



Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung molekulare Strukturbiologie



Untersuchungen zur Ionen-Protein- Wechselwirkung im Porenprotein Omp32 aus *Delftia acidovorans*

Thomas Klühspies

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. A. Bausch

Die Dissertation wurde am 10.04.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 26.07.2006 angenommen.

„MAN LASSE SICH NICHT IRREFÜHREN: GROSSE GEISTER SIND SKEPTIKER. ZARATHUSTRA IST EIN SKEPTIKER. DIE STÄRKE, DIE FREIHEIT AUS DER KRAFT UND ÜBERKRAFT DES GEISTES BEWEIST SICH DURCH SKEPSIS. MENSCHEN DER ÜBERZEUGUNG KOMMEN FÜR ALLES GRUNDSÄTZLICHE VON WERTH UND UNWERTH GAR NICHT IN BETRACHT. ÜBERZEUGUNGEN SIND GEFÄNGNISSE.“

FRIEDRICH NIETZSCHE: DER ANTICHRIST [54]

... IN ERINNERUNG AN LEOPOLD KLÜHSPIES

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Baumeister für die Aufnahme in seine Abteilung und die Möglichkeit, diese Arbeit unter den hervorragenden Bedingungen des Max-Planck-Institutes fertig stellen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Harald Engelhardt für die interessante Aufgabenstellung und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Sein breiter Wissensschatz, sein sanftes Wesen sowie seine ehrliche Menschlichkeit werden mir immer Vorbild sein.

Weiter möchte ich mich herzlich bei den Kollegen meiner Arbeitsgruppe, Herrn Johann „Jan“ Lubieniecki, Herrn Dr. Erik „Vulture“ Roth und Herrn Dr. Ulrich Zachariae bedanken. Vielen Dank für Euerer Hilfe im Labor und den Einblick in Euerer Fachgebiete, welcher dem „dummen“ Physiker erst klar gemacht hat, welche Tiefe in den anderen naturwissenschaftlichen Disziplinen steckt. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir immer sehr viel Freude bereitet.

Bei Herrn Dr. Reinhard „Guckus“ Guckenberger und Dr. Jens Schiener möchte ich mich bedanken für die freundliche Einweisung und den Einblick in die AFM-Technologie.

Bei Frau Dr. Sharmila De möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die interessanten Einblicke in die Kultur ihres Landes bedanken.

Herrn Dr. Reiner Wahl gilt mein Dank für die ersten Unterweisungen in die Biomineralisationsexperimente.

Bei Herrn Dipl. Biochem. Gregor Madej bedanke ich mich für seine kreativen Ideen auf dem Gebiet der Biochemie und seine tollen Schnurren, welche den Laboralltag bunter gemacht haben.

Bei Frau Dipl. Phys. (Univ.) Christine Kofler möchte ich mich für die vielen Spaziergänge im Bannwald bedanken. Die persönlichen Gespräche mit ihr haben mir viel gegeben.

Bei Dr. Friedrich Förster und Florian Beck möchte ich für die eiserne Bergkameradschaft bei unseren nächtlichen Klettertouren bedanken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei dem Team der Werkstatt bedanken. Ohne das tägliche Werk von Herrn Rudolf Gatz, Herrn Thomas Matthes-Rösler und Herrn Manfred Baumgartner blieben viele wissenschaftliche Ideen nur graue Theorie.

Bei Frau Dr. Susanne Witt, Frau Dr. Alexandra Gerega und Frau Dr. Karin Felderer bedanke ich mich für die netten Gespräche und dafür, dass sie es immer „menscheln“ haben lassen.

Meinem Mitbewohner Lukas Dammer danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und dafür, dass er mich während des ganzen Weges begleitet und ertragen hat.

Meiner Lebensgefährtin Angie Fuchs möchte ich danken, dass sie mich unterstützt und immer wieder sanft in den Hintern getreten hat.

Ohne meine Eltern, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke.

Meiner Tochter Janis Tänzer möchte ich für ihre Geduld danken, und mich dafür entschuldigen, dass ich gerade in den letzten Wochen zu wenig Zeit für ihre Belange hatte.

Abschließend möchte ich mich bei allen und auch bei allen ehemaligen „Baumeisters“, welche ich hier nicht namentlich aufzählen kann, bedanken. Euch und die Erinnerung an unsere gemeinsame Zeit trage ich im Herzen.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	13
2 Abkürzungsverzeichnis.....	15
3 Einleitung.....	16
4 Leitfähigkeitsexperimente.....	21
4.1 Einleitung	21
4.2 Methoden und Material.....	26
4.2.1 Leitfähigkeitsmessungen.....	26
4.2.2 Instrumente	38
4.2.3 Chemikalien.....	42
4.3 Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessungen	43
4.3.1 Messungen am Wildtyp-Protein.....	43
4.3.2 Messungen am rekombinanten Wildtyp von Omp32	47
4.3.3 Messungen an den Omp32-Mutanten	57
5 Simulationsrechnungen zur Schließkinetik.....	61
5.1 Einleitung	61
5.2 Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung.....	65
5.3 Der Simulationsalgorithmus	67

5.4	Bestimmung der Wechselwirkungs-Wahrscheinlichkeiten.....	69
5.5	Resultate der Simulationsberechnungen	70
5.5.1	Omp34.....	70
5.5.2	Rekombinantes Omp32.....	75
6	Biomineralisationsexperimente an Omp32.....	86
6.1	Herstellung der 2D-Kristalle.....	86
6.1.1	Einleitung.....	86
6.1.2	Methoden und Materialien.....	89
6.1.3	Die Bestimmung des geeigneten Lipid-zu-Proteinverhältnisses für die 2D-Kristallisation.....	90
6.2	Biomineralisation der planaren Proteinkristalle.....	94
6.3	Auswertung der Biomинeralisationsexperimente.....	100
6.3.1	Untersuchungen mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie	100
6.3.2	Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM)	102
6.4	Ergebnisse der Biomинeralisationsexperimente.....	105
7	Diskussion	116
7.1	Diskussion der Resultate der Leitfähigkeitsmessungen.....	116
7.2	Diskussion der Resultate der Simulationsrechnungen.....	121
7.3	Diskussion der Resultate der Biomинeralisationsexperimente.....	128
8	Anhang.....	137

8.1	Progamcode zur Simulation der Schließkinetik.....	137
9	Literaturverzeichnis	148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Porinunterklassen).....	20
Abbildung 2 (Omp32).....	22
Abbildung 3 (Ladungscluster).....	24
Abbildung 4 (Messgefäß).....	32
Abbildung 5 (Elektrode).....	34
Abbildung 6 (Messaufbau).....	36
Abbildung 7 (Messkammer).....	39
Abbildung 8 (Einbau Omp32).....	44
Abbildung 9 (Einbau WT Omp32).....	45
Abbildung 10 (Tabelle 1).....	47
Abbildung 11 (Einbau Omp32).....	48
Abbildung 12 (Detailausschnitt).....	49
Abbildung 13 (Stufenhistogramm).....	50
Abbildung 14 (Tabelle 2).....	50
Abbildung 15 (Histogramme Malat).....	52
Abbildung 16 (Leitfähigkeit (Malat)).....	53
Abbildung 17 (Leitfähigkeit (NaCl)).....	55
Abbildung 18 (Stufenhöhen).....	56
Abbildung 19 (Einbau Q1).....	57

Abbildung 20	(Einbau Q4)	59
Abbildung 21	(Schließkinetik Q4)	60
Abbildung 22	(Schließkinetik Omp32)	61
Abbildung 23	(2D-Kristall Omp34)	66
Abbildung 24	(Schließkinetik Omp34)	71
Abbildung 25	(Simulation pos. Spannung)	72
Abbildung 26	(Simulation neg. Spannung)	73
Abbildung 27	(WW-Parameter)	74
Abbildung 28	(Schließkinetik Omp32)	76
Abbildung 29	(Simulation pos. Spannung)	78
Abbildung 30	(Simulation neg. Spannung)	80
Abbildung 31	(Simulationen)	82
Abbildung 32	(WW-Parameter)	83
Abbildung 33	(Schlauchkristall)	91
Abbildung 34	(2D-Kristall)	92
Abbildung 35	(Kristallaufbau)	93
Abbildung 36	(Mineralisierter Kristall)	96
Abbildung 37	(Vorrichtung)	98
Abbildung 38	(AFM-Aufnahme)	105
Abbildung 39	(Mineralisierter Kristall)	106
Abbildung 40	(Symmetriegruppe)	107

Abbildung 41 (AFM-Aufnahme)	109
Abbildung 42 (Trimer).....	110
Abbildung 43 (Klassenanalyse 1).....	112
Abbildung 44 (Klassenanalyse 2).....	114
Abbildung 45 (Leitfähigkeiten).....	117
Abbildung 46 (Ladungsverteilung).....	129
Abbildung 47 (Ladungen im Trimer)	132

1 Zusammenfassung

Ionenkanäle sind wichtige Bestandteile der Membranen lebender Zellen bzw. Organismen. Durch diese Kanäle können lebende Zellen lösliche Stoffe mit ihrer Umwelt austauschen. In Gram-negativen Bakterien durchspannen Porine als Ionenkanäle die äußere Membran dieser Organismen. Ein Vertreter dieser Porine ist Omp32 aus *Deiftia acidovorans*. Dieses Porin eignet sich, aufgrund seiner gelösten atomaren Struktur, als Modellsystem zum Studium des transmembranen Transports. Ziel dieser Arbeit war es, einen tieferen Einblick in die Ionen-Protein-Wechselwirkung in Ionenkanälen, anhand dieses Modellsystems, zu gewinnen. Dazu wurden verschiedene Ansätze verfolgt:

1. Es wurden Leitfähigkeitsmessungen an Omp32 sowie an drei speziellen Mutanten in planaren Membranen durchgeführt,
2. weiter wurden Simulationsrechnungen, zur Klärung des Phänomens des spannungsabhängigen Schließens von Porinen, angestellt und
3. Biomineralisationsexperimente an 2D-Kristallen von Omp32 durchgeführt, um weitere Erkenntnisse zur Ionen-Protein-Wechselwirkung zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit lassen sich die folgenden Ergebnisse feststellen:

- Das rekombinant hergestellte Omp32 und seine speziellen Mutationen zeigen ein porintypisches Verhalten.

- Die durch molekular-dynamische Simulationsrechnungen gefundene Bindungsstelle für Malationen, im Bereich der Konstriktionszone von Omp32, konnte in Leitfähigkeitsmessungen bestätigt werden.
- Der Vorgang des spannungsabhängigen Schließens beruht auf einer Vielzahl von Einzelereignissen.
- Das Modell der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung ist geeignet das spannungsabhängige Schließverhalten der Porine zu beschreiben.
- Die Ergebnisse der Biomineralisationsexperimente zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen geladenen Aminosäureresten des Porins und dem Auftreten einer Metallabscheidung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen werden am Ende der Arbeit einer kritischen Bewertung unterzogen.

2 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic force microscopy
DphPC	Diphytanoylphosphatidylcholin
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
CMC	critical micell concentration
UV	ultra-violett (Licht)
STM	scanning tunnel microscopy

3 Einleitung

Gram-negative Bakterien besitzen eine äußere und eine innere Zellmembran die den periplasmatischen Raum definieren und das Peptidoglykan, die rigide Komponente der Zellhülle, einschließen. Jeglicher Austausch von Stoffwechselprodukten des Organismus muss über diese Membranen erfolgen. Während die innere Membran aus symmetrisch verteilten Phospholipiden besteht und vornehmlich Enzyme und Transportproteine enthält, weist die äußere Membran neben asymmetrisch angeordneten Phospholipiden auch Lipopolysaccharide auf, die die äußere Lipidschicht bilden (Hancock et al., 1994)¹. In der äußeren Membran befindet sich eine große Anzahl von Membranproteinen (Benz et al., 1985)². Darunter sind Rezeptorproteine, aktive und passive Transporter und Komponenten von Proteinkomplexen. Ihr Anteil an der äußeren Membran addiert sich auf ca. 50 Massenprozent. Die äußere Membran ist durch Proteine an der Peptidoglykanschicht befestigt. Beispiele für diese spezialisierten Verbindungsproteine sind das Braun'sche Lipoprotein der Enterobakterien und das Protein Omp α von *Thermotoga maritima*. Die äußere Membran schützt den Organismus durch Selektion auf molekularer Ebene vor dem unerwünschten Eintrag von externen zellschädigenden Substanzen (Nikaido et al., 1985).³

Die membrandurchspannende Abschnitte der Proteine der inneren Membran bestehen aus α -Helices wie z.B. der K^+ -Kanal. Im Gegensatz dazu sind die membrandurchspannenden Proteine der äußeren Membran aus β -Strängen aufgebaut, welche in sich geschlossene, antiparallele β -Faltblätter, sogenannte

β -Barrels bilden. Wobei das β -Barrel eigentlich ein in sich geschlossenes β -Faltblatt darstellt. Die β -Stränge sind bezüglich der Membranebene geneigt, wobei der Grad der Neigung durch den sogenannten „shear factor“ beschrieben wird (D. Marsh, 2000)⁴. Die Außenseite des β -Barrels ist in den Bereichen des Membrankontaktes mit stark hydrophoben Aminosäureresten ausgestattet, die in Wechselwirkung mit den Fettsäureketten der Lipide das Protein in die Membran halten und stabilisieren.

β -barrelartige Proteine existieren in wasserlöslicher und hydrophober, vulgo membranständiger Form. Die wasserlöslichen Vertreter haben dabei zwischen ein und acht β -Stränge. Beispiele sind Metalloproteasen (U. Baumann et al., 1993)⁵ oder Streptavidin (W. Hendrickson et al., 1989)⁶. Die Gruppe der membranständigen Proteine spaltet sich in weitere Untergruppen auf, deren Unterteilung gemäß der Anzahl der β -Stränge vorgenommen wird. Interessanterweise korreliert in einigen Fällen auch die Funktionen einiger Vertreter der jeweiligen Untergruppen, entsprechend der Anzahl von β -Strängen. Bisher werden diese Untergruppen in Proteine mit 8, 10, 12, 16, 18 oder 22 β -Strängen eingeteilt.

OmpA und OmpX aus *E. coli* gehören zur Untergruppe der membranständigen Proteine mit 8 β -Strängen. Vertreter dieser Gruppe üben offenbar verschiedene Funktionen aus, zumindest konnte bisher keine einheitliche Funktion nachgewiesen werden, obwohl sie eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen (C. Baldermann et al., 1998)⁷. Die Mitglieder dieser Gruppe zeichnen sich durch die Ausbildung eines sehr kleinen Kanals aus, welcher im Falle von OmpA nicht

durchgängig zu sein scheint und dessen physiologische Bedeutung ungeklärt ist (A. Arora et al., 2000).⁸

Bei der Untergruppe von β -Barrelproteinen mit 10 oder 12 β -Strängen handelt es sich beispielsweise um membranständige Enzyme wie OmpT (L. Vandeputte-Rutten et al., 2001)⁹ oder OmpLA, eine Protease bzw. Phospholipase (H. J. Snijder et al., 1999)¹⁰. Ein kombiniertes Kanal- und Tunnelprotein ist TolC (V. Koronakis et al., 2000),¹¹ welches aus drei gleichen Untereinheiten besteht, einen β -Barrel mit einem α -helikalen Kanal durch die Membran bildet und zum Export von Proteinen und anderen Molekülen aus dem Organismus dient.

Die Vertreter der Untergruppe mit 16 β -Strängen sind die Porine. Das Porin aus *Rhodobacter capsulatus* (M. S. Weiss et al., 1990)¹² war das Erste der membranständigen β -Barrelproteine, dessen atomare Struktur gelöst wurde (M. S. Weiss et al., 1992).¹³ Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist OmpF aus *E. coli*, dessen Eigenschaften bereits sehr gut untersucht sind (R.M. Garavito et al., 1980)¹⁴, (R. Koebnik et al., 2000).¹⁵ Auch das im Zentrum dieser Arbeit stehende Omp32 aus *Delftia acidovorans* gehört dieser Untergruppe an, deren Mitglieder für den passiven Transport von löslichen Molekülen bis zu einer Größe von ca. 600 Da verantwortlich sind. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Regel als stabile Trimere auftreten und keine spezifischen Bindungsstellen für Moleküle besitzen. Diese Untergruppe wird auch als die Gruppe der unspezifischen oder allgemeinen Diffusions-Porine bezeichnet.

Im Gegensatz dazu rechnet man die trimeren Porine mit 18 β -Strängen zu den spezifischen Porenproteinen. Vertreter dieser Gruppe sind das Maltoseporin LamB (T. Schirmer et al., 1993)¹⁶, (T. Schirmer et al., 1995)¹⁷ sowie das Sucroseporin ScrY (D. Forst et al., 1998)¹⁸, (J. E. W. Meyer et al., 1997a).¹⁹ Der Kanal dieser Porine zeigt stark spezialisierte Strukturen, wobei der spezifische Transport der Zuckermoleküle von einigen ausgezeichneten Aminosäuren abhängt (D. Ulmke et al., 1999)²⁰. Unter anderem mittels Simulationsrechnungen (J. E. W. Meyer et al., 1997b)²¹, (T. Schirmer et al., 1999)²² konnte gezeigt werden, dass der Transport der Moleküle innerhalb des dabei schrittweise von Bindungsstelle zu Bindungsstelle erfolgt. Ein Konzept, welches gleichzeitig eine hohe Spezifität bewirkt.

Vertreter der letzten Untergruppe mit 22 β -Strängen sind die Eisentransportproteine wie FhuA (K. P. Locher et al., 1997)²³, FepA (S. K. Buchanan et al., 1999)²⁴ und FecA (V. Braun et al., 2002)²⁵. Diese Vertreter sind ausschließlich aktive Transportproteine und bilden keine offenen Kanäle wie die trimeren Porine.

In Abbildung 1 sind typischen Vertreter der einzelnen Gruppen dargestellt und deren wichtigste Eigenschaften kurz zusammengefasst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vornehmlich die elektrostatischen Ionen-Protein-Wechselwirkungseigenschaften des Porins Omp32, aus dem Bakterium *Delftia acidovorans* (S. Gerbl-Rieger et al., 1992)²⁶ untersucht. Omp32 ist ein Vertreter der Untergruppe der membranständigen Proteine mit 16 β -Strängen

und wird nominell zu den unspezifischen Porinen gerechnet. Omp32 besteht aus 322 Aminosäuren und hat eine Masse von 34,8 kDa.

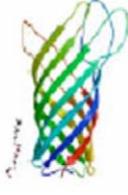
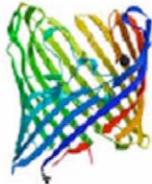
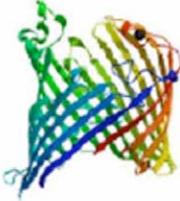
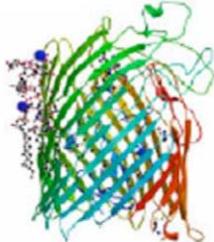
			
OmpA	Omp32	ScrY	FhuA
Anzahl β-Stränge:			
8	16	18	22
Durchmesser β-barrel:			
1,5 x 1,8 nm	2,8 x 3,3 nm	2,5 x 3,6 nm	3,6 x 4,7 nm
Funktion:			
Stabilität	Nährstoffaufnahme (unspezifisch)	Nährstoffaufnahme (spezifisch)	Eisenaufnahme

Abbildung 1

(Porinunterklassen)

Abbildung 1 zeigt Vertreter der unterschiedlichen Porinunterklassen und deren Eigenschaften. Die Angabe des Durchmessers bezieht sich dabei auf die minimalen Abstände gegenüberliegender C_{α} -Atome des porenbildenden Barrels. Die Abbildung wurde aus (K. Zeth et al., 2000)³⁰ entnommen.

Allerdings besitzt Omp32 die größte bekannte Anionenselektivität aller Porine (Mathes 2000)⁵¹ und hat im Gegensatz zu OmpF (P. S. Phale et al., 1998)²⁷, (K.M. Robertson et al., 2002)²⁸ eine extrem stark geladene Engstelle, welche mit 25 Å² den kleinsten Querschnitt unter den unspezifischen Porinen aufweist. Die hohe Ladungsdichte im Bereich der Engstelle von Omp32 hat eine starke Wechselwirkung zwischen dem Porin und den Ionen zur Folge, welche durch

den Kanal transportiert werden und auch die hohe Anionselektivität erklärt. Erste elektrophysiologische Messungen haben gezeigt, dass die Leitfähigkeit des Proteins einen nicht linearen Verlauf aufweist, was ebenfalls auf Ionen-Aminosäuren-Wechselwirkungen zurückschließen lässt. Aus neueren molekulardynamischen Untersuchungen (U. Zachariae et al., 2002)²⁹ wurde ersichtlich, dass nur einzelne Ionen die Engstelle passieren können und die Dynamik der Aminosäurereste eine bedeutende Rolle spielt.

Die Struktur des Proteins wurde mit einer Auflösung von 2,1 Å gelöst (K. Zeth et al., 2000)³⁰. Diese Strukturdaten bilden die wichtigste Grundlage für die weiteren Untersuchungen an Omp32. Die zugrundeliegende Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, weitere experimentelle Befunde zur Ionen-Protein-Wechselwirkung zu untersuchen und diese in Zusammenhang mit den bekannten Strukturdaten zu setzen.

4 Leitfähigkeitsexperimente

4.1 Einleitung

Das Porin Omp32 stellt, wegen seiner strukturellen Besonderheiten und der Übersichtlichkeit der elektrostatischen Eigenschaften, ein interessantes Objekt zur Erforschung der Funktionsweise von Proteinkanälen der äußeren Membran dar.

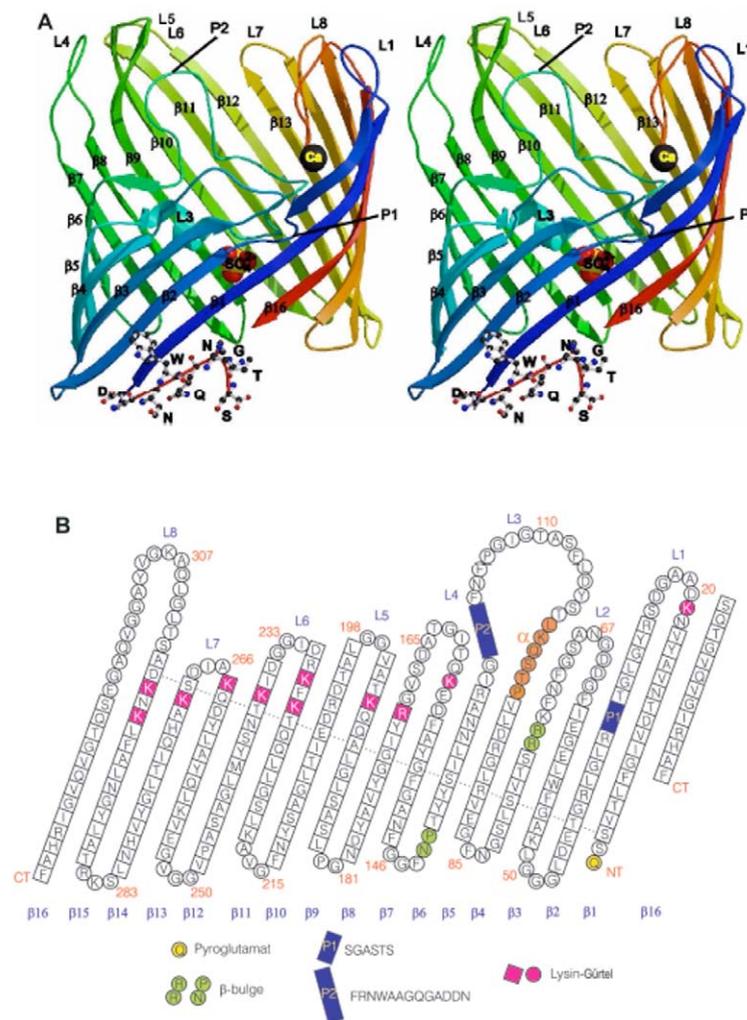


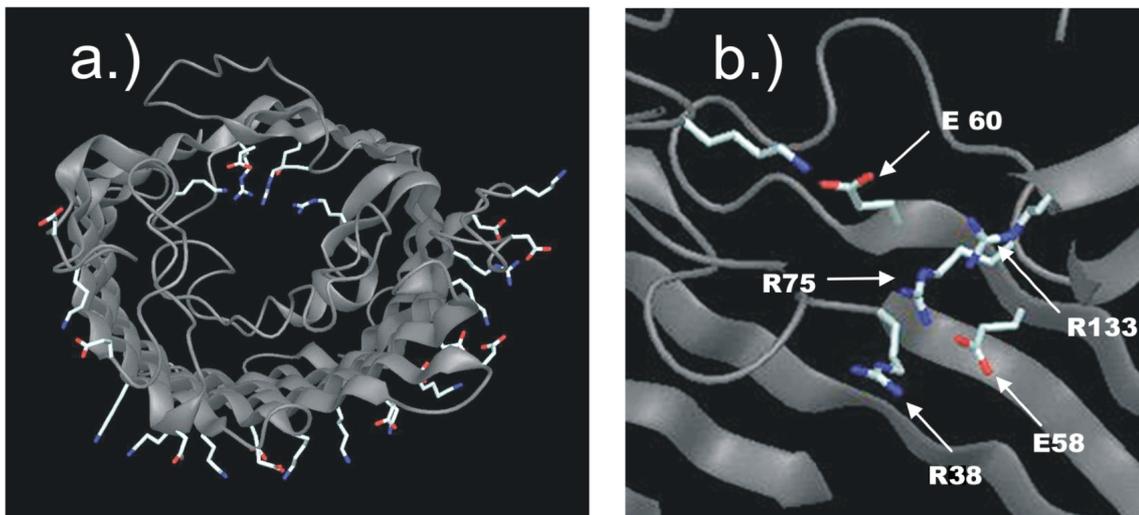
Abbildung 2

(Omp32)

zeigt im Bildteil (A) ein Stereobild von Omp32. Die Struktur von Omp32 besteht aus einem β -Barrel mit 16 β -Strängen (β_1 - β_{16}) und 8 extrazellulären Loops. In dieser Darstellung ist der erste β -Strang des N-Terminus in blauer Farbe dargestellt. Mit P1 ist eine Ausstülpung des Strangs β_2 gekennzeichnet, welcher in das Innere des Kanals hineinragt. Bildteil (B) zeigt die Aminosäuresequenz und das Faltungsmodell von Omp32. Die Abbildung wurde aus (Zeth et al., 2000)³⁰ entnommen.

Omp32 besitzt eine besonders enge Konstriktionsstelle innerhalb des aus dem β -Barrel gebildeten Kanals. Verantwortlich für die Formierung dieser Engstelle

sind Protein-Loops, welche in das Kanalinnere hineinragen. Dabei ist nicht nur der bei allen Porinen beteiligte Loop 3 von Bedeutung, sondern zusätzlich Loop 8 und eine Ausstülpung des β -Stranges 2, die nur bei Omp32 zur Porendefinition beitragen (K. Zeth et al., 2000).³⁰ Die Geometrie des Kanals mit seiner Engstelle, in Zusammenhang mit Seitenketten der Aminosäuren, welche in das Kanalinnere hineinragen, ist im Wesentlichen für die funktionellen Eigenschaften des Transports verantwortlich. Insbesondere die Aminosäurereste im Bereich der sogenannten Konstriktionszone sind dabei von großer Bedeutung, da sie die elektrostatischen Eigenschaften des Kanals von Omp32 bestimmen. Die Anion- oder Kationselektivität von Porinen wird der Ladungsverteilung im Kanalinneren zugeschrieben (P. S. Phale et al., 2001).³¹ Speziell ein Arginincluster (U. Zachariae et al., 2002)²⁹, der ein gemeinsames Merkmal aller unspezifischen Porine ist, bestimmt mit weiteren positiv geladenen Aminosäureresten im Kanal die elektrostatische Ladungssituation im Bereich der Konstriktionszone von Omp32. Im Gegensatz zu anderen Porinen (S. W. Cowan et al., 1992)³² befinden sich keine gegensätzlich geladenen Reste im Kanal. Dies hat zur Folge, dass das elektrostatische Feld der Pore stark positiv ist.

**Abbildung 3****(Ladungscluster)**

zeigt im Bildteil a.) die Aufsicht auf eine „space-ribbon“-Darstellung von Omp32. Dabei wurde eine Auswahl von geladenen Seitenketten hervorgehoben. Bildteil b.) zeigt in einer Ausschnittsvergrößerung die Seitenansicht der Konstriktionszone mit dem Arginincluster.

In Abbildung 3 ist dieser Arginincluster und seine Lokalisation innerhalb des Kanals dargestellt. In der Aufsicht von Abbildung 3 a.) ist deutlich sichtbar, dass die Ladungen im Bereich der Engstelle auf einer Seite des Kanals angeordnet sind. Weiter ist dort die hohe Ladungskonzentration an der Außenseite des β -Barrels dargestellt. Dieser Ladungsgürtel besteht hauptsächlich aus Seitenketten von Aspartaten und Lysininen und spielt auch in den Biomineralisationsexperimenten (Kapitel 6) eine wichtige Rolle. Abbildung 3 b.) zeigt den Aufbau des Argininclusters von Omp32 in einer Seitenansicht. Er wird gebildet von den Argininen R38, R75 und R133, die von zwei Glutamaten E58 und E60 flankiert werden. Diese befinden sich im Inneren des Barrels räumlich dicht hinter den Argininen und reichen nicht in den Kanal hinein. Diese Anordnung zeigte in Modellrechnung erstaunliche Eigenschaften. Durch die

Verhinderung einer gegenseitigen Abstoßung der Argininseitenketten, stabilisieren die Glutamate über Salzbrücken die Argininladungen. Anstelle einer bei pH 7 früher erwarteten Ladung (Karshikoff et al., 1994)³³ von +2 bleiben die Arginine mit einer Ladung von +3 vollständig protoniert (U. Zachariae et al., 2002).²⁹ Die Ladungen werden also bei physiologischen pH-Werten stabilisiert. Die Elektrostatik des Kanals wird durch die Ladungen der Arginine dominiert, wobei das elektrische Feld der hohen Ladung von +3 sogar bis in den Außenraum des β -Barrels reicht. Dies erklärt die hohe Anionenselektivität des Porins. Molekulardynamikrechnungen haben gezeigt, dass die Seitenketten des Argininclusters aufgrund ihrer speziellen Anordnung hoch beweglich sind und dadurch den Transport von Anionen durch den Kanal maßgeblich vermitteln (U. Zachariae et al., 2003).³⁴ Dass dieser Arginincluster auch eine Bindungsstelle für komplexere Anionen darstellen könnte, ließ sich aus Kristallographiedaten ableiten, die ein, im Bereich der Konstriktionsstelle gebundenes, SO_4^{2-} -Anion zeigen (vgl. Abbildung 2). In Molekulardynamiksimulationen wurde eine stabile Bindung eines Malations an die Seitenkette des Arginins R75 nachgewiesen, die später auch im Rahmen der Strukturdaten bestätigt wurde (U. Zachariae et al., 2006).³⁵ Diese Daten mit Hilfe von experimentellen Daten zu überprüfen und ggf. zu stützen, stellte eine wesentliche Motivation der Leitfähigkeitsexperimente dar. Zum Nachweis der Malatbindungsstellen wurden Leitfähigkeitsmessungen mit Elektrolytlösungen des Natriumsalzes der Äpfelsäure in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Zum Vergleich wurden auch Messungen in verschiedenen NaCl-Konzentrationen herangezogen.

Im Rahmen seiner Dissertation hat Dr. Erik Roth Mutanten von Omp32 hergestellt (E. Roth, 2005),³⁶ die den Arginincluster der Konstriktionszone betreffen. Für die Leitfähigkeitsmessungen standen drei Mutanten zur Verfügung, die im Folgenden als Q1, Q3 und Q4 bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um die Austausch der Arginine in Glutaminreste. Glutamin besitzt eine neutrale Seitenkette, wobei die Seitenkette des Arginins etwas länger, als jene des Glutamins ist. Mit diesem Austausch sollte der Porenquerschnitt so gering wie möglich geändert werden. Bei Q1 wurde das Arginin R38, bei Q3 das Arginin R133 und bei Q4 das Glutamat E58 jeweils durch ein Glutamin an gleicher Stelle ersetzt. Die Wirkungen der geladenen Seitenketten sollten somit einzeln unterbunden oder zumindest geschwächt werden.

4.2 Methoden und Material

4.2.1 Leitfähigkeitsmessungen

4.2.1.1 Planare Membranen

Alle Leitfähigkeitsmessungen wurden an planaren Lipidmembranen durchgeführt. Bei dem hier verwendeten Lipid handelt es sich um Diphytanoylphosphatidylcholin (DphPC) das sich zur Herstellung planarer Membranen als sehr geeignet erwiesen hat (A. Mathes, 2000).⁴¹ DphPC ist ein artifizielles Phospholipid, hergestellt und bezogen von *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Alabama, U.S.A.). Es zeichnet sich durch seine lange Haltbarkeit aus, da es u.a. keine Kohlenstoffdoppelbindungen (C=C) enthält, die bei Raumtemperatur zur Oxidation neigen. DphPC wird in Chloroform (10 mg/ml), zur weiteren Verwendung unter Stickstoffatmosphäre eingedampft und die Lipidmoleküle in Hexan bei einer Konzentration von $c=20$ mg/ml resuspendiert.

Lipide können auf einer Wasseroberfläche als Monolayer gespreitet werden, wenn das organische flüchtige Lösungsmittel verdampft. Wird die Lipidmenge entsprechend der Wasseroberfläche richtig gewählt, bildet sich spontan ein Lipidmonolayer, wobei die Lipidmoleküle mit ihren hydrophilen Kopfgruppen dem Wasser zugewendet sind. Wird zuviel Lipid verwendet, können weniger gut geordnete Mehrfachlayer entstehen, die sich im Allgemeinen aber nicht zur Herstellung definierter Lipiddoppellayern eignen.

Zur Herstellung von planaren Lipidbilayern dienen verschiedene Verfahren, das älteste nach Müller (Mueller et al. 1962).³⁷ Dabei wird ein Tropfen Lipid/Lösungsmittelgemisch, meist Dekan, in wässriger Umgebung auf eine kleine Apertur (0,2-2 mm \varnothing) aufgebracht. Dieser wird durch fortgesetztes Überstreichen (Brushing) mit einem flachen Werkzeug und gleichzeitiger Diffusion des Lösungsmittels immer mehr ausgedünnt, bis schließlich eine Lipiddoppelschicht entsteht. Dieses Verfahren hat den entscheidenden Nachteil, dass in der Doppelschicht immer noch erhebliche Mengen des Lösungsmittels zurückbleiben, die in natürlichen Membranen nicht vorkommen. Dieses Verfahren kann deshalb nur eingeschränkt als Modell für biologische Membranen dienen und wurde in der Vergangenheit kritisch diskutiert (J. Lakey et al., 1989).³⁸

Ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Doppelschichten stellt die Technik nach Montal und Mueller dar (1972).³⁹ In einem System aus zwei Kammern, die durch ein dünnes Septum mit einer kleinen Apertur ($\varnothing < 0,5$ mm) getrennt sind, wird auf beiden Seiten des Septums Elektrolytlösung bis knapp unter die Apertur gefüllt. Auf das Septum werden rund um das Loch einige

Tröpfchen Hexadekan aufgebracht, welches die Bindung des Bilayers an die PTFE-Folie stabilisiert. Dazu wird eine 0,3 % Hexadekan/Hexan-Lösung mit Hilfe einer selbstgezogenen Teflonpipette rund um die Apertur in geringer Menge aufgetragen. Nach Einbau des Septums in die Messkammer wird in beiden Kammern auf der Oberfläche der Elektrolytlösung Lipid/Lösungsmittelgemisch gespreitet und das Verdampfen des Lösungsmittels abgewartet. Nacheinander wird in den beiden Kammern das Elektrolytniveau so angehoben, bis die Apertur unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche liegt. Dabei kommt es zur Ausbildung eines planaren Bilayers. Dass mit diesem Verfahren eine lösungsmittelärmere Membran dargestellt werden kann, lässt sich durch ihre elektro-physiologischen Eigenschaften bestätigen. Die spezifische Kapazität einer so hergestellten Membran, liegt mit ca. $0,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ näher am Bereich der biologischen Membranen (ca. $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$), wohingegen Membranen nach der Brushing-Technik mit einer spezifischen Kapazität von ca. $0,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ deutlich darunter liegen. Eine niedrigere spezifische Kapazität deutet auf eine höhere Membrandicke und somit vermutlich auf einen höheren Gehalt an Lösungsmittel hin (Schindler 1989).⁴⁰ Auch die Ausbildung einer Mehrfachmembran bewirkt eine geringere Kapazität. Sie sind in jedem Fall nicht für physiologische Messungen geeignet. Eigene Beobachtungen haben gezeigt, dass Porine nicht in Membranen niedriger Kapazität einbauen bzw. messbare Poren bilden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Septen bestehen aus einer Teflonfolie mit einer Stärke von $6 \mu\text{m}$ (Bezugsquelle: Huth und Söhne, Starnberg). In diese wird mittels Funkenschlag jeweils ein einzelnes Loch mit einem Durchmesser von ca. $100 \mu\text{m}$ eingebracht. Die Funkenschlagtechnik ermöglicht die Herstellung von nahezu kreisrunden Löchern mit glattem Rand, welcher die

Membranherstellung günstig beeinflusst. Die hierbei erhaltenen Membranen haben eine typische Kapazität von ca. $90 \text{ pF} \pm 15 \text{ pF}$, was einer spezifischen Kapazität von $c_{\text{spez.}} \approx 0,95 \text{ } \mu\text{F}/\text{cm}^2 \pm 17\%$ entspricht. Oft entstehen im ersten Versuch Membranen mit einer Kapazität von ca. 40 pF , die aber nicht für den Porineinbau geeignet sind. Durch Senkung des Elektrolytniveaus in einer der beiden Kammern unter die Position der Apertur und anschließendes wieder Anheben konnte vielfach die Kapazität auf den charakteristischen Wert von 90 pF gebracht werden. Anscheinend begünstigt dieses Verfahren die Entfernung von doppelten Bilayern, die möglicherweise durch zu hohe Lipidgaben entstehen konnten.

Die Herstellung der planaren Membranen ist der kritischste Prozessschritt im Ablauf der gesamten Leitfähigkeitsexperimente. Die Erfahrung zeigte, dass meist 5-8 Anläufe notwendig waren, um einen geeigneten Bilayer zu erhalten. Dieser Umstand macht es unumgänglich, die Membranherstellung unter möglichst genau definierten Bedingungen ablaufen zu lassen. Dabei kommt der Reinigung aller Objekte, welche mit der Elektrolytlösung in Kontakt, sind, eine besondere Bedeutung zu. Es ist darauf zu achten, dass sowohl alle möglichen Anhaftungen von Lösungsmitteln, Lipiden, Detergenzien und Proteinen aus vorangegangenen Experimenten, als auch alle sonstigen Kontaminationen zuverlässig entfernt werden. Bei der Reinigung der Septen kommen folgende Reinigungsschritte zum Einsatz: zunächst wird das Septum im Strahl einer Spritzflasche mit Ethanol vorgereinigt, danach erfolgt eine Reinigungsprozedur aus vier Schritten. Das Septum wird in vier separaten Gefäßen jeweils zweimal in Ethanol und zweimal in einer Mischung von Methanol/Chloroform (50:50) für 5 Sekunden geschwenkt. Zwischen diesen Schritten wird das Septum, um eine

Verschmutzung der anderen Reinigungsbäder zu vermeiden, mit einem Stück Filterpapier vorsichtig trocken getupft. Als letzter Reinigungsschritt vor der Verwendung wird das Septum in ein Becherglas mit Hexan getaucht und danach getrocknet. Nach zehnfacher Verwendung wird das Septum zusätzlich über Nacht in einer 1 %igen Lösung von Genapol (X80, Fluka Deisenhofen) gelagert, um evtl. vorhandene Lipidreste zu entfernen.

Die Messkammern werden nach ihrer Benutzung sofort mit deionisiertem Wasser gespült und anschließend mit Ethanol (zur Analyse 99,8 Vol. %) ausgespritzt. Die Kammern werden dann in 50 % Ethanollösung aufbewahrt. Für die Versuche standen 5 Paare von Halbkammern zur Verfügung. Sobald alle einmal benutzt worden waren, wurden sie zusammen mit der Aufbewahrungslösung in ein Ultraschallbad gebracht und dort bei voller Leistung für 20 Minuten belassen. Es erwies sich als hilfreich im Sinne der Membranherstellung, die Kammern nach ca. 2-3maliger Verwendung über Nacht einer 1 %igen Detergenzlösung auszusetzen. Zusätzliche Behandlung mit Helmanex-Lösung (ein Chrom-Schwefelsäure-Ersatzstoff von Helma GmbH & Co., Mühlheim/Baden) zeigte keine signifikante Verbesserung der Membranherstellung. Um die Halbkammern möglichst rückstandsfrei einsetzen zu können, wurden sie vor dem Einsatz jeweils mit einem in Ethanol getränkten, fusselfreien Papiertuch gründlich ausgewischt und dann mit Stickstoff trockengeblasen.

4.2.1.2 Messprinzip

Die Messungen erfolgten alle in einem Gefäßkomplex bestehend aus zwei Teflonhalbzellen, die von einem Edelstahlring zusammengepresst werden. Beide Halbzellen sind nur durch das Septum getrennt, welches durch den lateralen Druck der Halbzellen fixiert ist. Als zusätzliche Abdichtung und zur homogenen Druckverteilung kommt ein perforiertes Stück Parafilm zum Einsatz. Der Parafilm wird gemeinsam mit dem Septum so zwischen den Halbzellen verpresst, dass das Septum mittig auf dem perforierten Bereich des Films liegt, d.h. das Septum und seine Apertur ist beiderseits von den Elektrolytlösungen in beiden Halbzellen frei zugänglich. Die Halbzellen enthalten jeweils einen Magnetrührer, der es erlaubt, während des Experiments die Elektrolytlösung nach Bedarf zu durchmischen. Durch separate Schrägbohrungen von der Oberseite zu den Hauptgefäßen der Halbzellen können, mit Hilfe von Spritzen, sowohl der Flüssigkeitsstand in den Halbzellen geregelt, als auch die Elektroden in Kontakt mit der Elektrolytlösung gebracht werden. Als Elektroden kommen beschichtete Silberdrähte zum Einsatz. Zur Herstellung werden von hochreinem Silberdraht (\varnothing 1 mm, Reinheit 99,98 %, Hersteller: Goodfellow, Bad Nauheim) Stücke mit einer Länge von ca. 5 cm abgetrennt. Danach werden die Drahtstücke sorgfältig gereinigt, indem sie zunächst mit einem feinkörnigen Schleifpapier von der Oxidschicht befreit und abschließend mit Ethanol fettfrei gesäubert werden. Die Drahtstifte werden zu 2/3 ihrer Länge in eine KCl-Lösung getaucht. Die Konzentration dieser Lösung entspricht jener, die bei der Messung Verwendung findet.

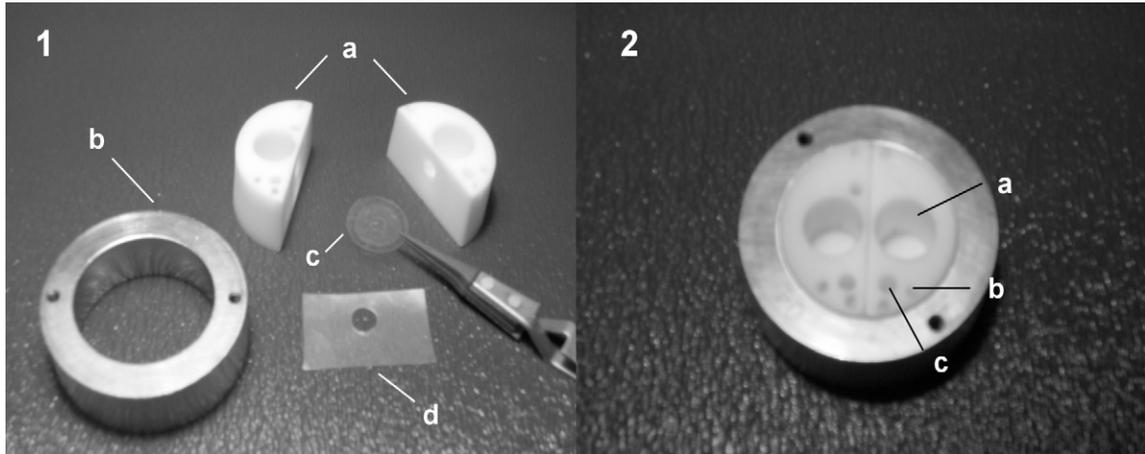


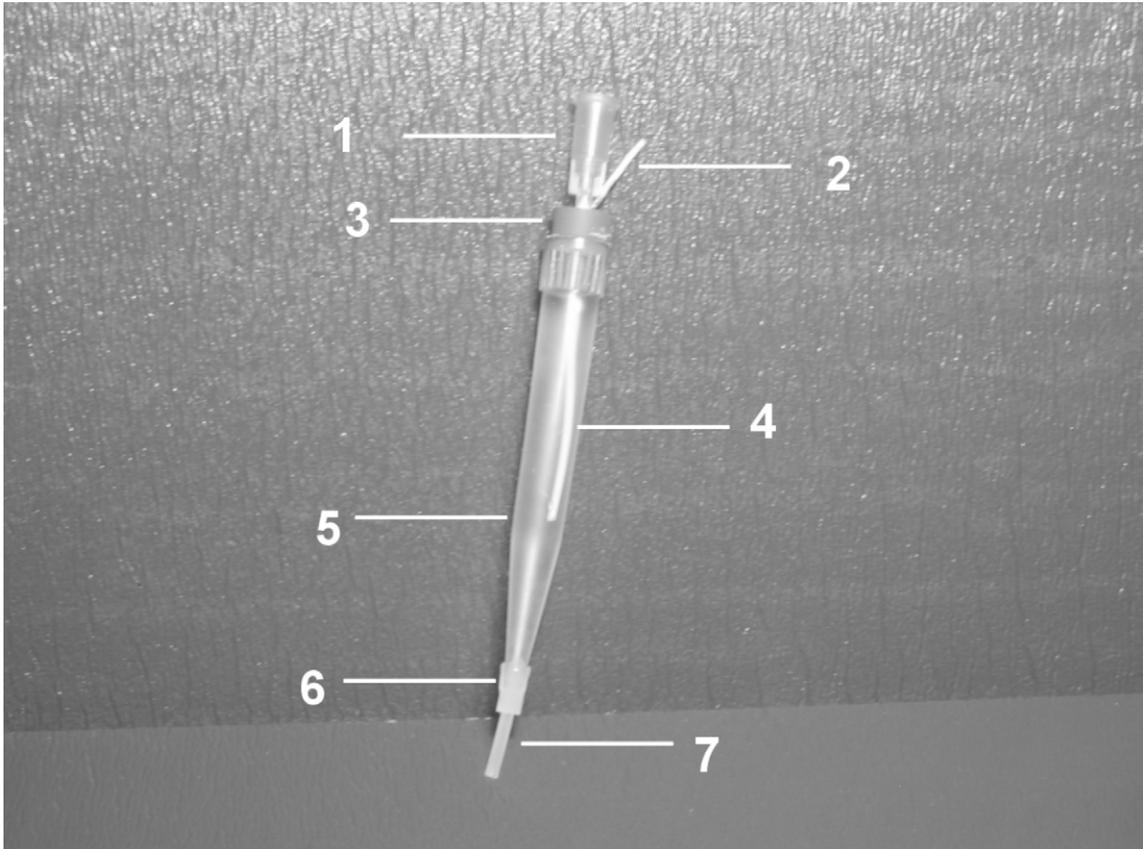
Abbildung 4 (Messgefäß)

Es zeigen: Bildteil (1) die Einzelteile des Messgefäßes; (1a) die beiden Teflonhalbzellen, an den flachen Seiten können die Bohrungen erkannt werden, die die Elektrolytkammern verbinden; (1b) den Metallring, der während der Messung die beiden Teflonhälften gegeneinander fixiert; (1c) das Septum in einer Haltepinzette; (1d) das perforierte Stück Parafilm; Bildteil (2) eine Photographie des fertig montierten Gefäßkomplexes; (2a) die Bohrung des Elektrolytgefäßes, welches später den Magnetrührer aufnimmt; (2b) die Bohrung für die Spritzen, mit deren Hilfe der Flüssigkeitsstand beeinflusst werden kann; (2c) die Bohrung für die Elektrode; direkt darunter findet sich noch eine zweite Bohrung, durch die die Elektrodenunterseite mit Elektrolytlösung umspült werden kann, um eventuell vorhandene Luftbläschen zu beseitigen. Alle Bohrungen sind als kommunizierende Röhren ausgeführt.

Die Stifte werden in einem elektrolytischen Prozess mit einer Ag/AgCl Oberfläche überzogen. Sie fungieren dabei als Anode und eine sich ebenfalls in der Lösung befindliche Silberdrahtspule als Kathode. Um eine möglichst homogene Beschichtung zu erreichen, umschließt die Spule die spätere Elektrode konzentrisch. Während des fünfzehnminütigen Beschichtungsprozesses fließt ein Strom von ca. 1 mA. Es empfiehlt sich, mehrere Drahtstücke zu beschichten, um aus einer größeren Auswahl Paare zu finden, welche in KCl-Lösung die geringste Potentialdifferenz aufweisen. Die Potentialdifferenz sollte dabei höchstens 2 mV betragen. Nach dem Beschichten müssen

die Drahtstücke ständig in KCl-Lösung aufbewahrt werden, wobei die Paare leitend verbunden sein sollten, damit eine bestehende Potentialdifferenz noch weiter abgebaut wird. Selbstverständlich ist bei allen weiteren Schritten darauf zu achten, dass die Beschichtung nicht beschädigt wird.

Auf den etwas erweiterten Einlass von Standardpipettenspitzen von 1000 μ l-Pipetten wird ein Teflonschlauch von 1 mm Außendurchmesser und ca. 3 cm Länge montiert und mit einem Stück Gummischlauch dicht verschlossen. Der Teflonschlauch wird mit einer Agarosematrix verfüllt. Die Agarosematrix besteht aus 2 % Agarose in KCl-Lösung, welche in ihrer Konzentration der Mess- bzw. Beschichtungskonzentration entspricht. Die so verschlossene Pipettenspitze wird nun mit KCl-Lösung aufgefüllt. Die Stifte werden bis zum beschichteten Abschnitt von der schmäleren Seite her so durch einen vorgebohrten Gummistopfen hindurch gesteckt, dass das unbeschichtete Ende auf der anderen Seite kontaktiert werden kann. Der Stopfen mit der Ag/AgCl-Elektrode wird nun auf die vorbereitete Pipettenspitze gesteckt, wobei der beschichtete Draht ganz von Elektrolytlösung umgeben ist. Eine zusätzliche Bohrung im Stopfen, welche mit einer Kanüle versehen ist, ermöglicht den Austritt von überschüssiger KCl-Lösung während des Montiervorganges. Die fertiggestellten Elektroden werden ständig in Elektrolytlösung aufbewahrt. Wenn die einzelnen Komponenten zusammengesetzt sind, wird das Elektrolytniveau zunächst auf einen Stand unterhalb der Apertur gebracht und in beide Halbzellen jeweils 9 μ l des Lipid-Hexangemisches (s.o.) auf der Elektrotoberfläche gespreitet. Während der nun folgenden Membranherstellung wird eine permanente Wechsellspannung durch die Elektroden über das Septum angelegt.

**Abbildung 5****(Elektrode)**

zeigt die Photographie einer fertig präparierten Elektrode: (1) Kanüle zur Ableitung überflüssiger Elektrolytlösung beim Verschließen der Elektrode; (2) Unbeschichtetes Ende des Silberdrahtes; (3) Gummistopfen; (4) Beschichteter Silberdraht; (5) Pipettenspitze 1000 μ l mit Elektrolytlösung gefüllt; (6) Gummischlauch zur Abdichtung und Verbindung zu (7) mit Agaroselösung befüllter Teflonschlauch

Die Wechselspannung hat Dreieckscharakteristik, eine Frequenz von 30 Hz und einen Amplitudenbetrag von 10 mV. Das Spannungs- und das Stromsignal kann währenddessen simultan auf einem Oszilloskop und auf dem Monitor des Messrechners verfolgt werden. Ist die Membranherstellung erfolgreich, stellt sich beim Stromsignal die typische Rechteckform ein, mit der Phasen-

verschiebung von $\pi/2$. Gleichzeitig liefert die Monitoranzeige des Rechners den aus Strom- und Spannungssignal errechneten Kapazitätsverlauf. Hat sich eine Membran gebildet, deren Kapazität bei dem der, je nach Aperturgröße zu erwartende, Wert für einige Minuten konstant bleibt, kann die Kapazitätsmessung abgebrochen werden.

Es wird zunächst eine konstante Spannung über die Membran angelegt, in der Regel -20 mV. Der Messrechner zeichnet im Folgenden den Strom- und Spannungsverlauf über die Membran mit einer Samplingrate von 19.34 kHz auf. Ein zugeschalteter xy-Schreiber dokumentiert zusätzlich den Strom zur besseren Überwachung des Langzeitverlaufes.

Ist die Membran stabil, kann das Protein zugegeben werden. Üblicherweise werden Proteinmengen zwischen 1 μg und 15 μg eingesetzt. Die Proteinlösungen hatten normalerweise Konzentrationen von einigen mg/ml. Die Anteile anderer Inhaltsstoffe wie Salze und Detergenzien variierten von Probe zu Probe, da sie, speziell bei den rekombinant gewonnenen Präparaten, stark von den Rückfaltungsbedingungen abhängig waren. Da aber die Proben in ausreichend hohen Konzentrationen zur Verfügung standen, konnte durch Verdünnung der Einfluss der zusätzlichen Inhaltsstoffe minimiert werden. Der Zusammenhang zwischen Verdünnung und verschwindendem Einfluss der Inhaltsstoffe zeigte sich insbesondere im Einbauverhalten der Proteine, so konnten bei gleichen (1:2 – 1:5) Verdünnungen, mit verschiedenen Proben, auch gleiche Einbauraten gewonnen werden. Bei geringen Verdünnungen ($< 1:1$) zeigte sich dagegen ein stark abweichendes Verhalten. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Verdünnung wurde stets Genapol in einer Konzentration von

1 % - 2 % (CMC 1 %) verwendet. Besondere Aufmerksamkeit ist darauf zu legen, dass nach der Proteinzugabe die Detergenzkonzentration in der entsprechenden Halbzelle deutlich unter der CMC liegt. Da die Halbzellen ein Volumen von ca. 1,2 ml haben, ist bei einer Zugabe von höchstens 2 - 20 μl Proteinlösung (in 2 % Genapol) diese Bedingung gewahrt.

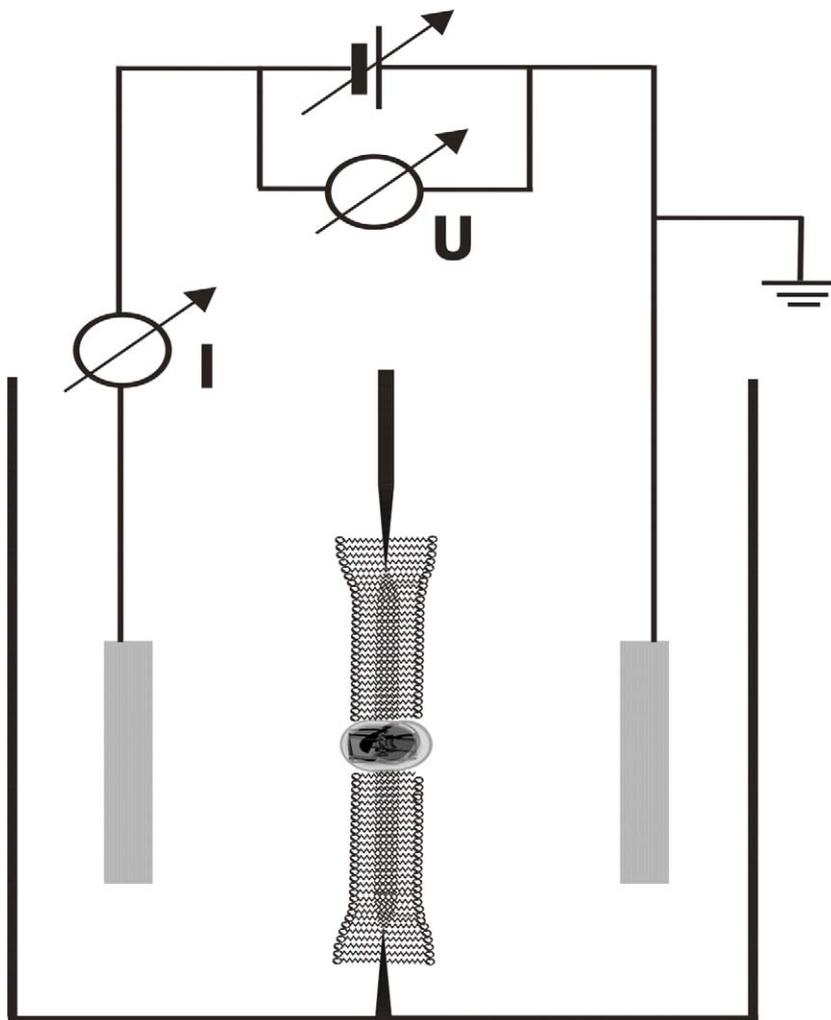


Abbildung 6

(Messaufbau)

zeigt die schematische Darstellung des Messaufbaues. Zwischen den beiden in grau dargestellten Elektroden befindet sich die künstliche Membran mit den inkorporierten Porinen. Ein Stromfluss ist nur durch die Porine möglich. Eine der Elektroden ist geerdet und die Spannung U somit bezüglich des Erdpotentials definiert.

Nach der Zugabe von Genapol wurde der Lösung eine Equilibrierungszeit von ca. zwei Wochen gewährt. Diese Equilibrierungsphase erwies sich als notwendig, um im darauffolgenden Experiment eine befriedigende Einbaurrate zu erhalten. Die Zugabe der Proteinlösung erfolgte stets nur in eine der Halbkammern. Bei den durchgeführten Messungen wurde eine Elektrode geerdet und die an der zweiten Elektrode angelegte Spannung bzgl. des Erdpotentials entsprechend definiert. Die Porinzugabe erfolgte stets in der geerdeten Halbkammer. Nach Zugabe der Proteinlösung wurde, mit Hilfe der in der Halbkammer befindlichen Magnetrührfischchen, eine Homogenisierung der Lösung herbeigeführt. Die Dauer des Rührvorgangs lag dabei im Bereich von 30 – 60 Sekunden. Wurde bei dem Rührvorgang bereits ein deutlicher Stromanstieg festgestellt, war dies ein Hinweis auf eine instabile Membran. Das Experiment wurde in solchen Fällen abgebrochen und von Anfang an wiederholt. Erste Einbauereignisse waren meist in einem Zeitraum von 10 – 20 Minuten zu beobachten. In den durchgeführten Versuchen stellte sich nach einer zunächst hohen Einbaurrate ($N/t \approx 0,3$ [1/s]) nach ca. 1½ h eine Sättigung des Stromanstiegs ein. Danach konnten aber immer noch Einzelereignisse beobachtet werden. Die Rate dieser Einzelereignisse lag bei ca. $N/t \approx 2$ [1/h]. Niedrige Anfangsraten ($N/t < 0,03$ [1/s]), erforderten meist eine nochmalige Proteinzugabe, um einen befriedigenden Proteineinbau zu gewährleisten, dabei wurde nochmals dieselbe Menge Porinlösung verwendet und danach analog der ersten Zugabe homogenisiert. Konnte nach einer halben Stunde kein Einbau festgestellt werden, wurde das Experiment abgebrochen. Mehrmalige Zugaben von Protein ($N > 4$) bewirkten gleichsam Membranstabilitäten, welche in der Folge keine verlässliche Messung zuließen.

4.2.2 Instrumente

Die verwendeten Instrumente im Messaufbau der Leitfähigkeitsmessungen entsprechen im Wesentlichen denen von Anton Mathes (Mathes 2000)⁴¹ in seiner Dissertation beschriebenen Komponenten und seien deshalb im Folgenden nur kurz beschrieben. Verbesserungen wurden bei der Dämpfung und Lagerung des Messaufbaus vorgenommen. Nach dem Umzug in neue Räumlichkeiten steht nunmehr ein spezielles Betonfundament zur Verfügung, welches schwingungstechnisch vom Laborboden entkoppelt ist. Zusätzlich wurde die Datenerfassung auf ein zeitgemäßeres System mit hoher Scanrate umgestellt und erstmals die Datenübertragung vom Experiment zur Messkarte des Rechners vollständig abgeschirmt.

4.2.2.1 Messkammer

Die Messkammer ist als Faradayscher Käfig ausgeführt. Die Abschirmung gegenüber elektromagnetischer Strahlung wird durch einen Rahmen aus Aluminiumprofilen und Seitenwänden aus Aluminiumblechen, sowie aluminiumbeschichteten Pappen realisiert. Alle Komponenten sind durch separate Kontaktstellen geerdet. Die Kammer ruht auf zwei Marmorplatten von 6 cm und 3 cm Stärke. Diese sind übereinander, sowie durch sechs schwingungsabsorbierende Hartgummiblöcke getrennt gelagert. Die Platten ruhen ihrerseits auf einem Arbeitspodest aus Polystyrolplatten von jeweils 8 cm Stärke, die in Sandwichbauweise miteinander verklebt sind.

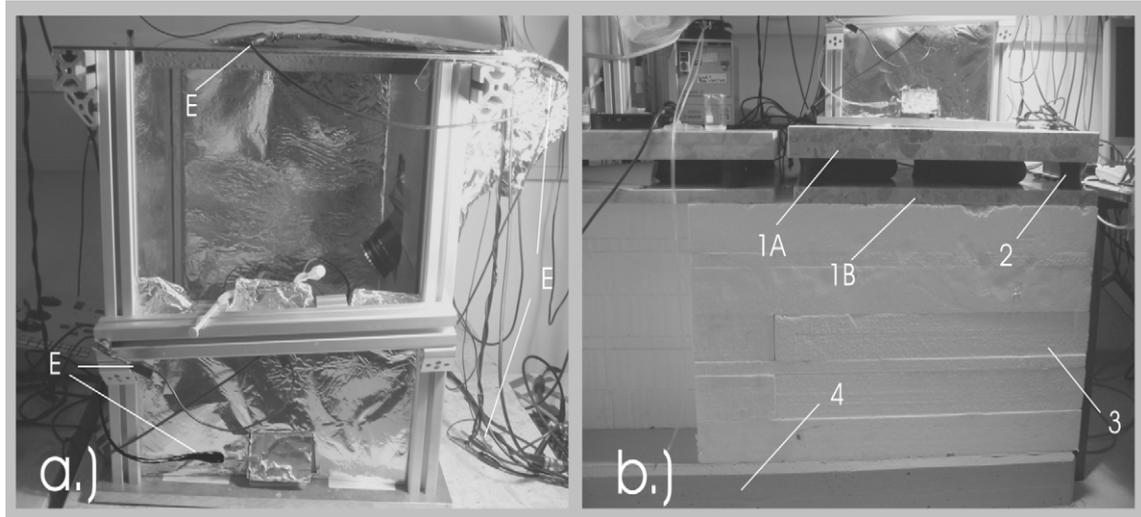


Abbildung 7 (Messkammer)

zeigt in Bildteil a.) eine Photographie der Messkammer, sichtbare Erdungskontaktstellen sind mit dem Buchstaben E gekennzeichnet. Bildteil b.) zeigt den Aufbau des Messkammerunterbaues. Die Messkammer ruht auf zwei Marmorplatten (1A und 1B), zwischen den Marmorplatten befinden sich Hartgummi-Blöcke (2), die Marmorplatten ruhen auf Polystyrolplatten (3), die auf einem Betonsockel (4) lagern.

Den Abschluss zum Boden bildet ein massiver Betonsockel, welcher die Schwingungsübertragung durch den Laborboden stark reduziert. Diese Maßnahmen zur Schwingungsdämpfung sind die Grundlage für stabile Lipidmembranen.

Innerhalb der Messkammer befindet sich eine Vertiefung, in die der fertig montierte Gefäßkomplex komplett versenkt werden kann. Diese Vertiefung enthält den Antriebsmechanismus für die Rührfischchen. Zur Kontaktierung der Messelektroden befindet sich die Vorverstärkereinheit des EPC7 innerhalb der Messkammer.

4.2.2.2 Elektronik

Das Herzstück der Messelektronik ist ein Patch-Clamp-Verstärker (EPC7, List-Electronics, Darmstadt), der um eine digitale Auslesemöglichkeit der Verstärkungsstufen des Stimulus- und Gainsignals erweitert wurde. Zur direkten Kontrolle der Signale dient ein digitales Oszilloskop (Typ 2211, Tektronix, Heerenveen, Niederlande) und zur Langzeitkontrolle des Membranstromverlaufes ein Analogschreiber (R-01, Rikadenki Electronics GmbH, Freiburg). Das Stimulussignal für die Messungen wird vom Analogausgang (der Ausgabebereich beträgt ± 10 V) der Messkarte über einen Tiefpassfilter (100 Hz) an den Verstärker weiter geleitet. Der Verstärker skaliert entsprechend der gewählten Einstellung das Signal herab. In den Versuchen wurden nur Skalierungen von 1×10^{-3} und 1×10^{-2} gewählt. Das resultierende Stromsignal wird in der Vorverstärkereinheit der Messkammer durch einen Tiefpassfilter (10 kHz) aufbereitet und während der Hauptverstärkung innerhalb des Patch-Clamp-Verstärkers nochmals mit einem 3Pol-/3kHz-Besselfilter tiefpassgefiltert. Dieses Signal wurde dann direkt an den Analogeingang der Messkarte angelegt. Eine weitere analoge Filterung des Signals, wie sie in früheren Messungen (Mattes 1999) verwendet wurde, fand nicht mehr statt. Diese war damals notwendig, um bei Langzeitmessungen eine geringere Digitalisierungsrate verwenden zu können, ohne dabei das Abtasttheorem zu verletzen. Durch die Umstellung auf einen leistungsfähigeren Rechner zur Datenerfassung können aber selbst Messungen von 1 – 2 Tagen Dauer bei hohen Scanraten durchgeführt werden, ohne dass die dabei anfallenden Datenmengen von mehreren hundert Megabytes die Speicherkapazität des Rechners überlasten.

4.2.2.3 Datenerfassung

Das vorhandene Datenerfassungssystem wurde auf eine modernere Hard- und Softwarebasis umgestellt. Zum Einsatz kam ein IBM-kompatibler Pentium IV Rechner bei 2 GHz, mit 512 MB Arbeitsspeicher und einer 80 GB Festplatte. Der Rechner ist ausgestattet mit einer Messkarte PCI NI 6070E-Serie (National Instruments, München). Diese zeichnet sich durch eine hohe Samplingrate von maximal 1,25 M/s und einer 12-bit Digitalisierungsrate aus. Zur Kontaktierung der Messkarte mit dem Verstärker wurde ein vollständig geschirmter Kontaktblock vom Typ BNC-2120 (National Instruments, München) verwendet. Zusätzlich wurde das System von Labview 4.0.1 auf die Version Labview 6i umgestellt. Labview ist eine objekt-orientierte Programmiersprache, in der die vorhandenen Routinen zur Signalgenerierung, Messwerverfassung und Datenauswertung programmiert sind. Die Migration der Routinen erfolgte über Labview 5.0, wobei einige Subroutinen von Hand angepasst werden mussten. Desweiteren wurden einige in Labview 4 implementierte Subroutinen zur Datenauswertung, wie Filter und Darstellungsroutinen, von Hand für Labview 6i aufbereitet. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten, erfolgte wie bereits die Umsetzung der Simulationsrechnung, unter Verwendung von Igor Pro 5. Zur Auswertung der Einbaucharakteristiken, bzw. zur Bestimmung der Stufenhöhen, welche die Leitfähigkeit einzelner Porine repräsentieren, wurden Makros erstellt, welche mit Hilfe eines Korrelationsalgorithmus automatisch Stufen innerhalb der Messkurven erkennen und damit auf einfache Art und Weise die Erstellung von Statistiken über diese Einzelereignisse ermöglichen. Zur Auswertung und Simulation der Schließkinetiken wurden die gleichen Routinen benutzt, wie sie bereits für die Auswertung der Schließkinetiken von Omp34

verwendet worden sind. Der Quellcode der verwendeten Makros findet sich im Anhang dieser Arbeit.

4.2.3 Chemikalien

Für die Leitfähigkeitsmessungen kamen folgende Chemikalien zum Einsatz:

Ethanol absolut 99,8%	Sigma-Aldrich, Seelze
Hexan z. Analyse	Merck, Darmstadt
Methanol z. Analyse	Merck, Darmstadt
Chloroform z. Analyse	Merck, Darmstadt
Helmanex	Helma, Mühlheim/Baden
Genapol X80	Fluka, Deisenhofen
DphPC in Chloroform	Avanti Polar Lipids, Alabaster/USA
Hexadekan f. Gaschromatographie	Merck, Darmstadt
KCl z. Analyse	Merck, Darmstadt
$C_4H_4O_5Na_2$ z. Analyse	Sigma-Aldrich, Seelze

4.3 Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessungen

4.3.1 Messungen am Wildtyp-Protein

4.3.1.1 Einbaucharakteristik

Um die Daten der rekombinant hergestellten Proteine besser beurteilen zu können, wurden Vergleichsmessungen mit nativem Omp32 angestellt. Ein Vergleich der Einbaucharakteristiken mit älteren Messungen ermöglicht eine Bestätigung der Zuverlässigkeit der neuen Messungen. Besonders interessant gestaltete sich jedoch der Vergleich zu den Messungen des rekombinant hergestellten Wildtyps und der Mutanten. Dabei stand im Vordergrund festzustellen, ob der rekombinant hergestellte Wildtyp ein „natürliches“ Verhalten zeigt und inwiefern sich die Mutationen auf die Leitfähigkeit auswirken. Abbildung 8 zeigt in Bildteil a.) den Ausschnitt einer Messung der Einbaucharakteristik des nativen Wildtyps. Der Stromverlauf zeigt die typischen Stufen, welche durch den Einbau von Porintrimeren in die Membran entstehen. Die Messung wurde über eine Gesamtdauer von ca. 35 Minuten durchgeführt. Mit Hilfe des Korrelationsalgorithmuses wurden die Stufen automatisch identifiziert. In Abbildung 8 a.) sind die Orte der gefundenen Stufen durch Markierungskreuze gekennzeichnet. Bei geringeren Signal-Rauschverhältnissen kann nicht verhindert werden, dass der Rechner einzelne Rauschereignisse als Einbauereignisse interpretiert. Eine manuelle Auslese der automatisch gefundenen Stufen ist deshalb unabdingbar. Trotzdem erwies sich die automatisierte Auswertung als ein verlässliches und wegen der Fülle der Daten unverzichtbares Hilfsmittel zur Auswertung der Einbaucharakteristiken.

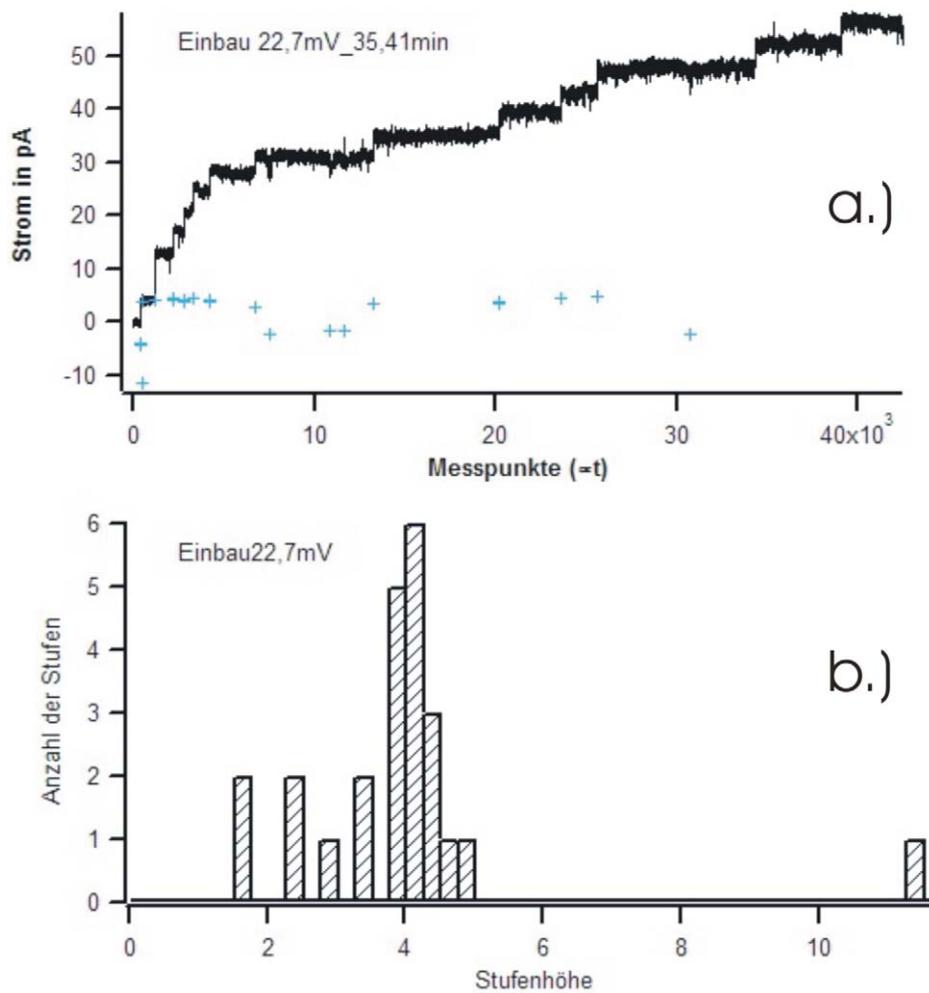


Abbildung 8 (Einbau Omp32)

zeigt in Bildteil a.) eine Messung des Einbauverhaltens von Omp32. Die Dauer der Messung betrug ca. 35 min. Während der Messung lag eine Spannung von 22,7mV über die Membran an. Bildteil b.) zeigt ein Histogramm als Ergebnis der automatisierten Auswertung der Messung aus Bildteil a.). Die Anzahl der vom Rechner identifizierten Einzelstufen ist in Abhängigkeit von deren Stufenhöhen dargestellt. Die Kreuze im Bildteil a.) markieren die Orte der Stufen.

Die automatisierte Stufenidentifikation liefert als Resultat ein Histogramm der gefundenen Stromsprünge. Ein derartiges Histogramm ist in Abbildung 8 b.) dargestellt. Das Histogramm zeigt die Anzahl der gefundenen Stufen in

Abhängigkeit der Stufenhöhen. Derartige Histogramme erlauben die Bestimmung eines Schwerpunktes der Stufenhöhe und somit einen charakteristischen Wert für die mittlere Stufenhöhe.

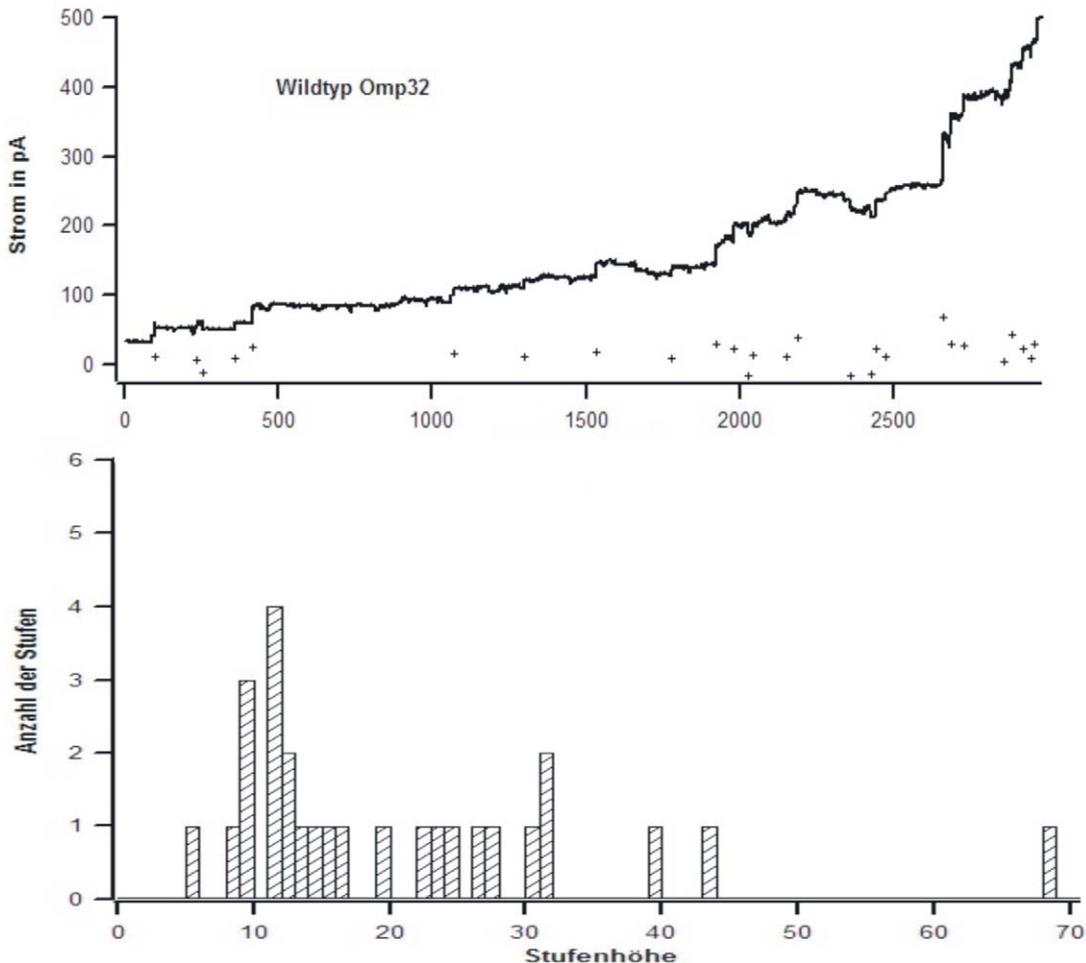


Abbildung 9 (Einbau WT Omp32)

zeigt im Bildteil a.) eine andere Messung der Einbaucharakteristik des nativen Wildtyps von Omp32. zeigt ein weiteres Beispiel einer Einbaucharakteristik. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von ca. 45 Minuten bei einer Spannung von 90,9 mV. Bildteil b.) zeigt analog zu Abbildung 8 das Histogramm der Stufen der automatisierten Auswertung.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Einbaurrate und der Lebensdauer der Membran war es oftmals notwendig, mehrere Messungen der Einbaurrate zu

den einzelnen Proteintypen vorzunehmen, um eine statistisch befriedigende Anzahl von Einzelstufen zu erhalten. Die Messwerte der Einzelmessungen wurden dann in einer Gesamtstatistik zusammengefasst. Insbesondere die Messungen zum nativen Wildtypprotein zeigten zunächst eine sehr geringe Einbaurrate gegenüber denjenigen Einbauraten der rekombinant hergestellten Proteine. Vermutlich lässt sich diese Abweichung auf die verschiedenen Aufreinigungsprozesse und der daraus resultierenden unterschiedlichen Restkonzentrationen von Lipiden oder Aggregation von Proteinen in der Proteinstammlösung zurückführen. Zur Erhöhung der Einbaurrate wurde, speziell bei den Messungen zur Einbaucharakteristik vom nativen Wildtyp, der Wert der angelegten Spannung erhöht. Abbildung 9 zeigt eine Messung, welche bei einer angelegten Spannung von 90,9 mV durchgeführt wurde. Um die Resultate der einzelnen Messungen zusammenfassen zu können, wurden die Stromwerte der Stufen in entsprechende Leitfähigkeitswerte umgerechnet. Die Nichtlinearität (A. Mathes et al., 1998)⁴² der Leitfähigkeit von Omp32 bei höheren absoluten Spannungswerten wurde dabei nicht explizit berücksichtigt. Diese Vorgehensweise erscheint zulässig, da die Nichtlinearität bei Spannungen bis 100 mV noch nicht besonders stark ausgeprägt ist und somit in jedem Falle noch innerhalb des Messfehlers der einzelnen Stufenereignisse liegt. Im Rahmen der damaligen Messung wurde auch die Leitfähigkeit des Omp32 Porintrimers bestimmt. Die früheren Messungen zeigten dabei einen Wert für die Leitfähigkeit von $0,18 \pm 0,03$ nS bei einer KCl-Konzentration von 100 mM. Die neueren Messungen im Rahmen dieser Arbeit lieferten einen Wert, der durchschnittlichen Leitfähigkeit eines Porintrimers, von $0,15 \pm 0,06$ nS (Abbildung 10). Auch diese Messungen wurden bei einer Salzkonzentration von

Messung	Leitfähigkeit in nS	\pm Fehler in nS	N _{Stufen}
1	0,18	0,05	23
2	0,13	0,06	36

Abbildung 10**(Tabelle 1)**

zeigt eine Tabelle mit den Resultaten zweier Einzelmessungen zur Einbaucharakteristik des nativen Wildtyps von Omp 32

100 mM KCL durchgeführt. Die Resultate der neueren Messungen stimmen somit im Rahmen der Messgenauigkeit annähernd mit jenen der älteren Messungen überein. Die Neuerungen am Messaufbau und dabei speziell die Verbesserung der Messwerterfassung durch eine neue Messkarte mit höherer Scanrate hatten keine verfälschenden Auswirkungen auf den Inhalt die Resultate. Ein Vergleich der Resultate der weiteren Messungen, insbesondere der Messungen, zu den rekombinant hergestellten Proteinen, mit den älteren Messungen ist deshalb zulässig.

4.3.2 Messungen am rekombinanten Wildtyp von Omp32

4.3.2.1 Einbaucharakteristiken

4.3.2.1.1 Standardmessung der Leitfähigkeit in 100 mM KCl

Im Folgenden wurden Messungen zur Einbaucharakteristik des rekombinant hergestellten Porins Omp32 durchgeführt. Abbildung 11 zeigt ein Beispiel dieser Messungen.

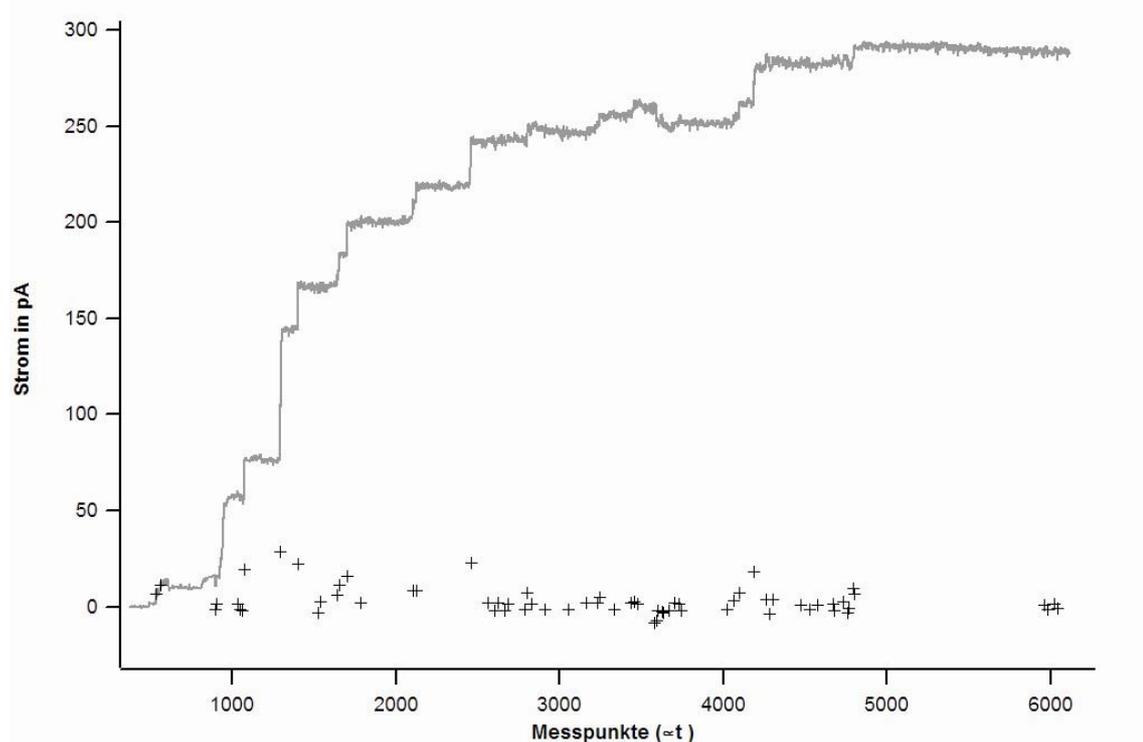
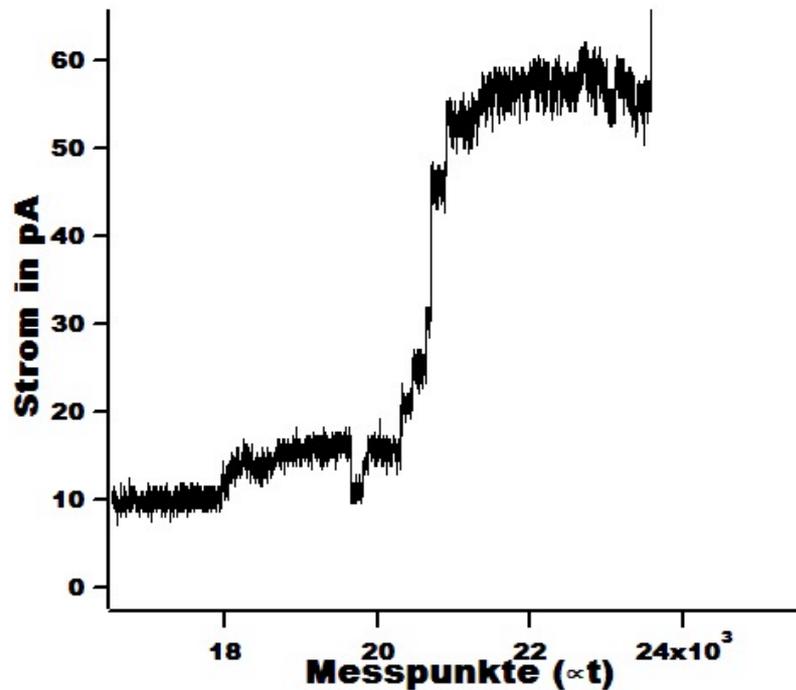


Abbildung 11 (Einbau Omp32)

zeigt eine Messung der Einbaucharakteristik von rekombinant hergestelltem Omp32 die Messung verlief über einen Gesamtzeitraum von 56 Minuten und wurde bei einem absoluten Spannungswert von 20,7 mV durchgeführt. Die Orte der automatisch gefundenen Stufen sind durch Kreuze markiert.

Die typischen Stufen im Stromverlauf sind deutlich erkennbar, wobei auffällig ist, dass die Stufenhöhen variierten. Die Datenreduktion in dieser Darstellung erweckt den Anschein, dass es sich bei den größten Stufen um Einzelereignisse handelte. Die angewendete hohe Scanrate ermöglicht jedoch eine genauere Analyse des Stromverlaufes. In Abbildung 12 ist eine Detailvergrößerung der ersten größeren Stufen, welche in Abbildung 11 im Bereich des tausendsten Messpunktes liegt, dargestellt. Die Messpunktdichte der Abbildung 12 ist dabei zehnmal größer, als jene in Abbildung 11.

**Abbildung 12****(Detailausschnitt)**

zeigt einen Detailausschnitt der Messung von Abbildung 11 mit einer vergrößerten Messpunktdichte.

Durch die höhere Auflösung lässt sich erkennen, dass sich die größeren Stufen aus mehreren „elementaren“ Einzelstufen zusammensetzten. Trotz der hohen Scanrate ließen sich nicht alle Einbauereignisse in Einzelereignisse auflösen. Der Korrelationsalgorithmus zur automatisierten Stufenerkennung konnte daher, in einigen Fällen, die Stufen nicht in elementare Einbauereignisse auflösen.

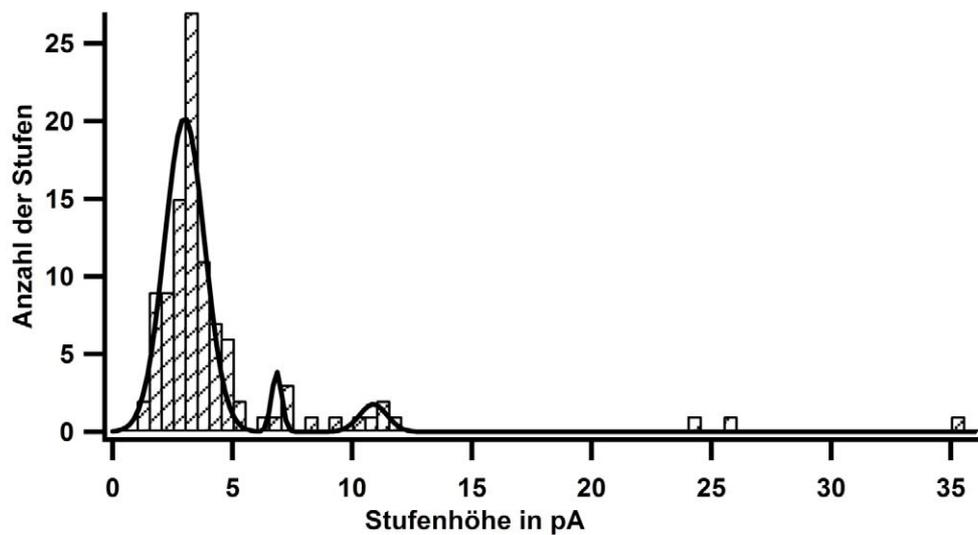


Abbildung 13 (Stufenhistogramm)

zeigt das Stufenhistogramm der Auswertung einer Messung der Einbaucharakteristik des rekombinanten Wildtyps. Der Überlagerte Kurvenverlauf stellt einen dazugehörigen Gaussfit zur Schwerpunktsbestimmung dar.

Dadurch wurde es notwendig, die Stufenhöhe solcher Mehrfachereignisse in Einzelereignisse umzurechnen. Für die Stufenhöhen der Einbaucharakteristik ergaben sich somit die folgenden Werte:

Einzelereignisse	Doppelereignisse	Dreifachereignisse
$0,15 \pm 0,06 \text{ nS}$	$0,17 \pm 0,02 \text{ nS}$	$0,18 \pm 0,04 \text{ nS}$

Abbildung 14 (Tabelle 2)

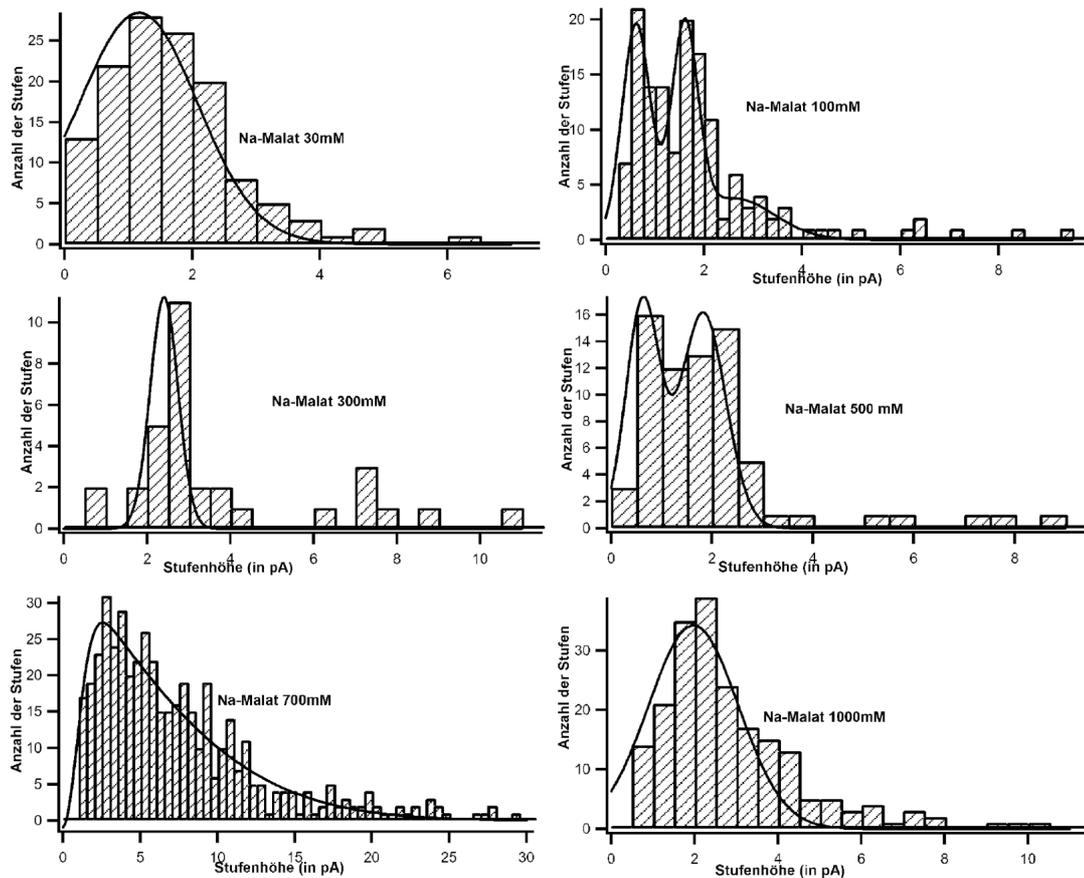
zeigt eine Tabelle mit den Leitfähigkeitswerten für den rekombinanten Wildtyp.

Diese Werte des rekombinanten Wildtyps stimmen, im Rahmen der Messgenauigkeit, mit den Werten der früheren Messungen zum nativen

Wildtypprotein Omp32 überein. In bezug auf die Leitfähigkeit des rekombinant hergestellten Proteins ist also keine signifikante Abweichung zur Einbaucharakteristik des nativen Proteins zu beobachten. Daher sollten die Leitfähigkeiten der nativen und der rekombinant hergestellten Omp32-Porintrimere vergleichbar sein und weitere Messungen bei verschiedenen Konzentrationen und verschiedenen Salzen zulassen.

4.3.2.1.2 Messung der Leitfähigkeit in Na₂Malat-Lösungen

Der Organismus *Delftia acidovorans* wächst bevorzugt in Medien mit organischen Säuren und darunter speziell in Medien, welche Äpfelsäure enthalten (A. Willems et al., 1992).⁴³ Da die äußere Membran dieses Organismusses Omp32-Trimere in großer Anzahl und dichter Packung enthält, ist die Annahme naheliegend, dass dieses Protein an der Aufnahme von Malat beteiligt ist. Weiter haben Simulationsrechnungen gezeigt, dass Omp32 eine Bindungsstelle für Malationen aufweist (U. Zachariae, 2004).⁴⁴ Dies sollte durch Messungen zur Einbaucharakteristik von rekombinant hergestelltem Omp32 bei verschiedenen Konzentrationen von Malationen überprüft werden. Verwendet wurde das Natriumsalz der L-Äpfelsäure. Die Lösungen des Salzes wurden in Konzentrationen zwischen 30 mM und 1000 mM eingesetzt. Um eventuelle säurebasierte Membraneffekte zu vermeiden und die Messungen mit anderen Salzen vergleichen zu können, wurden die Elektrolytlösungen mit Hilfe von konzentrierter Na(OH)-Lösung auf einen pH-Wert von 6,9 eingestellt. Die Messungen wurden mit Elektroden durchgeführt, welche auf die in Abschnitt 4.2.1.2. beschriebene Art hergestellt wurden und deren Agarosematrix eine KCl-Lösung mit einer Konzentration von 100 mM enthielten.

**Abbildung 15****(Histogramme Malat)**

zeigt die Resultate der Auswertungen der durchgeführten Messungen zu unterschiedlichen Malatkonzentrationen. Dargestellt sind jeweils die Histogramme der automatisierten Stufensuche. Zur Bestimmung des Schwerpunktes der absoluten Stufenhöhe wurden die Histogramme mit Gaußkurven gefittet.

Die Messungen wurden als Einzelmessungen nacheinander ausgeführt. Beginnend mit der niedrigsten Malatkonzentration wurden sukzessiv Messungen mit Elektrolytlösungen von höherer Malatkonzentration bis zur höchsten Malatkonzentration durchgeführt. Durch dieses Vorgehen sollten Diffusionseffekte innerhalb der Elektroden so gering als möglich gehalten werden. Während der Messungen lag jeweils eine Spannung von $-20,7$ mV über die Membran an. Abbildung 15 zeigt die Resultate der durchgeführten

Messungen. Da es sich um Einzelmessungen mit unterschiedlichen Membranen handelt, variiert auch die Anzahl der Stufen in den einzelnen Histogrammen. Die Messungen mit wenigen Einbauereignissen führen zu einer höheren Schwankungsbreite.

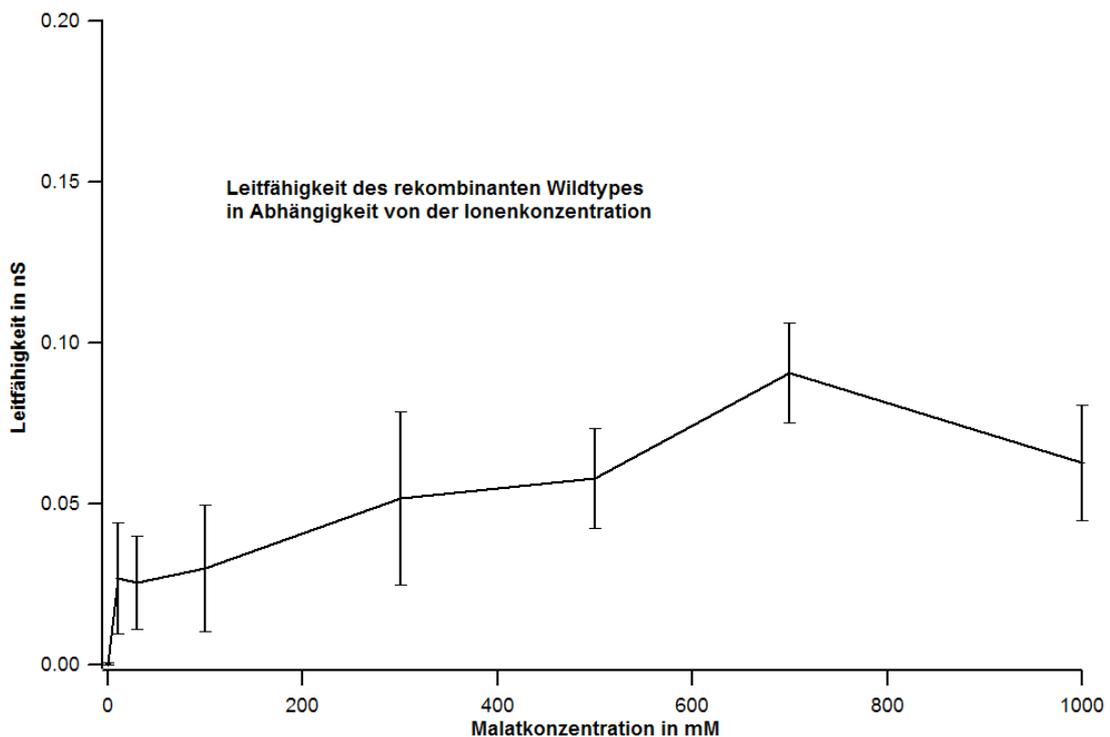


Abbildung 16

(Leitfähigkeit (Malat))

zeigt die Leitfähigkeit des rekombinant hergestellten Porintrimers in Abhängigkeit von der Konzentration der Malationen.

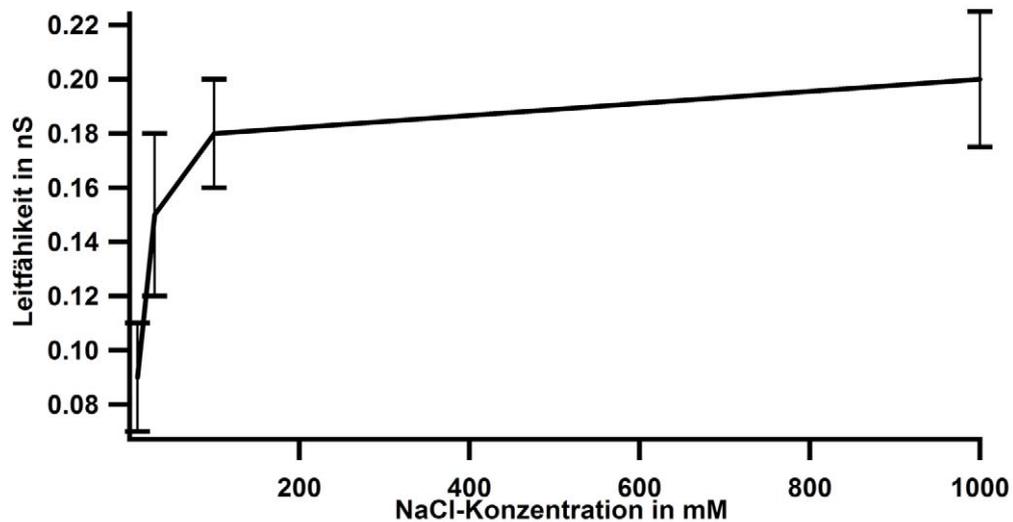
In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Messungen der Einbaustufen für verschiedene Malatkonzentrationen dargestellt. Zunächst fällt auf, dass die absoluten Leitfähigkeitswerte für alle Malatkonzentrationen deutlich geringer sind, als die Leitfähigkeit, welche für 100 mM KCl bestimmt worden ist. Da es

sich bei dem Malation, im Vergleich zum Chloridion, um ein komplexes Molekül handelt, dessen Abmessungen wesentlich größer sind als der Ionenradius des Chloridions, ist ein solches Verhalten zu erwarten.

Der Verlauf der Kurve in Abbildung 16 zeigt jedoch deutlich die Charakteristik einer Sättigungskinetik. Der leichte Anstieg im Bereich zwischen 100 mM und 1000 mM Na_2Malat könnte auf einen additiven Beitrag der Na^+ -Ionen zurückzuführen sein.

4.3.2.1.3 Messung der Leitfähigkeit in NaCl-Lösungen

Zusätzlich wurden Messungen der Einbaucharakteristik bei verschiedenen Konzentrationen von NaCl durchgeführt. Die Daten dieser Messungen dienen als Interpretationshilfe der Malatdaten, um den Einfluss der Na-Ionen auf die Messungen der Leitfähigkeiten, bei verschiedenen Malatkonzentrationen, besser verstehen zu können. Die Messungen erfolgten in Analogie zu den Messungen zu Na_2Malat unter Verwendung einer 100 mM KCl-Elektrode und wurden in aufsteigender Konzentration gemessen. Die Größenordnung der gefundenen NaCl-Leitfähigkeitswerte stimmt mit jener von KCl überein. Beide sind damit um einen Faktor 2 größer als die Leitfähigkeitswerte für Na_2Malat . Ein Austausch der Kationen K^+ durch Na^+ scheint keinen signifikanten Effekt in Bezug auf die Leitfähigkeit zu haben, was mit der Anionenselektivität von Omp32 übereinstimmt.

**Abbildung 17****(Leitfähigkeit (NaCl))**

zeigt die Resultate der Leitfähigkeitsmessungen an rekombinantem Omp32 in Abhängigkeit der verschiedenen Konzentrationen von NaCl.

Die verringerten Leitfähigkeitswerte bei Na_2Malat -Elektrolytlösungen ist somit ein Effekt, welcher auf das Malatanion zurückzuführen ist.

4.3.2.2 Messungen zur Schließkinetik

Aus den Messungen zur Schließkinetik, die in Kapitel 5.5.2. beschrieben sind, wurde auch eine Analyse der Stufenhöhen der Schließkurven zu verschiedenen Spannungen durchgeführt. Diese Auswertung zeigt deutlich den nichtlinearen Verlauf der Leitfähigkeit, wie er bereits für den Wildtyp festgestellt worden ist (A. Mathes, 2000).⁵¹ Bei Spannungswerten oberhalb der physiologischen Grenze stellt sich mit zunehmenden absoluten Spannungen eine Abnahme der Leitfähigkeit ein.

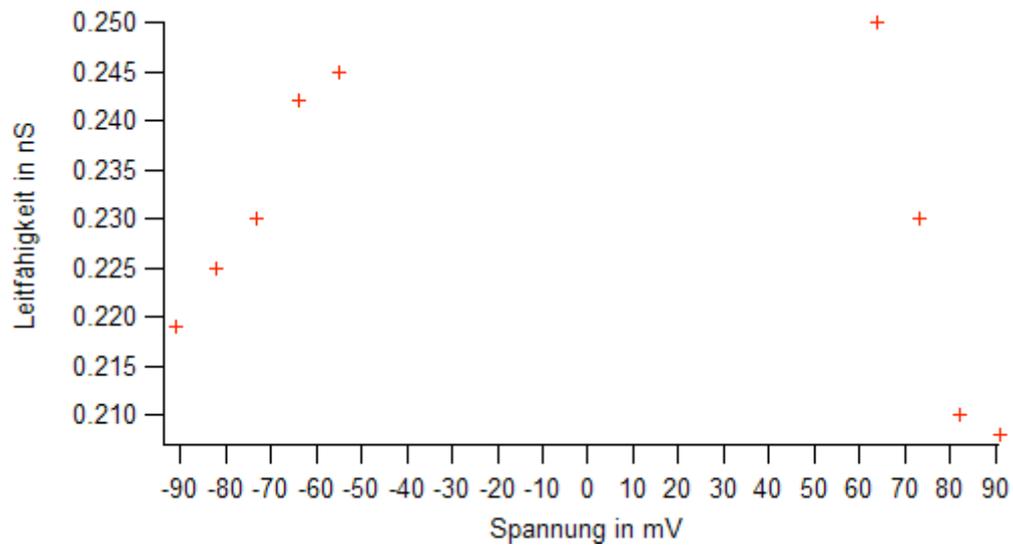


Abbildung 18 (Stufenhöhen)

zeigt das Resultat einer Auswertung der Schließkinetik von Omp32 in Hinsicht auf die Höhe der Stufen des Schließvorganges bei verschiedenen Spannungen.

Die in Abbildung 18 dargestellten Leitfähigkeitswerte der Porintrimere entsprechen einer Abflachung der Kennlinie im UI-Diagramm bei höheren Spannungswerten. Sie sind ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass sich der rekombinante Wildtyp in seinen Ladungstransporteigenschaften nicht vom nativen Wildtyp unterscheidet.

4.3.3 Messungen an den Omp32-Mutanten

4.3.3.1 Messungen an der Mutante Q1

Die Mutante Q1 des Porins Omp32 unterscheidet sich vom Wildtyp dadurch, dass das Arginin R38 durch ein ungeladenes Glutamin ersetzt wurde. Der Einbau wurde bei einer Konzentration von 100 mM KCl durchgeführt.

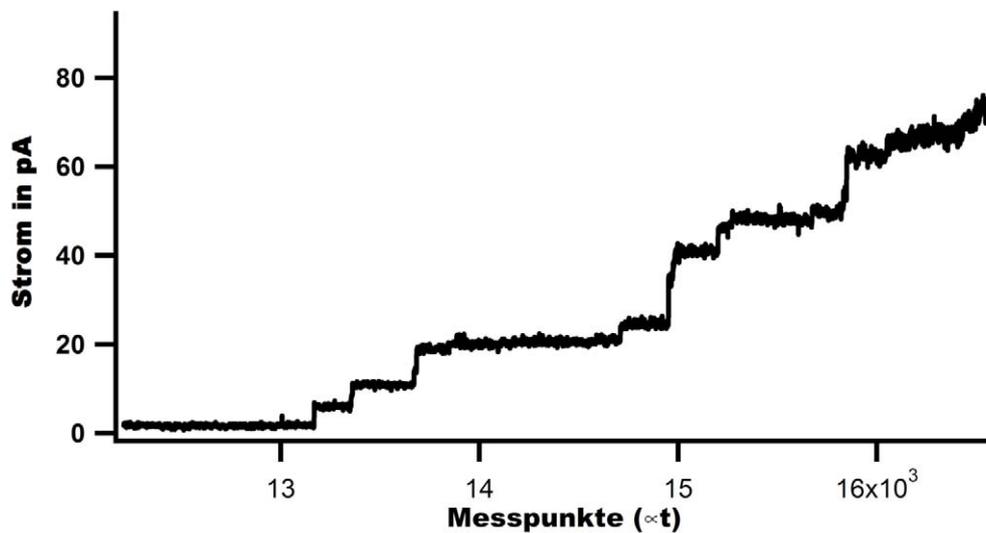


Abbildung 19

(Einbau Q1)

zeigt den Ausschnitt einer Messung zur Einbaucharakteristik der Mutante Q1.

Bei den Messungen lag eine absolute Spannung von 20,7 mV an. Abbildung 19 stellt einen Ausschnitt einer Messung zur Einbaucharakteristik von Omp32 dar. Die gesamte Messung verlief über einen Zeitraum von 1,5 Stunden. Die Messung zeigt den charakteristischen Stufenverlauf, ein Hinweis darauf, dass sich die Mutante in ihrem Einbauverhalten ähnlich wie der Wildtyp verhält. Die Stufenhöhen sind jeweils ganzzahlige Vielfache einer elementaren Stufenhöhe.

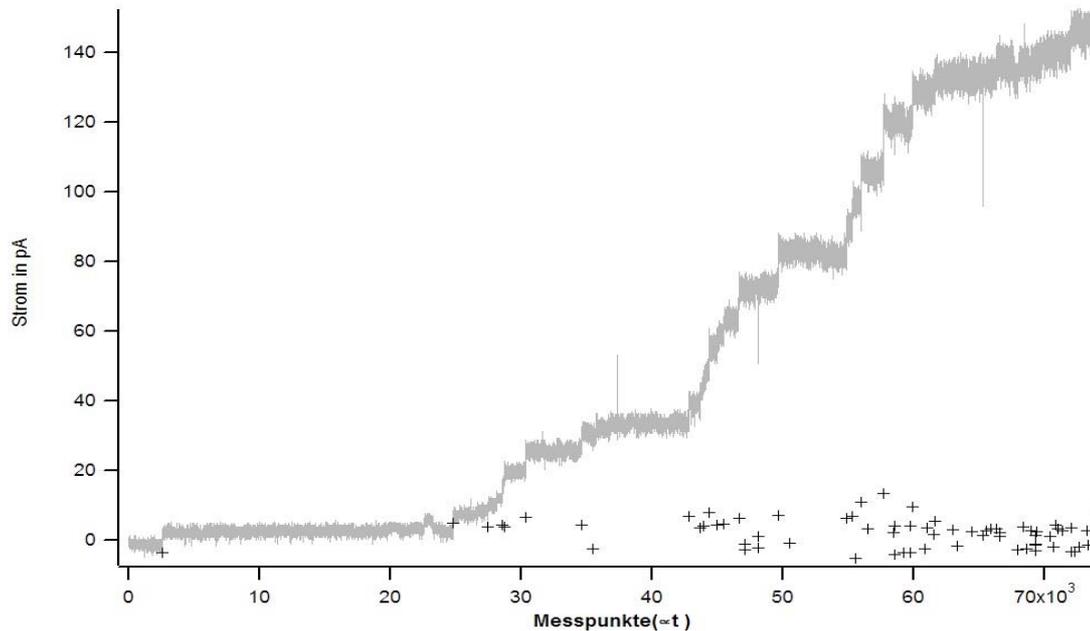
Die ersten beiden Stufen der Abbildung 18 entsprechen dabei in ihrer Höhe dem Wert der elementaren Stufenhöhe. Die automatisierte Stufensuche mittels des Korrelationsalgorithmuses liefert eine durchschnittliche Stufenhöhe von $3,7 \pm 0,9$ pA, welche einer Leitfähigkeit von $0,18 \pm 0,04$ nS pro Trimer entspricht. Die Leitfähigkeit entspricht damit den Leitfähigkeiten des Wildtyps und des rekombinant hergestellten Wildtyps. Die Mutation des Arginins R38 scheint daher keine signifikante Auswirkung auf die Leitfähigkeit zu haben.

4.3.3.2 Messungen an der Mutante Q3

Die Mutante Q3 bezeichnet die Mutation von R133 zu Q133. Das R133 befindet sich am exoplasmatischen Ende der Konstriktionsstelle. Es wurden mehrere Messversuche an dieser Mutante angestellt, allerdings konnte in keinem Fall ein Einbau in die Membran festgestellt werden. Einer der Messversuche verlief dabei über 43,4 Stunden, da bei diesem Versuch eine erstaunlich stabile Membran etabliert werden konnte. Derzeit kann nicht beurteilt werden, ob dieser negative Befund ursächlich mit der Mutation verbunden, oder ob ein anderer Parameter dafür verantwortlich ist.

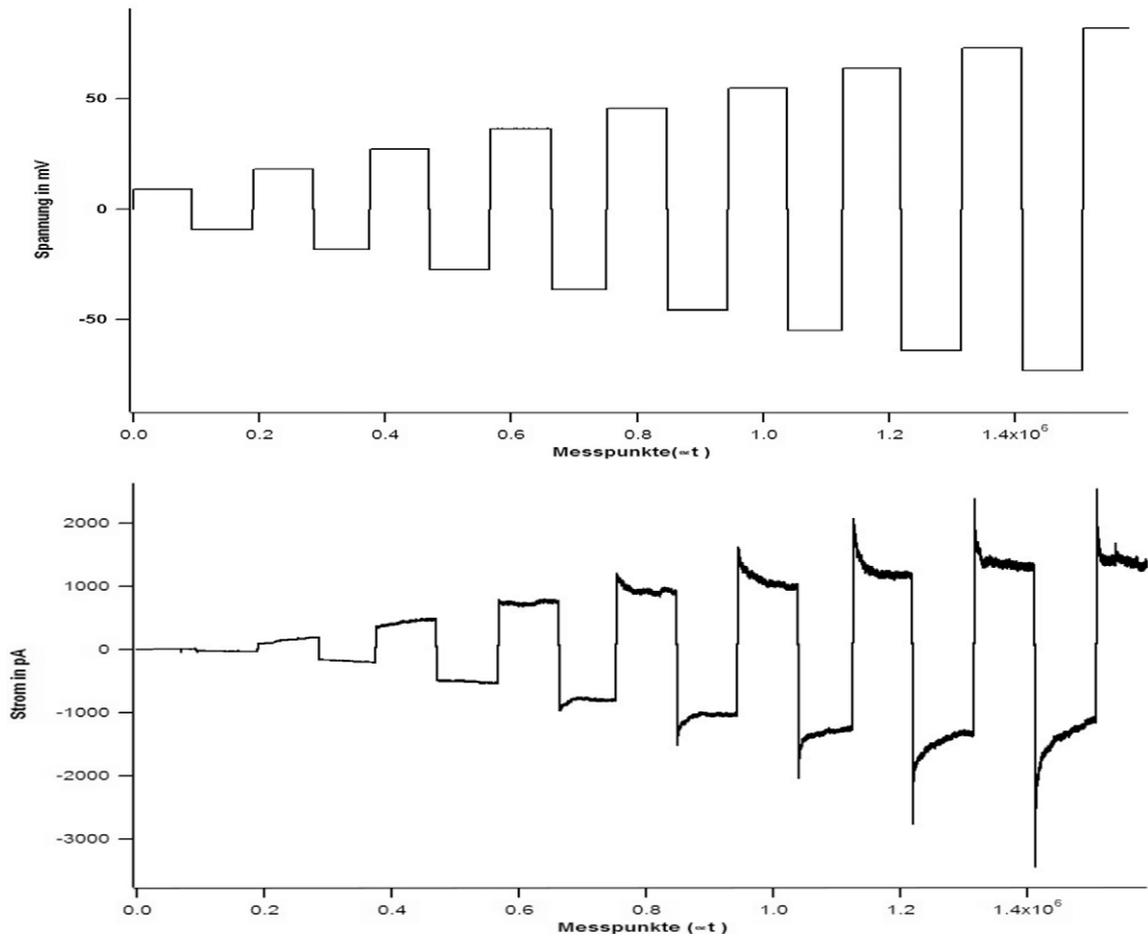
4.3.3.3 Messungen an der Mutante Q4

Die Mutante Q4 unterscheidet sich vom Wildtyp durch eine Mutation der 58. Aminosäure. Das negativ geladene Glutamat wurde durch ein neutrales Glutamin ersetzt. Es wurden sowohl Messungen der Einbaucharakteristik als auch der Schließkinetik durchgeführt.

**Abbildung 20****(Einbau Q4)**

zeigt eine Einbaucharakteristik der Mutante Q4. Die Positionen der gefundenen Stufen sind durch Markierungskreuze gekennzeichnet. Diese spezielle Messung wurde bei einer angelegten Spannung von 20,5mV durchgeführt und erstreckte sich über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten.

Die Auswertung der Messungen zur Einbaucharakteristik von Q4 lieferte einen Wert der durchschnittlichen Stufenhöhe von $3,1 \pm 0,9$ pA. Dies entspricht einer Leitfähigkeit von $0,15 \pm 0,04$ nS. Die Mutante Q4 entspricht also in ihrer Leitfähigkeit in etwa dem Wert der Leitfähigkeit des Wildtyps und zeigt somit keine signifikante Abweichung. Zusätzlich wurde an der Mutante Q4 auch eine Messung des Schließverhaltens durchgeführt.

**Abbildung 21****(Schließkinetik Q4)**

zeigt eine Messung der Schließkinetik von Q4. Im oberen Teil der Abbildung ist der angelegte zeitliche Spannungsverlauf dargestellt. Der untere Abbildungsteil zeigt den daraus resultierenden Stromverlauf über die Membran. Die gesamte Messung verlief über einen Zeitraum von ca. 11 Stunden und wurde in 100 mM KCl durchgeführt.

Der im unteren Teil der Abbildung 21 dargestellte Stromverlauf zeigt die typische Schließkinetik der Porine. Die Mutante Q4 verhält sich also auch in ihrem Schließverhalten wie ein normales Porin. Die Mutation von Glu58 zu Glutamin scheint, zumindest unter Verwendung von KCl als Elektrolyt, keinen signifikanten Einfluss auf den Ladungstransport bzw. die Leitfähigkeit zu haben.

5 Simulationsrechnungen zur Schließkinetik

5.1 Einleitung

Bereits wiederholt konnte bei Leitfähigkeitsmessungen an Porinen ein spannungsabhängiges Schließen der Ionenkanäle beobachtet werden. Der Mechanismus dieses Vorgangs und dessen Funktion *in vivo* sind umstritten (M. Brunen et al., 1995)⁴⁵, (M. Watanabe et al., 1997)⁴⁶, (J. Björkstén et al., 1994).⁴⁷ Als Möglichkeit wird in der Literatur ein Kollabieren der Pore genannt (K. Saxena et al., 1999)⁴⁸, (P. Vangelder et al., 1997).⁴⁹ Nach dem Anlegen einer konstanten Gleichspannung im Bereich zwischen $\pm 100\text{mV}$ kommt es zum Abfall des Stromes von einem Maximalwert bis zu einem Minimalniveau.

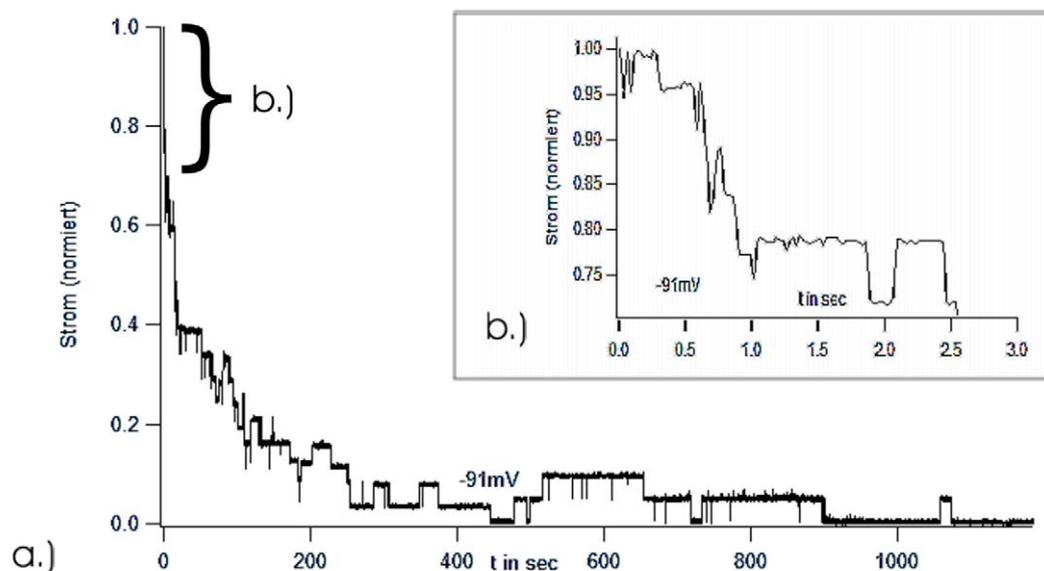


Abbildung 22

(Schließkinetik Omp32)

zeigt in Bildteil a.) die Darstellung einer Messung an rekombinant hergestelltem Omp32. Dabei handelt es sich um eine Messung der Schließkinetik des Proteins bei -91mV . Bildteil b.) zeigt eine Ausschnittsvergrößerung der ersten 3 Sekunden der Messung. Deutlich ist ersichtlich, dass auch der Starke Stromabfall während der Anfangsphase durch einzelne, diskrete Schließvorgänge verursacht wird.

Ob es sich dabei tatsächlich um einen entgültigen Sättigungszustand handelt, kann, bedingt durch die begrenzte Messdauer, nicht abschließend geklärt werden. Selbst nach längerer Messdauer war noch ein dann zwar deutlich schwächerer, aber nicht verschwindender Abfall des Ionenstroms über die Membran zu beobachten. Der relative Abfall ist im Allgemeinen umso stärker, je höher die angelegte Spannung ist. Bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit ließen sich solche Schließkinetiken ebenfalls für Omp32 nachweisen. Für Omp34 einem verwandten Porin aus dem Organismus *Acidovorax delafieldii*, wurde bereits früher ein ähnliches Schließverhalten gezeigt (M. Brunen et al., 1993).⁵⁰ Im Bildteil a.) von Abbildung 22 ist ein typischer Verlauf der Schließkinetik für Omp32 dargestellt, welcher im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurde. Das Beispiel zeigt den Stromverlauf bei einer angelegten Spannung von -91mV. Nach einem steilen Abfall zu Beginn der Messung zeigt der resultierende Strom ein verlangsamtes Schließverhalten, wobei die Schließvorgänge der einzelnen Porintrimere als Stufen im Stromverlauf erkennbar sind. Aus Darstellungsgründen wurde der Wert des Maximalstromes auf die Einheit 1 normiert. Die Stufenhöhe im Bildteil a.) wurde mit 0,02 Einheiten bestimmt. Dementsprechend handelt es sich um eine Messung an einer Membran mit ca. 50 inkorporierten Trimeren. Durch eine verbesserte Messwerterfassungstechnik mit höheren Scanraten im kHz-Bereich konnten die Kurven der Schließkinetik in hoher zeitlicher Auflösung gemessen werden. Die hohe Auflösung ermöglicht eine detaillierte Analyse der Kinetiken. Abbildung 22 b.) zeigt einen Detailausschnitt der ersten drei Sekunden aus der Messung, in dem ebenfalls deutlich Einzelstufen aufgelöst sind. Die Messung zeigt, dass der starke und schnelle Abfall der Stromkurve unmittelbar nach dem Anlegen einer

Spannung, wie er bei auch bei Omp34 beobachtet wurde, das Ergebnis einzelner Schließereignisse ist. Dieser Zusammenhang war bisher immer vermutet worden und konnte jetzt durch die verbesserte Messtechnik nachgewiesen werden.

Weder die Bedeutung noch die Funktionsweise dieses Schließverhaltens konnten bisher hinreichend geklärt werden. Um dennoch Rückschlüsse über den phänomenologischen Stromverlauf auf die Funktionsweise zu ermöglichen, wurden bereits früher (A. Mathes, 2000)⁵¹ verschiedene mathematische Modelle diskutiert, die geeignet sind, den experimentellen Stromverlauf zu simulieren. Eines der diskutierten Modelle ist der exponentielle Zerfall. Zeitlich exponentielle Verläufe sind in vielen biologischen Prozessen zu finden, da sie die Lösungen zu Differentialgleichungen bieten, wie sie immer auftreten, wenn die Änderung einer Population proportional zur Gesamtpopulation ist ($dN \propto N$). Bereits früh wurde für Porine die Theorie aufgestellt, dass sie nur zwei Schaltzustände annehmen könnten (G. Ehrenstein et al., 1977).⁵² Gemeinsam mit den Annahmen, dass die Anzahl der Porine in der Membran konstant bleibt und dass sich unter gleichen Bedingungen auch ein gleiches Verhältnis zwischen geschlossenen und offenen Porinpopulationen einstellt, erhält man den entsprechenden differentiellen Zusammenhang. Es zeigte sich jedoch, dass zur Simulierung der experimentellen Stromkurven eine einzige Exponentialfunktion nicht ausreichend ist. Die meisten Kurven bei verschiedenen Spannungen erfordern zumindest zwei, die bei hohen Spannungsbeträgen ($|U| \geq 70$ mV), sogar drei Exponentialfunktionen. Die einzelnen Exponentialfunktionen addieren sich dabei zu einer Gesamtfunktion. Insbesondere der bereits erwähnte starke Stromabfall bei hohen Spannungen

innerhalb der ersten Minuten, kann nur befriedigend mit drei Funktionen dargestellt werden. Damit muss es aber auch bis zu drei unterschiedliche Porinpopulationen geben, die in entsprechend unterschiedlichen Zeitskalen schalten. Bisher sind allerdings keine experimentellen Befunde bekannt, welche auf die Existenz unterschiedlicher Porinpopulationen hinwiesen. Zu den drei erforderlichen Zeitvariablen kommen bei drei Exponentialfunktionen noch drei weitere Amplitudenvariablen sowie eine weitere Variable für die Asymptote ($t \rightarrow \infty$). Bei insgesamt sieben Variablen ist eine Interpretation der Funktionszusammenhänge aus dem mathematischen Modell heraus nahezu unmöglich.

Als weiteres mathematisches Modell wurde der algebraische Zerfall diskutiert (A. Mathes, 2000).⁵¹ Auch mit Hilfe des algebraischen Zerfalls lassen sich die experimentellen Befunde hinreichend gut simulieren. Dieses Modell lässt den Schluss zu, dass die Kinetik die Eigenschaften einer negativen Kooperativität aufweist. Das bedeutet, dass ein geschlossenes Porin die übrigen offenen Poren schwächer zum Schließen anregt, als offene Porine. Hierin zeigt sich ein entscheidender Punkt dieses Modells: Alle Porine in der Membran müssen miteinander wechselwirken. Noch schärfer formuliert bedeutet dies, dass jedes individuelle Porin „Kenntnis“ über den aktuellen Schaltzustand aller anderen Porine in der Membran haben muss. Diese Bedingung setzte also eine langreichweitige Wechselwirkung über die gesamte Membran voraus. Mögliche Wechselwirkungen der Porine, wie Coulomb- oder van der Waals-Kräfte haben aber nur Reichweiten, die im besten Falle Auswirkungen auf die nächsten Nachbarn haben könnten. Als Konsequenz daraus bliebe nur der Schluss auf eine bisher unbekannte Wechselwirkung, welche durch ein gleichzeitig auf alle

Porine einwirkendes Medium, z.B. die Membran, vermittelt werden müsste. Bisher konnte in Experimenten kein Hinweis auf eine solche Wechselwirkung gefunden werden. Deshalb wurde hier ein weiteres Modell zur möglichen Erklärung der Schließkinetik entwickelt. Dieses und dessen Umsetzung in der Simulation ist im Folgenden beschrieben.

5.2 Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung

Einen Ausweg aus der Postulierung einer langreichweitigen Wechselwirkung, die der algebraische Zerfall nahe legt, bietet das Modell der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung. Dieses Modell beschränkt sich immanent auf die mögliche Wechselwirkung der Porine mit Ihren unmittelbaren Nachbarn. Porine tendieren sowohl in natürlichen als auch in künstlichen Membranen dazu, hexagonale Gitter zu bilden (A. C. Steven et al., 1977).⁵³ Somit ist jedes Porintrimer von sechs direkten Nachbarn umgeben. Ausgehend von kurzreichweitigen Wechselwirkungen wird der Schaltvorgang eines einzelnen Porins nur mehr durch die Wechselwirkungen mit seinen sechs Nachbarn beeinflusst. Im angewandten Simulationsmodell wird ebenfalls davon ausgegangen, dass jedes Porin nur zwei Schaltzustände annehmen kann: offen oder geschlossen. Die jeweiligen Schaltzustände der Nachbarn wirken sich dann auf das Schaltverhalten eines Porins aus. Dabei werden für alle Porine sieben mögliche Zustände unterschieden, die sich durch die Anzahl (N) der geschlossenen, umgebenden Nachbar(n) definieren ($N \in \{0, 1, \dots, 6\}$). Jedem dieser sieben Zustände wird ein Wahrscheinlichkeitswert zugeordnet, den Schaltzustand für ein Porin zu ändern. Die in dieser Arbeit angestellten Simulationen berücksichtigen zunächst nur Schließwahrscheinlichkeiten, d.h., nur ein noch

offenes Porin kann seinen Schaltzustand ändern und schließen. In einer modifizierten Programmversion ist auch eine Öffnungswahrscheinlichkeit implementiert worden, welche die Kurvenverläufe ebenfalls befriedigend simulieren kann.

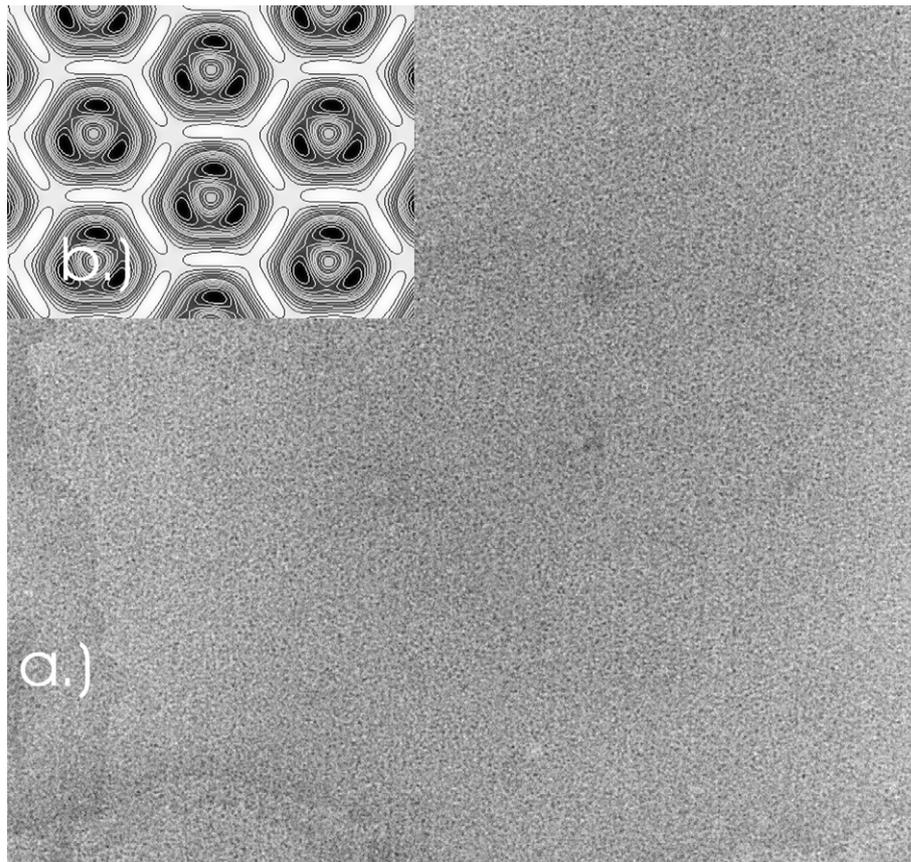


Abbildung 23

(2D-Kristall Omp34)

zeigt in Teil a.) einen planaren 2D-Kristall des Proteins Omp34 und im Bildteil b.) die computerberechnete Mittelung des Kristalls. Die Porine sind in der Membran dicht gepackt, jedes Omp34-Molekül besitzt sechs direkte Nachbarmoleküle.

Die hier beschriebenen Untersuchungen beschränken sich aber auf die Schließwahrscheinlichkeiten. Dieses Vorgehen ist insofern zulässig, da die

meisten Schließkinetikkurven einen monotonen Abfall zeigen. Gelegentliche, eventuelle Wiederöffnungen von einzelnen Porinen verschwinden dabei im Rauschen der Messung. Lediglich die Kurven zu niedrigen Membranspannungen ($|U| < 30$ mV) zeigen nicht den monotonen Abfall. Somit ist in diesen Fällen allerdings auch nicht von einem Schließverhalten auszugehen. Eine Verbesserung der Simulation durch die Einführung von Öffnungswahrscheinlichkeiten dient im Wesentlichen nur dazu, das Rauschverhalten der Kurven besser darstellen zu können. Die Simulationen mit reinen Schließverhalten können den Kurvenverlauf aber bereits hinreichend gut simulieren.

5.3 Der Simulationsalgorithmus

Ziel der Simulation ist die Berechnung von Schließkurven zu gegebenen Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten. Dafür wird zunächst eine quadratische Matrix binärer Elemente angelegt. Diese Matrix ist die orthogonale Transformation eines hexagonalen Gitters, wie es von den Porinen in einer Membran gebildet wird. Jeder Gitterplatz stellt ein Porin dar, der zugehörige binäre Inhalt beschreibt dessen Schaltzustand (1 für ein offenes Porin; 0 entsprechend für ein Geschlossenes). Die Dimension der Matrix repräsentiert somit die Gesamtanzahl der simulierten Porine. Bei den hier angestellten Rechnungen wurde eine Dimension von 20×20 Elementen, also 400 Porinen gewählt. Diese Anzahl entspricht in ihrer Größenordnung jener Porinanzahl, die in den zu simulierenden Kurven vermessen wurde. Zusätzlich zu den 400 Porinen der Matrix wird ein Rand definiert, der im Simulationsprogramm frei gewählt werden kann. Er kann aus offenen, geschlossenen, oder einem wählbaren Verhältnis von offenen und geschlossenen Porinen bestehen. Es wurde hier ein Rand aus offenen Porinen angenommen. Die Simulation der

Messkurven verläuft nun nach folgendem Schema: Zu Beginn der Simulation sind alle Porine geöffnet. Dieser Zustand entspricht dem des maximalen Stromwertes zu Beginn der Messungen einer Schließkinetik. Der maximale Strom zu Beginn der Messung wird genau wie der maximale Strom der Simulation auf Eins normiert. Da jedes Porin den gleichen Anteil zum Gesamtstrom liefert, ist auch in der Simulation der Strom proportional zur Gesamtzahl der offenen Porine. Nun wird die Matrix Element für Element betrachtet und über alle direkten Nachbarelemente addiert. Die resultierende Summe gibt das vorhandene Nachbarschaftsverhältnis an. Der Algorithmus sucht nun aus dem Wahrscheinlichkeitsvektor das entsprechende Element. Der Computer generiert eine Zufallszahl zwischen 1 und 0, vergleicht diese mit der Schließwahrscheinlichkeit aus dem Wahrscheinlichkeitsvektor, um zu entscheiden, ob das dem aktuellen Matrixelement entsprechende Porin zu schließen ist. Sind alle Matrixelemente abgearbeitet, so werden die Zustandsgrößen aller Matrixelemente addiert. Diese Summe wird auf den Gesamtstrom aller Porine normiert und liefert so den nächsten Punkt der Simulationskurve. Das Abbruchkriterium für die Simulation einer Messkurve ist erreicht, wenn die Anzahl der berechneten Punkte der Simulationskurve mit der Anzahl der Messpunkte übereinstimmt. Die Umsetzung der Simulationsalgorithmen erfolgte durch Programmierung von Makros in Igor Pro 5, einer Plattform zur wissenschaftlichen Auswertung von Daten und Kurven. Igor Pro 5 ist ein Produkt der Firma WaveMetrics, Inc.

5.4 Bestimmung der Wechselwirkungs-Wahrscheinlichkeiten

Diese Routine berechnet zu einer gegebenen Messkurve die dazugehörigen Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten. Beim Start des Programms werden zunächst sieben Obergrenzen der Wahrscheinlichkeitswerte vorgegeben, die anschließend in einer Serie von Intervallschachtelungen verbessert werden. Die Vorgabe von oberen Grenzen ist optional zur Beschleunigung der Berechnung. Es wurden meist Intervallmaxima von 0,5 gewählt, da die Erfahrung gezeigt hat, dass Wahrscheinlichkeitswerte größer als 0,5 nicht zu brauchbaren Simulationskurven führten. In den gerechneten Beispielen war ein maximaler Anfangswert von 0,2 für die Simulationsrechnungen bereits geeignet, um befriedigende Resultate zu erzielen. Die sieben Obergrenzen werden als Komponenten in einen Wahrscheinlichkeitsvektor geschrieben. Der Algorithmus halbiert nun die Intervalle zwischen 0 und den Obergrenzen, nimmt daraus die Mitte der oberen Hälfte und die Mitte der unteren Hälfte als neue Wahrscheinlichkeitswerte. Da es sieben Wahrscheinlichkeitswerte zu optimieren gilt, und für jeden Wert immer zwei mögliche Intervallmitten zu testen sind, entstehen nach der Kombinatorik 128 unabhängige Möglichkeiten. Um den zufälligen Fehler zu verringern, werden für jede dieser 128 Möglichkeiten zwischen 10 und 20 Simulationskurven berechnet. Aus diesen Kurven werden das arithmetische Mittel und die mittlere quadratische Abweichung der gemittelten Simulation zur Messkurve ermittelt. Die Werte dieser 128 Standardabweichungen werden in einem Vektor gespeichert. Die minimale Komponente dieses Vektors gibt die optimale Kombination von neuen Intervallgrenzen für den nächsten Rechenzyklus vor. Damit ist ein Intervallschachtelungsdurchlauf beendet und das Programm startet mit dem Nächsten

unter Verwendung der neuen Intervallgrenzen. Die Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsparameter wurde in der Regel nach 15 Durchgängen der beschriebenen Routine beendet. Dieses Vorgehen ist zulässig, da die Wahrscheinlichkeitswerte nach 15 Intervallschachtelungen bereits auf fünf Stellen genau berechnet werden würden. Bei vierhundert Porinen und maximal 20 Simulationen pro Durchlauf ist eine weitere Verbesserung der Wahrscheinlichkeitswerte nicht mehr sinnvoll.

5.5 Resultate der Simulationsberechnungen

5.5.1 Omp34

Die Simulationsrechnungen wurden zunächst mit Messkurven des Porins Omp34 durchgeführt, um die Ergebnisse mit den anderen Modellen und mit den Daten von Omp32 vergleichen zu können. In Abbildung 24 ist die Schließkinetik des Porins dargestellt, wobei insbesondere der zunächst starke und später bedeutend schwächere Abfall des Stromes nach Anlegen einer Spannungsstufe erkennbar ist. Ziel der Simulationsrechnungen war es, genau diesen Verlauf mit Hilfe des Nächsten-Nachbar-Wechselwirkungsmodells darzustellen. Die dabei erhaltenen Wahrscheinlichkeitswerte für die Wechselwirkungen der unterschiedlichen Nachbarschaftsverhältnisse bieten eine Grundlage für die Bewertung der Natur dieser Wechselwirkung.

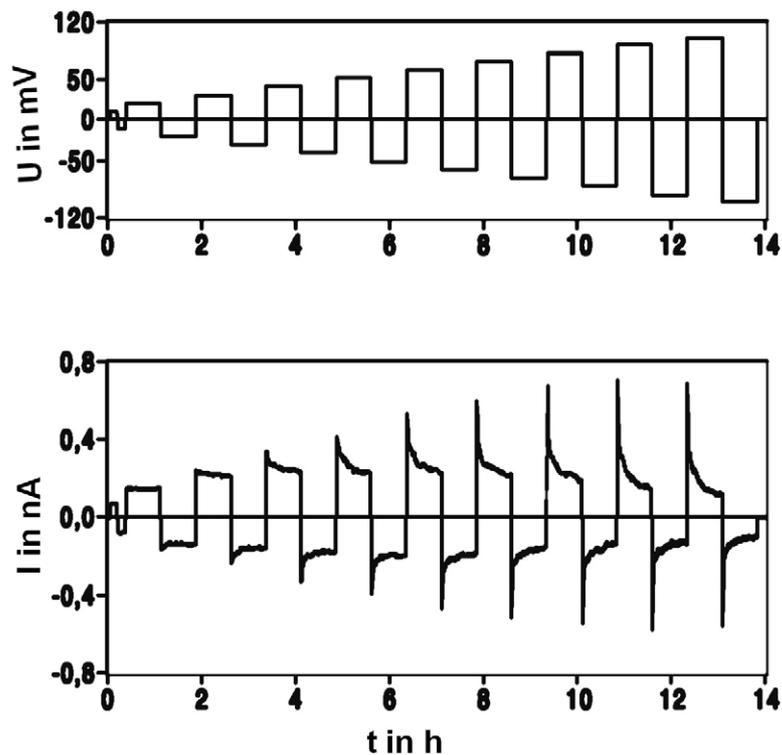
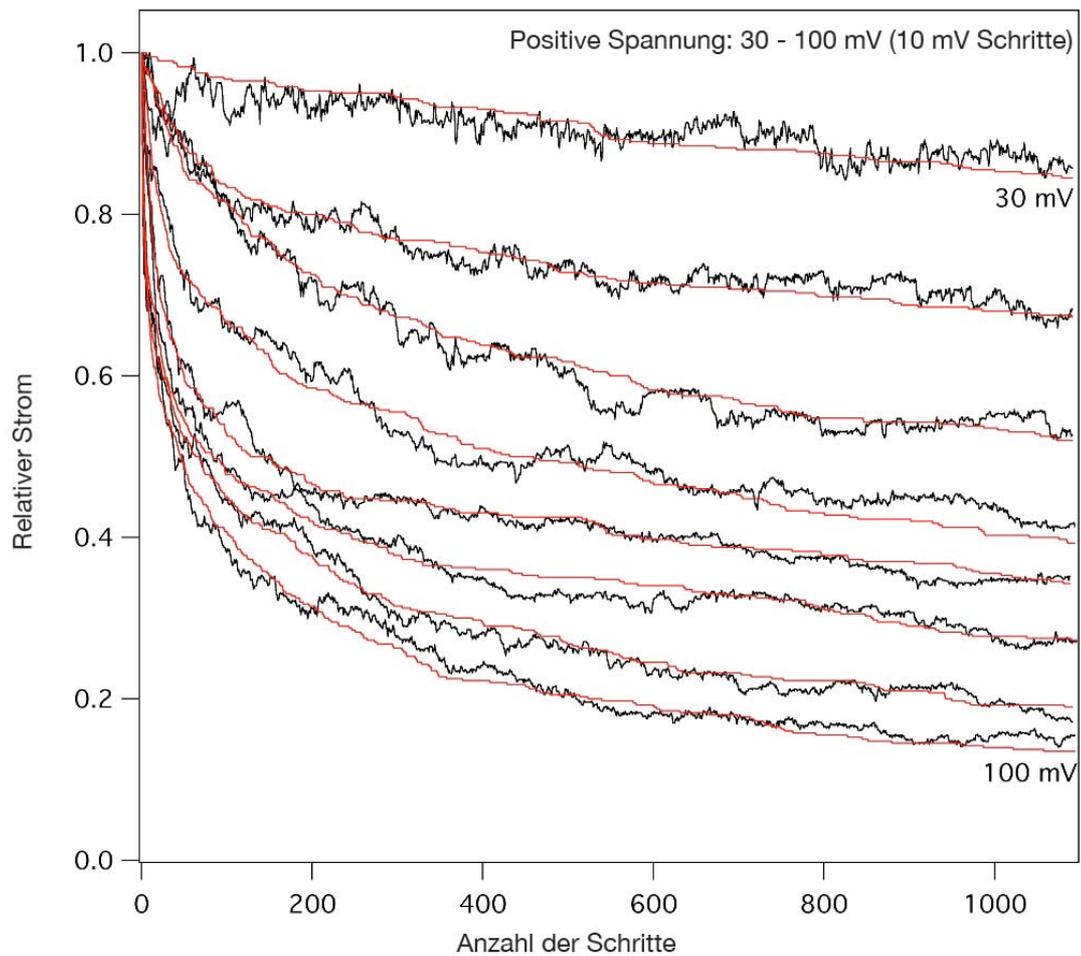


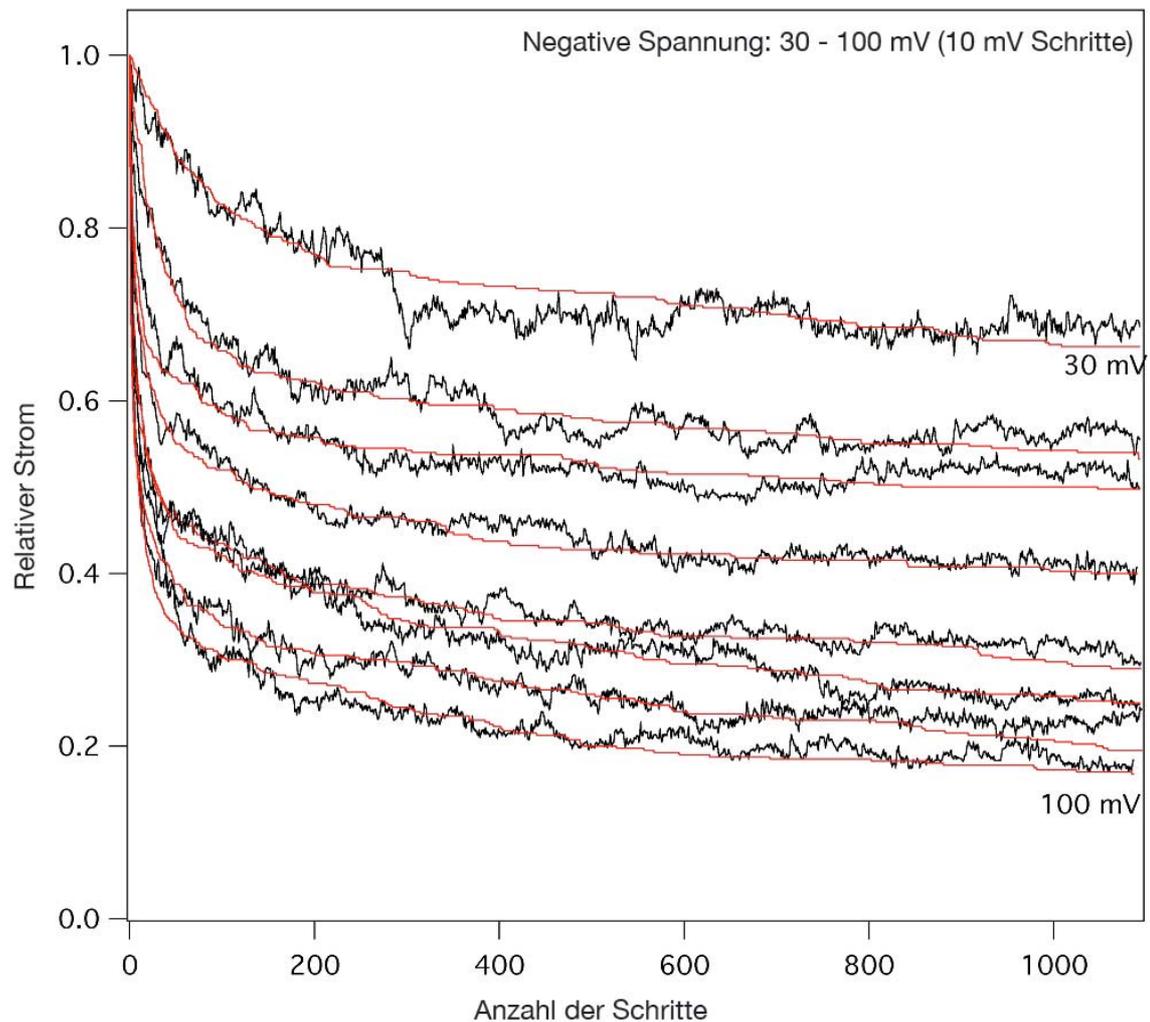
Abbildung 24 (Schließkinetik Omp34)

Messdaten zur Schließkinetik von Omp 34 (A. Mathes, 2000).⁵⁴ Im oberen Bildteil ist der angelegte Spannungsverlauf dargestellt, im unteren Bildteil parallel dazu der daraus resultierende Strom durch die Porine in der Membran. Die Stromkurven zeigen den typischen Verlauf der Schließkinetiken.

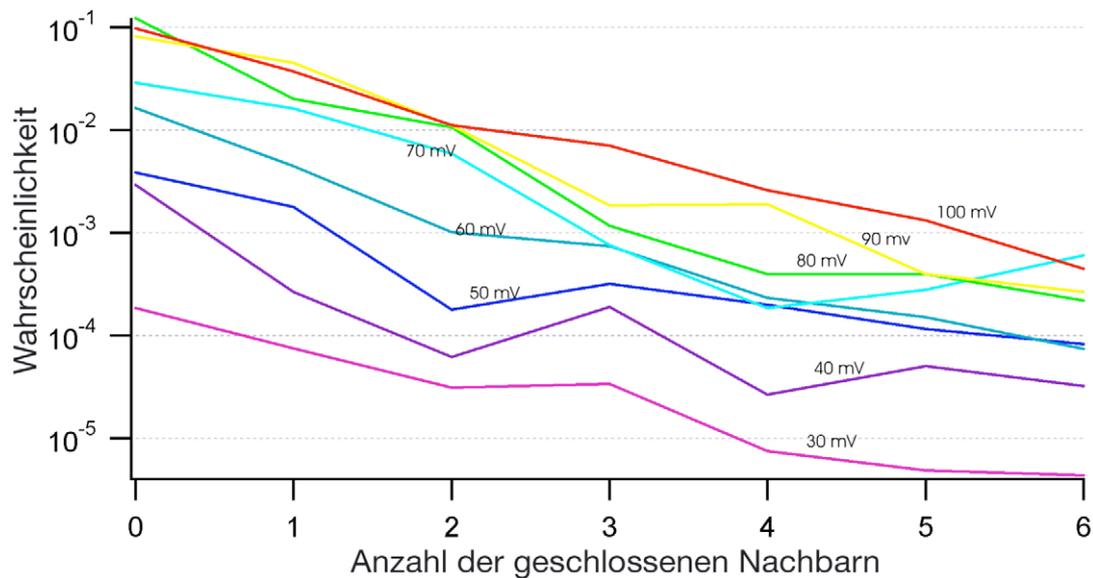
Abbildung 25 und Abbildung 26 belegen die Möglichkeit, die gemessenen Stromverläufe mittels des Modells der Wechselwirkung zwischen den nächsten Nachbarn zu simulieren. Es lassen sich für alle Stromkurven der Schließkinetik sieben Wahrscheinlichkeitsparameter der möglichen Nachbarschaftsverhältnisse finden, so dass die dazugehörige Simulation die realen Stromkurven mit hinreichender Genauigkeit nachzeichnet.

**Abbildung 25****(Simulation pos. Spannung)**

zeigt die Stromverläufe aus Abbildung 24 zu positiven Spannungswerten zwischen +30 mV und +100 mV in schwarzer Farbe. Die Stromwerte wurden für den maximalen Strom auf 1 normiert. Die in rot (grau) dargestellten Kurven stellen die zugehörigen simulierten Stromverläufe dar. Die x-Achse gibt die Anzahl der gemessenen und simulierten Punkte wieder.

**Abbildung 26****(Simulation neg. Spannung)**

zeigt die Stromverläufe aus Abbildung 24 zu negativen Spannungswerten zwischen -30 mV und -100 mV in schwarzer Farbe. Die Stromwerte wurden für den maximalen Strom auf 1 normiert. Die in rot (grau) dargestellten Kurven stellen die zugehörigen simulierten Stromverläufe dar. Die x-Achse gibt die Anzahl der gemessenen und simulierten Punkte wieder.

**Abbildung 27****(WW-Parameter)**

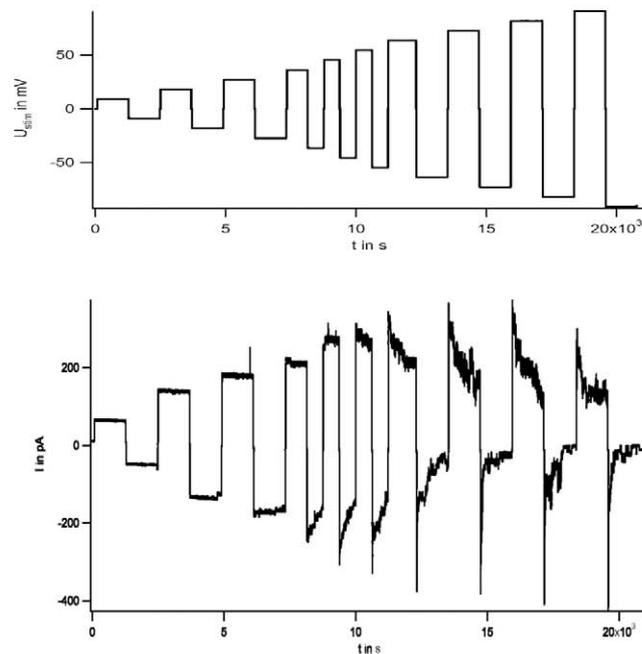
ist eine Darstellung berechneter Wahrscheinlichkeitsparameter der Simulation verschiedener Schließkinetiken von Omp34 bei positiven Spannungen. Die farbigen Kurven geben die Verbindung der diskreten Wahrscheinlichkeitswerte wieder, verschiedene Farben repräsentieren dabei die Wahrscheinlichkeitswerte zu verschiedenen Spannungen. Auf der vertikalen Achse sind die absoluten Wahrscheinlichkeitswerte in logarithmischer Darstellung aufgetragen. Die horizontale Achse ordnet den Wahrscheinlichkeitswerten die entsprechenden Nachbarschaftsverhältnisse zu.

Die in Abbildung 27. aufgetragenen Wahrscheinlichkeitswerte zeigen deutlich den Zusammenhang einer negativen Kooperativität. Das heißt, die Anzahl der bereits geschlossenen Nachbarporine senkt die Wahrscheinlichkeit eines einzelnen offenen Porins, ebenfalls in den geschlossenen Zustand zu wechseln. Allgemein lässt sich ablesen, dass die Wechselwirkung umso stärker ist, je mehr offene Proteine vorhanden sind. Desweiteren kann, da sich die einzelnen Verbindungskurven kaum schneiden, aus der Darstellung direkt abgelesen werden, dass die Schließwahrscheinlichkeiten zu gleichen Nachbarschaftsverhältnissen mit höherer Spannung ebenfalls größer sind. Hier sind, um

die Übersichtlichkeit zu bewahren, nur die berechneten Wahrscheinlichkeitswerte zu Messkurven mit positiven Spannungen aufgetragen. Die Wahrscheinlichkeitswerte zu den negativen Spannungen zeigen ein analoges Verhalten. Die Verbindungslinien der Wahrscheinlichkeitswerte zu gleichen Spannungen scheinen in dieser Darstellung annähernd auf Geraden zu liegen. Durch die logarithmische Auftragung legt dies eine eventuelle exponentielle Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeitsparameter nahe. Die Parameter scheinen mit der zunehmenden Anzahl von geschlossenen Nachbarn exponentiell abzunehmen. Dieser Zusammenhang würde eine Vereinfachung des Modells erlauben, da nicht mehr sieben unabhängige Wahrscheinlichkeitsparameter benötigt werden. Es wurde versucht, eine entsprechende exponentielle Abhängigkeit in weitere Simulationsrechnungen einzubinden. Es zeigte sich jedoch, dass die Simulationen bei erzwungener exponentieller Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeitsparameter schlechtere Resultate brachten. Dies spricht nicht grundsätzlich gegen einen solchen Zusammenhang, er lässt sich aus den vorliegenden Daten aber nicht mit befriedigender Genauigkeit ableiten.

5.5.2 Rekombinantes Omp32

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die Schließkinetiken von rekombinantem Omp32 gemessen. In Abbildung 28 ist eine derartige Messung exemplarisch dargestellt. Das rekombinante Omp32, wie auch der Wildtyp, zeigen ein Schließverhalten ähnlich dem von Omp34. Bei beiden Proteinen folgt auf einen steilen Abfall des transmembranen Stromes eine schwächere Abnahme. Ebenso steigt im Allgemeinen der absolute Abfall des Stromes mit zunehmender Höhe der angelegten Spannung.

**Abbildung 28****(Schließkinetik Omp32)**

zeigt eine exemplarische Messung zum Schließverhalten von rekombinantem Omp32 im oberen Bildteil ist das angelegte Spannungsprofil dargestellt, im unteren Bildteil der daraus resultierende Stromverlauf. Bei höheren Spannungswerten zeigt die Stromkurve auch hier den typischen Verlauf einer Schließkinetik.

Da Omp32 ebenso wie Omp34 in Membranen dazu neigt, eine hexagonale Anordnung zu bilden, ist es möglich, das Simulationsmodell der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung auch auf das Schließverhalten von Omp32 anzuwenden. Zur Simulation wurden Schließkurven zu einzelnen Spannungswerten aus verschiedenen Messungen ausgewählt. Um die Rechenzeiten der Simulationsrechnungen auf einem vertretbaren Niveau zu halten, wurde die Anzahl der Datenpunkte der Schließkurven auf tausend Messpunkte reduziert.

Dieser Schritt war insbesondere notwendig, da die verbesserte Messtechnik, mit ihrer Möglichkeit von Scanraten im kHz-Bereich, entsprechend große Datenmengen erzeugt. Die Messdaten der Schließkinetiken wurden in automatisierten Langzeitmessungen aufgenommen. Die Messungen der Schließkurven zu einzelnen Spannungen dauerten dabei zwischen fünfzehn und dreißig Minuten, was einer Anzahl $N_{\text{Messpunkte}}$ von Messpunkten zwischen 900.000 und 1.800.000 entspricht. Für eine Simulation auf handelsüblichen Tischrechnern (PCs) ist dieses Datenaufkommen zu groß, da für jeden Iterationsschritt der Simulation bei sieben Wahrscheinlichkeitsparametern ($2^7=$) 128 Simulationskurven mit jeweils $N_{\text{Messpunkte}}$ zu berechnen sind. Daher wurden die Messdaten durch Mittelung über die nächsten Nachbarn in mehreren Schritten auf eine Anzahl von 1000 Messpunkten reduziert. Damit einher geht zwar auch eine Glättung der Kurve, aber durch geeignete Mittelung konnten die charakteristischen Stufen der Schließkurven bewahrt werden.

In Abbildung 29 sind mehrere Schließkurven zu positiven Spannungswerten zwischen +40mV und +91mV aus verschiedenen Einzelmessungen aufgetragen. Messungen am rekombinanten Omp32 zu kleineren Spannungswerten zwischen +10mV und +30mV zeigten keine, beziehungsweise nur eine geringe Tendenz zum Schließverhalten (vgl. Abbildung 28). Dieser Umstand und die Tatsache, dass *in vivo* über die äußere Membran nur Potentiale bis zu 30 mV vorhanden sind (K. Sen et al., 1988),⁵⁵ begründet die Zweifel, ob der Effekt des spannungsabhängigen Schließens auch eine physiologische Bedeutung innehat. Diese Beobachtung eines verringerten Schließens bei kleineren absoluten Werten der Spannung entspricht auch dem bei Omp34 beobachteten Verhalten.

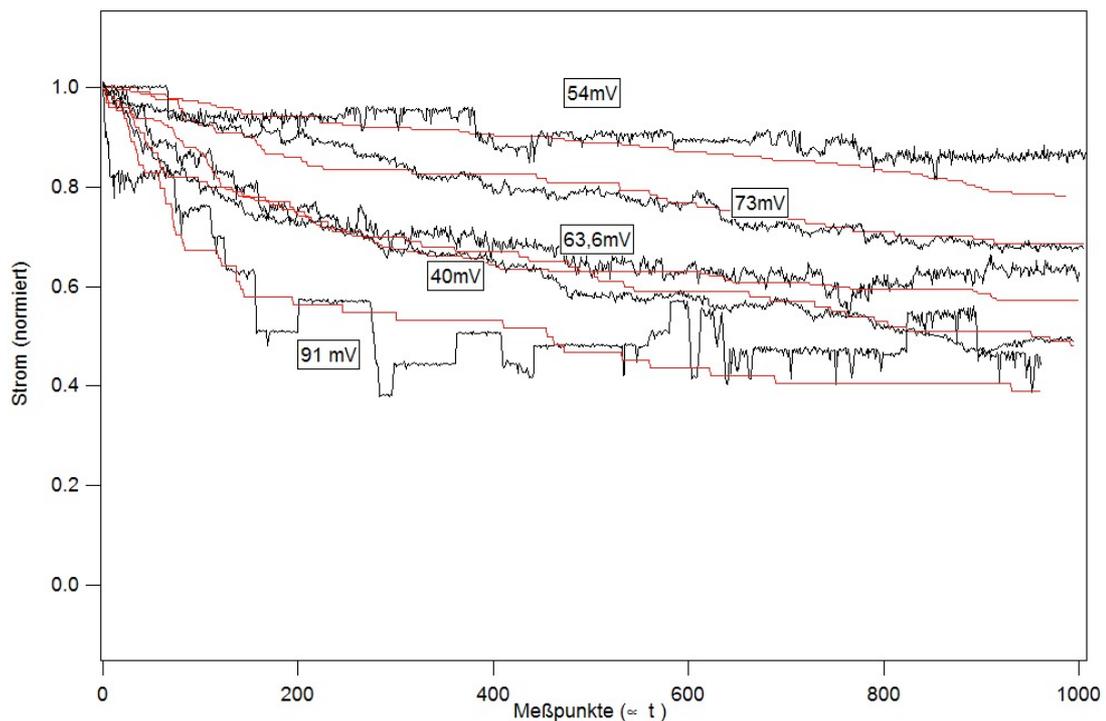


Abbildung 29 (Simulation pos. Spannung)
 zeigt das Schließverhalten von rekombinantem Omp32 zu positiven Spannungswerten zwischen +40 mV und +91 mV in schwarzer Farbe. Die Stromkurven entstammen mehreren Messungen analog der in Abbildung 28 dargestellten Messung. Die Stromwerte wurden für den maximalen Strom auf 1 normiert. Die in rot (grau) dargestellten Kurven stellen die zugehörigen simulierten Stromverläufe dar. Die x-Achse gibt die Anzahl der gemessenen und simulierten Punkte wieder.

In derselben Abbildung wurden die entsprechenden Simulationskurven in roter (bzw. grauer) Farbe dargestellt. Die Originalmesskurven weisen neben der generellen Schließetendenz auch vereinzelte „Öffnungsereignisse“ auf. Aus den Messdaten kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob diese „Öffnungsereignisse“ ursächlich mit einer Wiederöffnung bereits geschlossener Porine, oder mit einem fortgesetzten Porineinbau in die Membran während des Langzeitexperimentes verbunden sind. Bei den im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführten Messungen zur Schießkinetik wurde, nach der Zugabe der Proteinlösung und vor Beginn der Messungen, immer ein Zeitraum von ca. neunzig Minuten abgewartet, um die Anzahl der Einbauereignisse während des Messvorganges so gering wie möglich zu halten. Die Beobachtung des Verlaufes der Einbauereignisse zeigte, dass in der Regel nach diesem Zeitraum die Anzahl der Einbauereignisse eine Art Sättigung erreicht hatte. Eine Aussage über die Ursache der „Öffnungereignisse“ zu treffen gestaltet sich schwierig, da die Leitfähigkeitsmessungen keine Möglichkeit bieten, reale Öffnungereignisse von Einbauereignissen zu unterscheiden. Zusätzlich kann auch der Vergleich mit älteren Messungen nicht zu einer befriedigenden Unterscheidung führen, da gerade die Einbauereignisse sehr stark abhängig von den experimentellen Rahmenbedingungen sind. Speziell spielt die Art der verwendeten Detergenzien, selbst in geringen Konzentrationen, sowie deren Einwirkzeit auf das Protein, eine entscheidende Rolle für das Einbauverhalten. Der Zustand des durch Isolation, Rückfaltung und Reinigung dargestellten rekombinanten Omp32 unterscheidet sich allerdings von dem des gereinigten Wildtypproteins so, dass ein, durch die biochemischen Rahmenbedingungen verändertes, Einbauverhalten nicht mit Bestimmtheit ausgeschlossen werden kann. Der verwendete Simulationsalgorithmus berücksichtigt daher auch nur die generelle, dominierende Schließ Tendenz. Das heißt, es wurden keine Öffnungswahrscheinlichkeiten eingeführt, wodurch die Simulationskurven, im Gegensatz zu den realen Messkurven auch hier, immer eine monoton fallende Tendenz aufweisen.

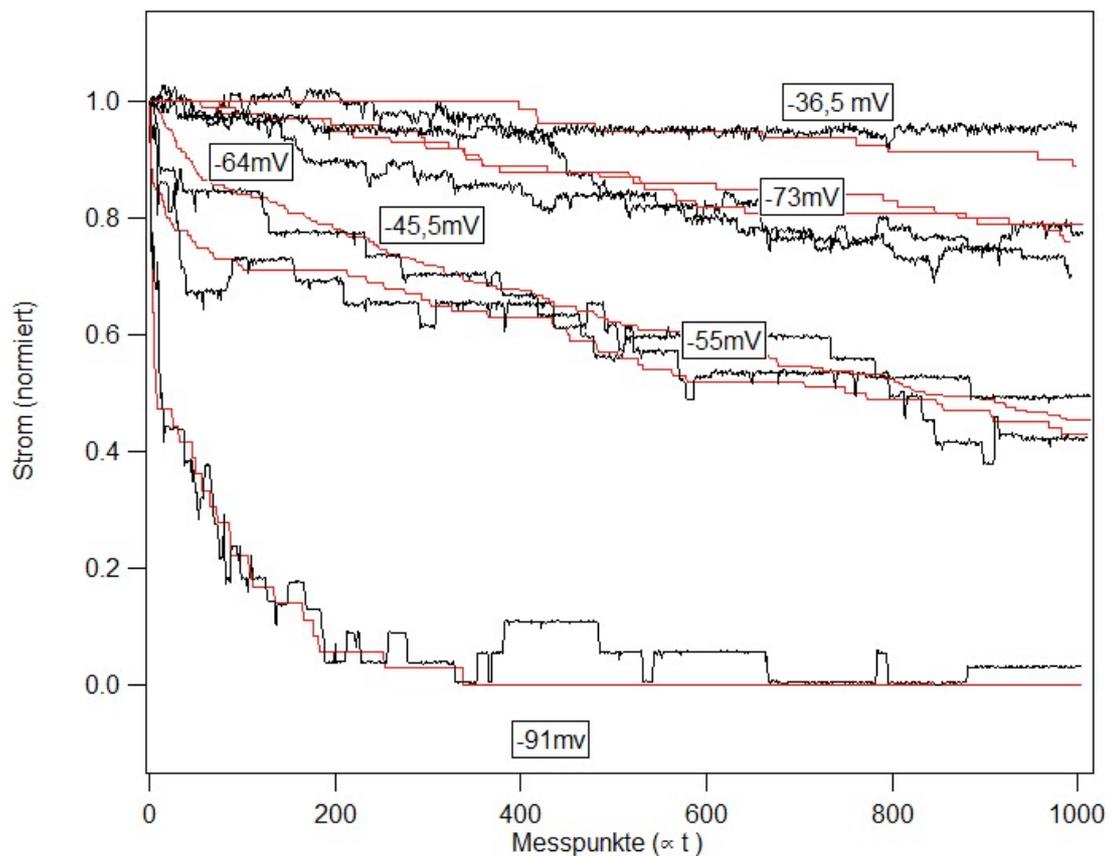


Abbildung 30 (Simulation neg. Spannung)
 zeigt das Schließverhalten von rekombinantem Omp32 zu negativen Spannungswerten zwischen $-36,5$ mV und -91 mV in schwarzer Farbe. Die Stromkurven entstammen mehreren Messungen analog der in Abbildung 28 dargestellten Messung. Die Stromwerte wurden für den maximalen Strom auf 1 normiert. Die in rot (bzw. grau) dargestellten Kurven stellen die zugehörigen simulierten Stromverläufe dar. Die x-Achse gibt die Anzahl der gemessenen und simulierten Punkte wieder.

In Abbildung 30 sind in schwarzer Farbe die Schließkurven zu unterschiedlichen negativen Spannungswerten zwischen $-36,5$ mV und -91 mV aus unterschiedlichen Messungen, zusammen mit den entsprechenden Simulationskurven rot (bzw. grau) dargestellt. Die Schließkurve zu -73 mV weist im Bereich zwischen dem ca. 390ten und dem 450ten Messpunkt ein lokales

Maximum auf. Der Anstieg zu diesem lokalen Maximum wird durch „Öffnungereignisse“ ab dem 390ten Messpunkt eingeleitet. Die Simulationskurve kann diesem Anstieg nicht folgen, und zeigt im Gegensatz dazu ein fortgesetzt fallendes Verhalten.

Auffallend in Abbildung 29 und Abbildung 30 ist weiterhin, dass die Stärke des Schließverhaltens der einzelnen Messkurven in keinem Zusammenhang mit unterschiedlichen absoluten Spannungswerten zu stehen scheint. In Abbildung 25 und Abbildung 26 zu Omp34 zeigen die Schließkurven deutlich, dass das Schließverhalten mit zunehmender Spannung ausgeprägter ist. Die Messkurven liegen mit zunehmender Spannung in entsprechender Reihenfolge untereinander. Anders als bei der entsprechenden Darstellung zu Omp34 scheint das Schließverhalten von rekombinantem Omp32 nicht mit zunehmender Spannung stärker ausgeprägt zu sein. Die Lage der Messkurven unterschiedlicher Spannungen zueinander erscheint zufällig zu streuen. Dieses Phänomen resultiert jedoch daraus, dass die einzelnen Messkurven aus unterschiedlichen Messungen verschiedener Einzelexperimente stammen. Die Messungen an verschiedenen Membranen mit jeweils wieder verschiedenen Anzahlen von inkorporierten Porinen können daher nicht direkt verglichen werden, um einen Zusammenhang zwischen dem Schließverhalten und der angelegten Spannung abzuleiten. Für die einzelnen Messungen hingegen konnte dieser Zusammenhang jedoch bestätigt werden. In Abbildung 30 beispielsweise stammen die Messkurven zu -45,5 mV, -55 mV und -91 mV aus einem Einzelexperiment an einer Membran mit ca. 50 darin inkorporierten Porinen. Diese drei Messkurven zeigen den typischen Zusammenhang zwischen Schließverhalten und angelegter Spannung.

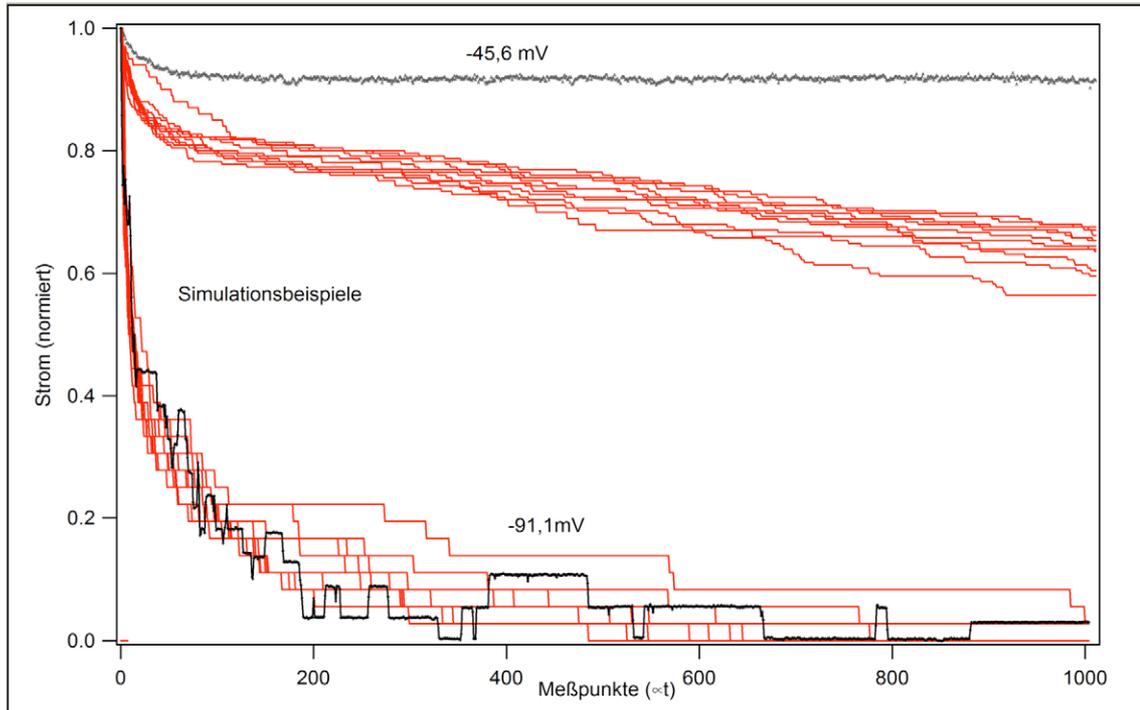


Abbildung 31 (Simulationen)

zeigt in schwarzer Farbe die Darstellung zweier exemplarischer Schließkurven zu angelegten Spannungen von $-45,5 \text{ mV}$ und $-91,1 \text{ mV}$. Zusätzlich sind in roter (bzw. grauer) Farbe jeweils 10 simulierte Kurven dargestellt. Die Simulationskurven wurden unter Anwendung von Wahrscheinlichkeitsparametern berechnet, welche nach 12 Iterationsschritten erhalten wurden. Die Kurven zu höheren Spannungswerten lassen sich besser mit dem Simulationsalgorithmus simulieren.

Dort, ebenso wie in der Abbildung 28, lässt sich dieser Zusammenhang auch für rekombinantes Omp32 qualitativ entnehmen. Allerdings konnten nicht alle Messkurven zufriedenstellend simuliert werden, insbesondere bei Simulationen zu Messkurven geringer absoluter Spannungswerte ($|U| \leq 45 \text{ mV}$) erwies sich der Simulationsalgorithmus als zu steif, als dass eine befriedigende Simulation hätte erzielt werden können. In Abbildung 31 ist ein derartiges Beispiel dargestellt. Die dort in schwarz dargestellte Messkurve zeigt nach einem sehr

kurzen Abfall einen nahezu konstanten Verlauf, sogar mit einer geringen Tendenz zu Wachstum im mittleren Teil der Kurve.

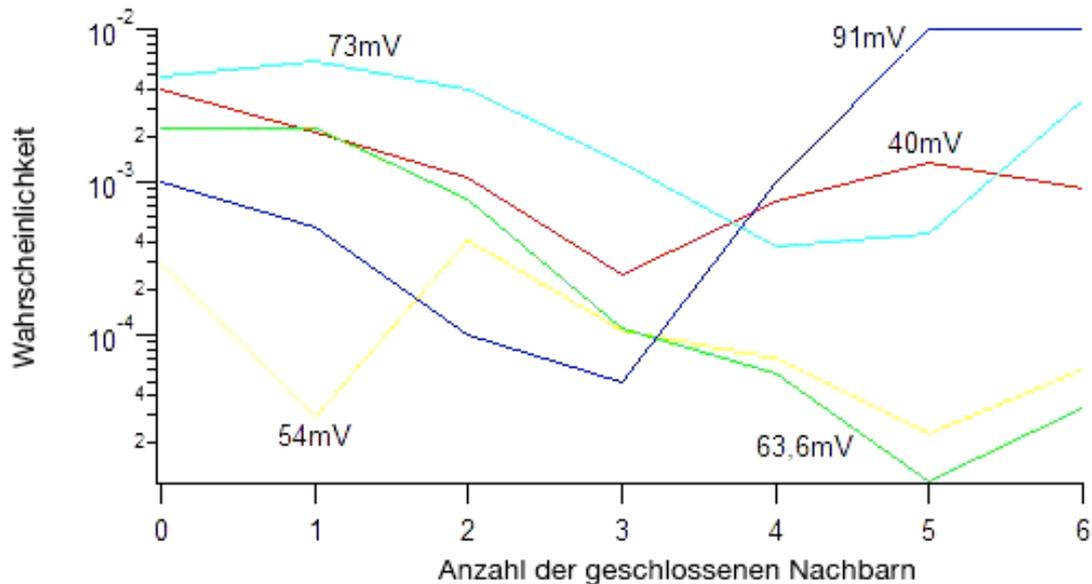


Abbildung 32

(WW-Parameter)

ist eine Darstellung berechneter Wahrscheinlichkeitsparameter der Simulationen für verschiedene Schließkinetiken von rekombinantem Omp32 bei positiven Spannungen. Die farbigen Kurven geben die Verbindung der diskreten Wahrscheinlichkeitswerte wieder, verschiedene Farben repräsentieren dabei die Werte verschiedener Spannungen zwischen 40 mV und 91 mV. Auf der vertikalen Achse sind die absoluten Wahrscheinlichkeitswerte in logarithmischer Darstellung aufgetragen. Die horizontale Achse ordnet den Wahrscheinlichkeitswerten die entsprechenden Nachbarschaftsverhältnisse zu.

Allerdings können diese Befunde nicht dahingehend gedeutet werden, dass das Modell der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung generell ungeeignet ist, um das spannungsabhängige Schließverhalten der Porine zu beschreiben. Dafür gibt es zwei Gründe: zum einen stellt der Simulationsalgorithmus eine parallele Intervallschachtelung für die sieben Wahrscheinlichkeitsparameter dar. Abhängig von den frei wählbaren Anfangswerten der Wahrscheinlichkeits-

parameter generiert der Rechner einen Satz von Parametern, welche die Abweichung der simulierten Kurve von der Messkurve minimiert. Dabei werden nicht alle möglichen Parameterkombinationen ausgetestet, d.h. es kann keine Aussage getroffen werden, ob es sich bei den gefundenen Parameterwerten um die einzig- oder bestmögliche Kombination von Parameterwerten handelt. Insbesondere ist der Algorithmus nicht davor gefeit, in einem lokalen Minimum der quadratischen Abweichung „gefangen“ zu werden.

Zum anderen berücksichtigt der Simulationsalgorithmus in seiner derzeitigen Version nicht die ebenfalls beobachteten „Öffnungereignisse“. Für eine sinnvolle Integration dieser Ereignisse ist es insbesondere notwendig, den Charakter dieser Ereignisse zu studieren, um Öffnen von Einbau differenzieren zu können.

In Abbildung 32 sind die berechneten Wahrscheinlichkeitsparameter zu den in der Abbildung 29 dargestellten Simulationsrechnungen dargestellt. Die Wahrscheinlichkeitsparameter der Simulationsrechnungen zu rekombinatem Omp32 scheinen nur eine geringe Tendenz zur negativen Kooperativität aufzuweisen. So zeigt Abbildung 32 scheinen die Wahrscheinlichkeitswerte einiger Parametersätze für Nachbarschaftsverhältnisse mit 4, 5 oder 6 geschlossenen Nachbarn, die größere Werte annehmen. Diese Daten müssen jedoch nicht zwangsläufig einer negativen Kooperativität widersprechen. Bei den zugehörigen Originaldaten in Abbildung 29 fällt auf, dass der absolute Abfall der Stromwerte in den Messkurven nur bis auf ca. fünfzig Prozent des Anfangstromwertes reicht. In der Übertragung dieser Stromwerte ($> 50\%$) sind die Nachbarschaftsverhältnisse mit 4, 5 oder 6 geschlossenen Nachbarporinen

statistisch deutlich unterrepräsentiert. Daraus folgt, dass deren zugehörige Wahrscheinlichkeitsparameter in der Kurvensimulationsrechnung weniger häufig abgefragt bzw. angewendet werden. Bei der Berechnung von Simulationskurven zu Messkurven mit geringem absoluten Stromabfall spielen die Wahrscheinlichkeitsparameter dieser Nachbarschaftsverhältnisse eher eine untergeordnete Rolle und sind somit in gewissem Maße frei wählbar. Sie spielen für die Konvergenz des Simulationsalgorithmus keine entscheidende Rolle und haben deshalb eine geringe Signifikanz. Die Wahrscheinlichkeitsparameter zu statistisch stärker repräsentierten Nachbarschaftsverhältnissen zeigen, vergleichbar mit den Daten zu Omp34, die Tendenz zur negativen Kooperativität.

Abschließend lässt sich zusammenfassen: Das Modell der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung ist in Rechnungen geeignet die Schließkinetikkurven nachzuvollziehen. Die Wahrscheinlichkeitsparameter des Wechselwirkungsmodells zeigen deutlich den Zusammenhang einer negativen Kooperativität, wobei höhere Spannungswerte eine stärkere Wechselwirkung zur Folge haben. Es deutet sich an, dass die Parameter für die Übergangswahrscheinlichkeiten einen funktionellen Zusammenhang mit der angelegten Spannung haben. Eine solche Beziehung würde es erlauben, die Zahl der Modellparameter zu reduzieren. Um das Modell dahingehend zu präzisieren, müssten die Öffnungsereignisse geklärt und in geeigneter Weise in die Simulationen mit einbezogen werden.

6 Biomineralisationsexperimente an Omp32

6.1 Herstellung der 2D-Kristalle

6.1.1 Einleitung

Die zielgerichtete Abscheidung von anorganischen Mineralien in lebenden Organismen ist in der Natur weitverbreitet. Von Beispielen, wie der Skelettbildung bei Wirbeltieren, über den Aufbau von Schalen bei Mollusken, bis hin zu den Magnetiten bei magnetotaktischen Bakterien (D. Schüler et al., 1999)⁵⁶. Die Abscheidung erfolgt meist in Biokomposite aus organischen Makromolekülen, wie Proteinen und Mineralien wie Silikaten oder Kalziumkarbonaten. Es entstehen so funktionell hoch spezialisierte Komplexe entsprechend den Anforderungen der Lebensbedingungen der Organismen. Durch eine in der Evolution der Lebewesen entstandene, planmäßige Strukturierung der Materialien bilden sich Konstruktionen, die in Ihren Eigenschaften den meisten menschlich erzeugten Werkstoffen überlegen sind. Die Werkstofftechnologie versucht bereits seit einigen Jahrzehnten ähnliche Methoden der Kombination verschiedener Materialien zu nutzen, um neue, für die jeweiligen Ansprüche optimierte Werkstoffe zu erhalten. Ein älteres Beispiel ist der Stahlbeton in der Bauindustrie, ein Jüngeres die Kombination von Karbonfasern mit Kunstharzen im Fahrzeugbau. Auch wenn auf diesem Wege bereits beachtliche Fortschritte in der Werkstoffoptimierung erreicht werden konnten, ist der Aufbau dieser Verbundwerkstoffe immer noch primitiv im Vergleich zu den Biokompositen vieler Lebewesen. Denn die Strukturierung dieser künstlichen Verbundwerkstoffe beschränkt sich meist auf die makroskopische Ebene, während Biokomposite eine Strukturierung auf der

Nanometerskala aufweisen. Die organischen Moleküle bilden eine selbstorganisierende Matrix, in welche die anorganischen Komponenten gezielt eingelagert sind. Erst in den letzten Jahren beginnt die Werkstoffkunde in diese mikroskopischen Regionen vorzudringen. In der Halbleitertechnologie werden, meist durch lithographische Techniken, unterschiedliche Materialien auf einer Oberfläche kontrolliert strukturiert. Im Gegensatz dazu steckt die Feinststrukturierung von Materialien innerhalb von Volumina noch am Anfang. Erste Ansätze bestehen zum Beispiel in der Methode, Werkstoffe durch Abscheidung aus der Gasphase in ein feines Granulat zu verwandeln, dessen Körnung lediglich wenige Nanometer im Durchmesser aufweist. Granulate unterschiedlicher Materialien werden gemischt und in aufwendigen Sinterprozessen zu neuen Verbundmaterialien verbacken. Dabei handelt es sich jedoch mehr um eine optimierte Durchmischung unterschiedlicher Werkstoffe als um eine gezielte Strukturierung. Die Herstellung der Granulate ist nur unter hohem Energieaufwand möglich. Die Materialauswahl beschränkt sich meist auf anorganische Stoffe, die auch im abschließenden Sinterprozess bestehen können.

In der Halbleitertechnologie konnte durch verbesserte, kurzweiligere UV-Quellen und dazugehörige Spezialoptiken aus Einkristallen die Strukturminiaturisierung weiter vorangetrieben werden, als es ursprünglich angenommen wurde. Dennoch stößt diese Technologie an ihre physikalischen Grenzen. Noch kurzweiligere Methoden, wie die Elektronenstrahlithographie stecken noch in den Kinderschuhen und sind bisher für eine großflächigere Anwendung im Bereich von einigen mm^2 noch nicht geeignet. Ebenso steigt der technische Aufwand mit zunehmender Miniaturisierung.

Dass es aber dennoch möglich ist, Materialien mit gezielter Strukturierung auf wenigen Nanometern herzustellen, lehrt die Natur. Das Augenmerk liegt insbesondere auf der Fähigkeit der Lebewesen, diese Strukturierung in selbstorganisierenden Prozessen durch Biomoleküle wie Proteine und Polysaccharide zu lösen. Diese Moleküle stellen innerhalb der Biokomposite gleichsam eine Matrix dar, in welcher die anorganischen Mineralien eingelagert sind. Über die spezifischen Interaktionen ist bisher noch wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte u. a. geklärt werden, ob insbesondere Ladungszentren von Proteinen bei Biomineralisationsprozessen eine Rolle spielen können. Dabei war auch die Frage, inwieweit sich die in einem engen Kanal angeordneten geladenen Aminosäurereste zur Herstellung von Nanoclustern eignen.

Die im Ablauf der Experimente erzeugten Pt-Nanocluster weisen grundsätzlich interessante Eigenschaften auf. Dies liegt vor allem an ihrer geringen Dimension so können Nanocluster dieser Abmessungen bereits bei Raumtemperatur typische Quanteneffekte aufweisen (H. Grabert et al., 1992).⁵⁷ Derartige Pt-Nanocluster zeigen zudem, im Unterschied zu Pt-Festkörpern, supraleitende Eigenschaften (A. Schindler et al., 2002)⁵⁸.

Das Porin Omp32 lässt sich zu 2D-Kristallen rekonstituieren. Diese Eigenschaft ist vorteilhaft, um die Anordnung von Metallclustern im Molekül mit Bildverarbeitungsmethoden analysieren zu können. Die vorgegebene, regelmäßige Orientierung der Porintrimere erleichtert die Positionsanalyse sehr.

Die Herstellung von zweidimensionalen Kristallen äußerer Membranproteine wird im Allgemeinen durch die Dialyse von Lipid-Proteinmischungen gegen eine

Pufferlösung realisiert. Die Lipide und das Membranprotein sind dabei mittels Detergenzien in einem Puffer gelöst. Dieser Lösung wird bei der Dialyse sukzessiv das Detergenz entzogen. Bei geeigneten Lipid/Protein-Verhältnissen kommt es durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Lipiden und den Außenseiten der Membranproteine zur Bildung einer lipidverarmten Membran mit hohem Proteingehalt. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass auch noch andere Verfahren zur zweidimensionalen Kristallisation von Membranproteinen existieren. Bei diesen wird im Wesentlichen das Detergenz durch Zugabe eines Absorbers (wie z.B. Bio-Beads) entfernt. Auch kommen hier bisweilen Lipidmonolayer an der Oberfläche der Lösung zum Einsatz, die durch Wechselwirkungen (wie koordinativen Bindungen) die regelmäßige Anordnung der Membranproteine begünstigen.

6.1.2 Methoden und Materialien

Im Folgenden ist die Herkunft wesentlicher Materialien für die Durchführung der Versuche aufgelistet.

DMPC

(L- α -Phosphatidylcholine-Dimyristoyl(C14:0)) Sigma-Aldrich, Seelze

K_2PtCl_4 Merck KgaA, Darmstadt

K_2PdCl_4 Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Netzchen-Gold 300 mesh Dünnsteg Plano GmbH, Wetzlar

n-Octylpolyoxyethylene (OPOE) Bachem GmbH, Heidelberg

Dialysemembran cut-off 12-16 kDa Pore 25 Å Biomol GmbH, Hamburg

01810-G-F Grids carbon & formvarfoil 400 mesh Ted Pella, Redding USA

6.1.3 Die Bestimmung des geeigneten Lipid-zu-Proteinverhältnisses für die 2D-Kristallisation

Ein geeignetes Lipid-zu-Proteinverhältnis für die 2D-Kristallisation des Porins wird zunächst durch Abschätzung bestimmt. Dabei wird das Verhältnis anhand der Geometrie eines zweidimensionalen Kristalls und der Lipide für eine möglichst hohe Proteinpäckung berechnet. Im vorliegenden Fall des trimerbildenden Porins Omp32 wird die dichteste Päckung für eine Elementarzelle des Kristalls bestimmt und die freibleibenden Lücken durch Lipidkopfguppen entsprechend deren Projektionsflächen aufgefüllt. Bei diesem Verfahren ist darauf zu achten, dass die tatsächliche Anzahl der Lipide einer Einheitszelle immer doppelt so hoch ist, da es sich bei der zu bildenden Membran um eine Lipid-Doppelmembran handelt. Für die beiden dichtesten Päckungen von Omp32 mit p3 bzw. p4-Symmetrie ergeben sich rechnerisch molare Lipid zu Protein-Verhältnisse von 30:1 bzw. 100:1. In mehreren Dialyseprozessen konnte bei elektronenmikroskopischen Kontrollen keine Kristallbildung nachgewiesen werden. Stattdessen kam es regelmäßig zur Bildung von großen Lipidvesikeln, die nur eine sporadische Insertion von Proteinen aufwiesen. Durch Modifikation des experimentellen Ansatzes wurden in einer Kontrollprobe, die nur in Detergenz (OPOE) gelöstes, aufgereinigtes Protein enthielt, nach der Dialyse gegen reinen Puffer erste Kristallbildungen beobachtet. Die Erklärung hierfür liegt in der Möglichkeit, dass bei der Aufreinigung nicht alle

Proteine von den sie umgebenden Lipidmolekülen getrennt werden konnten, und so bereits ein zur Kristallbildung ausreichender Anteil in der Proteinlösung vorhanden war. Die so gefundenen Kristalle haben meist die Form von Schläuchen.

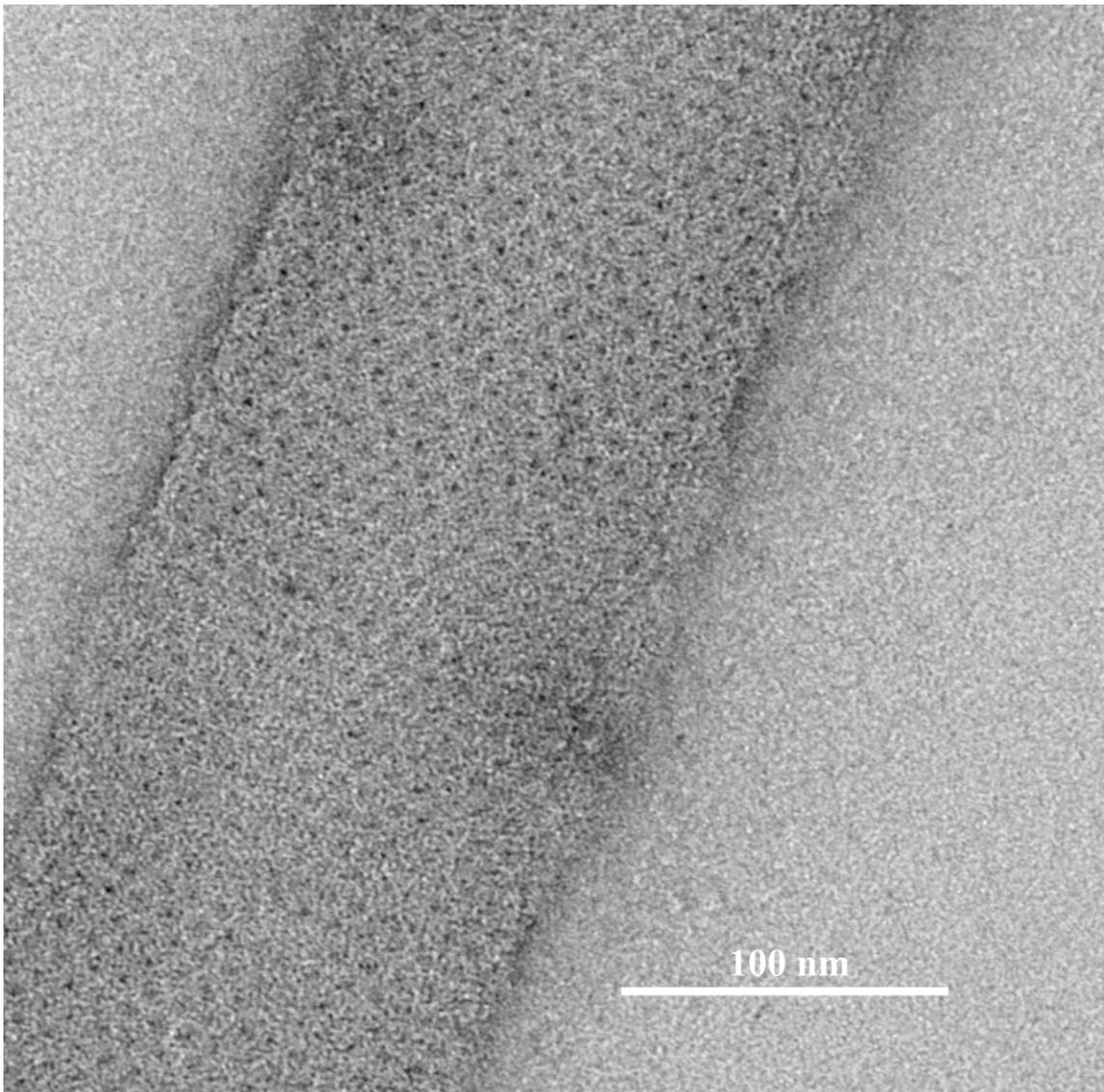


Abbildung 33

(Schlauchkristall)

zeigt einen schlauchförmigen 2D-Kristall des Proteins Omp32 nach Negativkontrastierung.

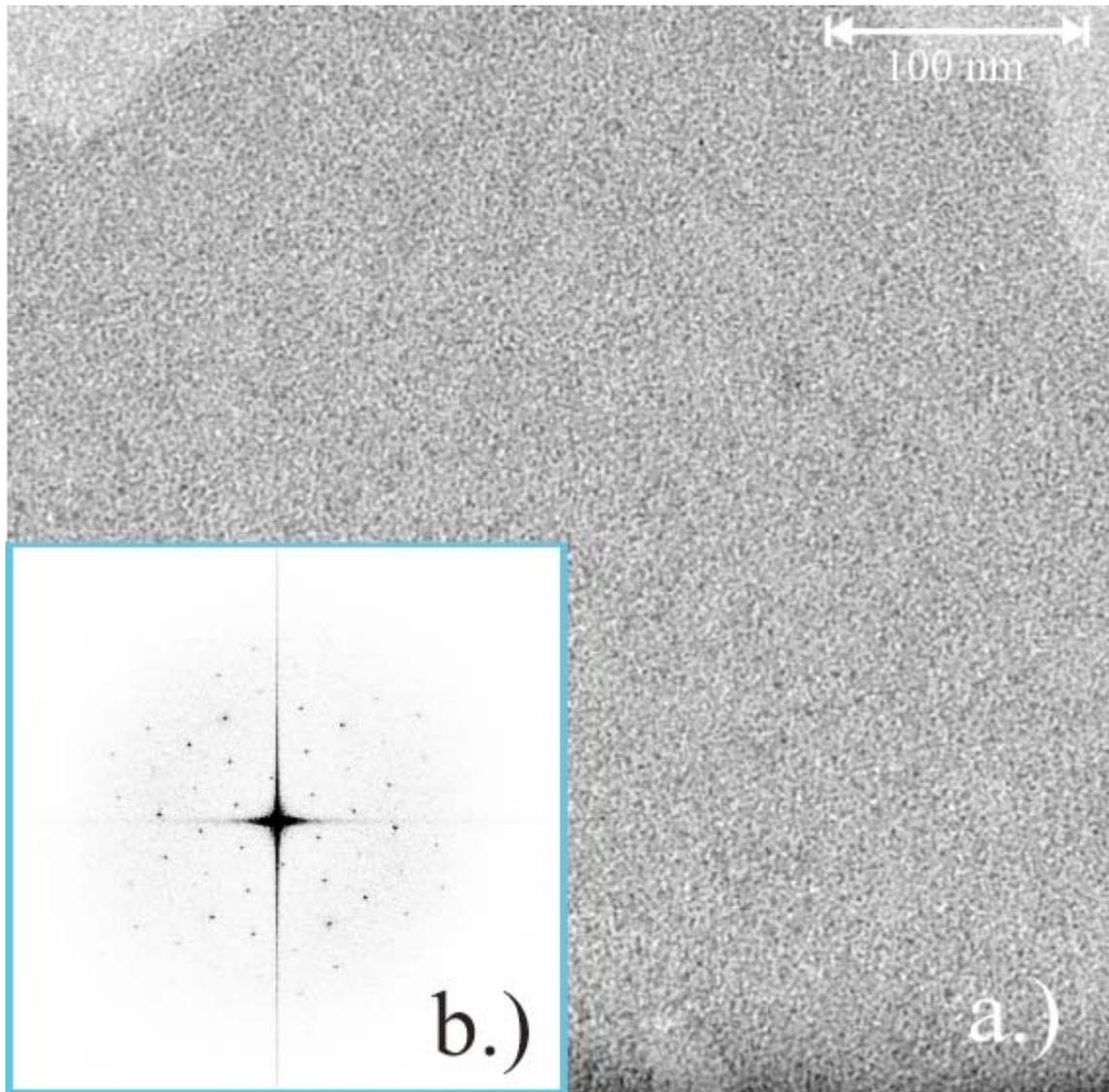


Abbildung 34 (2D-Kristall)

zeigt in Bildteil a.) die elektronenmikroskopische Aufnahme eines planaren zweidimensionalen Kristalls des Porins Omp 32. Der Kristall wurde mit Uranylacetat negativ kontrastiert. In Bildteil b.) ist das dazugehörige Powerspektrum des Kristalls mit umgekehrtem Kontrast dargestellt.

Anhand mehrerer Versuchsreihen konnte durch stetiges Verringern der Lipidkonzentration in der Ausgangslösung schließlich bei einer apparenten Lipid zu Protein-Konzentration von 2:1 die Bildung ebener 2D-Kristalle beobachtet werden (Abbildung 34). Sie wiesen eine hexagonale Anordnung der Porin-

trimere auf, die entweder der planaren Symmetriegruppe $p6$ oder $p312$ zuzurechnen war.

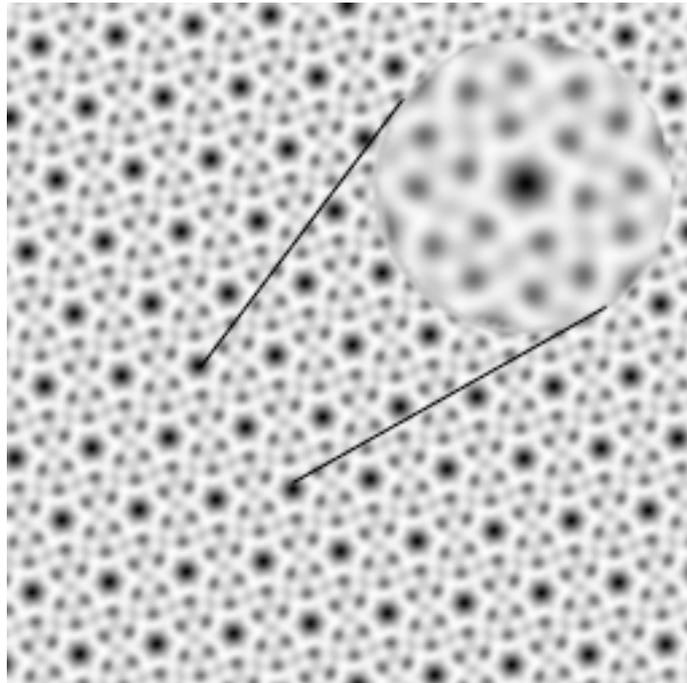


Abbildung 35

(Kristallaufbau)

zeigt einen idealisierten Proteinkristall nach Mittelung einiger hundert Einheitszellen der Aufnahme in Abbildung 34. Die symmetrische Anordnung der Trimere ist nochmals vergrößert wiedergegeben.

Die Mittelung in Abbildung 35 zeigt, dass um ein zentrales „Loch“ sechs Trimere angeordnet sind. Aus diesen Daten kann aber nicht eindeutig bestimmt werden, ob alle Trimere in der selben Richtung orientiert, oder benachbarte Porine jeweils um 180° zueinander gedreht sind, so dass abwechselnd die exoplasmatische und periplasmatische Seite des Porins die Kristalloberfläche bilden. Die Asymmetrie (Händigkeit) des mit Uranylacetat kontrastierten Porins in Projektion reicht offenbar nicht aus, die Kristallstruktur eindeutig festzulegen.

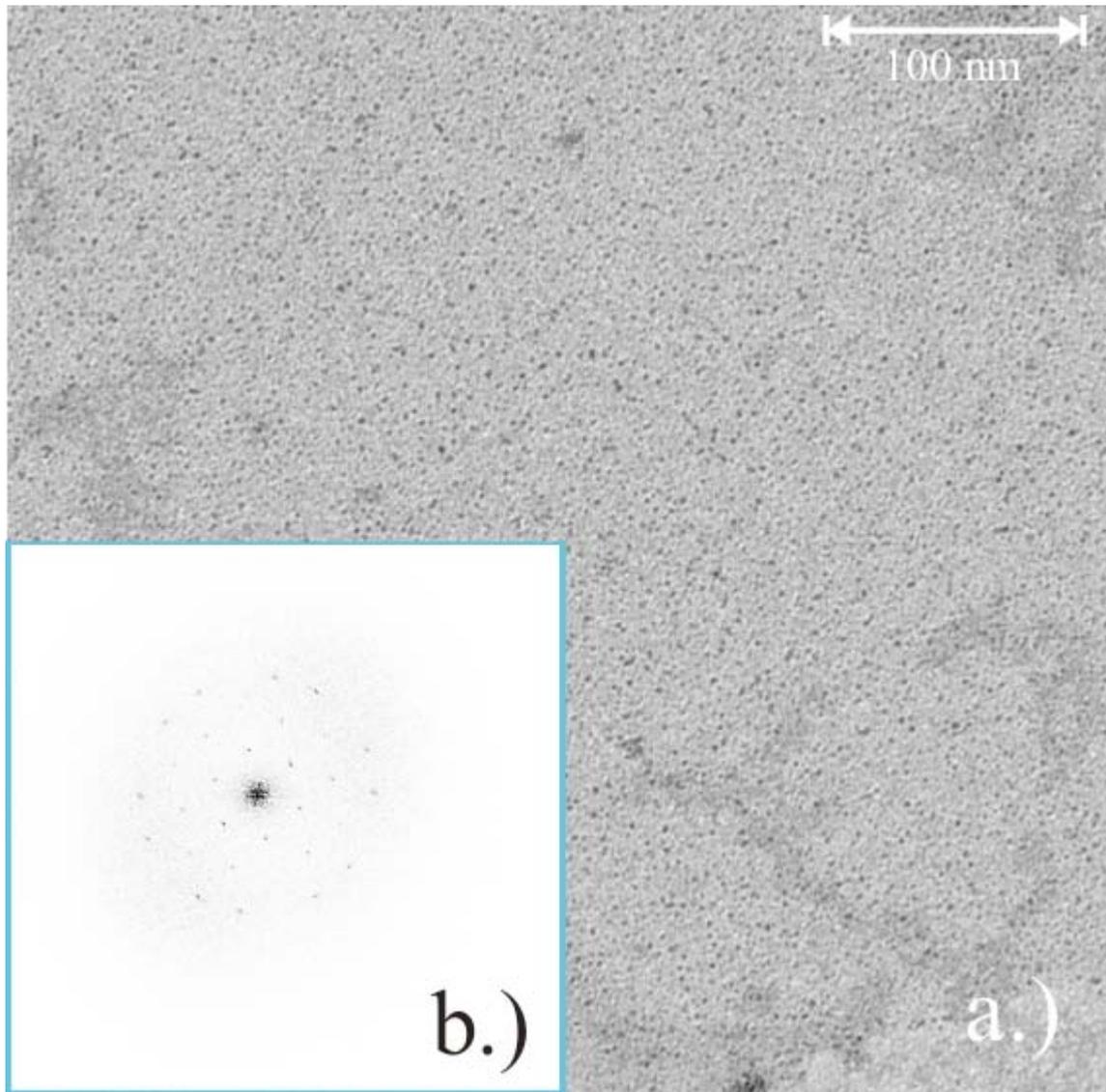
Der relativ niedrige Lipidanteil hat aber zu einem 2D-Kristall geführt, der für Omp32 zuvor noch nicht beobachtet worden war. Eine ähnliche Anordnung scheint in der äußeren Membran des parasitisch lebenden Bakteriums *Chlamydia trachomatis* vorzukommen (Baumeister und Engelhardt 1987).⁵⁹

6.2 Biomineralisation der planaren Proteinkristalle

Bereits mit den ersten schlauchförmigen Kristallen wurden Mineralisationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden in wässriger Lösung zunächst Platin und später Palladium an den Proteinkristallen abgeschieden. Verwendet wurden Lösungen von K_2PtCl_4 und K_2PdCl_4 , instabile Salze, die ursprünglich in photographischen Anwendungen benutzt wurden. Diese sind empfindlich sowohl gegenüber thermischem, als auch photonischem Energieeintrag und zerfallen in der Gegenwart von Reduktionsmitteln unter Abscheidung des Edelmetalls. Verstärkt wird diese Reaktion durch die autokatalytische Wirkung der bereits reduzierten Platin- bzw. Palladiumatome. Obwohl der Reaktionsablauf noch nicht vollständig aufgeklärt worden ist, konnten doch durch verschiedene Reihenexperimente einige funktionelle Zusammenhänge aufgezeigt werden.

Zur Vorbereitung wurden 30 mM Stammlösungen der Salze in hochentsalztem Wasser hergestellt und zur kompletten Hydrolyse unter Lichtabschluss bei 4°C für einige Tage gelagert (L.Colomboni-Ciacchi et al., 2001)⁶⁰. Aus der präparierten Stammlösung wurden nach Bedarf 10 mM Lösungen mit H_2O verdünnt und in der Regel 200 μ l dieser fertigen Lösung mit 10 μ l Kristalllösung (Proteingehalt ca. 1mg/ml) gemischt. Da bei diesem Verfahren die Mineralisationslösung von beiden Seiten auf die planaren

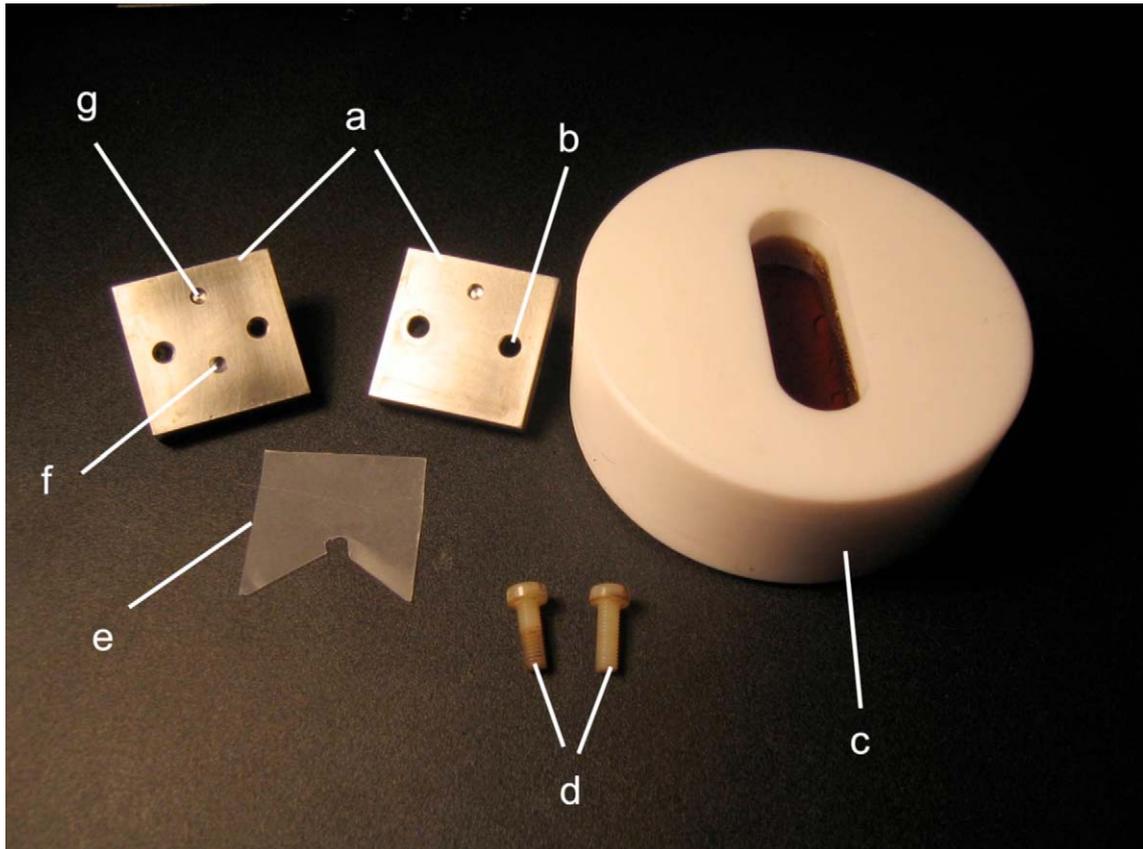
Kristalle einwirken kann, sei es im Folgenden als „Volumenmineralisierung“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu steht die so bezeichnete „Oberflächenmineralisation“, bei der zunächst 10 µl einer, mit Puffer auf ca. 300 µg/ml verdünnten Kristalllösung, auf die im Sauerstoffplasma hydrophilisierte Kohlenstoffoberfläche eines elektronen-mikroskopischen Netzchens (Grid) aufgebracht und nach einer kurzen Adsorptionsphase (10s) die überschüssige Lösung mit einem Filterpapier abgesaugt wird. Das so vorbereitete Grid wird, ohne dass es zwischenzeitlich komplett abtrocknet, mit seiner belegten Seite nach unten auf einen Tropfen 10 mM Kristallisationslösung mit einem Volumen von 200 µl gelegt. Dadurch kommt die Mineralisationslösung nur mit einer Seite der 2D-Kristalle in Kontakt und die Abscheidung des elementaren Edelmetalls findet ausschließlich an der zugänglichen Oberfläche der Kristalle statt. Wie bereits erwähnt, reagiert die Abscheidungsreaktion sehr empfindlich auf Energieeintrag. Auch die autokatalytische Komponente der Reaktion zählt zu den wichtigen Größen, die berücksichtigt werden müssen, um ein befriedigendes Resultat zu erhalten. Dabei war eine ausreichende Metallabscheidung auf dem Kristall das Ziel, aber auf keinen Fall eine vollständige Bedeckung der Oberfläche.

**Abbildung 36****(Mineralisierter Kristall)**

gibt in Teil a.) die elektronenmikroskopische Aufnahme eines volumen-mineralisierten 2D-Kristall des Proteins Omp32 wieder. Als dunkle Stellen sind deutlich die Metallabscheidungen und deren regelmäßige Anordnungen zu erkennen. Die Regelmäßigkeit der Metallabscheidungen kann auch im zugehörigen Powerspektrum (Bildteil b.) erkannt werden.

Auch eine Abscheidung von bereits reduzierten Edelmetallclustern auf der Oberfläche galt es zu vermeiden. Diese bilden sich unabhängig von

Wechselwirkungen mit dem Protein, mit fortschreitender Zeit und unterstützt durch die autokatalytische Wirkung in der Lösung. Die Ermittlung und Wahl der richtigen Parameter war daher entscheidend für das Gelingen der Reaktion. Bei allen Mineralisationsexperimenten kamen nur Grids aus Gold zur Verwendung, da nur diese die Mineralisierung nicht beeinflussten. Herkömmliche Grids aus Kupfer bewirken eine starke unkontrollierbare Metallabscheidung. Dieser Effekt ist der unedleren Natur des Kupfers zuzuschreiben. Auch das Auftreten der willkürlichen Clusterbildung aufgrund von Redoxreaktionen der Metallionen mit Pufferresten der Proteinlösung ist unbedingt zu unterdrücken, da die Ablagerung dieser Cluster die Effekte der spezifischen Ion-Proteinwechselwirkung überlagert und verfälscht. Die Clusterbildung steigt durch den autokatalytischen Reaktionsanteil nicht linear mit fortschreitender Reaktionsdauer an (L. I. Elding, 1970).⁶¹ Zu kurze Reaktionszeiten aber verhindern eine ausreichende Metallabscheidung an den Proteinen, die für die elektronenmikroskopischen Messungen erforderlich ist. Die angestellten Versuchsreihen haben gezeigt, dass gerade die zufällige Clusterbildung explosionsartig bei höheren Temperaturen ansteigt, während die Raten der spezifischen Abscheidung auch bei niedrigen Temperaturen nahezu konstant blieben. So haben sich für beide Mineralisationsformen, also sowohl für die Oberflächen- als auch für die Volumenmineralisation, gleiche Parameter als optimal erwiesen.

**Abbildung 37****(Vorrichtung)**

zeigt die Bestandteile der Vorrichtung zur spannungsabhängigen Beeinflussung der Oberflächenmineralisierung: a.) die beiden Elektrodenplatten, b.) eine Bohrung für die isolierende Schraubverbindung, c.) das Teflongefäß mit der Mineralisierungslösung, d.) die Kunststoffschrauben zur Verbindung der Elektrodenplatten, e.) die Isolationsschicht aus Parafilm wobei die Aussparung am unteren Rand dazu dient das elektronenmikroskopische Grid in Kontakt mit der Mineralisierungslösung zu halten, f.) die Vertiefung zur Aufnahme des Grids, g.) die isolierende schraubbare Verbindung zum Anlegen der externen Spannung.

Die Proben konnten am besten mineralisiert werden, wenn sie 72h bei 4°C unter Lichtabschluss inkubiert wurden.

Desweiteren wurden Experimente unternommen, bei denen die Oberflächenmineralisation durch ein äußeres elektrisches Feld gezielt beeinflusst werden sollte. Dazu wurde eine Art Plattenkondensator aus V2-A Edelstahl verwendet.

Der Kondensator besteht aus zwei quadratischen Platten von 2 cm Kantenlänge.

Eine der Platten weist eine runde Vertiefung im Zentrum auf (Abbildung 37, f). Sie ist so ausgelegt, dass sie ein elektronenmikroskopisches Grid aufzunehmen kann und dieses mit der Oberfläche der Platte und den Rändern der Vertiefung exakt abschließt. Ein mit Proteinkristallen beschichtetes Grid wird in die Vertiefung eingelegt. In der Mitte eines quadratischen Stückes Parafilm von ebenfalls 2 cm Kantenlänge wird mit einem Stanzwerkzeug ein Loch eingebracht. Dieses ist von gleichem Durchmesser wie ein EM-Grid und wird so ausgestanzt, dass es später genau über der Vertiefung liegt. Ausgehend vom Zentrum dieses Loches werden zwei Schnitte zu den Ecken einer Seitenkante angebracht. Der Parafilm weist nun eine Aussparung auf, dessen Form ein gleichschenkliges Dreieck mit einem Kreis an seiner Spitze darstellt. Der Film wird nun auf die Platte mit dem eingelegten Grid passend aufgelegt. Danach wird Mineralisierungslösung auf den Bereich der Aussparung aufgebracht, die zweite Platte direkt abschließend aufgelegt und die beiden Platten mittels nichtleitenden Schrauben aus Kunststoff fest verschraubt. Dabei kann überflüssige Mineralisierungslösung aus der, durch die Aussparung der zwischen den Platten gebildeten Spalte, austreten. Die gesamte Vorrichtung wird in ein mit Mineralisierungslösung gefülltes Bad gehängt. Die Öffnung der Aussparung ist dabei in Kontakt mit dem Mineralisierungsbad. Die Platten können jetzt als Elektroden getrennt voneinander mit einer Gleichspannungsquelle verbunden werden. Diese Experimente lieferten allerdings keine weiterführenden Ergebnisse zur Wechselwirkung der Mineralisationen mit den Proteinkristallen, da die Abscheidung an den

Elektroden die an den Proteinkristallen dominiert hatte. Allerdings legte die Metallabscheidung der Edelmetalle an der Kathode den Schluss nahe, dass diese nicht beim Zerfall eines PtCl_4^{-2} bzw. eines PdCl_4^{-2} Komplexes sondern durch Reduktion eines Pt- bzw. Pd-Ions stattfindet (L. I. Elding, 1970)⁶², (R. Wahl, 2003).⁶³ Dadurch ließe sich auch die erforderliche Hydrolysephase der Stammlösung erklären.

6.3 Auswertung der Biomineralisationsexperimente

6.3.1 Untersuchungen mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Die Bilddaten der elektronenmikroskopischen Messungen wurden rechnergestützt ausgewertet. Es wurde sowohl Auswertungen durch Korrelationsmittelungen, als auch mittels Hauptkomponentenanalyse durchgeführt.

6.3.1.1 Die Korrelationsmittelung

Bei der Korrelationsmittelung (W. O. Saxton und W. Baumeister, 1982)⁶⁴ handelt es sich um ein Verfahren, das das Rauschen der redundanten Elemente einer TEM-Abbildung verringert und so die Auflösung regelmäßig angeordneter Strukturen verbessert. Die Kristallstruktur ermöglicht es auf einfache Weise, mit Hilfe der Fouriertransformation die periodische Information von dem zufälligen Rauschen zu trennen. Aus dem errechneten Fourierraumbild (E.O. Bringham, 1992)⁶⁵ wird dabei möglichst genau die periodische von der restlichen Information getrennt und aus diesem periodischen Anteil dann wieder ein Realraumbild berechnet. Aus dem so gefilterten Bild wird eine oder mehrere Einheitszellen des Kristalls ausgeschnitten, um diese dann als Referenz für die Kreuzkorrelation mit dem

Gesamtbild zu verwenden und die Orte signifikanter Übereinstimmung, d.h. der Einheitszellen, zu bestimmen. Im Anschluss werden Bildteile entsprechend der Referenzgröße an den markierten Stellen aus dem Original extrahiert und gemittelt.

6.3.1.2 Die Korrespondenzanalyse

Die Korrespondenzanalyse hat ihren Ursprung in der multivariaten statistischen Analyse, welche, nach ihrer mathematischen Formulierung, bereits früh zur Auswertung von Datensätzen in den Sozialwissenschaften eingesetzt worden ist (H. O. Hirschfeld, 1935)⁶⁶, (R. A. Fisher, 1940)⁶⁷, (P. Horst, 1935).⁶⁸ Durch die fortschreitende Entwicklung auf dem Gebiet der elektronischen Datenverarbeitung konnte diese Methode bereits vor zwanzig Jahren zur Auswertung von Elektronenmikroskopiedaten angewandt werden (M. van Heel und J. Frank, 1981)⁶⁹, (J. Frank und M. van Heel, 1982).⁷⁰ Mittlerweile ist diese Methodik in der Elektronenmikroskopie weit verbreitet und allgemein anerkannt (H. Engelhardt et al., 1985)⁷¹, (J. P. Breaudiere und J. Frank, 1986)⁷², (K. Hirose et al., 1994)⁷³, (C. W. Akey, 1995)⁷⁴, (N. Braun et al., 1996).⁷⁵ Die Korrespondenzanalyse bzw. die hier angewendete Variante der Hauptkomponentenanalyse, (J. Kleinz, 1994)⁷⁶, (J. F. Aebersold et al., 1996)⁷⁷, (T. Scheybani, 1995)⁷⁸ erlaubt es, in einem Satz von Bildern voneinander unabhängige Bildelemente zu erkennen und ihren Beitrag zur Variabilität des gesamten Datensatzes zu analysieren. Dazu werden die gefundenen Einheitszellen bezüglich ihres Abstandes in einem N-dimensionalen Vektorraum angeordnet und in Klassen zusammengefasst. N ist dabei die Pixelanzahl der Einzelbilder mit deren möglichen Graustufenwerten, d.h. der Information jedes Bildes kann so einem Vektor eindeutig zugeordnet werden. Da es vorteilhaft ist,

wenn die Anzahl der Pixel $P = n \times n$ kleiner ausfällt, als die Anzahl der Bilder N (J. Kleinz, 1994),⁷⁷ wurden die Einheitszellen in kleinere Elementareinheiten der Porenöffnungen aufgeteilt. Der wesentliche Vorteil liegt jedoch darin, so die Clusterablagerung in jeder Pore unabhängig von den benachbarten Poren auswerten zu können. Die Differenz der Vektoren gibt ein Maß für die Ähnlichkeit der einzelnen Einheitszellenbilder (Identische Bilder zum Beispiel haben die Differenz Null). Diese Auswertung erlaubt es, genauere Aussagen über signifikante Abweichungen, z.B. bei der Mineralisierung, zu treffen, welche durch die unspezifische Statistik der Korrelationsmittelung nicht zutage treten würden.

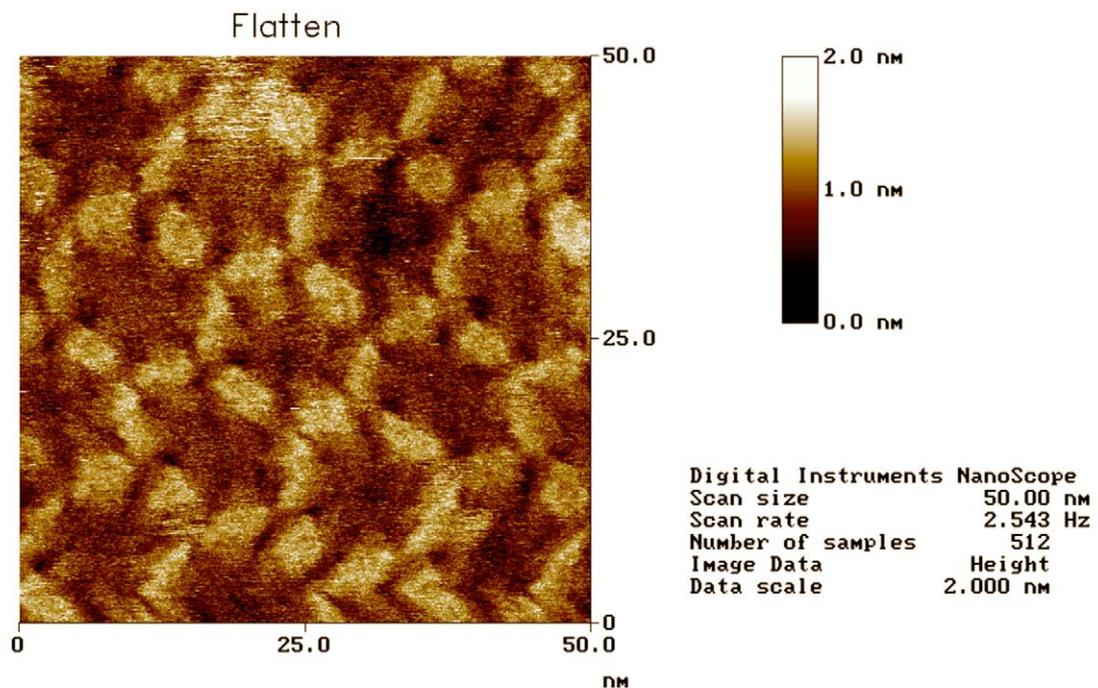
6.3.2 Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) ist eine Weiterentwicklung des Prinzips der Rastertunnelmikroskopie (*scanning tunneling microscopy*, STM). Die Rastertunnelmikroskopie wurde auch schon auf biologische Objekte angewendet, zur Ableitung des Tunnelstromes erfordert sie jedoch eine leitfähige Oberfläche, wodurch bei diesen Objekten eine leitfähige Beschichtung notwendig wird. Diese Beschichtung jedoch ist bei biologischen Proben meist unerwünscht. Bei kleineren Molekülen besteht die Schwierigkeit in der Auswertung der gewonnenen Daten (R. Guckenberger et al., 1989)⁷⁹, (H. Nejoh, 1990)⁸⁰, (J. Yuan et al., 1990)⁸¹, (J. Yuan et al., 1991)⁸², (R. Guckenberger et al., 1994)⁸³, (Z. Shao et al., 1995).⁸⁴ Im Gegensatz zur Rastertunnelmikroskopie, welche die Oberfläche mit Hilfe eines Tunnelstromes abbildet, kann die Rasterkraftmikroskopie mit Hilfe einer Spitze, dem sogenannten Tip, Wechselwirkungen unterschiedlicher Art darstellen (G. Binnig

et al.,1982)⁸⁵, (G. Binnig et al.,1986)⁸⁶, (S. Alexander et al., 1989).⁸⁷ Das Rasterkraftmikroskop hat seinen Ursprung in der Materialwissenschaft, da es neben den reinen Topographiedaten auch Materialeigenschaften der unterschiedlichsten Oberflächen mit hoher Auflösung darstellen kann (R. Eschrich, 1996).⁸⁸ Das AFM bietet mehrere Vorteile, insbesondere für die Anwendung auf biologische Proben. Die Messungen können unter nahezu physiologischen Umweltbedingungen durchgeführt werden. Abbildungen sind direkt in Lösungen, bei Raumtemperatur und im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie auch unter Normaldruck möglich. Das Rasterkraftmikroskop bietet die Möglichkeit Kräfte, welche zwischen dem Tip und der abzubildenden Oberfläche wirken, direkt in Form von Bildinformationen darzustellen. Dazu rastert die Spitze mit Hilfe von Piezoaktuatoren die Probenoberfläche ab. Die Piezoaktuatoren können durch elektrische Ansteuerung exakte Bewegungen des Tips in Bereich weniger Angström ausführen. Die Gewinnung von Bilddaten kann dann im Wesentlichen auf zwei Wegen erfolgen. Entweder wird die Oberfläche in einer vorbestimmten Höhe abgerastert und dabei über das Elastizitätsmodul des Tips die erforderliche Kraft indirekt bestimmt, oder der Tip drückt, während der Abrasterung mit einer festgelegten Kraft, auf die Oberfläche und die Änderung der z-Position des Tips wird als topographische Information dargestellt. Einen Spezialfall der Konstantenhöhenmethode stellt der sogenannte Tapping-Modus¹ dar. Der Tip wird dabei in oszillierende Schwingungen nahe seiner Eigenfrequenz versetzt. Berührt die Spitze die Probenoberfläche, so entsteht eine Dämpfung der Schwingung. Durch einen

¹ Tapping-Mode-AFM ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Digital Instruments

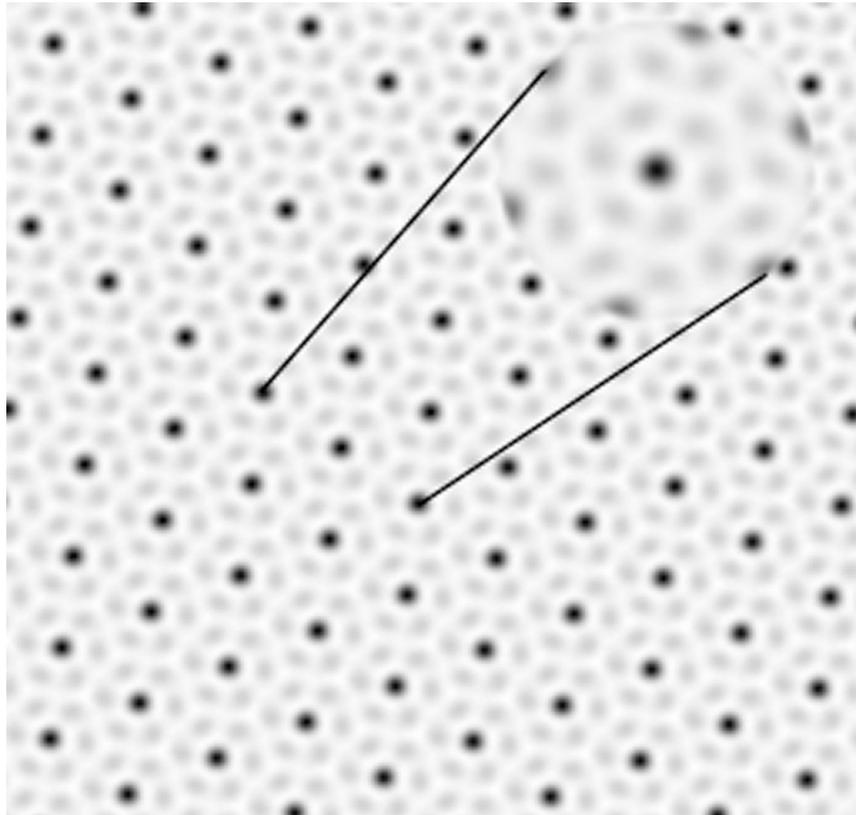
elektrischen Regelkreis wird die Schwingung auf eine konstante mittlere Amplitude eingestellt. Diese Methode liefert die topographische Höheninformation. Sie bietet den Vorteil, dass der Tip durch seine Schwingung nicht permanent mit der Probenoberfläche in Kontakt steht. Dadurch ist die laterale Krafteinwirkung, welche durch die Rasterbewegung der Spitze in der xy-Richtung entsteht, verringert. Diese Methode ist besonders gut für biologische Proben geeignet, wenn diese in wässriger Lösung abgebildet werden und deshalb oft Haftungsprobleme auf dem Trägersubstrat aufweisen. Biologischen Proben tendieren nämlich im klassischen Kontaktmodus dazu, durch die Spitze auf dem Trägersubstrat verschoben zu werden, wodurch eine Abbildung nicht mehr möglich ist. Alle in dieser Arbeit dargestellten AFM-Aufnahmen sind Topographieaufnahmen, welche im Tapping-Modus aufgenommen wurden. Die Aufnahmen entstanden bei Raumtemperatur und in wässriger Pufferlösung. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Nano-Scopes der Firma Digital Instruments hergestellt. In Abbildung 38 ist ein Beispiel einer solchen AFM-Aufnahme dargestellt. Dieses Bild wurde in der größten erzielten Vergrößerung aufgenommen. Es zeigt einen Ausschnitt des Proteinkristalls mit 17 Elementarzellen. Nahe dem Zentrum der hellen propellerartigen Strukturen können, als schwarze Punkte, selbst die Porenöffnungen der Omp32-Trimere, welche nur 1-2 Nanometer Durchmesser aufweisen, identifiziert werden. Die Abbildung zeigt eindrucksvoll die Leistungsfähigkeit der AFM-Technologie. Die Kantenlänge des Bildausschnittes beträgt lediglich 50 nm. Zur Auswertung kamen im Wesentlichen AFM-Aufnahmen mit niedrigeren Vergrößerungsfaktoren (vgl. Abbildung 41), um zur Mittelung eine größere Anzahl von Einheitszellen zur Verfügung zu haben.

**Abbildung 38****(AFM-Aufnahme)**

zeigt ein Beispiel einer AFM-Aufnahme eines Proteinkristalls von Omp32. Die Topographieinformationen sind entsprechend der nebenstehenden Skala in verschiedenen Brauntönen wiedergegeben. Unterhalb der Höhenskala sind die wichtigsten Aufnahme­daten wieder gegeben, dazu gehören: der Skalierungsmaßstab, die Scanrate bzw. Rasterfrequenz, die Anzahl der Bildzeilen, die Art der Darstellung sowie der Wertebereich der z-Koordinaten.

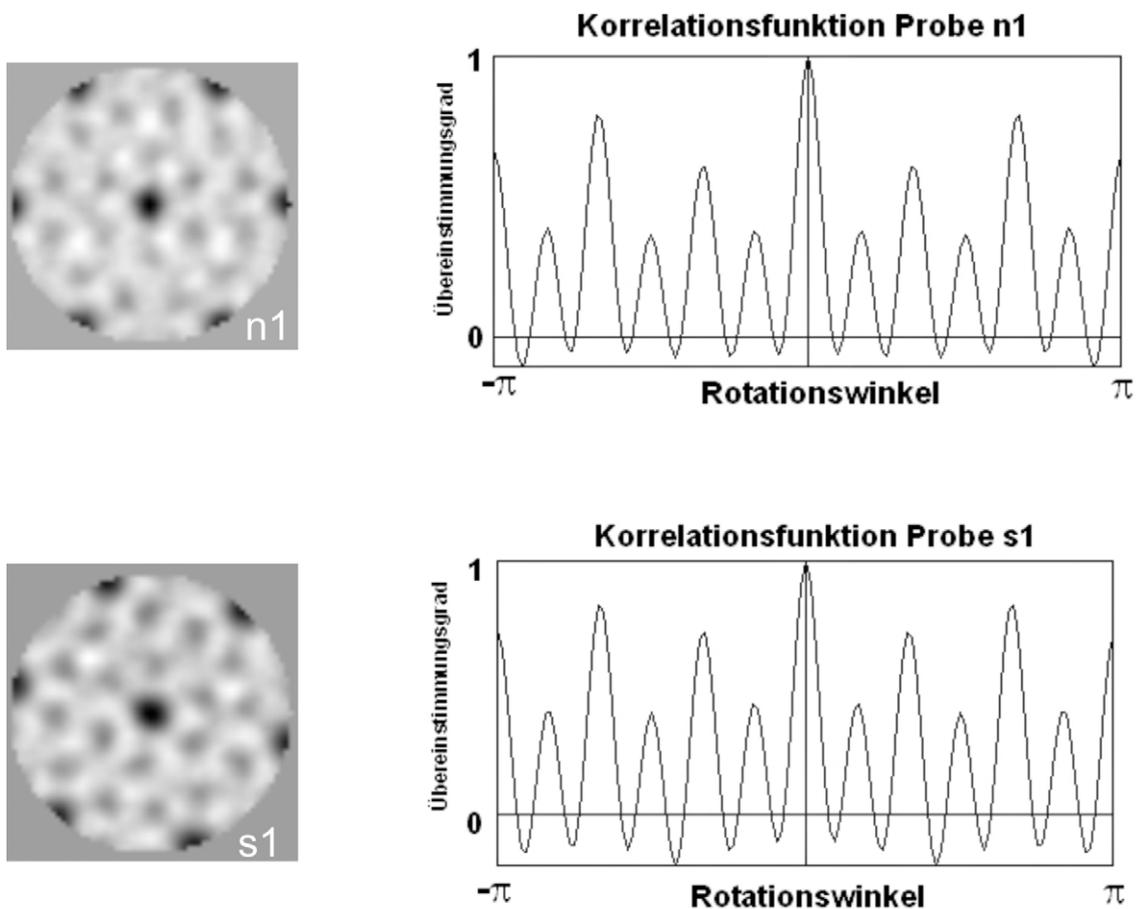
6.4 Ergebnisse der Biomineralisationsexperimente

Wie bereits in früheren Untersuchungen an anderen Proteinen festgestellt wurde (M.Mertig et al., 2001)⁸⁹, kann auch an zweidimensionalen Kristallen von Omp32 eine kontrollierte Abscheidung von Metallclustern vorgenommen werden.

**Abbildung 39****(Mineralisierter Kristall)**

Zeigt die Mittelung eines zweiseitig volumenmineralisierten Omp32 2D-Kristalls mit hexagonaler Symmetrie. Die Kristallform entspricht der in Abbildung 35 dargestellten Kristallform.

Dank seiner bereits gelösten Struktur ist Omp32 ein besonders interessantes Untersuchungsobjekt, um die Wechselwirkung der Ionen mit dem Protein im Mineralisierungsprozess zu studieren. Dazu ist aber auch die Bestimmung der planaren Symmetriegruppe zur Charakterisierung der Beschaffenheit des Kristalls notwendig.

**Abbildung 40****(Symmetriegruppe)**

zeigt die nicht symmetrisierten Korrelationsmittelungen einiger hundert Einheitszellen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zweier oberflächenmineralisierter Proben (n1, s1). Der Radius der Einheitszellen beträgt 12,8 nm. In der rechten Hälfte sind die Korrelationsfunktionen der Einheitszellen der beiden Proben bezüglich verschiedener Rotationswinkel zu sich selbst dargestellt. Die Korrelationsfunktionen sind in relativen Einheiten aufgetragen, wobei die Identität $\varphi = 0$ auf 1 normiert wurde. Die Korrelationsfunktion zeigt jeweils höhere Übereinstimmung bei Rotationswinkeln von $\pm 120^\circ$ als bei anderen ganzzahligen Vielfachen von 60° .

Die Aufklärung der Symmetriegruppe durch die Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen negativ kontrastierter oder volumenmineralisierter zweidimensionaler Kristalle nicht eindeutig möglich. Wird aber die peri- und die extraplasmatische Seite des Porins unterschiedlich mineralisiert, so kann dies

dazu genutzt werden, um die planare Symmetriegruppe zu bestimmen. Die Aufnahmen von einseitig oberflächenmineralisierten Kristallen böten so die Möglichkeit, die gegensätzliche Orientierungen der Proteine innerhalb der Kristallmembran unterscheiden zu können und damit auch eine Differenzierung zwischen den planaren Symmetriegruppen $p6$ und $p312$ vorzunehmen.

Die Korrelationsfunktionen aus Abbildung 40 zeigen bei zwei unterschiedlichen Proben eine stärkere Übereinstimmung bei Rotationswinkeln von $\pm 120^\circ$ als bei den anderen, durch 60° teilbaren Drehwinkeln. Dieses Resultat ist ein deutliches Indiz für die Zugehörigkeit der 2D-Kristalle zur planaren Symmetriegruppe $p312$. Es sind also jeweils sechs Porintrimere um ein zentrales Loch angeordnet, wobei zwei benachbarte Proteine jeweils um 180° in der Membranebene gedreht sind. Der Beobachter sieht abwechselnd die Mineralisierung der extra- und der periplasmatischen Seite. Eine weitere, bis dato unbekannte, Rolle für den Kristallaufbau hat das zentrale Loch im Rotationszentrum. Die Mineralisierung an dieser Stelle dominiert deutlich gegenüber den Mineralisierungen in den Poren. Eine Frage ist hierbei, ob dieses Loch wirklich die gesamte planare Membran durchzieht. So ist es unklar, ob die Mineralisierungslösung über dieses Loch von der Oberfläche bis zur Unterseite der Membran vordringen und damit die Außenseiten der umgebenden Proteine auf ihrer gesamten Länge benetzen kann. Die starke Mineralisierung, ebenso wie die starke Färbung des Rotationszentrums in den Negativ-Kontrast-Aufnahmen legt einen solchen Schluss nahe. Dafür spricht auch, dass diese Kristalle erst bei einem sehr geringen Lipid:Proteinverhältnis erhalten wurden. Bei einer so geringen Lipidkonzentration in der Membran war

es denkbar, dass nicht genug Lipidmoleküle zur Ausbildung eines Bilayers zur Verfügung stehen, der das Loch vollständig füllen könnte.

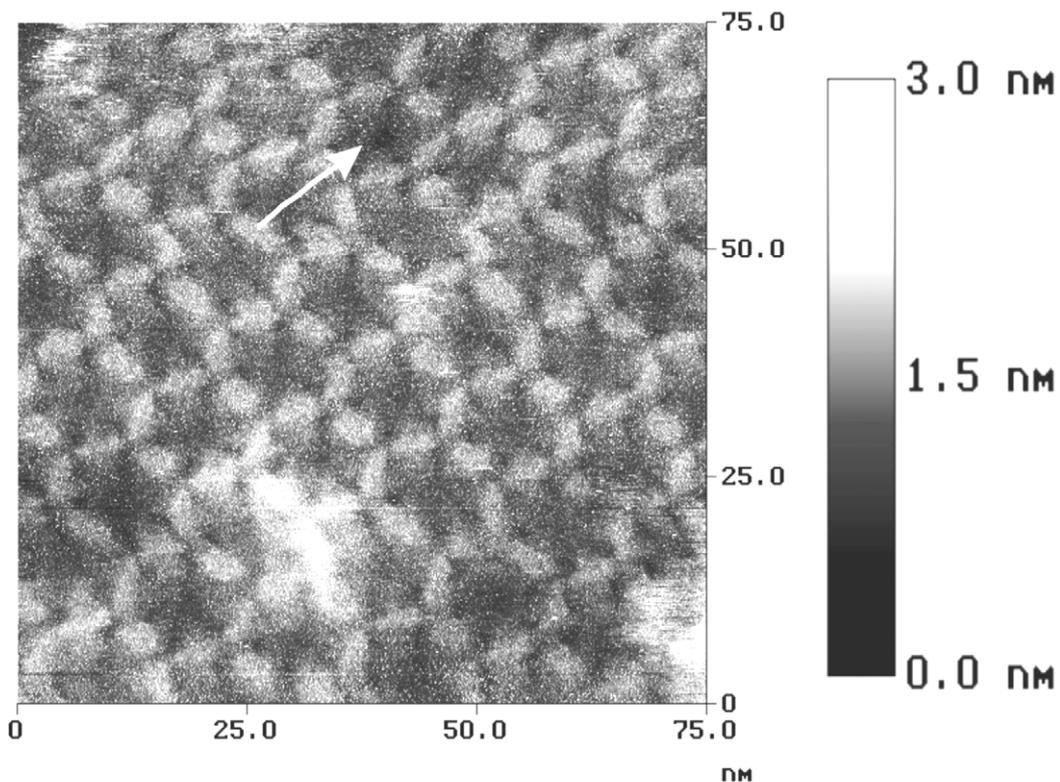


Abbildung 41

(AFM-Aufnahme)

ist eine Aufnahme eines nichtmineralisierten 2D-Kristalls des Proteins Omp32 mittels Rasterkraftmikroskopie. Die Graustufenwerte des Bildes geben die Höhenangaben der topographischen Oberflächenstruktur des Proteinkristalls. Der weiße Pfeil zeigt auf das Rotationszentrum einer Einheitszelle. Die Grauwertskala in der rechten Abbildungshälfte dient zur Interpretation der Höheninformation aus der Rasterkraftaufnahme. Eines der wenigen offenen Löcher ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Um diese Frage zu lösen, wurden Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) vorgenommen. Trotz des nominell geringen Lipidgehalts ist in

der Aufnahme von Abbildung 41 zu erkennen, dass die meisten zentralen Löcher nicht durchgängig sind. Allerdings ließen sich einige „offene“ Löcher finden, die zeigen, dass das Lipid-zu-Protein-Verhältnis für die Bildung einer geschlossenen Membran limitierend war. Deutlich ist hier die hexagonale Struktur des Proteinkristalls sichtbar. Offene Löcher in den Rotationszentren müssten sichtbar sein, da bei dieser Aufnahme die Auflösung gut genug war, um selbst die kleineren Porenöffnungen der Proteintrimere abzubilden.

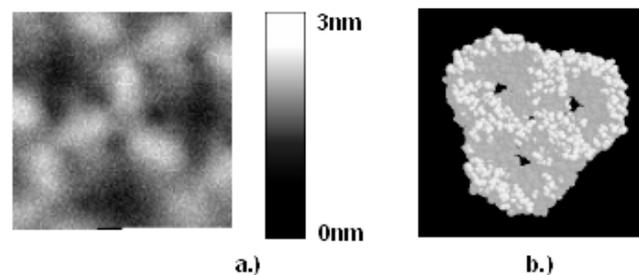


Abbildung 42

(Trimer)

Bildteil a.) ist die Mittelung eines Porintrimerers aus einer AFM-Aufnahme des Proteinkristalls mit der zugehörigen Grauwertskala. Die Kantenlänge des AFM-Bildes entspricht 14 nm. Bildteil b.) ist zum Vergleich die Ansicht der periplasmatischen Seite eines Spacefill-Modells der atomaren Struktur von Omp32. Der Vergleich der Abbildungen zeigt eine gute Übereinstimmung.

In der Mittelung über die Trimere können topologische Details des Trimerers gut beobachtet werden (vgl. Abbildung 42). So lassen sich im Vergleich mit dem Röntgenstrukturmodell deutlich die Kanten der Kontaktflächen der drei periplasmatischen Trichter als dreiflüglige propellerartige Struktur identifizieren. Auch die Eingänge der eigentlichen Kanäle sind deutlich als schwarze Punkte

erkennbar. Damit bietet sich das AFM als ideale Ergänzung zur Lokalisation der abgeschiedenen Edelmetallcluster an.

Allerdings ergaben sich unerwartete Schwierigkeiten bei der Wahl eines geeigneten AFM-Trägersubstrats für bereits mineralisierte 2D-Kristalle. In zahlreichen Experimenten gewährleisteten weder Glimmer, noch Graphit, oder Germanium eine ausreichende Adsorption der Kristalle. Auch Versuche, bereits adsorbierte 2D-Kristalle direkt auf dem Substrat zu mineralisieren, schlugen fehl. Im Falle von Graphit und Germanium kam es dabei zu chemischen Wechselwirkungen der Trägersubstrate mit der Mineralisierungslösung, die eine kontrollierte Abscheidung am Kristall nicht mehr zuließen. Bei Glimmer lösten sich die bereits adsorbierten Kristalle während des mehrtägigen Mineralisierungsprozesses wieder von der Trägersubstanz ab. Dennoch liefern die Bilder der unmineralisierten Kristalle wichtige Informationen zur Interpretation der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Da, wie aus den topologischen Daten hervorgeht, das mittlere Loch des Kristalls mit Lipiden aufgefüllt ist, kann die Mineralisierungslösung auch nur die Oberfläche dieses Lipidbilayers erreichen. Die Mineralisierung findet also in allen Fällen nur an der zugänglichen Oberfläche des Kristalls statt. Die Mineralisierungslösung kann weder durch offene Mittellöcher die den Löchern zugewandten Seiten der Porine auf ihrer ganzen Länge erreichen, noch kann sie im Prozess der Oberflächenmineralisierung bis zur Unterseite der Porine durch die Vertiefung im zentralen Rotationszentrum hindurch diffundieren. Dieses Erkenntnis ist von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der Metallabscheidung an diesen Stellen. Die Abscheidung an diesen Stellen dominiert deutlich gegenüber der Abscheidung innerhalb der Poren der Trimere (vgl. Abbildung 39

und Abbildung 40). Dieser Effekt kann also nicht durch das große, zur Verfügung stehende Volumen eines durchgängigen Loches interpretiert werden, sondern muss durch eine Wechselwirkung mit der frei zugänglichen Oberfläche zustande kommen.

Um dennoch eine genauere Analyse der Metallabscheidung und insbesondere der Lokalisation an den Kristallen zu erhalten, wurde zur Auswertung die Methode der Korrespondenzanalyse angewandt.

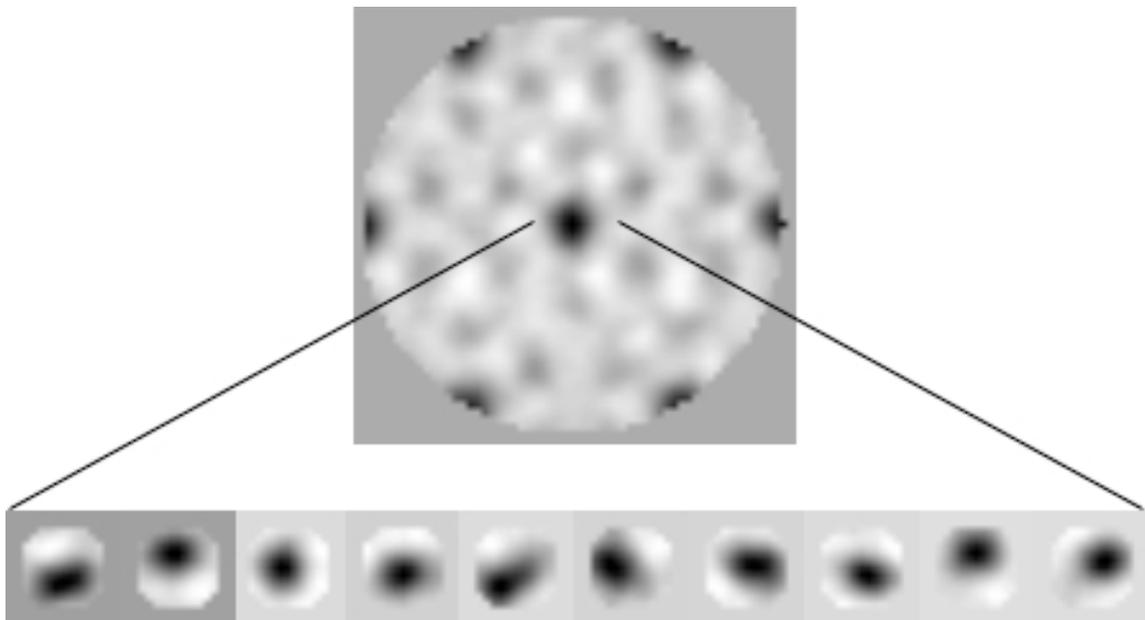


Abbildung 43

(Klassenanalyse 1)

zeigt im oberen Teil eine Einheitszelle eines oberflächenmineralisierten Kristalls und in der Bildergalerie die Resultate einer Klassenanalyse der Besetzung des mittleren Rotationszentrums. Die Schwerpunkte der abgeschiedenen Metallcluster liegen am Rand des Rotationszentrums.

Dazu wurden zunächst aus mehreren elektronenmikroskopischen Aufnahmen von einseitig oberflächen-mineralisierten Kristallen die Bilder der Einheitszellen ausgeschnitten und in einem Datensatz vereinigt. Dadurch entstand eine Datenbasis von ungefähr tausend Einheitszellen, deren Umfang sich für eine statistische Analyse eignet. So war es möglich, die Daten in verschiedene signifikante Klassen aufzuteilen. Die Analyse erfolgte rechnergestützt unter Verwendung der EM-Software (R. Hegerl, 1996).⁹⁰ Die Korrespondenzanalyse liefert als Resultat die Aufteilung der Einzeldaten in Klassen von Bildern größerer Ähnlichkeit und, wie im vorliegenden Fall, Klassen von ähnlicher Metallverteilung an der Oberfläche des Kristalls. Die Abbildung 43 zeigt 10 Klassen der Mineralisierung des mittleren Rotationszentrums. Die Klassen sind von links nach rechts entsprechend ihrer abnehmenden Besetzungszahl angeordnet. Hierbei ist die erste Klasse mit 157 Bildern am stärksten, und die letzte mit 72 Einzelbildern am schwächsten besetzt. Die Klassenstärken sind also annähernd vergleichbar und weisen keine drastisch bevorzugte Besetzung auf. Die Mittelung der einzelnen Klassen zeigt jeweils die Metallisierung der mittleren Vertiefung. Dabei geben die Positionen der „Cluster“ die Verteilung der Schwerpunkte der Metallisierung an. Die Metallverteilung in der zentralen Vertiefung zeigt keine bestimmbare Affinität für einen bestimmten Ort innerhalb der Vertiefung, jedoch lässt sich deutlich erkennen, dass die Metallabscheidung bevorzugt an den Rändern der Pore stattfindet. Als mögliche Ursache für die Neigung zur Abscheidung am Rand bietet sich die hohe Anzahl der dort befindlichen, geladenen Seitenketten des Porins an, die zum Lysingürtels gehören. Eine Darstellung dieses Ladungsgürtels findet sich in Abbildung 3 a.). Zusätzlich wurde für die Trimere des p312-Kristalls auf der Basis desselben

Datenmaterials eine analoge Korrespondenzanalyse durchgeführt (Abbildung 44).

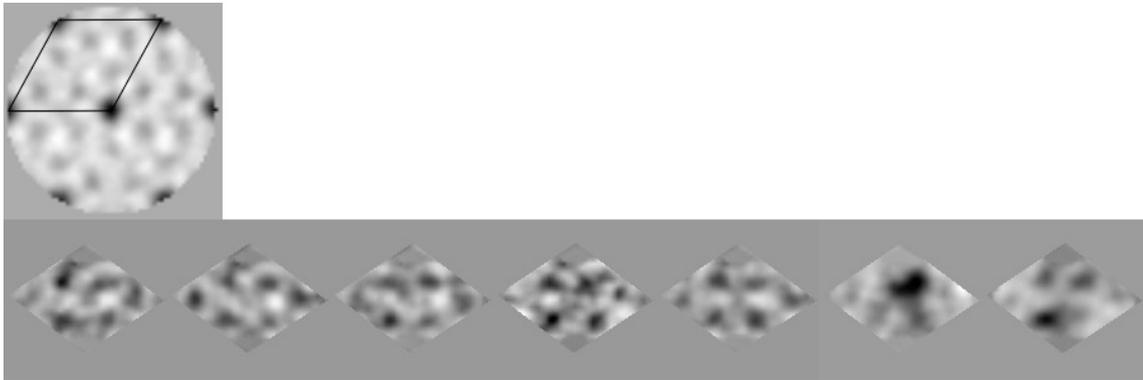


Abbildung 44

(Klassenanalyse 2)

zeigt oben links die gemittelte Einheitszelle eines oberflächenmineralisierten zweidimensionalen Kristalls des Proteins Omp32. Die schwarz umrandete Raute markiert den Ausschnitt, der die reduzierte Einheitszelle darstellt und der Basis des darunter abgebildeten Resultats der Klassenanalyse entspricht. Die einzelnen Klassen waren mit je ca. 150 Bildern in etwa gleichstark besetzt. Die Metallabscheidung findet bevorzugt in den Porenöffnungen der beiden Trimere statt.

Auch hier handelt es sich bei den rautenförmigen Bildern der Klassen wieder um die Schwerpunktdarstellung der Metallverteilung innerhalb der einzelnen dargestellten Klassen. Von besonderem Interesse ist hier der Vergleich zwischen den jeweils rechten und linken Hälften der Rauten, da sie die extra- und die periplasmatischen Seiten des Proteins darstellen. Deutlich kann die Affinität der Metallabscheidung zu den jeweils drei Poren des Porintrimers der rechten und linken Teilseite erkannt werden. Zwischen den beiden Hälften ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Metallverteilung nachweisen. Die Metallabscheidung in den Poren kann mit der in der Engstelle der Poren

vorhandenen hohen Dichten geladener Seitenketten in Zusammenhang gebracht werden. Im Gegensatz zu den an der Porinaußenkante befindlichen Gürtel aus Lysinen geht das elektrostatische Feld in den Poren aber überwiegend auf Arginine zurück (Abbildung 3 b.)).

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Abscheidung der Metallcluster bevorzugt in Bereichen stark geladener Aminosäurereste stattfand. Für den Abscheidungsprozess scheint die elektrostatische Ionen-Protein-Wechselwirkung eine entscheidende Rolle zu spielen.

7 Diskussion

7.1 Diskussion der Resultate der Leitfähigkeitsmessungen

In den Messungen zur Leitfähigkeit konnte gezeigt werden, dass sich der rekombinant hergestellte Wildtyp sowie die Mutanten Q1 und Q4 in ihrer Einbaucharakteristik und ihren Leitfähigkeitswerten den Ergebnissen der Messungen am nativen Wildtyp entsprechen. Die am rekombinanten Wildtyp und an der Mutante Q4 durchgeführten Messungen zur Schließkinetik zeigten das für Porine charakteristische Schließverhalten. Die Mutation von Arg38 zu Gln38 bei Q1 bzw. die Mutation von Glu58 zu Gln58 bei der Mutante Q4 scheinen als einzelne Mutationen keinen gravierenden Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften des Ladungstransportes zu haben, soweit dies aus den vorliegenden Messungen zu schließen ist. Dabei handelt es sich um die Aminosäurereste des Argininclusters, welche den periplasmatischen Öffnungen des Porins am nächsten liegen. In molekulardynamischen Simulationen konnte bisher nur eine Bindung von Malat an die Seitenkette des Arg75 nachgewiesen werden.⁴⁴ Dabei handelt es sich jedoch um den Aminosäurerest des Argininclusters welcher näher an der exoplasmatischen Öffnung des Porins liegt (vgl. Abbildung 3). Die Messungen an den Mutanten Q1 und Q4 sind deshalb nur bedingt geeignet, um durch sie die Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen zu überprüfen. Allerdings liefern diese Messungen die Grundlagen für künftige Messungen an weiteren Mutanten die mittlerweile, nach Abschluss dieser Arbeit, zur Verfügung stehen. Insbesondere die Mutante Q2

bei der das Arg75 durch ein Gln75 ersetzt wurde und weitere Mutanten mit mehrfachen Mutationen der geladenen Seitenketten des Argininclusters sollten geeignet sein, um die Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen zu überprüfen.

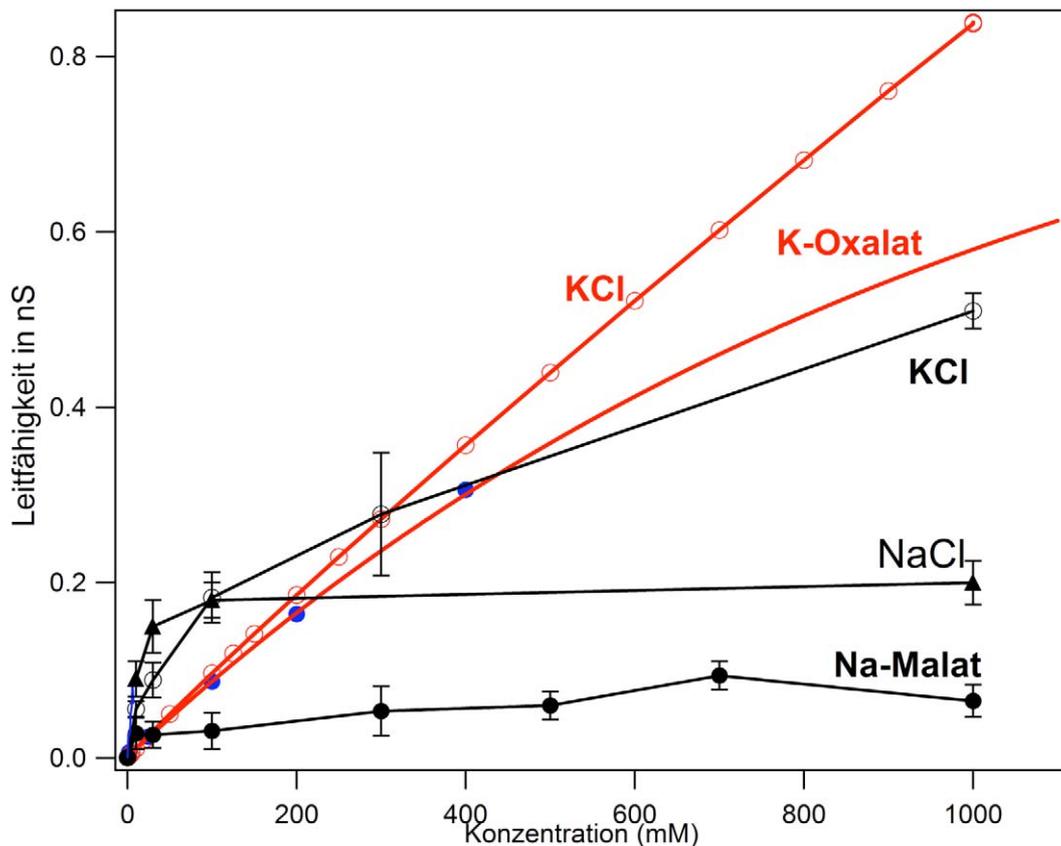


Abbildung 45

(Leitfähigkeiten)

zeigt die Darstellung mehrerer Leitfähigkeitskurven zu verschiedenen Salzen in Abhängigkeit von deren Konzentration. Bei den roten Kurven handelt es sich um theoretische Werte für Kanäle ohne Wechselwirkungen (H. Falkenhagen, 1971)⁹¹, (J. Bartels et al., 1960)⁹² Die schwarzen Kurven sind experimentelle Daten gemessen an Omp32.

Einen interessanten Aspekt zur Überprüfung der theoretischen Befunde durch Leitfähigkeitsmessungen bieten die Leitfähigkeitsmessungen am rekombinanten Wildtyp bei verschiedenen Konzentrationen des Natriumsalzes der Äpfelsäure. Abbildung 45 zeigt mehrere Leitfähigkeitskurven in Abhängigkeit der Salz bzw. Ionenkonzentration. Die in schwarzer Farbe dargestellten experimentellen Daten wurden am Wildtyp von Omp32 gemessen. Die theoretischen Daten, Grundlage der roten Kurven, wurden der Literatur entnommen.^{91,92} Dabei handelt es sich um Daten, welche durch Näherung eines Ionenflusses in einem Kanal von definiertem Durchmesser und ohne Berücksichtigung einer Wechselwirkung zwischen den Ionen und dem Kanal berechnet wurden. Die theoretischen Kurven dienen dem Vergleich mit den experimentellen Daten. Kaliumoxalat wurde ausgewählt, da in der Literatur keine anderen, vergleichbaren Daten, zu Salzen organischer Säuren und insbesondere zu Malatsalzen gefunden werden konnten. Die Vernachlässigung einer Wechselwirkung zwischen dem Kanal und den Ionen führt in Vergleich zu den experimentellen Daten zu deutlich höheren Leitfähigkeitswerten. Sie zeigen weiter kein spezifisches Sättigungsverhalten.

Die experimentellen Daten weisen eine geringere Leitfähigkeit auf, wobei die Leitfähigkeitswerte zu verschiedenen Malatkonzentrationen deutlich geringer sind. Zusätzlich zeigt die Malatkurve ein typisches Sättigungsverhalten, welches auf eine Bindungsstelle für Malationen innerhalb des Kanals schließen lässt. Auch in diesem Zusammenhang sind analoge Messungen an Mutanten und insbesondere am Porin mit mehrfachen Mutationen innerhalb des Arginin-clusters angezeigt, um die Funktion der Seitenketten im Leitfähigkeitsverhalten genauer bestimmen zu können.

Ein weiterer Ansatz zur experimentellen Bestimmung der Malatbindungsstelle könnten Versuche mit radioaktivem Malat darstellen. Denkbar wäre, zu einer wässrigen Lösung aus Omp32 mit Detergenz, eine bestimmte Konzentration von radioaktivem Malat zuzusetzen und das Porin mit Gelelektrophorese analytisch darzustellen. Das Gel dann im Anschluss auf eine Photoplatte bzw. einem Film aufgebracht werden und dort in Abhängigkeit von der benutzten Isotopenkonzentration belassen werden. In einem anschließenden Vergleich könnte festgestellt werden, ob die Bande mit der höchsten Radioaktivität auch mit dem Ort der höchsten Proteinkonzentration übereinstimmt. Generell sollte diese Vorgehensweise möglich sein, da die Bindungsenergie des Malations innerhalb der Pore um Größenordnungen höher ist, als die Energie des Malations innerhalb des äußeren elektrischen Feldes während der Gelelektrophorese. Um unspezifische Bindungen von radioaktiven Malationen, beispielweise an der Außenseite des Porins ausschließen zu können, sollten Vergleichsuntersuchungen mit anderen Porinen oder Mutanten von Omp32 durchgeführt werden. Diese Methode könnte zu einem direkten experimentellen Nachweis der theoretisch gefundenen Bindungsstelle dienen.

Wie bereits erwähnt, erscheinen die Einfachmutanten Q1 und Q4 nicht geeignet, um eine signifikante Änderung der Leitfähigkeitseigenschaften hervorzurufen. Möglich ist dabei auch dass es sich bei dem Arginincluster mit seinen mehreren geladenen Seitenketten um eine Art redundantes System handelt, dessen korrekte Funktionsweise durch eine einzelne diskrete Mutation im Bereich der Konstriktionszone nicht gefährdet wird. Weiterhin ist denkbar, dass die Entfernung einer Ladung eine geringere Ionenselektivität nach sich zieht, die einem erhöhten Kaliumstrom zulässt und damit eine kaum geänderte

Gesamtleitfähigkeit zur Folge hat. Eine korrekte Funktionsweise dieses Porins sollte von großer Bedeutung für den Organismus *Delftia acidovorans* sein, da es sich bei Omp32 um das dominierende Protein in dessen äußerer Membran handelt und das Bakterium auf Polymalat wächst, das es enzymatisch zu L-Malat abbaut und über die äußere Membran aufnimmt (C. Gödde et. al., 1999)⁹³.

7.2 Diskussion der Resultate der Simulationsrechnungen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Leitfähigkeitsmessungen am Omp32 zeigten das typische Schließverhalten, das bei verschiedenen Porinen gefunden wurde. Bisher gibt es keine schlüssige Erklärung für die Funktionsweise des Schließvorganges. Zunächst vermutete Konformationsänderungen des Loop 3 im Poreninneren, die aus Molekulardynamik-Rechnungen abgeleitet wurden (M. Watanabe et al., 1997),⁴⁶ erwiesen sich jedoch als nicht haltbar (G. Bainbridge et al., 1998).⁹⁴ Derzeit werden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen:

- I. subtile Konformationsänderungen der Anordnung von Aminosäureresten in der Engstelle des Kanals (Phale et al., 1997)⁹⁵ die zu einer Blockade des Ionenstromes führen, und
- II. größere Konformationsänderungen anderer exoplasmatischer Loops, die den Kanal schließen. Diese Änderungen wurden durch AFM-Untersuchungen nahegelegt (D. J. Müller et al., 1998).⁹⁶

Die letztere Erklärung kann nicht für alle Porine zutreffen, da die Loopstrukturen der Porine unterschiedlich ausfallen (S.W. Cowan et al., 1992).³² Da Einzelkanalmessungen und die Beobachtung der Porinkonformation noch nicht kombinierbar sind, war es von Interesse, über andere Messgrößen Informationen zum Schließverhalten zu erreichen. Eine Möglichkeit bot die Untersuchung der Kinetik des Vorganges.

Diese erforderte Reihenmessungen über längere Zeiträume bei verschiedenen Spannungen, die nur sehr schwer zu realisieren sind. Dies erklärt, weshalb es auch nur zwei Arbeiten dazu gibt (James und Taylor, 1996),⁹⁷ (Mathes und Engelhardt, 1998).⁹⁸ Der charakteristische Verlauf der Messkurven kann bisher nur mit komplizierten mathematischen Modellen nachvollzogen werden. Eine Methode ist der algebraische Zerfall mit der angepassten Formel:

$$I(t) = A_0 \cdot \left(\frac{t}{x_0} + 1 \right)^{-\frac{1}{\beta}} + y_0$$

wobei

$I(t)$ der zeitabhängige Stromverlauf,

A_0 die Anfangsamplitude (Maximalamplitude) des Stromes,

t die Zeit,

x_0 der relative x-Achsenabschnitt,

β der Exponent mit $\beta \in [1; \infty]$ und

y_0 der y-Achsenabschnitt ist.

In seiner Dissertation hat Mathes⁵¹ bereits gezeigt, dass die Anwendung des algebraischen Zerfalls in Konsequenz eine Wechselwirkung zwischen den Poren der Membran bedingt. Die Natur dieser Wechselwirkung ist bisher völlig ungeklärt. Mathes konnte in seinen Rechnungen zeigen, dass diese unbekannte Wechselwirkung den Charakter einer negativen Kooperativität aufweist. Dabei handelte es sich um eine Wechselwirkung, bei welcher die Gesamtzahl der bereits geschlossenen Poren die Wahrscheinlichkeit einer noch offenen Pore, sich ebenfalls zu schließen, senkt. Diese Art der Wechselwirkung impliziert jedoch, dass jede Pore der Membran mit allen anderen Poren eine Wechselwirkung unterhält, bzw. mit ihnen kommuniziert. Es müsste sich also um eine komplexe und vor allem langreichweitige Wechselwirkung handeln.

Dabei bliebe völlig ungeklärt, durch welchen Mechanismus diese Wechselwirkung über die gesamte Membran vermittelt werden könnte.

Daher wurde auch die Möglichkeit einer kurzreichweitigen Wechselwirkung, der sogenannten Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung diskutiert (siehe Abschnitt 5.2). Sie bildet die Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Simulationsrechnungen. Die Simulationen zur Schließkinetik von Omp34 zeigten dabei ebenfalls eine deutliche Tendenz zur negativen Kooperativität, wobei die Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten selbst die Tendenz einer exponentiellen Abnahme zeigten (vgl. Abbildung 27). Für die Schließkinetiken des rekombinanten Omp32 waren diese Zusammenhänge nicht eindeutig festzustellen. Für die meisten Schließkinetikkurven konnte der Simulationsalgorithmus zwar befriedigende Anpassungen erzeugen, jedoch zeigten sie die oben genannten Zusammenhänge nicht eindeutig. Ein abschließendes Urteil über die Theorie der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen und umfassende Messreihen notwendig. Das Gleiche gilt für die Aufklärung des Funktionsmechanismus der Wechselwirkung zwischen den benachbarten Poren. In Elektrostatikrechnungen konnte bereits gezeigt werden, dass die elektrostatischen Potentiale der Monomere aufgrund ihrer Reichweite nicht geeignet sind, um eine derartige Wechselwirkung zu vermitteln.

Weitere Simulationsrechnungen könnten die Frage klären, ob die Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung ein plausibles Erklärungsmodell für das Schließverhalten der Porine liefern kann. Bisher wurden die Simulationsrechnungen durchgeführt, indem die Messkurven willkürlich auf eine Anzahl von einigen

tausend Datenpunkten reduziert und im Anschluss daran Simulationskurven mit der entsprechenden Anzahl von Datenpunkten gerechnet wurden. Diese Methode war notwendig, um den Rechenaufwand der Simulationsdaten auf ein erträgliches Maß zu beschränken (vgl. Abschnitt 5.5.2). Die Steigerung der Rechenleistung moderner Prozessoren sollte diese Beschränkung obsolet machen. Die Aufhebung dieser Beschränkung ist wichtig, damit aufgrund der Ergebnisse der Simulationsrechnungen nicht nur qualitative, sondern auch direkt quantitative Schlüsse gezogen werden können. Die Zeitauflösung der Simulationsrechnung muss den realen Gegebenheiten angepasst werden, damit auch die absoluten Werte der Schließwahrscheinlichkeitsparameter der tatsächlichen Wechselwirkungsstärke entsprechen. In diesem Zusammenhang wäre es notwendig, durch Messungen der Schließkinetiken bei größtmöglichen Scanraten eine Art kürzester Schließdauer zu bestimmen. In anderen Worten: Es sollte aus diesen Messungen der minimale Zeitraum abgeschätzt werden, welchen ein einzelnes Porin benötigt, um vom offenen Zustand in den geschlossenen Zustand zu wechseln. Diese kürzeste Schließdauer könnte dann als Grundlage für die notwendige Zeitauflösung der Simulationsrechnungen dienen. Wenn zusätzlich noch die Größe des Simulationsarrays an die tatsächliche Anzahl der Porine in der Membran angepasst wird, sollten die in solchen Rechnungen erhaltenen Schließwahrscheinlichkeiten in ihren absoluten Werten der Größe der Wechselwirkung entsprechen. Derartige quantitative Daten könnten helfen, um die Natur einer Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung besser verstehen zu können und insbesondere die Ursache und die Vermittlung dieser Wechselwirkung aufzuklären.

Ein weiterer Aspekt zur Aufklärung der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung liegt in der Integration von Öffnungswahrscheinlichkeiten in die Simulationsrechnungen. Trotz der dominierenden Tendenz zum Schließen zeigten die Messkurven immer vereinzelte Öffnungseignisse. Um eine vollständige Simulation der Schließkinetik zu erreichen, muss auch diese Tendenz Eingang in das Modell der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung finden. Dabei können die folgenden Modellvarianten angewandt werden:

- es wird ein globaler Öffnungswahrscheinlichkeitsparameter für alle geschlossenen Porine definiert, welcher mit den anderen sieben Schließwahrscheinlichkeitsparametern optimiert wird, oder
- es werden sieben Öffnungswahrscheinlichkeitsparameter eingeführt, die analog den Schließwahrscheinlichkeitsparametern den sieben möglichen Nachbarschaftsverhältnissen eines Porins zugeordnet sind.

Die erste Modellvariante geht davon aus, dass es sich bei den Öffnungseignissen um einen zufälligen Effekt handelt, welcher der generellen Schließ Tendenz überlagert ist. Verursacht werden könnte ein solcher Effekt beispielsweise, durch vereinzelte Einbauereignisse von zusätzlichen Porinen in die Membran (Einbauereignisse und Öffnungseignisse können aufgrund der Natur der Messungen nicht unterschieden werden). Diese Modellvariante böte den Vorteil, dass die eigentliche Wechselwirkung weiterhin durch die sieben Schließwahrscheinlichkeitsparameter vollständig charakterisiert wäre.

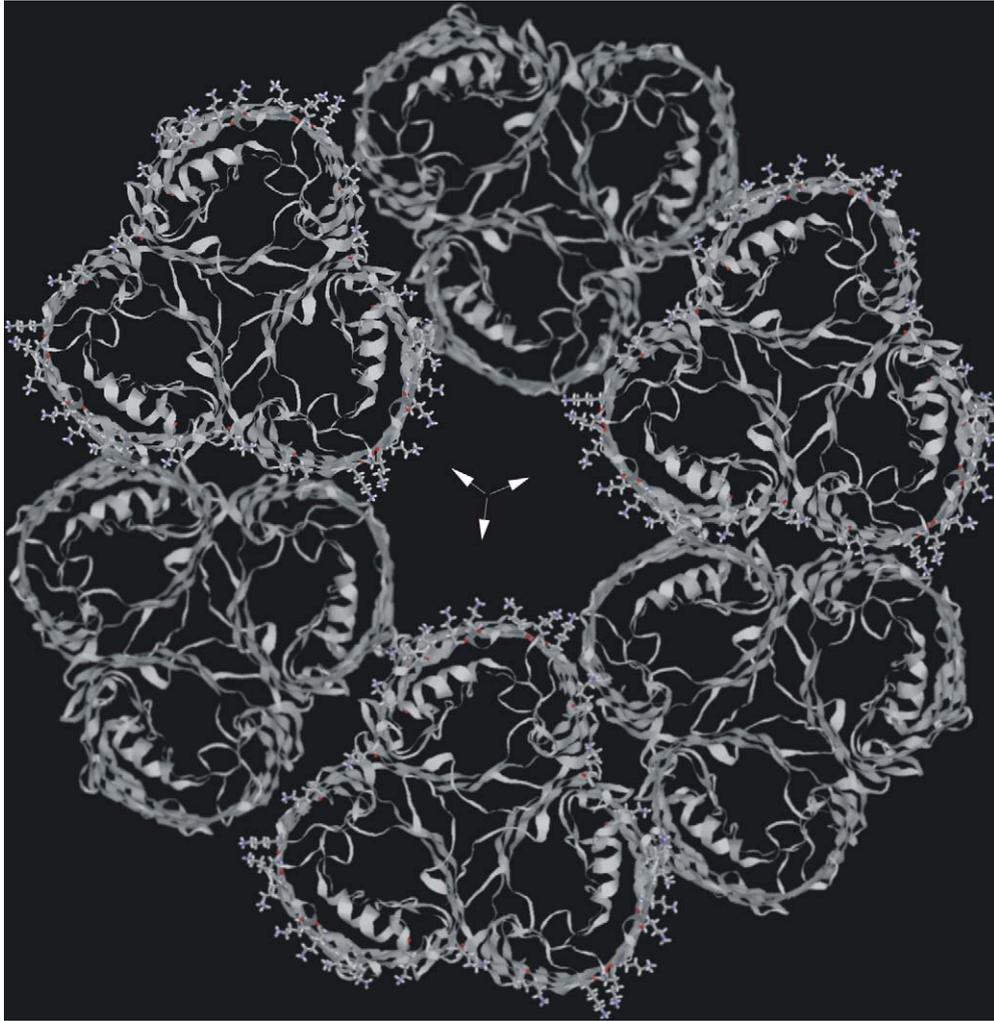
Die zweite Modellvariante sieht die Öffnungseignisse ebenfalls als Bestandteil der Nächsten-Nachbar-Wechselwirkung und somit die Öffnungswahrscheinlich-

keitsparameter in Abhängigkeit von den Nachbarschaftsverhältnissen an. Damit stünde bei den Resultaten jedoch die Interpretation von vierzehn Parametern an. Die Analyse der Daten würde sehr erschwert und die Aufklärung der Wechselwirkung unter Umständen unmöglich werden. Mit großer Sicherheit wäre diese Modellvariante in der Lage, die Messdaten besser simulieren zu können. Allerdings vergrößert sich mit der Anzahl der Parameter, auch der Lösungsraum der Simulationsrechnungen und damit die Wahrscheinlichkeit, nur lokale Lösungen zu finden. Um dieses Problem zu umgehen bzw. die Qualität der Resultate besser einschätzen zu können, wären umfangreiche Analysen notwendig. Beispielsweise müssten die Schrittweite der Intervallschachtelung verringert werden, um damit eine größere Anzahl von Parameterkombinationen zu testen. Zusätzlich müssten mehrere Simulationen mit systematisch variierten Anfangswerten durchgeführt werden, um die Konsistenz der gefundenen Lösungen zu überprüfen. Alle diese Maßnahmen würden den Rechenaufwand der Simulationen signifikant steigern. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass weitere Simulationsrechnungen mit einer höheren Zeitauflösung sicherlich aufschlussreiche Ergebnisse liefern könnten und die Einführung eines globalen Öffnungswahrscheinlichkeitsparameters bedacht werden sollte. Der Wert bisher durchgeführter Modellrechnungen liegt darin, den möglichen Interpretationsrahmen für die Grundlage des spannungsabhängigen Schließens zu erweitern bzw. abzustecken. Es zeigt sich, dass kooperative Vorgänge der beobachteten Kinetik entsprechen. Auf dieser Basis ist es nun möglich, eventuelle experimentelle Ansätze zu formulieren. Ein Weg könnten infrarot-

spektroskopische Messungen sein, wie sie an Omp32 in rekonstruierten Membranen durchgeführt wurden (M. Schwarzott al., 2003).⁹⁹

7.3 Diskussion der Resultate der Biomineralisationsexperimente

Das unspezifische Porin Omp32 ist ein geeignetes Modellsystem zum Studium der Ion-Protein-Wechselwirkungen bei Biomineralisationsvorgängen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals 2D-kristallisierte Porine mit Pd- und Pt-Komplexen, welche sich aus wässriger Lösung reduziert zu metallischen Clustern anordnen, mineralisiert. Dabei zeigte sich, dass die Metallcluster bevorzugt an Positionen innerhalb der Poren und Vertiefungen des Kristalls zu finden sind. Die besondere Kristallanordnung mit ihrer p312-Symmetrie erlaubt eine detaillierte Analyse der Metallabscheidung. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen haben gezeigt, dass Metallabscheidungen an drei bevorzugten Positionen stattfinden. Diese Positionen sind die extrazellulären und periplasmatischen Öffnungen der Porintrimere, sowie die Vertiefungen im zentralen Rotationszentrum der Elementarzellen. Aus den erhobenen Daten ließ sich keine exakte Lokalisierung der Metallcluster in z-Richtung bestimmen. Lediglich für die Vertiefung im Rotationszentrum konnte aus den AFM-Daten der unmineralisierten Kristalle eine annähernde Positionsbestimmung erreicht werden. Die AFM-Daten der unmineralisierten Proteinkristalle haben gezeigt, dass es sich bei der zentralen Vertiefung nicht um ein Loch im Kristall handelt, sondern um eine flache Mulde mit einer Tiefe unterhalb eines halben Nanometers (vgl. Abbildung 38). Daher müssen die Metallcluster im mineralisierten Kristall oberhalb der in der Mulde befindlichen Lipidmoleküle angeordnet sein. Im Falle der p312-Symmetrie liegen um diese Mulde sechs Porintrimere in alternierender Orientierung (vgl. Abbildung 46).

**Abbildung 46****(Ladungsverteilung)**

zeigt die schematische Darstellung einer Einheitszelle des zweidimensionalen Omp32-Kristalls mit $p312$ -Symmetrie. Die Seitenketten der Lysine des Lysingürtels der exoplasmatischen Porinöffnung sind in dieser Darstellung hervorgehoben. Die Pfeile zeigen die Lysinseitenketten, welche in das Innere der zentralen Mulde ragen.

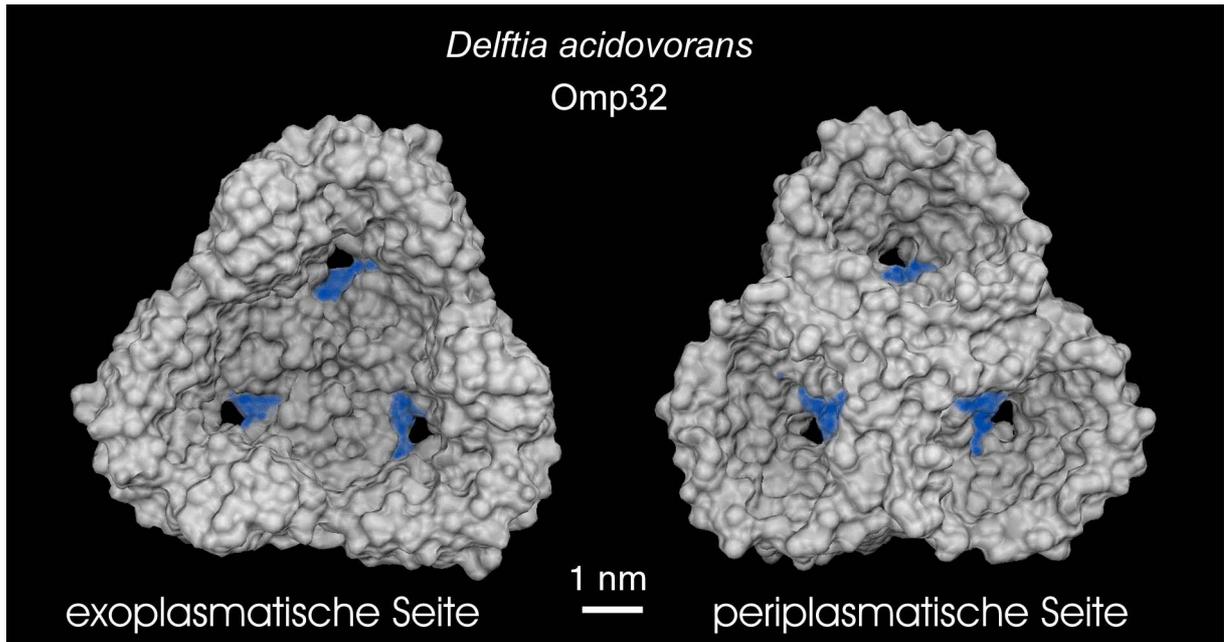
Das heißt, die Porine sind abwechselnd mit ihrer peri- und ihrer exoplasmatischen Seite nach oben angeordnet. Dadurch ragen bei jedem zweiten Porintrimer der Einheitszelle die Seitenketten des Lysingürtels in das Innere der Mulde hinein. In diesen Bereichen weisen die Ränder der Mulde eine starke Ladungskonzentration auf. Die Wechselwirkung dieser Ladungen mit den Pt-

und Pd-Ionen bzw. -Komplexen könnte ursächlich für die Abscheidung von Metallen innerhalb der Mulde verantwortlich sein. Ein Vergleich mit Abbildung 43 zeigt, dass die Schwerpunkte der Metallcluster aller Klassen immer dem Rand zugewandt sind. Unter Annahme eines relativ isotropen Wachstums der Cluster, beginnend von einem initialen Reduktionsort, gleich eines Kondensationskeimes, sollte die Lage des Schwerpunktes der Metallcluster Aufschluss über den Ort der ersten und damit wahrscheinlichsten bzw. stärksten Wechselwirkung geben. Die Orientierung der Cluster zum Rand der Mulde legt den Schluss nahe, dass die Metallabscheidung mit der erhöhten Ladungsdichte am Rand der Mulde korreliert.

Um eine höhere statistische Aussagekraft zu erreichen, wurden bei den Auswertungen zu Abbildung 43 und Abbildung 44 Einheitszellen aus mehreren EM-Bildern unterschiedlicher Kristalle gemeinsam ausgewertet. Die verschwindend geringe Wahrscheinlichkeit bei dieser Methode, mehrere Kristalle in gleicher Orientierung auswerten zu können, hat zur Konsequenz, dass bei der Auswertung der rotationssymmetrischen Mulde im Zentrum der Einheitszelle (Abbildung 43) die Orientierungen der entsprechenden Bildausschnitte variieren. Die Affinität zu den geladenen Seitenketten der Lysine kann nicht mit letzter Sicherheit bestimmt werden, immerhin zeigen die Schwerpunkte der Metallcluster von gleichstark besetzten, somit in Abbildung 43 benachbarter, Gruppen eine Affinität zu den Ladungsclustern.

Bereits die erste Analyse der einseitig-mineralisierten 2D-Kristalle (Abbildung 39) zeigte, dass eine Mineralisierung innerhalb der Poren stattfindet. Diese Mineralisierung ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt, als die

Mineralisierung der zentralen Mulde. Die einseitige Mineralisierung lieferte erste Hinweise zur Bestimmung der Symmetriegruppe des Kristalls (vgl. Abbildung 40). Gleichzeitig wurde durch diese Messungen ebenfalls bestätigt, dass die einseitige Mineralisierung erfolgreich durchgeführt werden konnte, da eine beidseitige Mineralisierung keine Differenzierung zwischen den Symmetriegruppen $p6$ und $p312$ zugelassen hätte. Der Befund des Vorliegens einer $p312$ -Symmetrie konnte später durch die AFM-Untersuchungen bestätigt werden. Weiter kann aus diesen Befunden geschlossen werden, dass die Mineralisierung der Trimerporen auf deren dem Grid abgewandten Seiten dominiert. Würde die Pore auf ihrer gesamten Länge mineralisiert könnte, aus den EM-Daten ebenfalls keine Unterscheidung zwischen den Symmetriegruppen getroffen werden. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass Metallionen bzw. Komplexe nicht im gesamten Kanal gleichmäßig zur Mineralisierung zur Verfügung stehen. Der Weg für die Ionen durch die Pore muss demnach eingeschränkt sein. Diese Beschränkung kann im Wesentlichen durch zwei Umstände hervorgerufen werden: zum einen durch die Engstelle der Pore und zum anderen könnte der wachsende Metallcluster die Diffusion behindern. Beide Umstände könnten eine oberflächenseitig dominierende Mineralisierung erklären. Für eine einseitige, innerhalb der unteren Hälfte der Kristalle liegende Mineralisation konnten keine Hinweise gefunden werden.

**Abbildung 47****(Ladungen im Trimer)**

zeigt eine schematische Darstellung der exo- und periplasmatischen Seite des Porins. Die Bereiche der Ladungen der Argininseitenketten des Argininclusters sind in blauer Farbe gekennzeichnet. Die exoplasmatische Seite zeigt die gemeinsame Mulde der Monomere auf deren Grund die Eingänge zur Konstriktionszone liegen. Die periplasmatische Seite ist gekennzeichnet durch die drei einzelnen Kanäle. Dort reichen die Bereiche der Argininseitenketten fast bis zum Eingang der Kanäle.

Die einzelnen Poren der Trimere sind gemäß der EM-Daten und deren Auswertung in etwa gleich stark besetzt. Dies gilt insbesondere für Trimere beider Sorten, also jenen, welche mit ihrer exoplasmatischen Seite nach oben und denjenigen, welche mit ihrer periplasmatischen Seite nach oben im Kristall angeordnet sind. Auf der exoplasmatischen Seite des Porins bilden die einzelnen Monomere eine gemeinsame Vertiefung, während sie auf der periplasmatischen Seite als drei getrennte Kanäle aus der Membran treten (vgl. Abbildung 47). Die Ergebnisse der Mineralisation zeigen in beiden Orientierungen deutlich drei isolierte Metallcluster pro Trimer. So weisen auch

die Trimere, welche mit der exoplasmatischen Seite nach oben im Kristall angeordnet sind, drei isolierte Metallcluster auf. Da die Öffnungen der drei Kanäle dort jedoch in eine gemeinsame Mulde münden, muss die Mineralisierung im Bereich dieser Mündung oder unterhalb davon beginnen. Dort liegt bereits die Engstelle der Kanäle und damit auch der Einflussbereich der geladenen Seitenketten des Argininclusters, insbesondere die Seitenkette des Arginins 133, ist hier zugänglich.

Im Falle der Trimere, welche im Kristall mit der periplasmatischen Seite nach oben angeordnet sind, reicht der Einfluss des Argininclusters sehr weit nach außen. Die Seitenkette des Arginins 38 liegt dort kurz vor dem Eingang zu den drei isolierten Kanälen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Mineralisierungsprozess in Bereichen seinen Ausgang nimmt, in welchen stark (positiv) geladene Seitenketten vorhanden sind. Dies führt zur Annahme, dass diese Seitenketten die Mineralisierung initiieren oder zumindest begünstigen.

Biominalisationsexperimente und solche, die die spezifische Anlagerung von Metallclustern zum Ziel haben, wurden hauptsächlich mit bakteriellen S-Layern durchgeführt. S-Layer sind natürlich 2D-Kristalle eines Außenflächenproteins, die eine Zellmembrankomponente zahlreicher Bakterien und Archaeen bilden (H. König, 1994),¹⁰⁰ (U. B. Slayter et al., 1996).¹⁰¹ Es gab mehrere Ansätze regelmäßige Metallisierungen durchzuführen (E. Bäuerlein, 2003).¹⁰² Da jedoch die Atomstrukturen von S-Layer nach wie vor ungeklärt sind, konnte der Reaktionsmechanismus für Proteine bisher nicht aufgeklärt werden.

Untersuchungen mit DNA und theoretische Modellstudien legten Wechselwirkungen mit N in Purinbasen und Histidin nahe (L. C. Ciachi et al., 2003),¹⁰³ (M. Mertig et al., 2002).¹⁰⁴ Elektronenmikroskopische Studien an, mit Pd mineralisierten S-Layern zeigen klar, dass es keinen streng lokalisierten Nukleationsansatz für die Bildung der Metallcluster gibt (R. Wahl et al., 2005).¹⁰⁵ Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass mehrere Aminosäurereste oder über gewisse Oberflächenareale verteilte physikalisch-chemische Eigenschaften zur Anlagerung des Metalls führen. Die Untersuchungen mit dem Porin Omp32 konnten nun erstmals zeigen, dass positive Ladungscluster eine solche Eigenschaft aufweisen.

Das Modellprotein Omp32 erscheint also geeignet, eventuelle spezifische Wechselwirkungen aufklären zu helfen.

Um die Lokalisierung der Metallcluster innerhalb des zweidimensionalen Kristalls genauer bestimmen zu können, bestünde beispielsweise die Möglichkeit, EM-Untersuchungen mit Energiefilterung (EELS) durchzuführen. Dadurch könnte die Position der Metallcluster genauer bestimmt werden, da sich die Energieverluste der Elektronen innerhalb des Proteinkristalles und durch die Metallcluster besser differenzieren ließen. Allerdings dürfte die dafür notwendige Strahlendosis ein Problem darstellen. In Betracht käme auch eine Untersuchung mittels Elektronentomographie bzw. Elektronenkristallographie (W. Baumeister, 2002)¹⁰⁶ zu einer näheren Bestimmung der z-Position der Metallcluster innerhalb des Proteinkristalls. Die erzielbare Auflösung würde eine Lokalisierung des Clusterschwerpunkts auf 1-2 nm erlauben (W. Baumeister et al., 1986)¹⁰⁷.

Interessant wären zweifellos auch weitere AFM-Untersuchungen an mineralisierten Proteinkristallen. Dazu müsste jedoch erst ein geeignetes Substrat gefunden werden, das die folgenden Eigenschaften aufweisen sollte:

- I. seine Oberflächenrauigkeit darf nicht zu groß sein, damit Rasterkraftuntersuchungen möglich werden,
- II. es muss entweder gute Adhäsionseigenschaften für volumenmineralisierte 2D-Kristalle aufweisen, oder
- III. gute Adhäsionseigenschaften für nicht mineralisierte Kristalle haben, sowie eine Mineralisierung der Kristalle erlauben, ohne selbst eine Affinität zur Metallabscheidung zu zeigen.

Alternativ oder kumulativ könnten auch weitere Untersuchungen mit rastersondenmikroskopischen Techniken durchgeführt werden. Als Beispiel sei hier die SNOM-Technik genannt, welche es zuließe, bei mineralisierten Kristallen aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften direkt zwischen Proteinanteilen und Metallclustern der Oberfläche zu unterscheiden.

Zum Studium der Ionen-Protein-Wechselwirkung sollte in diesem Zusammenhang auch eine Biomineralisierung von zweidimensionalen Kristallen der Omp32-Mutanten erfolgsversprechend sein. Insbesondere die Kristalle einer Mutante, bei welcher alle geladenen Aminosäurereste des Argininclusters durch neutrale Seitenketten ausgetauscht wurden, stellen ein interessantes Studienobjekt dar. Aufgrund der bisherigen Untersuchungen sollte ein Vergleich der EM-Aufnahmen von mineralisierten Kristallen der Mutanten und des nativen Proteins deutliche Unterschiede aufweisen und somit der Einfluss der

geladenen Seitenketten auf den Mineralisierungsprozess direkt beobachtet werden. Leider gestaltet sich die Herstellung der Mutanten als schwierige Herausforderung, weshalb bis dato nur eine geringe Menge der Mutanten für Untersuchungen zur Verfügung standen. Für Kristallisationsansätze wären etwas größere Mengen notwendig.

Als Fazit ist festzustellen, dass die gut definierte Ladungseigenschaft des Porins Omp32 und die Möglichkeit, es in 2D-Kristallen zu rekonstituieren, das Protein zu einem geeigneten Analyseobjekt für die Aufklärung der Metallisierungsvorgänge machen.

8 Anhang

8.1 Programmcode zur Simulation der Schließkinetik

```

#pragma rtGlobals=1          // Use modern global access method.
#include <Waves Average>
//
// #include <All IP Procedures>
// #include <Image Saver>
//
// =====
// Closing Kinetics simulation - includes open kinetics -          VERSION 3.5 (3. Mar. 2004)
// =====
// Model 1:
// Closing Kinetics model for porins. Every porin in a 2D-array is surrounded by 6 other porins that are either open
// or closed (conducting or not conducting). Depending on the number of closed pores in the neighbourhood the one considered
// will close with a certain probability. This is the cooperativity model. The array is in fact a 2D-crystal and may be chosen
// in size as desired (default size is square, but the effective 2D-lattice is hexagonal).
// The program starts scanning the array for pores (= porins) that are open. If this applies for pore i the status of the six
// neighbouring pores are evaluated and the closed pores are counted. There are seven situations: 0 to 6 pores closed. For each
// situation pore i has a certain probability to close. Whether it becomes a closed pore is determined by a "Monte Carlo"
// decision. Now the program proceeds to pore i+1 and so on until the whole array has been scanned. While scanning the total
// of open pores is counted and stored as a conductance measure in a simulated curve. The next turn provides a different
// situation for individual pores and a smaller "conductance" because some of the channels are closed now. By this way a
// closing curve is simulated. Each point measured (equally spaced in time) is simulated by this procedure (equally spaced from
// one step to the next). The boundary conditions for the array may be set to "open pores" or "closed pores" .
//
// Data and variables required for Curve Simulation:
// -----
// ARR:          This is the array of pores. It is filled with 0 (closed) or 1 (open). The starting situation is all pores are open
//               (1).
//               See Macro MakeArray for generating an array of arbitrary size (width).
// ProbVec:      This is vector (list) containing 7 closing probabilities (values are 0 to 1, no negatives) and one open probability
//               in the last position (normally set to 0, if reopening of pores is not to be forced). The values should be typed into
//               the
//               "Prob Values" Table that is displayed upon Macro MakeProb. These transition probabilities are applied to
//               simulate a closing kinetics curve. (For first trials set the last value, i.e. the open probability, to zero.)
// OCurve:       This is a copy of the original closing curve ("CurveName"). It is generated by Macro SelectCurve. "CurveName" is
//               written into the windows to indicate which curve is to be simulated (fitted).
// RESULTS:
// SCurve:       This is the simulated curve, i.e. the result of the Program "Simulate Curve" (see Button in main window). It is
//               generated and displayed automatically. If you need to keep this curve make a copy (it is overwritten in the next run.)
// RMSvalue:     Is displayed and updated in the "RMSData" table. It indicates the deviation of the SCurve from the OCurve.
//
//               Note that there are working copies of a number of the input and output data that are not deleted after a run.
//               If they were deleted by accident it should not be a problem because they are generated automatically if needed.
//
// Data and variables required for simulation of N curves (Button: Simulate N Curves):
// -----
// N:            Just set N below the Button to the desired value (limited from 2 to 100). The program simulates N curves applying
// ProbVec for each run. This provides an impression on the stochastic variability (the smaller the array is, the
// more differ individual curves from a common average). Two more windows are opened, one displaying the original
// curve and all the simulated ones, the other shows the original curve, the average of the simulations and the plus
// and minus SD curves. (The data of a normal Curve Simulation are required in addition.)
// RESULTS:
// Sc_1 to Sc_N: These are the N simulated curves (SCurve contains the last simulation only, i.e. Sc_N). They will be deleted with
//               the next run of "Simulate N Curves" and replaced by the actual results.
// SCurveAV:     This is the average of all N simulated curves.
// SCurveAVmSD:  Actually the average minus the SD curve (not stored as such).
// SCurveAVpSD:  Correspondingly the average plus the SD curve. (All these curves are overwritten in the next run.)
//
// Fitting simulated curves to the original data (Button: Fit Curve):
// -----
// The fitting procedure starts with the given set of transition probabilities in ProbVec and improves these values such that the
// simulated curve fits the original one better. To achieve this an interval for each probability is defined (data in ProbLimits) .
// Within these limits the corresponding probabilities are fitted. The program determines the interval size for each probability
// and sets the corresponding probability to 1/3 and 2/3 of the interval (actually lower limit plus 1/3 of the interval size and
// lower limit plus 2/3 of the interval size). This is done for each of the 7 transition probabilities, so that 27 =128 combinations
// occur. All these probability combinations are tested and the fit of the simulated curves to the original one is judged by the
// common RMS criterion (actually the sum of squares is calculated). The RMS values are stored together with the corresponding
// probability combination and the minimum RMS selected. The corresponding combination of transition probabilities is stored in
// ProbVec. Now the interval limits are updated such that the new interval for the individual probability is set to 2/3 of the previous
// interval size. If the new probability value was chosen from the lower estimate, the upper limit was reduced and vice versa. This
// procedure characterizes one single approximation step. Normally a number of approximations are needed to find a proper set
// of transition probabilities (see: Approx per FitCycle). NOTE: The reasonable choice of starting values for the limits of the
// individual probabilities is an essential step.
// Since the simulated curve is the result of a stochastic process it is dangerous to trust a single simulation for the determination of
// the RMS value being the quality criterion for the approximation process. To minimize the influence of statistical fluctuations,
// a number of simulations should be performed and the RMS values averaged. This improves the correct choice of the best
// combination of transition probabilities (see: Simulations per Approx).
// Even with a number of simulations for each step of the approximation process there is some uncertainty left, so that it is
// recommended to perform more than one fit cycle (see: Number of FitCycles) to get an idea how the final estimates of the
// transition probabilities fluctuate.
//
// Opening probabilities:
// -----
// Currently, opening probabilities can only be applied but NOT fitted. Actually, there is one single open probability to be
// applied (set in the last position in ProbVec). The procedure is as follows. First, the open pores are scanned (see above)
// and closed according to the transition probabilities. This updated array is stored separately. In a second run the original
// array is scanned for the closed pores and the opening probability applied. Previously closed pores that are opened now are
// updated in the stored array from the first scan. This array is the result from which the apparent conductance (number of
// open pores) is calculated and stored in the simulated curve as a data point. Application of an opening probability influences
// the fit of the closing probabilities, i.e. the values are somewhat different. "Fit" of the open probability has to be done by hand.
// NOTE: This procedure is only one of several possibilities to apply opening. Other procedures have to be tested.
//
// Time required for fitting:
// -----
// The fit procedure takes its time. One single simulation takes about 1 to 5 seconds for a curve of 1000 to 1500 data points.

```

```

// (The actual value depends on the number of open pores (size of array!), opening of closed pores not included.)
// So, one approximation step needs approx. 2 to 10 minutes if only one simulation is done for each of the 128 simulation tests.
// (Values apply for 1 GHz OS X / G4 Mac.)
//
// Data and variables required for Fit Curve:
// -----
// Simulations per Approx:      Means simulations per single test for the 128 test per approximation step. The smaller the
//                               array is, the more simulations should be averaged to get a reasonable estimate for the correct
//                               RMS value. (For array size = 10 (means 100 pores) apply at least 5 (better >10) simulations.)
//                               (Limits are 1 to 50)
// Approx. per FitCycle:       Number of approximation steps (usually around 10).
//                               (Limits are 1 to 25)
// Number of FitCycles: Repeat a complete fit cycle several times, each starting with the same set of interval limits.
//                               (Limits are 1 to 25)
// ProbLimits:                 Contains the lower and upper limit of the interval for the corresponding probability defined
//                               in ProbVec. The ProbLimits are displayed in the "Prob Values" table and should be defined there.
//                               They are updated after each approximation step. The best combination of transition probabilities
//                               are written into the ProbVec and also updated. One single simulation is done after each approximation
//                               step and updated in the "Closing kinetics simulation" window. (Note that the displayed curve is
//                               a simulation done with the best choice of probabilities but will not necessarily result in the
//                               best approximation because of the statistical fluctuation. So, the actual RMS value displayed and
//                               updated in the "RMS value" table is not identical with the minimal RMS value found during the
//                               approximation procedure. In almost all cases the actual value is larger.)
//                               NOTE: All the other input data from curve simulations are required in addition.
// RESULTS:
// ProbVec_1 to ProbVec_N:     N means the number of FitCycles chosen. These ProbVec_ contain the finally fitted probability
//                               values as a result from the N fit cycles. The variability of the values gives an impression of the
//                               consistency of the fit procedure.
// ProbVec_Average:           Contains the averaged transition probabilities from the N ProbVec_ data. This represents the
//                               final result and estimate for the fitted probabilities.
// ProbVec_SD:                 Contains the standard deviation of the averaged N ProbVec_ data. These data are used to produce
//                               the error bars in the plot of the averaged probabilities (see Macro: DispProbAverage).
//
// ProbLimits_1 to ProbLimits_N: Meaning of N as above. These ProbLimits_ contain the final interval limits as a result from
//                               the N fit cycles.
//
// ProbVecMatrix_1 to ... _N:  Contains all the probabilities of each approximation step from the N fit cycles. These data are
//                               useful if the approximations did not focus but fluctuated (according to the RMS values). So it is
//                               possible to select the best combination of probabilities afterwards even if the final result was
//                               worse than an intermediate one.
// RMSminList_1 to ... _N:    This is the corresponding list of RMS values that is needed to find the best fit of probability values
//                               during the approximations that did not result in the best one in a complete fit cycle (see above).
//
//                               NOTE: All the results are deleted / overwritten with the next call of Fit Curve (or of Fit Parameter).
// Model 2:
// This model originates from Model 1 (actually, it includes the analysis of the probability values as a function of voltage).
// The probability values could apparently be fitted by an exponential curve:  $p(c) = A * \exp(B*c) + D$ , where  $D = 0$ .
// It turned out that B is apparently independent of the voltage, so that it can be expressed by a (fitted) constant value (ExpFac).
// The factor A = f(c=0) is identical to the closing probability for 6 open neighbours, which is to be fitted.
// The procedure "Fit Parameter" (Button) fits A according to the iterative method (see intervals etc. above). The dependent values for
// c>0 (i.e. one or more pores closed in the neighbourhood) are calculated according to the exponential model and the Exponential
// Factor (ExpFac) given.
// The procedure applies the same averaging of simulations, number of approximations, and repetition of FitCycles as with the "Fit Curve".
// These values have to be set.
//
// Data and variables required for Fit Parameter:
// -----
// All the data and variables of Fit Curve are also used here.
// ProbLimits:                 Only the first value p(0) in row 0 is fitted.
//                               Only these limits have to be set (the other values are ignored). The limits are updated according to the
//                               fit.
//
// ProbVec:                     ProbVec is updated after fitting where the first value was fitted and the other ones calculated according
//                               to the exponential model (by use of the Exponential Factor given).
// Exponential Factor:          To be defined below "Fit Parameter" button (accepts floating point values between -10 and +10).
//
// RESULTS:
// See results of "Fit Curve", except for
// RMSminList_1 to ... _N:     The minimum RMS values are not stored. Existing lists are not updated.
//
//                               NOTE: All the results are deleted / overwritten with the next call of Fit Parameter (or of Fit Curve).
//
// MACROS:
// -----
// 1. To make an Array of any size apply Macro:
// 2. To initialise the ProbVec values use Macro:
// 3. To simulate or fit a given curve select it by Macro:
// 4. To create a second graph (copy of main window):
// 5. To create a graph of the averaged Prob values:
//
// INITIALIZE PROCEDURE:
// -----
// To initialize the main window (if not existent) type into command line:
// and perform Macros 1 to 3 afterwards. This should be sufficient to initialize all the data required for simulation and fitting.
//
// =====
//
// =====
// Functions and Macros:
// =====
//
// Create Button Table for curve simulation and fit procedure
// -----
Window ClosingKinetics() : Graph
    PauseUpdate; Silent 1
    Display /W=(10,10,600,450) OCurve as "Closing kinetics simulation"
    AppendTOGraph SCurve
    SetAxis left -0.15, 1.15
    ModifyGraph mirror(left)=2
    ModifyGraph mirror=2
    ModifyGraph mode(OCurve)=3,marker=19
    ModifyGraph msize(OCurve)=0.5
    ModifyGraph rgb(OCurve)=(21845,21845,21845)
    SetDrawLayer/W=ClosingKinetics/K UserFront
    DrawText 0.8,0.1, SelCurve

    Variable NSim

    if (exists("NSimValue") !=1)
        Make/N=1 NSimValue

```

```

        NSimValue=1
    endif

    if (exists("NApproxValue") !=1)
        Make/N=1 NApproxValue
        NApproxValue=1
    endif

    if (exists("NFitCycleValue") !=1)
        Make/N=1 NFitCycleValue
        NFitCycleValue=1
    endif

    if (exists("NSimApproxValue") !=1)
        Make/N=1 NSimApproxValue
        NSimApproxValue=1
    endif

    if (exists("ExpFacValue") !=1)
        Make/N=1 ExpFacValue
        ExpFacValue=0
    endif
    ExpFacValue=0

    ShowTools
    ControlBar 82
    Button SimCurveButton,pos={10,2},size={110,30},proc=SimCurveButtonProc,title="Simulate Curve"
    Button SimCurveNButton,pos={125,2},size={140,30},proc=SimCurveNButtonProc,title="Simulate N Curves"
    Button FitCurveButton,pos={270,2},size={100,30},proc=FitCurveButtonProc,title="Fit Curve"
    Button FitParamButton,pos={270,35},size={100,30},proc=FitParamButtonProc,title="Fit Parameter"
    SetVariable ctrlNumSim,pos={155,35}, value=NSimValue,title=" N = ",size={70,18},win=ClosingKinetics
    SetVariable ctrlApproxFit,pos={375,22}, value=NApproxValue,title=" Approx per FitCycle = ",size={160,18},win=ClosingKinetics
    SetVariable ctrlApproxFit,limits={1,25,1}
    SetVariable ctrlCyclesFit,pos={375,42}, value=NFitCycleValue,title=" Number of FitCycles = ",size={160,18},win=ClosingKinetics
    SetVariable ctrlCyclesFit,limits={1,25,1}
    SetVariable ctrlSimFit,pos={375,2}, value=NSimApproxValue,title=" Simulations per Approx = ",size={160,18},win=ClosingKinetics
    SetVariable ctrlSimFit,limits={1,50,1}
    SetVariable ctrExpFit, pos={270,65}, value=ExpFacValue, title=" Exponential Factor = ",size={160,18},win=ClosingKinetics
    SetVariable ctrExpFit,limits={-10,10,0}

EndMacro

// Entry for curve simulation via Button Control
// -----
Function SimCurveButtonProc(ctrlName) : ButtonControl
    String ctrlName

    Variable RunTime

    Duplicate/O SCurve RMSWave

    if (exists("RMSData") !=1)
        Make/N=1 RMSData
    endif

    if (WinType("RMSvalueTable") !=2)
        Execute "RMSvalueTable()"
        DoWindow/F RMSvalueTable
        AppendToTable RMSData
    endif

    // RunTime=datetime
    SimCurve(OCurve, SCurve,ProbVec, ARR, ARR2,RMSWave,RMSData)
    // RunTime=datetime-RunTime
    // print "Runtime = ",RunTime // output of running time for one single
    simulation

End

Window RMSvalueTable() : Table

    Edit as "RMS value"

EndMacro

// Entry for N curve simulations via Button Control
// -----
Function SimCurveNButtonProc(ctrlName) : ButtonControl
    String ctrlName

    String ScName
    Wave NSimValue, SCurve,OCurve,RMSData,RMSWave,ARR,ARR2,ProbVec
    Wave SCurveAV,SCurveAVnSD,SCurveAVpSD,Dummy
    Variable NSim,i

    NSim=NSimValue[0]

    Duplicate/O SCurve RMSWave
    Duplicate/O SCurve SCurveAV
    SCurveAV=0
    Duplicate/O SCurveAV SCurveAVnSD
    Duplicate/O SCurveAV SCurveAVpSD

    if (exists("RMSData") !=1)
        Make/N=1 RMSData
    endif

    if (WinType("RMSvalueTable") !=2)
        Execute "RMSvalueTable()"
        DoWindow/F RMSvalueTable
        AppendToTable RMSData
    endif

    if (WinType("KineticGraph") !=1)
        Execute "KineticGraph()"
    else
        DoWindow/F KineticGraph
    endif
end

```

```

RemoveFromGraph/Z OCurve
RemoveFromGraph/Z SCurve
AppendToGraph OCurve
ModifyGraph mode(OCurve)=3,marker=19
ModifyGraph msize(OCurve)=0.5
ModifyGraph rgb(OCurve)=(21845,21845,21845)
SetAxis left -0.15, 1.15
ModifyGraph mirror(left)=2
ModifyGraph mirror=2

for (i=1;i<101;i+=1)
  ScName="Sc_"+num2str(i)
  RemoveFromGraph/Z $ScName
  KillWaves/Z $ScName
endfor

for (i=1;i<NSim+1;i+=1)
  SimCurve(OCurve, SCurve,ProbVec, ARR, ARR2,RMSwave,RMSData)
  ScName="Sc_"+num2str(i)
  Duplicate/O SCurve $ScName
  AppendtoGraph $ScName
  Duplicate/O $ScName Dummy
  SCurveAV=SCurveAV+Dummy
  SCurveAVmSD=SCurveAVmSD+(Dummy)^2
endfor

SCurveAVmSD=((SCurveAVmSD-(SCurveAV)^2/NSim)/(NSim-1))^0.5 // SD of averaged curves
SCurveAV=SCurveAV/NSim // average of curves
SCurveAvpSD=SCurveAV+SCurveAVmSD // averaged curve plus SD
SCurveAVmSD=SCurveAV-SCurveAVmSD // averaged curve minus SD

if (WinType("KineticGraph2") !=1)
  Execute "KineticGraph2()"
else
  DoWindow/F KineticGraph2
endif

RemoveFromGraph/Z OCurve
RemoveFromGraph/Z SCurve
AppendToGraph OCurve
ModifyGraph mode(OCurve)=3,marker=19
ModifyGraph msize(OCurve)=0.5
ModifyGraph rgb(OCurve)=(21845,21845,21845)
SetAxis left -0.15, 1.15
ModifyGraph mirror(left)=2
ModifyGraph mirror=2

AppendtoGraph SCurveAV
AppendtoGraph SCurveAVmSD
AppendtoGraph SCurveAvpSD

End

Window KineticGraph2() : Graph
  Display/W=(610,460,1210,850) as "Simulated Curve: Average +/- SD "

EndMacro

// Simulate closing kinetics with given transition probabilities
// -----
Function SimCurve(OCurve,SCurve,ProbVec, ARR, ARR2,RMSwave,RMSData) // called by "Simulate Curve" Button
  Wave OCurve, SCurve,ProbVec, ARR,ARR2,RMSwave,RMSData

  Variable DIM
  Variable g,h,i,j,k, hmax,kmax,cpor, tp, zehn
  Variable OpenSum,MaxSum
  Variable RMSvalue

  // Maximum number of open pores
  DIM = (DimSize(ARR,0))
  MaxSum=(DIM-2)^2

  // Determine size of OCurve for simulation
  WaveStats/Q OCurve
  kmax=V_rpoints

  // Refresh array with open pores (except for edges)
  for (i=1;i<DIM-1;i+=1)
    for (j=1;j<DIM-1;j+=1) // fill ARR - but not edges - with open pores
      ARR[i][j]=1
    endfor
  endfor

  ARR2=ARR
  SCurve = 1

  // Check neighbour situation of pores and calculate closing kinetics with given probabilities
  for(k=0; k<kmax; k+=10)
    OpenSum=0 // refresh value for this cycle
    for (i=1; i<DIM-1; i+=1) // look for open pores to be closed
      for (j=1; j<DIM-1; j+=1)
        if(ARR[i][j]=1)
          OpenSum+=1
          cpor=6-ARR[i-1][j]-ARR[i-1][j+1]-ARR[i][j-1]-ARR[i][j+1]-ARR[i+1][j-1]-ARR[i+1][j]
          tp = ProbVec[cpor]
          if (abs(enoise(1))<=tp)
            ARR2[i][j] = 0
          endif
        endif
      endfor
    endfor

    IF (ProbVec[7] !=0) // if value==0 do not apply open
      events
    endif
  endfor
endfunction

```

```

    for (i=1; i<DIM-1; i+=1)
        opened
            for (j=1; j<DIM-1; j+=1)
                if (ARR[i][j]==0)
                    tp = ProbVec[7]
                    if (abs(enoise(1))<=tp)
                        ARR2[i][j] = 1
                    endif
                endif
            endfor
        endif
    endfor
    ENDIF
    zehm=k
    for (i=0; i<10; i+=1)
        zehn = zehm+1
        SCurve[zehn]=OpenSum/MaxSum
    endfor
    ARR = ARR2
    // update current in SCurve for actual ARR
    // update ARR for next cycle
endfor

RMSwave=(SCurve-OCurve)^2
WaveStats/Q RMSwave
RMSvalue = V_avg*V_npnts
RMSData=RMSvalue
// calculate RMS deviation
// ACTUALLY, THIS IS THE SUM OF SQUARES !!

End

// Entry for fit algorithm via Button Control: MODEL 1
// -----
Function FitCurveButtonProc(ctrlName) : ButtonControl
    String ctrlName

    Variable f,i,j,h
    Wave ProbVec, ProbVec2

    if (exists("RMSData") !=1)
        Make/N=1 RMSData
    endif

    if (WinType("RMSvalueTable") !=2)
        Execute "RMSvalueTable()"
        DoWindow/F RMSvalueTable
        AppendToTable RMSData
    endif

    Duplicate/O SCurve RMSwave
    // update RMSwave

    if (exists("TestMatrix") !=1)
        Make/N=(128,7) TestMatrix
    endif
    // prepare TestMatrix
    // contains the information, what combinations
    // of probabilities (lower or upper limits of test
    // interval) should be tested: 0=lower, 1= higher
    // interval border
    TestMatrix = 0

    if (exists("RMSMatrix") !=1)
        Make/N=128 RMSMatrix
    else
        Redimension/N=128 RMSMatrix
    endif

    for (j=0; j<7; j+=1)
        for (i=0; i<128; i+=2^(j+1))
            for (h=0; h<2^j; h+=1)
                TestMatrix[i+h][j]=1
            endfor
        endfor
    endfor

    ProbVec2 = ProbVec
    // working copy of ProbVec

    FitCurve(OCurve, SCurve, ProbVec, ProbVec2, RMSwave, RMSMatrix, TestMatrix, RMSData, ProbLimits)

End

Function FitCurve(OCurve, SCurve, ProbVec, ProbVec2, RMSwave, RMSMatrix, TestMatrix, RMSData, ProbLimits)
    Wave OCurve, SCurve, ProbVec, ProbVec2, RMSwave, RMSMatrix, TestMatrix, RMSData, ProbLimits

    Wave ProbVecS, ProbLimitsS, RMSminList, ProbVecStats, Dummy, ProbVecMatrix
    Wave NApproxValue, NFitCycleValue, NSimApproxValue, ProbVec_Average, ProbVec_SD
    String ScName, PvName, PlName, RnName, PvnName
    Variable RMSvalue, RMSmin, RMSaverage, SimMax
    Variable f, g, Gmax, h, Hmax, i, ibest, j, m, Mmax, t
    Variable limlow, limhigh
    Variable interval, calctime

    String/G SelCurve

    Duplicate/O ProbVec ProbVecS
    ProbLimits
    Duplicate/O ProbLimits ProbLimitsS

    // *****
    // !! SET NUMBER OF FITS AND OTHER VARIABLES HERE !!
    // *****

    Hmax=NApproxValue[0]
    // Number of approximation steps in one FIT CYCLE
    // Hmax = 10 means ten approximation steps (recommended)
    // The higher Hmax the more accurate are the transition probabilities fitted
    // (although they may be wrong anyway ...)

    Gmax=NFitCycleValue[0]
    // Repeat FIT CYCLE Gmax times (Gmax =1 means just one FIT CYCLE)
    // Gmax > 1 provides insight into the 'statistical' fluctuations of the fitted
    // transition probabilities. The results are stored in ProbVec_1 (ProbLimits_1) etc.

    Mmax=NSimApproxValue[0]
    // Number of simulations for averaging RMSvalues. High Mmax means trustworthy
    // selection of the apparently best transition probabilities for approximation.
    // The run time increases approx. linearly with Mmax.

```

```

interval =4                                     // Determines the size of the fit interval .
                                                // Interval=3 (4) means the next interval is 2/3 (3/4) in size.
                                                // 3: fastest approximation (see ACCURACY below)
                                                // 4 or higher: approximation more slowly, less risky (requires higher Hmax)
                                                // The ACCURACY of the fitted transition probability can be assessed as follows:
                                                // ACCURACY = (Diff/interval) * [(interval-1)/(interval)]^(Hmax-1)
                                                // where Diff is the initial difference between the upper and the lower limit of the
                                                // fit interval given in ProbLimits.
                                                // Example 1:          Diff=1, Hmax=10, interval=3          Accuracy = ±0.00867
                                                // Example 2:          Diff=1, Hmax=10, interval=4          Accuracy = ±0.01877
                                                // Example 3:          Diff=1, Hmax=13, interval=4          Accuracy = ±0.00792

// *****

if (exists("RMSminList") !=1)                   // initialize the RMSminList containing the
averaged                                       // RMSmin values from the Hmax approximations
Make/N=(Hmax) RMSminList
else
// Useful for later inspection of the best approximation
Redimension/N=(Hmax) RMSminList              // if Hmax was chosen too high or the approximation was
RMSminList = 0                                // already quite good in the first trials
endif

if (exists("ProbVecMatrix") !=1)
Make/N=(8, Hmax) ProbVecMatrix
else
Redimension/N=(8, Hmax) ProbVecMatrix
ProbVecMatrix = 0
endif

for (i=1;i<101;i+=1)                           // Delete old data: RMSminList_1, ProbVec_1, ProbLimits_1 to 100 each
RmName="RMSminList_"+num2str(i)
KillWaves/Z $RmName
RmName="ProbVec_"+num2str(i)
KillWaves/Z $RmName
RmName="ProbLimits_"+num2str(i)
KillWaves/Z $RmName
RmName="ProbVecMatrix_"+num2str(i)
Killwaves/Z $RmName
endifor

print ""
print "***** Fitting Paramters for Curve: ",SelCurve," *****"

FOR (g=1;g<Gnax+1;g+=1)                        // Perform FIT CYCLE Gnax times (repetitions for statistics)

ProbVec=ProbVecS
ProbLimits=ProbLimitsS

RMSminList = 0                                // refresh RMSminList for the new round

FOR (h=1;h<Hnax+1;h+=1)                       // Perform Hmax approximations in FIT CYCLE
calctime=datetime

For (i=0; i<128; i+=1)                        // row of TestMatrix
for (j=0; j<7; j+=1)                          // column of TestMatrix
t=TestMatrix[i][j]
limlow= ProbLimits[j][0]
limhigh=ProbLimits[j][1]
if (t==0)
f=(limlow+(limhigh-limlow)/interval)
else
f=(limhigh-(limhigh-limlow)/interval)
endif
ProbVec[j]=f                                  // insert lower or upper limits to be tested into ProbVec
endifor

RMSaverage=0
SimMax=0
for (m=0; m<Mnax+1;m+=1)                      // perform Mnax simulations and average the RMS values
SimCurve(OCurve,SCurve,ProbVec, ARR,ARR2,RMSwave,RMSData)
RMSvalue=RMSData[0]
RMSaverage=RMSaverage+RMSvalue
SimMax+=1
endifor
RMSaverage=RMSaverage/SimMax
RMSMatrix[i]=RMSaverage

EndFor

WaveStats/Q RMSMatrix                         // find the smallest RMS value in RMSMatrix at position ibest
ibest=V_minloc
RMSmin=V_min
RMSminList[h-1] = RMSmin                      // save current RMSmin value in RMSminList for cycle h
calctime=datetime-calctime
print "Approximation ",h," RMSvalue =",RMSmin," Run time (sec): ",calctime

for (j=0; j<7; j+=1)                          // update ProbLimits for new limits of best guess
t=TestMatrix[ibest][j]
limlow= ProbLimits[j][0]
limhigh=ProbLimits[j][1]
if (t==0)
ProbLimits[j][1] = (limhigh-(limhigh-limlow)/interval) // update upper limit
ProbVec[j] = limlow+(limhigh-limlow)/interval           // update ProbVec
else
ProbLimits[j][0] = (limlow+(limhigh-limlow)/interval) // update lower limit
ProbVec[j] = limhigh-(limhigh-limlow)/interval         // update ProbVec
endif
endifor

SimCurve(OCurve,SCurve,ProbVec, ARR,ARR2,RMSwave,RMSData)

ProbVecMatrix[h-1]=ProbVec[p]
DoUpdate                                       // update curve and ProbVec display

ENDFOR

print "***** FitCycle: ",g," completed *****"

RmName="RMSminList_"+num2str(g)
// ScName="SCurve_"+num2str(g)

```

```

PvName="ProbVec_"+num2str(g)
PlName="ProbLimits_"+num2str(g)
PvmName="ProbVecMatrix_"+num2str(g)
// Duplicate SCurve $ScName // SCurves are not representative, skip saving
Duplicate/O ProbVec $PvName // overwrites copies already existing
Duplicate/O ProbLimits $PlName
Duplicate/O RMSminList $RmName
Duplicate/O ProbVecMatrix $PvmName

ENDFOR

// calculate ProbVec Averages and SD
Duplicate/O ProbVec ProbVec_Average
Duplicate/O ProbVec ProbVec_SD
ProbVec_Average = 0
ProbVec_SD = 0

if (Gmax>1)
  for (g=1;g<Gmax+1;g+=1)
    PvName="ProbVec_"+num2str(g)
    Duplicate/O $PvName Dummy
    ProbVec_Average=ProbVec_Average+Dummy
    ProbVec_SD=ProbVec_SD+Dummy^2
  endfor
  ProbVec_SD=((ProbVec_SD-(ProbVec_Average)^2/Gmax)/(Gmax-1))^0.5
  ProbVec_Average=ProbVec_Average/Gmax
endif

print "Results: "
print "ProbVec_1 to",Gmax,"..... Transition probabilities after last approximation"
print "ProbLimits_1 to",Gmax,".... Interval limits for last approximation"
print "ProbVecMatrix_1 to",Gmax,"ProbVec for all approximation steps"
print "RMSminList_1 to",Gmax,"... RMS values for all approximation steps"
if (Gmax>1)
print "ProbVec_Average: ..... containing the averaged ProbVec"
print "ProbVec_SD: ..... containing the standard deviation"
endif
print ""

End

// Button control entry for parameter fit (p(c=0) = A) with explicit function for p(c) = A exp(B*c): MODEL 2
// -----
Function FitParamButtonProc(ctrlName) : ButtonControl
  String ctrlName

  Variable f,i,j,h
  Wave ProbVec, ProbVec2

  if (exists("RMSData") !=1)
    Make/N=1 RMSData
  endif

  if (WinType("RMSvalueTable") !=2)
    Execute "RMSvalueTable()"
    DoWindow/F RMSvalueTable
    AppendToTable RMSData
  endif

  if (exists("RMSMatrix") !=1) // prepare RMSMatrix for just to 2 values
    Make/N=2 RMSMatrix
  else
    Redimension/N=2 RMSMatrix
  endif

  Duplicate/O SCurve RMSwave // update RMSWave
  ProbVec2 = ProbVec // working copy of ProbVec

  FitParam(OCurve, SCurve, ProbVec,ProbVec2,RMSwave,RMSData,RMSMatrix,ProbLimits)

End

Function FitParam(OCurve, SCurve, ProbVec,ProbVec2,RMSwave,RMSData,RMSMatrix,ProbLimits)
  Wave OCurve, SCurve, ProbVec,ProbVec2,RMSwave,RMSData,RMSMatrix,ProbLimits

  Wave ProbVecS, ProbLimitsS, ProbVecStats, Dummy, ProbVecMatrix
  Wave NApproxValue, NFitCycleValue, NSimApproxValue, ExpFacValue,ProbVec_Average, ProbVec_SD
  String ScName,PvName,PlName,RmName,PvmName
  Variable RMSvalue,RMSmin, RMSaverage, SimMax
  Variable f,g,Gmax,h,Hmax,i,ibest,j,m,Mmax,t, ExpFac
  Variable limlow,limhigh
  Variable interval, calctime

  String/G SelCurve

  Duplicate/O ProbVec ProbVecS // save original values of ProbVec and ProbLimits
  Duplicate/O ProbLimits ProbLimitsS

  // *****
  // !! SET NUMBER OF FITS AND OTHER VARIABLES HERE !!
  // *****

  Hmax=NApproxValue[0] // Number of approximation steps in one FIT CYCLE
  // Hmax = 10 means ten approximation steps (recommended)
  // The higher Hmax the more accurate are the transition probabilities fitted
  // (although they may be wrong anyway ...)

  Gmax=NFitCycleValue[0] // Repeat FIT CYCLE Gmax times (Gmax =1 means just one FIT CYCLE)
  // Gmax > 1 provides insight into the 'statistical' fluctuations of the fitted
  // transition probabilities. The results are stored in ProbVec_1 (ProbLimits_1) etc.

  Mmax=NSimApproxValue[0] // Number of simulations for averaging RMSvalues. High Mmax means trustworthy
  // selection of the apparently best transition probabilities for approximation.
  // The run time increases approx. linearly with Mmax.

  interval = 4 // Determines the size of the fit interval .
  // Interval=3 (4) means the next interval is 2/3 (3/4) in size.

```

```

// 3: fastest approximation (see ACCURACY below)
// 4 or higher: approximation more slowly, less risky (requires higher Hmax)

// The ACCURACY of the fitted transition probability can be assessed as follows:
// ACCURACY = (Diff/interval) * [(interval-1)/(interval)]^(Hmax-1)
// where Diff is the initial difference between the upper and the lower limit of the
// fit interval given in ProbLimits.
// Example 1: Diff=1, Hmax=10, interval=3 Accuracy = +0.00867
// Example 2: Diff=1, Hmax=10, interval=4 Accuracy = +0.01877
// Example 3: Diff=1, Hmax=13, interval=4 Accuracy = +0.00792
ExpFac=ExpFacValue[0] // constant factor in exponent of probability function: p(c) = A exp(B*c) where B=ExpFac

// *****
if (exists("RMSminList") !=1) // initialize the RMSminList containing the
averaged // RMSmin values from the Hmax approximations
Make/N=(Hmax) RMSminList
else // Useful for later inspection of the best approximation
Redimension/N=(Hmax) RMSminList // if Hmax was chosen too high or the approximation was
RMSminList = 0 // already quite good in the first trials
endif

if (exists("ProbVecMatrix") !=1)
Make/N=(8, Hmax) ProbVecMatrix
else
Redimension/N=(8, Hmax) ProbVecMatrix
ProbVecMatrix = 0
endif

for (i=1;i<101;i+=1) // Delete old data: RMSminList_1, ProbVec_1, ProbLimits_1 to 100 each
//RmName="RMSminList_"+num2str(i)
//KillWaves/Z $RmName
RmName="ProbVec_"+num2str(i)
KillWaves/Z $RmName
RmName="ProbLimits_"+num2str(i)
KillWaves/Z $RmName
RmName="ProbVecMatrix_"+num2str(i)
Killwaves/Z $RmName
endfor

print ""
print "***** Fitting Paramter for Curve: ",SelCurve," *****"

FOR (g=1;g<Gnax+1;g+=1) // Perform FIT CYCLE Gnax times (repetitions for statistics)

ProbVec=ProbVecS
ProbLimits=ProbLimitsS

//RMSminList = 0 // refresh RMSminList for the new round

FOR (h=1;h<Hmax+1;h+=1) // Perform Hmax approximations in FIT CYCLE
calctime=datetime

For (i=0; i<2; i+=1) // test just two limits (low and high)

dependent) limlow= ProbLimits[0][0] // only first value is to be fitted (the others are
limhigh=ProbLimits[0][1]
if (i==0)
f=(limlow+(limhigh-limlow)/interval) // test lower limit
else
f=(limhigh-(limhigh-limlow)/interval) // test upper limit
endif
ProbVec[0]=f
// insert lower or upper limits to be tested into ProbVec

for (j=1;j<7;j+=1) // calculate the dependent probability values according to
t = f * exp(ExpFac*j) // the exponential model: p(c) = A exp(B*c) where B=ExpFac
ProbVec[j]=t
endfor

RMSaverage=0
SimMax=0
for (m=0; m<Mnax+1;m+=1) // perform Mnax simulations and average the RMS values
SimCurve(OCurve,SCurve,ProbVec, ARR,ARR2,RMSwave,RMSData)
RMSvalue=RMSData[0]
RMSaverage=RMSaverage+RMSvalue
SimMax+=1
endfor
RMSaverage=RMSaverage/SimMax
RMSMatrix[i]=RMSaverage

EndFor

WaveStats/Q RMSMatrix // find the smallest RMS value in RMSMatrix at position ibest
ibest=V_minloc
RMSmin=V_min
//RMSminList[h-1] = RMSmin // save current RMSmin value in RMSminList for cycle h
calctime=datetime-calctime
print "Approximation ",h," RMSvalue =",RMSmin," Run time (sec): ",calctime

for (i=0; i<2; i+=1) // update ProbLimits for new limits of best guess
limlow= ProbLimits[0][0]
limhigh=ProbLimits[0][1]
if (ibest==0)
ProbLimits[0][1] = (limhigh-(limhigh-limlow)/interval) // update upper limit
ProbVec[0] = limlow+(limhigh-limlow)/interval // update ProbVec
else
ProbLimits[0][0] = (limlow+(limhigh-limlow)/interval) // update lower limit
ProbVec[0] = limhigh-(limhigh-limlow)/interval // update ProbVec
endif
endfor

for (j=1;j<7;j+=1) // calculate the dependent probability values according to
t = f * exp(ExpFac*j) // the exponential model: p(c) = A exp(B*c) where
B=ExpFac ProbVec[j]=t // to update ProbVec for simulation
endfor

SimCurve(OCurve,SCurve,ProbVec, ARR,ARR2,RMSwave,RMSData)

```

```

        ProbVecMatrix[h-1]=ProbVec[p]
        DoUpdate
    ENDFOR
    // update curve and ProbVec display

print "***** FitCycle: ",g, " completed *****"

RmName="RMSminList_"+num2str(g)
// ScName="SCurve_"+num2str(g)
PvName="ProbVec_"+num2str(g)
PlName="ProbLimits_"+num2str(g)
PvmName="ProbVecMatrix_"+num2str(g)
// Duplicate SCurve $ScName // SCurves are not representative, skip saving
Duplicate/O ProbVec $PvName // overwrites copies already existing
Duplicate/O ProbLimits $PlName
Duplicate/O RMSminList $RmName
Duplicate/O ProbVecMatrix $PvmName

ENDFOR

// calculate ProbVec Averages and SD
Duplicate/O ProbVec ProbVec_Average
Duplicate/O ProbVec ProbVec_SD
ProbVec_Average = 0
ProbVec_SD = 0

if (Gmax>1)
    for (g=1;g<Gmax+1;g+=1)
        PvName="ProbVec_"+num2str(g)
        Duplicate/O $PvName Dummy
        ProbVec_Average=ProbVec_Average+Dummy
        ProbVec_SD=ProbVec_SD+Dummy^2
    endfor
    ProbVec_SD=((ProbVec_SD-(ProbVec_Average)^2/Gmax)/(Gmax-1))^0.5
    ProbVec_Average=ProbVec_Average/Gmax
endif

print "Results: "
print "ProbVec_1 to",Gmax,"..... Transition probabilities after last approximation"
print "ProbLimits_1 to",Gmax,"..... Interval limits for last approximation"
print "ProbVecMatrix_1 to",Gmax,"ProbVec for all approximation steps"
print "RMSminList_1 to",Gmax,".... RMS values for all approximation steps"
if (Gmax>1)
print "ProbVec_Average: ..... containing the averaged ProbVec"
print "ProbVec_SD: ..... containing the standard deviation"
endif
print ""

End

// *****
// MARCOS FOR DISPLAY OF SIMULATION DATA
// *****

// Create 2D-Arrays (dimension DIM)
// -----
Macro MakeArray(Dimension, Edge)
    Variable Dimension, Edge
    Prompt Dimension, "Width of 2D-array (will be increased by 2 for edges): / Value for edge (0/1): "

    Variable DIM
    DIM = Dimension+2

    if (WinType("ArrayTable") ==2)
        DoWindow/F ArrayTable
        RemoveFrontTable/Z ARR
    else
        Execute "ArrayTable()"
    endif

    if (exists("ARR") !=1)
        Make/B/U/N=(DIM,DIM) ARR
    else
        Redimension/B/U/N=(DIM,DIM) ARR
    endif

    ARR = Edge // apply value for edges

    if (exists("ARR2") !=1) // working copy for simulation
        Duplicate ARR ARR2
    else
        Redimension/B/U/N=(DIM,DIM) ARR2
    endif

    AppendToTable ARR
    ModifyTable width=30
    ModifyTable alignment(ARR)=1,format(ARR)=1

EndMacro

Window ArrayTable(): Table
    Edit as "Array"

EndMacro

// Make Wave for 8 transition probabilities: 7 for closing and 1 for opening
//-----
Macro MakeProb()

// Make ProbVec for transition probabilities for simulation
if (exists("ProbVec") !=1)
    Make/D/N=(8) ProbVec
else
    Redimension/D/N=(8) ProbVec
    ProbVec[7]=0 // set open probability to zero
endif

if (exists("ProbVec2") !=1) // working copy for simulation and fitting
    Duplicate ProbVec ProbVec2
else
    Redimension/D/N=(8) ProbVec2
endif

```

```

        ProbVec2[7]=0
    endif

    if (WinType("ProbTable")!=2)
        Execute "ProbTable()"
    else
        DoWindow/F ProbTable
    endif
    AppendToTable ProbVec
    ModifyTable width=80

    if (exists("ProbLimits") !=1)
        Make/D/N=(8,2) ProbLimits
        ProbLimits=0 // default lower limit
        ProbLimits[[1]=1 // default upper limit
    else
        Redimension/D/N=(8,2) ProbLimits // use existing limits
    endif
    RemoveFrontTable/Z ProbLimits
    AppendToTable ProbLimits
EndMacro

Edit as "Prob Values"
EndMacro

// Display Kinetic curve (original data) --> new graph window
// -----
Macro DispCurve()

    if (WinType("Kinetic")!=1)
        Execute "KineticGraph()"
    else
        DoWindow/F KineticGraph
    endif

    RemoveFrontGraph/Z OCurve
    AppendToGraph OCurve
    ModifyGraph mode(OCurve)=3,marker=19
    ModifyGraph msize(OCurve)=0.5
    ModifyGraph rgb(OCurve)=(21845,21845,21845)
    RemoveFrontGraph/Z SCurve
    AppendToGraph SCurve
    SetAxis left -0.15, 1.15
    ModifyGraph mirror(left)=2
    ModifyGraph mirror=2
EndMacro

Window KineticGraph() : Graph

    Display/W=(610,10,1210,400) as "Kinetic"
EndMacro

// Select original data (--> OCurve) for simulation fit
// -----
Macro SelectCurve(SelCur)
    String SelCur
    Prompt SelCur, "Select [original] curve to be simulated: ",popup,WaveList("",";","")

    String/G SelCurve
    SelCurve=SelCur

    WaveStats/Q $SelCur

    if (exists("OCurve") !=1)
        Make/N=(V_npnts) OCurve
    else
        Redimension/N=(V_npnts) OCurve
    endif

    OCurve = $SelCur

    if (exists("SCurve") !=1)
        Duplicate OCurve SCurve
    else
        Redimension/N=(V_npnts) SCurve
        SCurve=OCurve
    endif

    // Display curves
    RemoveFrontGraph/Z OCurve
    AppendToGraph OCurve
    ModifyGraph mode(OCurve)=3,marker=19
    ModifyGraph msize(OCurve)=0.5
    ModifyGraph rgb(OCurve)=(21845,21845,21845)
    RemoveFrontGraph/Z SCurve
    AppendToGraph SCurve
    SetAxis left -0.15, 1.15
    ModifyGraph mirror(left)=2
    ModifyGraph mirror=2
    DoWindow/F ClosingKinetics
    SetDrawLayer/W=ClosingKinetics/K UserFront
    DrawText 0.8,0.1, SelCurve

    if (WinType("KineticGraph") ==1)
        DoWindow/F KineticGraph
        SetDrawLayer/W=KineticGraph/K UserFront
        DrawText 0.8,0.1, SelCurve
    endif
EndMacro

// Display averaged ProbVec (after Fit)
// -----
Macro DispProbAverage()

    if (WinType("ProbGraph") !=1)
        execute "ProbGraph()"
    endif

```

```
else
  DoWindow/F ProbGraph
endif

SetDrawLayer/W=ProbGraph/K UserFront
DrawText/W=ProbGraph 0.8,0.1, SelCurve

RemoveFromGraph/W=ProbGraph/Z ProbVec_Average
AppendToGraph ProbVec_Average
ErrorBars ProbVec_Average Y,wave=(ProbVec_SD,ProbVec_SD)
ModifyGraph mirror=2;DelayUpdate
ModifyGraph log(left)=1; DelayUpdate
SetAxis left 1e-05,1;DelayUpdate
SetAxis bottom 0,6
ModifyGraph mode=3,marker=19;DelayUpdate
// ModifyGraph zero(left)=1

End

Window ProbGraph() : Graph

Display as "ProbVec Average"

EndMacro
```

9 Literaturverzeichnis

¹Hancock, R., D. Karunaratne, and C. Bernegger-Egli. 1994. Molecular organisation and structural role of outer membrane macromolecules. Pages 263-279 in J. Ghuyssen and R. Hakenbeck, eds. *Bacterial Cell wall*. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

²Benz, R., A. Schmid, R. Hancock.(1985). Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J. Bacteriol.* 162: 722-727

³Nikaido, H., and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49, 1-32

⁴D.Marsh (2000) Infrared dichroism of twisted β -sheet barrels. The structure of *E. coli*. Outer membrane proteins *JMB* 297 803-808

⁵Baumann, U. Wu, S., Flaherty, K.M. and McKay, D.B. (1993). 3-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa* – a two-dimensional protein with a calcium binding parallel-beta roll motif. *EMBO J.* 12, 3357-3364

⁶Hendrickson, W.A., Pähler, A., Smith, J.L., Satow, Y., Merritt, E.A., and Phizackerley, R.P. (1989). Crystal structure of core streptavidin determined from multi-wavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2190-2194

⁷Baldermann, C., Lupas, A., Lubieniecki, J., and Engelhardt, H. (1998). The regulated outer membrane protein Omp21 from *Deinococcus acidovorans* is identified as a member of a new family of eight-stranded β -sheet proteins by its sequence and properties. *J. Bact.* 180, 3741-3749

⁸Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G., and Tamm, L.K. (2000). Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 275, 1594-600

-
- ⁹Vandeputte-Rutten, L., Kramer, R.A., Kroon, J., Dekker, N., Egmond, M.R., and Gros, P. (2001). Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J.* **20**, 5033-5039
- ¹⁰Snijder, H.J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K.H., Verhij, H.M., Egmond, M.R., Dekker, N., and Dijkstra, B.W. (1999). Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **401**, 717-721
- ¹¹Koronakis V., Sharff A., Koronakis E., Luisi B., and Hughes C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein ToOC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914-919
- ¹²Weiss, M.S., Wacker, T., Weckesser, J., Welte, W., and Schulz, G.E. (1990). The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3Å resolution. *FEBS Lett.* **267**, 268-272
- ¹³Weiss, M.S., and Schulz, G.E. (1992). Structure of porin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**, 493-509
- ¹⁴Garavito, R.M., and Rosenbusch, J.P. (1980). Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial X-ray analysis. *J. Cell Biol.* **86**, 327-329
- ¹⁵Koebnik, R., Locher, K.P., and Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology.* **37**, 239-253
- ¹⁶Schirmer, T., and Cowan, S.W. (1993). Prediction of membrane-spanning α -strands and its application to maltoporin. *Prot. Sci.* **2**, 1361-1363
- ¹⁷Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F., and Rosenbusch, J.P. (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**, 512-514

-
- ¹⁸Forst, D., Welte, W., Wacker, T. and Diederichs, K. (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 37-46
- ¹⁹Meyer, J.E.W., Hofnung, M., and Schulz, G.E. (1997). Structure of maltoporin from *Salmonella typhimurium* ligated with a nitrophenyl-maltotrioxide. *J. Mol. Biol.* **266**, 761-775
- ²⁰Ulmke, D., Kreth, J., Lengeler, J.W., Welte, W., and Schmid, T. (1999). Site-directed mutagenesis of loop L3 of sucrose porin ScrY leads to changes in substrate selectivity. *J. Bacteriol.* **181**, 1920-1923
- ²¹Meyer, J.E.W., and Schulz, G.E. (1997). Energy profile of maltooligosaccharide permeation through maltoporin as derived from the structure and from a statistical analysis of saccharide-protein interactions. *Protein Sci.* **6**, 1084-1091
- ²²Schirmer, T., and Phale, P.S. (1999). Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. *J. Mol. Biol.* **294**, 1159-1167
- ²³Locher, K.P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch J.P., and Moras, D. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: Crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**, 771-778
- ²⁴Buchanan, S.K. Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., and Deisenhofer J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 56-63
- ²⁵Braun, V., and Braun, M. (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Letters.* **529**, 78-85

-
- ²⁶Gerbl-Rieger, S., Engelhardt, H., Peters, J., Kehl, M., Lottspeich, F., and Baumeister, W. (1992). Topology of the anion-selective porin Omp32 from *Comamonas acidovorans*. *J. Struct. Biol.* **108**, 14-24
- ²⁷Phale, P.S., Philippsen, A., Kiefhaber, T., Koebnik, R., Phale, V.P., Schirmer, T. and Rosenbusch, J.P. (1998) Stability of trimeric OmpF porin: contributions of the latching loop L2. *Biochemistry* **37**, 15663-15670
- ²⁸ Robertson, K.M., and Tieleman, D.P. (2002). Orientation and interactions of dipolar molecules during transport through OmpF porin. *FEBS Lett.* **528**, 53-57
- ²⁹Zachariae, U., Koumanov, A., Engelhardt, H., and Karshikoff, A. (2002). Electrostatic properties of the anion selective porin Omp32 from *Delftia acidovorans* and of the arginine cluster of bacterial porins. *Protein Sci.* **11**, 1309-1319
- ³⁰Zeth, K., Diederichs, K., Welte, W., and Engelhardt, H. (2000). Crystal structure of Omp32, the anionselective porin from *Delftia acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. *Structure* **8**, 991-999
- ³¹Phale, P. S., Philippsen A., Widmer, C., Phale, V. P., Rosenbusch, J. P. und Schirmer, T. (2001). Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. *Biochemistry* **40**: 6319-6325.
- ³²Cowan S. W. , Schirmer T., Rummel G., Steiert M., Ghosh R., Pauptit R. A., Jansonius J. N., Rosenbusch J. P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli*. Porins **358**, 727-733
- ³³Karshikoff A., Spassov V., Cowan S. W., Ladenstein R., Schirmer T. (2002) Electrostatic properties of two porin channels from *E. coli* *J. Mol. Biol.* **240** 372-384
- ³⁴Zachariae, U., Helms, V., and Engelhardt, H. (2003) Multistep mechanism of chloride translocation in a strongly anion-selective porin channel. *Biophys. J.* **85**, 954-962

-
- ³⁵Zachariae U., Klühspies T., De S., Engelhardt H., Zeth K. (2006) High Resolution Crystal Structures And Molecular Dynamics Studies Reveal Substrate Binding In The Porin Omp32 JBC Paper in Press ; Angenommen am 23. Januar, 2006
- ³⁶Roth, E. (2005) Mutation, Expression, Rückfaltung von Omp32 aus *Delftia acidovorans* sowie Sequenzierung und Untersuchung des Porin-assoziierten Proteins (PAP), Dissertation LMU München 2005
- ³⁷Mueller, P.; Rudin, D.; Tien, H. T.; Wescott, W.C. (1962) Reconstruction of Excitable Cell Membrane Structure in vitro. In: *Circulation* 26, S.1167-1171
- ³⁸Lakey, J. Pattus F., (1989) The voltage dependent activity of *E. coli* porins in different planar bilayer reconstitutions *Eur. J. Biochem.* **186** 303-308
- ³⁹Montal, M.; Mueller, P.; (1972) Formation of Bimolecular Membranes From Lipid Monolayers and a Study of their electrical Properties. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, S. 3561-3566.
- ⁴⁰Schindler, H.; (1989) Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and of detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions. *Meth. Enzymol.* 171: 225-253
- ⁴¹Mathes, A.; Biophysikalische Untersuchung der Ionenkanalleitfähigkeit von bakteriellen Porinen in Lipidmembranen Shaker, Aachen (2000)
- ⁴²Mathes, A. und Engelhardt, H. (1998). Nonlinear and asymmetric open channel characteristics of an ion-selective porin in planar membranes. *Biophys. J.* **75**:1255-1262.
- ⁴³Willems, A., de vos, P., and de Ley, J. (1992) The genus *Delftia*: in: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer, editors. *The prokaryotes*. Third edition. Springer-Verlag, New York, NY, USA. 2583-2590
- ⁴⁴Zachariae U. (2004) Theoretische Untersuchung zur Elektrostatik bakterieller Porine und zur Anionentranslokation im Porin Omp32 Dissertation TU München 2004

-
- ⁶⁶Brunen, M., and Engelhardt, H. (1995). Significance of positively charged amino acids for the function of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 127-132
- ⁴⁶Watanabe, M., Rosenbusch, J., Schirmer, T., and Karplus, M. (1997). Computer simulations of the OmpF porin from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **72**, 2094-2103
- ⁴⁷Björkstén, J., Soares, C.M., Nilsson, O., and Tapia, O. (1994). On the stability and plastic properties of the interior loop L3 in *Rhodobacter capsulatus* porin – a molecular dynamics study. *Protein Eng.* **7**, 487-494
- ⁴⁸Saxena, K., Drosou, V., Maier, E., Benz, R., and Ludwig, B. (1999). Ion selectivity reversal and induction of voltage-gating by site-directed mutations in the *Paracoccus denitrificans* porin. *Biochemistry* **38**, 2206-2212
- ⁴⁹Vangelder, P., Saint, N., van Boxtel, R., and Tommassen, J. (1997). Pore functioning of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* – mutagenesis of the constriction loop L3. *Protein Eng.* **10**, 699-706
- ⁵⁰Brunen, M., Engelhardt, H., (1993) Asymmetry of orientation and voltage gating of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34 in lipid bilayers *Eur. J. Biochem.* **212**, 129-135
- ⁵¹Mathes, A.; Biophysikalische Untersuchung der Ionenkanalleitfähigkeit von bakteriellen Porinen in Lipidmembranen Shaker, Aachen (2000)
- ⁵²Ehrenstein, G., Lecar, H., (1977) Electrically gated ionic channels in lipid bilayers In: *Q. Rev. Biophys.* **10**: 1-34.
- ⁵³Steven A., Heggeler B., Müller R., Kistler J., Rosenbusch J.; Ultrastructure of a periodic protein layer in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Cell Biol.* **72**: 292-301 (1977)

-
- ⁵⁴Mathes, A.; Biophysikalische Untersuchung der Ionenkanalleitfähigkeit von bakteriellen Porinen in Lipidmembranen Shaker, Aachen (2000)
- ⁵⁵Sen, K., Hellmann, J., and Nikaido, H. (1988). Porin channels in intact cells of *Escherichia coli* are not affected by Donnan potentials across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **263**, 1182-1187
- ⁵⁶Schüler, D., Frankel, R., *Appl. Microbiol. Biot.* **52**, 464 (1999)
- ⁵⁷H. Grabert und M. H. Devoret (Hg.), Single Charge Tunneling: Coulomb Blockade Phenomena in Nanostructures, Bd. 294 von Nato Science Series B (Plenum Press, 1992)
- ⁵⁸A. Schindler et al., Tc-enhancement in superconducting granular platinum, *Europhys. Lett.* **58** (6), 885 (2002)
- ⁵⁹Baumeister und Engelhardt, Three-dimensional structure of bacterial surface layers. In: Membranous Structures [J.R. Harris, R.W. Horne, eds.] *Electron microscopy of proteins Vol 6*, pp 109-154, Acad. Press, London
- ⁶⁰L. Colombi-Ciacchi et al., Initial nucleation of platinum clusters after reduction of K_2PtCl_4 in aqueous solution: A first principles study, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7371 (2001)
- ⁶¹L. I. Elding, The stepwise dissociation of the tetrachloroplatinate(II) ion in aqueous solution VI. Rates of formation and equilibria of the chloro aqua complexes of platinum (II), *Acta Chem. Scand.* **24** (5), 1527 (1970)
- ⁶²L. I. Elding, The stepwise dissociation of the tetrachloroplatinate(II) ion in aqueous solution IV. The chlorotriaquaplatinum(II) ion, *Acta Chem. Scand.* **24** (4), 1331 (1970)
- ⁶³Wahl R. (2003) Reguläre bakterielle Zellhüllenproteine als biomolekulares Templat
Dissertation TU Dresden 2003

-
- ⁶⁴W. O. Saxton und W. Baumeister, The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein, *J. Microsc.* 127 (2), 127 (1982)
- ⁶⁵E. O. Brigham, *FFT Schnelle Fourier-Transformation*, 5. Au. (R. Oldenbourg Verlag, 1992)
- ⁶⁶H. O. Hirschfeld, A connection between correlation and contingency, *Proc. Cambridge Phil. Soc., Math. Phys. Sci.* 31, 520 (1935)
- ⁶⁷R. A. Fisher, The precision of discriminant functions, *Ann. Eugenics* 10, 422 (1940)
- ⁶⁸P. Horst, Measuring complex attitude, *J. Social Psych.* 6, 369 (1935)
- ⁶⁹M. van Heel und J. Frank, Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules, *Ultramicroscopy* 6, 187 (1981)
- ⁷⁰J. Frank und M. van Heel, Correspondence analysis of aligned images of biological particles, *J. Mol. Biol.* 161, 134 (1982)
- ⁷¹H. Engelhardt et al., High resolution shadowing of freeze-dried bacterial photosynthetic membranes: Multivariate statistical analysis and surface relief reconstruction, *Ultramicroscopy* 16, 395 (1985)
- ⁷²J. P. Bretaudiere und J. Frank, Reconstitution of molecule images analysed by correspondence analysis: A tool for structural interpretation, *J. Microsc.* 144, 1 (1986)
- ⁷³K. Hirose et al., Structural changes in muscle crossbridges accompanying force generation, *J. Cell. Biol.* 127 (3), 763 (1994)
- ⁷⁴C. W. Akey, Structural plasticity of the nuclear pore complex, *J. Mol. Biol.* 248, 273 (1995)
- ⁷⁵N. Braun et al., Orientation of globular proteins adsorbed on solid substrates: an electron microscopic analysis, *Thin solid films* 284-285, 703 (1996)

-
- ⁷⁶J. Kleinz, Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Proteasomen: 3Dorientierung der Moleküle und Bildrestauration aus Fokuserien, Dissertation, Technische Universität München und Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (1994)
- ⁷⁷J. F. Aebersold et al., Quantitative interpretation of HRTEM images using multivariate statistics: the case of the ($\bar{1}$ 0)-interface in a Ni base superalloy, *Ultramicroscopy* 62, 171 (1996)
- ⁷⁸T. Scheybani, Zweidimensionale Kristallisation wasserlöslicher Proteine an der Wasser-Luft-Grenzfläche für elektronenkristallographische Untersuchungen, Dissertation, Technische Universität München und Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (1995)
- ⁷⁹Guckenberger, R., Wiesgräbe, W., Hillebrand A., Hartmann, T., Wang, Z., Baumeister, W. (1989) *Ultramicroscopy* 31, 327-332
- ⁸⁰Nejoh, H. (1990) *Appl. Phys. Lett.* 57, 2907-2909
- ⁸¹Yuan, J.Y., Shao, Z. (1990) *Ultramicroscopy* 34, 223-226
- ⁸²Yuan, J.Y., Shao, Z., Gao, C. (1991) *Phys. Rev. Lett.* 67, 863-866
- ⁸³Guckenberger, R., Heim, M., Cevc, G., Knapp, H.F., Wiegräbe, W., Hillebrand, A. (1994) *Science* 266, 1538- 1540
- ⁸⁴Shao, Z., Yang, J., Somlyo, A.P. (1995) *Annu. Rev. Dev. Biol.* 11, 241-265
- ⁸⁵Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C.H., Gerber, E., Weibel, E. (1982) *Appl. Phys. Lett.* 40, 178-180
- ⁸⁶Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C.H. (1986) *Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933
- ⁸⁷Alexander, S., Hellmans, L., Marti, O., Schneir, J., Elings, V., Hansma, P.K. (1989) *J. Appl. Phys.* 65, 164-167

-
- ⁸⁸Eschrich, Rainer, Dissertation 1996, Technische Universität München
- ⁸⁹Mertig, M., Wahl, R., Lehmann, M., Simon, P., Pompe W.(2001) Formation and manipulation of regular metallic nanoparticle arrays on bacterial surface layers: an advanced TEM study Eur. Phys. J. D **16** 317-320
- ⁹⁰R. Hegerl, The EM program package: A platform for image processing in biological electron microscopy, J. Struct. Biol. 116 (1), 30 (1996)
- ⁹¹Falkenhagen H. Theorie der Elektrolyte S.Hirzel Verlag Stuttgart 1971
- ⁹²Bartels J. et al. Landolt-Börnstein Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik Springer Verlag 1960
- ⁹³Gödde, C., Lieberggesell M., Steinbüchel A., Isolation of poly (-L-malic acid) degrading bacteria and purification and characterisation of the PMA hydrolase from *Comamonas acidovorans* strain 7789 FEMS Microbiol. Lett. **173**: 365-372
- ⁹⁴Bainbridge, G., H. Mobasher, G. Armstrong, E. Lea, J. Lakey 1998 Voltage-gating of *E. coli* porin: a cysteine-scanning mutagenesis study of loop 3 J. Mol. Biol. **275** 171-176
- ⁹⁵Phale S., Schirmer T., Lou K., Hardmeyer A., Rosenbusch J., 1997 Voltage gating of *E. coli* porin channel: role of the constriction loop Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 6741-6745
- ⁹⁶D. J. Müller, D. Fotiadis, A. Engerl. Mapping flexible Proteindomains at sub-nanometer resolution with the AFM FEBS Letters **436** 105-111
- ⁹⁷Jones C. und Taylor D. 1996. Voltage gating of porin channels in lipid bilayers. Thin Solid Films 284-285: 748-751
- ⁹⁸Mathes A., Engelhardt H., 1998 Voltage-dependent closing of porin channels: analysis of relaxation kinetics, J Membrane Biol. **165**: 11-18

⁹⁹Schwarzott M., Engelhardt H., Klühspies T., Baurecht D., Naumann D., Fringli U. In situ FTIR ATR spectroscopy of the Preparation of an oriented monomolecular film of porin Omp32 on an internal reflecting element by dialysis *Langmuir* **19** (2003) 741-745

¹⁰⁰König H., Analysis of Archeal Cell Envelopes in: Chemical Methods in Procarities Systems 1994 John Wiley and Sons Ltd. (1994)

¹⁰¹Slayter, U., B., Messner, P., Prun, D., Sára, M., Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins R.G. Landes Company and Academic Press (1996)

¹⁰²Bäuerlein E. Biomineralisation von Einzellern: eine außergewöhnliche Membranbiochemie zur Produktion anorganischer Nano- und Mikrostrukturen *Angew. Chemie* **115** Nr.6 (2003)

¹⁰³L.C. Ciacchi, M. Mertig, R. Seidel, W. Pompe, A. De Vita, Nucleation of platinum clusters on biopolymers: a first principles study of the molecular mechanisms *Nanotechnology* **14** (2003) 840-848

¹⁰⁴Mertig, M., Ciacchi, L., C., Seidel, R., Pompe, W., DNA as a selective Metallisation Template *Nanoletters* 2002 Vol.2 No.8 841-844

¹⁰⁵R. Wahl, H. Engelhardt, W. Pompe, M. Mertig, Multivariate Statistical Analysis of Two-Dimensional Metal Cluster Arrays Grown in Vitro on a Bacterial Surface Layer *Chem. Mater.* **2005** 17, 1887-1894

¹⁰⁶Baumeister W., Electron tomography: towards visualising the molecular organisation of the cytoplasm *Current opinion in structural biology* 2002, **12** 679-684

¹⁰⁷Baumeister W., Barth M., Hegerl R., Guckenberger R., Hahn M., Saxton W. O., Three-dimensional Structure of the Regular Surface-Layer (HPI-Layer) of *Deinococcus radiodurans* *J. Mol. Biol.* (1986) **187** 241-253