorischen Domäne. Anbinden des Calmodulins aktiviert die Kinase durch Aufheben der Autoinhibition (Payne *et al.*, 1988). Wenn die Helix nicht mit der Helix einer anderen Bindestelle wechselwirkt, wäre ein analoger Aktivierungsmechanismus zur calmodulinabhängigen Proteinkinase denkbar. Ein solcher Mechanismus ist auch dann denkbar, wenn die Helix C frei zum Zytoplasma weist und andere, besser konservierte Sequenzabschnitte (z.B. zwischen $\beta 2$ und $\beta 4$) an der Weitergabe der Konformationsänderung beteiligt sind.

MÖGLICHE STRUKTURELLE URSACHEN DER KOOPERATIVITÄT BEI CNG-KANÄLEN:

Im CAP-Dimer ist die Kooperativität der Bindung der beiden Liganden negativ ($n = 0,3$). Die Kooperativität ist jedoch stark von der Ionenstärke abhängig: Unter physiologischen Bedingungen (200 mM) ist $n = 0,3$. Bei einer Ionenstärke von 400 mM ist n etwa eins und bei einer Ionenstärke von 600 mM ist $n = 2,3$ (Ebright, 1986). Außerdem verändern sich die Dimerisierungskonstanten in Abhängigkeit von der Ionenstärke (Brown & Crothers, 1989).

Die Nukleotid-Bindestellen der cAPK bzw. cGPK liegen als Dimere auf einem Polypeptid vor. In der cGPK liegen außerdem die katalytische und die beiden regulatorischen Domänen auf einem Polypeptid. Die Nukleotid-Bindestellen liegen C-terminal von der katalytischen Domäne (vgl. Abb. 4.73). CNG-Kanäle besitzen nur eine Nukleotid-Bindestelle pro Untereinheit, die Bindestellendomäne liegt in der Sequenz C-terminal zur Pore.

In beiden Kinase-Familien existieren die aktiven Molekülformen als Dimere. Es sind also jeweils vier Nukleotid-Bindestellen in einem Dimer vorhanden. Die Orientierung der Dimere ist antiparallel mit Kopf an Kopf Kontakten im N-terminalen Sequenzbereich. Es ist ungeklärt, wie die beiden Monomere miteinander wechselwirken und wie die regulatorischen Untereinheiten mit den katalytischen Untereinheiten wechselwirken.

Die beiden Bindestellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sequenz, ihrer Affinität und ihrer Struktur (geschlossen aus Bindungsstudien mit Nukleotidanaloga, Corbin *et al.*, 1982; Doskeland *et al.*, 1983; Corbin & Doskeland, 1983). Nach Anbinden von zwei Liganden pro regulatorischer Untereinheit wird die Autoinhibition der katalytischen Untereinheit durch die regulatorische Untereinheit aufgehoben (Kuno *et al.*, 1989). Das Enzym ist aktiv.

Die C-terminale Bindestelle (B) ist für Nukleotide leichter erreichbar, Nukleotidbindung an Bindestelle B macht Bindestelle A leichter erreichbar, Nukleotidbindung an Bindestelle A führt zur Aktivierung (Ogreid & Doskeland, 1981). Der Hill-Koeffizient (n) liegt typischerweise bei 1,5 - 1,6, die primäre Ursache der Kooperativität liegt in Wechselwirkungen zwischen den beiden Bindestellen einer regulatorischen Domäne (Ogreid *et al.*, 1985; Ringheim & Taylor, 1990).

Bei CNG-Kanälen legt die zeitlich parallele Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante und des Hill-Koeffizienten den Schluß nahe, daß Kooperativität im wesentlichen aus dem transmembranalen Bereich des Proteins stammt. Die im Vergleich zur Veränderung der Aktivierungskonstante beim ROD langsamere zeitliche Veränderung des Hill-Koeffizienten deutet darauf hin, daß die damit verbundenen Veränderungen der Proteinstruktur komplexer sind als die zur raschen Veränderung der Aktivierungskonstante führenden. Die Versuche nach Inkubation mit NEM (Abs. 4.8) zeigen, daß auch die Kooperativität auf allosterische Wechselwirkungen zurückgeht, da es sowohl möglich ist, die Kooperativität durch NEM unabhängig von der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungskonstante zu verändern, während die Veränderung in den Langzeitversuchen zeitlich parallel zur Veränderung der K_a/V -Kurve verläuft.

6 SUMMARY

OBJECTIVE AND METHODS

Cyclic nucleotide-gated channels (CNG-channels) form a novel class of ionic channels: they share structural properties with voltage-dependent potassium channels and functional properties with ligand-gated channels. CNG-channels were first detected in vertebrate photoreceptors and olfactory sensory neurons, where they play a crucial role in signal transduction.

CNG-channels are directly and cooperatively activated by binding of 3',5'-cGMP or 3',5'-cAMP to intracellular binding sites of the polypeptide. The existence of one binding site per subunit was predicted from sequence homology with cyclic nucleotide-dependent protein kinases and the catabolite gene activator protein (CAP) of *E. coli*.

The patch-clamp technique has been applied to study the electrophysiological properties of cloned CNG-channel α -subunits expressed in *Xenopus* oocytes. Mutant and chimaeric channels were expressed for examining structure-function relationships. A homology model of the cyclic nucleotide-binding site based on structure prediction methods and the crystal structure of the CAP protein was developed.

EXPRESSION OF CLONED WILD TYPE CNG-CHANNEL α SUBUNITS

Cloned α -subunits of CNG-channels from bovine rods (ROD) and olfactory neurons (OLF), chicken rods (ChRod) and cones (ChCone) and an α -subunit cloned from a cDNA library specific for rabbit aorta tissue (Herz) were heterologously expressed and characterised electrophysiologically. From this group of channels, *in situ* data are available only for the bovine rod CNG-channel. Therefore structure-function relationships are based mainly on the comparison of the functional properties of the cloned α -subunits.

The ionic selectivities for monovalent cations were determined from reversal-potential measurements under symmetrical biionic conditions. The permeability ratios P_i / P_{K^+} calculated from V_{rev} according to the Goldman-Hodgkin-Katz equation yielded the following series of ion selectivity:

$$NH_4 > K > Na > Li > Rb > Cs$$

For the ROD channel, the positions of potassium and sodium were exchanged. The relative preference of ammonium over caesium is about 5-fold.

The permeabilities determined from macroscopic current amplitudes at +80 mV showed characteristic differences for sodium, potassium and rubidium, lithium, respectively: The ROD and ChCone channels are more conductive for potassium than sodium and more conductive for lithium than rubidium, whereas the Herz and OLF channels are more conductive for sodium

than potassium and more conductive for rubidium than lithium. In all cases, ammonium was most conductive, caesium least.

Blockage by l-cis-diltiazem and amiloride was tested for the ROD and OLF channel. The ROD channel is half-maximally blocked by l-cis-diltiazem at 55 μM (+80 mV), the OLF channel is insensitive to blockage by l-cis-diltiazem when expressed in *Xenopus* oocytes. Both channels are blocked in a strongly voltage dependent manner by amiloride. Half-maximal blockage occurs at about 200 μM (+80 mV).

REGULATION OF LIGAND SPECIFICITY

Although the biochemical transduction pathway of the olfactory system is not yet fully understood, cAMP is considered to be the major cyclic nucleotide involved in olfaction, whereas cGMP is the internal messenger of vertebrate photoreception. Nevertheless, all of the examined CNG-channel polypeptides were more sensitive to activation by cGMP than cAMP when expressed in *Xenopus* oocytes. For the bovine ROD and OLF channels, the difference is about 10- to 15-fold. Mutating a single amino acid in the cyclic nucleotide binding site of both channels was sufficient to abolish the difference in ligand specificity for the ROD and OLF channels. The effect of this exchange was partially predicted by models based on the cyclic nucleotide binding sites of cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. The results indicate that an additional H-bond between the 2-amino group of cGMP with Threonine 560 in the ROD channel (or T537 in the OLF channel) is sufficient to explain the difference in the affinity for cGMP and cAMP.

REGULATION OF LIGAND SENSITIVITY

The OLF channel is 15- to 30-fold more sensitive to both cyclic nucleotides than the ROD channel. Chimaeric recombinant cDNAs were constructed from the ROD and OLF channel and the activation by cGMP of the expressed channel proteins was examined. Sixteen of 21 chimera were functional. Surprisingly, the exchange of the binding site itself did not alter the activation properties significantly. Deletion or exchange of the N-terminal intracellular domains produced indifferent channel polypeptides with intermediate activation constants compared to the respective wild type channels. In both pairs of chimaera, the polypeptide consisting of the C-terminal 75 % of the respective wild type sequence donor is unable to determine a ligand sensitivity specific for the ROD or the OLF channel. The intracellular N-terminal domain has the largest effect on the ligand sensitivity. The effect of the OLF N-terminus is more pronounced than the effect of the ROD N-terminus. Exchanging the H5-H6 domain produces

channel phenotypes with a 3.5-fold change in the activation constant: If the domain originates from the OLF channel, the activation constant decreases 3.5 fold, if the domain originates from the ROD channel, the activation constant increases.

The ligand sensitivity of CNG-channels is regulated in an allosteric manner; the interactions between the different domains of an α -subunit polypeptide with each other differ quantitatively and qualitatively in the ROD and OLF channel polypeptides.

VOLTAGE DEPENDENCE OF NUCLEOTIDE-DEPENDENT CHANNEL ACTIVATION

It was impossible however, to deduce a structural model of channel activation, that would allow to explain the observed changes of the cGMP-activation constants in a qualitative and quantitative manner. Therefore, a more sophisticated analysis of the nucleotide-dependent channel activation was performed by examining the voltage dependence of the activation constant and the Hill coefficient. The Hill coefficient was independent from the applied transmembrane voltage under all experimental conditions, whereas the voltage dependence of activation proved to be a specific and useful parameter for the macroscopic characterisation of CNG-channel activation.

A mutant exchanging three OLF-specific amino acids in the S4-motif of the ROD channel indicates that the observed difference in the voltage dependence of the activation constant between the ROD and OLF channel is mainly due to an Arginine/Histidine exchange in the voltage sensor of the OLF channel.

Computer modeling and further mutagenesis studies will be necessary in order to resolve the complex interplay of voltage- and nucleotide-dependent activation steps in CNG-channels.

SINGLE-CHANNEL ANALYSIS

Preliminary single-channel experiments were performed to explain the macroscopical activation characteristics in terms of single-channel conductance and open probability. Single channel amplitudes of the channel polypeptides examined so far ranged between 17 and 35 pS. The single-channel conductance of several chimaeric channels containing the pore-region of the OLF channel was largely unchanged compared to the OLF wild type. Furthermore the ionic selectivity of a chimaeric channel consisting of OLF sequence in the H1-H6 region and of ROD sequence in the C- and N-termini was unchanged compared to the OLF wild type, thus indicating that the intracellular domains do not influence the permeation pathway of the channel.

The single-channel *i/V*-curve of several OLF-related chimaera was independent from nucleotide concentration and could be well fitted to the shape of macroscopic *I/V*-curves recorded in

the presence of saturating cGMP concentrations. The maximal open probability of the OLF channel was 98 % and independent of the applied transmembrane voltage, yielding an effective gating charge of zero. In this case, the steepness of the K_a/V -curve is a measure of the voltage dependent modulation of the open probability. However, more kinetic data will be required to set up a mathematical model of voltage- and nucleotide-dependent channel gating.

SLOW KINETIC PROCESSES AND EVIDENCE FOR THE MECHANISM OF COOPERATIVITY

The development of a stepper-motor controlled perfusion system with enhanced on-line analysis features of pClamp for the first time allowed the examination of CNG-channel properties under nucleotide concentration-, time- and voltage-clamp conditions simultaneously. Thus, it was possible to distinguish systematic and random factors contributing to the observed variability of the activation parameters. Random factors such as the variability of the activation constant, the variability of rectification characteristics from patch to patch or the occasionally observed voltage- and nucleotide-dependent inactivation of the channels might result from differences in lipid-protein or protein-protein interactions during seal formation and patch excision. In addition, systematic, time-dependent changes of channel function were observed. The activation constant of the OLF and Herz channels remains constant for about 30 to 40 minutes, whereas the activation constant of the ROD decreases exponentially with a time constant of 20 minutes. Initial studies of time-dependent changes in the activation parameters of chimaeric channels indicates that long-term changes in channel behaviour might give further insight into the complex interactions of different domains of the polypeptide that are involved in channel activation. For instance, the decay of the voltage dependence of open probability (as determined from the voltage dependence of the macroscopic activation constant) shows the same time dependence as the decay of the Hill coefficient, and thus these parameters seem to be related mechanistically. On the other hand, the decrease in cooperativity observed after incubation with N-ethyl-maleimide is not accompanied with a decrease in the voltage-dependence of the open probability.

Using a maximum likelihood optimisation approach to single-channel analysis it could be shown that the distribution of subconductance levels is a highly time-dependent process.

SECONDARY STRUCTURE PREDICTION AND COMPUTER MODELING

A neural network program and analysis of the amphipathic moment was used for secondary structure prediction of related protein families: Shaker potassium channels, cyclic nucleotide-dependent protein kinases, CAP and CNG-channels. CNG-channels show sequence homology to the catalytic and regulatory subunits of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and to the S3-S6 domain of Shaker potassium channels.

A homology model of the CNG-channel nucleotide-binding site was build using the X-ray structure of the CAP nucleotide binding-site as a template. The model is unambiguous, if the conserved Glycine residues in β -strands turns of the Swiss-roll structure in CAP are interpreted to indicate a common tertiary structure. The relative orientation of the binding site with respect to the transmembrane channel domains remains to be examined and further experiments are necessary to identify those amino acids that participate in relaying the conformational change from the binding site to the rest of the protein.

A 6-transmembrane domain model with an additional hairpin structure forming the ionic pathway is in agreement with the prediction values for the central part of the channel sequence. The distribution of conserved and unconserved residues predicts possible lipid contacts for H1 to H3, if these domains form α -helices. H3 gave the weakest hints for an α -helical secondary structure.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adair, G.S. (1925) The Hemoglobin System. VI. The Oxygen Dissociation of Hemoglobin. *J.Biol.Chem.* 63:529-545
- Ahmad, I., Cummins, D. & Barnstable, C.J. (1992a) Rat Retinal Ganglion Cells Express a cGMP-Gated Ion Channel. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* Suppl.:940
- Ahmad, I., Korbmacher, C., Segal, A.S., Cheung, P., Boulpaep, E.L. & Barnstable, C.J. (1992b) Mouse Cortical Collecting Duct Cells Show Nonselective Cation Channel Activity and Express a Gene Related to the cGMP-Gated Rod Photoreceptor Channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:10262-10266
- Alexander, S.S. & Bellerby, C.W. (1937) Experimental Studies on the Sexual Cycle of the South African Clawed Toad (*Xenopus laevis*). I. *J.Exp.Biol.* 15:74-81
- Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bönigk, W. & Kaupp, U.B. (1991) Control of Ligand Specificity in Cyclic Nucleotide-Gated Channels from Rod Photoreceptors and Olfactory Epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:9868-9872
- Altenhofen, W. & Kaupp, U.B. (1993) Family of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. In: *Molecular Mechanism of Generation of Electric Signals in Sensory Cells. Proceedings of the 18th Taniguchi International Symposium, Biophysics Division*. Tokunaga, F. (Hrsg.), The Taniguchi Foundation, Kyoto, pp. 159-173.
- Altenhofen, W., Erkens, H. & Kaupp, U.B. (1993) Efficient and Inexpensive Perfusion System Combined with Enhanced Online Graphic Analysis Features of Clampex (in Vorbereitung)
- Alvarez-Leefmans, F.J. (1992) Extracellular Reference Electrodes. In: *Practical Electrophysiological Methods*. Kettenmann, H. & Grantyn, R. (Hrsg.), Wiley-Liss, New York, pp. 171-182.
- Anderson, C.S., MacKinnon, R., Smith, C. & Miller, C. (1988) Charybdotoxin Block of Single Ca^{2+} Activated K^{+} Channels: Effects of Channel Gating, Voltage, and Ionic Strength. *J.Gen.Physiol.* 91:317-334
- Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J. & Gaber, R.F. (1992) Functional Expression of a Probable *Arabidopsis Thaliana* Potassium Channel in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:3736-3740
- Anderson, W.B., Perlman, R.L. & Pastan, I. (1972) Effect of Adenosine 3',5'-Monophosphate Analogues on the Activity of the cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Receptor in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 247:2717-2722
- Anderson, W.B., Schneider, A.B., Emmer, M., Perlman, R.L. & Pastan, I. (1971) Purification of and Properties of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Receptor Protein which Mediates Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Gene Transcription in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 246:5929-5937

- Andres, G., Bretscher, A., Lehmann, F.E. & Roth, D. (1948) Einige Verbesserungen in der Haltung und Aufzucht von *Xenopus laevis*. *Experientia* 5:83-84
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* 181:223-230
- Atkinson, R.A., Saudek, V., Huggins, J.P. & Pelton, J.T. (1991) H-1 NMR and Circular Dichroism Studies of the N-Terminal Domain of Cyclic GMP Dependent Protein Kinase - A Leucine/Isoleucine Zipper. *Biochemistry* 30:9387-9395
- Auerbach, A. & Sachs, F. (1984) Patch Clamp Studies of Single Ionic Channels. *Ann.Rev.Biophys.Bioeng.* 13:269-302
- Auerbach, A. & Sachs, F. (1985) High-Resolution Patch-Clamp Techniques. In: *Voltage and Patch Clamping With Microelectrodes*. Smith, T. G. J., Lecar, H., Redman, S. J. & Gage, P. W. (Hrsg.), American Physiological Society, Bethesda, pp. 121-149.
- Bacigalupo, J., Johnson, E.C., Vergara, C. & Lisman, J.E. (1991) Light-Dependent Channels from Excised Patches of *Limulus* Ventral Photoreceptors Are Opened by cGMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:7938-7942
- Bader, C.R., MacLeish, P.R. & Schwartz, E.A. (1979) A Voltage-Clamp Study of the Light Response in Solitary Rods of the Tiger Salamander. *J.Physiol.London* 296:1-26
- Ball, F.G. & Sansom, M.S.P. (1988) Single-Channel Autocorrelation Functions - the Effects of Time Interval Omission. *Biophys.J.* 53:819-832
- Ball, F.G., Davies, S.S. & Sansom, M.S.P. (1990) Single-Channel Data and Missed Events: Analysis of a Two-State Markov Model. *Proc.R.Soc.Lond.B* 242:61-67
- Ball, F.G., Chen, A. & Sansom, M.S.P. (1992) Poisson Sampling-Based Inference for Single Ion Channel Data with Time Interval Omission. *Proc.R.Soc.Lond.B* 250:263-269
- Bard, Y. (1970) Comparison of Gradient Methods for the Solution of Nonlinear Parameter Estimation Problems. *SIAM J.Numer.Anal.* 7:157-186
- Barlow, R. & Blake, J.F. (1989) Hill Coefficients and the Logistic Equation. *Trends Pharmacol.Sci.* 10:440-441
- Barnard, E.A., Miledi, R. & Sumikawa, K. (1982) Translation of Exogenous Messenger RNA Coding for Nicotinic Acetylcholine Receptors Produces Functional Receptors in *Xenopus* Oocytes. *Proc.R.Soc.Lond.B* 215:241-246
- Barry, P.H. & Diamond, J.M. (1970) Junction Potentials, Electrode Standard Potentials, and Other Problems in Interpreting Electrical Properties of Membranes. *J.Membr.Biol.* 3:93-12
- Barry, P.H. (1989) Ionic Permeation Mechanisms in Epithelia: Bionic Potentials, Dilution Potentials, Conductances, and Streaming Potentials. *Meth.Enzymol.* 171:678-715

- Barth, L.G. & Barth, L.J. (1959) Differentiation of Cells of the *Rana Pipiens* Gastrula in Unconditioned Medium. *J.Embryol.Exp.Morph.* 7:210-221
- Bataillon, E. (1911) Les deux facteurs de la parthenogénèse traumatique chez les amphibiens. *Compt.Rend.* 152:920
- Batut, J., Daveran-Mingot, M.-L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A.M. & Kahn, D. (1989) FixK, a Gene Homologous with *fir* and *crp* from *Escherichia Coli*, Regulates Nitrogen Fixation Genes Both Positively and Negatively in *Rhizobium Meliloti*. *EMBO J.* 8:1279-1286
- Baulieu, E.-E., Godeau, F., Schorderet, M. & Schorderet-Slatkine, S. (1978) Steroid Induced Meiotic Division in *Xenopus laevis* Oocytes: Surface and Calcium. *Nature* 275:593-598
- Baylor, D.A. & Nunn, B.J. (1986) Electrical Properties of the Light-Sensitive Conductance of Salamander Rods. *J.Physiol.London* 371:115-145
- Bellerby, C.W. (1933) The Endocrine Factors Concerned in the Control of the Ovarian Cycle. I. *Xenopus laevis* as a Test Animal. *Biochem.J.* 27:615-620
- Bellerby, C.W. (1934) A Rapid Test for the Diagnosis of Pregnancy. *Nature* 133:494-495
- Bellerby, C.W. (1938a) Experimental Studies on the Sexual Cycle of the South African Clawed Toad (*Xenopus laevis*) III. *J.Exp.Biol.* 15:91-100
- Bellerby, C.W. (1983b) Experimental Studies on the Sexual Cycle of the South African Clawed Toad (*Xenopus laevis*) II. *J.Exp.Biol.* 15:82-90
- Bennett, N., Ildefonse, M., Crouzy, S., Chapron, Y. & Clerc, A. (1989) Direct Activation of cGMP-Dependent Channels of Retinal Rods by the cGMP Phosphodiesterase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:3634-3638
- Bentley, G., Dodson, E., Dodson, G., Hodgkin, D. & Mercola, D. (1976) Structure of Insulin in 4-Zinc Insulin. *Nature* 261:166-168
- Berk, L. (1938) Studies in the Reproduction of *Xenopus laevis*. I. The Relation of External Environmental Factors to the Sexual Cycle. *S.Afr.Jour.Med.Sci.* 3:72-77
- Berkowitz, B.A., Bevins, C.L. & Zasloff, M.A. (1990) Magainins: A New Family of Membrane-Active Host Defense Peptides. *Biochem.Pharmacol.* 39:625-629
- Bertrand, D., Cooper, E., Valera, S., Rungger, D. & Ballivet, M. (1991) Electrophysiology of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes Following Nuclear Injection of Genes or cDNAs. *Meth.Neurosci.* 4:174-193
- Biel, M., Altenhofen, W., Hullin, R., Ludwig, J., Freichel, M., Flockerzi, V., Kaupp, U.B. & Hofmann, F. (1993) Primary Structure and Functional Expression of a Cyclic Nucleotide-Gated Channel from Rabbit Aorta. *FEBS Letts.* 329:134-138
- Blatz, A.L. & Magleby, K.L. (1986) Correcting Single-Channel Data for Missed Events. *Biophys.J.* 49:967-980

- Bles, E.J. (1905) The Life-History of *Xenopus laevis*, Daudin. *Trans.roy.Soc.Edinb.* 41(3):789-821
- Blundell, T.L., Sibanda, B.L., Sternberg, M.J.E. & Thornton, J.M. (1987) Knowledge-Based Prediction of Protein Structures and the Design of Novel Molecules. *Nature* 326:347-352
- Bonath, K. (1977) Narkose der Amphibien. In: *Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische*. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, pp. 63-98.
- Bové, F.J. (1992) MS-222 Sandoz. *Das Anaesthetikum und Sedativum für Fische, Frösche und andere Kaltblütler*. Sandoz, Druck-Nr. 3350/401,
- Boyle, M.B. & Kaczmarek, L.K. (1991) Electrophysiological Expression of Ion Channels in *Xenopus* Oocytes. *Meth.Neurosci.* 4:157-173
- Bönigk, W., Altenhofen, W. & Kaupp, U.B. (1992) Primary Structure and Functional Expression of cGMP-Gated Channels from Chicken Rod and Cone Photoreceptors. *Biophys.J.* 61:A514(Abstract)
- Bönigk, W. (1993) *Klonierung und Expression von cGMP-gesteuerten Kanälen aus Sebstäbchen und Zapfen der Hühnernetzhaut*. Dissertation, Universität Osnabrück, Osnabrück.
- Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dose, A., Illing, M., Molday, R.S. & Kaupp, U.B. (1993) Rod and Cone Photoreceptor Cells Express Distinct Genes for Cyclic GMP-Gated Channels. *Neuron* 10:865-877
- Brayton, C. (1992) Wasting Disease Associated with Cutaneous and Renal Nematodes, in Commercially Obtained *Xenopus laevis*. *Tropical Veterinary Medicine : Current Issues Perspectives* 197-201
- Brown, A.L. (1970) *The African Clawed Toad*. Butterworths, London.
- Brown, A.M. & Crothers, D.M. (1989) Modulation of the Stability of a Gene-Regulatory Protein Dimer by DNA and cAMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:7387-7391
- Browne, C.L. & Werner, W. (1984) Intracellular Junctions Between the Follicle Cells and Oocytes of *Xenopus laevis*. *J.exp.Zool.* 230:131-135
- Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D.P., Wei, A. & Salkoff, L. (1993) mSlo, a Complex Mouse Gene Encoding "Maxi" Calcium-Activated Potassium Channels. *Science* 261:221-224
- Butt, E., Van Bemmelen, M., Fischer, L., Walter, U. & Jastorff, B. (1990) Inhibition of Cyclic GMP Dependent Protein Kinase by Rp-3',5'-Monophosphorothioates. *FEBS Letts.* 263:47-50
- Cachelin, A.B., de Peyer, J.E., Kokubun, S. & Reuter, H. (1983) Sodium Channels in Cultured Cardiac Cells. *J.Physiol.London* 340:389-401

- Cameron, S.B. (1947) Successful Breeding of *Xenopus laevis*, the South African Clawed Toad. *Amer.Jour.Med.Tech.*, May
- Capovilla, M., Caretta, A., Cervetto, L. & Torre, V. (1983) Ionic Movements through Light-Sensitive Channels of Toad Rods. *J.Physiol.London* 343:295-310
- Changeux, J.P., Thiéry, J., Tung, Y. & Kittel, C. (1967) On the Cooperativity of Biological Membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 57:335
- Chen, T.Y., Peng, Y.W., Dhallan, R.S., Ahmed, B., Reed, R.R. & Yau, K.W. (1993) A New Subunit of the Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel in Retinal Rods. *Nature* 362:764-767
- Chua, K., Tytgat, J., Liman, E. & Hess, P. (1992) Membrane Topology of RCK1 K-Channels. *Biophys.J.* 61:A289(Abstract)
- Chung, S.H., Moore, J.B., Xia, L., Premkumar, L.S. & Gage, P.W. (1990) Characterization of Single-Channel Currents Using Digital Signal Processing Techniques Based on Hidden Markov Models. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B* 329:265-285
- Chung, S.H. & Kennedy, R.A. (1991) Forward-Backward Nonlinear Filtering Technique for Extracting Small Biological Signals From Noise. *J.Neurosci.Meth.* 40:71-86
- Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1982) Determination of the Conformations of Cyclic Nucleotides Bound to the N-terminal Core of the Cyclic AMP Receptor Protein of *Escherichia Coli* by 1H-NMR. *FEBS Letts.* 145:197-202
- Cochran, D.M. (1961) In: *Knaurs Tierreich in Farben, Amphibien*. Droemer, (Hrsg.), Knauer, München, Zürich, pp. 80-83.
- Cohen, B.N., Labarca, C., Davidson, N. & Lester, H.A. (1992) Mutations in M2 Alter the Selectivity of the Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor for Organic and Alkali Metal Cations. *J.Gen.Physiol.* 100:373-400
- Cohen-Armon, M., Sokolovsky, M. & Dascal, N. (1989) Modulation of the Voltage-Dependent Sodium Channels by Agents Affecting G-Proteins: A Study in *Xenopus* Oocytes Injected with Brain RNA. *Brain.Res.* 496:197-203
- Cole, K.S. (1949) Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Giant Axon. *Arch.Sci.Physiol.* 3:253-258
- Colman, A. (1987a) Translation of Eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* Oocytes. In: *Transcription and Translation*. Hames, B. D. & Higgins, S. J. (Hrsg.), IRL Press, 3. Aufl., pp. 270-302.
- Colman, A. (1987b) Expression of Exogenous DNA in *Xenopus* Oocytes. In: *Transcription and Translation*. Hames, B. D. & Higgins, S. J. (Hrsg.), IRL Press, 3. Aufl., pp. 38-68.
- Colquhoun, D. (1971) *Lectures on Biostatistics*. Clarendon Press, Oxford.

Colquhoun, D. & Hawkes, A.G. (1981) On the Stochastic Properties of Single Ion Channels. *Proc.R.Soc.Lond.B* 211:205-235

Colquhoun, D. & Sigworth, F.J. (1983) Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records. In: *Single-Channel Recording*. Sakmann, B. & Neher, E. (Hrsg.), Plenum Press, New York, London, pp. 191-264.

Cook, N.J., Hanke, W. & Kaupp, U.B. (1987) Identification, Purification, and Functional Reconstitution of the Cyclic GMP-Dependent Channel from Rod Photoreceptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:585-589

Corbin, J.D., Rannels, S.R., Flockhart, D.A., Robinson-Steiner, A.M., Tigani, M.C., Doskeland, S.O., Suva, R.H. & Miller, J.P. (1982) Effect of Cyclic Nucleotide Analogs on Intrachain Site I of Protein Kinase Isozymes. *Eur.J.Biochem.* 125:259-266

Corbin, J.D. & Doskeland, S.O. (1983) Studies of Two Different Intrachain cGMP-Binding Sites of cGMP-Dependent Protein Kinase. *J.Biol.Chem.* 258:11391-11397

Corbin, J.D., OGREID, D., Miller, J.P., Suva, R.H., Jastorff, B. & Doskeland, S.O. (1986) Studies of Cyclic GMP Analog Specificity and Function of the Two Intrachain Binding Sites of Cyclic GMP Dependent Protein Kinase. *J.Biol.Chem.* 261:1208-1214

Cornish-Bowden, A. & Koshland, D.E.J. (1975) Diagnostic Uses of the Hill (Logit and Nernst) Plots. *J.Mol.Biol.* 95:201-212

Corpet, F. (1988) Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucl.Acids Res.* 16:10881-10890

Crouzy, S.C. & Sigworth, F.J. (1990) Yet another Approach to Dwell-Time Omission Problem of Single-Channel Analysis. *Biophys.J.* 58:731-743

Croxton, T.L. (1988) A Model of the Gating of Ion Channels. *Biochim.Biophys.Acta* 946:19-24

Cruciani, R.A., Barker, J.L., Durell, S.R., Raghunathan, G., Guy, H.R., Zasloff, M. & Stanley, E.F. (1992) Magainin-2, a Natural Antibiotic from Frog Skin, Forms Ion Channels in Lipid Bilayer Membranes. *Eur.J.Pharmacol.Mol.Pharmacol.Sect.* 226:287-296

Dargemont, C. & Kühn, L.C. (1992) Export of messenger RNA from Microinjected Nuclei of *Xenopus laevis* Oocytes. *J.Cell Biol.* 118:1-9

Dascal, N. (1987) The Use of *Xenopus* Oocytes for the Study of Ion Channels. *CRC Crit.Rev.Biochem.* 22:317-387

Daudin, F.M. (1803) *Histoire naturelle des rainettes, des grenouilles et des crapauds*. Paris.

de Wit, R.J.W., Hekstra, D., Jastorff, B., Stec, W.J., Baraniak, J., Driel, R. & van Haastert, P.J.M. (1984) Inhibitory Action of Certain Cyclophosphate Derivatives of cAMP on cAMP-Dependent Protein Kinase. *Eur.J.Biochem.* 142:255-260

- DeGrazia, H., Harman, J.G., Tan, G.-S. & Wartell, R.M. (1990) Investigation of the cAMP Receptor Protein Secondary Structure by Raman Spectroscopy. *Biochemistry* 29:3557-3562
- Delgado, R., Hidalgo, P., Diaz, F., Latorre, R. & Labarca, P. (1991) A Cyclic AMP-Activated K⁺ Channel in Drosophila Larval Muscle Is Persistently Activated in Dunce. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:557-560
- Dempster, J. (1988) Computer Analysis of Electrophysiological Signals. In: *Microcomputers in Physiology*. Fraser, P. J. (Hrsg.), IRL Press, pp. 51-93.
- Dern, R. (1953) Der Einfluß verschiedener Belichtungszeiten auf Hypophyse, Schilddrüse und Larvenentwicklung von Rana temporaria. *Zool.Jagtb.Abt.3 Allg.Zool.u.Physiol.Tiere* 63:477-500
- Deuchar, E.M. (1975) *Xenopus: The South African Clawed Frog*. John Wiley & Sons, London.
- Dhallan, R.S., Yau, K.-W., Schrader, K.A. & Reed, R.R. (1990) Primary Structure and Functional Expression of a Cyclic Nucleotide-Activated Channel From Olfactory Neurons. *Nature* 347:184-187
- Dhallan, R.S., Macke, J.P., Eddy, R.L., Shows, T.B., Reed, R.R., Yau, K.-W. & Nathans, J. (1992) Human Rod Photoreceptor cGMP-Gated Channel: Amino Acid Sequence, Gene Structure, and Functional Expression. *J.Neurosci.* 12:3248-3256
- DiFrancesco, D. & Tortora, P. (1991) Direct Activation of Cardiac Pacemaker Channels by Intracellular Cyclic AMP. *Nature* 351:145-147
- Doskeland, S.O., OGREID, D., Ekanger, R., Sturm, P.A., Miller, J.P. & Suva, R.H. (1983) Mapping of Two Intrachain Cyclic Nucleotide Binding Sites of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate Dependent Protein Kinase I. *Biochemistry* 22:1094-1101
- Dostmann, W.R.G. & Taylor, S.S. (1991) Identifying the Molecular Switches That Determine Whether (Rp)-cAMP[S] Functions As an Antagonist or an Agonist in the Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase-I. *Biochemistry* 30:8710-8716
- Dryer, S.E. & Henderson, D. (1991) A Cyclic GMP-Activated Channel in Dissociated Cells of the Chick Pineal Gland. *Nature* 353:756-758
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of Oocyte Development in Laboratory Maintained Animals. *J.Morph.* 136:153-180
- Durell, S.R. & Guy, H.R. (1992) Atomic Scale Structure and Functional Models of Voltage-Gated Potassium Channels. *Biophys.J.* 62:238-250
- Ebright, R.H., Le Grice, S.F.J., Miller, J.P. & Krakow, J.S. (1985) Analogs of Cyclic AMP that Elicit the Biochemically Defined Conformational Change in Catabolite Gene Activator Protein (CAP) but do not Stimulate Binding to DNA. *J.Mol.Biol.* 182:91-107

Ebright, R.H. (1986) *Structure Function Studies with the Catabolite Gene Activator Protein (CAP) of Escherichia coli*. Thesis, Harvard University, Cambridge.

Eisenberg, D., Weiss, R.M. & Terwilliger, T.C. (1982a) The Helical Hydrophobic Moment: A Measure of the Amphiphilicity of a Helix. *Nature* 299:371-374

Eisenberg, D., Weiss, R.M., Terwilliger, T.C. & Wilcox, W. (1982b) Hydrophobic Moments and Protein Structure. *Faraday Symp.Chem.Soc.* 17:109-120

Eisenberg, D., Weiss, R.M. & Terwilliger, T.C. (1984) The Hydrophobic Moment Detects Periodicity in Protein Hydrophobicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:140-144

Eisenberg, D., Wesson, M. & Wilcox, W. (1989) Hydrophobic Moments as Tools for Analyzing Protein Sequences. In: *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*. Fasman, G. D. (Hrsg.), Plenum Press, New York, London, pp. 635-646.

Elkan, E.R. (1939) *Xenopus laevis*, Daudin. Problems and Observations. *Aquarist and Pondkpr.* 9:95-100

Elkan, E. (1957) *Xenopus laevis* Daudin. In: *UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. UFAW (The Universities Federation for Animal Welfare), London, 2. Aufl., pp. 804-815.

Elkan, E. & Muray, R.W. (1952) A Larval Trematode Infection of the Lateral Line System of the Toad *Xenopus laevis*. *Proc.Zool.Soc.Lond.* 122:121-126

Elsdale, T.R., Gurdon, J.B. & Fischberg, M. (1960) A Discription of the Technique for Nuclear Transplantation in *Xenopus laevis*. *J.Embryol.Exp.Morph.* 8:437

Eppig, J. & Dumont, J.N. (1976) Defined Nutrient Medium for the in Vitro Maintenance of *Xenopus laevis* Oocytes. *In Vitro* 12:418-427

Fantham, H.B. (1919) Some Parasitic Protozoa Found in South Africa - II. *S.Afr.J.Sci.* 16:185-191

Fantham, H.B. (1923) Some Parasitic Protozoa Found in South Africa - VI. *S.Afr.J.Sci.* 20:493-500

Fenwick, E., Marty, A. & Neher, E. (1982) A Patch-Clamp Study of Bovine Chromaffin Cells and of their Sensitivity to Acetylcholine. *J.Physiol.London* 331:577-597

Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. & Lyubarsky, A.L. (1985) Induction by Cyclic GMP of Cationic Conductance in Plasma Membrane of Retinal Rod Outer Segment. *Nature* 313:310-313

Fesenko, E.F., Kolesnikov, S.S. & Lyubarsky, A.L. (1986) Direct Action of cGMP on the Conductance of Retinal Rod Plasma Membrane. *Biochim.Biophys.Acta* 856:661-671

Filek, W.. (1967) *Frösche im Aquarium*. Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, W.Keller & Co., Stuttgart.

Finer-Moore, J., Bazan, J.F., Rubin, J. & Stroud, R.M. (1989) Identification of Membrane Proteins and Soluble Protein Secondary Structural Elements, Domain Structure, and Packing Arrangements by Fourier-Transform Amphipathic Analysis. In: *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*. Fasman, G. D. (Hrsg.), Plenum Press, New York, London, pp. 719-759.

Fishman, H.M. (1981) Current and Voltage Clamp Techniques. In: *Techniques in Cellular Physiology*. Baker, P. F. (Hrsg.), Elsevier, North Holland, pp. 1-42.

Fitzhugh, R. (1983) Statistical Properties of the Asymmetric Random Telegraph Signal, with Applications to Single-Channel Analysis. *Math.Biosci.* 64:75-89

Folkers, G., Brünjes, J., Michael, M. & Schill, J. (1993) Modeling by Homology of the HSV1-TK Sequence Embedded Structural Alignment. *J.Recept.Res.* 13:147-162

Fried, M.G. & Crothers, D.M. (1984) Equilibrium Studies of the Cyclic AMP Receptor Protein-DNA Interaction. *J.Mol.Biol.* 172:241-262

Friese, W.K (1933) Beobachtungen über *Xenopus laevis* (Daud.) (Krallenfrosch) im Freien und in der Gefangenschaft. *Bl.Aquar.-u.Terrarienk.* 44:57-59

Frings, S. & Lindemann, B. (1988) Odorant Response of Isolated Olfactory Receptor is Blocked by Amiloride. *J.Membr.Biol.* 105:233-243

Frings, S., Lynch, J.W. & Lindemann, B. (1992) Properties of Cyclic Nucleotide-gated Channels Mediating Olfactory Transduction. *J.Gen.Physiol.* 100:45-67

Furman, R.E. & Tanaka, C. (1989) Photoreceptor Channel Activation: Interaction Between cAMP and cGMP. *Biochemistry* 28:2785-2788

Furman, R.E. & Tanaka, J.C. (1988) Patch Electrode Glass Composition Affects Ion Channel Currents. *Biophys.J.* 53:287-292

Furuichi, Y., LaFiandra, A. & Shatkin, A.J. (1977) 5'-Terminal Structure and mRNA Stability. *Nature* 266:235-239

Garges, S. & Adhya, S. (1985) Sites of Allosteric Shift in the Structure of the Cyclic AMP Receptor Protein. *Cell* 41:745-751

Garner, M.M. & Revzin, A. (1982) Stoichiometry of Catabolite Activator Protein/Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphate Interactions at the Lac Promotor of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 21:6032-6036

Gilman, A.G. (1989) G Proteins and Regulation of Adenyl Cyclase. *JAMA-J.Am.Med.Assn.* 262:1819

Gitlin, G. (1939) Gravimetric Studies of Certain Organs of *Xenopus laevis* Under Normal and Experimental Conditions. I. The Oviducts. *S.Afr.J.Med.Sci.* 4 (Suppl.):41-52

- Gitlin, G. (1941) Seasonal Variations and Sexual Differences in the Fat Bodies and other Fat Deposits of *Xenopus laevis*. *S.Afr.J.Med.Sci.* 6:136-144
- Goldin, A.L. (1992) Maintenance of *Xenopus laevis* and Oocyte Injection. *Meth.Enzymol.* 207:266-279
- Goldman, D.E. (1943) Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *J.Gen.Physiol.* 27:37-60
- Gordon, S.E., Brautigan, D.L. & Zimmerman, A.L. (1992) Protein Phosphatases Modulate the Apparent Agonist Affinity of the Light-Regulated Ion Channel in Retinal Rods. *Neuron* 9:739-748
- Goulding, E.H., Ngai, J., Kramer, R.H., Colicos, S., Axel, R., Siegelbaum, S.A. & Chess, A. (1992) Molecular Cloning and Single-Channel Properties of the Cyclic Nucleotide-Gated Channel from Catfish Olfactory Neurons. *Neuron* 8:45-58
- Gray, P. & Attwell, D. (1985) Kinetics of Light Sensitive Channels in Vertebrate Photoreceptors. *Proc.R.Soc.Lond.B* 223:379-388
- Grobbelaar, C.S. (1922) Some Trematodes in South African Anura and the Relationships and Distribution of their Hosts. *Trans.roy.Soc.S.Afr.* 10:191-200
- Grobbelaar, C.S. (1924) Beiträge zu einer anatomischen Monographie von *Xenopus laevis* (Daud.). *Z.ges.Anat.I.Z.Anat.Entw.Gesch.* 72:131-168
- Gronenborn, A.M. & Clore, G.M. (1982) Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies on Cyclic Nucleotide Binding to the *Escherichia coli* Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate Receptor Protein. *Biochemistry* 21:4040-4048
- Guharay, F. (1982) *Pharmacology of Murine NIE-115 Neuroblastoma Cells. PhD Thesis.* Univ. Nottingham, Nottingham.
- Gurdon, J.B. (1967) African Clawed Frog. In: *Methods in Developmental Biology*. Wilt, F. H. & Wessels, N. K. (Hrsg.), T.Y. Crowell Co, New York, pp. 75-84.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. & Marbaix, G. (1971) Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells. *Nature* 233:177-182
- Gurdon, J.B., Lingrel, J.B. & Marbaix, G. (1973) Message Stability in Injected Frog Oocytes: Long Life of Mammalian a and b Globin Messages. *J.Mol.Biol.* 80:539-551
- Gurdon, J.B. & Woodland, H. (1975) *Xenopus*. In: *Handbook of Genetics, Vol.4*. King, R. (Hrsg.), Plenum Press, New York, London, pp. 35-50.
- Gurdon, J.B. & Wickens, M.P. (1983) The Use of *Xenopus* Oocytes for the Expression of Cloned Genes. *Meth.Enzymol.* 101:370-386

- Guy, H.R., Durell, S.R., Warmke, J., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991) Similarities in Amino Acid Sequences of *Drosophila* eag and Cyclic Nucleotide-Gated Channels. *Science* 254:730
- Guy, R.H. & Hucho, F. (1987) The Ion Channel of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Trends in Neurosciences* 10:318-321
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981) Improved Patch-Clamp-Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Arch.-Eur.J.Physiol.* 391:85-100
- Hamill, O.P. & McBride, D.W. (1992) Rapid Adaptation of Single Mechanosensitive Channels in *Xenopus* Oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:7462-7466
- Hamm, J., Darzynkiewicz, J., Tahara, S.M. & Mattaj, I. (1990) The Trimethylguanosine Cap Structure of U1 mRNA is a Component of a Bipartite Nuclear Targeting Signal. *Cell* 62:569-577
- Hamm, J. & Mattaj, I.W. (1990) Monomethylated Cap Structures Facilitate RNA Export from the Nucleus. *Cell* 63:109-118
- Hanke, W., Cook, N.J. & Kaupp, U.B. (1988) cGMP-Dependent Channel Protein from Photoreceptor Membranes: Single-Channel Activity of Purified and Reconstituted Protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:94-98
- Hawkes, A.G., Jalali, A. & Colquhoun, D. (1992) Asymptotic Distributions of Apparent Open Times and Shut Times in a Single Channel Record Allowing for the Omission of Brief Events. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B* 337:383-404
- Haynes, L.W. & Yau, K.-W. (1985) Cyclic GMP-Sensitive Conductance in Outer Segment Membrane of Catfish Cones. *Nature* 317:61-64
- Haynes, L.W., Kay, A.R. & Yau, K.-W. (1986) Single Cyclic GMP-Activated Channel Activity in Excised Patches of Rod Outer Segment Membrane. *Nature* 321:66-70
- Haynes, L.W. & Yau, K.W. (1988) L-cis-Diltiazem Blocks the cGMP-Gated Channel in Cones. *Soc.Neurosci.Abstr.* 14:160
- Haynes, L.W. (1992) Block of the Cyclic GMP Gated Channel of Vertebrate Rod and Cone Photoreceptors by l-cis-Diltiazem. *J.Gen.Physiol.* 100:783-801
- Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1992) A Functional Connection Between the Pores of Distantly Related Ion Channels as Revealed by Mutant K⁺ Channels. *Science* 258:1152-1155
- Hey, D. (1949) A Report on the Culture of the South African Clawed Frog, *Xenopus laevis* (Daudin) at the Jonkershoek Inland Hatchery. *Trans.roy.Soc.S.Afr.* 32:45-54
- Heyduk, E., Heyduk, T. & Lee, J.C. (1992) Global Conformational Changes in Allosteric Proteins. *J.Biol.Chem.* 267:3200-3204

- Heyduk, T. & Lee, J.C. (1989) *Escherichia coli* cAMP Receptor Protein: Evidence for Three Protein Conformational States with Different Promoter Binding Affinities. *Biochemistry* 28:6914-6924
- Heyduk, T. & Lee, J.C. (1990) Application of Fluorescence Energy Transfer and Polarization to Monitor *Escherichia coli* cAMP Receptor Protein and lac Promoter Interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:1744-1748
- Hill, A.V. (1913) The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. *Biochem.J.* 7:471-480
- Hobson, B.M. & Townsend, B.G. (1967) The Anaesthetic Action of Di-Ethyl Ether, Ethyl Carbamate and Tricaine Methanesulfonate upon *Xenopus laevis*. In: *Small Animal Anaesthesia*. Graham-Jones, O. (Hrsg.), Pergamon Press, London, New York, pp. 47-58.
- Hodgkin, A.L. & Katz, B. (1949) The Effect of Sodium Ions on the Electrical Activity of the Giant Axon of the Squid. *J.Physiol.London* 108:37-77
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952) A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *J.Physiol.London* 117:500-544
- Hodgkin, A.L., McNaughton, P.A. & Nunn, B.J. (1985) The Ionic Selectivity and Calcium Dependence of the Light-Sensitive Pathway in Toad Rods. *J.Physiol.London* 358:447-468
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. & Ruth, P. (1992) Structure and Physiological Role of cGMP-Dependent Protein Kinase. *Biochim.Biophys.Acta* 1135:51-60
- Hogben, L.T., Charles, E. & Slome, D. (1931) Studies on the Pituitary. VIII. The Relation of the Pituitary Gland to Calcium Metabolism and Ovarian Function in *Xenopus*. *J.Exp.Biol.* 8:345-354
- Holland, C.A. & Dumont, J.N. (1975) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) IV. Effects of Gonadotropin, Estrogen and Starvation on Endocytosis in Developing Oocytes. *Cell Tissue Res.* 162:177-184
- Holley, L. & Karplus, M. (1989) Protein Secondary Structure Prediction with a Neural Network. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:152-156
- Horn, R. & Patlak, J. (1980) Single Channel Currents from Excised Patches of Muscle Membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:6930-6934
- Horowitz, P. & Hill, W. (1980) *The Art of Electronics*. Cambridge University Press, London, New York
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. & Aldrich, R.W. (1990) Biophysical and Molecular Mechanisms of Shaker Potassium Channel Inactivation. *Science* 250:533-538
- Hsu, Y.-T. & Molday, R.S. (1993) Modulation of the cGMP-Gated Channel of Rod Photoreceptor Cells by Calmodulin. *Nature* 361:76-79

- Ildefonse, M. & Bennett, N. (1991) Single-Channel Study of the cGMP-Dependent Conductance of Retinal Rods from Incorporation of Native Vesicles into Planar Lipid Bilayers. *J.Membr.Biol.* 123:133-147
- Ildefonse, M., Crouzy, S. & Bennett, N. (1992) Gating of Retinal Rod Cation Channel by Different Nucleotides - Comparative Study of Unitary Currents. *J.Membr.Biol.* 130:91-104
- Isacoff, E.Y., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1991) Putative Receptor for the Cytoplasmic Inactivation Gate in the Shaker K⁺ Channel. *Nature* 353:86-90
- Ives, J.G.D. & Janz, G.J. (1961) *Reference Electrodes. Theory and Practice*. Academic Press, New York
- Jaenicke, R. (1987) Folding and Association of Proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 49:117-237
- Jan, L.Y. & Jan, Y. (1990) A Superfamily of Ion Channels. *Nature* (1990) 345:672
- Janz, G.J. & Ives, J.G.D. (1968) Silver, Silver Chloride Electrodes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 148:210-221
- Jones, R.E. (1978) *The Vertebrate Ovary*. Plenum Press, New York
- Kabsch, W. & Sander, C. (1985) Identical Pentapeptides with Different Backbones. *Nature* 317:207
- Kabsch, W. & Sander, S. (1984) On the Use of Sequence Homologies to Predict Protein Structure: Identical Pentapeptides can have Completely Different Conformations. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:1075-1078
- Kalk, M. (1960) Climate and Breeding in *Xenopus laevis*. *S.Afr.J.Sci.* 56:271-276
- Kaplan, H.M. & Light, L. (1955) Evaluation of Chemicals Used in Control and Treatment of Disease in Fish and Frogs Caused by *Pseudomonas hydrophila*. *Am.J.vet.Res.* 16:342-344
- Kaplan, H.M. (1969) Anaesthesia in Amphibians and Reptiles. *Fed.Proc.* 28:1541-1546
- Karlin, A. (1967) On the Application of a Plausible Model of Allosteric Proteins to the Receptor for Acetylcholine. *J.Theor.Biol.* 16:306-320
- Karpen, J.W., Zimmerman, A.L., Stryer, L. & Baylor, D.A. (1988) Gating Kinetics of the Cyclic GMP-Activated Channel of Retinal Rods: Flash Photolysis and Voltage-Jump Studies. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:1287-1291
- Karsenti, E., Bravo, R. & Kirschner, M. (1987) Phosphorylation Changes Associated with Early Cell Cycle in *Xenopus* Eggs. *Dev.Biol.* 119:442-453
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. & Numa, S. (1989) Primary Structure and

Functional Expression from Complementary DNA of the Rod Photoreceptor Cyclic GMP-Gated Channel. *Nature* 342:762-766

Kaupp, U.B. & Altenhofen, W. (1992) Cyclic Nucleotide-Gated Channels of Vertebrate Photoreceptor Cells and Olfactory Epithelium. In: *Sensory Transduction*. Rockefeller University Press, pp. 134-150.

Kaupp, U.B., Vingron, M., Altenhofen, W., Bönigk, W., Eismann, E. & Ludwig, J. (1992) Cyclic Nucleotide-gated Channels - A Family of Proteins Involved in Vertebrate Photoreception and Olfaction. In: *Signal Transduction in Photoreceptor Cells*. Hargrave, P. A., Hofmann, K. P. & Kaupp, U. B. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 195-213.

Kegel, D.R., Wolf, D.B., Sheridan, R.E. & Lester, H.A. (1985) Software for Electrophysiological Experiments with a Personal Computer. *J.Neurosci.Meth.* 12:317-330

Kettenmann, H. & Grantyn, R. (1992) *Practical Electrophysiological Methods*. Wiley Liss, New York

Kim, J., Adhya, S. & Garges, S. (1992) Allosteric Changes in the cAMP Receptor Protein of *Escherichia-Coli* - Hinge Reorientation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:9700-9704

Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Xuong, N.-H., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M. (1991a) Structure of a Peptide Inhibitor Bound to the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science* 253:414-420

Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.-H., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M. (1991b) Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science* 253:407-414

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. & Adhya, S. (1993) Transcriptional Regulation by cAMP and its Receptor Protein. *Annu.Rev.Biochem.* 62:749-795

Kolesnikov, S.S., Zhainazarov, A.B. & Kosolapov, A.V. (1990) Cyclic Nucleotide-Activated Channels in the Frog Olfactory Receptor Plasma Membrane. *FEBS Letts.* 266:96-98

Kolesnikov, S.S., Rebrik, T.I., Zhainazarov, A.B., Tavartkiladze, G.A. & Kalamkarov, G.R. (1991) A Cyclic-AMP-Gated Conductance in Cochlear Hair Cells. *FEBS Letts.* 290:167-170

Korn, S.J. & Horn, R. (1988) Statistical Discrimination of Fractal and Markov Models of Single-Channel Gating. *Biophys.J.* 54:871-877

Koshland, D.E., Nemethy, G. & Filmer, D. (1966) Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry* 5:365-385

Kozak, M. (1984) Compilation and Analysis of Sequences Upstream from the Translational Start Site in Eukaryotic mRNAs. *Nucl.Acids Res.* 12:857-872

Kraft, U. (1910) Etwas von meinem Krallenfrosch (*Xenopus* sp.). *Bl.Aquar.-u.Terrarienk.* 21:642-643

Krafte, D.S. & Lester, H.A. (1989) Expression of Functional Sodium Channels in Stage II-III *Xenopus* Oocytes. *J.Neurosci.Meth.* 26:211-215

Krafte, D.S. & Lester, H.A. (1992) Use of Stage II-III *Xenopus* Oocytes to Study Voltage-Dependent Ion Channels. *Meth.Enzymol.* 207:339-345

Kramer, R.H. & Siegelbaum, S.A. (1992) Intracellular Ca^{2+} Regulates the Sensitivity of Cyclic Nucleotide-Gated Channels in Olfactory Receptor Neurons. *Neuron* 9:897-906

Kumar, V.D. & Weber, I.T. (1992) Molecular Model of the Cyclic GMP-Binding Domain of the Cyclic GMP-Gated Ion Channel. *Biochemistry* 31:4643-4649

Kuno, T., Shuntoh, H., Takeda, T., Ito, A., Sakaue, M., Hirai, M., Ando, H. & Tanaka, C. (1989) Activation of Type I Cyclic AMP Dependent Protein Kinases is Impaired by a Point Mutation in Cyclic AMP Binding Sites. *Eur.J.Pharmacol.Mol.Pharmacol.Sect.* 1:263-272

Kushner, L., Lerma, J., Bennett, M.V.L. & Zukin, R.S. (1989) Using the *Xenopus* Oocyte System for Expression and Cloning of Neuroreceptors and Channels. *Meth.Neurosci.* 1:3-29

Kypr, J. & Mrázek, J. (1985) Possible Mechanism of the Allosteric Activation of cAMP Receptor Protein. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 131:780-785

Lagnado, L. & Baylor, D. (1992) Signal Flow in Visual Transduction. *Neuron* 8:995-1002

Landgraf, W., Hofmann, F., Pelton, J.T. & Huggins, J.P. (1990) Effects of Cyclic GMP on the Secondary Structure of Cyclic GMP Dependent Protein Kinase and Analysis of the Enzyme's Amino-Terminal Domain by Far-Ultraviolet Circular Dichroism. *Biochemistry* 29:9921-9928

Landgrebe, F.W. (1939) The Maintenance of Reproductive Activity in *Xenopus laevis* for Pregnancy Diagnosis. *J.Exp.Biol.* 16:89-95

Lane, C.D. (1976) Rabbit Haemoglobin from Frog Eggs. *Sci.Amer.* 235:61-71

Lane, C.D. (1983) The Fate of Genes, Messengers, and Proteins Introduced into *Xenopus* Oocytes. *Curr.Top.Dev.Biol.* 18:89-116

Lecomte, J.T.J. & Matthews, C.R. (1993) Unraveling the Mechanism of Protein Folding - New Tricks for an Old Problem. *Protein Engineering* 6:1-10

Lee, C.W.B., Aldrich, R.W. & Gierasch, L.M. (1992) Conformational Studies of the N-terminal Domain of the Shaker B K^+ Ion Channel by CD and NMR. *Biophys.J.* 61:A379(Abstract)

Leonard, J.P. (1989) Expression of Exogenous Voltage-Gated Calcium Channels in *Xenopus* Oocytes. *Meth.Neurosci.* 1:62-75

Leonard, R.J., Labarca, C.G., Charnet, P., Davidson, N. & Lester, H.A. (1988) Evidence that the M2 Membrane-Spanning Region Lines the Ion Pore of the Nicotinic Receptor. *Science* 242:1578-1581

- Lesk, A.M. & Chothia, C. (1982) Evolution of Proteins Formed by β -Sheets. II. The Core of the Immunoglobulin Domains. *J.Mol.Biol.* 160:325-342
- Levenberg, K. (1944) A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares. *Q.Appl.Math.* 2:164-168
- Levis, R.A. & Rae, J.L. (1992) Constructing a Patch Clamp Setup. *Meth.Enzymol.* 207:14-66
- Li, M., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1992) Specification of Subunit Assembly by the Hydrophilic Amino-Terminal Domain of the Shaker Potassium Channel. *Science* 257:1225-1230
- Liebovitch, L.S., Fischbarg, J. & Koniarek, J.P. (1987) Ion Channel Kinetics: A Model Based on Fractal Scaling Rather than Multistate Markov Process. *Math.Biosci.* 84:37-68
- Light, D.B., Corbin, J.D. & Stanton, B.A. (1990) Dual Ion Channel Regulation by Cyclic GMP and Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase. *Nature* 344:336-339
- Lockhard, R.E. & Lane, C. (1978) Requirement for 7-Methylguanosine in Translation of Globin mRNA *in vivo*. *Nucl.Acids Res.* 5:3237-3247
- Lopez, G.A., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1991) Hydrophobic Substitution Mutations in the S4-Sequence Alter Voltage-Dependent Gating in Shaker K⁺-Channels. *Neuron* 7:327-336
- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. & Kaupp, U.B. (1990a) Primary Structure of a cAMP Gated Channel From Bovine Olfactory Epithelium. *FEBS Letts.* 270:24-29
- Ludwig, J., Altenhofen, W. & Kaupp, U.B. (1990b) Primary Structure and Functional Expression of a cAMP/cGMP Gated Ionic Chanel from Bovine Olfactory Epithelium. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 371:1028
- Ludwig, J., Altenhofen, W. & Kaupp, U.B. (1993) Determinants of Ligand Sensitivity in Cyclic Nucleotide-Gated Channels. (in Vorbereitung)
- Luo, Z., Shafit-Zagardo, B. & Erlichman, J. (1990) Identification of the MAP2 and P75-Binding Domain in the Regulatory Subunit RIIB of the Type II Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. Cloning and Expression of the Complementary DNA for Bovine Brain RIIB. *J.Biol.Chem.* 265:21804-21810
- Magleby, K.L. & Weiss, D.S. (1990) Estimating Kinetic Parameters for Single Channels with Stimulation: a General Method that Resolves the Missed Event Problem and Accounts for Noise. *Biophys.J.* 58:1411-1425
- Marcus-Sekura, C.J. & Hitchcock, M.J.M. (1987) Preparation of Oocytes for Microinjection of RNA and DNA. *Meth.Enzymol.* 152:284-288
- Marello, K., Larovere, J. & Sommerville, J. (1992) Binding of *Xenopus* Oocyte Masking Proteins to Messenger RNA Sequences. *Nucl.Acids Res.* 20:5593-5600
- Marmont, G. (1949) Studies on the Axon Membrane. *J.Cellular Comp.Physiol.* 34:351-382

- Masui, Y. & Clarke, H.J. (1979) Oocyte Maturation. *Int.Rev.Cytol.* 57:186-282
- Matthews, G (1987) Single-Channel Recordings Demonstrate that cGMP Opens the Light-Sensitive Ion Channel of the Rod Photoreceptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:299-302
- Matthews, G. & Watanabe, S.I. (1987) Properties of Ion Channels Closed by Light and Opened by Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate in Toad Retinal Rods. *J.Physiol.London* 389:691-715
- McKay, D.B., Weber, I.T. & Steitz, T.A. (1982) Structure of Catabolite Gene Activator Protein at 2.9-Å Resolution. *J.Biol.Chem.* 257:9518-9524
- McLatchie, L.M. & Matthews, H.R. (1992) Voltage-Dependent Block by L-cis-diltiazem of the Cyclic GMP-Activated Conductance of Salamander Rods. *Proc.R.Soc.Lond.B* 247:113-119
- McManus, O.B., Blatz, A.L. & Magleby, K.L. (1987) Sampling, Log Binning, Fitting, and Plotting Durations of Open and Shut Intervals from Single Ion Channels and the Effects of Noise. *Pflügers Arch.-Eur.J.Physiol.* 410:530-553
- Melton, D.A. (1987) Translation of Messenger RNA in Injected Frog Oocytes. *Meth.Enzymol.* 152:288-304
- Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., Mishina, M., Numa, S. & Sakmann, B. (1986) Patch-Clamp Measurements on *Xenopus laevis* Oocytes: Currents through Endogenous Channels and Implanted Acetylcholine Receptor and Sodium Channels. *Pflügers Arch.-Eur.J.Physiol.* 407:577-588
- Miledi, R., Parker, I. & Sumikawa, K. (1989) Transplanting Receptors from Brain into Oocytes. In: *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures, Vol. 3*. Raven Press, Ltd., New York, pp. 57-90.
- Miles, E.M. (1950) Red-Leg in Tree-Frogs Caused by *Bacterium alkaligenes*. *J.Gen.Microbiol.* 4:434-436
- Millard, N. (1941) The Vascular Anatomy of *Xenopus laevis* (Daudin). *Trans.roy.Soc.S.Afr.* 28:387-439
- Miller, J.L. & Korenbrot, J.I. (1993) Phototransduction and adaptation in rods, single cones and twin cones of the striped bass retina: a comparative study. *Vis.Neurosci.* 10, 653-667
- Millhauser, G.L., Salpeter, E.E. & Oswald, R.E. (1988) Diffusion Models of Ion Channel Gating and the Origin of the Power-Law Distributions from Single-Channel Recording. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:1503-1507
- Mohr, J.L. (1942) On the Persistence of Protozoan Infections in the Cloaca of an Anuran, *Xenopus laevis* (Daudin). *Parasitology* 34:284

- Molday, R.S., Molday, L.L., Dose, A., Clarklewis, I., Illing, M., Cook, N.J., Eismann, E. & Kaupp, U.B. (1991) The cGMP-Gated Channel of the Rod Photoreceptor Cell Characterization and Orientation of the Amino Terminus. *J.Biol.Chem.* 266:21917-21922
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.-P. (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J.Mol.Biol.* 12:88-118
- Moore, K.S., Bevins, C.L., Brasseur, M.M., Tomassini, N., Turner, K., Eck, H. & Zasloff, M. (1991) Antimicrobial Peptides in the Stomach of *Xenopus laevis*. *J.Biol.Chem.* 266:19851-19857
- Moult, J. (1989) Comparative Modeling of Protein Structure - Progress and Prospects. *J.Res.Natl.Inst.Standards Technol.* 94:79-84
- Munson, P.J. (1990) A Review of Nonlinear Least-Squares Curve Fitting Techniques for Data Analysis. *Computers in Endocrinology: Recent Advances* 72:33-44
- Nace, A.W. (1968) The Amphibian Facility of the University of Michigan. *Bioscience* 18:767-775
- Nakamura, T. & Gold, G.H. (1987) A Cyclic Nucleotide-Gated Conductance in Olfactory Receptor Cilia. *Nature* 325:442-444
- Nawy, S. & Jahr, C.E. (1990) Suppression by Glutamate of cGMP-activated Conductances in Retinal Bipolar Cells. *Nature* 346:269-271
- Neher, E. (1986) Patch Clamp Studies on the Role of Calcium in Secretion. In: *Fortschritte der Zoologie, Bd.33, Membrane Control*. Lüttgau, (Hrsg.), G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 275-286.
- Neher, E. (1988) The Use of the Patch Clamp Technique to Study Second Messenger-Mediated Cellular Events. *Neuroscience* 26:727-734
- Neher, E. & Sakmann, B. (1992) The Patch Clamp Technique. *Sci.Amer.* 266:28-35
- Newport, J. & Kirschner, M. (1982) A Major Developmental Transition in Early *Xenopus* Embryos: I. Characterization and Timing of Cellular Changes at the Midblastula Stage. *Cell* 30:675-686
- Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. (1956) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. Amsterdam
- Nigrelli, R.F. & Maraventano, L.W. (1944) Pericarditis in *Xenopus laevis* Caused by *Diplostomulum xenopi sp.nov.*, a Larval Strigeid. *J.Parasit.* 30:184-190
- Ochsé, W. (1948) Die Zucht des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* Daudin. *Gynaecologica* 126:55-77
- Ogreid, D. & Doskeland, S.O. (1981) The Kinetics of Association of Cyclic AMP to the Two Types of Binding Sites Associated with Protein Kinase II from Bovine Myocardium. *FEBS Letts.* 129:287-292

- Ogreid, D., Ekanger, R., Suva, R.H., Miller, J.P., Sturm, P., Corbin, J.D. & Doskeland, S.O. (1985) Activation of Protein Kinase Isozymes by Cyclic Nucleotide Analogs Used Singly or in Combination. *Eur.J.Biochem.* 150:219-227
- Ogreid, D., Ekanger, R., Suva, R.H., Miller, J.P. & Doskeland, S.O. (1989) Comparison of the two classes of binding sites (A and B) of type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinases by using cyclic nucleotide analogs. *Eur.J.Biochem.* 181:19-31
- Oiki, S., Danho, W., Madison, V. & Montal, M. (1988) M2 δ , a Candidate for the Structure Lining the Ionic Channel of the Nicotinic Cholinergic Receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:8703-8707
- Oppenheim, A. & Schafer, R.W. (1975) *Digital Signal Processing*. Prentice Hall, New York
- Parker, G.H. (1939) General Anaesthesia by Cooling. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 42:186-187
- Pascarella, S. & Bossa, F. (1989) PRONET: a Microcomputer Program for Predicting the Secondary Structure of Proteins with a Neural Network. *CABIOS* 5:319-320
- Paterson, B.M. & Rosenberg, M. (1979) Efficient Translation of Prokaryotic mRNAs in a Eukaryotic Cell-Free System Requires Addition of a Cap Structure. *Nature* 279:692-696
- Pauling, L. (1935) The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and its Structural Interpretation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 21:186
- Payne, M.E., Fong, Y.-L., Ono, T., Colbran, R.J., Kemp, B.E., Soderling, T.R. & Means, A.R. (1988) Calcium-Calmodulin Dependent Protein Kinase II Characterization of Distinct Calmodulin Binding and Inhibitory Domains. *J.Biol.Chem.* 263:7190-7195
- Picco, C. & Menini, A. (1993) The Permeability of the cGMP-Activated Channel to Organic Cations in Retinal Rods of the Tiger Salamander. *J.Physiol.London* 460:741-758
- Picones, A. & Korenbrot, J.I. (1992) cGMP-Dependent Conductance of Cone Outer Segment Membrane is Active Even in the Absence of Nucleotide. *Biophys.J.* 61:A427(Abstract)
- Pittler, S.J., Lee, A.K., Altherr, M.R., Howard, T.A., Seldin, M.F., Hurwitz, R.L., Wasmuth, J.J. & Baehr, W. (1992) Primary Structure and Chromosomal Localization of Human and Mouse Rod Photoreceptor cGMP-Gated Cation Channel. *J.Biol.Chem.* 267:6257-6262
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I. & Baumann, A. (1988) Shaker Encodes a Family of Putative Potassium Channel Proteins in the Nervous System of Drosophila. *EMBO J.* 7:1087-1096
- Press, W.H., Flannery, B.P., Teukolsky, S.A. & Vetterling, W.T. (1987) *Numerical Recipes*. Cambridge University Press, Sydney
- Quandt, F.N., Nicol, G.D. & Schnetkamp, P.P.M. (1988) Voltage Dependency of Gating of Cyclic GMP-Activated Ion Channels in Bovine Rod Outer Segments and Block by 1-cis-Diltiazem. *Biophys.J.* 53:390a

- Quian, N. & Sejnowski, T.J. (1988) Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins Using Neural Network Models. *J.Mol.Biol.* 202:865-884
- Rackovsky, S. (1993) On the Nature of the Protein Folding Code. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:644-648
- Rae, J.L. & Levis, R. (1984) Patch Clamp Recordings From the Epithelium of the Lens Obtained Using Glasses Selected for Low Noise and Improved Sealing Properties. *Biophys.J.* 45:144-146
- Rae, J.L., Levis, R.A. & Eisenberg, R.S. (1988) Ionic Channels in Ocular Epithelia. In: *Ion Channels, Vol 1*. Narahashi, T. (Hrsg.), Plenum Press, New York, pp. 1-31.
- Reed, R.R. (1992) Signaling Pathways in Odorant Detection. *Neuron* 8:205-209
- Riggs, A., Reiness, G. & Zubay, G. (1971) Purification and DNA-Binding Properties of the Catabolite Gene Activator Protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 68:1222-1225
- Ringheim, G. & Taylor, S. (1990) Dissecting the Domain Structure of the Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase I and Elucidating the Role of MgATP. *J.Biol.Chem.* 265:4800-4808
- Rocha e Silva, M. (1970) A Thermodynamic Approach to Problems of Drug Antagonism. II. A Microphysical Model of the Phenomenon of Recovery. *Physiol.Chem.Phys.* 2:503
- Rocha e Silva, M. (1978) Kinetics of Antagonist Action. In: *Histamine II and Anti-Histaminics, Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol.18,2*. Rocha e Silva, M. (Hrsg.), Springer, Berlin, pp. 295-332.
- Rodriguez, J.M. (1939) On the Morphology of *Balantidium kirbyi* n.sp., from the Plathander. *J.Parasit.* 25:197-200
- Rosenberg, M. & Paterson, B.M. (1979) Efficient Cap-Dependent Translation of Polycistronic Prokaryotic mRNAs is Restricted to the First Gene in the Operon. *Nature* 279:696-701
- Rossmann, M.G. & Argos, P. (1976) Exploring Structural Homology of Proteins. *J.Mol.Biol.* 105:75-96
- Roux, B. & Sauve, R. A (1985) General Solution to the Time Interval Omission Problem Applied to Single Channel Analysis. *Biophys.J.* 48:149-158
- Ruddock, P.A. & Ruffle, W.G. (1972) The Care and Maintenance of a Breeding *Xenopus* Colony. *J.Inst.Anim.Tech.* 23:83-90
- Rugh, R. (1962) *Experimental Embryology*. Burgess Publishing Company, Minneapolis
- Ruknudin, A., Song, M.J. & Sachs, F. (1991) The Ultrastructure of Patch-clamped Membranes: A study Using High Voltage Electron Microscopy. *J.Cell Biol.* 112:125-134

- Ruth, P., Landgraf, W., Keilbach, A., May, B., Egleme, C. & Hofmann, F. (1991) The Activation of Expressed cGMP-Dependent Protein Kinase Isozyme-Ialpha and Isozyme-Ibeta Is Determined by the Different Amino-Termini. *Eur.J.Biochem.* 202:1339-1344
- Ryu, S., Kim, J., Adhya, S. & Garges, S. (1993) Pivotal Role of Amino Acid at Position 138 in the Allosteric Hinge Reorientation of cAMP Receptor Protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:75-79
- Sachs, F., Neil, J. & Barkakati, N. (1982) The Automated Analysis of Data from Single Ionic Channels. *Pflügers Arch.-Eur.J.Physiol.* 395:331-340
- Sachs, F. & Auerbach, A. (1983) Single-Channel Electrophysiology: Use of the Patch Clamp. *Meth.Enzymol.* 103:147-176
- Sakmann, B. & Neher, E. (1983) *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York, London,
- Sandon, H. (1941) Studies on South African Endozoic Ciliates. I. Paranyctotherus (Balantidium) Kirbyi (Rodriquez) Emend.Gen.Nov. from the Rectum of the Clawd Toad, *Xenopus laevis*. *S.Afr.J.Med.Sci.* 6:116-127
- Sansom, M.S.P., Bail, F.G., Kery, C.J., McGee, R., Ramsey, R.L. & Usherwood, P.N.R. (1989) Markov, Fractal, Diffusion and Related Models of Ion Channel Gating: a Comparison with Experimental Data from Two Ion Channels. *Biophys.J.* 56:1229-1243
- Schaeffer, H.J. & Johnson, R.N. (1968) Enzyme Inhibitors. XX. Studies on the Hydrophobic and Hydroxyl Binding Regions of Adenosine Deaminase. 9-(2m-Bromoacetamidophenethyl)adenine, a New Irreversible Inhibitor of Adenosine Deaminase. *J.Med.Chem.* 11:21
- Schnapf, J.L. & Baylor, D.A. (1987) Die Reaktion von Photorezeptoren auf Licht. *Spektrum der Wissenschaft* Juni:116-123
- Scholübbes, H.-G., Knippenberg, P.H., Baraniak, J. & Stec, W.J. (1984) Investigations on stimulation of lac transcription *in vivo* in *Escherichia coli* by cAMP analogues. *Eur.J.Biochem.* 138:101-109
- Schrire, T. (1928) On Some New Species of Bacteria Isolated from *Xenopus laevis*. *Trans.roy.Soc.S.Afr.* 17:43-49
- Schrire, T. & Greenfield, E.C. (1929) On *Bacillus Fulminans* and Certain other New Organisms Isolated from *Xenopus laevis*. *Trans.roy.Soc.S.Afr.* 17:309-319
- Schuetz, A.W. (1969) Oogenesis: Processes and their Regulation. *Adv.Reprod.Physiol.* 4:99-148
- Schuetz, A.W. (1972) Hormones and Follicular Functions. In: *Oogenesis*. Biggers, J. D. & Schuetz, A. W. (Hrsg.), University Park Press, Baltimore, pp. 479-511.
- Schultz, S.C., Shields, G.C. & Steitz, T.A. (1991) Crystal Structure of a CAP-DNA Complex: The DNA is Bent by 90°. *Science* 253:1001

- Seidman, S. & Soreq, H. (1990) Coinjection of *Xenopus* Oocytes with cDNA-Produced and Native mRNAs: A Molecular Biological Approach to the Tissue-Specific Processing of Human Cholinesterases. *Int.Rev.Neurobiol.* 32:107-139
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.M., Gaynard, F. & Grignon, C. (1992) Cloning and Expression in Yeast of a Plant Potassium Ion Transport System. *Science* 256:663-665
- Shabb, J.B., Ng, L. & Corbin, J.D. (1990) One Amino Acid Change Produces a High Affinity cGMP- Binding Site in cAMP-Dependent Protein Kinases. *J.Biol.Chem.* 265:16031-16034
- Shabb, J.B., Buzzeo, B.D., Ng, L. & Corbin, J.D. (1991) Mutating Protein Kinase cAMP-Binding Sites into cGMP-Binding Sites - Mechanism of cGMP-Selectivity. *J.Biol.Chem.* 266:24320-24326
- Shapiro, H.A. & Zwarenstein, H. (1993) Metabolic Changes Associated with Endocrine Activity and the Reproductive Cycle in *Xenopus laevis*. *J.Exp.Biol.* 10:186
- Shapiro, B.G. & Shapiro, H.A. (1934) Histological Changes in the Ovaries and Ovarian Blood Vessels of *Xenopus laevis* Associated with Hypophysectomy, Captivity and the Normal Reproductive Cycle. *J.Exp.Biol.* 11:73-80
- Shapiro, H.A. (1937) The Biological Basis of Sexual Behavior in Amphibia IV. *J.Exp.Biol.* 14:38-47
- Shapiro, H.A. (1939) Seasonal Changes in the Ovulation Response of *Xenopus laevis* to Methyl-Testosterone. *J.Endocrinol.* 1:1-6
- Shaw, D.J., Rice, D.W. & Guest, J.R. (1983) Homology Between CAP and Fnr, a Regulator of Anaerobic Respiration in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 166:241-247
- Shen, N.V., Chen, X., Boyer, M.M. & Pfaffinger, P.J. (1993) Deletion Analysis of K Channel Assembly. *Neuron* 11:67-76
- Sigel, E. (1990) Use of *Xenopus* Oocytes for the Functional Expression of Plasma Membrane Proteins. *J.Membr.Biol.* 117:201-221
- Sigworth, F.J. & Sine, S.M. (1987) Data Transformations for Improved Display and Fitting of Single-Channel Dwell Time Histograms. *Biophys.J.* 52:1047-1054
- Smith, L.D. (1975) Molecular Events During Oocyte Maturation. In: *Biochemistry of Animal Development, Vol.III*. Weber, R. (Hrsg.), Academic Press, San Francisco, pp. 1-46.
- Smith, S.W. (1950) Chloromycetin in the Treatment of 'Red Leg'. *Science* 112:274-275
- Smith, T.G., Lecar, H., Redman, S.J. & Gage, P.W. (1985) *Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes*. Williams and Wilkens, Baltimore

Smith, T.G.J. & Lecar, H. (1985) Introduction. In: *Voltage and Patch Clamping With Micro-electrodes*. Smith, T. G. J., Lecar, H., Redman, S. J. & Gage, P. W. (Hrsg.), American Physiological Society, Bethesda, pp. 1-7.

Snutch, T.P. (1988) The Use of *Xenopus* Oocytes to Probe Synaptic Communication. *Trends in Neurosciences* 11:250-256

Sokabe, M., Sachs, F. & Jing, Z.Q. (1991) Quantitative Video Microscopy of Patch Clamped Membranes Stress, Strain, Capacitance, and Stretch Channel Activation. *Biophys.J.* 59:722-728

Sommerville, J. (1990) RNA-Binding Phosphoproteins and the Regulation of Maternal Messenger RNA in *Xenopus*. *J.Reprod.Fert.* S42:225-233

Soreq, H. & Seidman, S. *Xenopus* (1992) Oocyte Microinjection - From Gene to Protein. *Meth.Enzymol.* 207:225-265

Southwell, T. & Kirshner, A. (1931) On Some Parasitic Worms Found in *Xenopus laevis*, the South African Clawed Toad. *Ann.trop.Med.Parasit.* 1937:245-265

Stefanová, Z., Puchta, V. & Romanovsky, A. (1962) Erfahrungen mit dem Anaestheticum MS-222. *Die Pharmazie* 17:137-142

Stern, J.H., Kaupp, U.B. & MacLeish, P.R. (1986) Control of the Light-Regulated Current in Rod Photoreceptors by Cyclic GMP, Calcium, and l-cis-Diltiazem. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:1163-1167

Straub, R.E., Oron, Y. & Gershengorn, M.C. (1989) Expression of Mamalian Plasma membrane Receptors in *Xenopus* Oocytes: Studies of Thyrotropin-Releasing Hormone Action. *Meth.Neurosci.* 1:47-61

Stühmer, W. (1992) Electrophysiological Recording from *Xenopus* Oocytes. *Meth.Enzymol.* 207:319-339

Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J.S., Richards, B.M. & Barnard, E.A. (1981) Active Multi-Subunit Acetylcholine Receptor Assembled by Translation of Heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* 292:862-864

Sumikawa, K., Parker, I. & Miledi, R. (1986) *Xenopus* Oocytes as a Tool for Molecular Cloning of the Genes Coding for Neurotransmitter Receptors and Voltage-Operated Channel. In: *Fortschritte der Zoologie, Bd.33, Membrane Control*. Lüttgau, (Hrsg.), G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 127-139.

Sumikawa, K., Parker, I. & Miledi, R. (1989) Expression of Neurotransmitter Receptors and Voltage- Activated Channels from Brain mRNA in *Xenopus* Oocytes. *Meth.Neurosci.* 1:30-45

Swanson, R. & Folander, K. (1992) In Vitro Synthesis of RNA for Expression of Ion Channels in *Xenopus* Oocytes. *Meth.Enzymol.* 207:310-319

- Takio, K., Wade, R.D., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. & Titani, K. (1984) Guanosine Cyclic 3',5'-Phosphate Dependent Protein Kinase, a Chimeric Protein Homologous with Two Separate Protein Families. *Biochemistry* 23:4207-4218
- Tan, G.S., Kelly, P., Kim, J. & Wartell, R.M. (1991) Comparison of cAMP Receptor Protein (CRP) and a cAMP-Independent Form of CRP by Raman Spectroscopy and DNA Binding. *Biochemistry* 30:5076-5080
- Tanaka, J.C., Eccleston, J.F. & Furman, R.E. (1989) Photoreceptor Channel Activation by Nucleotide Derivates. *Biochemistry* 28:2776-2784
- Taylor, N.B. (1930) The Relation of Temperature to Heart Rate in the South African Frog (*Xenopus dactylethra*). *J.Physiol.London* 70:40-41
- Taylor, N.B. (1931) The Relation of Temperature to the Heart Rate of the South African Frog (*Xenopus dactylethra*). *J.Physiol.London* 71:156-168
- Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1987) Sequence of a Probable Potassium Channel Component Encoded at Shaker Locus of *Drosophila*. *Science* 237:770-775
- Thron, C.D. (1973) On the Analysis of Pharmacological Experiments in Terms of an Allosteric Receptor Model. *Mol.Physiol.* 9:1-9
- Titani, K., Sasagawa, T., Ericson, L.H., Kumar, S., Smith, S.B., Krebs, E.G. & Walsh, K.A. (1984) Amino Acid Sequence of the Regulatory Subunit of Bovine Type I Adenoine Cyclic 3',5'-Phosphate Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* 23:4193-4199
- Toivonen, S. (1952) Insufficiency of Light as a Cause of Partial Neoteny in *Xenopus laevis*. *Acta Endocrinol.* 10:243-254
- Trautmann, A. & Siegelbaum, S.A. (1983) The Influence of Membrane Isolation on Single Acetylcholine-Channel Current in Rat Myotubes. In: *Single-Channel Recording*. Sakmann, B. & Neher, E. (Hrsg.), Plenum Press, New York, London, pp. 473-480.
- Uhler, M.D., Carmichael, D.F., Lee, D.C., Chrivia, J.C., Krebs, E.G. & McKnight, G.S. (1986) Isolation of cDNA Clones Coding for the Catalytic Subunit of Mouse cAMP-Dependent Protein Kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:1300-1304
- Unger, R. (1918) Über den Einfluß der Temperatur auf Wirkungsstärke und Oberflächenaktivität der Narkotika. *Biochem.Z.* 89:238-278
- van Leeuwen, S.W. & van der Made, M. (1916) Über den Einfluß der Temperatur auf die Reflexfunktionen des Rückenmarkes von Warmblütlern und Kaltblütlern. *Pflügers Arch.-Eur.J.Physiol.* 165:37-83
- Vanderplank, F.L. (1939) *Xenopus laevis*: Light as Stimulus to Breeding. *Aquarist and Pondkpr.* 9:183-184

- Vaney, M.-C., Gilliland, G.L., Harman, J.G., Peterkofsky, A. & Weber, I.T. (1989) Crystal Structure of a cAMP-Independent Form of Catabolite Gene Activator Protein with Adenosine Substituted in one of two cAMP-Binding Sites. *Biochemistry* 28:4568-4574
- Villarroel, A., Herlitze, S., Koenen, M. & Sakmann, B. (1991) Location of a Threonine Residue in the alpha-Subunit M2 Transmembrane Segment That Determines the Ion Flow Through the Acetylcholine Receptor Channel. *Proc.R.Soc.Lond.B* 243:69-74
- Wachtel, R.E. (1991) Fitting of Single-Channel Dwell Time Distributions. *Meth.Neurosci.* 4:410-428
- Wang, H.C., Beer, B., Sassano, D., Blume, A.J. & Ziai, M.R. (1991) Gene Expression in *Xenopus* Oocytes. *Int.J.Biochem.* 23:271-276
- Watanabe, S. & Matthews, G. (1989) Dose Response Relation of Cyclic GMP-Activated Channels in the Retinal Rod Photoreceptor. *Neurosci.Res.* S10:1-8
- Watanabe, S.-I. & Matthews, G. (1990) Cyclic GMP-Activated Channels of the Rod Photoreceptors Show neither Fast nor Slow Desensitization. *Vis.Neurosci.* 4:481-487
- Watenpaugh, K., Dow, J., Jensen, J.H. & Furberg, S. (1968) Crystal and Molecular Structure of Adenosine 3',5'-Cyclic Phosphate. *Science* 159:206-207
- Weber, G. & Anderson, S.R. (1965) Multiplicity of Binding. Range of Validity and practical test of Adair's Equation. *Biochemistry* 4:1942-1947
- Weber, I.T., Gilliland, G.L., Harman, J.G. & Peterkofsky, A. (1987) Crystal Structure of a Cyclic AMP-Dependent Mutant of Catabolite Gene Activator Protein. *J.Biol.Chem.* 262:5630-5636
- Weber, I.T., Takio, K., Titani, K. & Steitz, T.A. (1982) The cAMP-binding Domains of the Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase and the Catabolite Gene Activator Protein are Homologous. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:7679-7683
- Weber, I.T. & Steitz, T.A. (1987) Structure of a Complex of Catabolite Gene Activator Protein and Cyclic AMP Refined at 2.5 Å Resolution. *J.Mol.Biol.* 198:311-326
- Weber, I.T., Shabb, J.B. & Corbin, J.D. (1989) Predicted Structures of the cGMP-Binding Domains of the cGMP-Dependent Protein Kinase: A Key Alanine/Threonine Difference in Evolutionary Divergence of cAMP and cGMP-Binding Sites. *Biochemistry* 28:6122-6127
- Wickens, M.P. & Laskey, R.A. (1981) Expression of Cloned Genes in Cell-Free Systems and in Microinjected *Xenopus* Oocytes. In: *Genetic engineering, Vol.1.* Williamson, R. (Hrsg.), Academic Press, London, pp. 103-159.
- Wilkison, D.M. (1991) Digital Filtering of Potentials on Personal Computers. *Meth.Neurosci.* 4:397-409

Wittenberg, U. (1993) *Das Catabolite Activator Protein (CAP): Beiträge zur Untersuchung von Struktur und Dynamik eines molekularen Schalters mit Hilfe der Moleküldynamik-Simulation*. Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Wohlfahrt, P., Müller, H. & Cook, N.J. (1989) Lectin Binding and Enzymatic Deglycosylation of the cGMP-Gated Channel from Bovine Rod Photoreceptors. *J.Biol.Chem.* 264:20934-20939

Wolf, D.P. & Hedrick, J.L. (1971) A Molecular Approach to Fertilisation. II. Viability and Artificial Fertilisation of *Xenopus laevis* Gametes. *Dev.Biol.* 25:348-359

Woodland, H.R. (1974) Changes in Polysome Content of Developing *Xenopus laevis* Embryos. *Dev.Biol.* 40:90-101

Yathindra, N. & Sundaralingam, M. (1974) Conformation of Cyclic 3',5'-Nucleotides. Effect of the Base on the syn-anti Conformer Distribution. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 56:119-126

Yau, K.-W. & Nakatani, K. (1985) Light-Suppressible, Cyclic GMP-Sensitive Conductance in the Plasma Membrane of a Truncated Rod Outer Segment. *Nature* 317:252-255

Yau, K.-W. & Baylor, D.A. (1989) Cyclic GMP-Activated Conductance of Retinal Photoreceptor Cells. *Ann.Rev.Neurosci.* 12:289-327

Yellen, G. (1984a) Ionic Permeation and Blockade in Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels of Bovine Chromaffin Cells. *J.Gen.Physiol.* 84:157-186

Yellen, G. (1984b) Channels from Genes: the Oocyte as an Expression System. *Trends in Neurosciences* 7:457-458

Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1991) Mutations Affecting Internal TEA Blockade Identify the Probable Pore-Forming Region of a K^{+} Channel. *Science* 251:939-942

Yool, A.J. & Schwarz, T.L. (1991) Alteration of Ionic Selectivity of a K^{+} Channel by Mutation of the H5 Region. *Nature* 349:700-704

Zagotta, W.N., Hoshi, T. & Aldrich, R.W. (1990) Restoration of Inactivation in Mutants of Shaker Potassium Channels by a Peptide Derived from ShB. *Science* 250:568-571

Zasloff, M. (1987) Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial cDNA Sequence of a Precursor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:5449-5453

Zhainazarov, A.B. & Kolesnikov, S.S. (1990) Inactivation of cGMP-Dependent Conductance of Rod Outer Segment Plasma Membrane Induced by cGMP. *FEBS Letts.* 260:149-151

Zick, S.K. & Taylor, S.S. (1982) Interchain Disulfide Bonding in the Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase I. *J.Biol.Chem.* 257:2287-2293

- Zimmerman, A.L., Yamanaka, G., Eckstein, F., Baylor, D.A. & Styrer, L. (1985) Interaction of Hydrolysis Resistant Analogs of Cyclic GMP with the Phosphodiesterase and Light-Sensitive Channel of Retinal Rod Outer Segments. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82:8813-8817
- Zimmerman, A.L. & Baylor, D.A. (1986) Cyclic GMP-Sensitive Conductance of Retinal Rods Consists of Aqueous Pores. *Nature* 321:70-72
- Zimmerman, A.L., Karpen, J.W. & Baylor, D.A. (1988) Hindered Diffusion in Excised Patches from Retinal Rod Outer Segments. *Biophys.J.* 54:351-355
- Zimmerman, A.L. & Baylor, D.A. (1992) Cation Interactions Within the Cyclic GMP-Activated Channel of Retinal Rods from the Tiger Salamander. *J.Physiol.London* 449:759-783
- Zubay, G., Schwartz, D. & Beckwith, J. (1970) Mechanism of Activation of Catabolite-Sensitive Genes: A Positive Control System. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 66:104-110
- Zufall, F. & Hatt, H. (1991) Dual Activation of a Sex Pheromone-Dependent Ion Channel from Insect Olfactory Dendrites by Protein Kinase-C Activators and Cyclic GMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:8520-8524
- Zwarenstein, H. & Shapiro, H.A. (1933) Metabolic Changes Associated with Endocrine Activity and the Reproductive Cycle in *Xenopus laevis* III. Changes in the Calcium Content Associated with Endocrine Activity and the Reproductive Cycle in *Xenopus laevis*. *J.Exp.Biol.* 10:372-378
- Zwarenstein, H., Sapeika, N. & Shapiro, H.A. (1946) *Xenopus laevis*, a bibliography. The African Bookman, Cape Town.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Messungen. Die Standardabweichung ist in der Spalte "Standardabweichung" angegeben. Die Werte in der Spalte "Standardabweichung" sind die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Messungen. Die Standardabweichung ist in der Spalte "Standardabweichung" angegeben. Die Werte in der Spalte "Standardabweichung" sind die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Messungen. Die Standardabweichung ist in der Spalte "Standardabweichung" angegeben. Die Werte in der Spalte "Standardabweichung" sind die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Messungen. Die Standardabweichung ist in der Spalte "Standardabweichung" angegeben. Die Werte in der Spalte "Standardabweichung" sind die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Messungen. Die Standardabweichung ist in der Spalte "Standardabweichung" angegeben. Die Werte in der Spalte "Standardabweichung" sind die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Messungen. Die Standardabweichung ist in der Spalte "Standardabweichung" angegeben. Die Werte in der Spalte "Standardabweichung" sind die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind die Mittelwerte der Messungen. Die Standardabweichung ist in der Spalte "Standardabweichung" angegeben. Die Werte in der Spalte "Standardabweichung" sind die Standardabweichung der Mittelwerte.

ANHANG A

BESTIMMUNG DER MAKROSKOPISCHEN AKTIVIERUNGSPARAMETER NACH DER HILL-GLEICHUNG

"The whole story is a good example of a frequent phenomenon in the history of science: Of how a theory, ultimately shown to be untenable, could nevertheless describe and co-ordinate the facts for a time and provoke further research which led finally to a better (but more complicated) theory. With the unexplained mystery of the rectangular hyperbolas of 1909 and 1910 the theory would probably never have been proposed and the later research might have been delayed for years." (A.V. Hill über die "Hill-Gleichung")

Die Hill-Gleichung (Gleichung A1) wurde 1910 von A.V. Hill empirisch zur Beschreibung der Sauerstoffbindung an Hämoglobin verwendet (vgl. Hill, 1913). Ihr liegt im Gegensatz zu den Ansätzen von Monod (Monod *et al.*, 1965) und Koshland (Koshland *et al.*, 1966) kein funktionelles Modell zu Grunde⁴⁸. Die Anwendung der Hill-Gleichung zur Beschreibung des Aktivierungsverhaltens von CNG-Kanälen ist ebenfalls empirisch: Die experimentellen Daten lassen sich besser durch ein kooperatives Modell beschreiben als durch die Annahme, daß mehrere gleiche Bindestellen unabhängig voneinander besetzt werden, (Zimmerman & Baylor 1986, vgl. dazu auch Abb. A2).

Kooperativität bedeutet, daß der gemeinsame Effekt mehrerer Einheiten eines oligomeren Systems von der Summe der Einzeleffekte abweicht. Kooperativität kann positiv oder negativ sein. Das klassische Beispiel für Kooperativität in biologischen Systemen ist die Sauerstoffbindung an Hämoglobin. Positive Kooperativität bewirkt einen langsameren Anstieg der Dosis-Wirkungskurve für niedrige Sauerstoffkonzentrationen als man nach dem Massenwirkungs-gesetz erwarten würde. Im Konzentrationsbereich halbmaximaler Sättigung wird die Kurve dagegen steiler als erwartet. Physiologisch bedeutet positive Kooperativität einen steileren und damit im Sinne der Schaltfunktion präziseren Übergang zwischen zwei Zuständen. Durch kleine Änderungen in der Konzentration des Substrats wird im Vergleich zu nicht-kooperativen Systemen ein größerer Effekt erzielt (s. Abb. A1).

⁴⁸ Für weitere Literatur zu Kooperativitätsmodellen vgl. Karlin, 1967; Changeux *et al.*, 1967; Thron, 1973; Rocha e Silva, 1970; Rocha e Silva, 1978; Schaeffer & Johnson, 1968.

Die Hill-Gleichung lautet:

$$y = \frac{k_A c^n}{1 + k_A c^n} \quad \text{Gl. A1}$$

y = Anteil besetzter Bindestellen, hier: Anteil des maximal aktivierbaren Stroms

k_A = scheinbare Assoziationskonstante

n = dimensionslose Zahl, ohne modellhafte Bedeutung (Hill, 1913), "Hill-Koeffizient" bei Halbsättigung

c = Substratkonzentration

Ersetzt man die Assoziationskonstante k_A durch die Dissoziationskonstante k_D , erhält man

$$y = \frac{c^n}{c^n + k_D} \quad \text{Gl. A2}$$

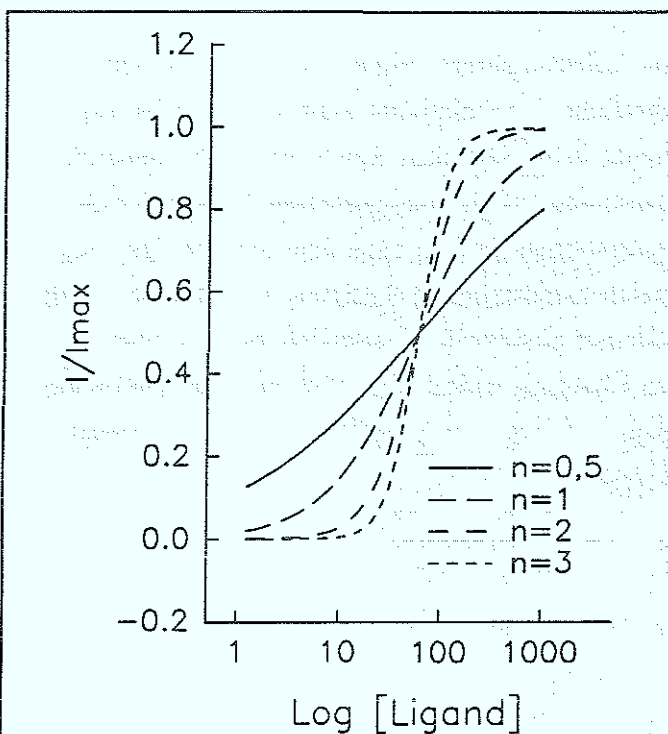


Abb. A1: Einfluß des Kooperativitätsparameters n auf die Steilheit der Dosis-Wirkungskurve. Das gezeigte Beispiel wurde nach Gleichung A3 für $K_a=60$ (in willkürlichen Einheiten) und den in der Legende angegebenen Werten für n berechnet. Die Aktivierungskonstante (hier: Schnittpunkt aller Kurven bei 50 % Aktivierung) und die asymptotischen Endwerte bleiben jeweils unverändert.

Die Hill-Gleichung beschreibt den Bindeprozeß durch eine einzige Bindekonstante und einen über alle Schritte gemittelten Exponenten. Adair erhielt eine bessere Übereinstimmung der von ihm gemessenen Daten zur Hämoglobinbindung, indem er den einzelnen Bineschritten vier unterschiedliche Bindekonstanten zuordnete (Adair, 1925). Auch diese Gleichung erlaubt keine modellhafte Interpretation für die gegenüber der Michaelis-Menten-Gleichung sigmoid abweichende experimentelle Kurve. Später versuchte Pauling die Veränderungen in der Bindekonstante geometrischen Veränderungen im Protein zuzuschreiben (Pauling, 1935). Die einzelnen Bindekonstanten konnten dann wieder als identisch angenommen werden. Weber zeigte 1965, daß der Hill-Koeffizient nicht

größer werden kann als die Zahl der Bindestellen, solange sich der Polymerisierungsgrad des Proteins durch die Bindung nicht ändert (Weber & Anderson, 1965).

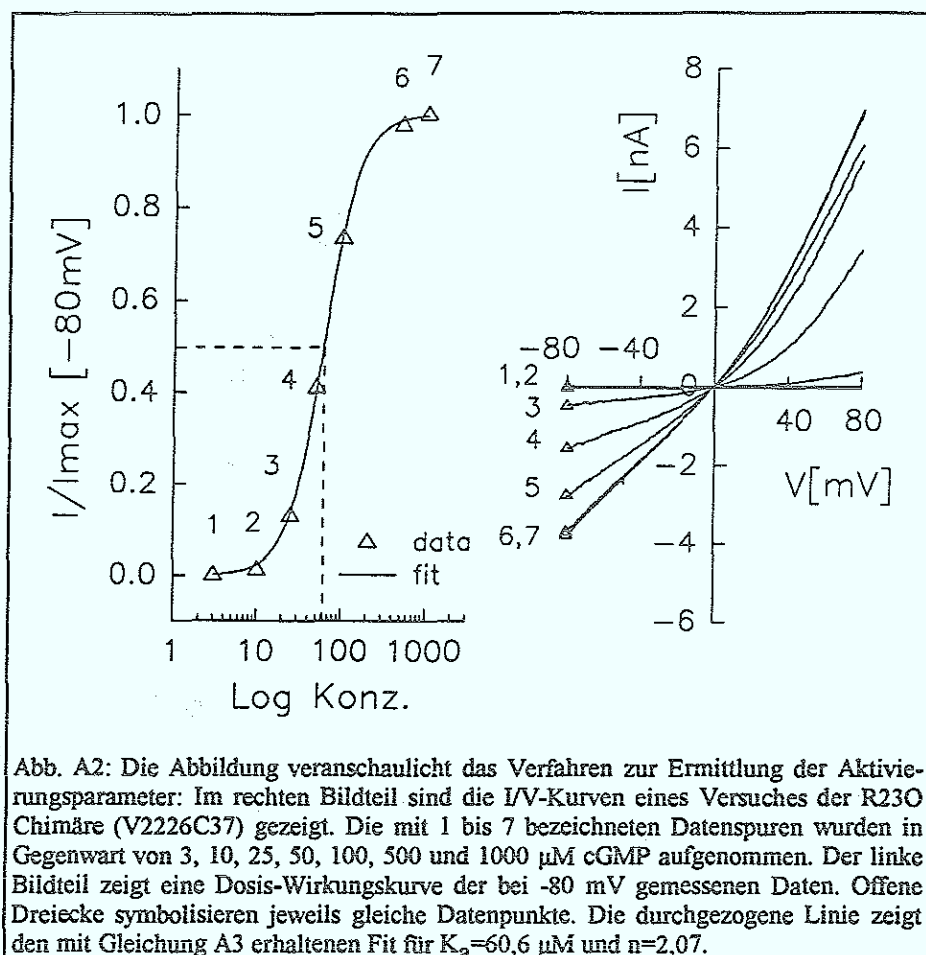


Abb. A2: Die Abbildung veranschaulicht das Verfahren zur Ermittlung der Aktivierungsparameter: Im rechten Bildteil sind die I/V-Kurven eines Versuches der R23O Chimäre (V2226C37) gezeigt. Die mit 1 bis 7 bezeichneten Datenspurten wurden in Gegenwart von 3, 10, 25, 50, 100, 500 und 1000 μM cGMP aufgenommen. Der linke Bildteil zeigt eine Dosis-Wirkungskurve der bei -80 mV gemessenen Daten. Offene Dreiecke symbolisieren jeweils gleiche Datenpunkte. Die durchgezogene Linie zeigt den mit Gleichung A3 erhaltenen Fit für $K_a = 60,6\text{ }\mu\text{M}$ und $n = 2,07$.

Die Standardmethode zur Bestimmung der Aktivierungsparameter aus der Hill-Gleichung beruht auf der graphischen Auftragung von $\text{Log}[y/(1-y)]$ (logit) gegen $\text{Log}[S]$, einer "quasi" linearisierten Form der Gleichung (vgl. Abb. A3). Die Steigung für Konzentrationen $\gg K_a$ und $\ll K_a$ geht gegen eins. Bei kleinen Konzentrationen wird zunächst die erste Bindestelle besetzt, bei sättigenden Konzentrationen steht im Mittel nicht mehr als eine unbesetzte Bindestelle zur Verfügung. Beide Konzentrationsbereiche sind daher nicht kooperativ. Im mittleren Konzentrationsbereich weist der Graph die steilste Steigung auf. Der Hill-Koeffizient wird durch die Steigung am steilsten Punkt der Kurve bestimmt, der Ordinatenabschnitt entspricht der Aktivierungskonstanten.

Lineare Regression aller Datenpunkte würde gerade die uninteressanten Endpunkte besonders hoch bewerten und ist im entscheidenden mittleren Konzentrationsbereich am unempfindlichsten. Eine "Automatisierung" der Auswertung per Computer ist daher aufwendig.

Üblicherweise wird in der CNG-Kanal-Literatur daher eine etwas robustere, leichter "computerisierbare" Gleichung angewendet:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{c^n}{c^n + K_a^n} \quad \text{Gl. A3}$$

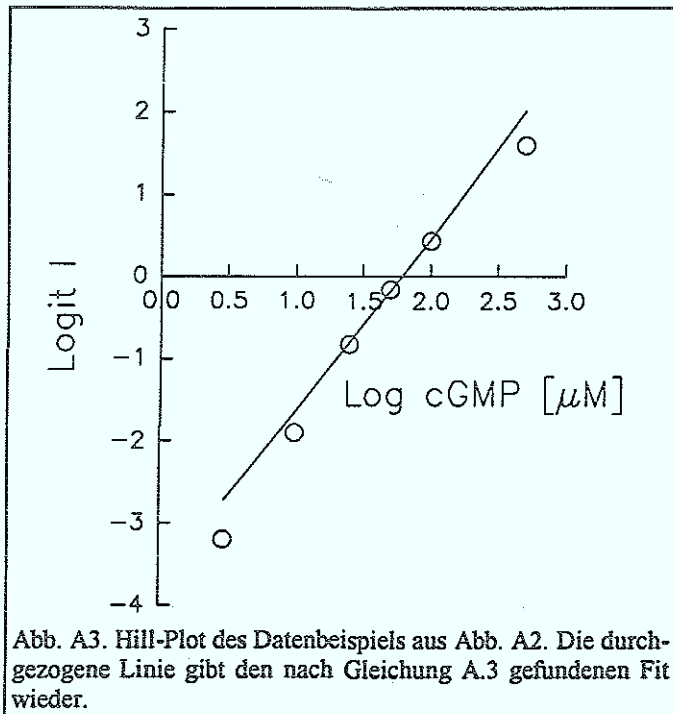


Abb. A3. Hill-Plot des Datenbeispiels aus Abb. A2. Die durchgezogene Linie gibt den nach Gleichung A.3 gefundenen Fit wieder.

K_a wird in dieser Arbeit als Aktivierungskonstante bezeichnet⁴⁹. Der numerische Wert für n entspricht in guter Näherung dem Hill-Koeffizient und K_a entspricht in guter Näherung der um den Exponenten n korrigierten Gleichgewichtskonstante der Hill-Gleichung (Barlow & Blake, 1989). Abb. A2 zeigt ein Beispiel zur Ermittlung der Aktivierungskonstante.

Abb. A3 zeigt das gleiche Datenbeispiel in der Darstellung des Hill-Plots. Die zum Vergleich eingezeichnete Gerade gibt den nach Gleichung A3 erhaltenen Fit wieder.

Abb. A4 demonstriert, daß der Fit im mittleren Konzentrationsbereich am empfindlichsten reagiert. Die Abbildung zeigt die Auswirkung je eines "Ausreißers" (10 % bezogen auf $I_{\max}$, offenes statt geschlossenes Symbol). Die gestrichelten Linien geben die nach Gleichung A3 resultierende prozentuale Abweichung von K_a und n wieder.

Cornish-Bowden weist darauf hin, daß sich aus Abweichungen der gefundenen "Geraden" vom erwarteten Hill-Plot wichtige Schlüsse ziehen lassen, falls z.B. mehrere Prozesse mit unterschiedlichen Hill-Koeffizienten und Aktivierungskonstanten überlagert sind (Cornish-Bowden & Koshland, 1975). Es wurde daher später als zusätzlicher Kontrollparameter die Abweichung des Fits nach Gleichung A3 von den Datenpunkten auf systematische Abweichungen untersucht.

⁴⁹ Der numerische Wert für K_a aus Gleichung A3 ist nicht identisch mit k_A aus Gleichung A1. Es werden daher unterschiedliche Symbole verwendet.

Der Nachteil der Darstellung der Dosis-Wirkungskurve in der nicht linearisierten Form ist, daß sich systematische Abweichungen schlecht erkennen lassen. Teilweise wurden Daten aus Langzeitversuchen daher auch nach der Darstellung des Hill-Plots analysiert. Erste Ergebnisse lassen erkennen, daß teilweise durchaus biphasische Dosis-Wirkungskurven gefittet werden können. Gelegentlich findet man die in Abb. A5 gezeigte Form doppelt logarithmischer Darstellung (Watanabe & Matthews, 1989). Die Darstellung beruht auf der Annahme, daß für kleine Konzentrationen der Anteil von K_a in Gleichung A3 gegen Null geht und die doppelt logarithmische Darstellung eine Gerade mit Steigung n ergibt. Die Annahme gilt für Konzentrationen $\ll K_a$. In diesem Konzentrationsbereich werden normalerweise nicht genügend Daten gemessen. Außerdem unterliegen Messungen extrem kleiner Konzentrationen dem größten systematischen Fehler durch Leckabzug und die für kleine Konzentrationen gefundenen Hill-Koeffizienten sollten gegen eins streben (s.o.).

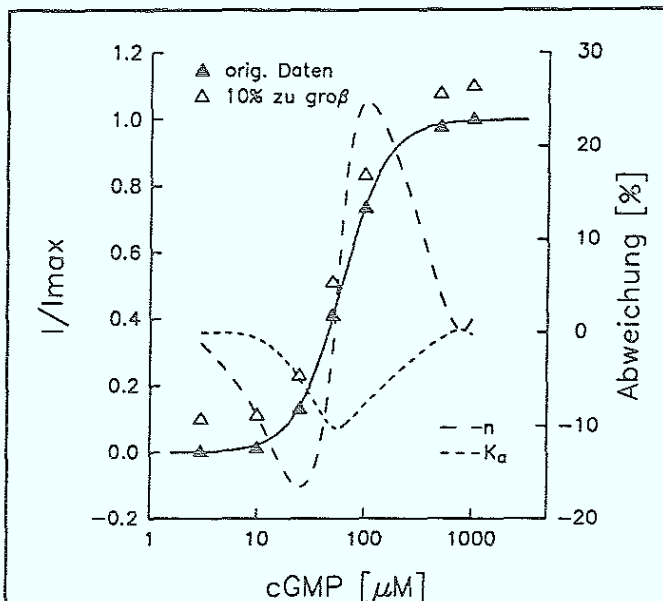


Abb. A4: Die Abweichung zeigt den prozentualen Fehler des aus Gleichung A3 gefitteten Kooperativitätsparameters und der Aktivierungskonstante, wenn je einer der gefitteten Datenpunkte um 10 % abweicht (offene statt geschlossene Datenpunkte).

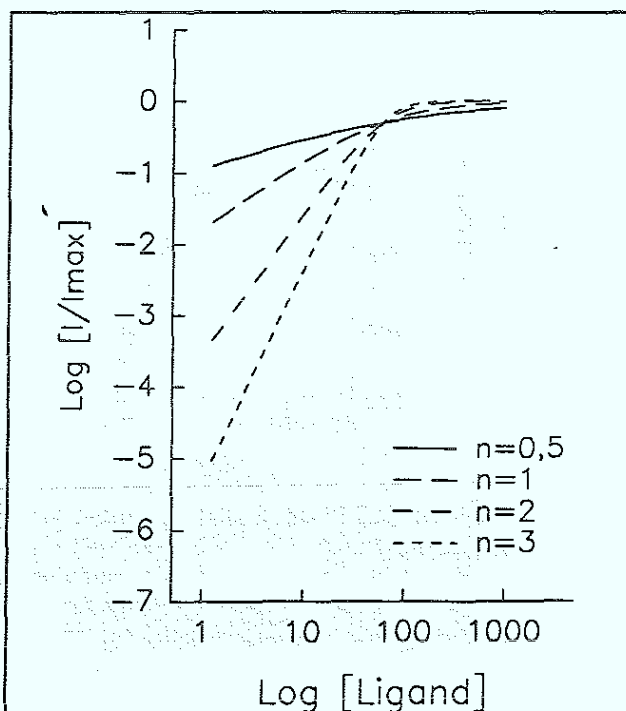
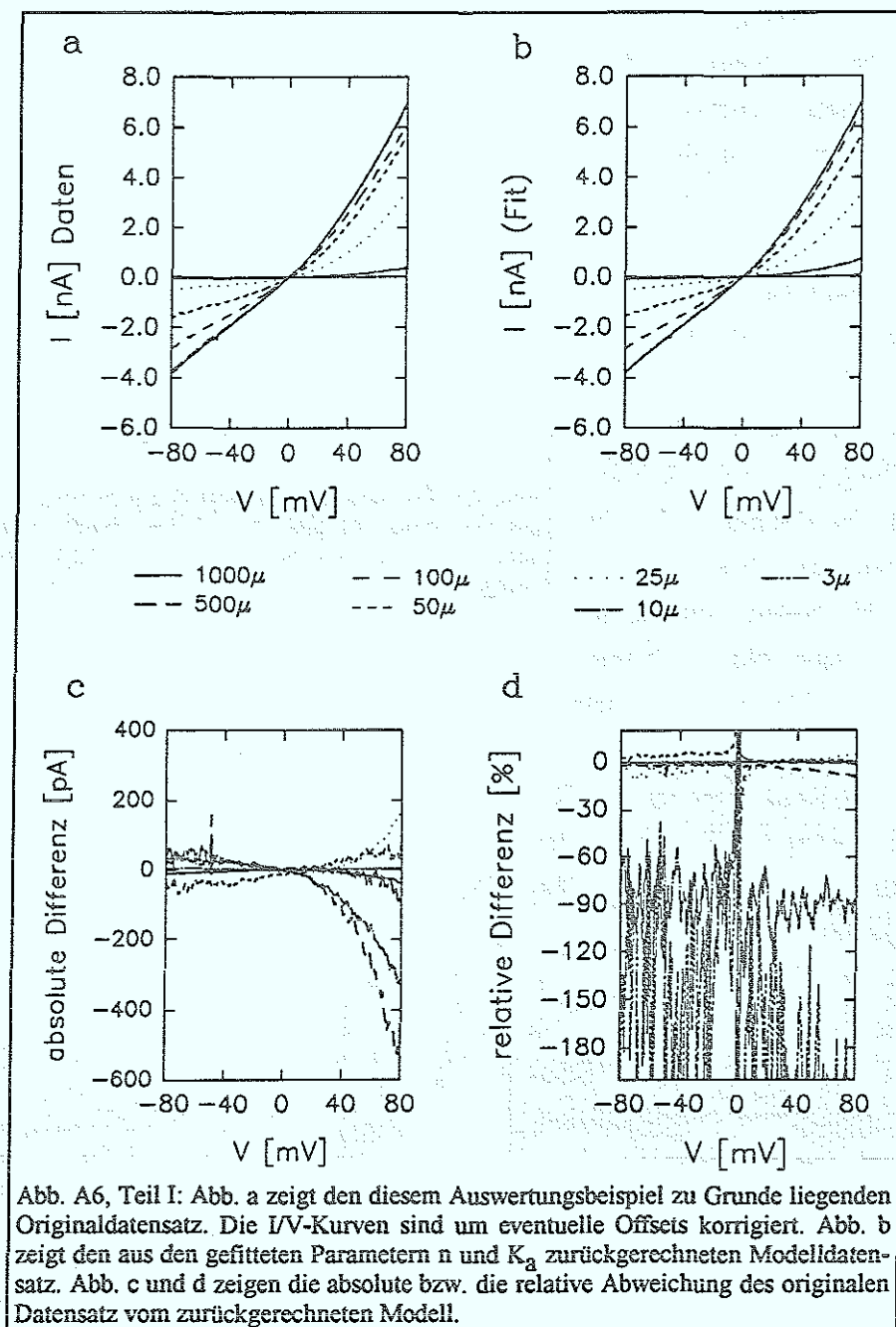
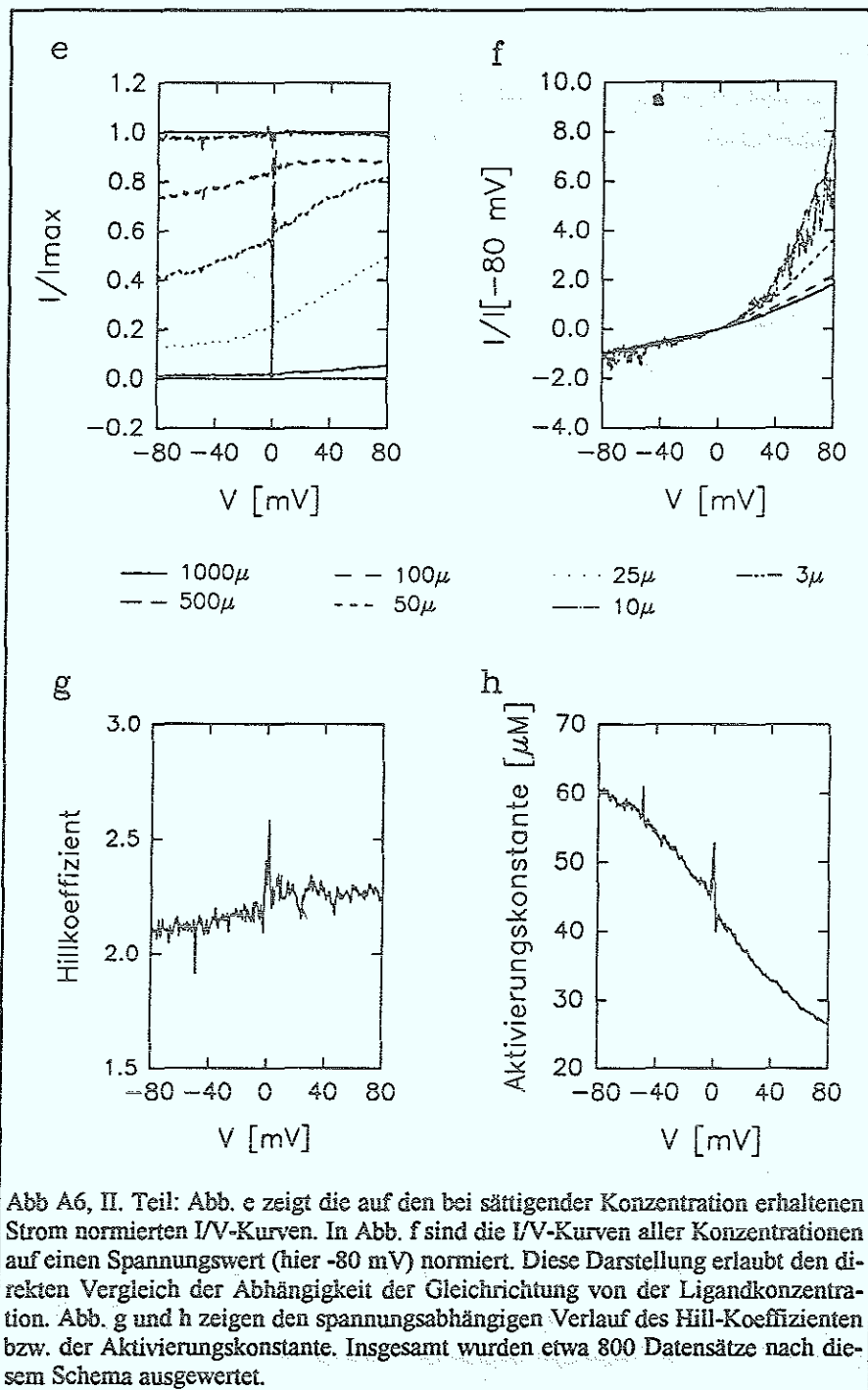


Abb. A5: Doppelt logarithmische Darstellung der in Abb. A1 gezeigten Beispiele.

ANPASSEN DER AKTIVIERUNGSPARAMETER AN DIE DATENSÄTZE



Anfänglich wurde SIGMAPLOT (Jandel Scientific, Erkrath) zur Auswertung der Daten verwendet. Später wurde zusammen mit W. Weber ein Programm entwickelt, das die Auswertung automatisiert. Die Implementierung erfolgte analog zu Press *et al.* (1987) in Microsoft Quick C. Die Auswertung erfolgt Schrittweise:



- Abzug des in Abwesenheit von cGMP gemessenen Leckstroms mit dem pClamp Programm CLAMPFIT
- Übergabe der 250 mittleren, zwischen Spannungsminimum und Spannungsmaximum liegenden Messwerte einer Spannungsrampe (vergl. Abb 3.6) für alle gemessenen Konzentrationen eines Meßdurchgangs als ASCII-Files an das Auswerteprogramm.

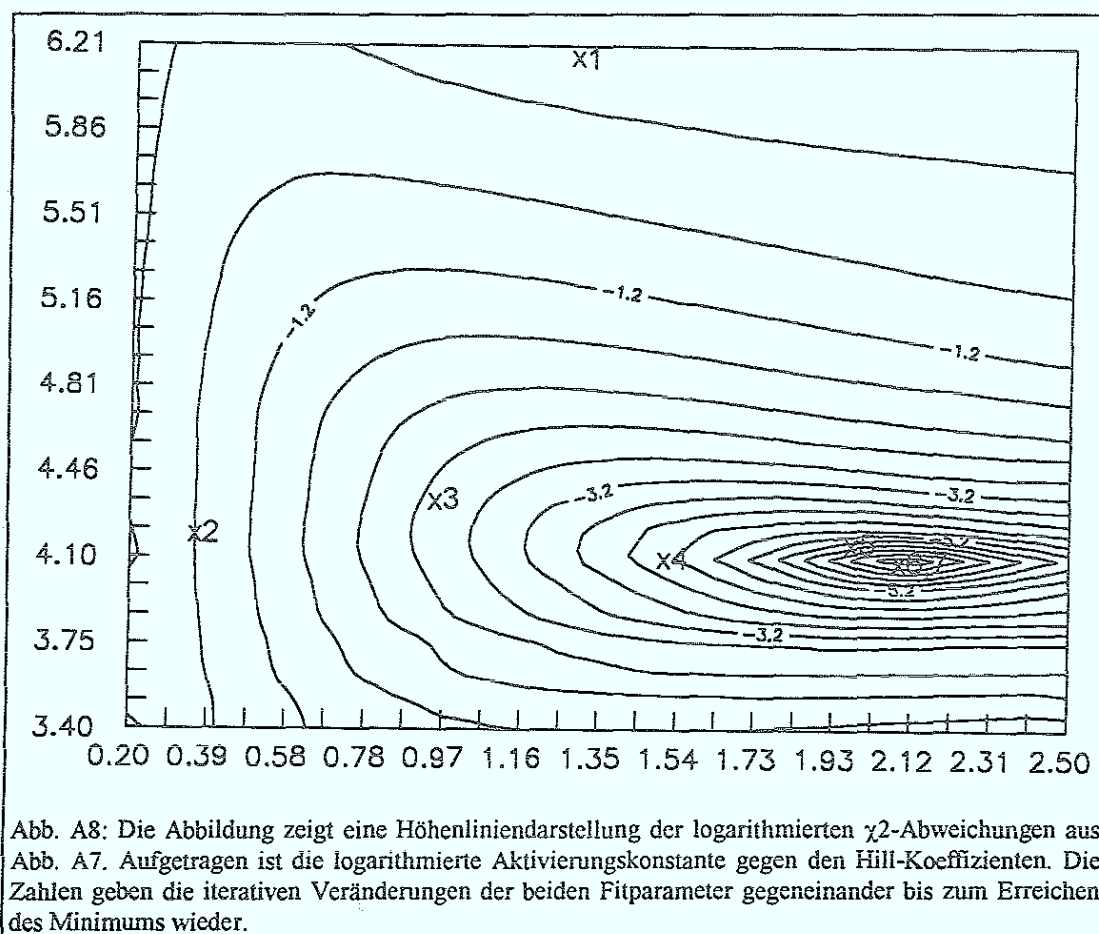
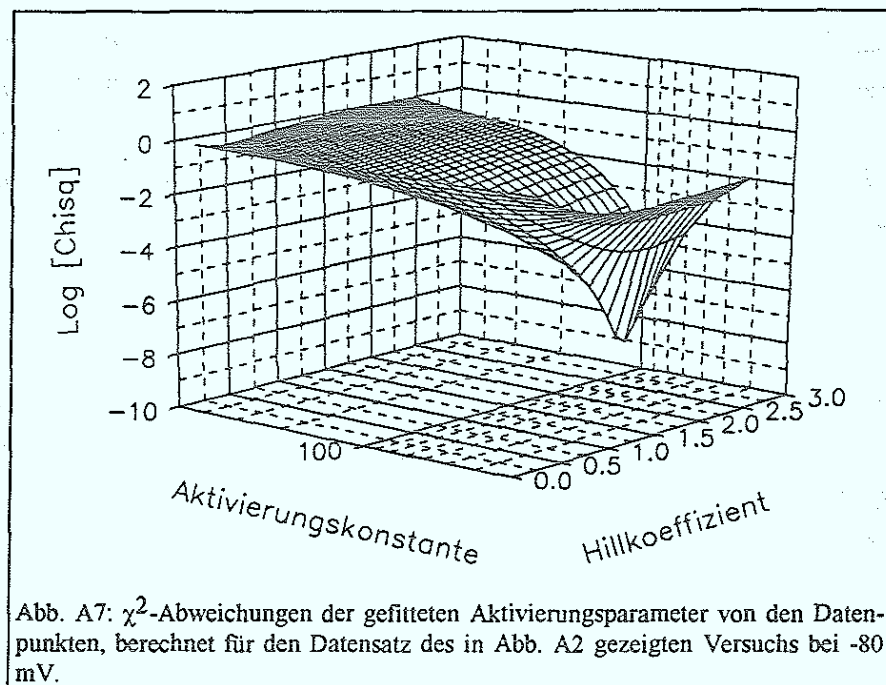
- Korrektur eventueller Offsets bei 0 mV. Abb. A6a zeigt eine typische, offset-korrigierte Kurvenschar.
- Die bei unterschiedlichen Ligandkonzentrationen gemessenen Ströme werden auf den bei sättigender cGMP-Konzentration gemessenen Strom normalisiert (Abb. A6e).
- Für jeden Spannungswert werden die Aktivierungsparameter n und K_a gefittet. (Abb. A6g und h)⁵⁰.
- Zur Kontrolle wird der Datensatz mit den Fitparametern zurückgerechnet (Abb. A6b). und die absoluten (Abb. A6c) und relativen (Abb. A6d) Abweichungen des Originaldatensatzes von den gefitteten Daten berechnet. Die Abweichungen waren in der Regel spannungsunabhängig und lagen für sättigende Ligandkonzentrationen unter 1 %, für Ligandkonzentrationen $\ll K_a$ auch höher. Wie in Abb. A4 gezeigt wird das Ergebnis dadurch nicht beeinflusst.
- Ferner wurden die I/V-Kurven auf den maximalen Strom bei -80 mV normiert (Abb. A6f).

⁵⁰ Für die verwendeten Rampenprotokolle wurden von pClamp zweidimensionale Datenfelder mit 512 Datenpunkten, jeweils einem Zeitwert und einem dazugehörigen Stromwert gespeichert. Die Auswertung erfolgt jedoch nicht als Funktion der Zeit, sondern als Funktion der Spannung.

Die aktuell am Patch anliegende Spannung kann nicht direkt gemessen werden. Abweichung der Sollspannung von der Istspannung am Patch kann hauptsächlich zwei Ursachen haben: unzureichende Kompensation des mit dem Membranpatch in Reihe geschalteten Zugangswiderstands der Pipette und unzureichende Offsetkorrektur. Im Übrigen kann man annehmen, daß sich die Spannung beim Durchlaufen der Rampe linear mit der Zeit zwischen den vorgewählten Eckwerten ändert.

Die Serienwiderstände wurden falls nötig durch entsprechende Einstellung am Verstärker kompensiert und die scheinbar über den Patch angelegte Spannung (s.o.) zur Kontrolle ebenfalls in einem Datenfeld gegen die Zeit gespeichert. Zusätzlich wurden jeweils die maximal und minimal erreichten Spannungswerte im Protokollfile ausgedruckt (vgl. Abs. 3.6). Der bei vollständig unkompensierten Spannungen in den üblicherweise verwendeten Pipetten auftretende Fehler durch den Serienwiderstand würde maximal zu einer Abweichung der Aktivierungskonstante um 10% führen.

Zur Auswertung wurden die mit den Stromdaten gespeicherten Zeiten durch die linear zwischen den Soll-Spannungseckpunkten interpolierten Werte ersetzt.



Die nicht-lineare Anpassung der Gleichungsparameter an den Datensatz basiert auf dem Levenberg-Marquardt Algorithmus (Levenberg, 1944). Der Algorithmus kombiniert die Methode des steilsten Gradienten (besonders effizient bei Bedingungen entfernt vom Minimum) und die Newton-Gauss Methode (für Bedingungen nahe am Minimum, Munson, 1990; Bard, 1970). Die χ^2 -Abweichungen der partiellen Ableitungen nach n und K_a werden minimiert. Abb. A7 zeigt eine logarithmierte Darstellung der χ^2 -Werte gegen n und K_a . Die Lösung ist eindeutig, da nur ein Minimum existiert. Abb. A8 zeigt, wie der Fitalgorithmus n und K_a von Iteration zu Iteration ändert, bis das Minimum gefunden ist.

Normalerweise konnten die Parameter des vorhergehenden Datensatzes als Startwerte der nächsten Iteration übernommen werden. Minima wurden dann innerhalb von drei bis fünf Iterationen gefunden werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, die Startwerte für n und K_a durch einen Zufallsgenerator erzeugen zu lassen. Dadurch wird bei stark verrauschten Datensätzen die Gefahr kleiner, in lokalen Minima hängen-zubleiben. Schließlich erlaubt das Programm, die Abbruchparameter zur Bestimmung der Genauigkeit des Fits individuell anzupassen.

ANHANG B

MOLEKULARBIOLOGIE

WILDTYPSEQUENZEN

DER CNG-KANAL AUS SEHSTÄBCHEN DES RINDS (ROD)

Der ROD Kanal wurde aus einer Retina-spezifischen cDNA Bibliothek des Rinds kloniert (Kaupp *et al.*, 1989). Das aus 690 Aminosäuren bestehende Protein hat eine Molmasse von 78 kDa, wenn es in Oozyten exprimiert wird. Aus Rindersehstäbchen isoliert, beträgt die Molmasse lediglich 63 kDa (jeweils auf SDS Gel bestimmt). Der native Kanal ist N-terminal prozessiert und beginnt erst mit Aminosäure 93 (Molday *et al.*, 1991).

DER CNG-KANAL AUS OLFAKTORISCHEN SINNESZELLEN DES RINDS (OLF)

Der OLF Kanal wurde aus einer cDNA Bibliothek aus Rinderriechepithel kloniert (Ludwig *et al.*, 1990a,b). Der translatierte Leserahmen umfaßt 663 Aminosäuren. Es wurden zwei Klone exprimiert, die sich an Nukleotidposition 128 und 155 unterscheiden. Die Nukleotidaustausche führen zum Austausch der Aminosäuren A42D und Q52R (Position 112 und 121 in Abb. B1). Die primären Transkripte ließen sich erst nach Deletion des 5'-nicht-kodierenden Bereichs und Einfügen einer optimierten "Kozak"-Sequenz (Kozak, 1984) funktionell in Oozyten exprimieren (Altenhofen *et al.*, 1991). Da die beiden Transkripte in ersten Messungen identische Eigenschaften bezüglich der Ligandempfindlichkeit zeigten, wurde nachfolgend nur das erstgenannte untersucht.

DIE CNG-KANÄLE AUS SEHZELLEN DES HUHNS (CHROD, CHCONE)

Die Klone des ChRod und des ChCone Kanals wurden aus einer cDNA Bibliothek aus Hühnerretina erhalten (Bönigk *et al.*, 1993). Der ChRod Klon hat einen offenen Leserahmen von 645 Aminosäuren, der Leserahmen des ChCone Klon umfaßt 735 Aminosäuren. Der immunohistochemische Nachweis zeigt, daß ChRod in Außensegmenten von Hühnerphotorezeptoren lokalisiert ist, und daß das ChCone Protein nur in Sehzapfen, nicht jedoch in Stäbchen vorkommt. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß der ChCone Kanal auch in Sehstäbchen exprimiert wird, oder daß es weitere Subtypen des Zapfenkanals gibt.

Beide Transkripte konnten erst nach Einfügen einer optimalen Kozak Sequenz, Verlängerung des Poly(A)⁺ Schwanzes⁵¹ und Austausch der 3'-nichtkodierenden Sequenzbereiche gegen die des ROD Kanals heterolog exprimiert werden (Bönigk *et al.*, 1993). Die Veränderungen wurden schrittweise eingeführt. Die Expressionsdichte konnte durch die Veränderungen leicht erhöht werden, die mittleren maximalen Ströme blieben jedoch insgesamt klein (beim ChRod im Mittel 10fach, beim ChCone 20fach, beim OLF 105fach und beim ROD 90fach größer als der Leckstrom).

DER CNG-KANAL AUS AORTENGeweBE DES KANINCHENS (HERZ153, HERZ357)

Der Herzkanal (Herz153) wurde aus einer Aorta-spezifischen cDNA Bibliothek des Kaninchens kloniert (Biel *et al.*, 1993). Der Klon kodiert für ein 732 Aminosäuren langes Protein. Es ist zu 93,7 % homolog zur Sequenz des OLF, N-terminal aber um 68 Aminosäuren länger. Auch hier wurde die Kozak Sequenz vor Expression optimiert. Es existiert eine zweite Translationsinitiierungsstelle im Leserahmen. Es ist nicht klar, ob beide Proteine auch *in vivo* exprimiert werden. Es wurde daher ein mutierter Klon (Herz357) untersucht, der erst mit dem zweiten Translationsstart beginnt. Die Lokalisierung und Funktion des Kanals *in situ* ist unklar.

Alle Proteinsequenzen wurden aus der Nukleotidsequenz der genannten Klone abgeleitet.

⁵¹ Der Poly(A)⁺-Schwanz soll u.a. für die Stabilität der mRNA in der Oozyte verantwortlich sein (Gurdon *et al.*, 1973).

VORBEREITEN DER mRNA ZUR INJEKTION

Die mRNA Präparation erfolgte durch *in vitro* Transkription von linearisierter cDNA in SP6- oder T3-Vektoren. Anschließend wurde die cDNA durch DNase Behandlung verdaut, nach Phenol- und Chloroformextraktion der Enzyme mit Äthanol präzipitiert und in TRIS/EDTA gepuffertem, DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Die mRNA wurde auf Homogenität, Länge und Konzentration untersucht und in Aliquots zu 0,4 µg/µl zur Injektion bereitgestellt⁵².

Mutanten und Chimären wurden mit PCR Methoden konstruiert und im Bereich der Schnittstellen (teilweise auch ganz) sequenziert.

Der ROD wurde von Dr. U.B. Kaupp kloniert, der OLF Klon sowie die T537X Mutanten und alle Chimären und Deletionsmutanten (außer DROD und R50) stammen von Dr. J. Ludwig, die T560X und EQ, RQ Mutanten sowie DROD und R50 wurden von W. Kraus in Zusammenarbeit mit Dr. E. Eismann angefertigt. Die Mutanten RODCG1-4, R269Q und D1 sowie MRODO1 stammen von Dr. E. Eismann. Die CNG-Kanäle aus Hühnergewebe wurden von Dr. W. Bönigk kloniert (alle IBI, KFA) und der Herzkanal von Dr. M. Biel (TU München). mRNA wurde außerdem von Frau S. Köppen und Frau P. Nacken präpariert.

SEQUENZALIGNMENTS, LEGENDE

In Abb. B.1 werden die Sequenzen der exprimierten CNG-Kanäle verglichen. Das Alignment wurde mit Hilfe von MULTALIGN erstellt. Die farbige Darstellung erfolgte auf einem HP Plotter. Die farbige Darstellung erleichtert das Erkennen von Missalignments und von strukturellen Merkmalen (vgl. z.B. das S4-Segment). Es werden lipophile Aminosäuren (VILF), geladene Aminosäuren (EDKR) und "Strukturbrecher" (G,P) unterschieden. Cysteine wurden durch Dickdruck hervorgehoben.

Die Fusionsstellen der im Text erwähnten Chimären und deletierten Transkripte sind durch Pfeile, die punktmutierte Aminosäuren durch Punkte kenntlich gemacht. Die Zuordnung der Transmembranregionen erfolgte in Analogie zu dem in der Einleitung gezeigten Modell (s. Abb. 1.1).

Die Benennung der Sequenzen und Chimären entspricht den im Text verwendeten Bezeichnungen. Soweit nicht anders vermerkt, sind die Fusionsstellen der Chimären für den OLF und den ROD identisch.

⁵² Die Konzentration scheint ebenso wie das Alter des Transkripts keinen kritischen Einfluß gehabt zu haben. Es wurden auch mit 0,1 µg/µl gute Ergebnisse erzielt und Transkripte wurden z.T. über 18 Monate verwendet (Lagerung in wässriger Lösung bei -80° C).

Die auf den OLF bezogene Nomenklatur in Abb. B1 bezeichnet auch die komplementären Chimären des ROD Kanals. Die Nummernangaben des Alignments beziehen sich jeweils auf die Aminosäureposition unter der ersten Ziffer.

DELETIONEN UND CHIMÄREN:

DRod: Aus der Sequenz des ROD wurde ein N-terminaler Bereich ausgeschnitten, in dem 51 von 70 Aminosäuren geladen sind. Das Label "DRod" in Abb. B1 bezeichnet Anfang und Ende des ausgeschnittenen Segments.

S93: Nachdem gezeigt wurde, daß der ROD *in situ* erst mit Aminosäure 93 beginnt, wurde ein Transkript getestet, dem die ersten 92 Aminosäuren fehlen. Es konnte bislang nicht funktionell exprimiert werden.

D1O, D1R: Die intrazellulären, N-terminalen Domänen wurden bis zur Position 274 abgeschnitten. Das Transkript beginnt bei H1.

O1R,R1O: Fusionsstelle für Transkripte, in denen der N-Terminus ausgetauscht wurde.

O3R, O4R, O5R: Die Chimären schneiden in den jeweiligen putativen transmembranalen Segmenten.

O5R,R6O: Nach dem sechs-Helix Modell liegt die Schnittstelle hinter H6. Die Existenz von H6 war unsicher, da sie mit dem Sequenzbereich überlappt, der im CAP als Bindestelle dient.

R6D: Das Transkript existiert nur für den ROD. Die Bindestelle wurde im ersten β -Faltblatt abgeschnitten.

O23R, R23O: abweichend von den anderen Chimären sitzt die Fusionsstelle in einer intrazellulären Schleife zwischen zwei Transmembrandurchgängen.

O1R6O, R1O6R: In dem Transkript ist der Bereich von H1-H6 mit den C- und N-terminalen intrazellulären Domänen des komplementären Kanals kombiniert.

O23R4O, R23O4R: Es wird der Bereich um H3 und S4 ausgetauscht um mögliche Interaktionspartner der Bindestelle zu identifizieren.

PUNKTMUTATIONEN

MUTATIONEN IM BEREICH DER BINDESTELLE:

T560 (ROD) und T537 (OLF) beziehen sich auf T678. Die Position ist in allen cGMP-spezifischen Bindestellen von einem Threonin, in den cAMP-spezifischen von einem Alanin besetzt. Die Seitenkette der Aminosäure wechselwirkt spezifisch mit cGMP.

RODCG1-4: Die beiden T678 benachbarten Aminosäuren (R677 und A679) sind sowohl in cGMP- als auch in cAMP-spezifischen Bindestellen der Proteinkinasen konserviert (s. schwarze Punkte). Wie die Aminosäure an Position 678 unterscheidet sich auch die Aminosäure an Position 676 spezifisch zwischen cGMP- und cAMP-Bindestellen (jeweils in einer Proteinfamilie vollständig konservierte Aminosäuren sind in Großbuchstaben gedruckt):

	• •
cAMP I:	ntPRAA gaPRAA sPRAA
cAMP II:	NkPRAA NrPRAA
cGMP I:	eDvRTA d kRTA
cGMP II	NCtRTA NCqRTA
CNG-Kanäle:	GNRRTA

Der Guanidiniumrest des in allen Bindestellen konservierten R677 wechselwirkt mit der Phosphatgruppe des Liganden. Nach dem ComputermodeLL ist die Seitenkette der Aminosäure an Position 676 vom Liganden abgewandt. Das in den Bindestellen der cAPK konservierte Prolin könnte jedoch zu einer unterschiedlichen räumlichen Fixierung der Seitenkette von R677 führen und damit die Lage der Base des Liganden verändern. Die entsprechende Position in den Bindestellen der cGPK ist demgegenüber nicht konserviert. In der Mutante RODCG1 ist R676P ausgetauscht, in der Mutante RODCG2 N675R und R676P, in der Mutante RODCG3 R676P und T678A und in der Mutante RODCG4 N675R, R676P und T678A.

Die Bindestelle des OLF ist an 13 von 124 Positionen nicht mit der des ROD identisch. Lediglich zwei der ausgetauschten Aminosäuren sind geladen. In der Mutante MRODO1 sind die ersten drei unterschiedlichen, N-terminal von T678 liegenden Aminosäuren (D656A, Y569C, A673M) des OLF in die Bindestelle des ROD eingeführt. Sie umfassen eine der beiden geladenen Aminosäuren.

C573S: Die Bindestelle der CNG-Kanäle enthält zwei Cysteine. Das hintere liegt im achten β -Faltblatt (C691), das vordere im zweiten (C623). Kanäle der OLF Gruppe enthalten zusätzlich ein drittes Cystein in β 6. Mit der Mutante sollte getestet werden, ob der nach Inkubation mit NEM beobachtete Effekt auf die Kooperativität durch eine Wechselwirkung des C691 erklärt werden kann.

MUTATIONEN AM S4-MOTIV:

EQ: Es wurden zwei Glutaminsäuren in der Sequenz des ROD gegen Glutamine ausgetauscht, die den "Kern" der vier Arginine im S4-Motiv der CNG-Kanäle einrahmen (E385Q, E399Q).

RQ: Es wurden das dritte und vierte Arginin des S4-Motivs im Rod gegen Glutamine ausgetauscht: R393Q, R396Q.

R269Q: In dieser Mutante ist im Gegensatz zur RQ Mutante nur R393 gegen Q ausgetauscht.

D1: Es wurden im ROD drei Aminosäuren des S4-Motivs ausgetauscht, die im OLF unterschiedlich sind: R393H, I394F und S395A.

		+	210	+	220	+	230	+	240	+	250
BOV		.	.	.	.	.	KKKKKKKK	KKKK	SKPP	DKKN	KKKKKKKK
CHROD		.	.	.	.	.	KKKKKKKK	KKKK	SKSEN	KKKK	KKKKKK
CHCONE		G	N	N	P	W	P	L	A	A	N
OLF		G	N	N	P	W	P	L	A	A	N
HERZ153		G	N	N	P	W	P	L	A	A	N

10/10/2020

10/10/2020

10/10/2020

10/10/2020

10/10/2020

10/10/2020

		+	560	+	570	+	580	+	590	+	600			
BOV	KW	OY	WTNKKT	DEKE	KN	PAK	RAE	A	N	H	ET	KK	RAE	ADCE
CHROD	KW	OY	WTNKKK	DEKE	KN	PAK	RAE	A	N	H	ET	KK	RAE	ADCE
CHCONE	KW	OY	WTNKKT	DEKE	KN	PAK	RAE	A	N	H	ET	KK	RAE	ADCE
OLF	KW	OY	WTNKKK	DEKE	KN	PAK	RAE	A	N	H	ST	KK	RAE	ADCE
HERZ153	KW	OY	WTNKKT	DEKE	KN	PAK	RAE	A	N	H	ST	KK	RAE	ADCE

	<u>αA</u>						<u>-β1-</u>		<u>β2</u>		<u>β3</u>		<u>β4</u>																										
			+	610		+	620		+	630		+	640		+	650																							
BOV	A	-	D	E	V	K	G	P	Q	Y	S	P	D	Y	C	K	K	-	D	-	K	E	M	Y	I	K	E	-	K	A	/	N	A	D	D	-	T	Q	
CHROD	A	-	D	E	V	K	L	Q	P	Q	Y	S	P	D	Y	C	K	K	-	D	-	K	E	M	Y	I	K	E	-	K	A	/	N	A	D	D	-	T	Q
CHCONE	A	-	D	E	V	K	K	P	T	R	S	P	D	Y	C	K	K	-	D	-	K	E	M	Y	I	K	E	-	K	A	/	N	A	D	D	-	T	Q	
OLF	A	-	D	E	V	K	R	P	Q	Y	S	P	D	Y	C	K	K	-	D	-	K	E	M	Y	I	K	E	-	K	A	/	N	A	D	D	-	T	Q	
HERZ153	A	-	D	E	V	K	R	P	Q	Y	S	P	D	Y	C	K	K	-	D	-	K	E	M	Y	I	K	E	-	K	A	/	N	A	D	D	-	T	Q	

O6R

R6D

	-B5-		-B6-		-B7-		-B8-		-B9-					
	+	660	+	670	+	680	+	690	+	700				
BOV	Y A	S A	S Y	T E	S N	K	S K A	N R	A T A N	T S	-Y S D	T C	S K D D	M E A
CHROD	Y A	S A	S Y	T E	S N	K	S K A	N R	A T A N	T S	-Y S D	T C	S K D D	M E A
CHCONE	Y A	S A	S Y	T E	S N	K	S K S	N R	A T A N	T S	-Y S D	T C	S K D D	M E A
OLF	Y A	S A	S C	T E	S N	K	S K M	N R	A T A N	T S	-Y S D	T C	S K D D	M E A
HERZ153	Y A	S A	S C	T E	S N	K	S K M	N R	A T A N	T S	-Y S D	T C	S K D D	M E A

	cC									
	+	710	+	720	+	730	+	740	+	750
BOV	TEYPUAK-M	EEK-KQ	LMKD	LD	INANA	SOPKO	EEK	ATMASS		
CHROD	TEYPUAKAM	EEK-KQ	MKD	LD	AN	SOPKO	EEK	AYME-SM		
CHCONE	TEYPUAKKA	EEK-NQ	LMKN	LD	EZA	AKA	AOPKO	EEK	DALETA	
OLF	TEYPUAKK	EEK-EE	LMKE	LD	ENE	AASME	DL	QEK	EQ	RTNM
HERZ153	TEYPUAKK	EEK-EE	MKE	LD	ENE	AASME	DL	QEK	KQ	RTNM

		+	760	+	770	+	780	+	790	+	800																		
BOV	DT	Q	T	R	A	A	A	R	Y	E	S	M	Q	Q	K	Q	T	K	T	K	K	P	S	A	T	E	S	T	S
CHROD	DN	Q	T	K	A	A	A	R	Y	D	A	A	Q	Q	K	K	T	Q	M	K	K	K	P	M	E	T	A	A	T
CHCONE	DT	Q	T	R	A	A	A	R	Y	S	S	S	Q	Q	K	K	Q	A	P	V	T	R	K	K	Y	S	S	S	S
OLF	DT	Y	T	R	A	A	A	R	Y	T	A	Q	Q	K	K	Q	T	A	T	T	K	M	K	Q	N	N	E	D	S
HERZ153	RT	Y	T	R	A	A	A	R	Y	T	A	Q	Q	K	K	Q	T	A	T	T	K	M	K	Q	N	N	E	D	S

	+ 810 +	820 +	830 +	840 +	850
BOV	-PTUSTQQ.....				
CHROD	DKP-VTKTE.....				
CHCONE	PEDQKKD.....				
OLF	PAEKP.....				
HERZ153	AAAEQP.....				

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%

ANHANG C

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS MAKROSKOPISCHEN MESSUNGEN

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Aktivierungsparameter der untersuchten Wildtypen, Mutanten und Chimären. Es sind jeweils der Hill-Koeffizient, die Aktivierungskonstante (in μM soweit nicht anders vermerkt) und das Verhältnis der Amplituden des gemessenen Stromes zum Leckstrom mit Mittelwert, Standardabweichung und der Anzahl der Versuche für zwei Spannungen, +80 und -80 mV, angegeben. Ferner ist der Quotient der Ströme bei -80 mV / +80 mV als Maß für die Gleichrichtung angegeben. Die letzte Spalte verweist auf die Abbildungsnummern der folgenden Abbildungen.

Die Tabelle ist in drei Abschnitte gegliedert: Der erste Abschnitt enthält die an Wildtypen gemessenen Daten, der zweite die Daten der Chimären und der dritte die Daten der Punktmutanten.

Im Anschluß an die Tabelle ist für jedes exprimierte Transkript bzw. für jede unterschiedliche Meßbedingung eine Übersicht zur zusammenfassenden Dokumentation der Messungen angefügt. Der Bildaufbau ist für alle folgenden Abbildungen gleich: Die linke Spalte enthält eine Übersicht über die Rohdaten, die rechte die jeweiligen Parameter mit Mittelwert und Standardabweichung.

- In der ersten Bildreihe ist links eine typische Reihe von I/V-Kurven unterschiedlicher Ligandkonzentration abgebildet. Die Versuchsnummer des gezeigten Experiments ist in der Legende angegeben. Rechts ist zum Vergleich der Gleichrichtungseigenschaften eine auf +80 mV normierte und über alle auswertbaren Versuche gemittelte I/V-Kurve jeweils sättigender Ligandkonzentration mit Standardabweichung gezeigt.
- In der zweiten Reihe sind in der linken Abbildung die absoluten Aktivierungskonstanten gegen die Spannung aufgetragen und rechts die auf -76 mV normierten und gemittelten Aktivierungskonstanten mit Standardabweichung (K_a/V -Kurve).
- In der letzten Reihe sind die entsprechenden Werte für den Hill-Koeffizienten gezeigt (n/V-Kurve).

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

WILDTYPEN

Tabelle C1		+80 mV			-80 mV			Rektif.	Abb.
		n	Ka	Faktor	n	Ka	Faktor		
ChCone	Mittel	2,73	33,98	19,74	2,27	65,28	12,78	0,63	C1
cGMP	Stdabw.	1,05	9,11	21,44	0,74	16,88	14,17	0,11	
	Anzahl	14	14	14	14	14	14	14	
ChRod	Mittel	2,32	15,39	10,02	2,14	34,14	4,87	0,49	C2
cGMP	Stdabw.	0,57	7,57	7,27	0,52	13,24	2,78	0,16	
	Anzahl	8	8	9	8	8	8	8	
OLF 100K	Mittel	2,29	1,56	104,69	2,44	2,45	129,91	0,70	C3
cGMP	Stdabw.	0,53	0,44	143,50	0,53	0,73	224,40	0,14	
	Anzahl	24	24	24	24	24	24	24	
OLF	Mittel	2,47	57,86	39,81	2,42	92,02	23,74	0,57	C4
cAMP	Stdabw.	0,61	8,05	24,48	0,49	14,88	15,31	0,04	
	Anzahl	12	12	12	12	12	12	12	
OLF 25K	Mittel	2,91	4,07	54,26	3,32	8,58	27,33	0,51	C5
	Stdabw.	0,14	0,94	38,58	0,49	2,92	18,20	0,11	
	Anzahl	4	4	4	4	4	4	4	
OLF 250K	Mittel	2,46	2,08	67,54	2,61	3,25	47,04	0,63	C6
	Stdabw.	0,17	0,18	69,26	0,26	0,32	52,78	0,04	
	Anzahl	4	4	4	4	4	4	4	
OLF 25Li	Mittel	2,65	1,86	2,98	2,98	3,01	5,76	1,91	C7
	Stdabw.	0,46	0,04	0,42	0,91	0,11	0,86	0,09	
	Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	
OLF 100Li	Mittel	2,88	2,54	30,53	2,77	3,98	45,49	1,32	C8
	Stdabw.	0,61	0,33	24,54	0,29	0,72	38,21	0,11	
	Anzahl	11	11	11	11	11	11	11	
OLF 25NH	Mittel	2,78	6,17	8,78	4,53	7,25	12,99	1,38	C9
	Stdabw.	0,03	1,02	3,39	0,07	0,89	3,76	0,08	
	Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	
ROD 100K	Mittel	1,99	34,60	87,98	2,00	79,54	79,89	0,58	C10
cGMP	Stdabw.	0,51	11,32	100,70	0,55	24,44	130,57	0,13	
	Anzahl	30	30	30	34	34	34	28	
ROD	Mittel	1,81	1215	13,30	n.d.	n.d.	3,57	0,15	C11
cAMP	Stdabw.	0,93	296	9,92	n.d.	n.d.	0,12	0,06	
	Anzahl	3	3	3			2	4	
ROD 25K	Mittel	2,00	49,23	26,26	1,69	116,06	7,56	0,29	C12
	Stdabw.	0,47	13,98	13,29	0,46	42,90	3,58	0,03	
	Anzahl	10	10	10	10	10	10	10	
ROD 250K	Mittel	2,37	32,46	44,72	2,01	62,88	35,98	0,65	C13
	Stdabw.	0,46	12,77	26,40	0,23	21,84	22,30	0,05	
	Anzahl	11	11	11	11	11	11	10	

ROD 25Li	Mittel	2,13	61,03	12,51	1,82	148,82	11,04	0,89	C14
	Stdabw.	0,25	11,07	4,62	0,24	31,31	4,15	0,07	
	Anzahl	5	5	5	5	5	5	4	
ROD 100Li	Mittel	2,15	60,02	111,60	1,75	145,18	129,03	0,84	C15
	Stdabw.	0,36	9,43	40,77	0,32	31,43	67,59	0,06	
	Anzahl	12	12	12	12	12	12	12	
ROD 25NH	Mittel	1,97	73,20	20,25	1,64	164,67	14,91	0,61	C16
	Stdabw.	0,81	22,18	10,27	0,50	83,42	12,65	0,15	
	Anzahl	11	11	11	11	11	11	9	
ROD 100Na	Mittel	1,75	61,00	36,28	2,02	86,27	42,37	1,12	C17
	Stdabw.	0,03	0,31	5,85	0,17	10,42	9,23	0,07	
	Anzahl	2	2	2	2	2	2	2	
HERZ153	Mittel	2,28	1,72	83,36	2,40	2,92	97,27	0,62	C18
cGMP	Stdabw.	0,32	0,39	115,43	0,26	0,56	155,77	0,05	
	Anzahl	9	9	9	9	9	9	9	
HERZ153	Mittel	1,71	57,94	37,59	1,79	113,91	29,29	0,70	C19
cAMP	Stdabw.	0,28	8,52	18,41	0,37	31,13	15,12	0,10	
	Anzahl	7	7	7	7	7	7	7	
HERZ357	Mittel	2,66	1,91	39,80	2,49	3,25	33,61	0,64	C20
cGMP	Stdabw.	0,61	0,51	42,74	0,54	0,99	43,23	0,08	
	Anzahl	15	16	16	16	16	16	13	
HERZ357	Mittel	1,61	45,52	93,46	1,59	79,31	85,94	0,70	C21
cAMP	Stdabw.	0,27	12,76	81,17	0,22	21,36	131,96	0,14	
	Anzahl	10	11	11	8	9	9	9	

CHIMÄREN

		+80 mV			-80 mV				Abb.
		n	Ka	Faktor	n	Ka	Faktor	Rektif.	
R6O	Mittel	1,7	135,6	7,0	1,7	192,7	2,7	0,37	C22
	Stdabw.	0,2	43,3	5,1	0,4	65,5	2,1	0,19	
	Anzahl	27	27	27	26	26	26	26	
O6R	Mittel	2,9	1,5	8,8	3,1	2,0	5,6	0,58	C23
	Stdabw.	0,5	0,3	6,9	1,4	0,5	3,8	0,03	
	Anzahl	15	15	16	16	16	16	16	
R5O	Mittel	2,2	46,0	98,8	2,2	104,9	71,2	0,52	C24
cGMP	Stdabw.	0,6	13,2	71,9	0,6	33,8	80,6	0,15	
	Anzahl	24	24	24	21	21	21	21	

R5O	Mittel	1,6	1,75	31,5	1,4	2,00	3,3	0,12	C25
cAMP	Stdabw.	0,3	0,55	21,7	0,2	0,54	2,1	0,03	
[mM]	Anzahl	8	8	9	4	4	8	8	
O5R	Mittel	3,0	3,5	230,6	2,8	5,7	205,7	0,59	C26
	Stdabw.	0,5	0,6	72,5	0,2	1,1	109,6	0,11	
	Anzahl	9	9	9	9	9	9	9	
R5O6R	Mittel	1,9	12,0	124,5	1,7	28,3	71,5	0,59	C27
	Stdabw.	0,5	6,3	220,4	0,6	8,8	127,7	0,07	
	Anzahl	5	7	7	7	7	7	7	
O5R6O	Mittel	1,9	4,8	134,6	2,1	7,5	144,1	0,65	C28
	Stdabw.	0,2	1,1	113,9	0,5	2,3	164,8	0,10	
	Anzahl	10	10	10	10	10	10	10	
D1O	Mittel	2,2	35,7	37,8	2,2	55,9	23,9	0,64	C29
	Stdabw.	0,7	15,5	49,6	0,5	21,8	30,6	0,06	
	Anzahl	14	14	14	14	14	14	14	
DIR	Mittel	2,5	30,7	4,4	2,2	57,5	2,5	0,54	C30
	Stdabw.	0,6	10,6	2,6	0,7	22,1	1,5	0,07	
	Anzahl	6	7	7	7	7	7	7	
O1R	Mittel	2,3	8,7	139,5	2,5	17,3	103,8	0,63	C31
	Stdabw.	0,2	3,3	80,8	0,4	6,2	64,6	0,07	
	Anzahl	8	8	8	8	8	8	14	
R1O	Mittel	2,3	9,0	300,9	2,4	19,1	330,1	0,76	C32
	Stdabw.	0,4	3,0	343,1	0,3	8,2	431,9	0,16	
	Anzahl	7	7	7	7	7	7	7	
O1R6O	Mittel	2,4	14,5	53,5	2,0	29,0	43,5	0,51	C33
	Stdabw.	0,8	3,3	47,5	0,7	6,3	51,1	0,08	
	Anzahl	23	23	23	23	23	23	23	
R1O6R	Mittel	2,9	3,2	66,7	2,6	6,3	48,3	0,75	C34
	Stdabw.	0,5	1,1	66,3	0,3	2,3	44,0	0,14	
	Anzahl	4	8	8	4	8	8	8	
DRod	Mittel	2,2	30,3	78,3	2,1	63,6	30,2	0,59	C35
	Stdabw.	0,3	6,9	106,2	0,2	10,3	2,5	0,02	
	Anzahl	3	3	3	3	3	3	3	
R23O	Mittel	2,3	20,4	537,1	2,4	40,8	486,6	0,53	C36
	Stdabw.	0,4	6,2	162,5	0,7	16,2	317,3	0,06	
	Anzahl	9	9	9	10	10	10	7	
R23O4R	Mittel	2,4	56,3	15,5	2,6	83,0	7,4	0,41	C37
	Stdabw.	1,2	25,9	11,5	0,8	31,1	5,2	0,14	
	Anzahl	6	6	6	5	5	5	5	

O23R4O	Mittel	2,5	2,8	11,3	2,9	4,6	7,3	0,61	C38
	Stdabw.	0,5	0,5	5,2	0,2	0,4	3,3	0,01	
	Anzahl	4	4	4	4	4	4	4	

MUTANTEN

Tabelle		Plus			Minus			Rektif.	Abb.
		n	Ka	Faktor	n	Ka	Faktor		
C573S	Mittel	1,7	98,2	9,9	1,7	205,6	3,4	0,4	C39
	Stdabw.	0,5	39,9	9,4	0,4	81,6	2,5	0,1	
	Anzahl	18	18	18	18	18	18	18	
D1	Mittel	1,68	108,28	50,88	1,42	212,03	15,96	0,32	C40
	Stdabw.	0,11	31,50	26,73	0,12	75,86	6,94	0,06	
	Anzahl	9	9	9	9	9	9	9	
MRODO1	Mittel	1,74	35,52	21,89	1,65	87,35	19,68	0,61	C41
	Stdabw.	0,44	5,60	7,12	0,25	25,48	7,18	0,11	
	Anzahl	4	4	4	4	4	4	4	
T537A	Mittel	1,98	53,03	7,48	2,15	95,64	5,11	0,64	C42
cGMP	Stdabw.	0,56	16,04	2,91	0,58	41,15	2,11	0,03	
	Anzahl	8	8	8	8	8	8	8	
T537A	Mittel	2,09	17,06	16,09	2,61	26,89	17,01	0,81	C43
cAMP	Stdabw.	0,54	3,69	14,40	0,88	6,02	16,90	0,16	
	Anzahl	15	15	15	15	15	15	15	
T537S	Mittel	2,59	0,69	125,15	2,85	0,94	104,79	0,65	C44
cGMP	Stdabw.	0,54	0,15	35,71	0,21	0,26	49,95	0,05	
	Anzahl	6	6	6	6	6	6	6	
T537S	Mittel	1,50	15,91	438,18	2,38	31,11	640,34	1,04	C45
cAMP	Stdabw.	0,32	4,80	560,27	0,71	6,25	730,20	0,10	
	Anzahl	4	4	4	4	4	4	4	
T560A	Mittel	1,68	840	32,07	1,94	1437	16,76	0,50	C46
cGMP	Stdabw.	0,47	269	22,79	0,57	487	12,31	0,14	
	Anzahl	14	14	14	14	14	14	14	
T560A	Mittel	1,60	2,75	10,34	1,34	2,64	3,45	0,18	C47
cAMP	Stdabw.	0,27	0,91	7,97	0,19	0,079	0,63	0,03	
[mM]	Anzahl	3	3	3	2	2	2	2	
T560S	Mittel	2,31	6,42	263,54	2,83	15,37	241,36	0,67	C48
cGMP	Stdabw.	0,19	1,08	101,66	1,40	3,73	86,68	0,07	
	Anzahl	7	7	7	6	6	6	6	
T560S	Mittel	1,93	2,24	47,49	2,04	2,31	6,19	0,18	C49
cAMP	Stdabw.	0,10	0,33	26,36	0,11	0,21	5,58	0,02	
[mM]	Anzahl	3	3	3	3	3	3	2	

Abb. C1: ChCone, 100 mM KCl, cGMP; 13 Versuche aus 9 Patchen, maximale Konzentrationen 500-2000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2000 μM cGMP. Versuch: W1517C54.

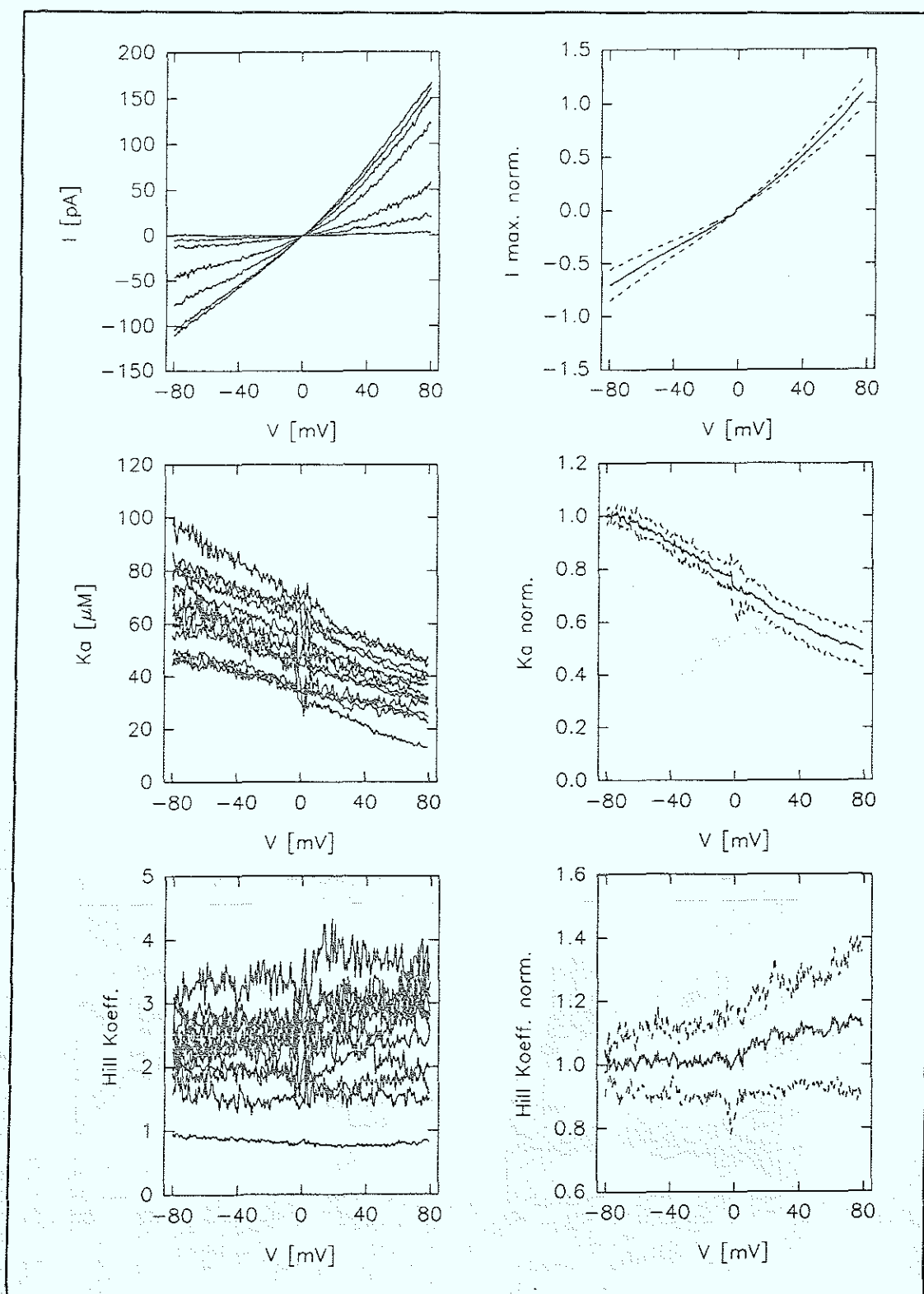


Abb. C2: ChRod, 100 mM KCl, cGMP; 5 Versuche aus 5 Patchen, maximale Konzentrationen 500-2000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2000 μM cGMP. Versuch W2113C16.

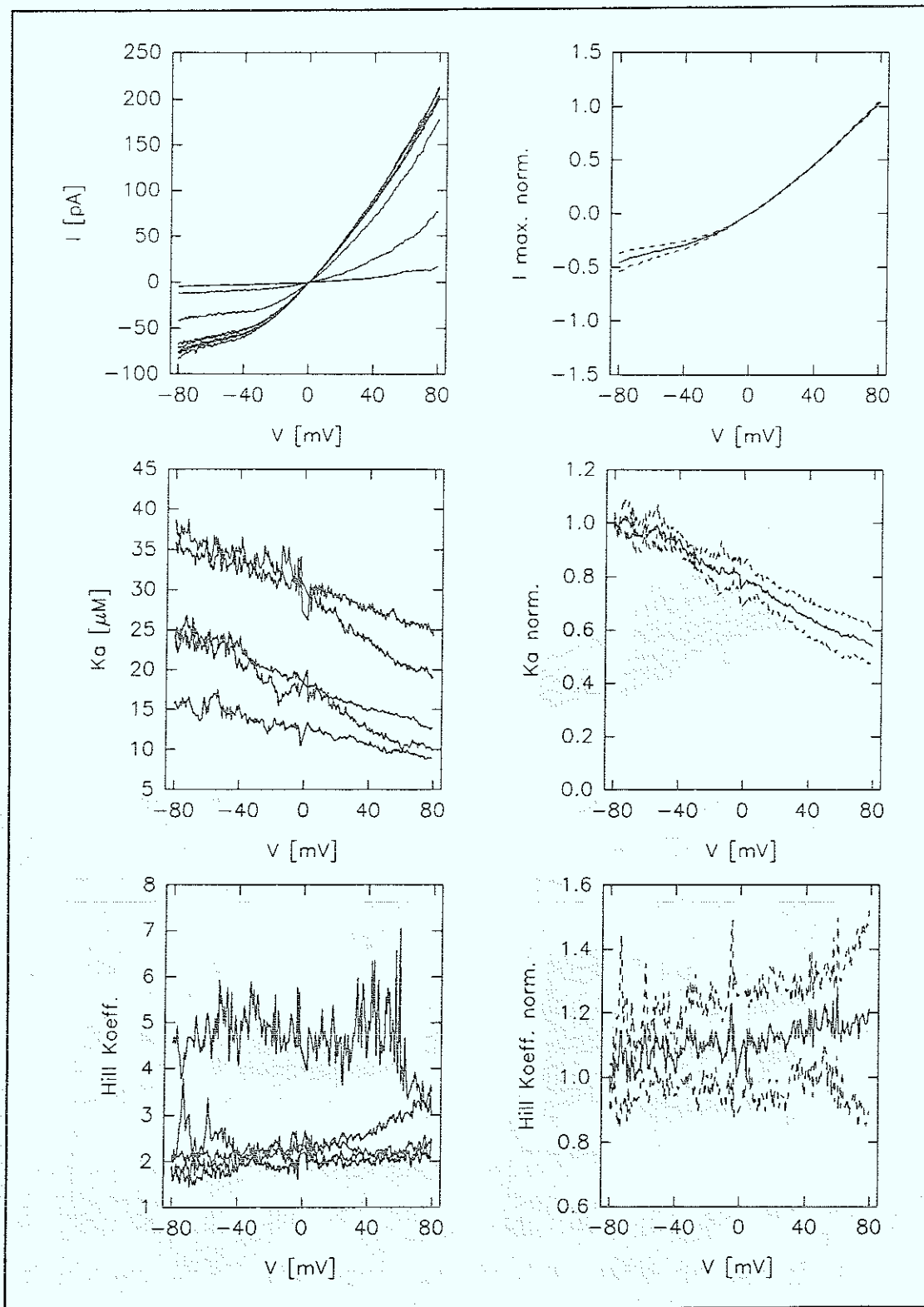


Abb. C3: OLF, 100 mM KCl, cGMP; 12 Versuche aus 7 Patchen, maximale Konzentrationen 25-100 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch W2D10C38.

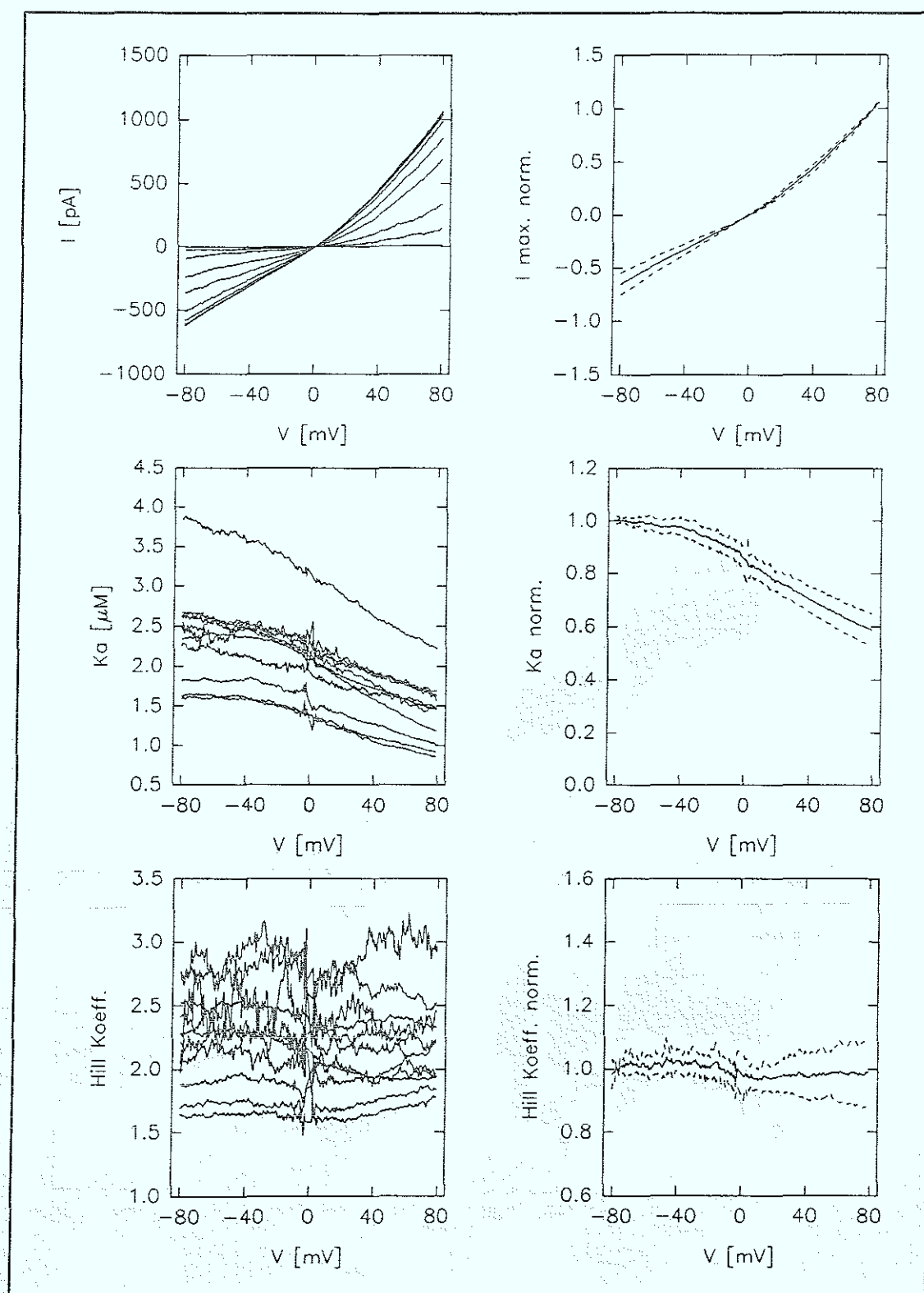


Abb. C4: OLF, 100 mM KCl, cAMP; 11 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 5 mM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 5, 10, 25, 50, 100, 1000, 5000 μ M cAMP. Versuch W2D17C19.

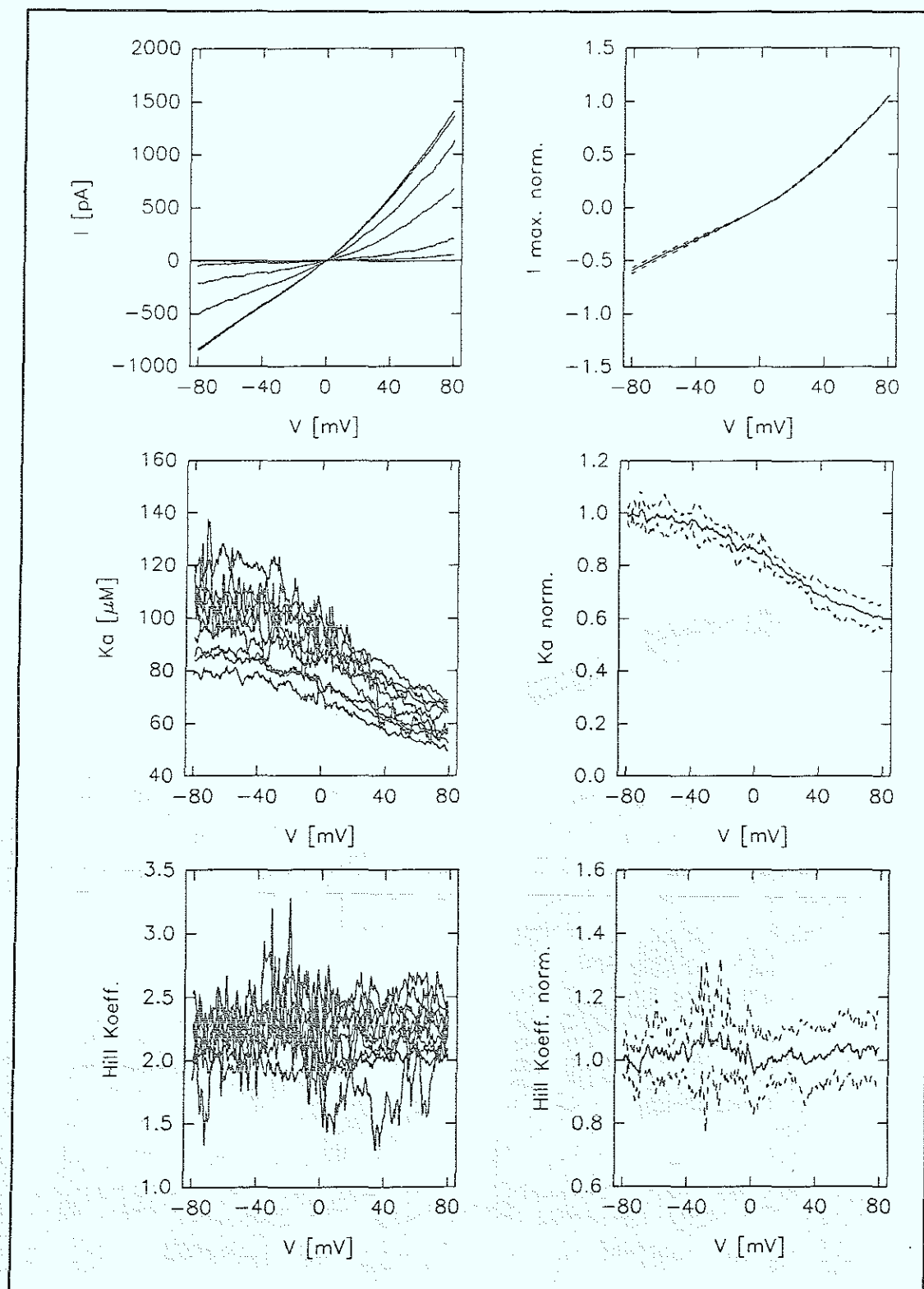


Abb. C5: OLF, 25 mM KCl, cGMP; 6 Versuche aus 4 Patchen, maximale Konzentrationen 25-50 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 2, 3, 5, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch W1D01C87.

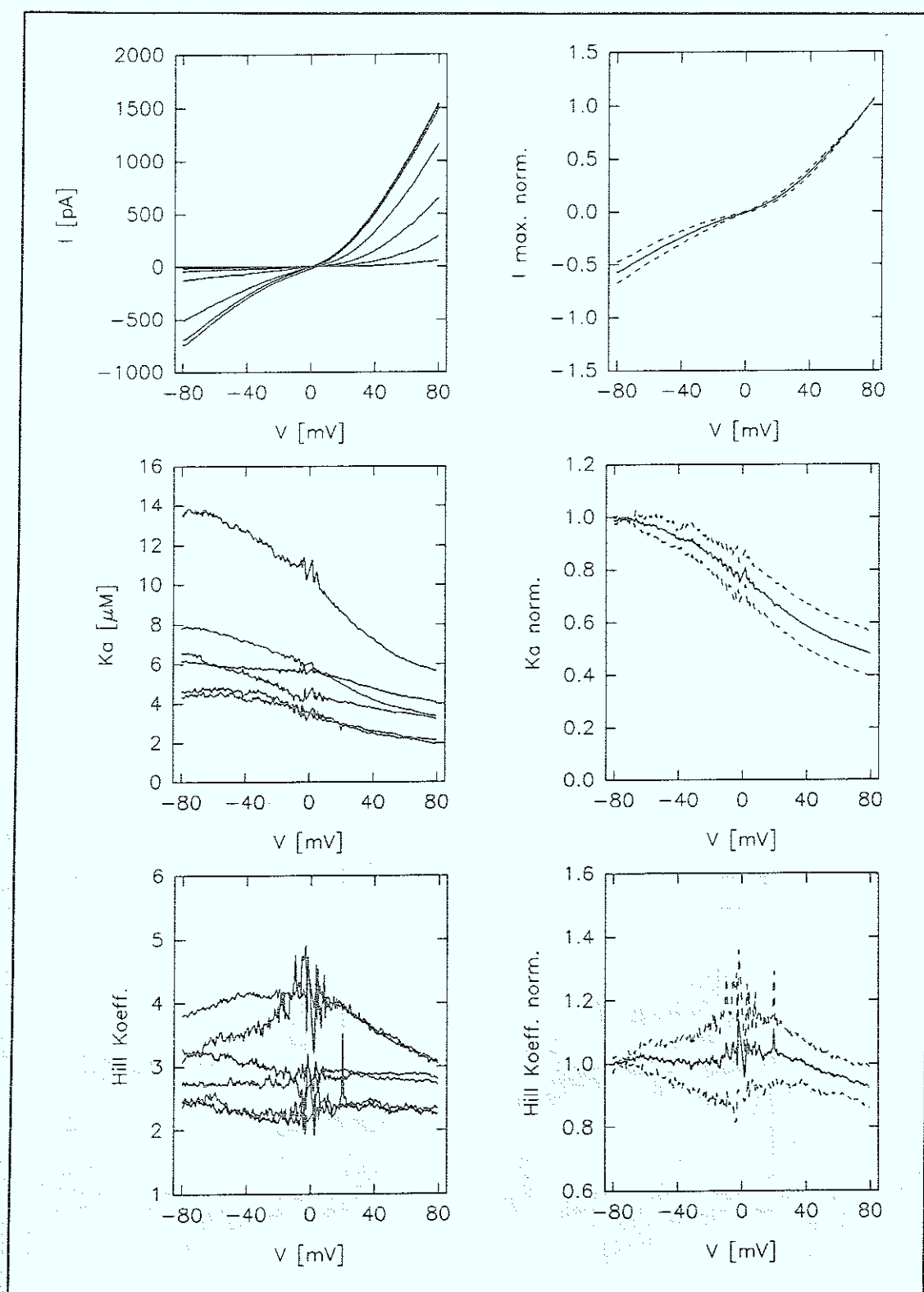


Abb. C6: OLF, 250 mM KCl, cGMP; 5 Versuche aus 4 Patchen, maximale Konzentrationen 25-50 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 25 μM cGMP. Versuch V1D01C19.

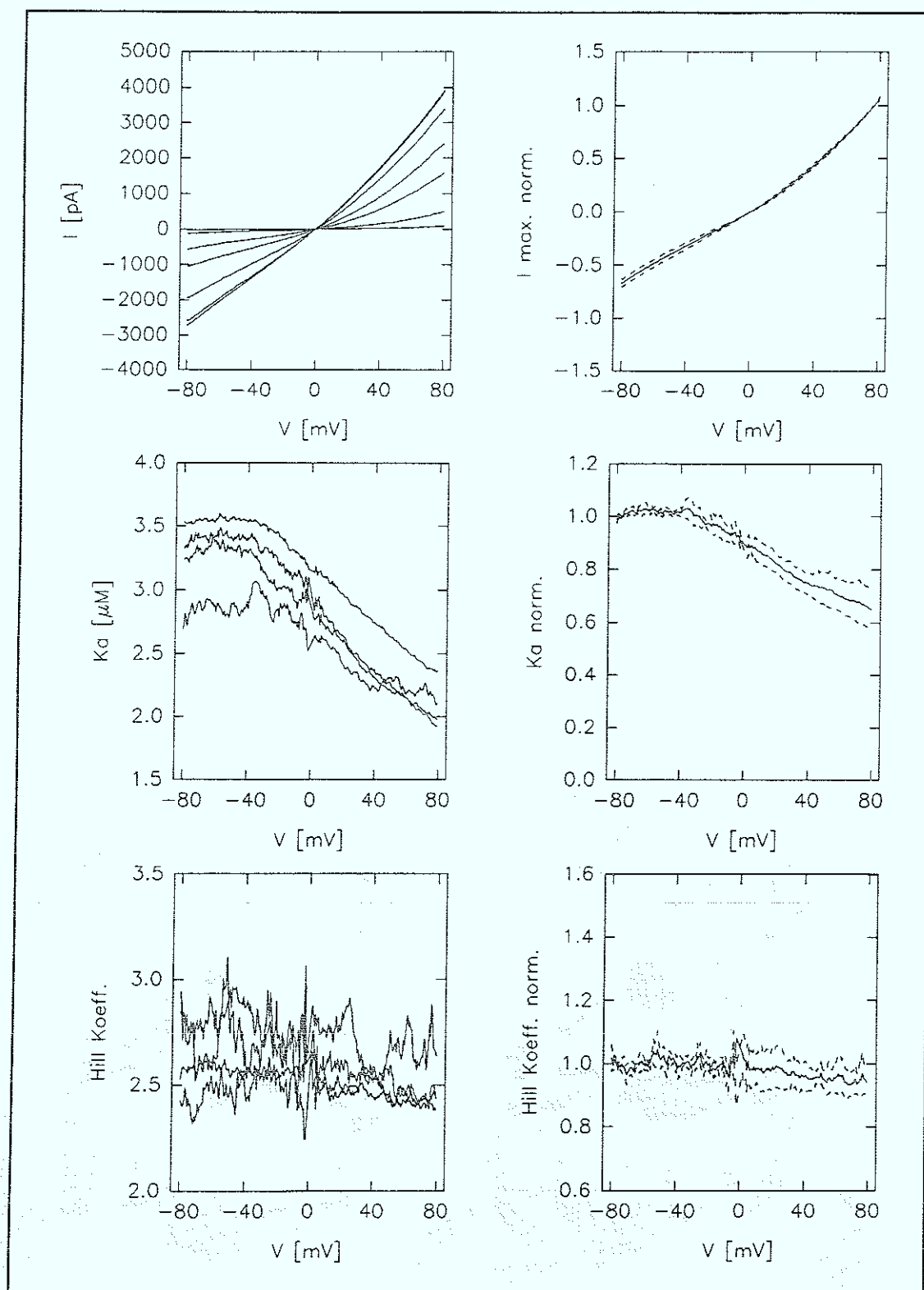


Abb. C7: OLF, 25 mM LiCl, cGMP; 3 Versuche aus 2 Patchen, maximale Konzentrationen 10-50 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 2, 3, 5, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch W1D03C89.

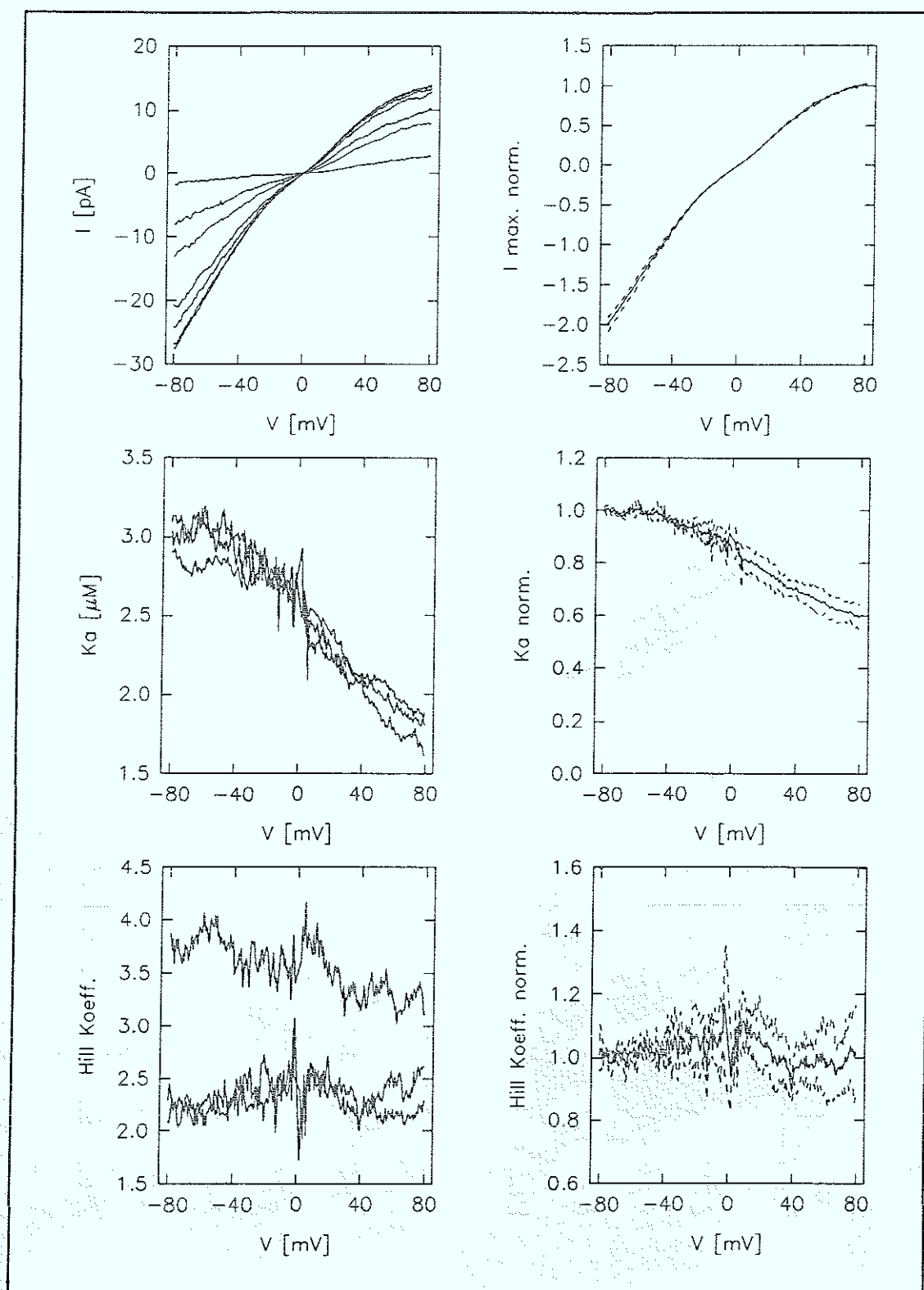


Abb. C8: OLF, 100 mM LiCl, cGMP; 11 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 25-50 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 2, 3, 5, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch W2604C38.

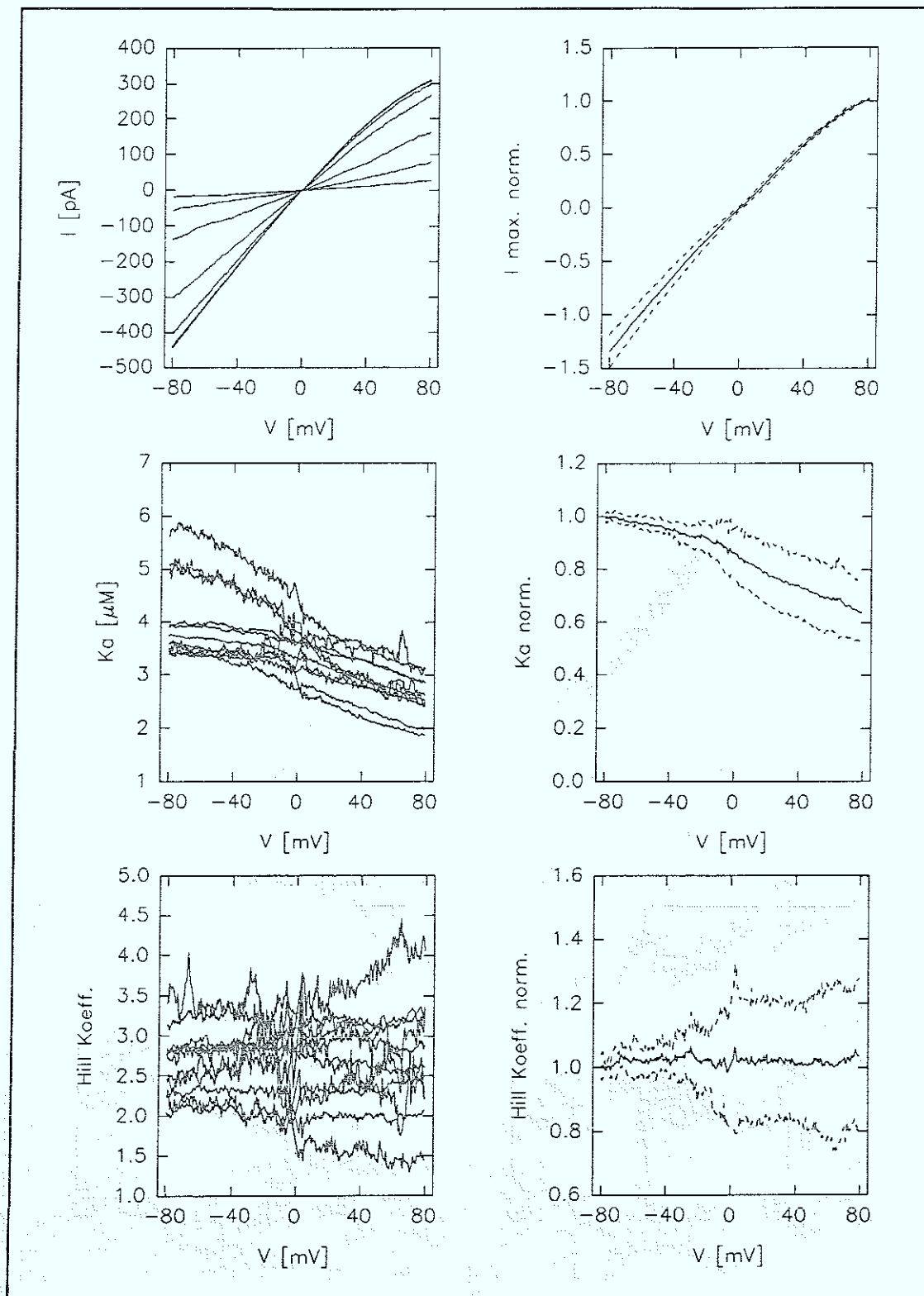


Abb. C9: OLF, 25 mM NH_4Cl , cGMP; 6 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 25-50 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 5, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch W2611C63.

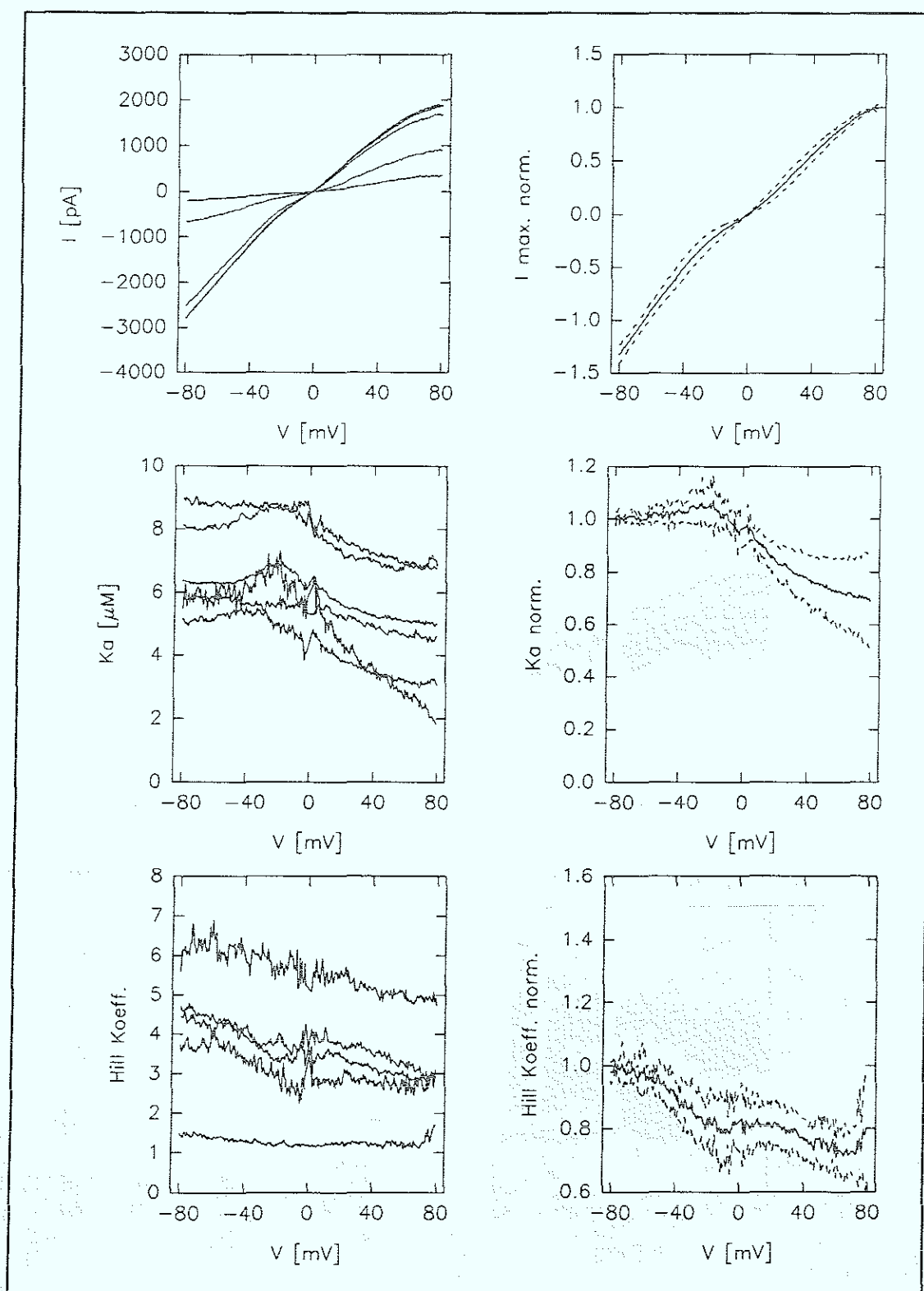


Abb. C10: ROD, 100 mM KCl, cGMP; 37 Versuche aus 23 Patchen, maximale Konzentrationen 500-5000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 500, 1000 μM cGMP. Versuch V1418C16.

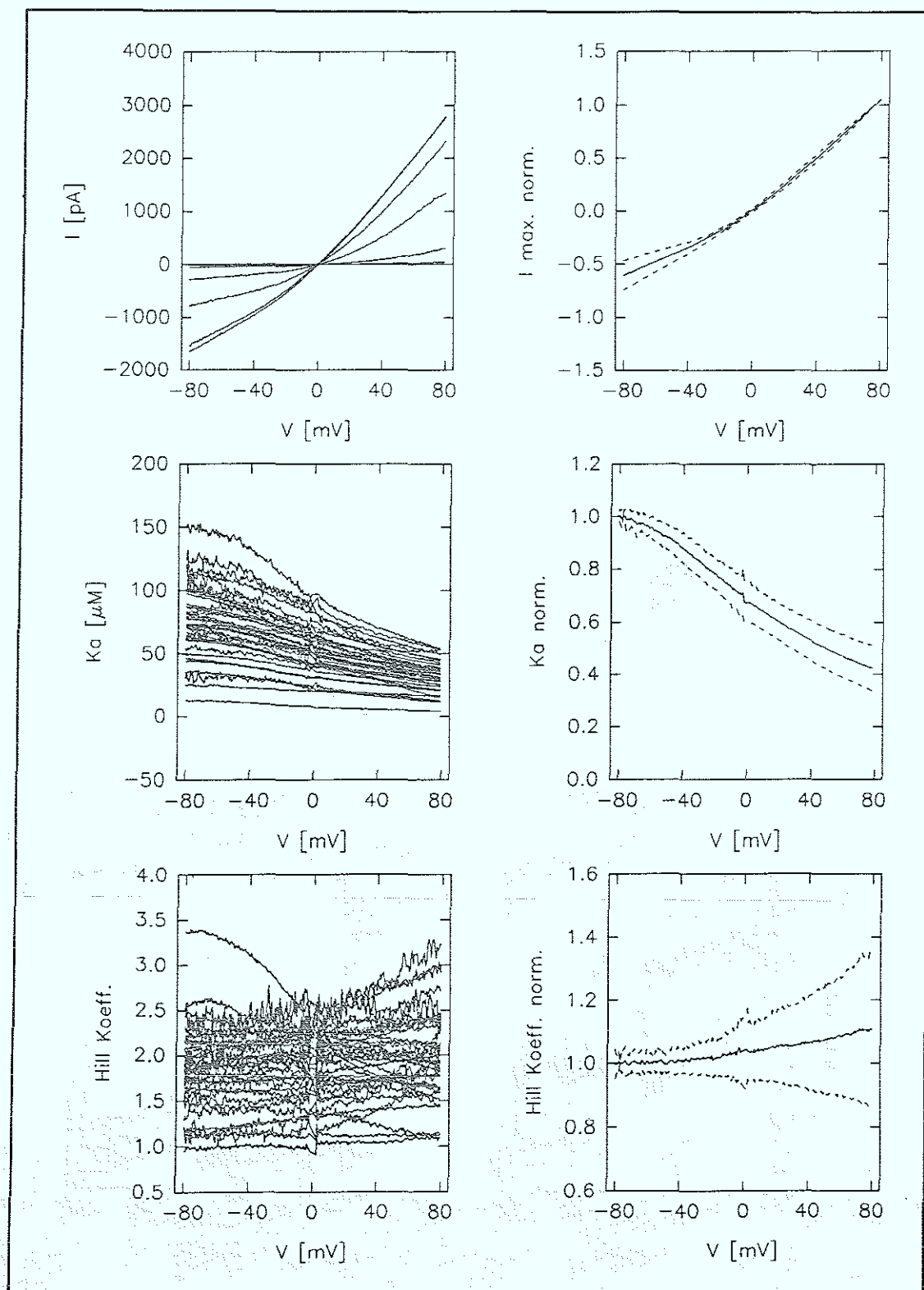


Abb. C11: ROD, 100 mM KCl, cAMP; 3 Versuche aus 3 Patchen, maximale Konzentrationen 10-20 mM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.3, 0.5, 3, 5, 10, 20 mM cAMP. Versuch W1417C39.

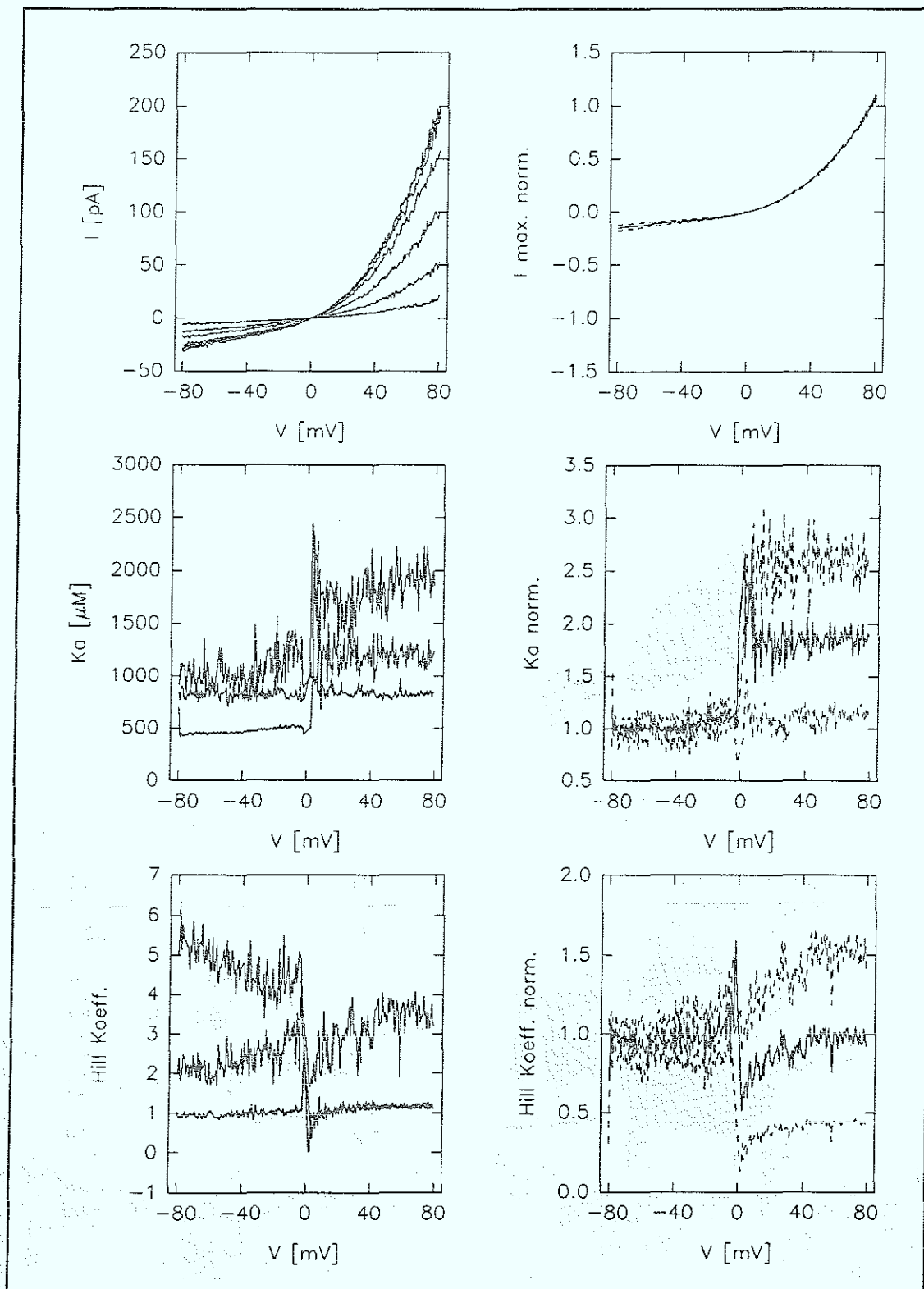


Abb. C12: ROD, 25 mM KCl, cGMP; 11 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 500-2000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 500, 1000 μM cGMP. Versuch V1N17C57.

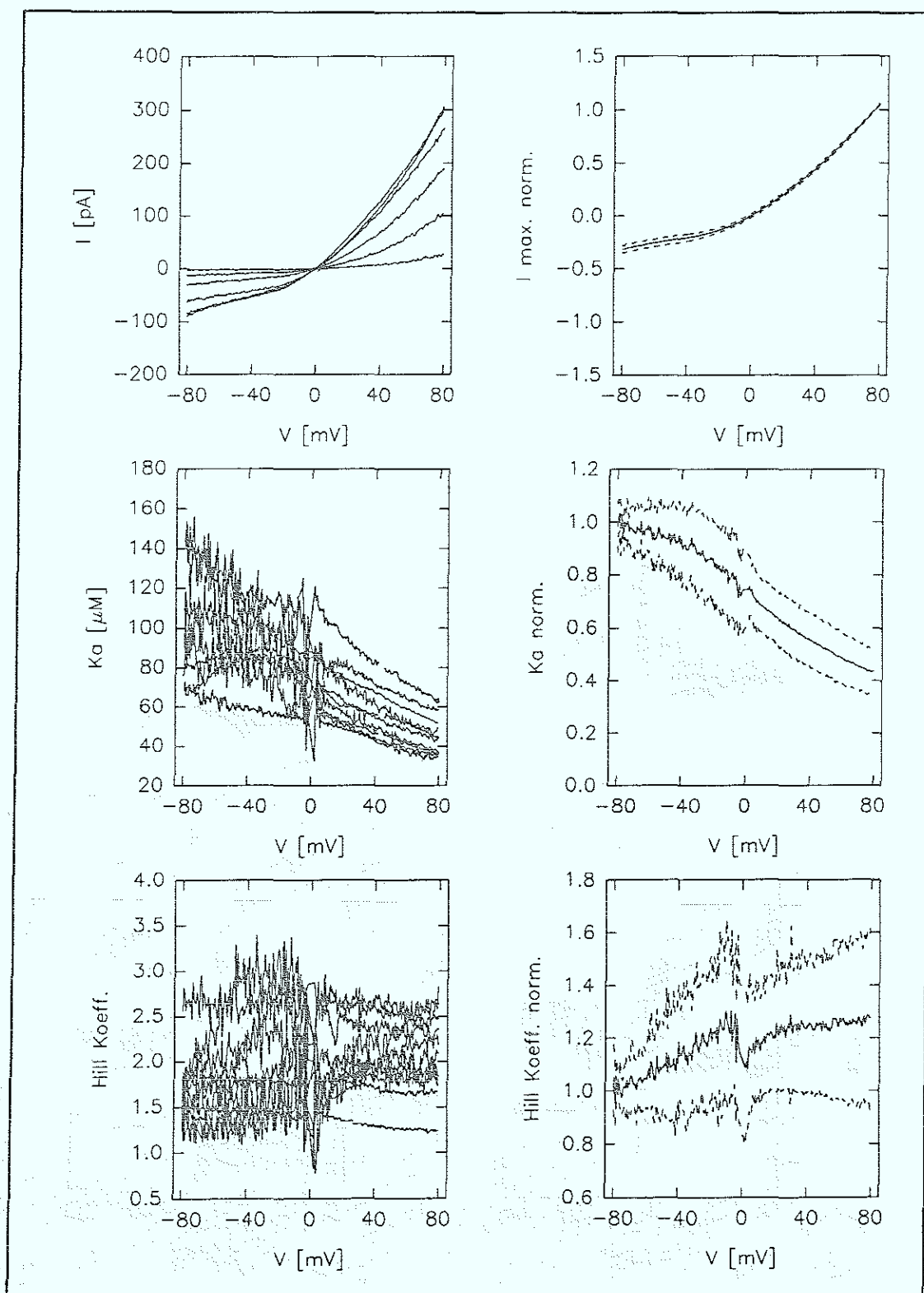


Abb. C13: ROD, 250 mM KCl, cGMP; 12 Versuche aus 5 Patchen, maximale Konzentrationen 500-2000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 10, 25, 50, 100, 500, 2000 μM cGMP. Versuch V1N18C21.

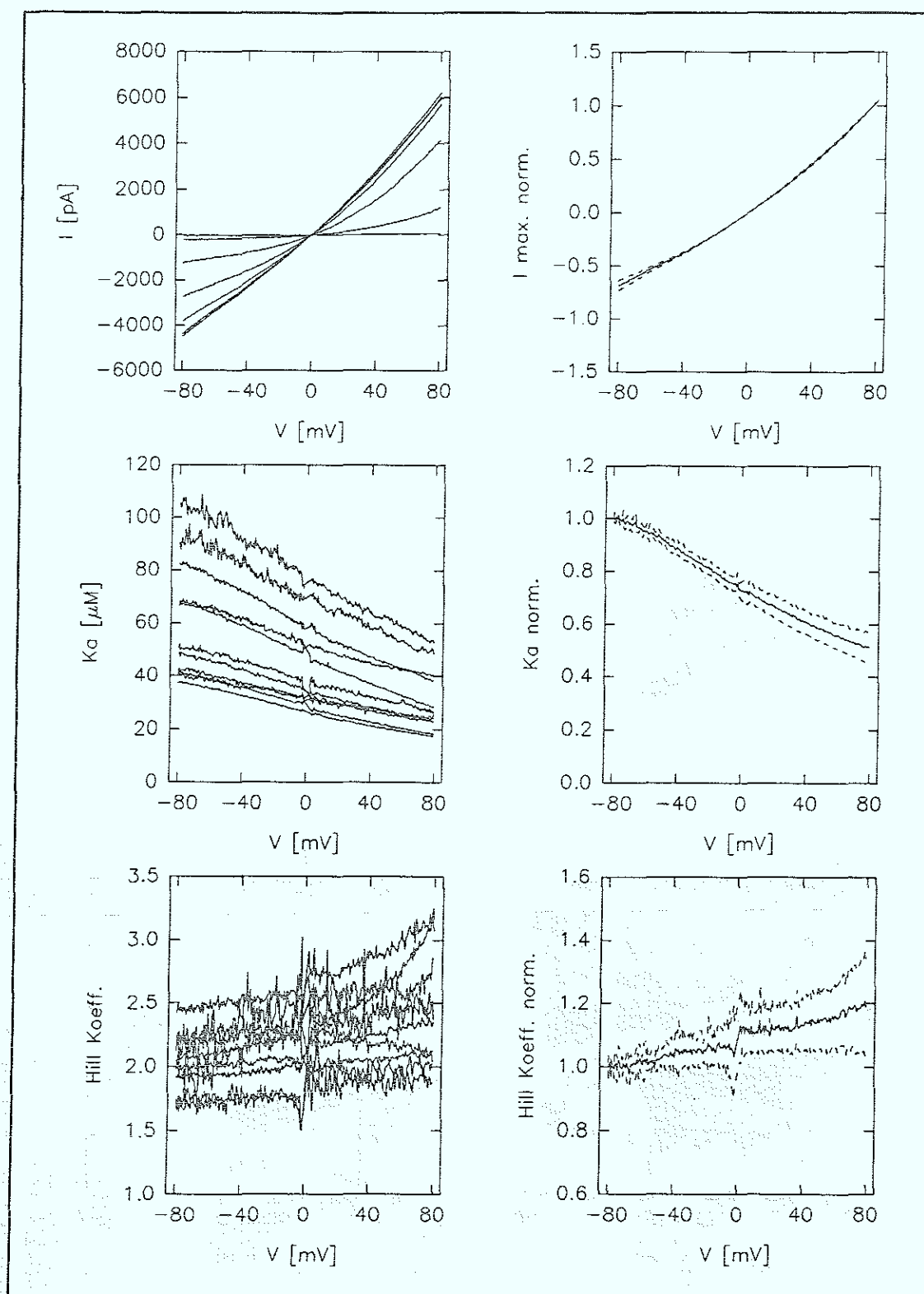


Abb. C14: ROD, 25 mM LiCl, cGMP; 6 Versuche aus 5 Patchen, maximale Konzentrationen 2000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 1000, 2000 μM cGMP. Versuch W1D03C12.

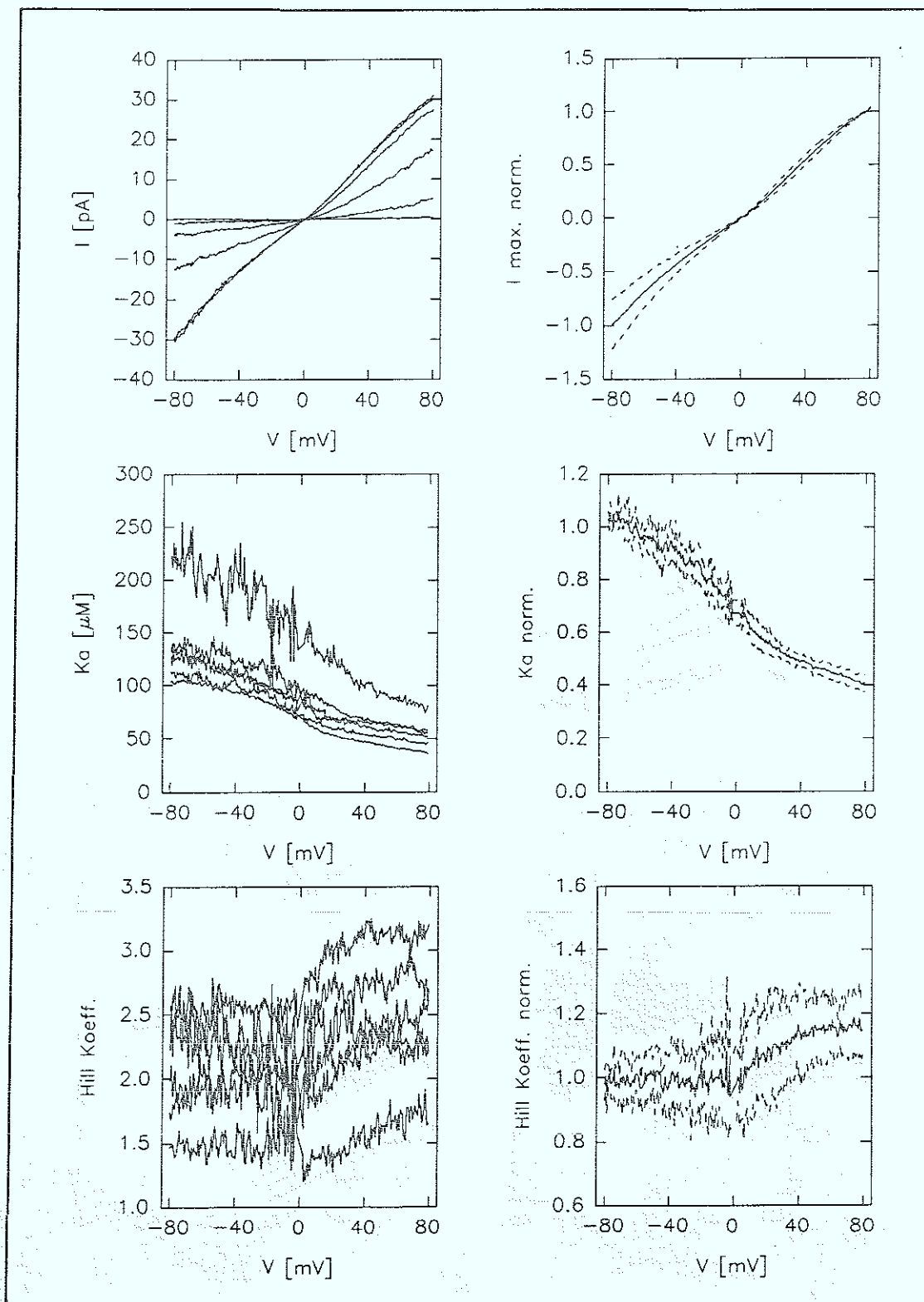


Abb. C15: ROD, 100 mM LiCl, cGMP; 11 Versuche aus 9 Patchen, maximale Konzentrationen 1000-5000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 μM cGMP. Versuch W2605C84.

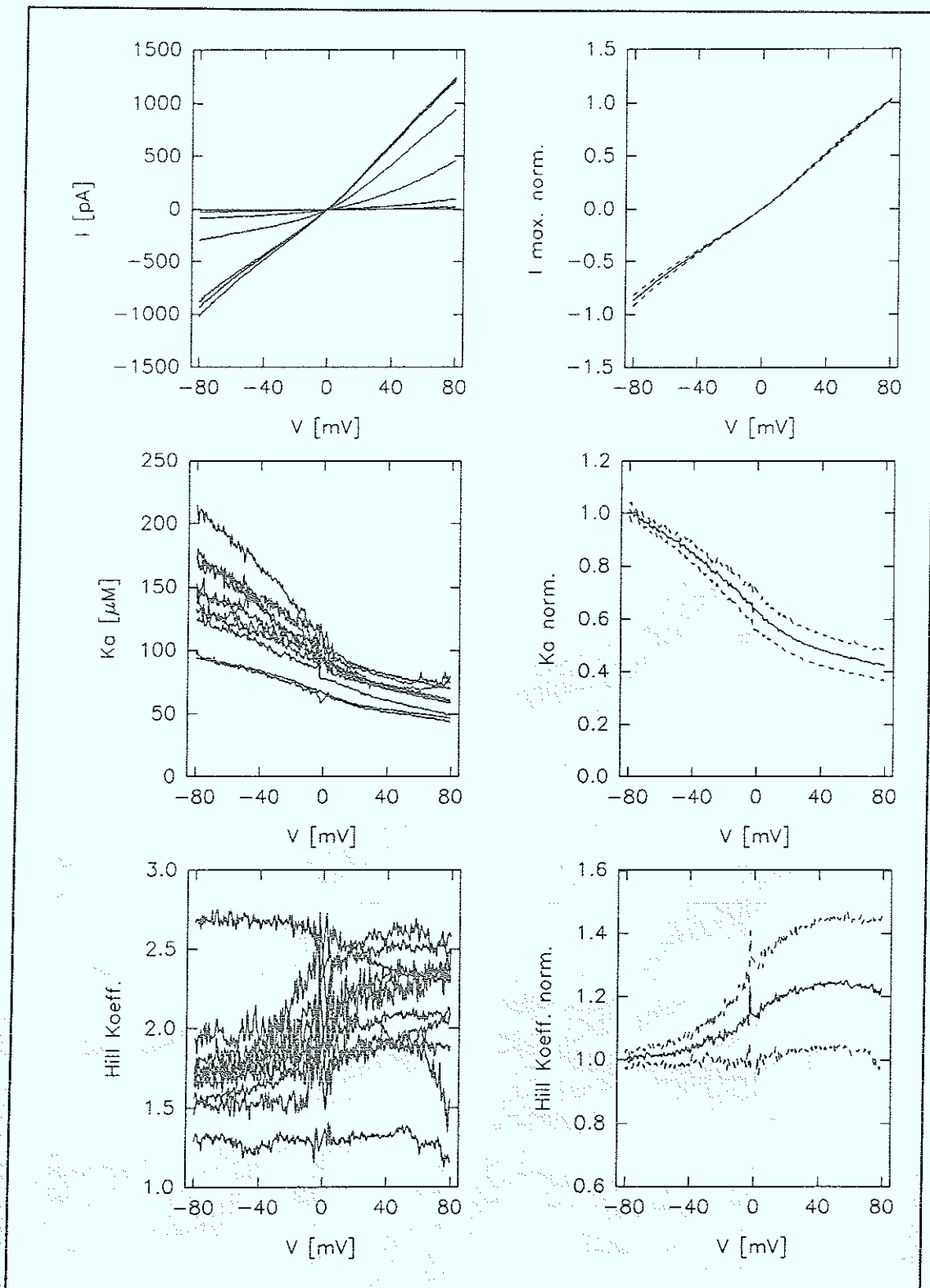


Abb. C16: ROD, 25 mM NH_4Cl , cGMP; 10 Versuche aus 5 Patchen, maximale Konzentrationen 500-5000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 25, 50, 100, 500, 5000 μM cGMP. Versuch V2612C40.

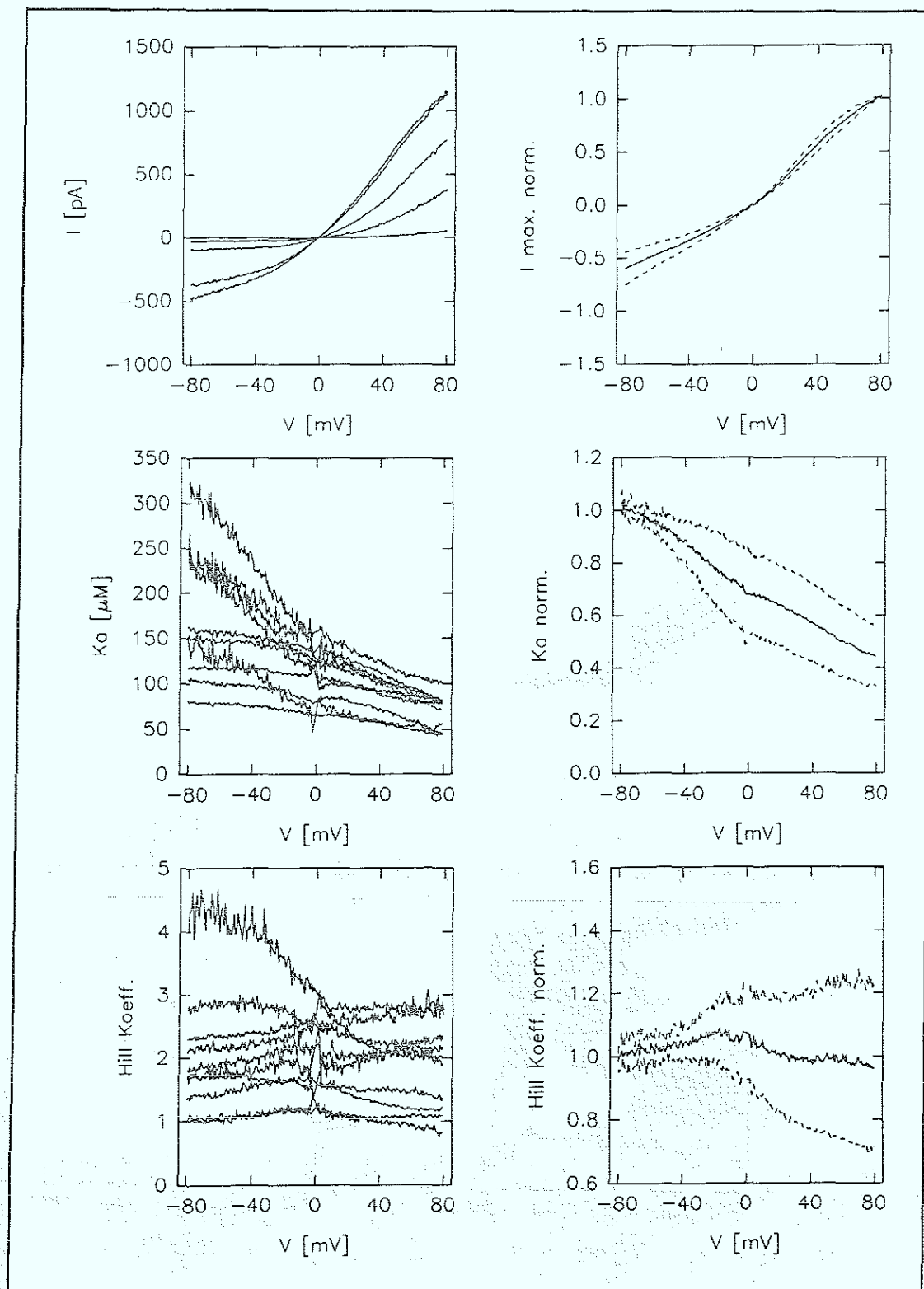


Abb. C17: ROD, 100 mM NaCl, cGMP; 2 Versuche aus 1 Patch, maximale Konzentration 1000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 500, 1000 μM cGMP. Versuch W2630C10.

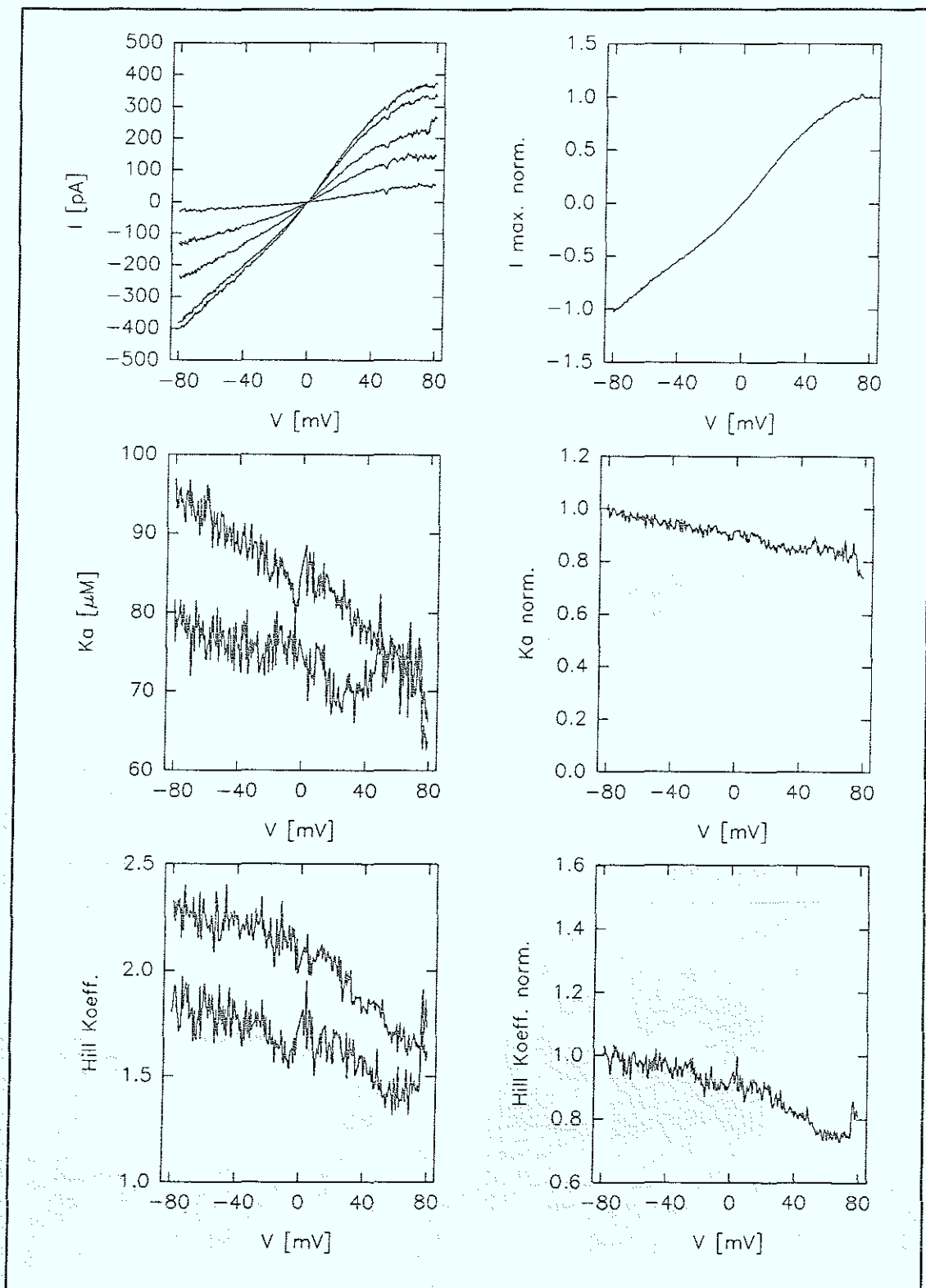


Abb. C18: HERZ153, 100 mM KCl, cGMP; 11 Versuche aus 7 Patchen, maximale Konzentrationen 1 mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 25, 50 μ M cGMP. Versuch V2D09C70.

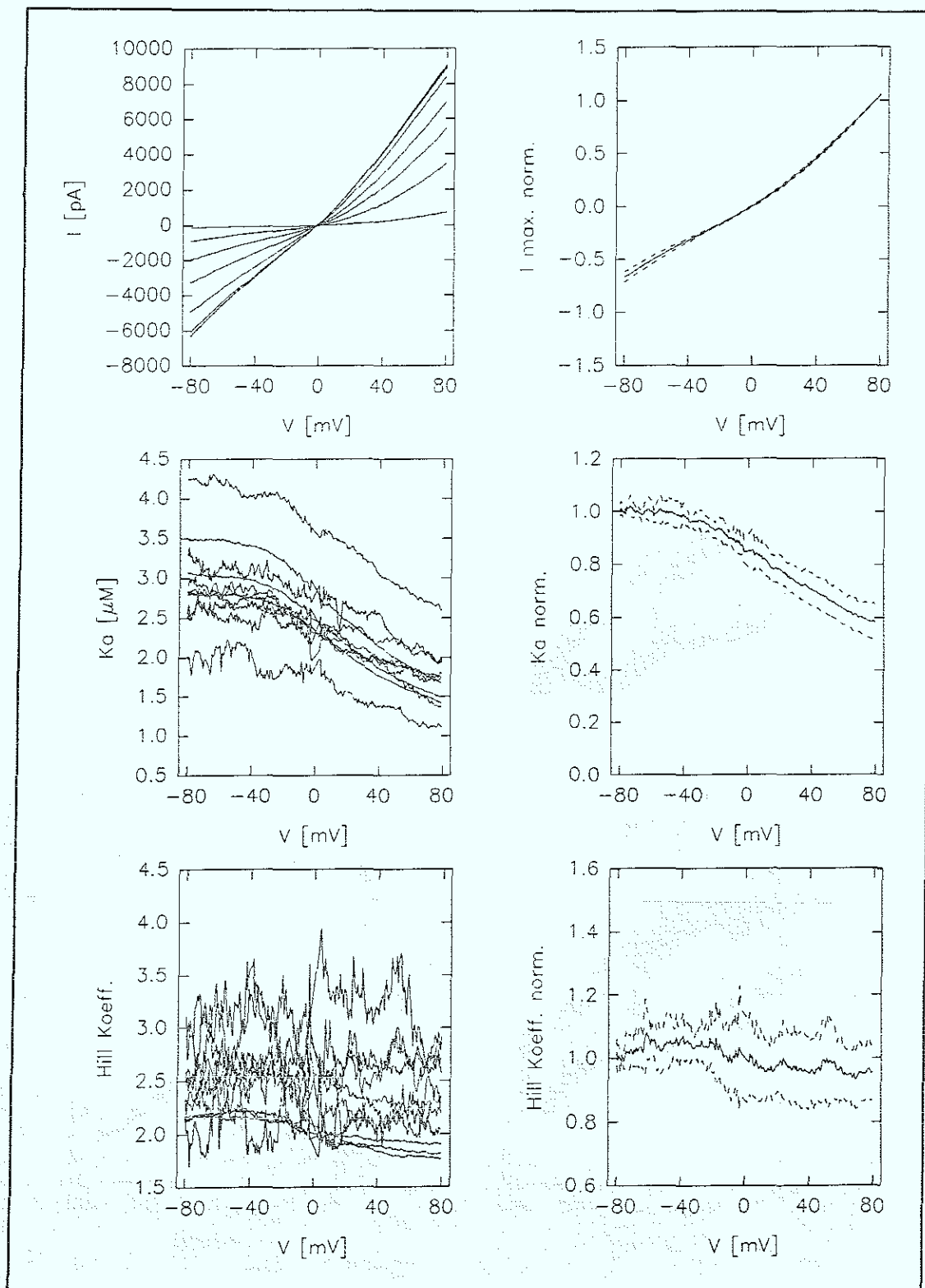


Abb. C19: HERZ153, 100 mM KCl, cAMP; 8 Versuche aus 4 Patchen, maximale Konzentrationen 5 mM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 1000, 5000 μM cAMP. Versuch W2D18C01.

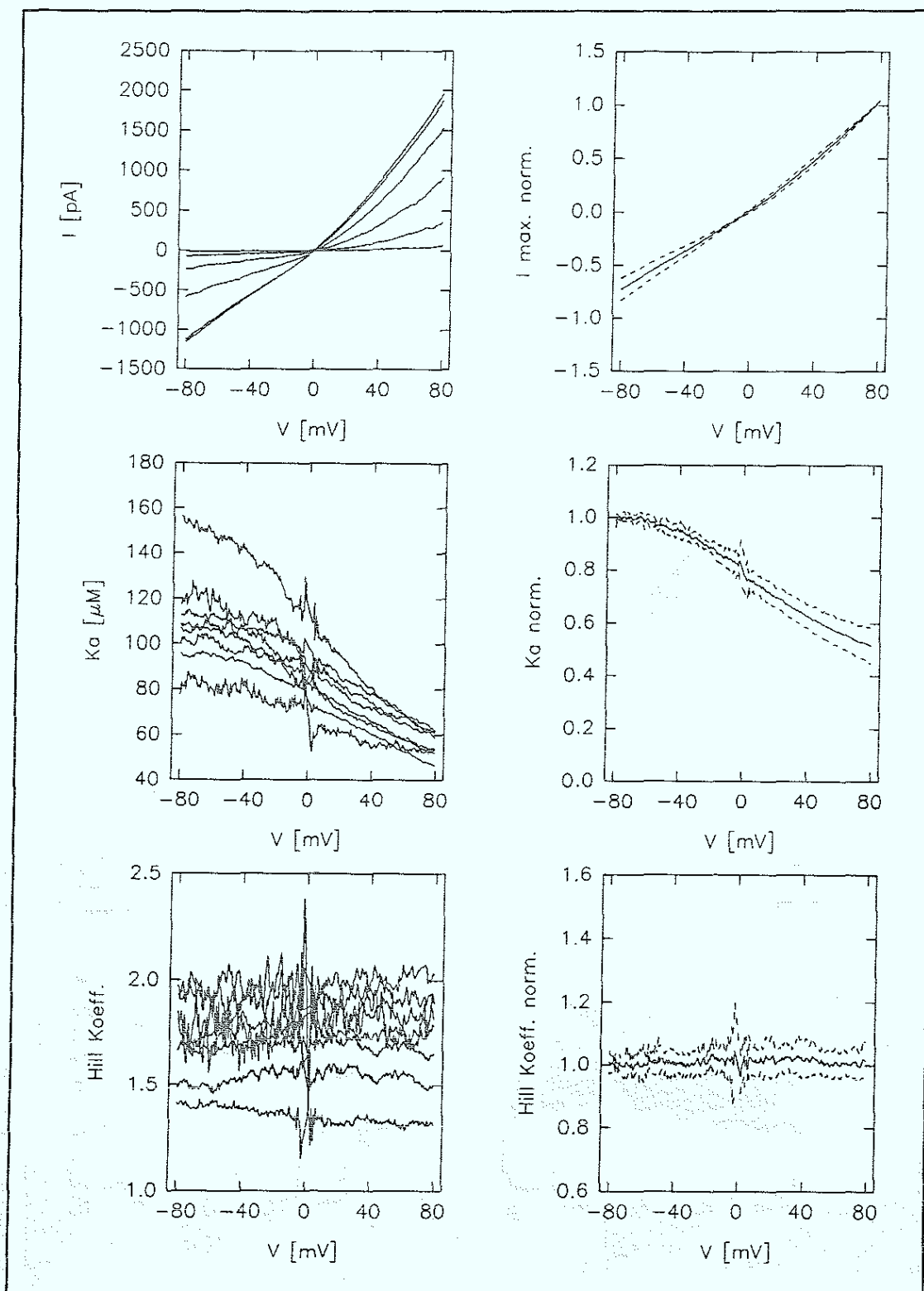


Abb. C20: HERZ357, 100 mM KCl, cGMP; 8 Versuche aus 5 Patchen, maximale Konzentrationen 50 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch W3206C58.

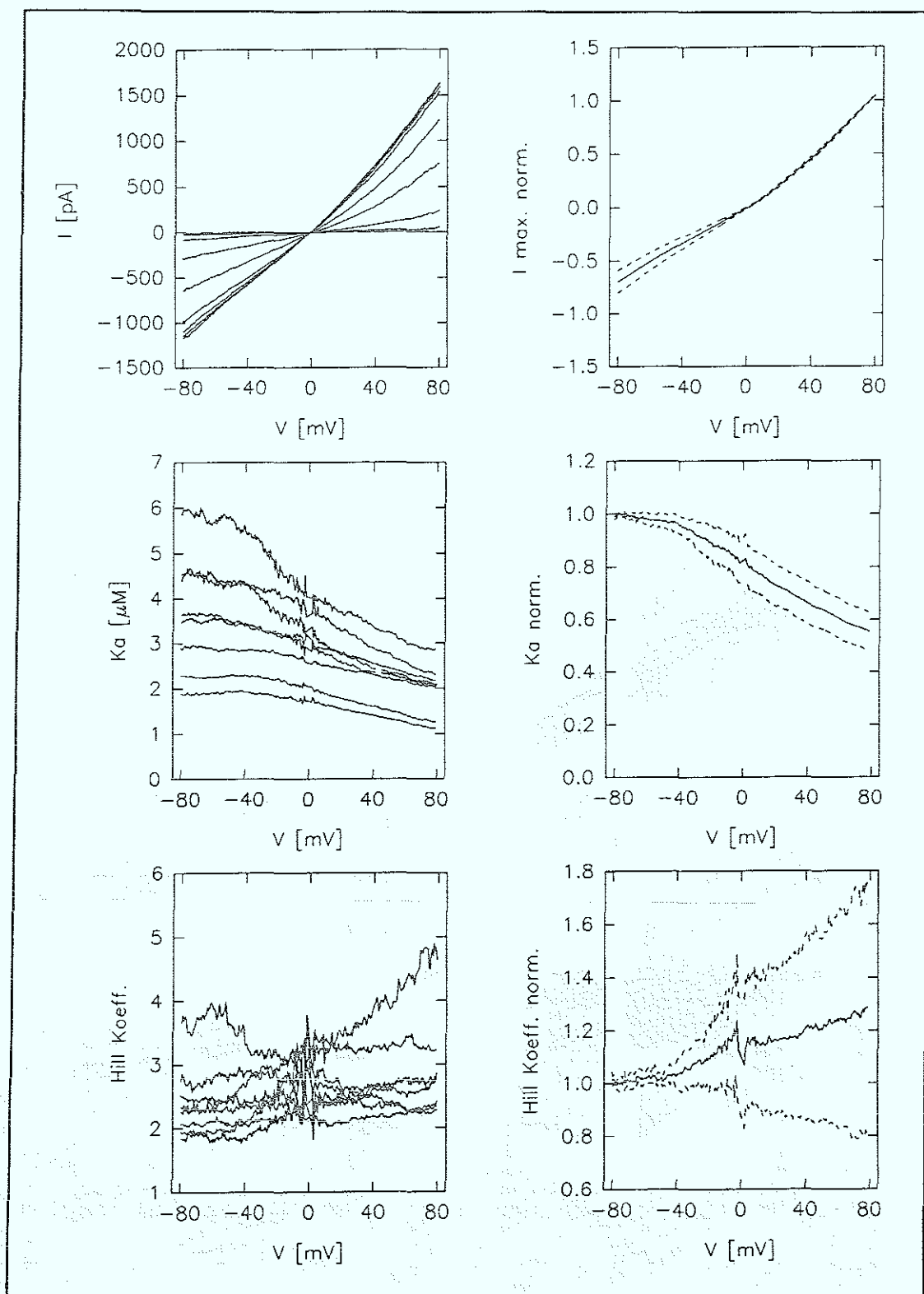


Abb. C21: HERZ357, 100 mM KCl, cAMP; 8 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 5 mM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 μ M cAMP. Versuch W2308C23.

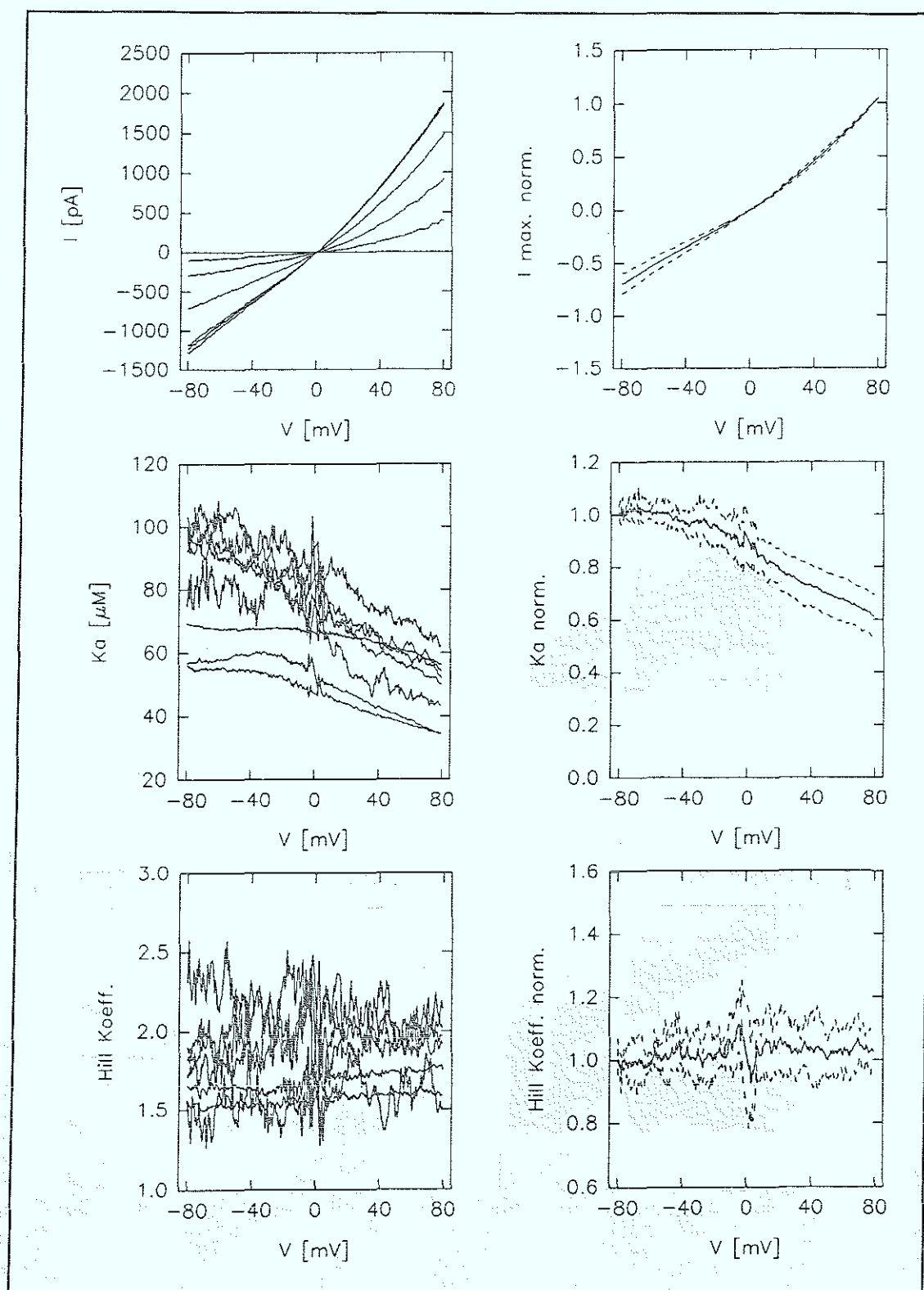


Abb. C22: R6O, 100 mM KCl, cGMP; 21 Versuche aus 12 Patchen, maximale Konzentrationen 5-10 mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 25, 50, 100, 300, 500, 1000 μ M cGMP. Versuch U0D04C01.

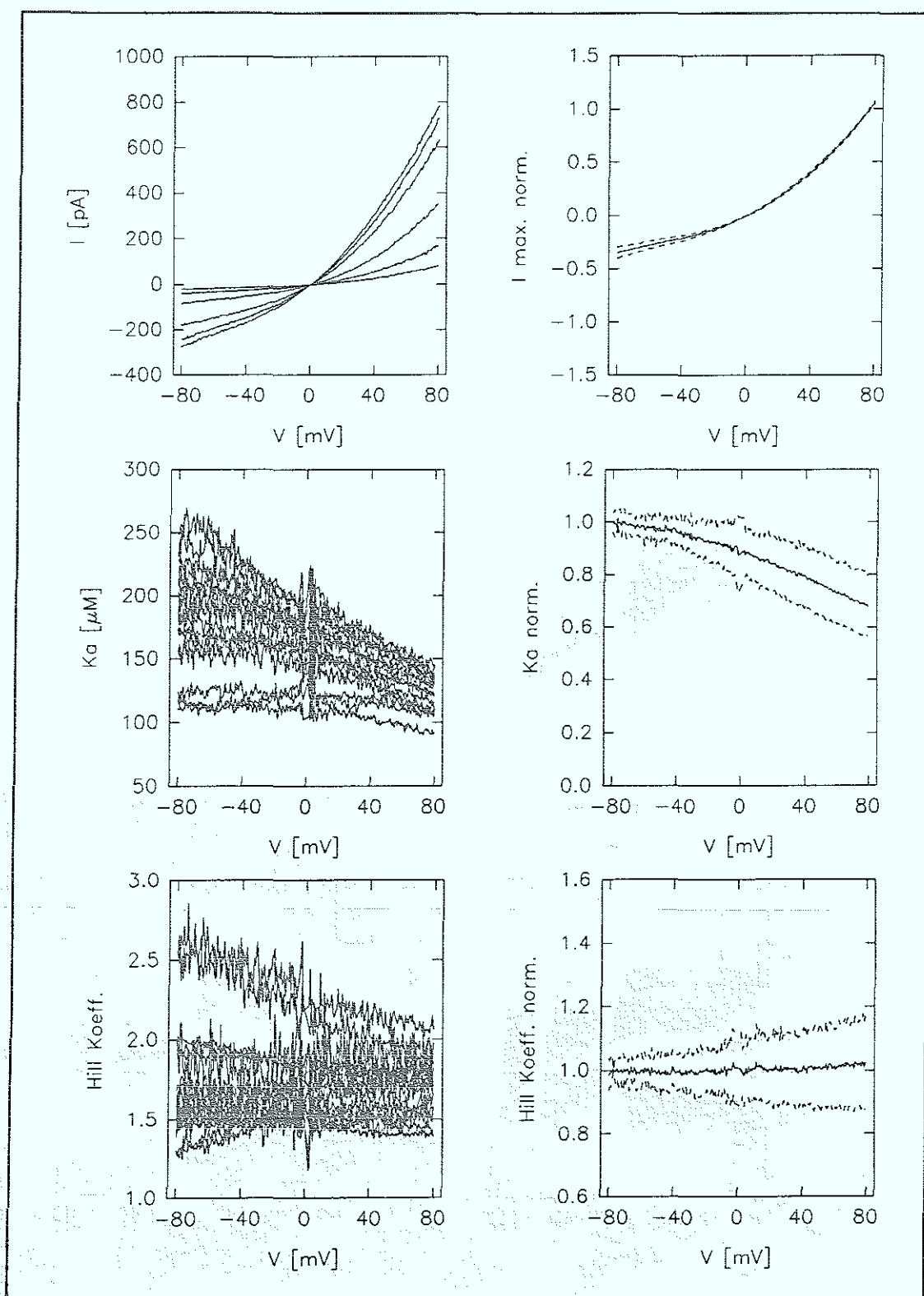


Abb. C23: O6R, 100 mM KCl, cGMP; 12 Versuche aus 10 Patchen, maximale Konzentrationen 25-50 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.25, 0.5, 2, 3, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch W2319C03.

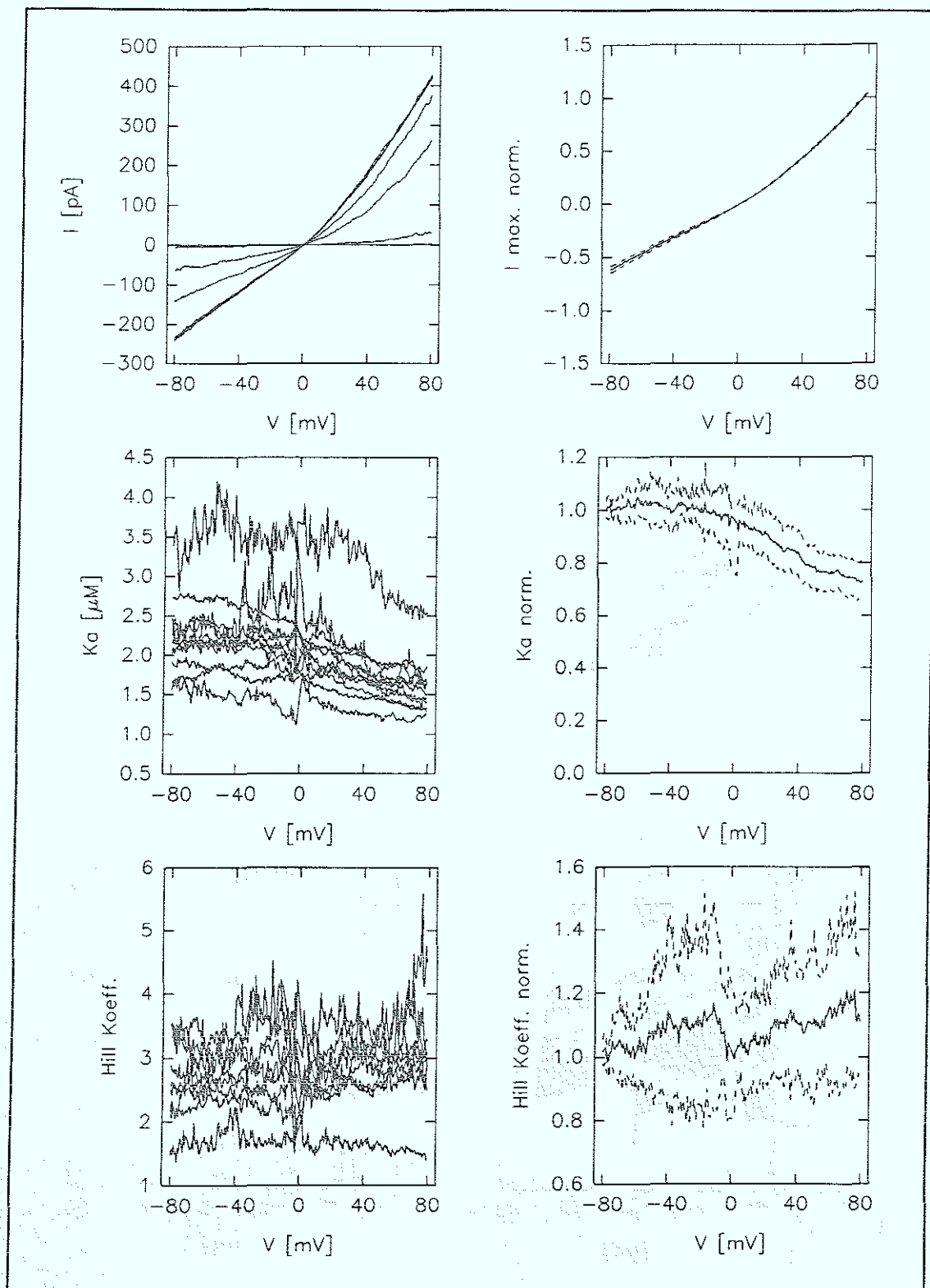


Abb. C24: R50, 100 mM KCl, cGMP; 9 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 2-5 mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 μ M cGMP. Versuch W3112C01.

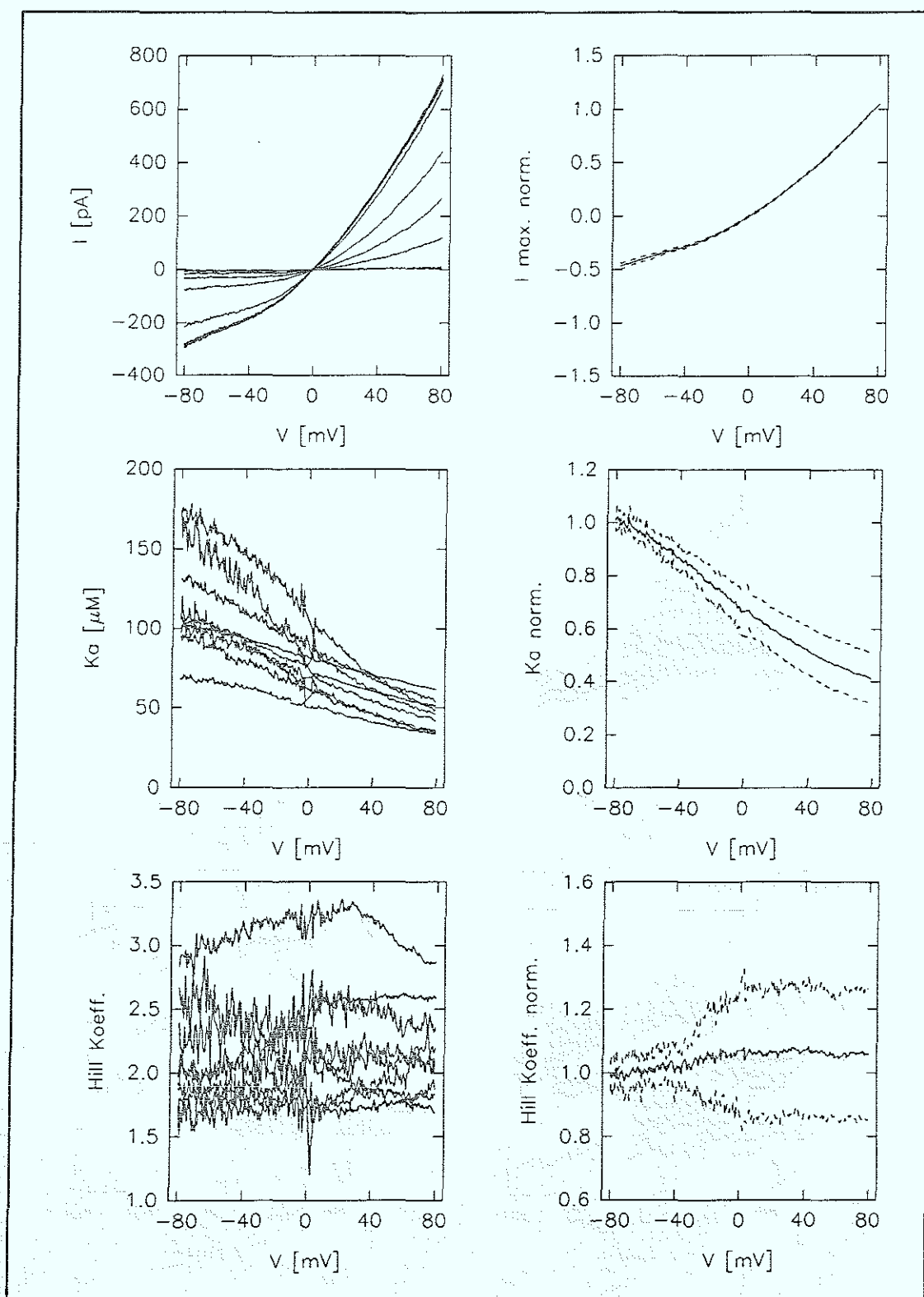


Abb. C25: R50, 100 mM KCl, cAMP; 7 Versuche aus 5 Patchen, maximale Konzentrationen 10-20 mM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 10, 20 mM cAMP. Versuch U1418C47.

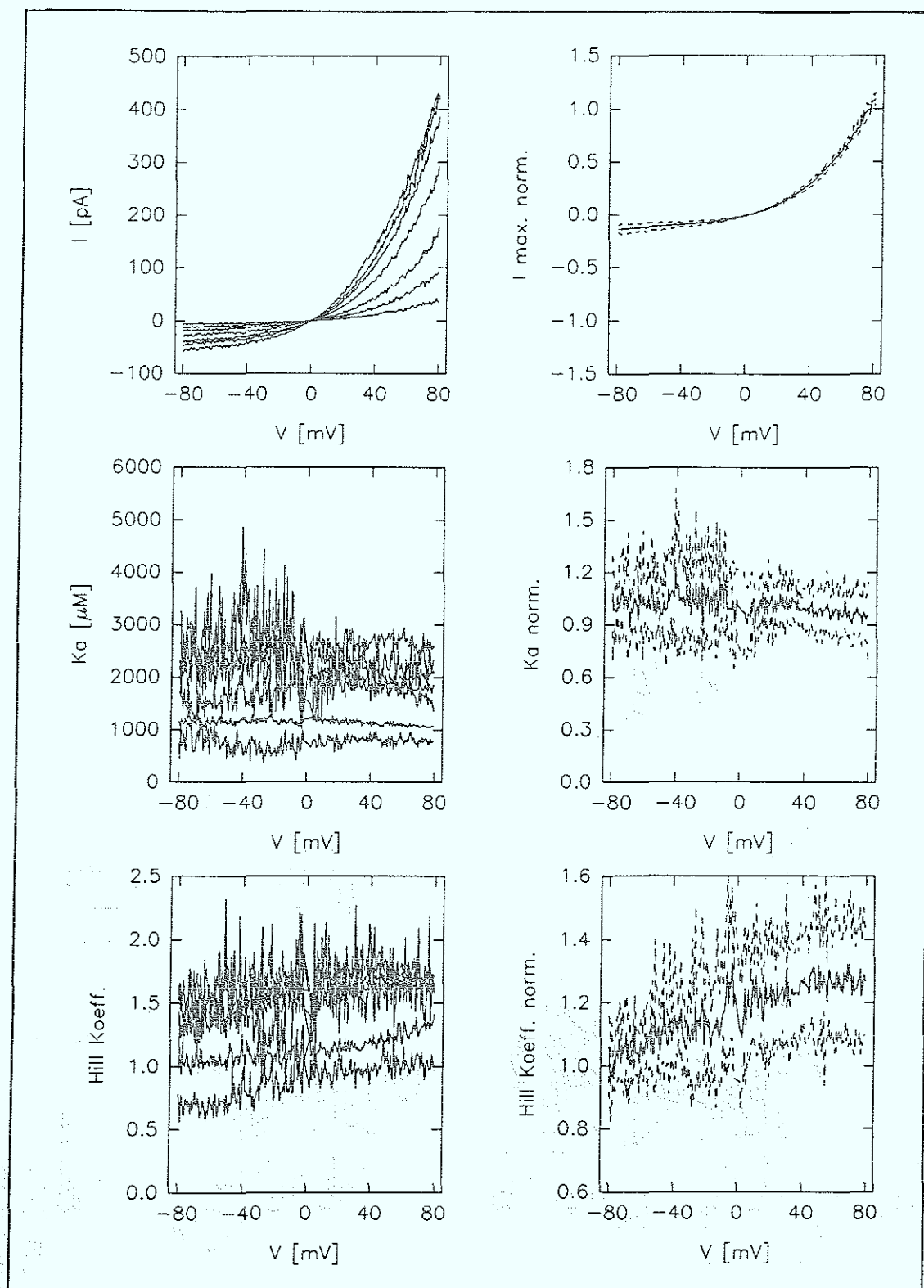


Abb. C26: O5R, 100 mM KCl, cGMP; 9 Versuche aus 4 Patchen, maximale Konzentrationen 50 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch W2327C01.

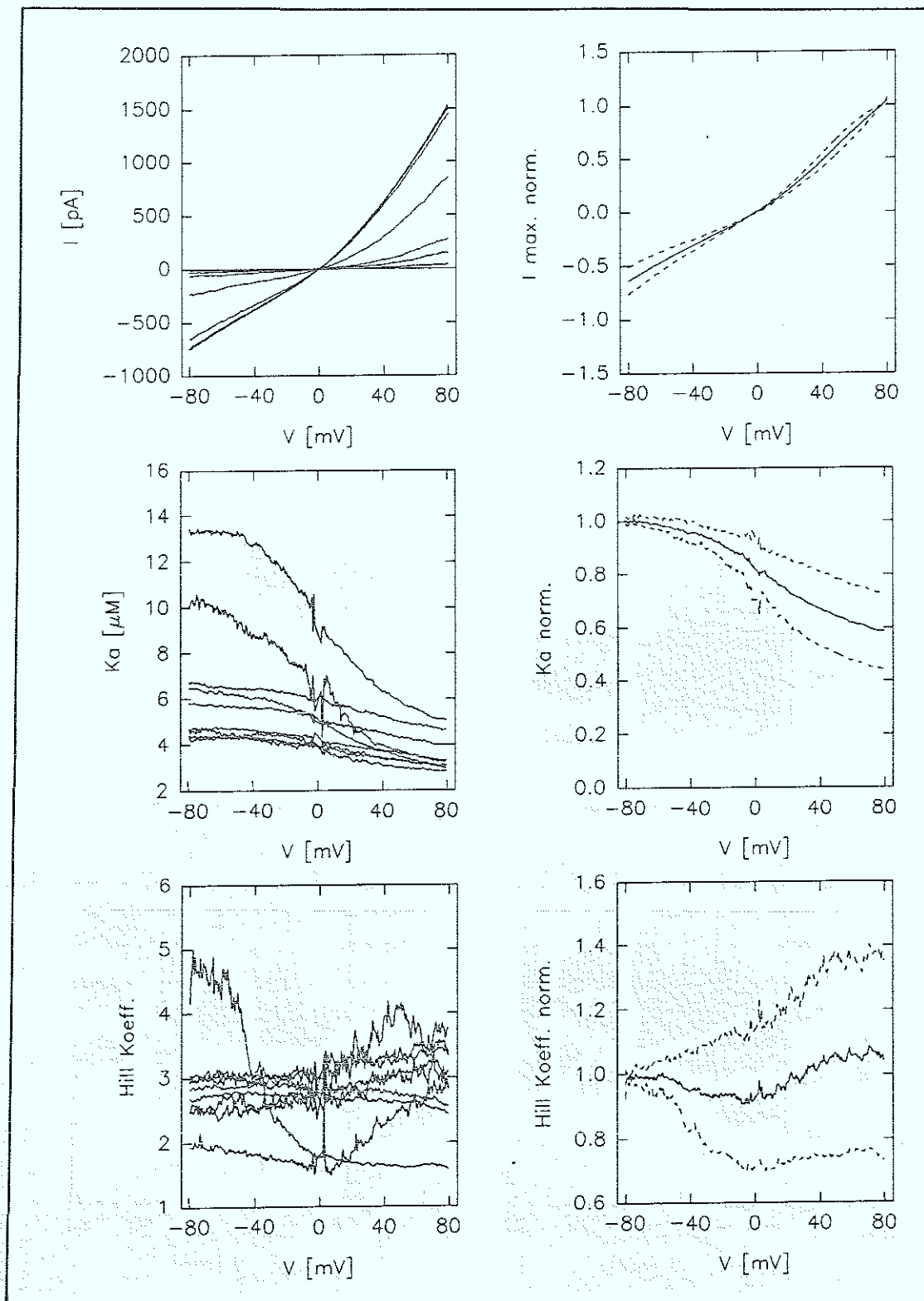


Abb. C27: R506R, 100 mM KCl, cGMP; 6 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 100-1000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 2, 3, 10, 25, 50, 100, 500 μM cGMP. Versuch W2227C81.

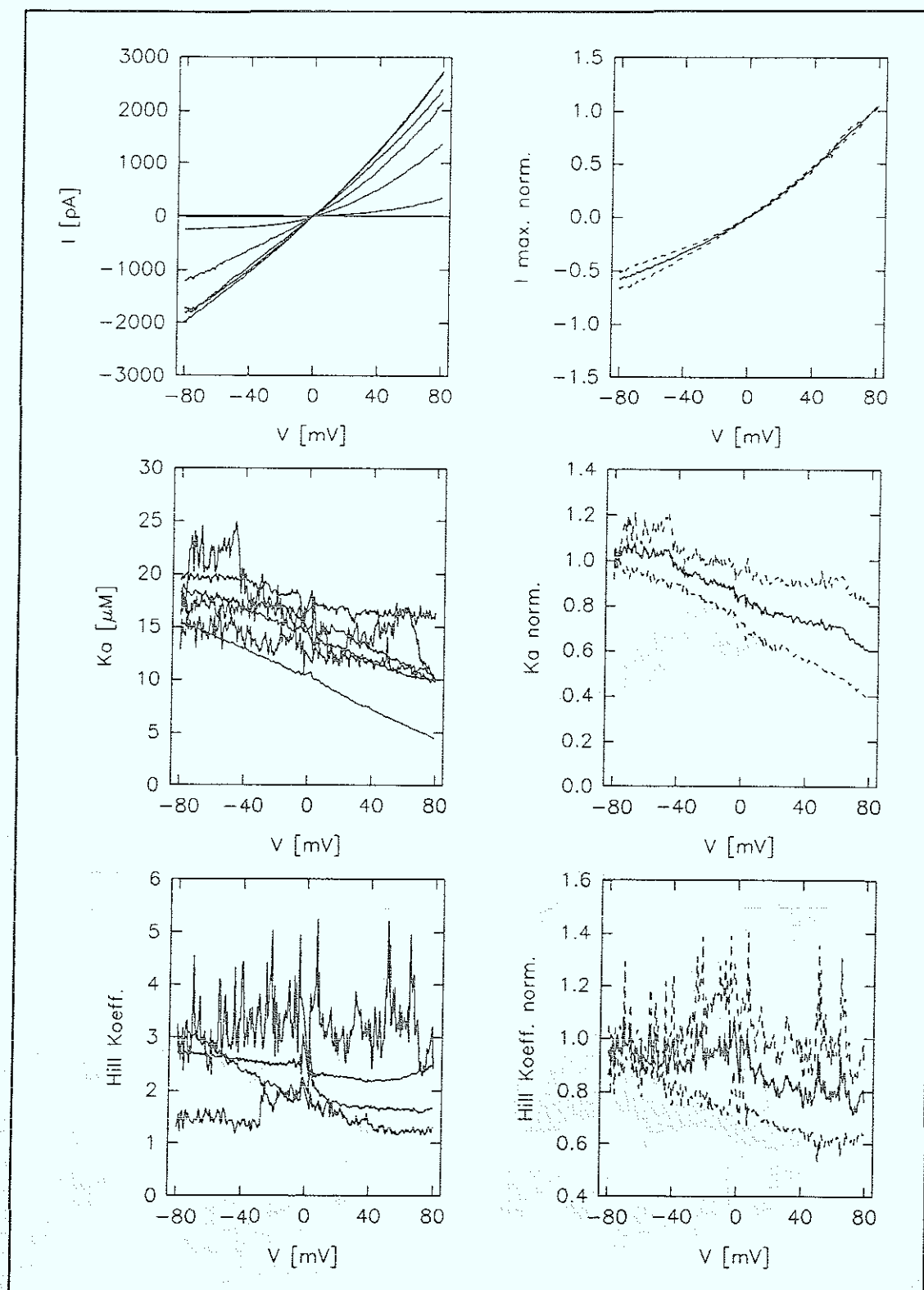


Abb. C28: O5R6O, 100 mM KCl, cGMP; 10 Versuche aus 8 Patchen, maximale Konzentrationen 100-1000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 2, 3, 10, 25, 50, 500 μM cGMP. Versuch W2227C12.

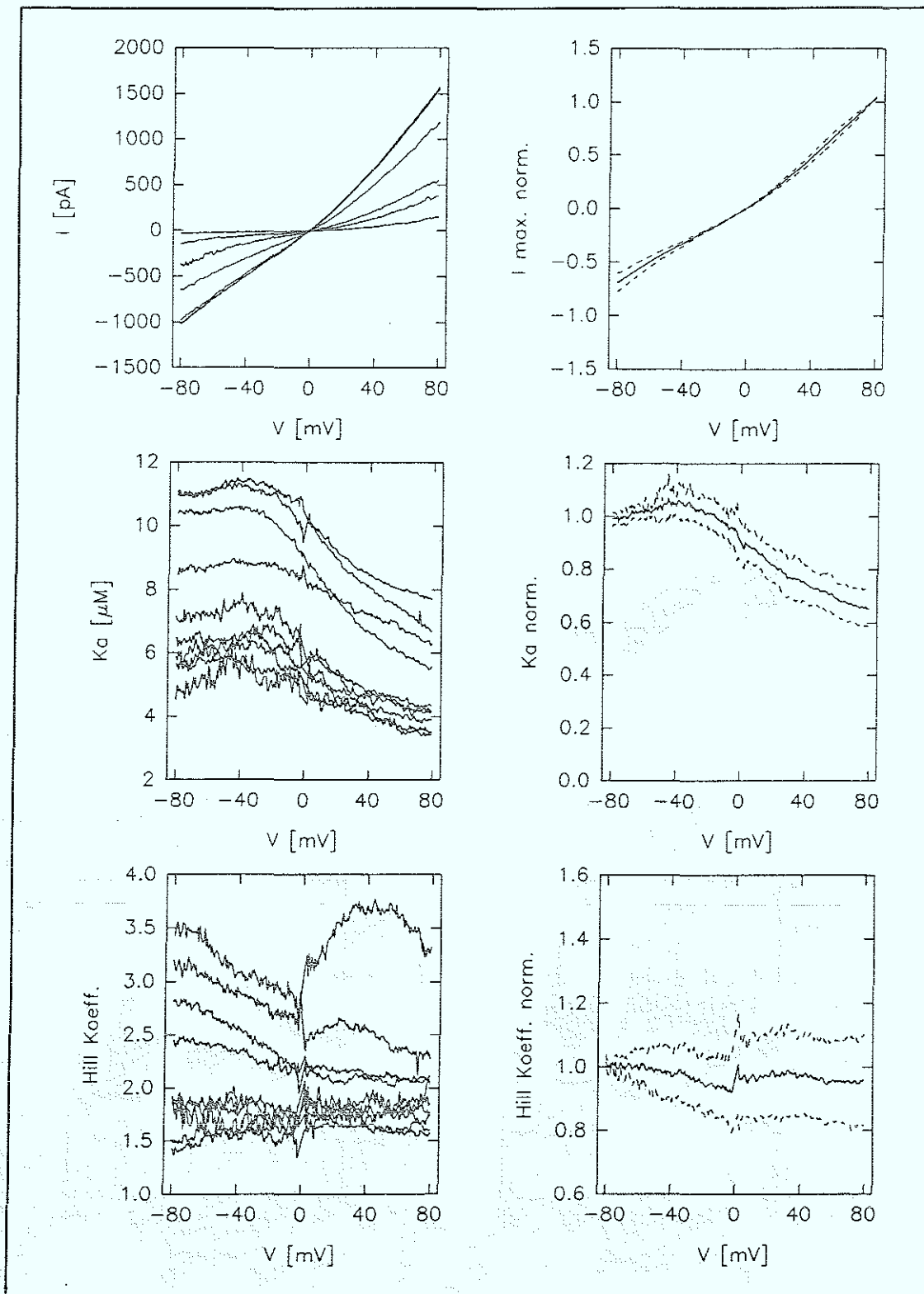


Abb. C29: D1O, 100 mM KCl, cGMP; 11 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 500-2000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 10, 25, 50, 100, 500, 2000 μM cGMP. Versuch U1N05C14.

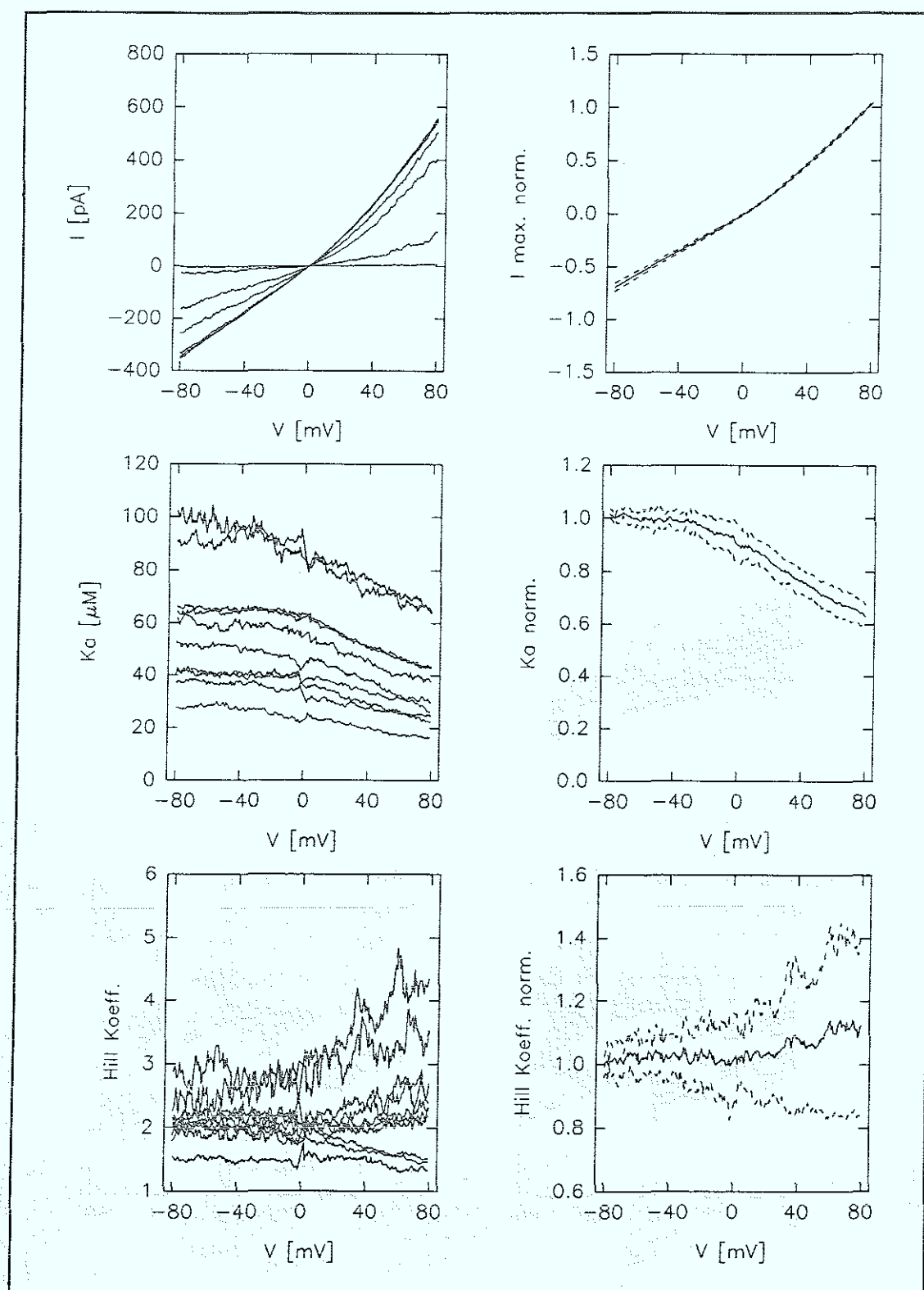


Abb. C30: D1R, 100 mM KCl, cGMP; 7 Versuche aus 5 Patchen, maximale Konzentrationen 1000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 μM cGMP. Versuch: W2228C03.

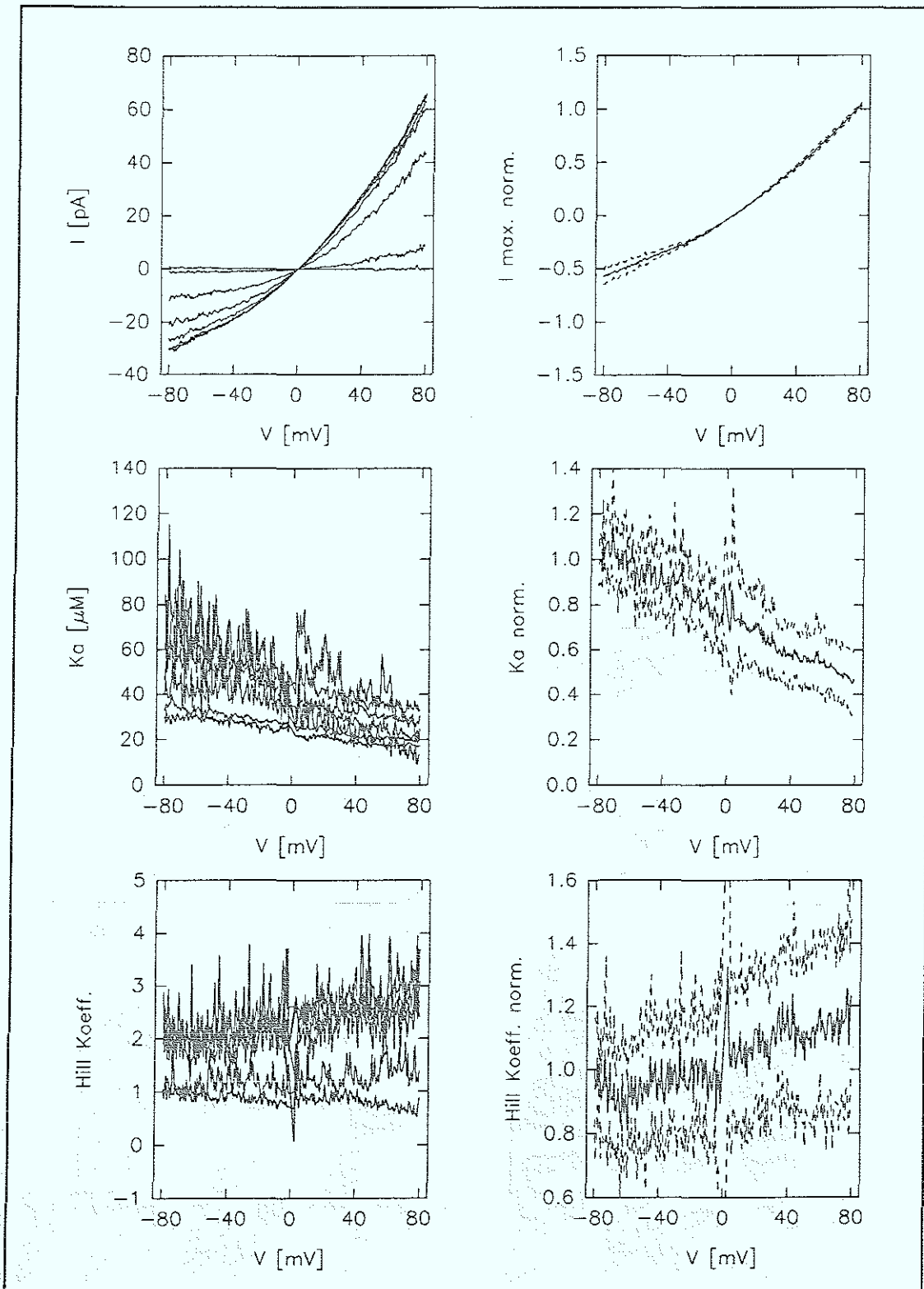


Abb. C31: O1R, 100 mM KCl, cGMP; 11 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 50-1000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 2, 3, 10, 25, 50, 500, 1000 μM cGMP. Versuch W2320C76.

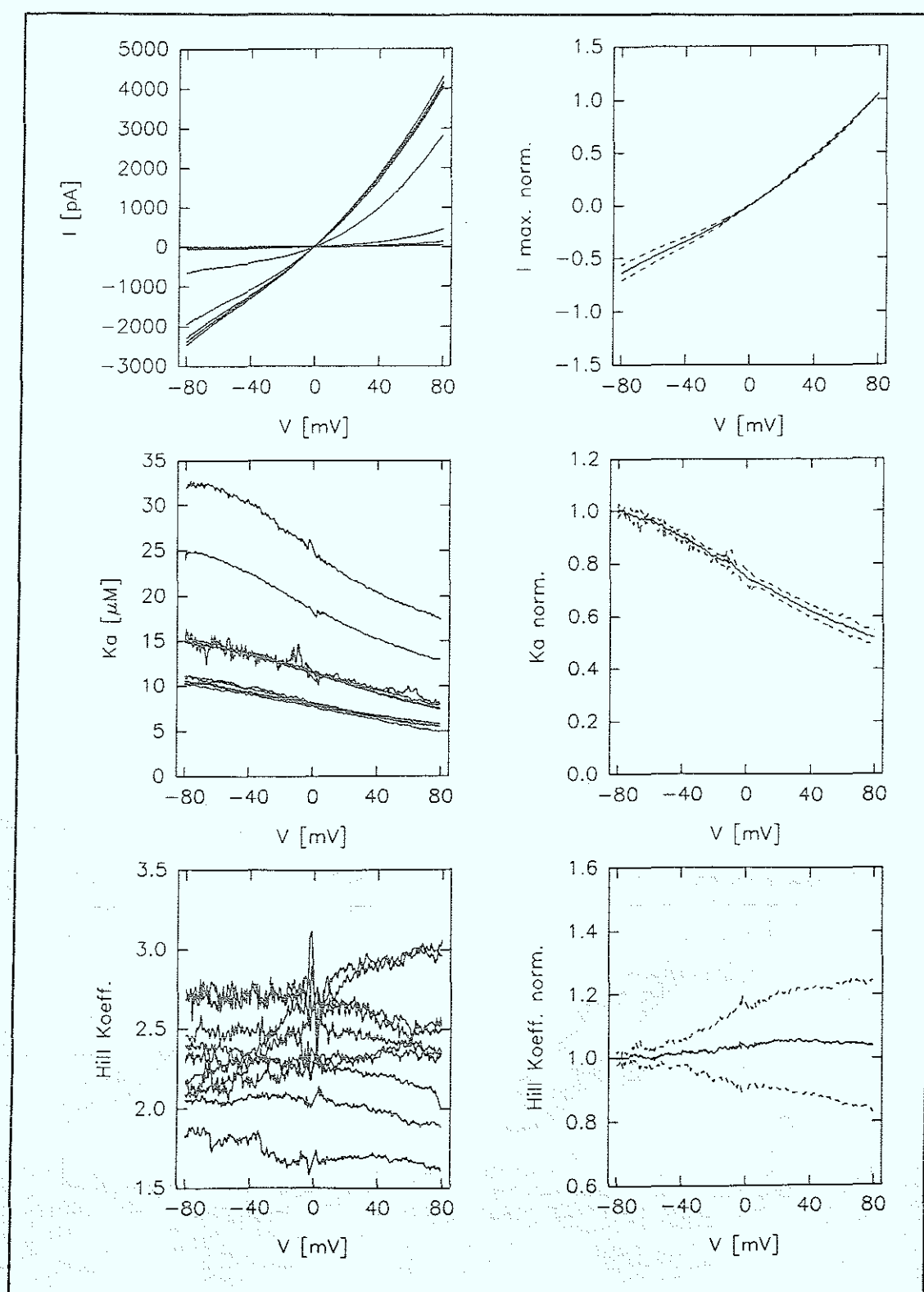


Abb. C32: R10, 100 mM KCl, cGMP; 3 Versuche aus 1 Patch, maximale Konzentration 250-2000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 2, 3, 10, 25, 50 μM cGMP. Versuch U1N05C87.

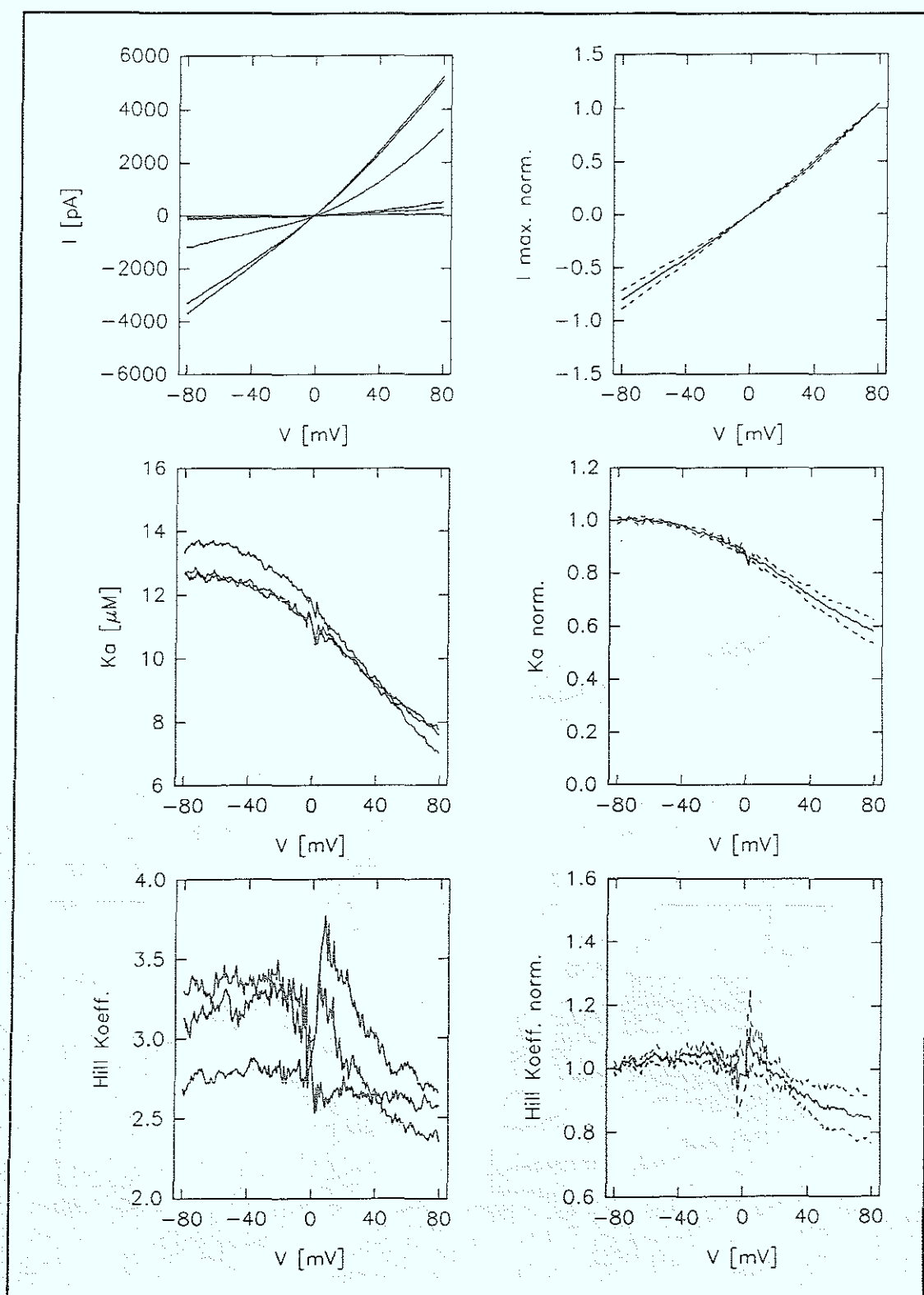


Abb. C33: O1R6O, 100 mM KCl, cGMP; 19 Versuche aus 10 Patchen, maximale Konzentrationen 500-5000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 2, 3, 10, 15, 20, 50, 1000, 5000 μM cGMP. Versuch T3112C57.

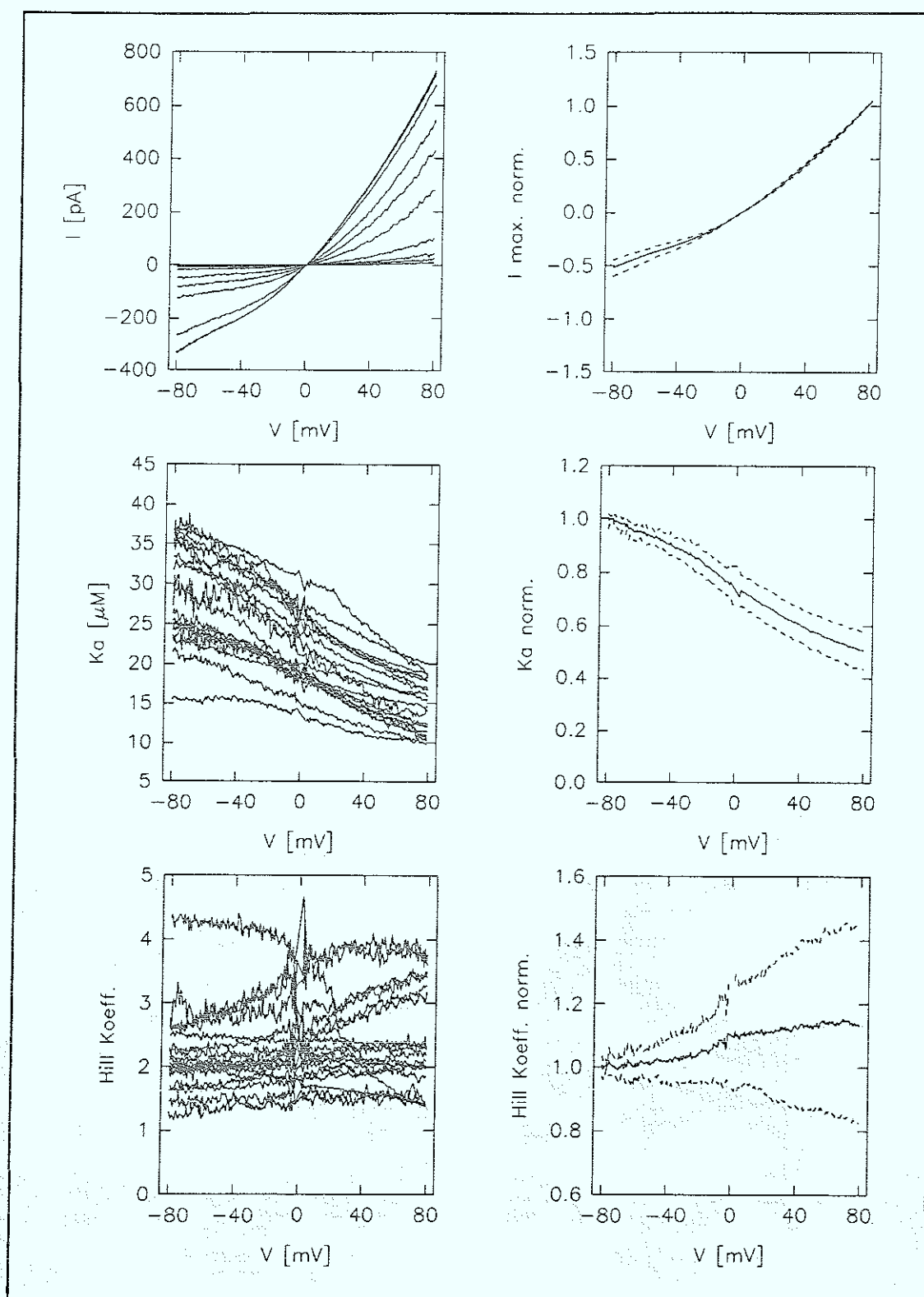


Abb. C34: R106R, 100 mM KCl, cGMP; 5 Versuche aus 3 Patchen, maximale Konzentrationen 25-500 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.5, 1, 3, 10, 25 μM cGMP. Versuch W1N05C23.

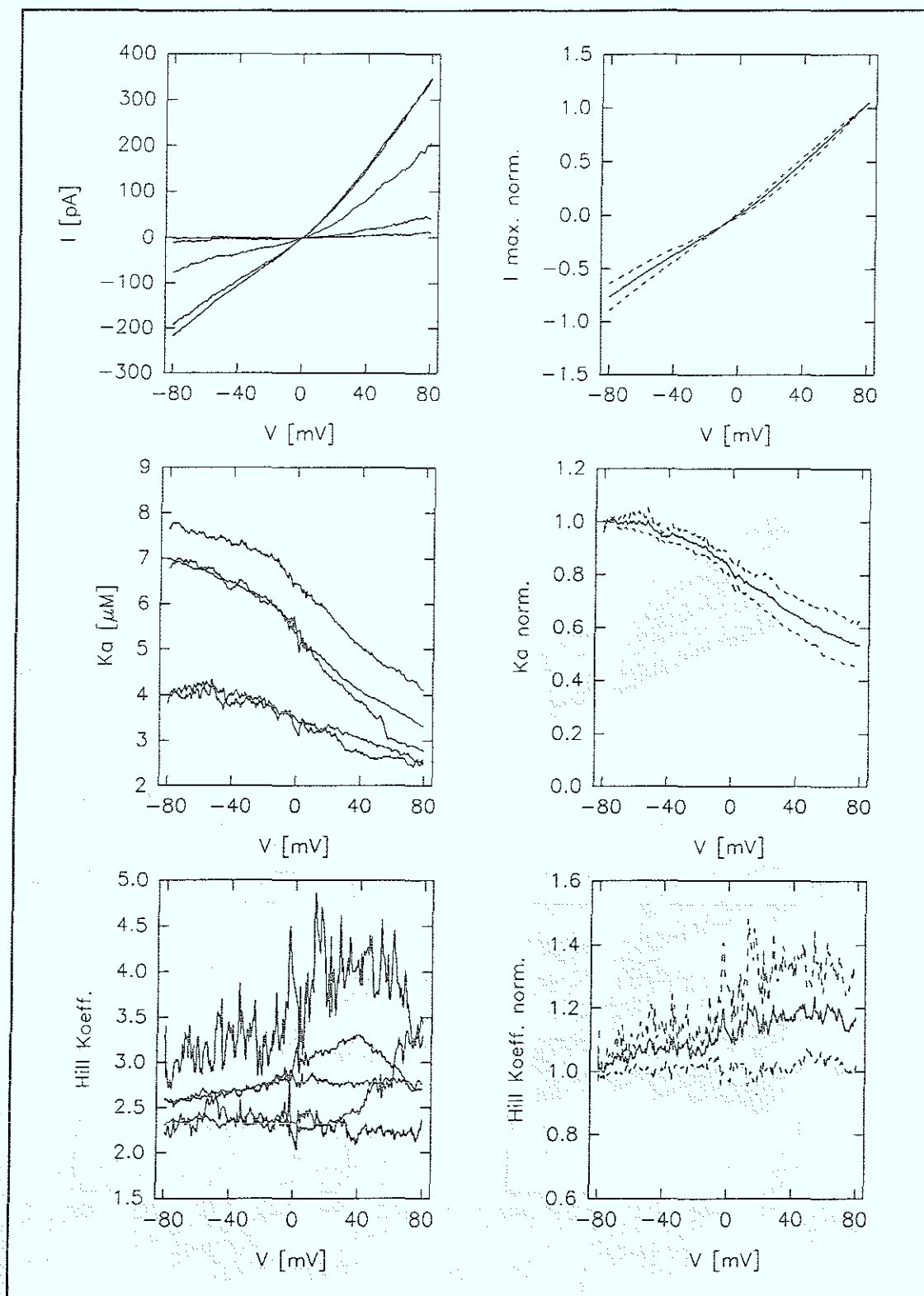


Abb. C35: DROD, 100 mM KCl, cGMP; 3 Versuche aus 1 Patch, maximale Konzentration 1 mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 10, 25, 50 100, 500, 1000 μ M cGMP. Versuch W1N08C16.

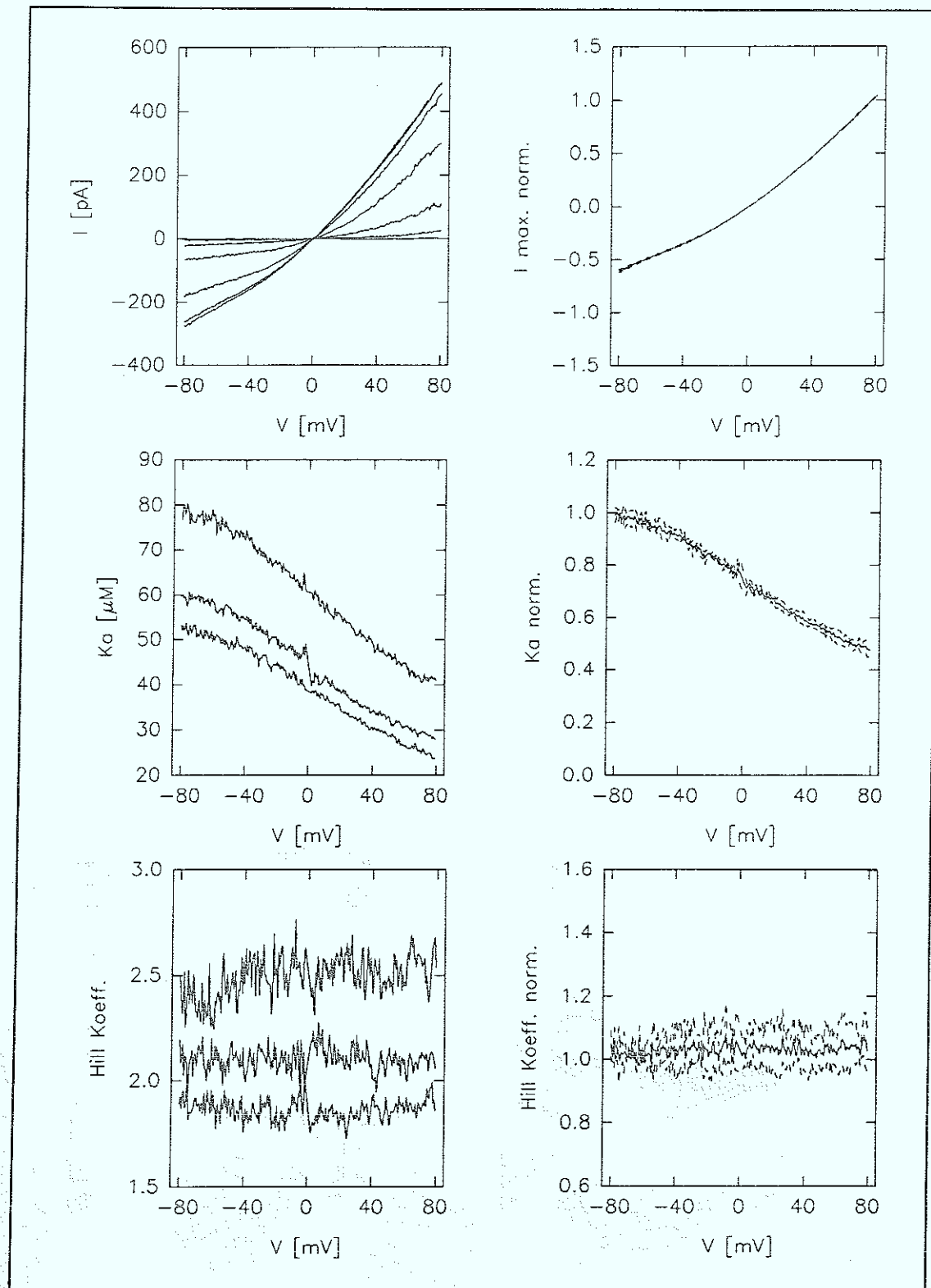


Abb. C36: R23O, 100 mM KCl, cGMP; 5 Versuche aus 4 Patchen, maximale Konzentrationen 1 mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 μM cGMP. Versuch V2226C37.

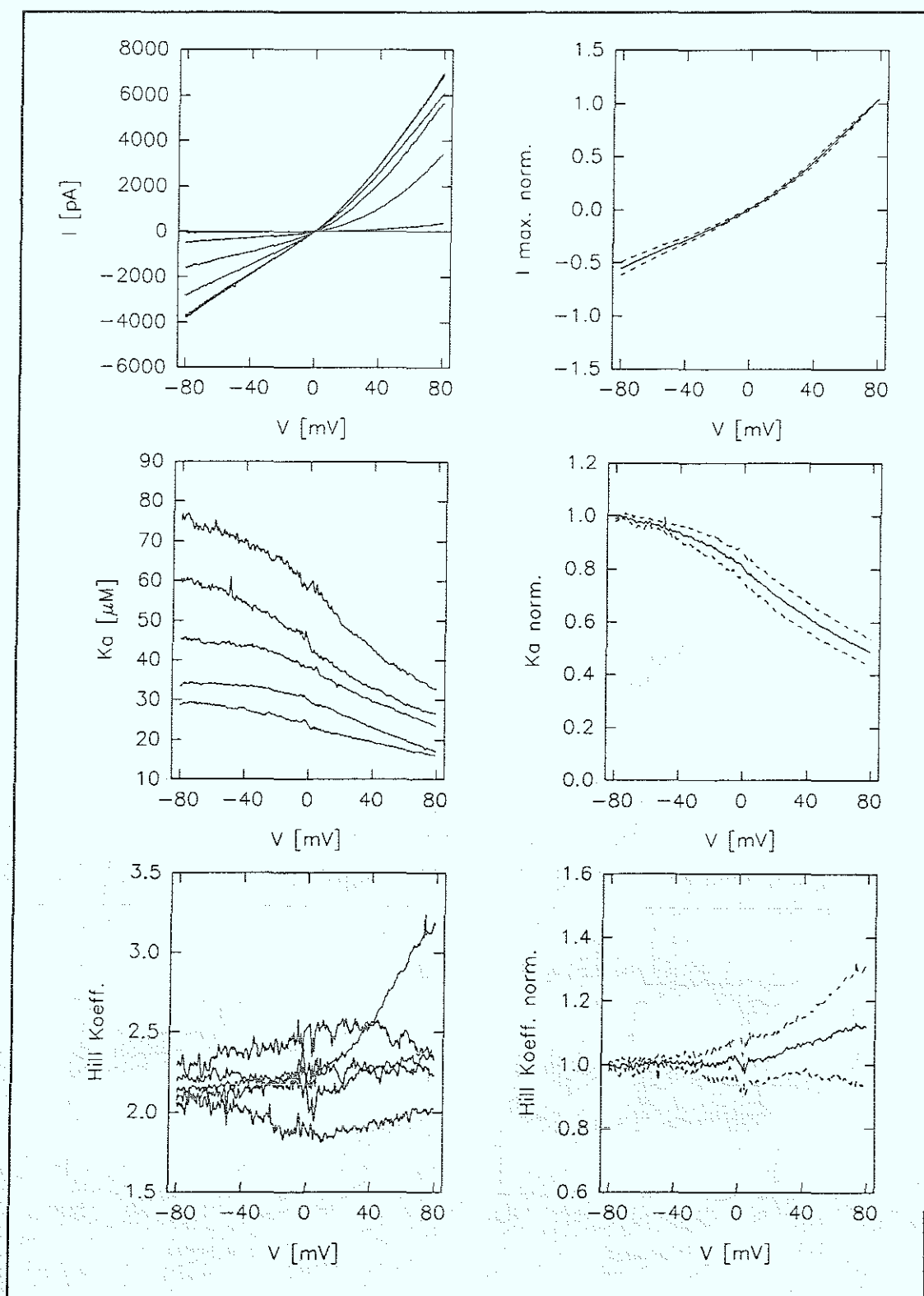


Abb. C37: R23O4R, 100 mM KCl, cGMP; 5 Versuche aus 3 Patchen, maximale Konzentrationen 500-1000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 500 μM cGMP. Versuch W1803C29.

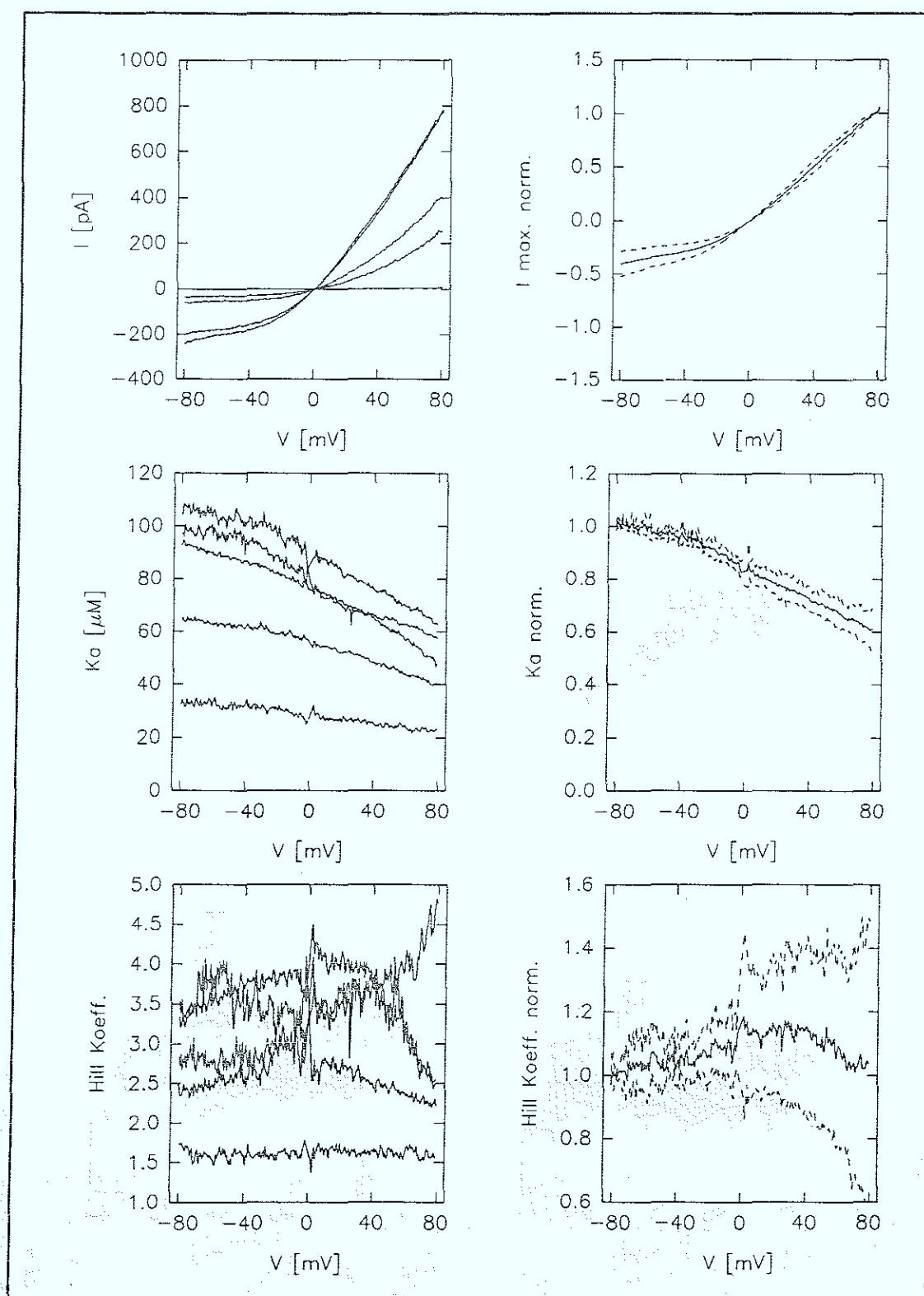


Abb. C38: O23R4O, 100 mM KCl, cGMP; 4 Versuche aus 2 Patchen, maximale Konzentrationen 25 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.25, 0.5, 1, 3, 10, 25 μM cGMP. Versuch V2510C08.

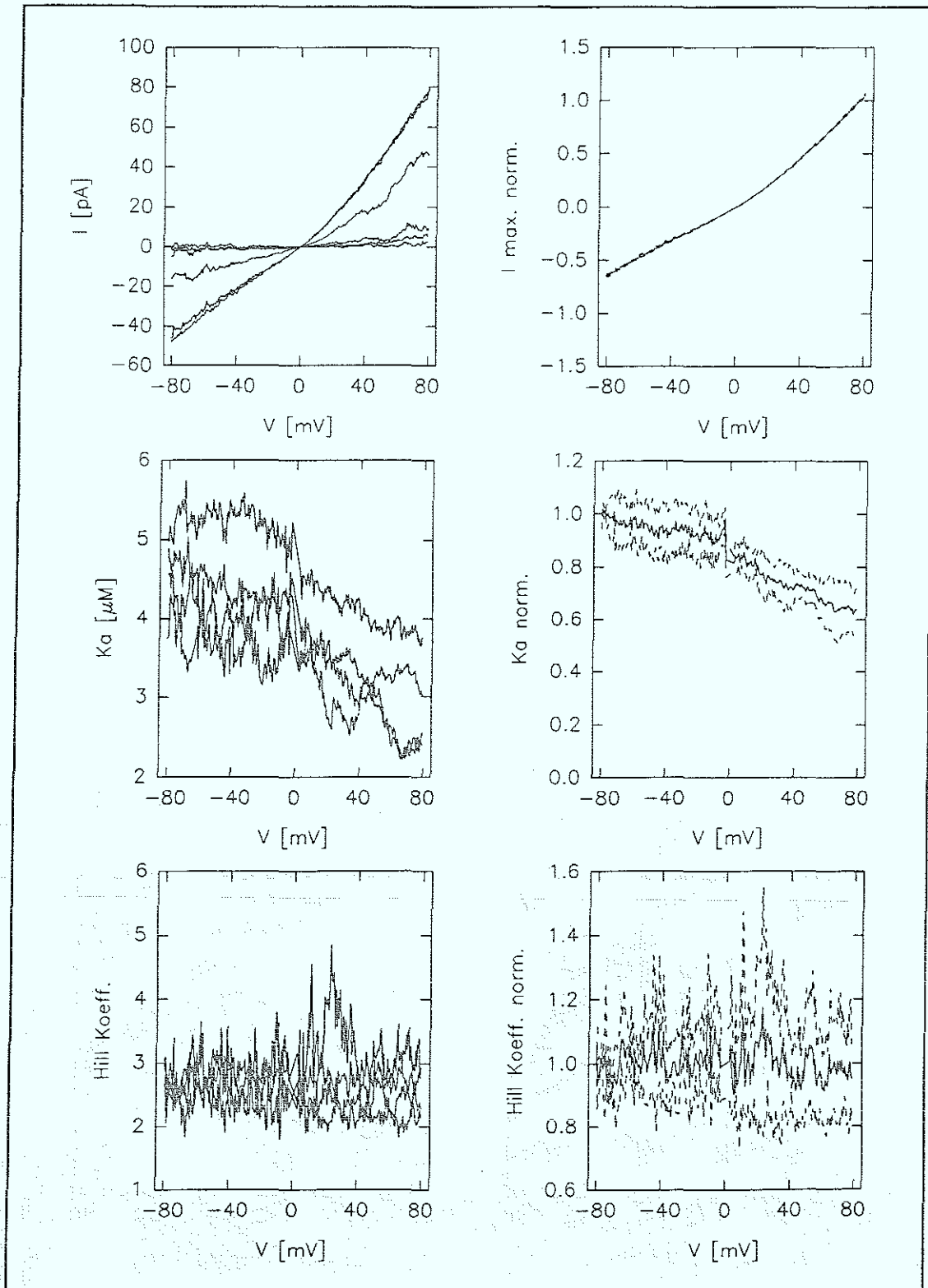


Abb. C39: C537S, 100 mM KCl, cGMP; 11 Versuche aus 7 Patchen, maximale Konzentrationen 10 mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2000 μ M cGMP. Versuch W1D14C01.

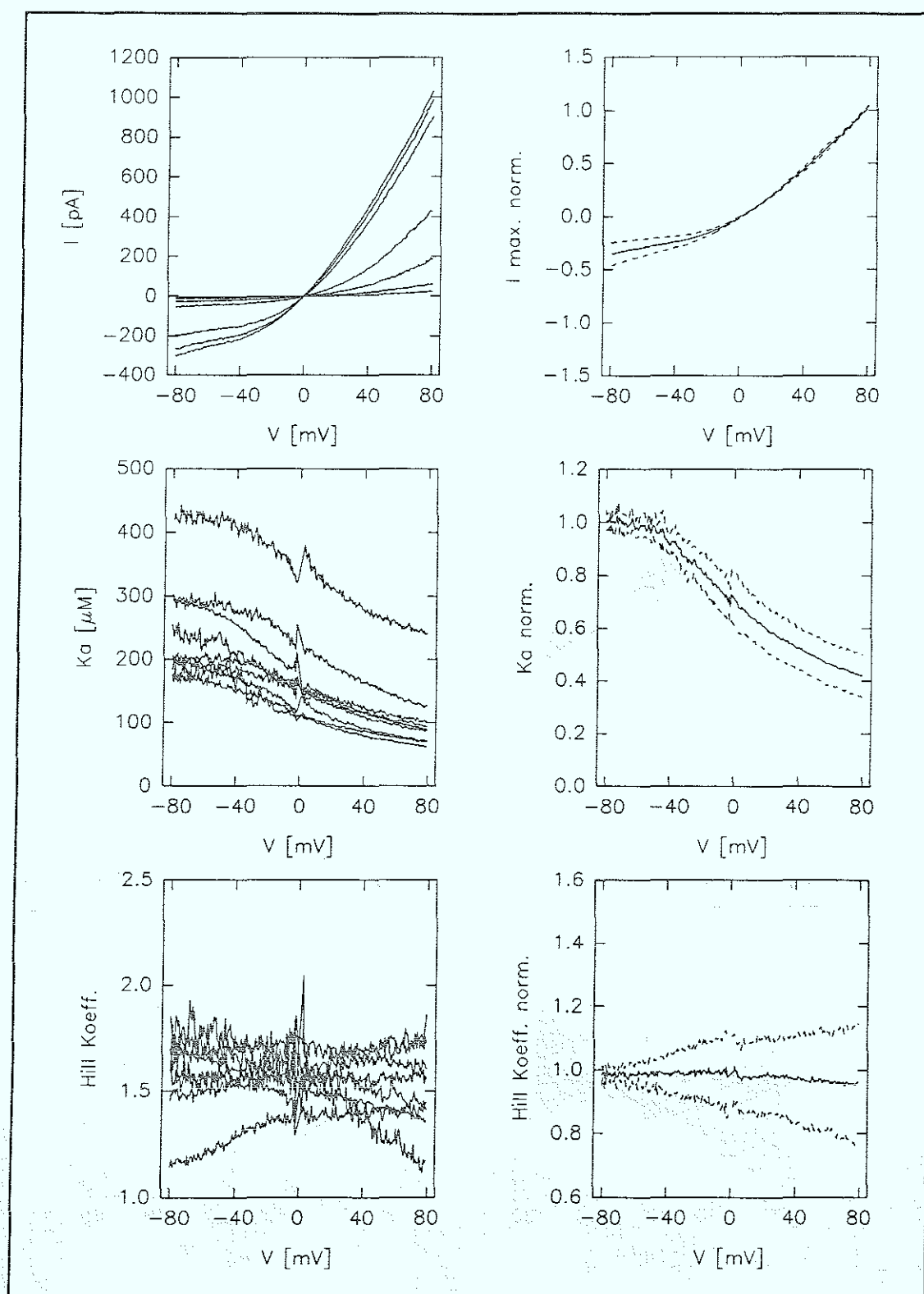


Abb. C40: D1, 100 mM KCl, cGMP; 9 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 1-5 mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 μ M cGMP. Versuch W1N16C41.

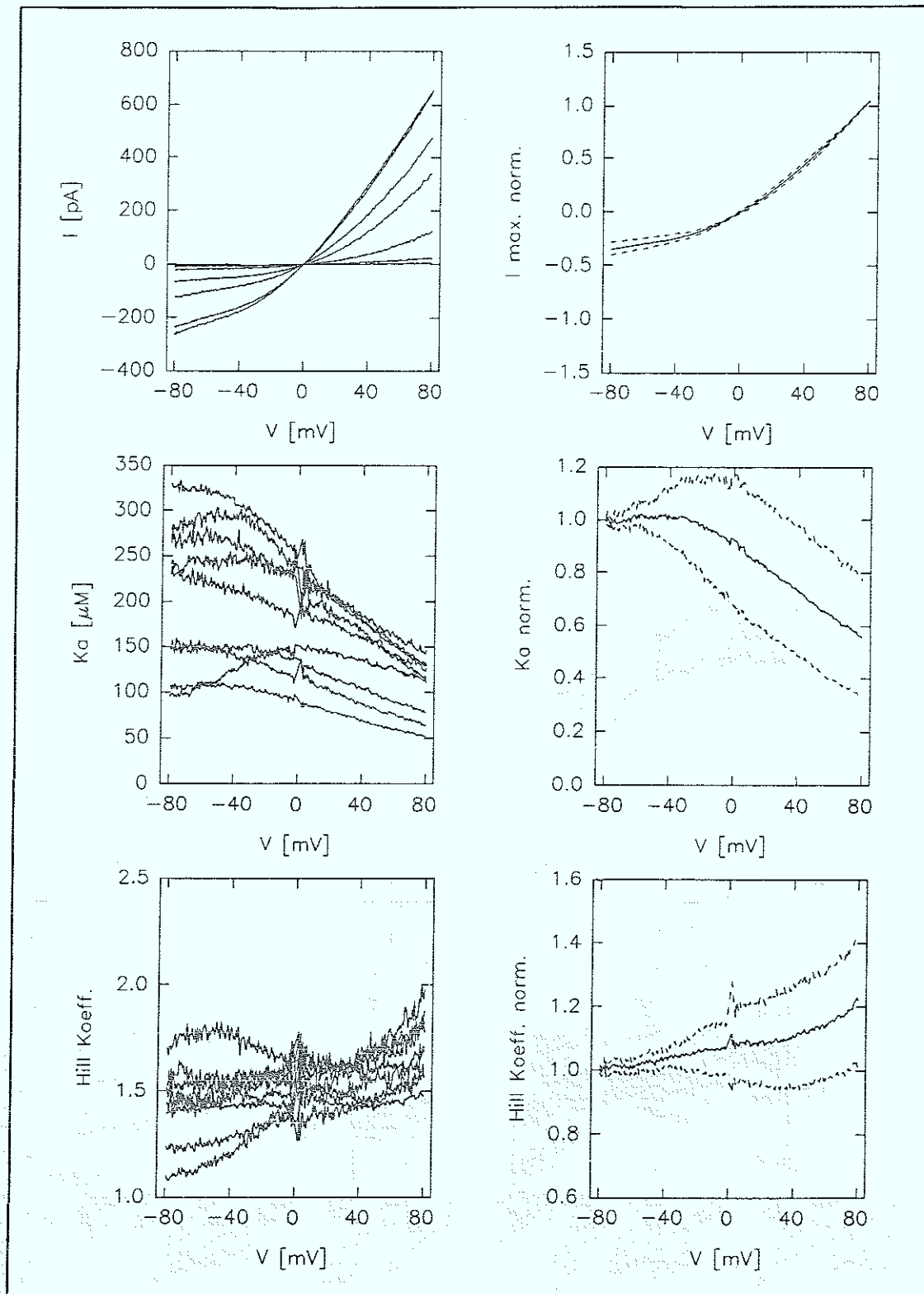


Abb. C41: MRODO1, 100 mM KCl, cGMP; 4 Versuche aus 4 Patchen, maximale Konzentrationen 500-1000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 500 μM cGMP. Versuch W0D23C11.

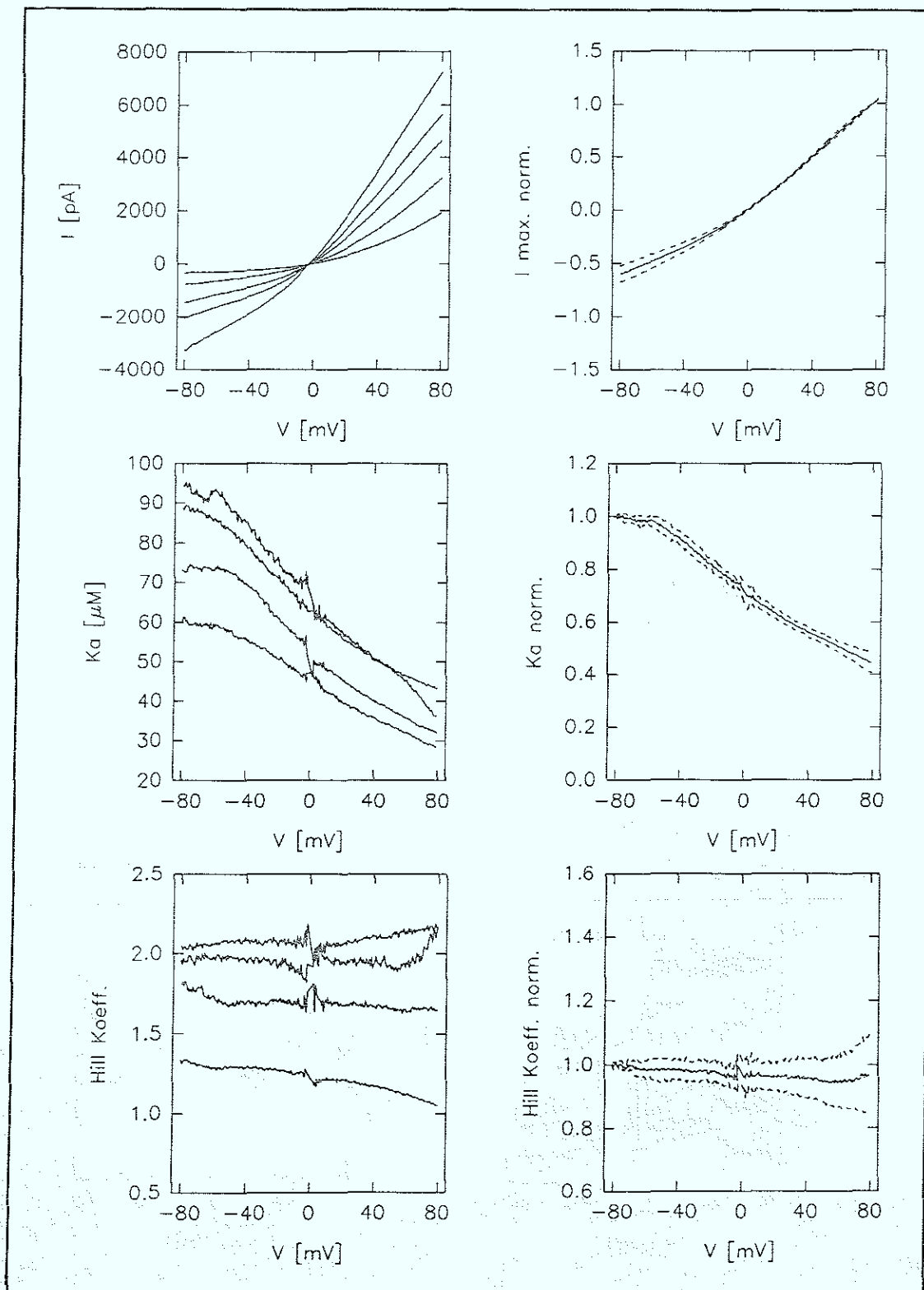


Abb. C42: T537A, 100 mM KCl, cGMP; 8 Versuche aus 7 Patchen, maximale Konzentrationen 500-1000 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 10, 25, 50, 100, 1000 μM cGMP. Versuch W1313C65.

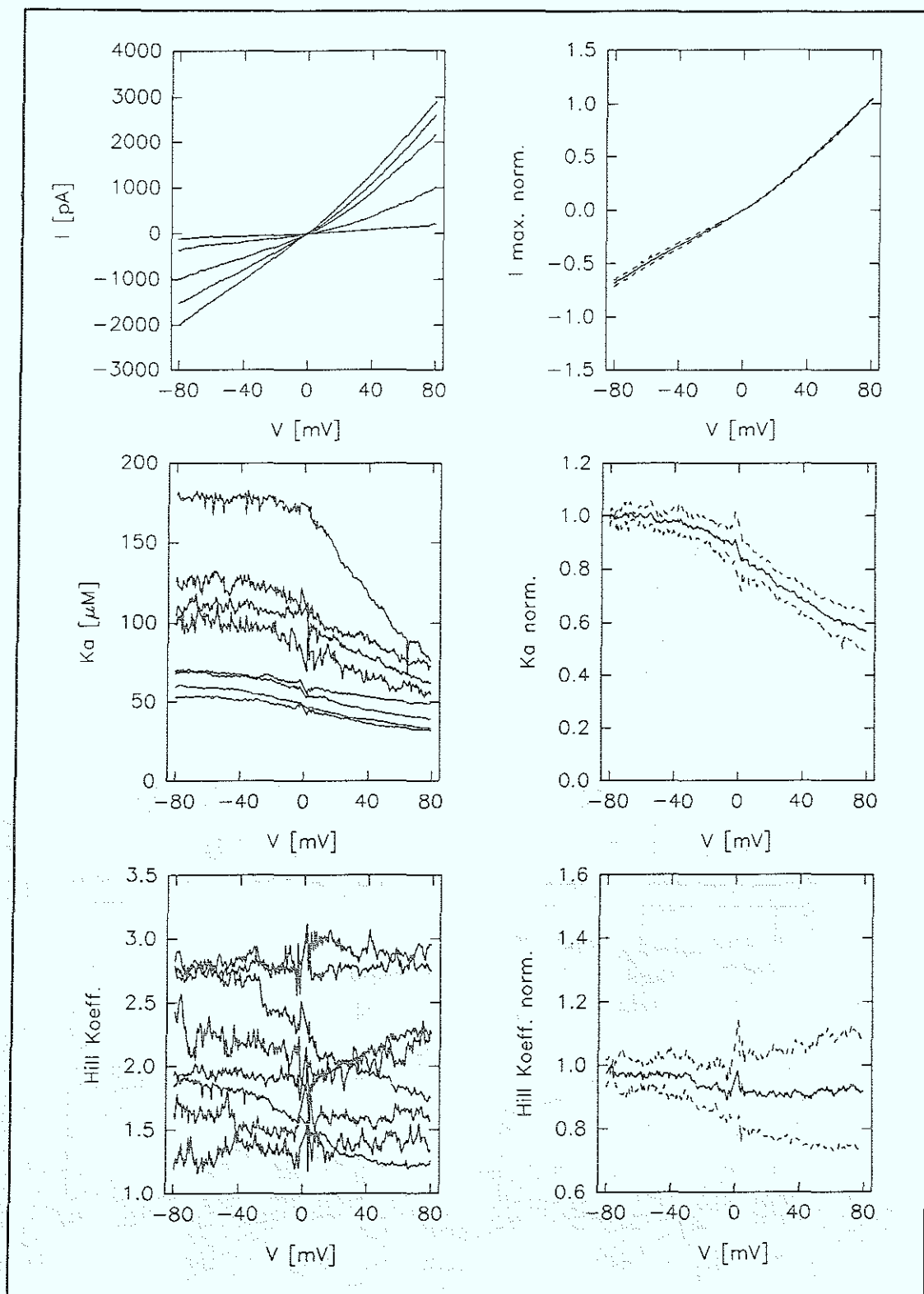


Abb. C43: T537A, 100 mM KCl, cAMP; 11 Versuche aus 7 Patches, maximale Konzentrationen 100-500 μM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 5, 10, 30, 50, 100 μM cAMP. Versuch V1314C66.

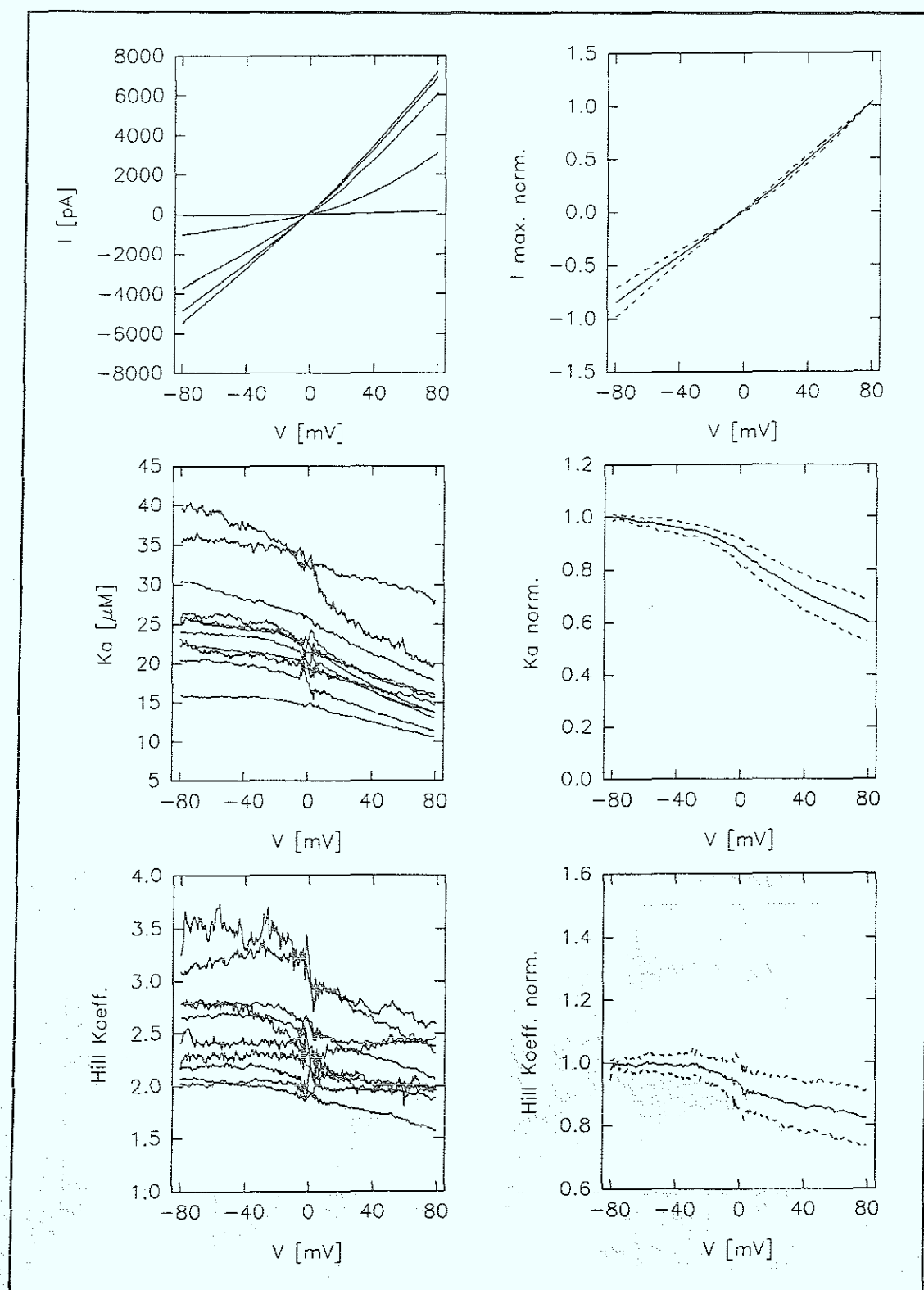


Abb. C44: T537S, 100 mM KCl, cGMP; 6 Versuche aus 4 Patchen, maximale Konzentrationen mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.03, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 50 μ M cGMP. Versuch V1518C95.

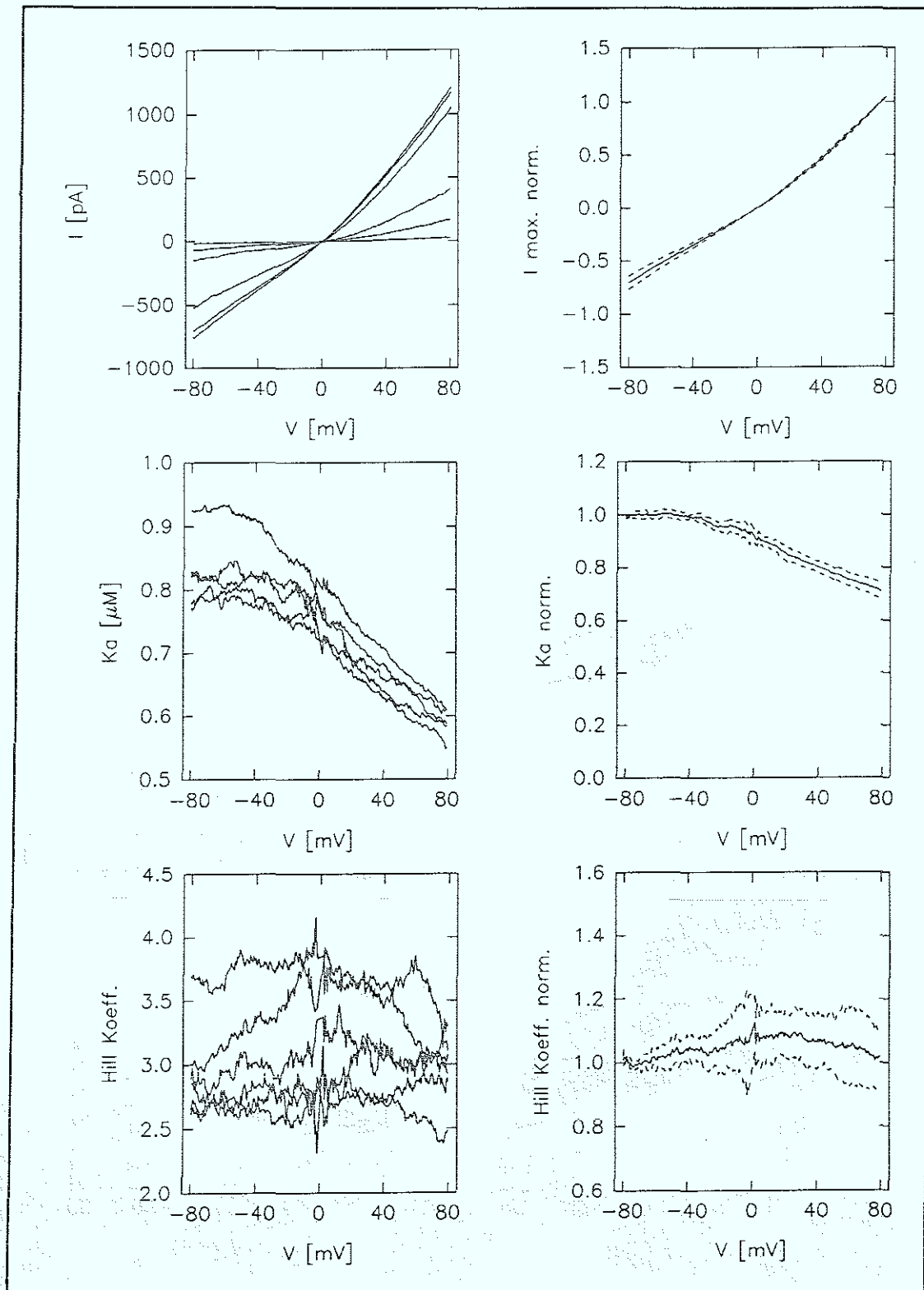


Abb. C45: T537S, 100 mM KCl, cAMP; 5 Versuche aus 5 Patches, maximale Konzentrationen 300 μM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 3, 30, 50, 100, 300, 500 μM cAMP. Versuch W1518C17.

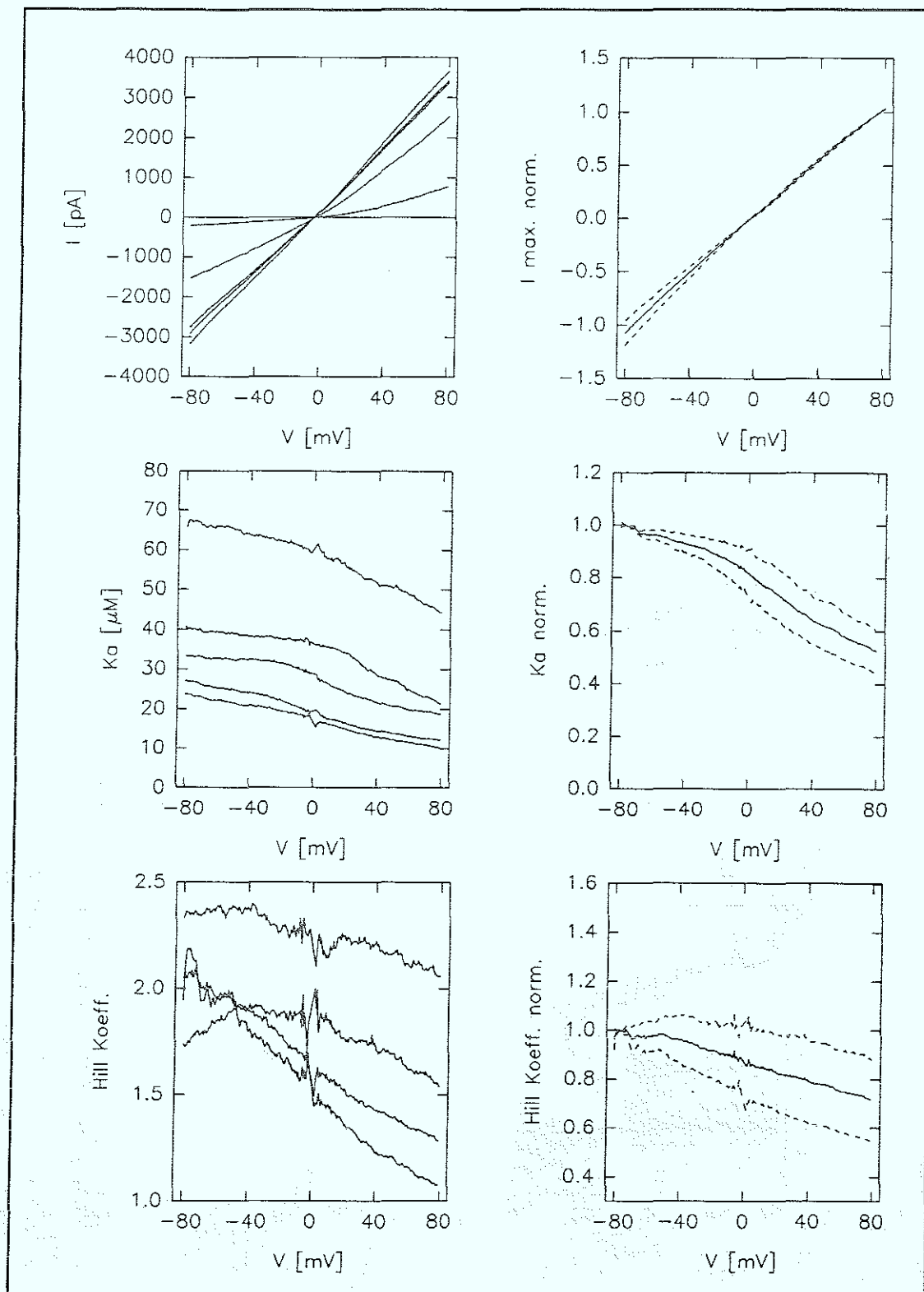


Abb. C46: T560A, 100 mM KCl, cGMP; 11 Versuche aus 8 Patchen, maximale Konzentrationen 5-10 mM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 50, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 μM cGMP. Versuch W0026C52.

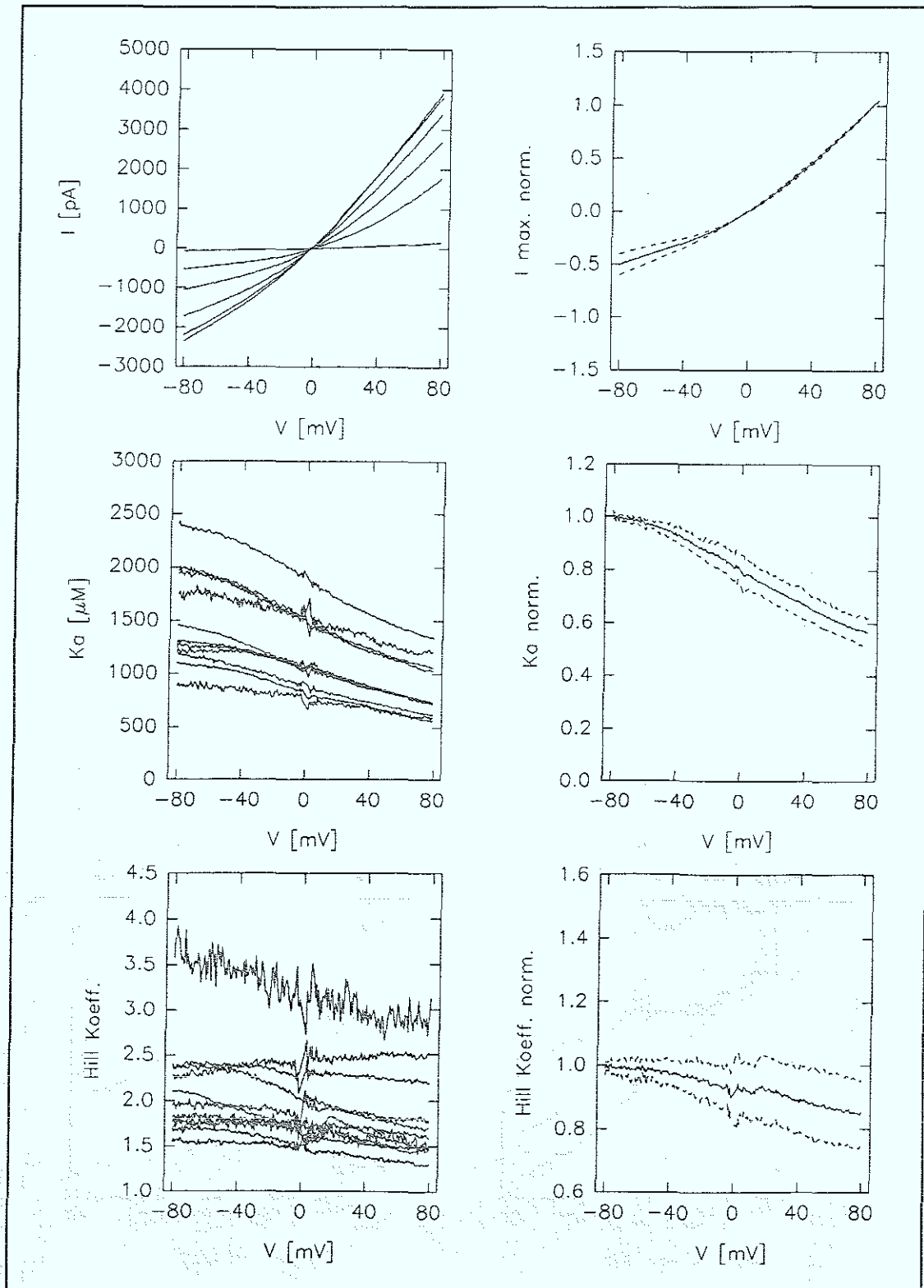


Abb. C47: T560A, 100 mM KCl, cAMP; 1 Versuch aus 1 Patch, maximale Konzentration 20mM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 10, 20 mM cAMP. Versuch V1417C39.

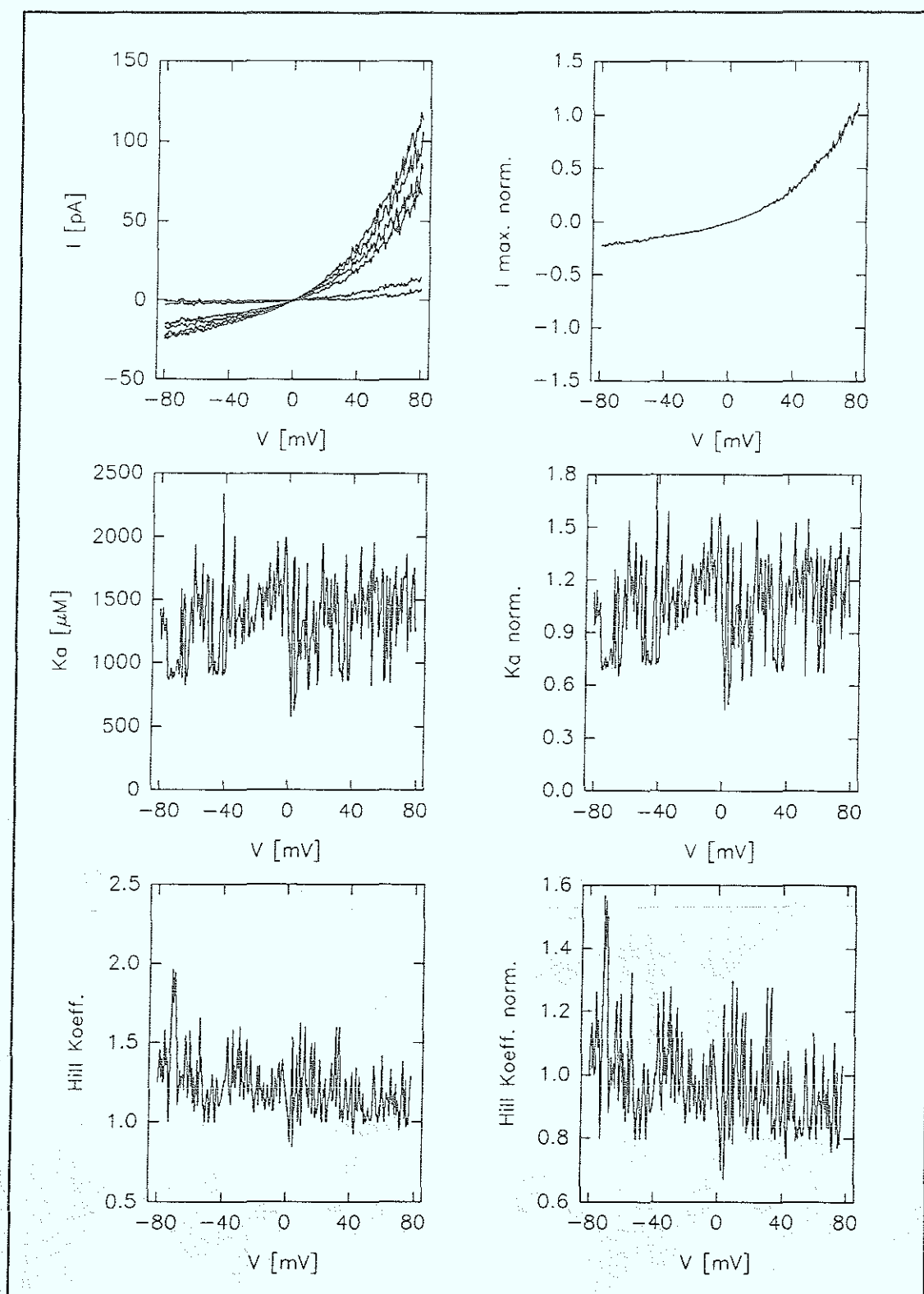


Abb. C48: T560S, 100 mM KCl, cGMP; 7 Versuche aus 6 Patchen, maximale Konzentrationen 50-100 μM cGMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 1, 2, 3, 10, 25, 50, 100 μM cGMP. Versuch W1408C94.

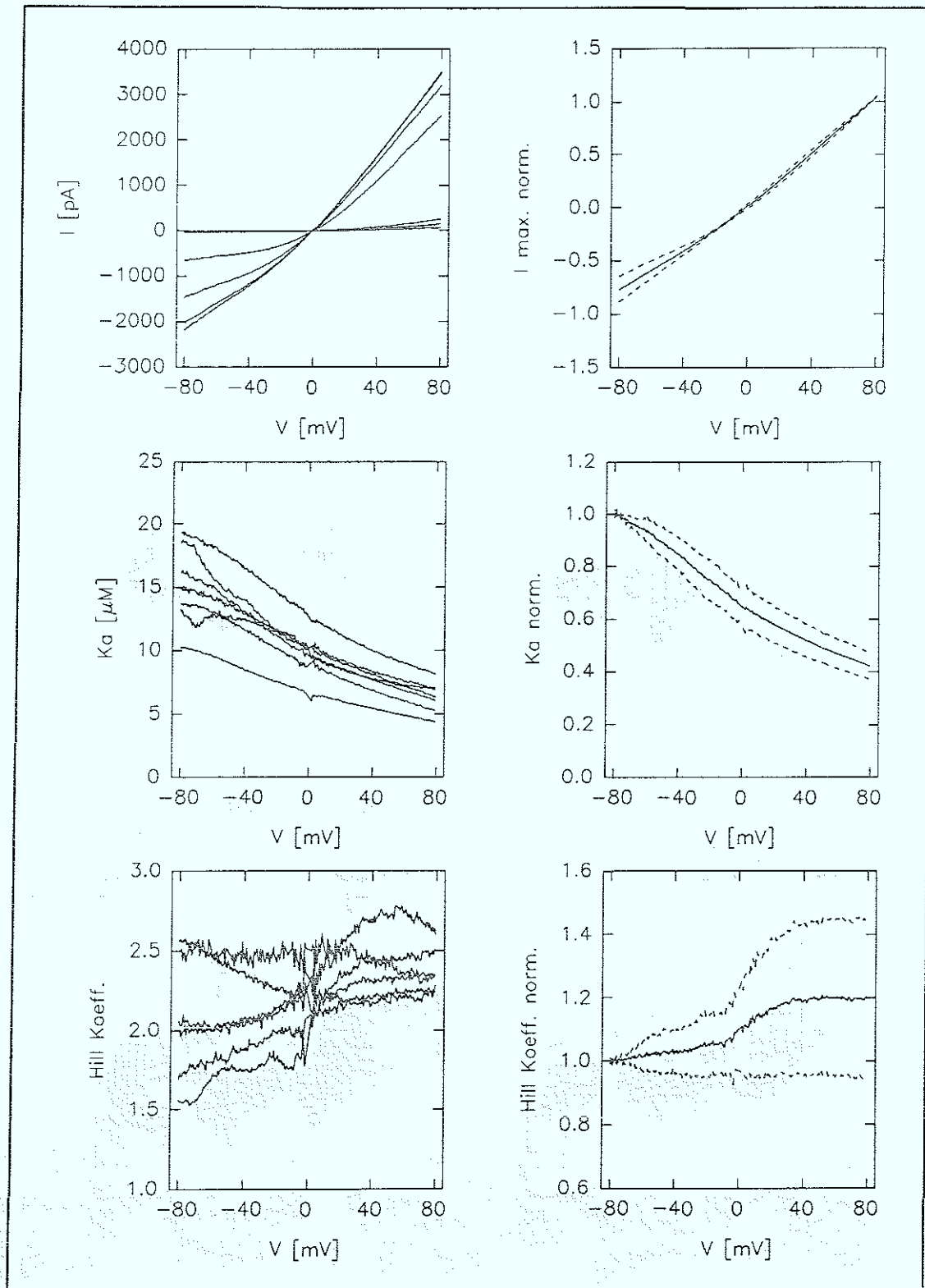
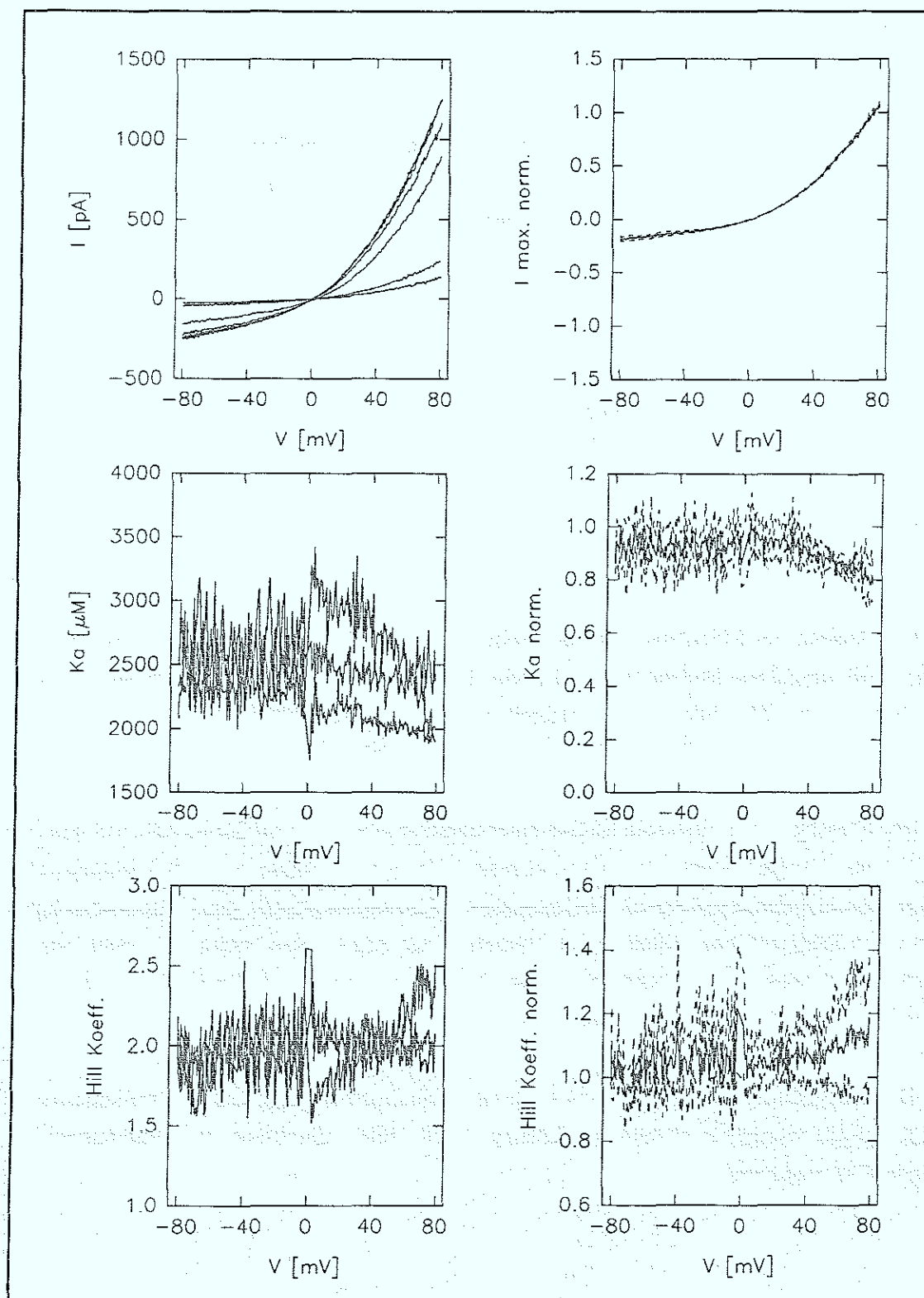


Abb. C49: T560S, 100 mM KCl, cAMP; 3 Versuche aus 3 Patchen, maximale Konzentrationen 20 mM cAMP, gezeigte I/V-Kurven in Gegenwart von 0,5, 1, 3, 5, 10, 20 mM cAMP. Versuch T1418C01.



ANHANG D

FARBTAFELN, LEGENDE

Abb. D1: Narkotisierter Krallenfrosch auf Eis. Durch einen Schnitt in der Bauchdecke ist Ovargewebe nach außen geführt. Man erkennt einzelne Oozyten. Der Gewebelappen enthält etwa 150 reife Oozyten. Originalgröße des Froschs etwa 11 cm.

Abb. D2: Im Ovargewebe verbundene Oozyten. Die pigmentfreien Oozyten im linken Teil der Abbildung sind die jüngsten, schräg rechts darunter die kleinen grauen, undeutlich gezeichneten, sind etwas älter und die dritte erkennbare Altersstufe sind Oozyten im Stadium V (Dumont, 1972), die zu Expressionsversuchen verwendet werden. Im Hintergrund, in diffusem Licht erscheinend, erkennt man Teile des Bindegewebssacks des Ovarlappens (Vergrößerung 25fach).

Abb. D3: Eine aus dem Bindegewebssack, aber noch nicht von umgebenden Follikelzellen (heller Kranz) befreite Oozyte (Vergrößerung 50fach).

Abb. D4: Die von umgebenden Zellen und der Vitellinmembran befreite Oozyte mit aufgesetzter Meßpipette (Vergrößerung 25fach).

Abb. D5: Ansicht des Meßplatzes von der Seite. Es sind Teile des Invertmikroskops, die von rotem Plastik umgebene Meßkammer mit Perfusionspipette sowie die Perfusionssteuerung mit den Schläuchen zur Flüssigkeitszufuhr abgebildet. In der rechten oberen Bildecke erkennt man den Vorverstärker mit dem BNC-Anschluß für den Pipettenhalter.

Abb. D6: Meßstand von oben (die Meßkammer unterscheidet sich von der in Abb. D5 gezeigten). Rechts im Bild sieht man den Vorverstärker (mit aufgesetzter Meßpipette). Die Polyethylenschlauchverbindung zum Pipettenhalter dient zur Kontrolle des Unterdrucks beim Bilden eines Seals zwischen Membran und Pipettenglas. Am unteren Bildrand erkennt man in blauer Farbe die Zufuhr für den schnellen Lösungsaustausch im Bad. Links im Bild ist die Perfusionspipette in Ruheposition zu sehen.

Abb. D7: Meßpipette vor einer der 14 Perfusionsöffnungen im laminaren Flüssigkeitsstrom. Die Messungen werden in strömender Lösung durchgeführt, um Ionen- und Ligandkonzentration konstant zu halten.

Abb. D8: Modell des cGMP-Moleküls. Kohlenstoffatome sind weiß, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot und Phosphoratome gelb dargestellt. Die raumfüllenden Kugelwolken symbolisieren Van-der-Waals Radien. Die Farbschattierung gibt die Ladungsverteilung wieder: rot entspricht positiver, blau negativer Ladung⁵³.

Im oberen Bildteil erkennt man den Guanosinring, im unteren Bildteil den Ribosephosphatrest. cGMP und cAMP unterscheiden sich durch die Position der Aminosubstitution am Guanosinring: Im cGMP steht die Aminogruppe in Position 2, Position 6 ist durch einen Carbonylsauerstoff substituiert. Im cAMP steht die Aminogruppe in Position 6, Position 2 ist unsubstituiert.

cGMP und cAMP existieren in zwei unterschiedlichen Konformationen, *syn* und *anti*. Sie unterscheiden sich in der Orientierung der Base zum Ribosephosphatrest. In der hier dargestellten *anti*-Konformation weisen die 2-Aminogruppe und der Phosphatrest in entgegengesetzte Richtung. Die Konformation ist aus sterischen Gründen bevorzugt, da raumfüllende Molekülteile in unterschiedliche Richtungen weisen.

Abb. D9: cGMP-Molekül in der *syn*-Konformation. Die Orientierung des Guanosinrests ist unverändert, der Ribosephosphatteil weist in die entgegengesetzte Richtung. Diese Konformation ist im cGMP aus elektrostatischen Gründen bevorzugt, weil die 2-Aminogruppe eine zusätzliche, stabilisierende H-Brücke zum Sauerstoff des Phosphatesters ausbilden kann. In Lösung liegen beide Konformere im Gleichgewicht vor. Für cGMP ist das Gleichgewicht zur *syn*-Konformation hin verschoben, für cAMP wegen der fehlenden stabilisierenden Wechselwirkung in Position 2 zur *anti*-Konformation.

Abb. D10: Computermodell der Röntgenstruktur des CAP Proteins (McKay *et al.*, 1982; Weber & Steitz, 1987). Die Darstellung zeigt nur das α -C-Atom-Rückgrat des Proteins. Die weißen Sterne geben die Position der in der Röntgenstruktur aufgelösten Wassermoleküle wieder. (Der weiße Pfeil ist "Artefakt" des Computergraphikbildschirms.) Das CAP Protein existiert als Dimer. In der Darstellung unterscheiden sich die beiden Monomere durch die Farbkodierung (blau bzw. gelb). In der Röntgenstruktur liegen die Monomere in zwei unterschiedlichen Konformationen einer offenen (blau), und einer geschlossenen (gelb) vor. In der offenen Konformation liegen C- und N- Terminus weiter auseinander als in der geschlossenen Konformation. Jedes Monomer besteht aus einer DNA-bindenden Domäne (oberer Bildteil) und aus einer Nukleotid-bindenden Domäne. Die Aminosäuresequenz dieser Domäne ist homolog zur Ligandenbindestelle von zyklisch-Nukleotid-abhängigen Proteinkinasen (Weber *et al.*, 1982) und zu CNG-Kanälen (Kaupp *et al.*, 1989). Der Ligand und die wechselwirkenden Aminosäuren sind im gelben Monomer rot gezeigt, im blauen Monomer weiß. In der Bildmitte

⁵³ Die Ladungsverteilung des cGMP wurde freundlicherweise von Frau J. Schill (ETH Zürich) mit dem Programm MOPAC berechnet.

sieht man von oben nach unten die im Text als α -C bezeichnete Aminosäurehelix. Beide Monomere sind um etwa 20° gegeneinander verdreht und berühren sich im Bereich der C-Helix. Die Liganden der Untereinheiten wechselwirken u. a. mit Aminosäuren der C-Helix des benachbarten Monomers. In der Röntgenstruktur des CAP ist cAMP wahrscheinlich in *anti*-Konformation gebunden (Weber & Steitz, 1987).

Abb. D11: Verwandte Kinase und CNG-Kanal Bindestellen, modelliert in Analogie zur CAP Bindestelle und übereinander projiziert. CAP, (geschlossen, zyanblau, mit DNA-bindender Domäne im linken Bildteil), Typ I cAPK erste Bindestelle (rot), Typ I cAPK zweite Bindestelle (hellgrün), Typ II cAPK erste Bindestelle (violett), Typ II cAPK zweite Bindestelle (gelb), cGPK erste Bindestelle (purpur), sowie die Bindestelle des ROD (dunkelblau). Die zweite Bindestelle der cGPK kann fast vollständig mit der zweiten Bindestelle der Typ I cAPK zur Deckung gebracht werden. Die Modelle der cAPKs und des CAP entstammen der Brookhaven Datenbank, die Modelle des ROD und der cGPK wurden in Analogie zur zweiten Bindestelle der Typ I cAPK modelliert.

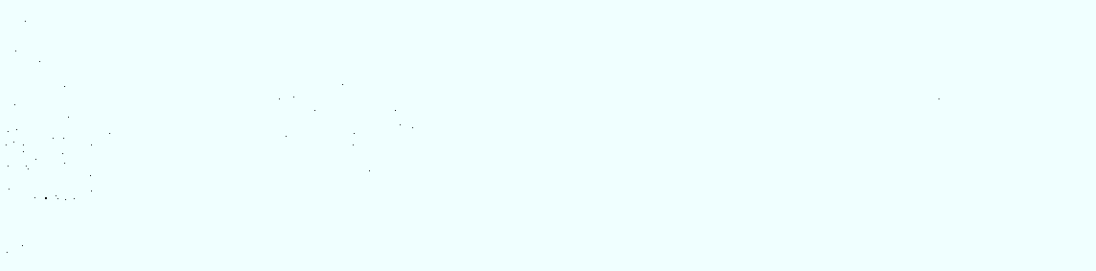
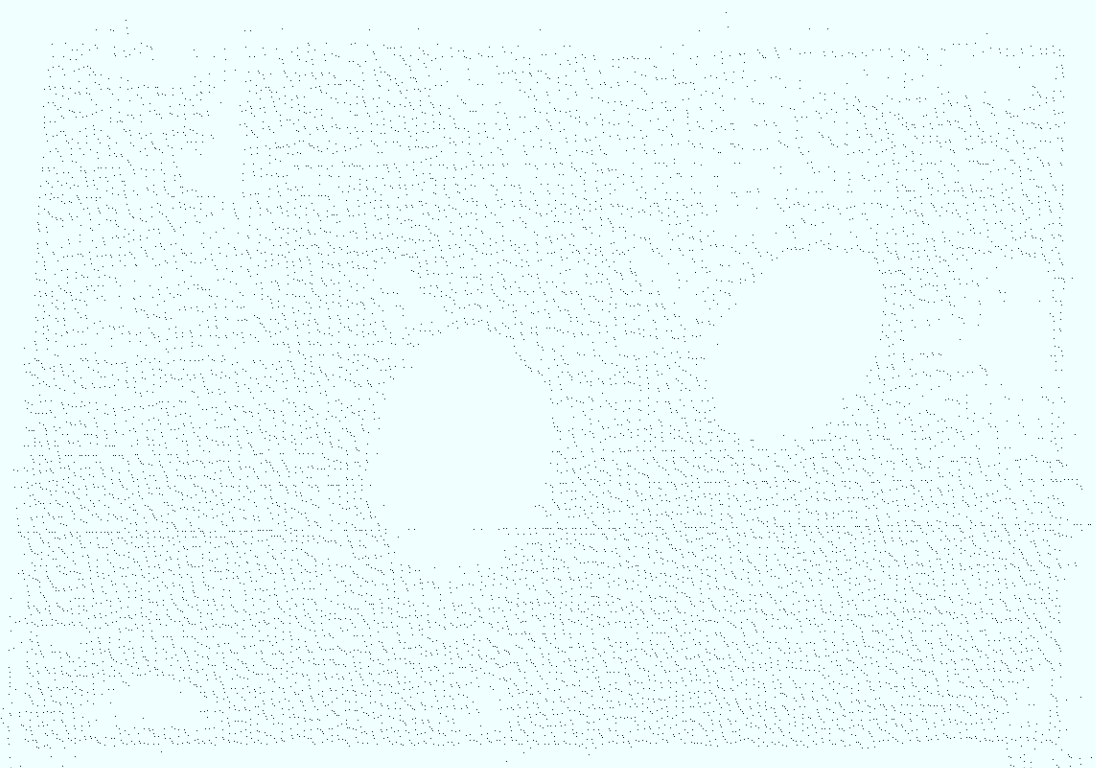
Abb. D12: Ansicht der aus dem Modell der cAPK entwickelten Bindestelle des ROD. Die Rückgratatom (zyanblau) sind zur Verdeutlichung der Sekundärstrukturmerkmale mit einem violetten Band unterlegt. Der N-Terminus liegt in der oberen linken Bildecke mit der in Abb. D14 als "A" bezeichneten α -Helix, es folgt die "Swiss Roll" aus 8 antiparallelen β -Faltblättern (β 1-8) und abschließend die α -Helices "B" und "C". Der Ligand, cGMP, ist in *syn*-Konformation gezeigt (gelb).

Abb. D13: Modell der Bindestelle des ROD aus unterschiedlicher Perspektive. Die Anordnung der antiparallelen β -Faltblätter der Bindetasche ist deutlicher zu erkennen.

Abb. D14: Modell der Bindestelle des ROD. Rechter Bildteil: Die Farbkodierung entspricht den Sekundärstrukturen des CAP, die Helices A - C sind mit Großbuchstaben, die β -Faltblätter (1-8) mit Zahlen bezeichnet. Linker Bildteil: Blau eingezeichnet sind die in Abs. 4.10 erwähnten geladenen Aminosäuren, die für Kontakte mit anderen Proteindomänen zur Verfügung stehen, unter ihnen auch das in cGMP-Bindestellen spezifisch konservierte K507. Geladene Aminosäuren, die nach dem Modell nahe genug beieinander liegen um Salzbrücken auszubilden, wurden rot gekennzeichnet. Das mit der Phosphatgruppe des cGMP wechselwirkende R559 (vgl. Abb. 4.22) wurde lila eingezeichnet.

Abb. D15: Ausschnitt aus dem Modell der Bindestelle des ROD. Es wurden die Seitenketten dargestellt, die potentiell mit dem Liganden wechselwirken. Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome dunkelblau, Kohlenstoffatome weiß und Phosphor gelb dargestellt. Die hellblauen

Atome geben das Rückgrat der nicht wechselwirkenden Aminosäuren wieder. Die gelb eingezeichneten Linien symbolisieren die Entfernungen möglicherweise miteinander wechselwirkender Protein- bzw. Ligandheteroatome (angegeben in Angström).



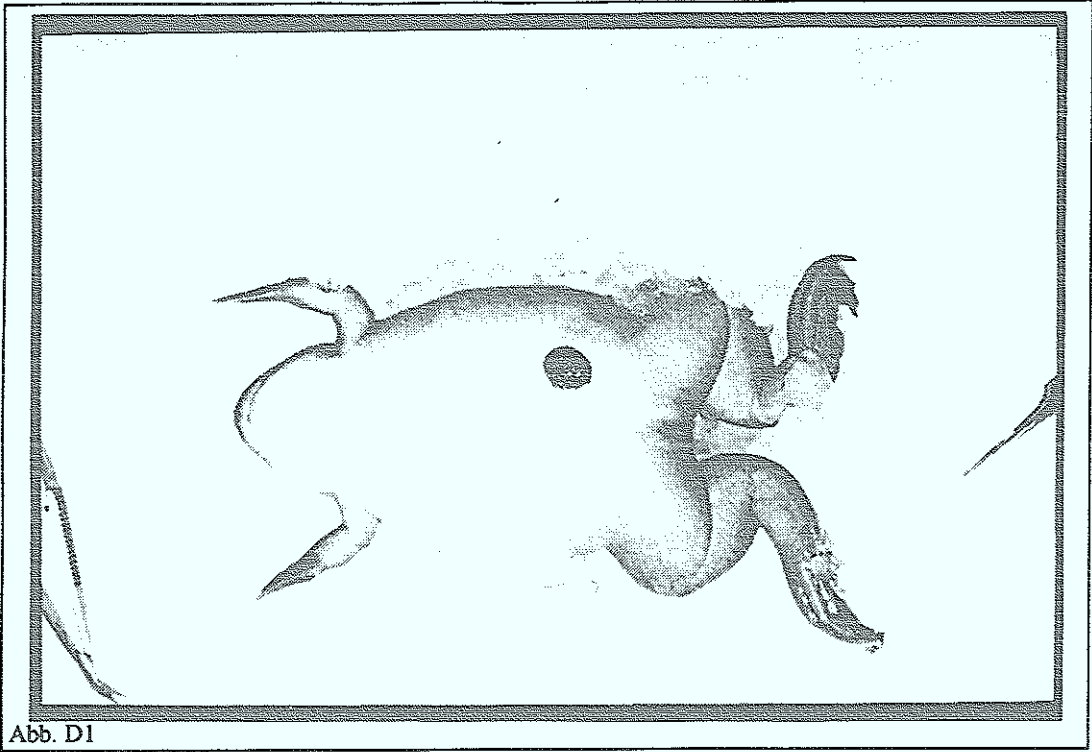
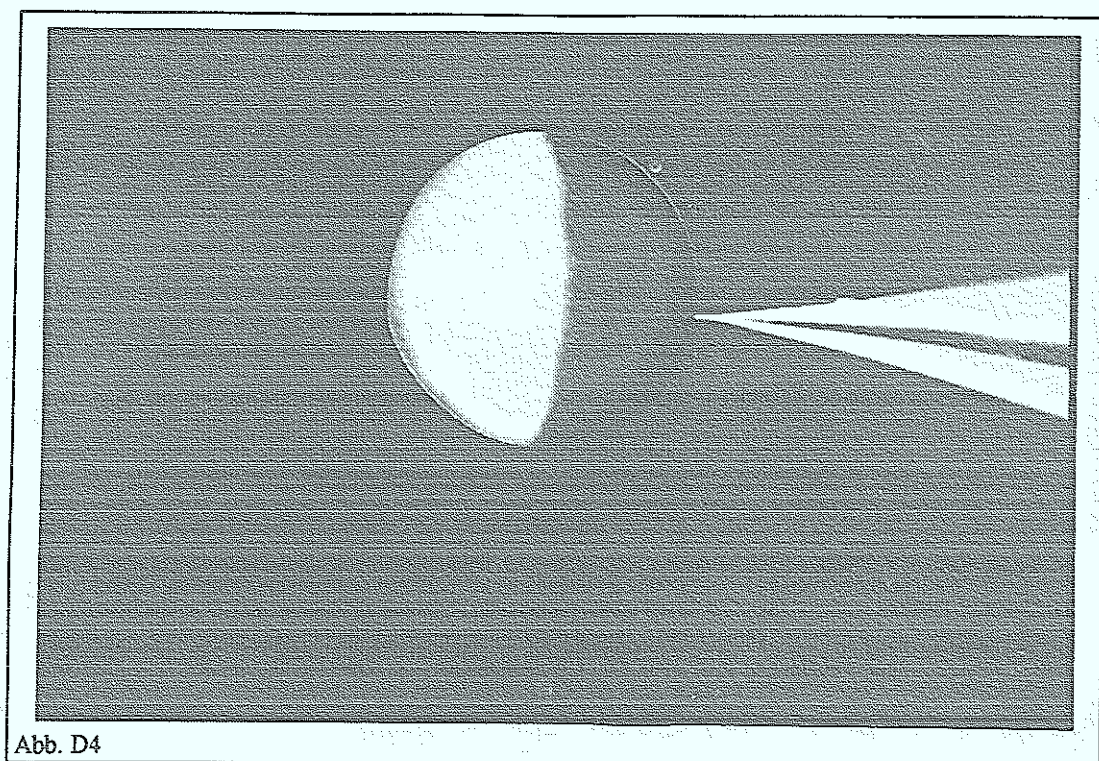
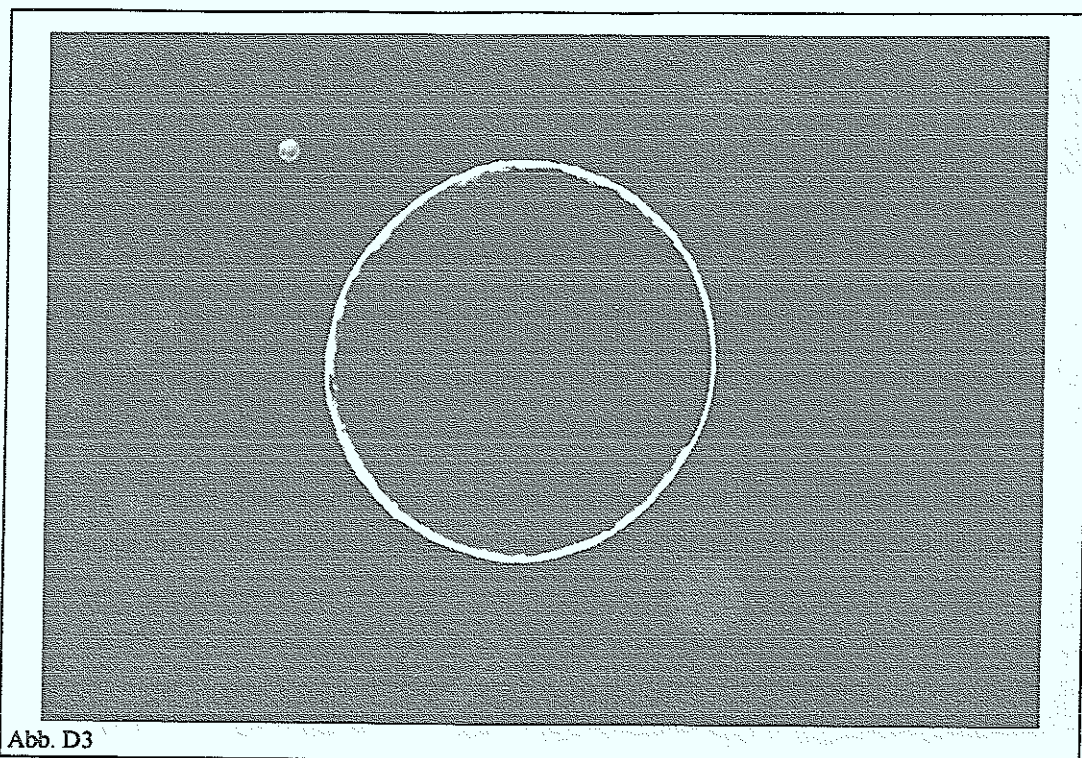
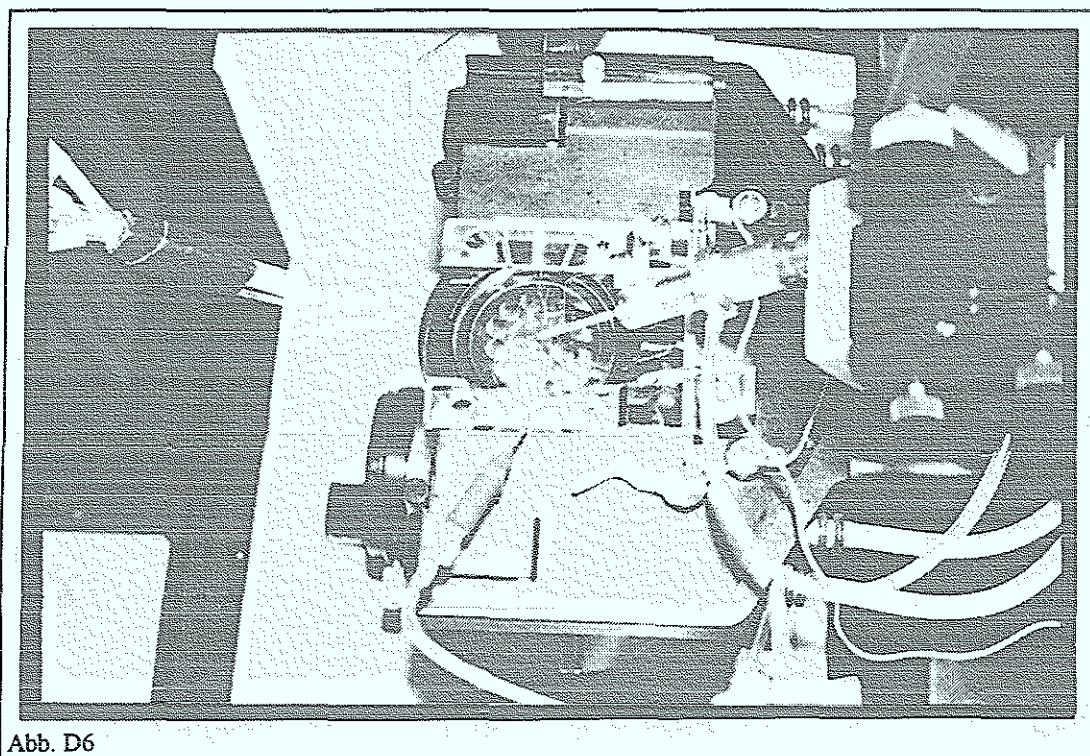


Abb. D1



Abb. D2





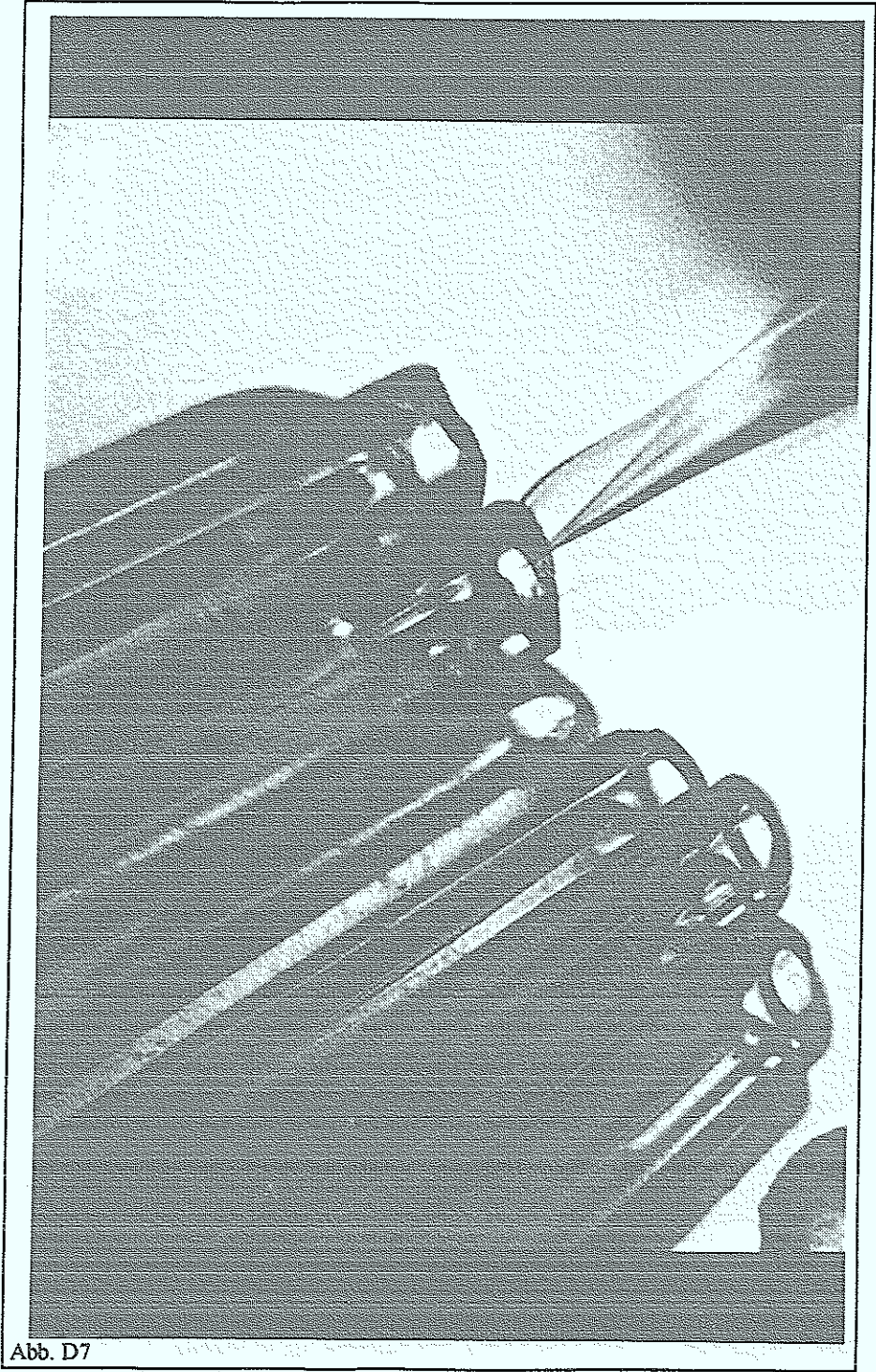
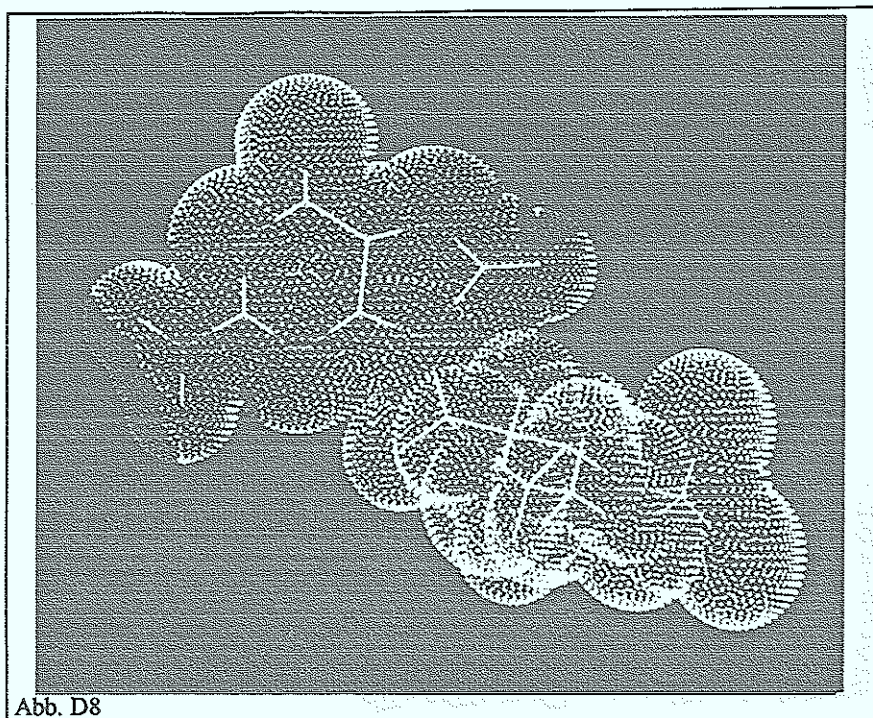
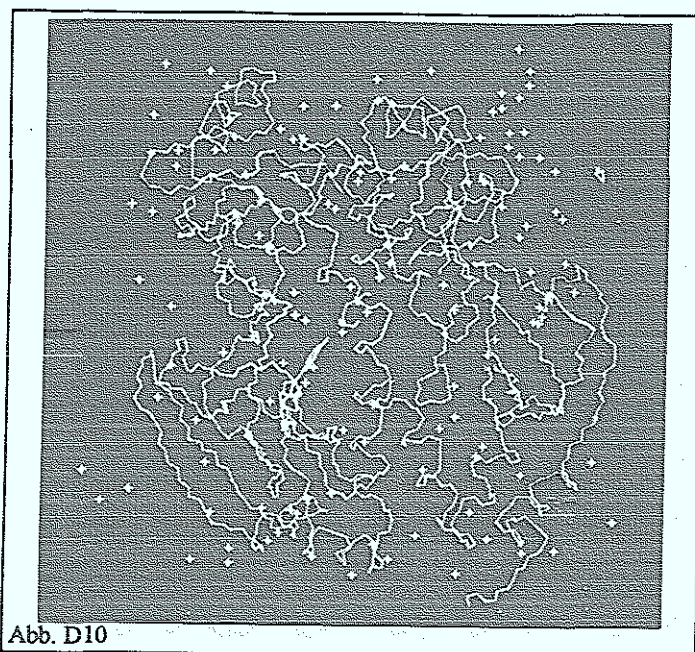
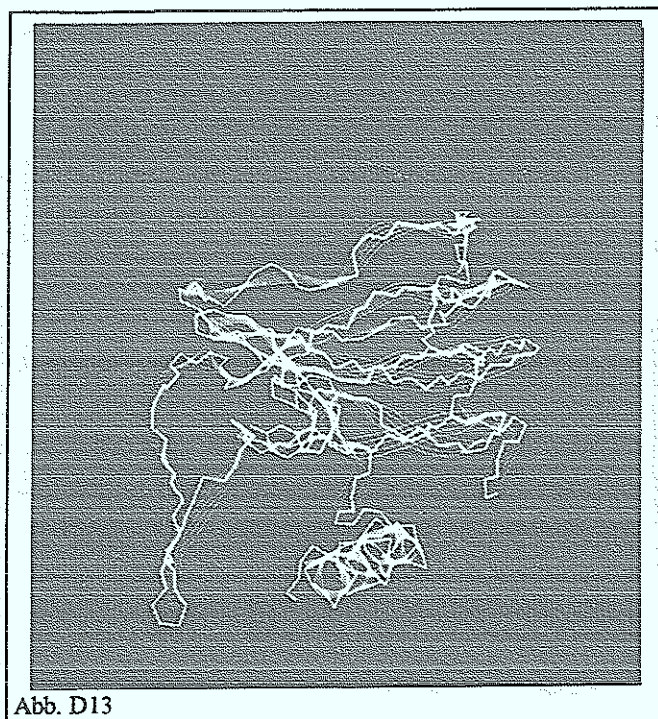
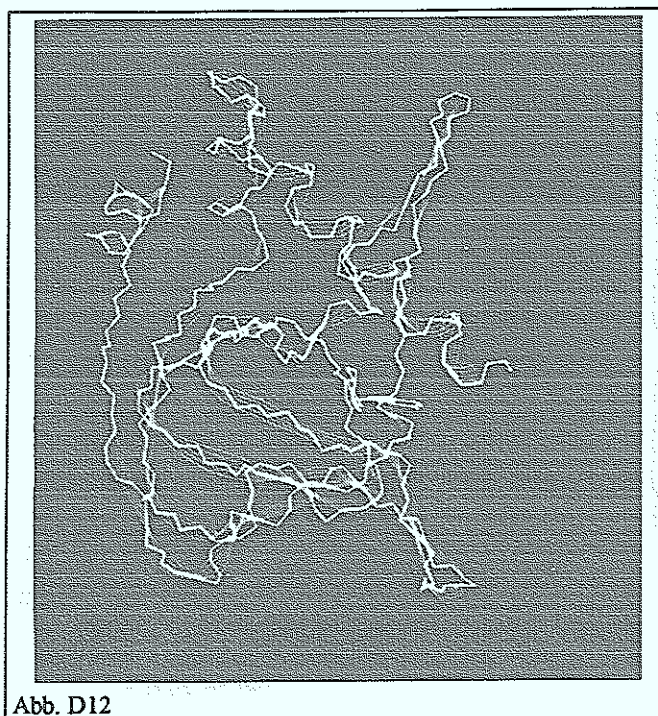
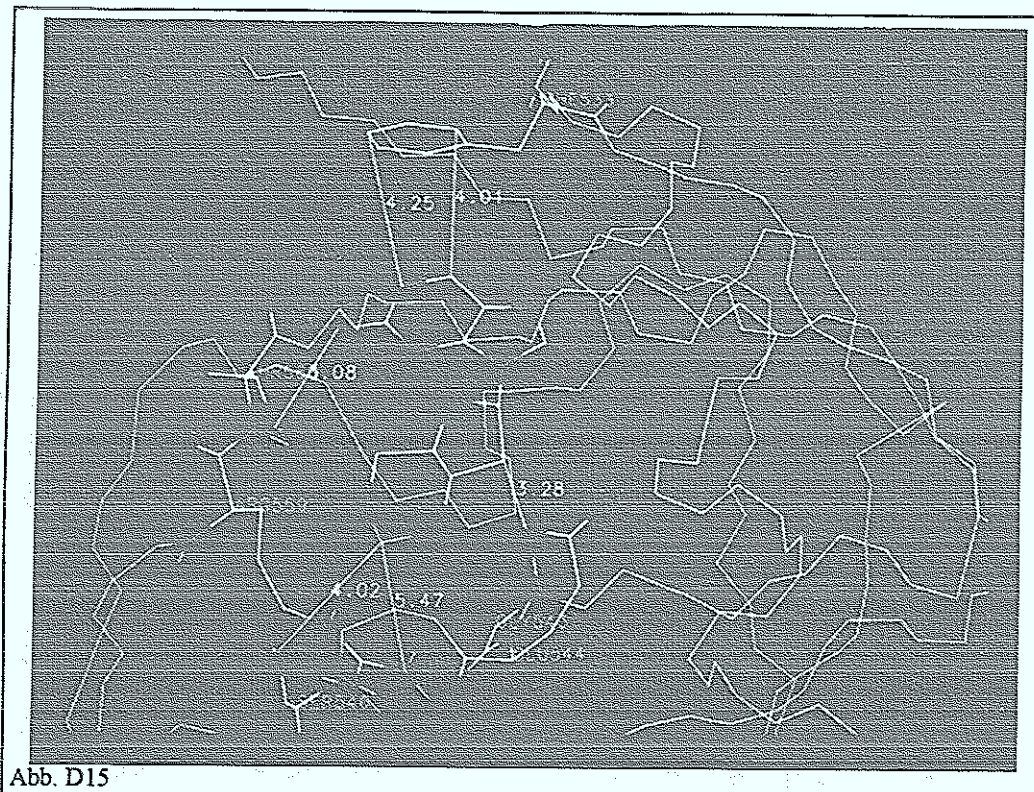
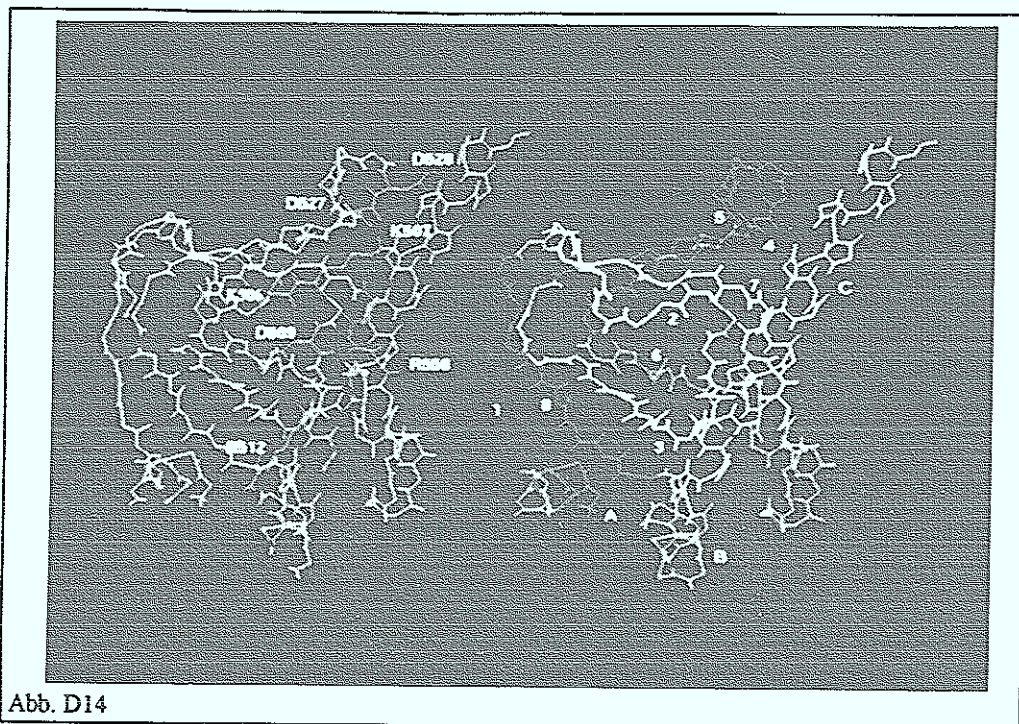


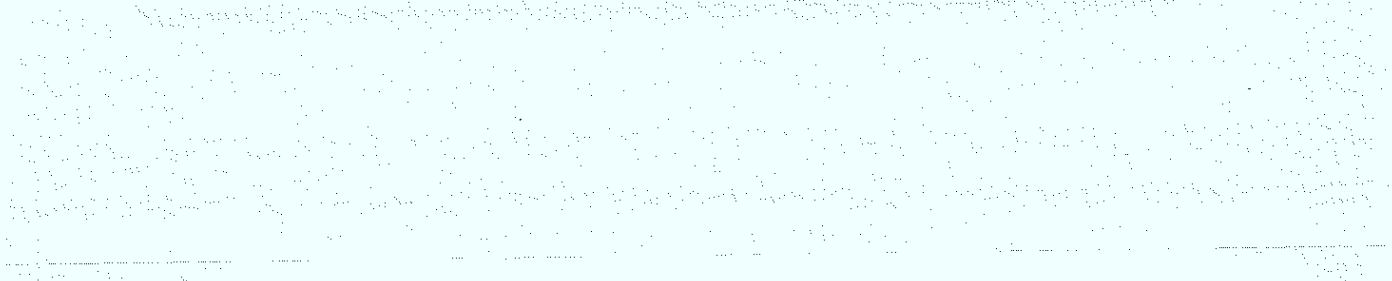
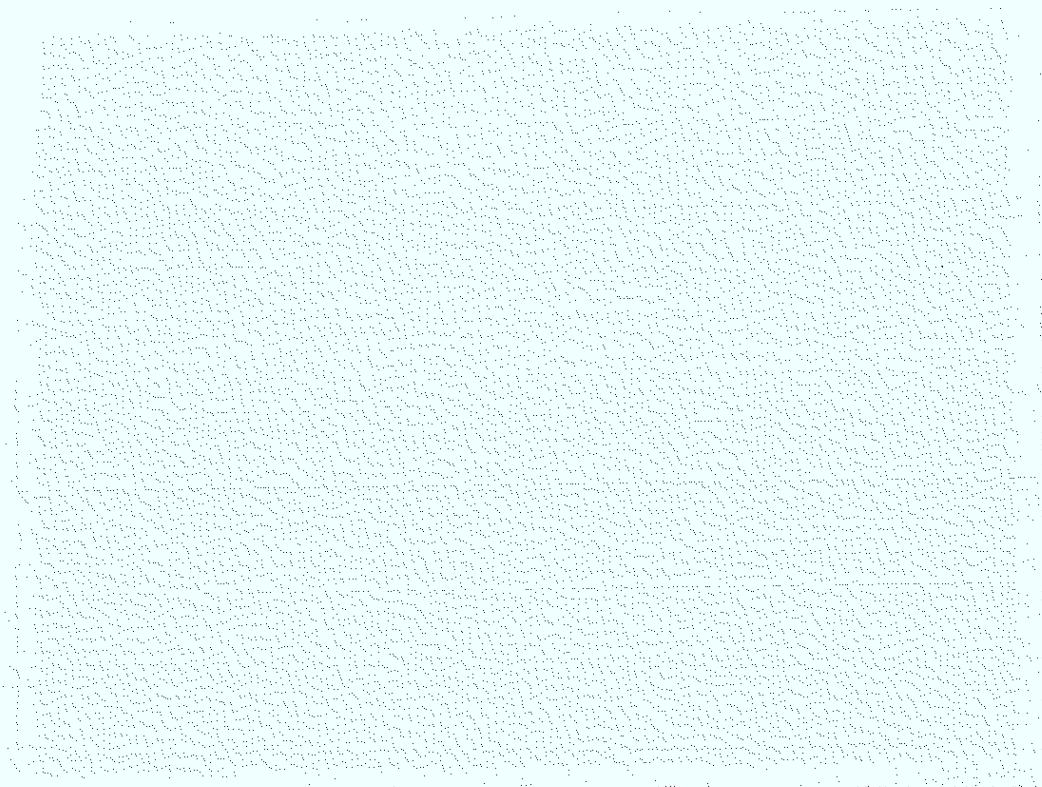
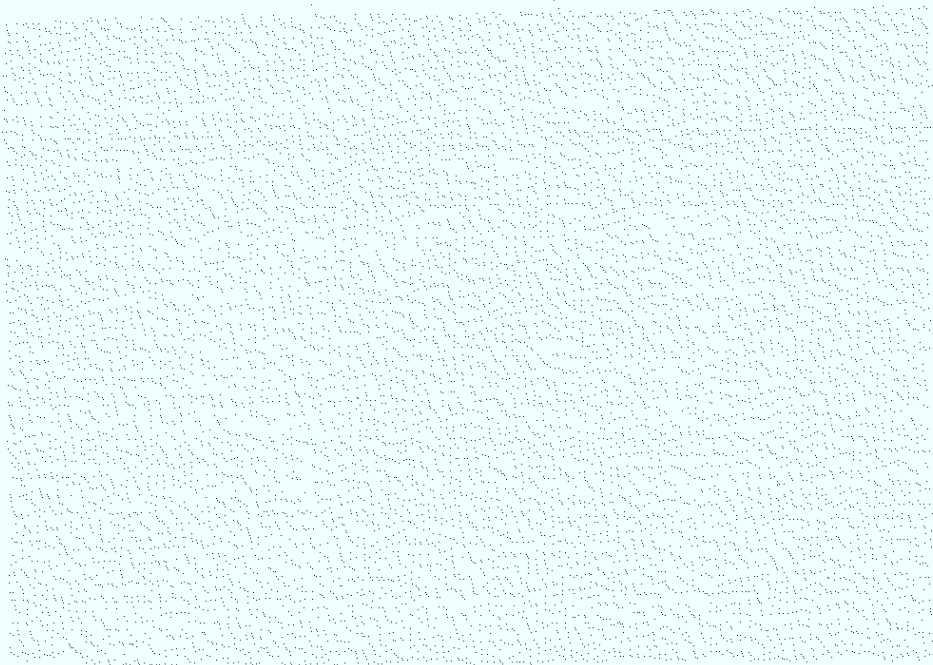
Abb. D7











TEILE DIESER ARBEIT WURDEN VERÖFFENTLICHT:

Ludwig, J., Altenhofen, W. & Kaupp, U.B. Primary Structure and Functional Expression of a AMP/cGMP-Gated Ionic Channel from Bovine Olfactory Epithelium. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* (1990) 371:1028

Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bönigk, W. & Kaupp, U.B. Control of Ligand Specificity in Cyclic Nucleotide-Gated Channels from Rod Photoreceptors and Olfactory Epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (1991) 88:9868-9872

Bönigk, W., Altenhofen, W. & Kaupp, U.B. Primary Structure and Functional Expression of cGMP-Gated Channels from Chicken Rod and Cone Photoreceptors. *Biophys.J.* (1992) 61:A514(Abstract)

Kaupp, U.B., Vingron, M., Altenhofen, W., Bönigk, W., Eismann, E. & Ludwig, J. (1992) Cyclic Nucleotide-gated Channels - A Family of Proteins Involved in Vertebrate Photoreception and Olfaction. In: *Signal Transduction in Photoreceptor Cells*. Hargrave, P. A., Hofmann, K. P. & Kaupp, U. B. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 195-213.

Kaupp, U.B. & Altenhofen, W. (1992) Cyclic Nucleotide-gated Channels of Vertebrate Photoreceptor Cells and Olfactory Epithelium. In: *Sensory Transduction*. Rockefeller University Press, pp. 134-150.

Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dose, A., Illing, M., Molday, R.S. & Kaupp, U.B. Rod and Cone Photoreceptor Cells Express Distinct Genes for Cyclic GMP-Gated Channels. *Neuron* (1993b) 10:865-877

Biel, M., Altenhofen, W., Hullin, R., Ludwig, J., Freichel, M., Flockerzi, V., Kaupp, U.B. & Hofmann, F. Primary Structure and Functional Expression of a Cyclic Nucleotide-Gated Channel from Rabbit Aorta. *FEBS* (1993) 329:134-138

Altenhofen, W. & Kaupp, U.B. (1993) Family of Cyclic Nucleotide-Gated Channels. In: *Molecular Mechanism of Generation of Electric Signals in Sensory Cells. Proceedings of the 18th Taniguchi International Symposium, Biophysics Division*. Tokunaga, F. (Hrsg.), The Taniguchi Foundation, Kyoto, pp. 159-173.

Ludwig, J., Altenhofen, W. & Kaupp, U.B. Allosteric Control of Ligand Sensitivity in Cyclic Nucleotide-Gated Channels. (in Vorbereitung)

Altenhofen, W., Erkens, H. & Kaupp, U.B. (1993) Efficient and Inexpensive Perfusion System Combined with Enhanced Online Graphic Analysis Features of Clampex (in Vorbereitung)

Wundersamer Kosmos Gehirn; Sendereihe der ARD, Atelier Koch, im Auftrag des Südwestfunks, voraussichtlicher Sendetermin Frühjahr 1994

1. The first part of the paper is devoted to a general discussion of the problem of the existence of solutions of the system of equations

which are satisfied by the functions u_i and v_i in the domain G of the plane. It is shown that the system has a solution if and only if the functions f_i and g_i satisfy certain conditions.

2. In the second part of the paper the problem of the uniqueness of the solution of the system of equations is considered. It is shown that the solution is unique if the functions f_i and g_i satisfy certain conditions.

3. In the third part of the paper the problem of the construction of the solution of the system of equations is considered. It is shown that the solution can be constructed by the method of successive approximations.

4. In the fourth part of the paper the problem of the stability of the solution of the system of equations is considered. It is shown that the solution is stable if the functions f_i and g_i satisfy certain conditions.

5. In the fifth part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the parameters is considered. It is shown that the solution depends continuously on the parameters.

6. In the sixth part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the boundary conditions is considered. It is shown that the solution depends continuously on the boundary conditions.

7. In the seventh part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the initial conditions is considered. It is shown that the solution depends continuously on the initial conditions.

8. In the eighth part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the coefficients is considered. It is shown that the solution depends continuously on the coefficients.

9. In the ninth part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the domain is considered. It is shown that the solution depends continuously on the domain.

10. In the tenth part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the boundary values is considered. It is shown that the solution depends continuously on the boundary values.

11. In the eleventh part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the initial values is considered. It is shown that the solution depends continuously on the initial values.

12. In the twelfth part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the coefficients is considered. It is shown that the solution depends continuously on the coefficients.

13. In the thirteenth part of the paper the problem of the dependence of the solution of the system of equations on the domain is considered. It is shown that the solution depends continuously on the domain.

DANKSAGUNGEN:

Mein Dank gilt meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben.

Herrn Professor Dr. U.B. Kaupp danke ich für die Überlassung des kompetitiven Themas, für die vielfältige und wohlwollende Unterstützung und Hilfestellung sowie für die Anregung, auf elektrophysiologischem Gebiet zu arbeiten.

Herrn Professor Dr. G. Folkers danke ich für seine bereitwillige und unbürokratische fachliche und persönliche Unterstützung, insbesondere für die Einführung in Theorie und Praxis der Protein-Sekundärstrukturvorhersage.

Herrn Prof. Dr. W. Stühmer (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) und Herrn Dr. H. Lühning (IBI, KFA) danke ich für die Einführung in die Patch-Clamp Technik und das *Xenopus* Expressionssystem, sowie Herrn Dr. H. Lühning für Hilfe beim Aufbau des Meßstandes.

Frau J. Schill und den Mitarbeitern des Arbeitskreises Folkers des Pharmazeutischen Instituts der ETH Zürich danke ich für vielfältige und selbstlose Unterstützung.

Herrn M. Godde danke ich für die anregende Zusammenarbeit und die Hilfe beim Reorganisieren meiner Literatur-Datenbank.

Dr. E. Eismann, Dr. W. Bönigk, Dr. J. Ludwig, sowie S. Köppen, P. Nacken, W. Kraus (IBI, KFA), und Dr. M. Biel (Physiologisches Institut, TU München) danke ich für das Bereitstellen von mRNA.

Den Mitarbeitern des IBI danke ich für die ereignisreiche Zeit. Insbesondere gilt mein Dank:

Herrn H. Erkens für die inspirierende Zusammenarbeit, das Einbringen von Ideen und Erfahrung im Entwurf und bei der Realisierung zahlreicher kleinerer und größerer Bestandteile des Meßstandes.

Herrn R. Esser, für die einfühlsame und aufopferungsvolle Pflege der Frösche in den letzten Jahren meiner Arbeit.

Herrn H.D. Grammig für Foto- und Elektroarbeiten.

Frau M. Bruns für die Hilfe beim Erstellen von Abbildungen und die Übernahme von Fotoarbeiten.

Der freundlichen Nachbarin, Frau A. Eckert, für die großzügige Verbreitung guter Laune sowie für die kalorische und psychische Unterstützung im Kampf gegen Dies und Das.

Den Praktikanten M. Godde, M. Zoche, W. Weber und W. Schwarzer danke ich für Hilfe bei den anfänglich manuellen Analysen der Spannungsabhängigkeit der Aktivierungsparameter, Herrn W. Weber ferner für die Implementierung des Levenberg-Marquard Algorithmus und meiner Schwester E. Altenhofen für Hilfe beim Ausdrucken der Daten des Anhangs C.

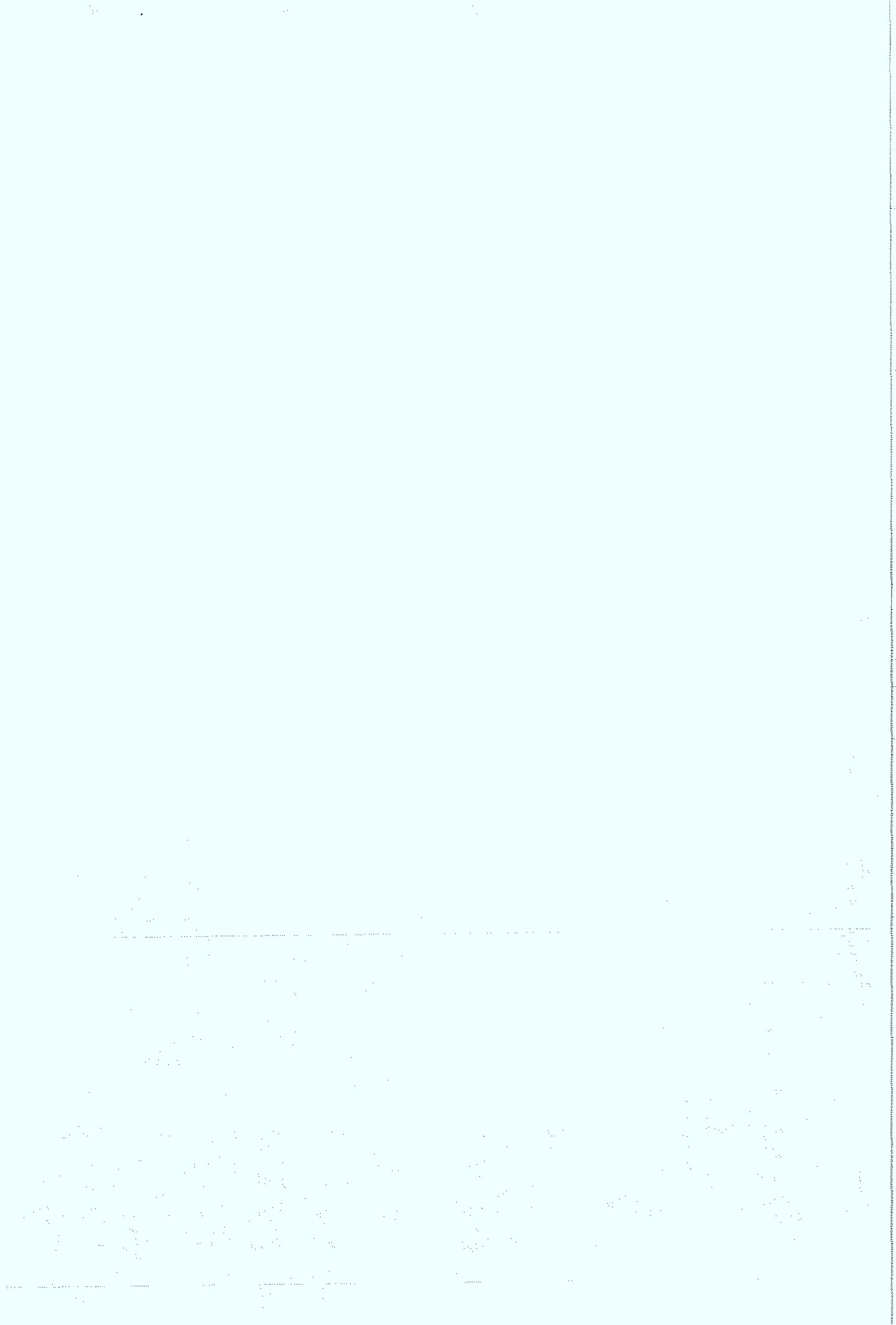
Herrn Dr. W. Schröder und Herrn H.D. Grammig für die Unterstützung durch die Einrichtung und Wartung des Instituts-Computernetzes.

Den Damen und Herren der Zentral-Bibliothek der KFA danke ich für die nicht unerschrockene, aber tatkräftige Hilfe beim Beschaffen von Literaturreferenzen.

Den Mitarbeitern des Zentralen Instituts für Angewandte Mathematik der KFA (ZAM) danke ich für die unbürokratische Bereitstellung von Rechenzeit auf Sun Workstations und der Cray.

Dem Forschungszentrum Jülich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit durch die Doktoranden-Förderung.

Handwritten text, mostly illegible due to extreme blurriness. The text appears to be organized into several paragraphs or sections, with some lines being more distinct than others. The handwriting is cursive and dense.



JÜL-2916

Mai 1994

ISSN 0944-2952