

- [36] D. C. Beer, R. V. Miller, L. G. Sneddon, R. N. Grimes, M. Mathew, G. J. Palenik, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 3046; R. N. Grimes, D. C. Beer, L. G. Sneddon, V. R. Miller, R. Weiss, *Inorg. Chem.* 13 (1974) 1138.
- [37] W. Siebert, T. Renk, K. Kinberger, M. Bochmann, C. Krüger, *Angew. Chem.* 88 (1976) 850; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15 (1976) 779.
- [38] G. E. Herberich, B. Hessner, G. Huttner, L. Zsolnai, *Angew. Chem.* 93 (1981) 471; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 472.
- [39] A. W. Duff, K. Jonas, R. Goddard, H.-J. Kraus, C. Krüger, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5479.
- [40] P. T. Chesky, M. B. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5186.
- [41] O. J. Scherer, H. Sitzmann, G. Wolmershäuser, *Angew. Chem.* 97 (1985) 358; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 351.
- [42] K. Jonas, *Adv. Organomet. Chem.* 19 (1981) 97; K. Jonas, L. Schieferstein, *Angew. Chem.* 91 (1979) 590; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18 (1979) 549; K. Jonas, *ibid.* 97 (1985) 292 bzw. 24 (1985) 295.
- [43] T. Kuhlmann, W. Siebert, *Z. Naturforsch.* B40 (1985) 167.
- [44] K. Stumpf, H. Pritzkow, W. Siebert, *Angew. Chem.* 97 (1985) 64; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 71.
- [45] H. Kurosawa in G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel (Hrsg.): *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. I, Pergamon, Oxford 1982, S. 750.
- [46] K. Wade, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1971, 792; *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* 18 (1976) 1.
- [47] Dreierkomplexe mit vier parallelen cyclischen Liganden bezeichnen wir als Tetradrecker-Sandwichkomplexe. In Anlehnung an die Nomenklatur der Tripeldecker [34, 35], die man auch als Trideck-Sandwichkomplexe beschreiben kann, wird die Bezeichnung „Quadrupeldecker“ [35] und im Englischen „quadruple-decker“ [12], sowie „quadruple-decked complexes“ [48, 49] benutzt. In [50] wird die Bezeichnung „Tetradrecker“ verwendet.
- [48] R. N. Grimes, *Coord. Chem. Rev.* 28 (1979) 47; R. N. Grimes in G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel (Hrsg.): *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. I, Pergamon, Oxford 1982, S. 459.
- [49] G. E. Herberich in G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel (Hrsg.): *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. I, Pergamon, Oxford 1982, S. 381.
- [50] G. Schmid, R. Köster in *Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie*, Bd. 13, Teil 3c, Thieme, Stuttgart 1984, S. 1.
- [51] W. Siebert, S. Maly, unveröffentlicht; vgl. hierzu W. Siebert, M. El-Din M. El-Essawi, R. Full, J. Heck, *Z. Naturforsch.* B40 (1985) 458.
- [52] a) W. Siebert, C. Böhle, C. Krüger, Y.-H. Tsay, *Angew. Chem.* 90 (1978) 558; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 527; b) W. Siebert, C. Böhle, C. Krüger, *ibid.* 92 (1980) 758 bzw. 19 (1980) 746.
- [53] W. Siebert, J. Edwin, H. Wadebold, H. Pritzkow, *Angew. Chem.* 94 (1982) 148; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 149.
- [54] R. D. Shannon, C. T. Prewitt, *Acta Crystallogr.* B25 (1969) 925; R. D. Shannon, *ibid.* A32 (1976) 751.
- [55] H. Wadebold, H. Pritzkow, W. Siebert, *Organometallics* 2 (1983) 1899.
- [56] W. Siebert, J. Edwin, unveröffentlicht.
- [57] W. Herter, *Dissertation*, Universität Heidelberg 1984.
- [58] H. Wadebold, H. Pritzkow, W. Siebert, *Chem. Ber.* 118 (1985) 729.
- [59] W. Schütz, geplante Dissertation, Universität Heidelberg.
- [60] T. Kuhlmann, W. Siebert, *Z. Naturforsch.* B39 (1984) 1046.
- [61] M. W. Whiteley, H. Pritzkow, U. Zenneck, W. Siebert, *Angew. Chem.* 94 (1982) 464; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 453.
- [62] H. Pritzkow, Universität Heidelberg 1984/85; persönliche Mitteilung.
- [63] T. Kuhlmann, H. Pritzkow, W. Herter, W. Siebert, unveröffentlicht.
- [64] J. W. Howard, R. N. Grimes, *Inorg. Chem.* 11 (1972) 263.
- [65] T. Kuhlmann, *Diplomarbeit*, Universität Heidelberg 1983.
- [66] W. Siebert, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 25 (1977) 597.
- [67] M. C. Böhm, Technische Hochschule Darmstadt, persönliche Mitteilung.
- [68] R. Köster, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim a. d. Ruhr, persönliche Mitteilung.
- [69] R. Geist, Universität Heidelberg, persönliche Mitteilung.
- [70] U. Zenneck, Universität Heidelberg, persönliche Mitteilung.
- [71] D. Schweitzer, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, persönliche Mitteilung.
- [72] H. Münschedt, BASF AG, Ludwigshafen/Rh., persönliche Mitteilung.
- [73] S. Roth, Max-Planck-Institut für Festkörperphysik, Stuttgart, persönliche Mitteilung.
- [74] T. Kuhlmann, S. Roth, J. Rozière, W. Siebert, *Angew. Chem.* im Druck.
- [75] H. Bönnemann, *Angew. Chem.* 97 (1985) 264; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 248.
- [76] L. Vasquez, geplante Dissertation, Universität Heidelberg.

Mechanismen des biologischen Ionentransports – Carrier, Kanäle und Pumpen in künstlichen Lipidmembranen

Von Peter Läuger*

Zellmembranen enthalten spezifische Systeme für den passiven und aktiven Ionentransport zwischen Cytoplasma und extrazellulärem Medium. Für eine Reihe von kleinen bis mittelgroßen Transportmolekülen wie Valinomycin und Gramicidin A liegen heute ausführliche strukturelle und kinetische Daten vor; in diesen Fällen ist es möglich, die Transportfunktion auf der Basis der Molekülstruktur zu verstehen. Durch Einbau in künstliche bimolekulare Lipidmembranen können die kinetischen Eigenschaften biologischer Transportsysteme im Detail untersucht werden.

1. Einleitung

Die Grundstruktur biologischer Membranen besteht aus einer Doppelschicht von Lipidmolekülen, die mit ihren polaren Kopfgruppen zum wässrigen Medium hin orientiert sind, während die apolaren Kohlenwasserstoffketten das Innere der Membran bilden (Abb. 1). In die Lipidstruktur sind Proteine eingelagert, von denen viele ganz durch die

Membran hindurchreichen. Eine Besonderheit biologischer Membranen liegt in der Tatsache, daß ihre Struktur im wesentlichen durch nicht-kovalente Bindungen (van-der-Waals-Kräfte, Coulomb-Wechselwirkungen) zusammengehalten wird. Auf diese Weise erreichen biologische Membranen ein hohes Maß an Flexibilität hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und ihrer dynamischen Eigenschaften.

Bei physiologischen Temperaturen befindet sich Zellmembranen in einem *fluiden* Zustand^[1]. Platzwechselzeiten benachbarter Lipidmoleküle innerhalb der Monoschicht liegen zwischen 10^{-8} und 10^{-7} s^[2]. Der Austausch von Li-

[*] Prof. Dr. P. Läuger
Fakultät für Biologie der Universität
D-7750 Konstanz

pidmolekülen in *transversaler* Richtung, d.h. von Schicht zu Schicht, ist dagegen viel langsamer (Sekunden bis Tage). Bei einer Reihe von Proteinen konnte eine verhältnismäßig rasche Diffusion in der Membranebene nachgewiesen werden^[3] (Diffusionskoeffizienten 10^{-11} - 10^{-9} cm 2 /s); andere Membranproteine sind vermutlich durch Wechselwirkung mit dem Cytoskelett in der Membran fixiert.

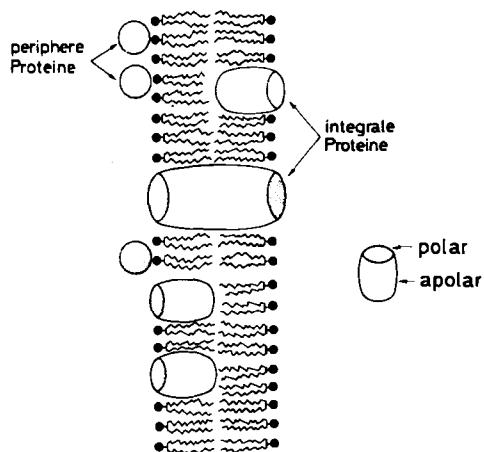


Abb. 1. Bau einer biologischen Membran (schematisch). Die Grundstruktur der Membran wird durch eine Lipid-Doppelschicht gebildet. Periphere Proteine sind durch vorwiegend elektrostatische Kräfte an die Membran gebunden. Integrale Proteine sind in die Lipiddmatrix eingelagert.

Lipidmembranen sind extrem undurchlässig für kleine Ionen wie Na^+ oder Cl^- . Eine proteinfreie Doppelschichtmembran aus Phosphatidylcholin (Lecithin) hat in einer 0.1 M NaCl-Lösung eine spezifische Leitfähigkeit der Größenordnung $1\text{--}10 \text{ nS/cm}^{[4]}$; dieser Wert entspricht (bei einer Membrandicke von 5–10 nm) der Leitfähigkeit eines sehr guten Isolators. Ursache der geringen Ionen-durchlässigkeit ist die hohe Energie, die notwendig ist, um ein Ion aus dem wässrigen Medium in das apolare, kohlenwasserstoffartige Membraninnere zu bringen. Diese Barriereneigenschaft ist für die Funktion der Zellmembran von entscheidender Bedeutung. So kann die Zellmembran gewissen Ionensorten selektiv den Durchtritt ermöglichen, und sie kann, wie etwa bei der Nervenerregung, die Ionenpermeabilität auf chemischem oder elektrischem Weg steuern.

2. Ionencarrier und Ionenkanäle

Die Ionenpermeabilität von Zellmembranen ist, wie man heute weiß, keine diffuse Eigenschaft der gesamten Membran, sondern an spezialisierte Transportmoleküle gebunden. Im Hinblick auf den Mechanismus kann man zwei Grenzfälle von Transportsystemen unterscheiden: Carrier und Kanäle^[5]. Ein Ionencarrier ist ein Molekül, welches das zu transportierende Ion bindet und in gebundener Form durch die Membran befördert (Abb. 2). Die Bindungsstelle ist dabei abwechselnd von der linken und von der rechten Seite her zugänglich, aber nicht von beiden Seiten gleichzeitig. Zwischen linksexponierter und

rechtsexponierter Form der Bindungsstelle kann durch eine Bewegung des gesamten Carriermoleküls relativ zur Membran gewechselt werden, oder (bei großen, ganz durch die Membran reichenden Carriermolekülen) durch eine Konformationsänderung in einem Teil des Moleküls (Abb. 2).

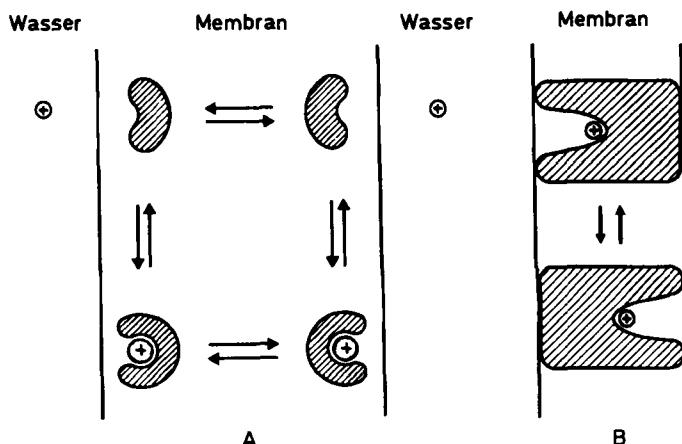


Abb. 2. Zwei Mechanismen des Carrier-vermittelten Ionentransports durch Lipidmembranen. A: Translation des Carriermoleküls relativ zur Membran. B: Wechsel zwischen linksexponierter und rechtsexponierter Form der Ionenbindungsstelle aufgrund von Konformationsänderungen.

Ein Ionenkanal kann ein die Membran ganz durchdringendes Proteinmolekül sein, das in seinem Inneren einen tunnelartigen Transportweg aufweist (Abb. 3). Durch elektrostatische Wechselwirkung mit polaren Gruppen des Proteins (z.B. Peptid-Carbonylgruppen) wird der Eintritt des Ions in den Kanal energetisch begünstigt. Gewisse Ionenkanäle in Zellmembranen sind permanent aktiv; sie

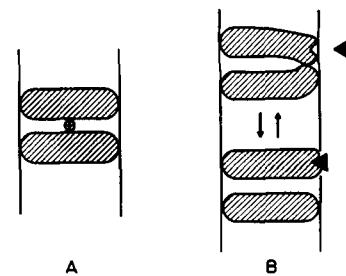


Abb. 3. A: Permanent offener Ionenkanal. B: Steuerung eines Ionenkanals durch Bindung eines Effektormoleküls.

sind entweder ständig offen oder öffnen und schließen sich spontan in statistischen Zeitintervallen. Andere Kanäle öffnen sich erst bei Bindung eines Effektormoleküls (Abb. 3). Dieser Mechanismus der Steuerung von Ionenkanälen liegt der Signalübertragung an neuromuskulären Synapsen zugrunde; dort führen an den Nervenendigungen ausgeschüttete „Transmitter“-Moleküle zur Aktivierung von Ionenkanälen in der Muskelmembran^[6]. Das Öffnen und Schließen Na^+ - und K^+ -spezifischer Ionenkanäle in Nervenmembranen wird durch das elektrische Feld in der Membran gesteuert^[7].

3. Künstliche Lipidmembranen

In zahlreichen Laboratorien wird gegenwärtig an der Isolierung und Reinigung von Transportproteinen aus biologischen Membranen gearbeitet. Bei der Untersuchung der Eigenschaften eines isolierten Transportsystems ergibt sich jedoch eine grundsätzliche Schwierigkeit: Anders als bei einem Enzym, dessen Aktivität im Reagensglas immer noch studiert werden kann, ist bei einem Membranprotein, sobald es in homogener Lösung vorliegt, die Transportfunktion nicht mehr feststellbar. Ein Ausweg besteht darin, das isolierte Transportmoleköl wieder in eine künstliche Lipidmembran einzubauen^[8]. Hierzu stehen heute zwei Membransysteme zur Verfügung: planare Lipid-Doppelschichtmembranen und Lipidvesikeln.

3.1. Planare Lipid-Doppelschichtmembranen

Mit verschiedenen Techniken können ebene, bimolekulare Lipidmembranen in wäßrigem Medium mit Durchmessern bis zu 10 mm hergestellt werden^[9, 10]. Bei der von *Montal* und *Mueller* eingeführten Methode^[10-12] wird eine aus zwei Kammern bestehende Teflonzelle benutzt; die die beiden Kammern trennende Teflonträgerfolie enthält im oberen Teil ein Loch. Die beiden Kammern werden bis unterhalb des Loches mit Wasser gefüllt, und dann wird auf der Wasseroberfläche eine monomolekulare Lipidschicht gebildet. Anschließend wird der Flüssigkeitsspiegel erst in der einen, dann in der anderen Kammer über die Höhe des Loches angehoben, wobei nach einem Reißverschluß-Mechanismus über dem Loch eine Lipid-Doppelschicht entsteht (Abb. 4; siehe auch Abb. 5). Mit verschiedenen Lipiden für die beiden Monoschichten erhält man asymmetrische Membranen^[13, 14].

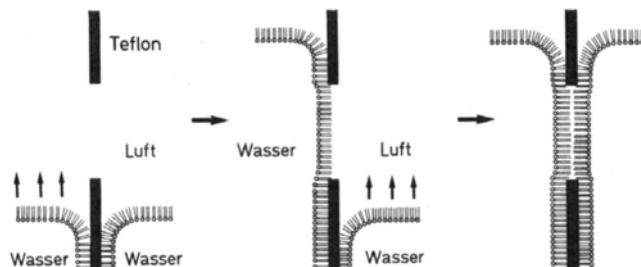


Abb. 4. Herstellung künstlicher Lipid-Doppelschichtmembranen. Auf der Wasseroberfläche wird durch Spreitung aus einer *n*-Hexan-Lösung ein monomolekularer Lipidfilm erzeugt. Durch Anheben erst der einen, dann der anderen wäßrigen Phase bildet sich über der Öffnung im Teflonträger eine bimolekulare Lipidmembran.

Die elektrischen Eigenschaften von Lipid-Doppelschichtmembranen können in der in Abbildung 5 angegebenen Meßzelle untersucht werden. Die spezifische elektrische Kapazität einer nach dem Verfahren von *Montal* und *Mueller* hergestellten Membran aus 1,2-Dioleoyl-phosphatidylcholin beträgt $C_m = 0.72 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ^[15]. Aus C_m kann nach der für einen Plattenkondensator gültigen Beziehung $C_m = \epsilon_0 \epsilon / d$ die Membrandicke d berechnet werden ($\epsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-12} \text{ C V}^{-1} \text{ m}^{-1}$: elektrische Feldkonstante; ϵ : Dielektrizitätskonstante der Membran). Mit dem Wert $\epsilon \approx 2.1$ für einen Kohlenwasserstoff ergibt sich die

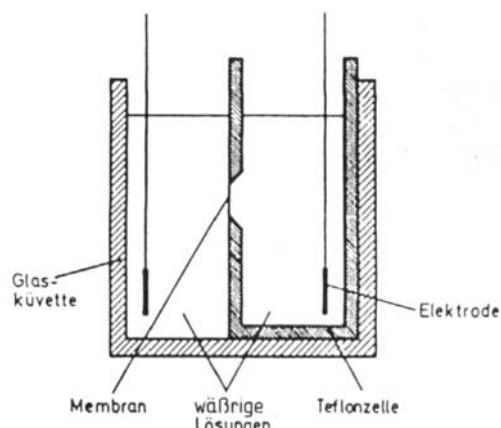


Abb. 5. Meßzelle zur Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von Lipid-Doppelschichtmembranen. Als Elektroden werden platinierte Platinelektroden oder Silber/Silberchloridelektroden verwendet.

Membrandicke zu $d \approx 2.6 \text{ nm}$. Dieser Wert ist kleiner als die doppelte Länge $2 l$ der Kohlenwasserstoffketten von Öl-säure ($2 l \approx 4.0 \text{ nm}$), was darauf hindeutet, daß die Kohlenwasserstoffketten in der Membran nicht völlig gestreckt vorliegen.

Die elektrische Leitfähigkeit reiner Lipid-Doppelschichtmembranen ist, wie bereits erwähnt, sehr klein. Daraus können Leitfähigkeitsänderungen, die durch den Einbau biologischer Ionentransportsysteme hervorgerufen werden, mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden. Ein weiterer wesentlicher Vorteil planarer Lipidmembranen ist der geringe elektrische Serienwiderstand zwischen Elektroden und Membran. Auf diese Weise können mit Hilfe von Relaxationsmethoden (Abschnitt 4.1) schnelle elektrische Prozesse in der Membran mit hoher Zeitauflösung untersucht werden.

Ein Verfahren, mit dem Membranen sehr kleiner Fläche (einige μm^2) hergestellt werden können, und das sich gut zum Einbau von Proteinen eignet, wurde kürzlich von *Hanke* et al. beschrieben^[16-19]. Eine mit einer Elektrolytlösung gefüllte Glas-Mikropipette (Spitzendurchmesser ca. $1 \mu\text{m}$) wird mit der Spitze unter die Wasseroberfläche getaucht (Abb. 6). Nach Herstellung einer Lipid-Mono-

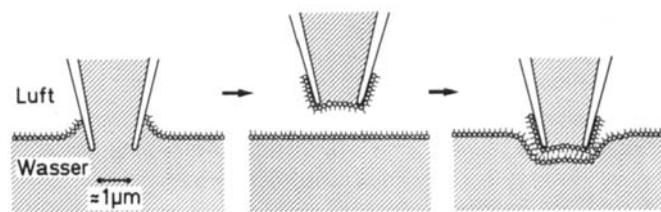


Abb. 6. Herstellung von Lipid-Doppelschichtmembranen sehr kleiner Fläche. Die Spitze einer Glas-Mikropipette befindet sich zunächst unter der Wasseroberfläche. Nach Bildung einer monomolekularen Lipidschicht wird die Pipette aus der Wasserphase herausgezogen und wieder eingetaucht.

schicht auf der Wasseroberfläche wird die Pipette herausgezogen, wobei sich die Spitze ebenfalls mit einer Monoschicht bedeckt. Beim Wiedereintauchen der Pipette bildet sich durch Vereinigung der beiden Monoschichten eine bimolekulare Membran. Ionenkanäle aus biologischen Membranen können durch Spreiten proteinhaltiger Lipidvesikeln an die Wasseroberfläche zunächst in die Mono-

schicht und damit schließlich in die bimolekulare Membran eingebaut werden^[16-20]. Da die Membranfläche sehr gering ist, kann erreicht werden, daß die Membran nur ein einziges Kanalmolekül enthält. Auf diese Weise können elektrische Einzelkanalströme mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden.

3.2. Lipidvesikeln

Für die Untersuchung von Transportsystemen mit geringen Transportraten sind planare Lipidmembranen wegen der beschränkten Membranfläche weniger gut geeignet. Für derartige Transportstudien kann man Suspensionen künstlicher Lipidvesikel verwenden, die mit Durchmessern zwischen etwa 30 nm und 1 µm in wäßrigen Elektrolytlösungen hergestellt werden können^[21,22]. Lipide, z. B. Phosphatidylcholin, quellen in Kontakt mit Wasser und bilden Suspensionen von „Liposomen“, die zwiebelschalenartig gebaut sind und aus konzentrischen Lagen von Doppelschichtmembranen bestehen. Durch Ultraschall können aus den einige µm großen Liposomen hohlkugelförmige Lipidvesikeln mit einem Außendurchmesser von etwa 30 nm hergestellt werden, die aus einer einzigen, geschlossenen Doppelschichtmembran bestehen. Diese einschaligen Lipidvesikeln haben einen wäßrigen Innenraum, in den wasserlösliche Substanzen eingeschlossen werden können.

Ein anderes Verfahren zur Herstellung einschaliger Lipidvesikeln besteht darin, ein Lipid mit Hilfe eines Detergents in micellärer Form in Wasser zu lösen und das Detergent durch Dialyse oder Gelchromatographie zu entfernen. Der Vesikeldurchmesser kann durch Wahl des Detergents und der experimentellen Bedingungen bei der Detergentsentfernung von 50–200 nm variiert werden. Durch Dialyse von Cholat werden mit Dioleoylphosphatidylcholin Vesikeln mit einem mittleren Außendurchmesser von 90 nm erhalten^[23]. 1 mL einer Suspension dieser Vesikeln enthält bei einer Lipidkonzentration von 10 g/L eine Membranfläche von $\approx 3 \text{ m}^2$; das eingeschlossene wässrige Innenvolumen beträgt etwa 1% des Gesamtvolumens.

Interessante Möglichkeiten ergeben sich durch Einsatz synthetischer amphiphiler Verbindungen bei der Vesikelherstellung. Durch Verwendung polymerisierbarer Lipidanaloga oder Lipidanaloga mit funktionellen Gruppen können Membranvesikeln mit neuartigen Eigenschaften erhalten werden^[24-26].

Transportproteine, die aus biologischen Membranen isoliert wurden, können in künstliche Lipidvesikeln eingebaut werden; ihre Funktion kann dann unter kontrollierbaren Bedingungen untersucht werden^[21]. Hierzu wird das Detergens-solubilisierte Protein zur Lipid/Detergens-Lösung gegeben und das Detergens entfernt. Das Protein wird dabei in die Membran der sich bildenden Lipidvesikel eingebaut. Ionenflüsse durch die Vesikelmembran können mit radioaktiven Isotopen oder mit optischen Indikatoren untersucht werden.

4. Ionencarrier

Heute sind eine ganze Reihe von Verbindungen bekannt, die in biologischen Membranen oder künstlichen

Lipidmembranen als bewegliche Ionencarrier (Abb. 2A) wirken^[24-28]. Am besten untersucht wurden die makrocyclischen Verbindungen Valinomycin, Enniatin B und die Makrotetrolide wie Monactin (Abb. 7). Valinomycin und Enniatin B sind Depsipeptide, sie sind aus Aminosäuren und α -Hydroxysäuren in abwechselnder Folge aufgebaut. Valinomycin bildet mit K⁺-Ionen einen 1:1-Komplex, wobei das Ion käfigartig von den sechs Sauerstoffatomen der Estercarbonylgruppen eingeschlossen wird^[31] (Abb. 8). Die Außenseite des Komplexes, die durch Methyl- und Isopropylgruppen gebildet wird, ist stark hydrophob.

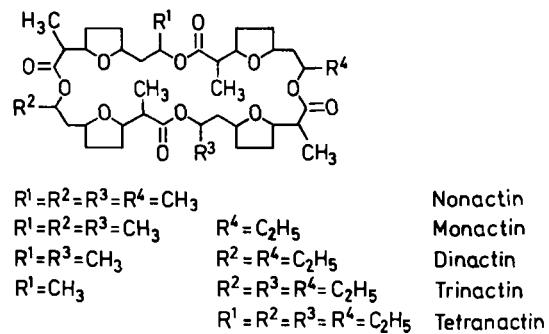
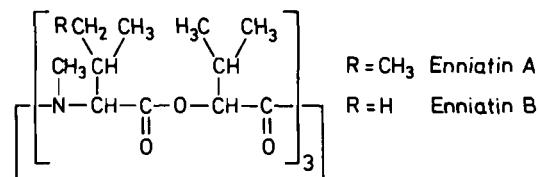
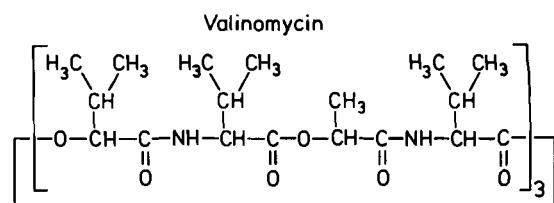


Abb. 7. Makrocyclische Ionencarrier. Valinomycin, Enniatin A und Enniatin B sind Depsipeptide, die abwechselnd aus α -Aminosäuren und α -Hydroxysäuren aufgebaut sind.

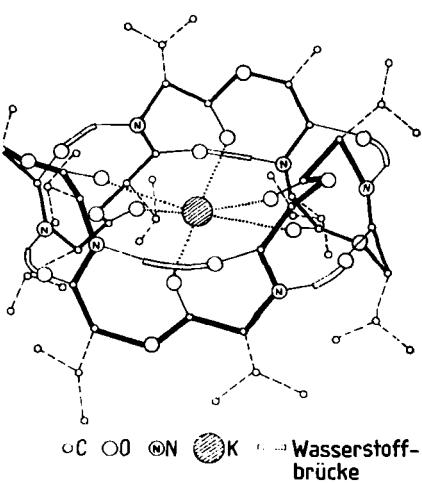


Abb. 8. Struktur des Valinomycin/K⁺-Komplexes [31]. Das zentrale K⁺-Ion ist käfigartig von sechs Sauerstoffatomen der Estercarbonylgruppen umgeben. Der Komplex ist durch sechs Wasserstoffbrücken zwischen NH- und CO-Gruppen der sechs Aminosäuren stabilisiert.

Die Struktur des Valinomycin/K⁺-Komplexes (Abb. 8) wurde aus röntgenkristallographischen^[32-36] und spektroskopischen^[31,37-48] Ergebnissen abgeleitet. Das Rückgrat des Moleküls ist zu sechs Schleifen gefaltet, die durch sechs Wasserstoffbrücken zwischen NH- und C=O-Gruppen der Aminosäuren zusammengehalten werden. UV-, IR-, Circulardichroismus(CD)- und NMR-Untersuchungen haben gezeigt, daß das unkomplexierte Valinomycinmolekül in Lösung je nach Lösungsmittel eine Vielzahl an Konformationen annehmen kann^[31,37-46]. In unpolaren Lösungsmitteln scheint das Molekül eine geschlossene Konformation ähnlich der des K⁺-Komplexes zu haben, während in polaren Lösungsmitteln offene Konformationen mit einer geringeren Zahl intramolekularer Wasserstoffbrücken überwiegen (Abb. 9)^[29,30]. Übergänge zwischen den Konformationen spielen sich in 10⁻⁹-10⁻⁷ s ab, wie durch Ultraschallabsorptionsmessungen nachgewiesen wurde^[29]. Schnelle Konformationsübergänge scheinen eine wesentliche Voraussetzung für die in homogener Lösung beobachteten hohen Komplexierungsraten makrocyclischer Ionencarrier zu sein^[41,49-52].

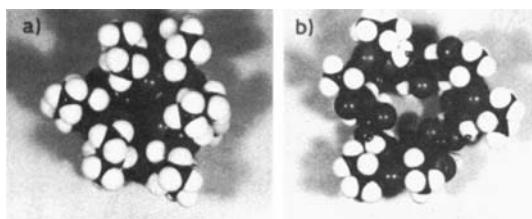


Abb. 9. Strukturen von Valinomycin in Lösung. (a) Geschlossene Konformation mit sechs intramolekularen Wasserstoffbrücken; (b) halb geöffnete Konformation mit drei intramolekularen Wasserstoffbrücken. Konformation (a) überwiegt in apolaren Lösungsmitteln, während Konformation (b) in polaren Medien angenommen wird (nach Grell et al. [29]).

Der Mechanismus des Carrier-vermittelten Transports von Alkalimetall-Ionen durch Membranen wurde mit Hilfe planarer Lipid-Doppelschichtmembranen genauer untersucht^[53-82]. In einer 1 M KCl-Lösung, die 0.1 μM Valinomycin enthält, beträgt die Membranleitfähigkeit etwa 10 mS/cm², ein Wert, der um sechs Größenordnungen über der Grundleitfähigkeit der Membran in 1 M KCl liegt^[59]. Diese starke Leitfähigkeitszunahme beruht praktisch ausschließlich auf einem Transport von K⁺-Ionen; dies ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Membranspannung in asymmetrischen KCl-Lösungen mit dem Nernst-Potential für K⁺ übereinstimmt^[53]. Die Spezifität von Valinomycin ist außerordentlich hoch; das Verhältnis der Membranleitfähigkeit in gleichkonzentrierten K⁺- und Na⁺-Lösungen beträgt etwa 2000^[84,85]. Valinomycin kann entweder der wäßrigen Phase oder direkt dem Lipid zugegeben werden. Es stellt sich dabei ein Verteilungsgleichgewicht mit einem Verteilungskoeffizienten von etwa 5·10⁴ zugunsten der Membran ein^[60].

Die beobachtete Konzentrations- und Spannungsabhängigkeit der Membranleitfähigkeit läßt sich mit der Annahme erklären, daß Valinomycin und Enniatin B sowie die Makrotetrolide nach dem in Abbildung 2A dargestellten translatorischen Carrier-Mechanismus wirken. Nach Abbildung 2A spielt sich der Transportvorgang in vier Teilschritten ab: 1) Bildung eines Komplexes zwischen

M⁺ und dem Carriermolekül S in der Membrangrenzfläche; 2) Translokation des Komplexes MS⁺ zur gegenüberliegenden Grenzfläche; 3) Freisetzung des Ions; 4) Rücktransport des freien Carriermoleküls. In erster Näherung kann man die Kinetik des Transportprozesses durch Einführung von Geschwindigkeitskonstanten für die einzelnen Reaktionsschritte beschreiben (Abb. 10). Dies ist einigermaßen selbstverständlich im Falle der Assoziations- und Dissoziationsreaktionen (Geschwindigkeitskonstanten k_R bzw. k_D); k_R und k_D sind dabei als globale Geschwindigkeitskonstanten aufzufassen, die jeweils mehrere Teilreaktionen (Konformationsänderungen des Carriers, schrittweiser Ersatz von Wassermolekülen der Hydrathülle durch Ligandenatome des Carriers) einschließen. Die Beschreibung der Translokation von MS⁺ und S mit Hilfe monomolekularer Geschwindigkeitskonstanten k_{MS} und k_S ist eine Näherung. Hierbei liegt die auf energetischen Überlegungen beruhende Vorstellung zugrunde, daß die Verweilzeiten von MS⁺ und S in der Grenzfläche wesentlich größer sind als die Zeit für die eigentlichen Translokationsschritte^[60].

Aus dem in Abbildung 10 dargestellten Reaktionsschema ergeben sich eine Reihe von interessanten Fragen. Gibt es einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, der die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion limitiert? Ist die hohe Spezifität von Valinomycin hauptsächlich durch thermodynamische Faktoren (Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung) oder durch kinetische Parameter bestimmt? Welche kinetischen Faktoren sind für die optimale Funktionsweise eines Carriers wesentlich? Die Beantwortung dieser Fragen erfordert eine detaillierte Analyse des Transportsystems. Eine derartige Analyse wird möglich durch den Einsatz von Relaxationsmethoden.

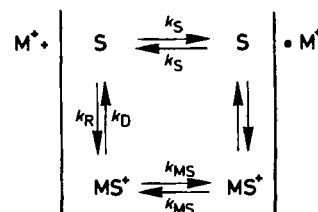


Abb. 10. Transport eines Ions M⁺ durch den Carrier S. k_R und k_D sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktionen, k_{MS} und k_S die Geschwindigkeitskonstanten für die Translokation des Komplexes MS⁺ bzw. des freien Carriers S.

4.1. Relaxationsmethoden zur Untersuchung von Ionentransportprozessen in Membranen. Kinetische Analyse von Carriersystemen

Relaxationsverfahren wurden zunächst zum Studium schneller chemischer Reaktionen in homogener Phase entwickelt^[83]. Das zu untersuchende System wird durch rasche Änderung eines äußeren Parameters (Druck, Temperatur) gestört und der Zeitverlauf der Näherung an den neuen stationären Zustand verfolgt. Relaxationsmethoden haben sich auch für die Untersuchung der Kinetik von Ionentransportprozessen in Membranen als wertvoll erwiesen^[60-63,67-72,75-81].

Bei der Spannungssprungmethode (Abb. 11) wird eine elektrische Spannung rasch an die Membran angelegt und

die Relaxation des Stromes registriert^[60, 78, 79]. Bei dem in Abbildung 10 dargestellten Carriermechanismus lässt sich der Zeitverlauf des Membranstromes als Summe von drei (in einfachen Fällen zwei) Exponentialfunktionen beschreiben. Aus den Zeitkonstanten und Amplituden der Exponentialfunktionen können die Geschwindigkeitskonstanten k_R , k_D , k_S und k_{MS} berechnet werden.

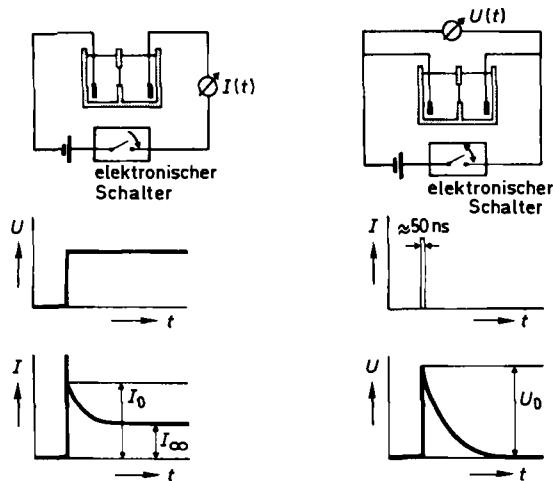


Abb. 11. Elektrische Relaxationsverfahren zur Untersuchung von Ionentransportprozessen in Membranen. Bei der Spannungssprungmethode (links) wird eine Spannung rasch an die Membran angelegt und die Relaxation des Membranstromes I gemessen. Beim Ladungspulsverfahren (rechts) wird die Membrankapazität durch einen ca. 50 ns dauernden Strompuls auf eine Anfangsspannung U_0 aufgeladen. Am Ende des Strompulses wird der äußere Stromkreis unterbrochen und das durch Ladungstransport in der Membran bedingte Abklingen der Spannung verfolgt.

Die Zeitauflösung der Spannungssprungmethode ist durch die Aufladezeit der Membrankapazität limitiert und beträgt etwa 1 μ s. Eine wesentlich höhere Zeitauflösung kann mit dem Ladungspulsverfahren (Abb. 11) erreicht werden^[68, 78, 86]. Hier wird durch einen 10–50 ns dauernden Strompuls die Membrankapazität auf eine Anfangsspannung von etwa 10 mV aufgeladen. Nach dem Ende des Strompulses wird der äußere Stromkreis unterbrochen und das durch Ionenbewegungen in der Membran bedingte Abklingen der Spannung verfolgt. Mit der Ladungspulsmethode kann in günstigen Fällen eine Zeitauflösung von 40 ns erzielt werden^[87].

Ein weiteres Relaxationsverfahren basiert auf einer sprunghaften Temperaturänderung der Membran und der angrenzenden Lösungen. Der Temperatursprung kann durch Absorption eines intensiven Lichtblitzes erzeugt werden^[88, 89]. Bei Verwendung einer im sichtbaren Bereich emittierenden Blitzlichtquelle wird den Außenlösungen der Membran ein Farbstoff als Absorber zugesetzt^[71]. Wegen der geringen Membrandicke folgt die Membran der Temperaturänderung der Lösungen innerhalb von 1 ns. Bei einer verbesserten Version der Methode (Abb. 12) wird die Lösung durch einen Puls eines Infrarot-Lasers aufgeheizt^[76]. Bei der Emissionswellenlänge des Nd-Glas-Lasers ($\lambda = 1.06 \mu\text{m}$) beträgt der decadische Absorptionskoeffizient von Wasser 0.063 cm^{-1} . Dies ermöglicht Temperatursprünge von etwa 0.3–0.4 K innerhalb von 0.4 ms in der „fixed-Q“-Mode des Lasers. Bei der üblichen Version der Methode wird eine konstante Spannung bereits vor dem Temperatursprung an die Membran angelegt. Der T -

Sprung führt zu einer momentanen Zunahme der Membranleitfähigkeit, entsprechend der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Ionentransports. Der sprunghaften Zunahme des Membranstromes folgt ein langsamerer, durch Translokation von Carriermolekülen in der Membran und Änderung des Komplexierungsgrades bedingter Relaxationsprozeß.

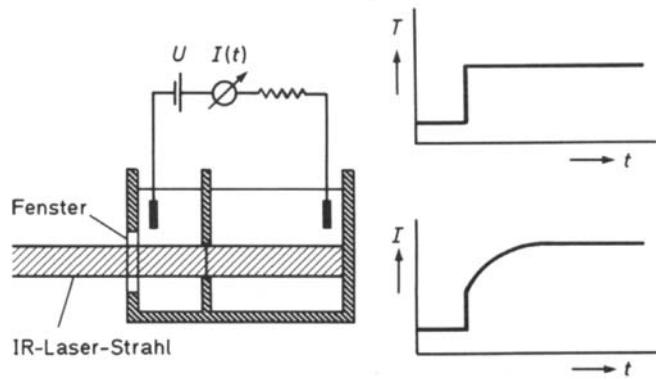


Abb. 12. Prinzip der Temperatursprung-Relaxationsmethode. Membran und angrenzende Lösungen werden durch Absorption eines Infrarot-Laserpulses schnell aufgeheizt. Eine Spannung U liegt bereits vor dem T -Sprung an der Membran an. Der T -Sprung führt zu einem praktisch momentanen Anstieg der Membranleitfähigkeit (entsprechend der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten), gefolgt von langsameren Relaxationsprozessen.

Die Analyse der Kinetik eines Carriersystems vom Valinomycin-Typ (Abb. 10) erfordert die Bestimmung von vier Geschwindigkeitskonstanten (k_R , k_D , k_S und k_{MS}). Mit Hilfe der Spannungssprungmethode^[60, 62, 63, 65, 67, 75, 90, 91] und des Ladungspulsverfahrens^[68–70, 73] wurden die Ionencarrier Valinomycin, Enniatin A und B, Beauvericin sowie die Makrotetrolide in künstlichen Lipidmembranen untersucht. Als typisches Beispiel werden im folgenden die Geschwindigkeitskonstanten für den Valinomycin-vermittelten K^+ -Transport durch Monoolein-Membranen bei 25°C angegeben^[68].

$$\begin{aligned} k_R &\approx 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \\ k_D &\approx 3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \\ k_{MS} &\approx 2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \\ k_S &\approx 4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

Bei einer K^+ -Konzentration von 1 M ($c_M = 1 \text{ M}$) sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ($c_M k_R$), Dissoziation (k_D) und der Translokation des beladenen Carriers (k_{MS}) ungefähr gleich groß ($2 \cdot 10^5$ – $3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist in diesem Fall der Rücktransport des freien Carriers ($k_S \approx 4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$). $k_{MS} \approx 2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ ist die Frequenz, mit der das beladene Carriermolekül die Membran überquert; der Reziproker Wert $1/k_{MS} \approx 5 \mu\text{s}$ gibt die Zeit an, die der Komplex im Mittel im Energieminimum in der Membrangrenzfläche zubringt.

Eine nützliche Größe für die Beschreibung der Kinetik von Carriern (und anderen Transportsystemen) ist die maximale Wechselzahl f , die definiert ist als der Grenzwert der Transportrate, der unter Kurzschlußbedingungen für unendlich hohe Ionenkonzentration auf der linken und verschwindende Ionenkonzentration auf der rechten Seite erreicht wird^[61]. f ist die maximale Zahl von Transportcy-

cken, die ein Carriermolekül pro Sekunde ausführen kann. Bei bekannten Geschwindigkeitskonstanten kann die Wechselzahl nach der Beziehung

$$f = \left(\frac{1}{k_{MS}} + \frac{1}{k_s} + \frac{2}{k_D} \right)^{-1} \quad (1)$$

berechnet werden. Im oben angeführten Beispiel erhält man $f \approx 2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$, was bedeutet, daß ein einzelnes Valinomycinmolekül $10^4\text{--}10^5 \text{ K}^+$ -Ionen in der Sekunde durch die Membran transportieren kann.

Die hohe Effizienz von Valinomycin als Ionencarrier ergibt sich hauptsächlich aus dieser großen Wechselzahl. Demgegenüber ist die Stabilitätskonstante $K = k_R/k_D \approx 1 \text{ M}^{-1}$ des K^+ -Komplexes in der Membrangrenzfläche bemerkenswert klein. Wesentlich größere Werte für die Stabilitätskonstante ($K = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) werden in Methanol gefunden^[29]. In Methanol/Wasser-Mischungen ist K jedoch kleiner und erreicht bei 70 Volumenprozent Wasser in Methanol ungefähr 1 M^{-1} ^[29]. Eine Mischung von 30% Methanol und 70% Wasser verhält sich also hinsichtlich der Komplexstabilität ähnlich wie die Membrangrenzfläche^[30]. Ähnliches gilt für die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation. In reinem Methanol findet man $k_R \approx 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_D \approx 1.2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ ^[29], während sich in Methanol mit 70 Volumenprozent Wasser extrapolierte Werte von $k_R \approx 1.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_D \approx 1.8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ ergeben, ähnlich wie im Falle der Membran^[30]. Mit Hilfe von CD-Messungen wurde die Stabilitätskonstante des Valinomycin/ K^+ -Komplexes in künstlichen Dimyristoyllecithin-Vesikeln zu $K \approx 1 \text{ M}^{-1}$ bestimmt^[29], was mit dem aus Relaxationsuntersuchungen an planaren Lipidmembranen erhaltenen Wert übereinstimmt.

4.2. Optimierungsprinzipien bei Carriersystemen

Die oben beschriebene Analyse führt auf das allgemeine Problem der Optimierung von Carriersystemen. Insbesondere kann man die Frage stellen, wie weit bei der biologischen Evolution von Ionencarriern die Natur sich einer optimalen Lösung angenähert hat. Für hohe Transportraten ist es natürlich günstig, wenn alle Geschwindigkeitskonstanten möglichst groß sind. Hier sind aber physikalische Grenzen gesetzt. Die Translokationsgeschwindigkeitskonstante k_s des freien Carriers ist begrenzt durch die Molekülgröße, durch die Mikroviskosität der Membran und durch die Bindung des amphiphilen Moleküls an die Membrangrenzfläche. k_{MS} ist ebenfalls durch die Membranviskosität sowie durch die Höhe der dielektrischen Energiebarriere der Membran limitiert. Es ist daher wenig wahrscheinlich, daß bei einem beweglichen Carrier k_s und k_{MS} viel größer als der bei Valinomycin beobachtete Wert von etwa 10^5 s^{-1} werden können. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_R liegt dagegen weit unterhalb des Grenzwerts für eine diffusionskontrollierte Reaktion. Der verhältnismäßig kleine Wert von k_R ergibt sich wahrscheinlich daraus, daß das Carriermolekül in der Membrangrenzfläche in einer offenen, für die Komplexbildung weniger günstigen Konformation stabilisiert ist.

Wie groß ist bei gegebenen Werten von k_R , k_{MS} und k_s der optimale Wert der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_D ? Ein sehr großer Wert von k_D wäre offensichtlich ungünstig, da dann die Stabilitätskonstante $K = k_R/k_D$ klein wird und das Molekül nicht mehr als Komplexbildner wirken kann. Jedoch wäre bei einem sehr kleinen Wert von k_D die Transportrate durch die langsame Dissoziation des Komplexes MS^+ in der Membrangrenzfläche limitiert. Der optimale Wert von k_D kann leicht aus der Bedingung berechnet werden, daß die Carrier-induzierte Membranleitfähigkeit bei festen k_R , k_{MS} und k_s ein Maximum annimmen soll. Es ergibt sich^[78]

$$k_D^* = [c_M k_R k_{MS} (2 + c_M k_R/k_s)]^{1/2} \quad (2)$$

Mit den oben angegebenen experimentellen Werten von k_R , k_{MS} und k_s findet man $k_D^* \approx 1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ bei $c_M = 0.1 \text{ M}$, was ungefähr mit dem tatsächlichen Wert $k_D \approx 3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ übereinstimmt. Sämtliche bis jetzt synthetisierten makrocyclischen Peptid- und Depsipeptid-Analoga von Valinomycin haben sich als weniger effiziente Carrier erwiesen als Valinomycin^[27, 72, 92, 93].

4.3. Einfluß der Membranstruktur auf die Kinetik von Carriersystemen

Biologische Membranen enthalten eine Vielzahl von Lipiden, die sich in der Struktur der polaren Kopfgruppe, der Länge der Kohlenwasserstoffketten und der Zahl der C=C-Bindungen unterscheiden. Die funktionelle Bedeutung dieser Vielfalt ist nur ungenügend bekannt. Durch Herstellung künstlicher Doppelschichtmembranen aus chemisch einheitlichen Lipiden ergibt sich die Möglichkeit, den Einfluß der Membranstruktur auf die Kinetik von Carriersystemen zu untersuchen^[62, 63, 69, 70, 72, 73, 94–96].

Elektrische Ladungen und Dipolmomente der Kopfgruppen führen zu einer Beeinflussung des Ionentransports. Membranen aus Phosphatidylserin oder Phosphatidylinositol haben ein negatives Grenzflächenpotential; daraus ergibt sich eine Anreicherung von Kationen an der Membrangrenzfläche und eine Erhöhung der Kationen-Transportgeschwindigkeiten^[96]. Durch orientierte Dipschichten in der Membrangrenzfläche entsteht eine zusätzliche Potentialdifferenz zwischen dem Membraninnern und den wäßrigen Lösungen^[95, 97]. Z. B. kann man aus Experimenten mit positiv und negativ geladenen lipophilen Ionen abschätzen, daß das Innere einer Phosphatidylcholinmembran gegenüber dem Außenmedium ein um $\approx 0.3 \text{ V}$ erhöhtes Potential hat^[97]. Auf diese Weise entsteht eine hohe Energiebarriere für den Transport von Kationen, während der Transport von Anionen begünstigt wird.

Die Geschwindigkeitskonstanten von Ionencarriern hängen stark von der Länge der Kohlenwasserstoffkette und der Zahl der Doppelbindungen ab. In Tabelle 1 sind kinetische Daten des Valinomycin/Rb⁺-Systems in Membranen aus verschiedenen Monoglyceriden angegeben^[69]. Bei Vergrößerung der Kettenlänge von C₁₆ auf C₂₂ nehmen die Translokationsgeschwindigkeitskonstanten k_s und k_{MS} auf 1/8 bis 1/10 ab, während k_R und k_D nahezu konstant bleiben. Eine Erhöhung der Zahl der C=C-Bindungen von eins auf vier führt dagegen zu einer starken Zunahme von

k_S und k_{MS} . Diese Erhöhung der Translokationsgeschwindigkeiten resultiert wahrscheinlich im wesentlichen aus dem verminderten Ordnungsgrad und der verminderten Mikroviskosität von Membranen aus hoch ungesättigten Lipiden.

Tabelle 1. Einfluß der Kettenlänge und der Zahl der Doppelbindungen von Lipiden auf die Geschwindigkeitskonstanten des Valinomycin-vermittelten Rb⁺-Transports [69]. Die Membranen wurden aus α -Monoglyceriden (MG) mit folgenden Fettsäureresten hergestellt: Palmitolsäure (16:1), Ölsäure (18:2), 11-Eicosensäure (20:1), Ercinsäure (22:1), 11,14-Eicosadiensäure (20:2), 11,14,17-Eicosatriensäure (20:3) und Arachidonsäure (20:4). Die Membranen wurden in n-Decan hergestellt. T = 25°C.

Lipid	k_R [10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹]	k_D [10 ⁴ s ⁻¹]	k_{MS} [10 ⁴ s ⁻¹]	k_S [10 ⁴ s ⁻¹]
Variation der Kettenlänge				
(16:1)-MG	43	13	74	8.5
(18:1)-MG	37	24	27	3.5
(20:1)-MG	23	12	10	1.8
(22:1)-MG	24	13	7	1.1
Variation der Zahl der Doppelbindungen				
(20:1)-MG	23	12	10	1.8
(20:2)-MG	34	9	39	3.2
(20:3)-MG	34	5	136	9.4
(20:4)-MG	42	3	240	12

5. Der Gramicidin-Kanal

Die einfachste bekannte Verbindung, die Ionenkanäle in Lipidmembranen bilden kann, ist Gramicidin A (Abb. 13), ein lineares Pentadecapeptid der Sequenz

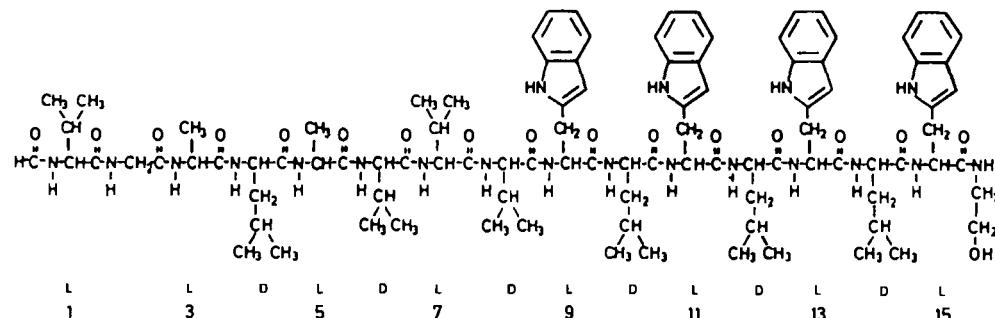
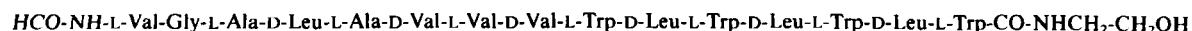


Abb. 13. Struktur von Valin-Gramicidin A [98].

das aus *Bacillus brevis* isoliert wird und antibiotisch wirksam ist^[98]. Gramicidin A ist extrem hydrophob; sogar die Endgruppen sind blockiert. In Gegenwart von Gramicidin A ist die Permeabilität biologischer Membranen oder künstlicher Lipidmembranen für kleine einwertige Kationen (Alkalimetall-Ionen, Ag⁺, Tl⁺, NH₄⁺, H⁺) stark erhöht^[53, 54, 99-102].

5.1. Einzelkanalexperimente

Hinweise darauf, daß Gramicidin A nicht als Carrier, sondern als Ionenkanal wirkt, ergaben sich aus Experimenten, bei denen äußerst kleine Mengen des Peptids einer planaren Lipid-Doppelschichtmembran zugesetzt wurden. Unter diesen Bedingungen beobachtet man bei konstanter elektrischer Spannung diskrete, stufenartige Schwankungen des Membranstromes, deren Amplitude in

1 M Cs⁺-Lösung bei 0.1 V etwa 8 · 10⁻¹² A beträgt (Abb. 14)^[103]. Setzt man der Membran steigende Mengen Gramicidin A zu, so überlagern sich zunehmend einzelne Stromfluktuationen, bis die Membran schließlich eine makroskopische Leitfähigkeit annimmt. Die einfachste Deutung dieser Experimente besteht in der Annahme, daß die beobachteten mikroskopischen Stromfluktuationen durch Entstehen und Verschwinden einzelner Ionenkanäle zustandekommen. Aus der Stufenhöhe der Stromschwankungen berechnet sich die Leitfähigkeitsänderung (in 1 M Cs⁺-Lösung) zu 80 pS, was (bei einer Spannung von 0.1 V) einem Durchtritt von 5 · 10⁷ Cs⁺-Ionen in der Sekunde entspricht. Diese Transportgeschwindigkeit ist um 3–4 Größenordnungen höher als die maximale eines Ionencarriers vom Valinomycin-Typ (Abschnitt 4.1). Daraus kann geschlossen werden, daß Gramicidin A nicht als Carrier wirkt; die beobachteten hohen Transportgeschwindigkeiten sind jedoch mit einem Kanalmechanismus in Einklang^[103].

Die Möglichkeit, durch empfindliche Strommessungen molekulare Einzelereignisse in einer Membran direkt zu beobachten, beruht letztlich auf der außerordentlich kleinen Grundleitfähigkeit einer Lipidmembran. Kürzlich ist es gelungen, mit Hilfe von Glas-Mikropipetten kleine Bezirke von Zellmembranen elektrisch zu isolieren und auf diese Weise Einzelkanalströme durch biologische Ionenkanäle zu registrieren^[105].

Eine genauere Analyse des in Abbildung 14 dargestellten Experiments zeigt, daß die Amplituden der Leitfähigkeitsfluktuationen nicht völlig einheitlich sind, sondern

eine Verteilung um einen Mittelwert zeigen. Die Breite der Verteilung ist von der Natur des Membranlipids abhängig^[106]. Außerdem beobachtet man in Gegenwart von Gramicidin mit geringerer Häufigkeit Einzelkanalereignisse mit sehr viel kleinerer Amplitude^[107]. Eine mögliche Erklärung dieser Befunde wäre, daß der Gramicidin-Kanal bei seiner Bildung verschiedene (langlebige) Konformationen annehmen kann (siehe Abschnitt 5.2), die sich in ihrer Ionenpermeabilität unterscheiden^[107-110].

Einzelkanalexperimente liefern neben der Kanalleitfähigkeit die Lebensdauer des Kanals. Empirisch findet man für die Wahrscheinlichkeit dP, einen Kanal mit einer Lebensdauer zwischen t und t+dt zu finden, $dP = \exp(-t/\tau) dt$, wie man es für ein System unabhängiger Teilchen mit konstanter Zerfallsgeschwindigkeit erwartet^[103]. Dabei entspricht τ der mittleren Lebensdauer des Kanals. Während (bei neutralen Lipiden) die Kanalleitfä-

higkeit wenig von der Natur des Lipids abhängt, nimmt die mittlere Lebensdauer τ mit zunehmender Kettenlänge (Membrändicke) des Lipids stark ab^[103,111-113]. τ variiert dabei von Millisekunden bis Sekunden. Ein weiterer Parameter, der die mittlere Lebensdauer beeinflußt, ist die Grenzflächenspannung der Membran^[112,114-116].

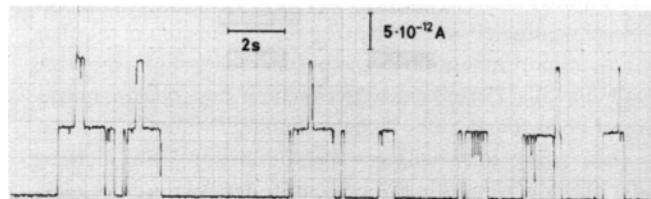


Abb. 14. Fluktuationen des Membranstromes bei sehr kleiner Gramicidin-Konzentration [104]. 1 M CsCl, 25°C, Membranspannung 0.1 V. Die Membran wurde aus Monoolein hergestellt. Die Basislinie entspricht der Membranleitfähigkeit in Abwesenheit von Gramicidin.

5.2. Struktur des Gramicidin-Kanals

Ein Strukturmodell für den Gramicidin-Kanal wurde von *Urry* anhand von Konformationsenergie-Betrachtungen vorgeschlagen^[117-119]. Es beinhaltet ein helicales Dimer, bei dem die beiden Monomere an den Formyl-Enden (Kopf-an-Kopf) über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 15 und 16). Die hydrophoben Aminosäure-Seitenketten sind an der Außenseite der linkshändigen β -Helix angeordnet^[120]. Im Zentrum, längs der Achse, enthält die Helix einen 0.4 nm weiten Tunnel, der mit Sauerstoffatomen der Peptid-Carbonylgruppen ausgekleidet ist (ein Durchmesser von 0.4 nm ist ausreichend, um unhydratisierte Alkalimetall-Ionen Durchtritt zu gewähren). Die Gesamtlänge des Dimers beträgt 2.5–3.0 nm; sie ist vergleichbar mit der Dicke der Kohlenwasserstoffschicht einer bimolekularen Lipidmembran. Konformationsenergie-Berechnungen zeigen, daß die Peptid-Carbonylgruppen sich mit dem Sauerstoff-Ende gegen die Helix-Achse neigen können^[117-119]. Durch diese sogenannte Librations-

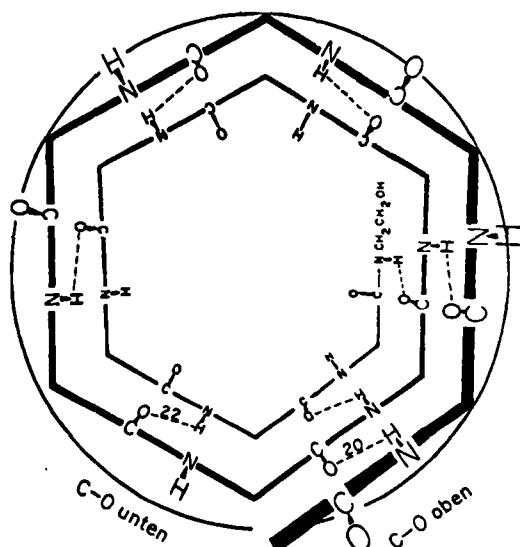


Abb. 15. Struktur der β -Helix von Gramicidin A [121]. Der 0.4 nm weite Tunnel entlang der Helix-Achse ist mit Sauerstoffatomen der Peptid-Carbonylgruppen ausgekleidet. Die an der Helix-Außenseite liegenden Aminosäure-Seitenketten sind nicht eingezeichnet. Der transmembranäre Kanal besteht aus zwei an den Formyl-Enden verknüpften Helices.

bewegung kann der Kanal sich an den Durchmesser des Ions anpassen; die Annäherung des negativen Dipol-Endes der Carbonylgruppe an das Kation führt zu einer energetisch günstigen Wechselwirkung zwischen Ion und Kanal.

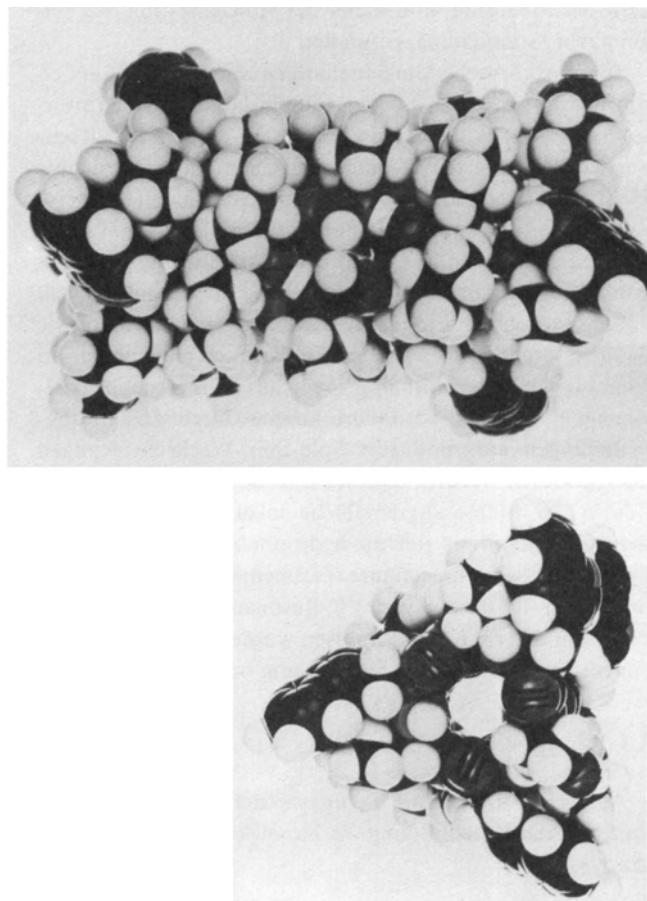


Abb. 16. Kalottenmodelle des Gramicidin-Kanals, nach *Urry* [118]. Oben: Außenseite des dimeren Kanals. Die beiden Monomere sind über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Unten: Blick längs der Helix-Achse. Der zentrale Tunnel hat einen Durchmesser von 0.4 nm.

Energieabschätzungen legen ferner nahe, daß der Kanal eine Vielzahl von stabilen Konformationen annehmen kann, die sich in der Orientierung der Aminosäure-Seitengruppen unterscheiden^[108-110]. Auswirkungen auf die Kanalleitfähigkeit können sich dadurch ergeben, daß die elektrostatische Energie eines Ions im Kanal von der Richtung der Dipolmomente der Tryptophanreste abhängt. Ferner kann die Librationsbewegung der Carbonylgruppen bei verschiedenen Konformationen der Seitenketten verschieden stark eingeschränkt sein.

Röntgen-Strukturuntersuchungen an Gramicidin sind bisher nur mit geringer Auflösung möglich^[122,123]; ihre Ergebnisse sind konsistent mit der Annahme eines helicalen Dimers. Interessanterweise ändert sich die Struktur erheblich beim Übergang vom freien Dimer zum Dimer-Kation (K^+ oder Cs^+)-Komplex. Der Durchmesser des Zylinders nimmt von 0.5 auf 0.68 nm zu, die Länge von 3.2 auf 2.6 nm ab.

Evidenz dafür, daß der Kanal ein Dimer ist, lieferte die Untersuchung der Kanalbildungskinetik (Abschnitt 5.3), sowie Experimente mit Pyromellityl-Derivaten von Gramicidin (Abschnitt 5.4). Ein weiterer Test der Dimer-Hypo-

diese bestand in kombinierten Fluoreszenz- und Leitfähigkeitsmessungen an Membranen, die mit einem Dansylmarkierten Gramicidin dotiert waren^[133]. In diesen Experimenten wurde, im Einklang mit dem Dimer-Modell, bei kleinen Gramicidin-Konzentrationen eine quadratische Abhängigkeit der Membranleitfähigkeit von der Fluoreszenz der Membran, und damit der Konzentration des eingebauten Gramicidins, gefunden.

Spektroskopische Untersuchungen zeigen, daß Gramicidin A in organischen Lösungsmitteln helicale Dimere verschiedener Struktur bilden kann^[124-132]. Neben dem Kopf-an-Kopf-assoziierten Dimer entstehen doppelsträngige Helices, in denen die beiden Peptidketten um eine gemeinsame Achse gewunden und durch intermolekulare Wasserstoffbrücken verknüpft sind. Die doppelsträngige Helix wurde ursprünglich als Alternative zu *Urrys* Kanalmodell vorgeschlagen^[27]. Eine Entscheidung zugunsten dieses Modells ergibt sich aus Leitfähigkeitsuntersuchungen an Membranen (Abschnitt 5.4), sowie aus Kernresonanzexperimenten^[134-136]. Insbesondere konnte durch Abstandsbestimmungen aufgrund von Spin-Spin-Wechselwirkungen nachgewiesen werden, daß der Carboxyterminus des Peptids in der Membrangrenzfläche lokalisiert ist, während der Aminoterminus tief im hydrophoben Teil der Membran liegt^[134]. Kernresonanzexperimente, in denen die chemische Verschiebung von ¹³C-Resonanzen in Gegenwart von Kationen im Kanal gemessen wurde, stützen ferner die Annahme, daß die Helix linkshändig orientiert ist^[136, 137].

5.3. Kinetik der Kanalbildung

Aufgrund des Dimerisierungsmodells (Abschnitt 5.2) läßt sich die Kanalbildung als bimolekulare Reaktion beschreiben.



Die Kinetik dieser Reaktion kann durch Relaxationsmessungen untersucht werden^[138, 140]. Grundlage für die Anwendung der Spannungssprung- oder Ladungspuls-Technik ist der Befund, daß die Zahl der aktiven Kanäle in der Membran von der elektrischen Feldstärke abhängt. Legt man zur Zeit $t=0$ eine Spannung rasch an eine Gramicidin-dotierte Membran an, so beobachtet man einen Anfangstrom, welcher durch die ursprüngliche Kanalzahl gegeben ist. Der Strom steigt dann asymptotisch auf einen Grenzwert an, entsprechend der spannungsinduzierten Verschiebung des Kanalbildungsgleichgewichtes. Für eine Kanalbildungsreaktion gemäß Gleichung (3) läßt sich voraussagen, daß der Reziproker Wert der Zeitkonstanten τ_c des Stromanstiegs linear von der Quadratwurzel der stationären Membranleitfähigkeit λ_∞ abhängen sollte.

$$1/\tau_c = k_D + 4\sqrt{k_R k_D \lambda_\infty / L A} \quad (4)$$

L ist die Avogadro-Konstante und A die Einzelkanalleitfähigkeit. Die Voraussage von Gleichung (4) wird experimentell bestätigt: Mißt man τ_c und λ_∞ bei verschiedenen Gramicidin-Konzentrationen, so ergibt die Auftragung von $1/\tau_c$ gegen $\sqrt{\lambda_\infty}$ eine Gerade^[138]. Die Kanalbildung läßt sich also, im Einklang mit Gleichung (3) als Reaktion

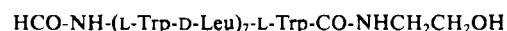
zweiter Ordnung darstellen. Dies bedeutet natürlich nicht, daß kompliziertere Möglichkeiten, etwa ein nachgeschaltetes Gleichgewicht zwischen einer inaktiven und einer aktiven Form des Dimers, oder eine Assoziation von inaktiven Dimeren zu einem aktiven Tetramer^[142], ausgeschlossen werden können.

Legt man das Dimerisierungsmodell [Gl. (3)] zugrunde, so können aus der Auftragung von $1/\tau_c$ gegen $\sqrt{\lambda_\infty}$ die Geschwindigkeitskonstanten k_R und k_D bestimmt werden. $1/k_D$ stimmt innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen mit der aus Einzelkanalexperimenten bestimmten mittleren Lebensdauer τ des Kanals überein^[138, 139].

Ein völlig unabhängiges Verfahren zur Untersuchung der Kanalbildungskinetik besteht in der Analyse des elektrischen Rauschens^[113, 143, 144]. Eine bimolekulare Lipiddmembran ist im thermodynamischen Sinn ein kleines System und daher starken Fluktuationen unterworfen. Aufgrund der statistischen Natur der Kanalbildungsreaktion schwankt die Kanalzahl und damit die elektrische Leitfähigkeit im Laufe der Zeit. Durch Messung der Korrelationsfunktion oder der Spektraldichte der Stromfluktuationen können die kinetischen Parameter des Kanalsystems bestimmt werden. Die Analyse des elektrischen Rauschens liefert zunächst dieselbe Information wie eine Kombination von Relaxationsexperiment und Einzelkanalmessung; darüberhinaus kann jedoch mit dieser Methode die Kanalleitfähigkeit bei hoher Kanaldichte bestimmt werden. Auf diese Weise können durch Rauschanalyse mögliche Wechselwirkungen zwischen benachbarten Ionenkanälen untersucht werden^[113].

5.4. Experimente mit Derivaten und Analoga von Gramicidin. Effekte elektrischer Ladungen an den Kanalmündungen

Experimente mit Gramicidin-Kanälen eröffnen die Möglichkeit, die Beziehung zwischen der Struktur und der Permeabilität eines Ionenkanals zu studieren. Zu diesem Zweck wurde die Membranaktivität einer Anzahl von Derivaten und Analoga von Gramicidin A untersucht^[104, 121, 141, 145-161]. Synthetische Analoga mit vereinfachter Sequenz, z. B.



bilden ebenfalls Ionenkanäle, aber mit veränderter Leitfähigkeit und veränderter Selektivität^[152]. Bereits der Austausch einer Aminosäure kann zu merklichen Änderungen der Einzelkanalleitfähigkeit führen. So nimmt z. B. die Leitfähigkeit für K^+ bei Substitution von Tryptophan in Position 11 durch Phenylalanin (vgl. Abb. 13) um den Faktor 1.4 ab^[106]. Bei gleichzeitiger Variation in zwei Positionen werden wesentlich größere Leitfähigkeitsänderungen beobachtet^[158]. Eine mögliche Deutung dieser Befunde besteht darin, daß die Geometrie und/oder die Flexibilität des Ligandensystems lokal durch die Natur der Aminosäureseitenkette beeinflußt wird. Außerdem kann, wie bereits erwähnt, die potentielle Energie des Ions im Kanal durch Einführung von Seitenketten mit elektrischen Dipolmomenten verändert werden.

Von besonderem Interesse sind Gramicidin-Derivate, die elektrisch geladene Gruppen am Carboxy- oder Ami-

noterminus tragen^[148, 152, 154, 159, 162]. Durch Veresterung des Ethanolaminrestes am Carboxyterminus mit Pyromellitsäure können drei negative Ladungen an der Kanalmündung eingeführt werden^[148]. O-Pyromellitylgramicidin A (Abb. 17) bildet in planaren Lipiddmembranen Ionenkanäle, die ein ähnliches Öffnungs-/Schließungs-Verhalten zeigen wie Gramicidin A. Wie im folgenden beschrieben wird, unterscheiden sich neutrales und negativ geladenes Gramicidin in anderen Eigenschaften jedoch sehr stark.

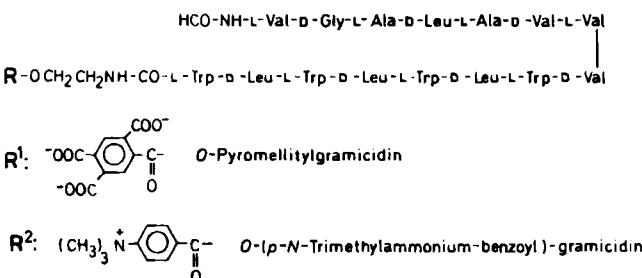


Abb. 17. Gramicidin-Derivate mit positiv und negativ geladenen Gruppen am Carboxyterminus. Der Carboxyterminus bildet die Mündung des Kanals.

Wenn O-Pyromellitylgramicidin einseitig zur einen wäßrigen Außenphase der Membran gegeben wird, beobachtet man nur eine geringfügige Änderung der Membranleitfähigkeit. Die Leitfähigkeit steigt aber um mehrere Größenordnungen an, wenn die Verbindung anschließend auch zur anderen Außenphase gegeben wird^[148]. Dieser Befund steht im Gegensatz zum Verhalten des neutralen Gramicidins, mit dem man nahezu dieselbe Leitfähigkeit erhält, unabhängig davon, ob das Peptid auf der einen oder auf beiden Seiten gleichzeitig zugegeben wurde. Diese Beobachtungen lassen sich auf der Basis des Dimer-Modells erklären, wenn man annimmt, daß die beiden Halbkanäle sich nur vereinigen können, wenn sie auf gegenüberliegenden Seiten der Membran vorhanden sind. Unmodifiziertes Gramicidin kann aufgrund seines stark hydrophoben Charakters wahrscheinlich sehr leicht die Membran überqueren, während das negativ geladene Derivat auf derjenigen Seite der Lipiddoppelschicht gebunden bleibt, auf der es zugegeben wurde. Bei gleichzeitiger Zugabe von O-Pyromellitylgramicidin zu beiden Außenphasen steigt die Membranleitfähigkeit erwartungsgemäß proportional zum Quadrat der Peptidkonzentration an^[148].

Große Unterschiede zwischen neutralem und negativ geladenem Gramicidin beobachtet man auch in der Einzelkanalleitfähigkeit^[148]. Während bei hoher Ionenkonzentration (1 M) die Λ -Werte des neutralen und negativ geladenen Kanals nahezu gleich sind, hat bei kleiner Ionenkonzentration (0.01 M) der negativ geladene Kanal eine fünf- bis sechsfach höhere Leitfähigkeit (Abb. 18). Dieser Befund entspricht der Erwartung, daß die negativen Ladungen an der Kanalmündung zu einer Akkumulation permeabler Kationen führen; entsprechend der Debye-Hückel-Theorie der interionischen Wechselwirkung ist diese Akkumulation bei kleiner Ionenstärke besonders ausgeprägt. Noch wesentlich stärkere elektrostatische Effekte werden beobachtet, wenn neutrales Gramicidin in negativ geladene Membranen eingebaut wird^[163].

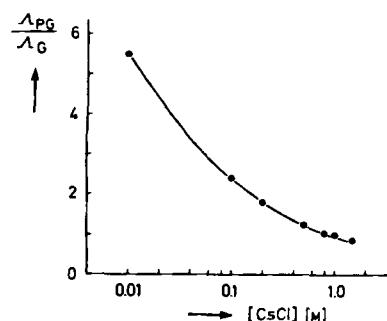


Abb. 18. Einzelkanalleitfähigkeit Λ_{PG} des negativ geladenen O-Pyromellitylgramicidin-Kanals, dividiert durch die Einzelkanalleitfähigkeit Λ_G von neutralem Gramicidin [148]. Bei kleiner Ionenstärke hat der negativ geladene Kanal eine fünf- bis sechsfach größere Leitfähigkeit als der neutrale.

Gibt man kleine Mengen einer Mischung von neutralem und negativ geladenem Gramicidin zur Membran, so beobachtet man im Einzelkanalexperiment drei Klassen von Kanälen unterschiedlicher Leitfähigkeit^[148]. Der Kanal mit der größten Leitfähigkeit ist identisch mit dem O-Pyromellitylgramicidin-Kanal, der Kanal mit der kleinsten Leitfähigkeit identisch mit dem normalen Gramicidin-Kanal. Es ist naheliegend anzunehmen, daß der Kanal von intermediärer Leitfähigkeit ein Hybrid aus einem neutralen und einem negativ geladenen Halbkanal ist. Derartige Hybridkanäle, deren Existenz durch das Dimer-Modell vorausgesagt wird, wurden auch mit anderen Derivaten und Analoga von Gramicidin beobachtet^[151, 158].

Ein Gramicidin-Derivat mit einer positiven Ladung an der Kanalmündung wird durch Einführung des p-N-Trimethylammoniumbenzoyl-Restes erhalten (Abb. 17). In diesem Fall ist die Leitfähigkeit im Vergleich zu der des neutralen Kanals reduziert^[152].

Kanäle mit neuartigen Eigenschaften erhält man, wenn man das kationische Peptid zur einen, das anionische Peptid zur anderen wäßrigen Phase gibt. In diesem Falle bilden sich in der Membran Hybridkanäle, die aus einem positiv und einem negativ geladenen Halbkanal bestehen^[152]. Diese strukturelle Asymmetrie spiegelt sich in einem asymmetrischen Strom-Spannungs-Verhalten wider (Abb. 19).

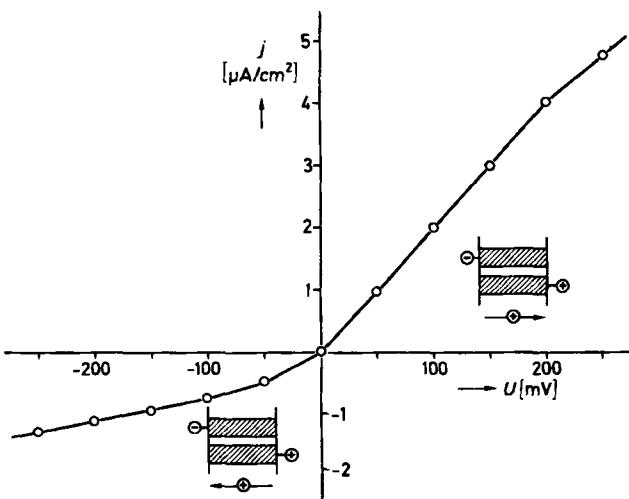


Abb. 19. Asymmetrische Strom-Spannungs-Charakteristik von Hybridkanälen, die aus einem positiv und einem negativ geladenen Halbkanal entsprechend Abbildung 17 gebildet wurden [152]. Die Membranstromdichte j wurde 1 ms nach Anlegen der Spannung U gemessen. Der Strom steigt in „Vorwärtsrichtung“ (Kationenfluß vom negativen zum positiven Kanalende) stärker an als in „Rückwärtsrichtung“.

Der Kanalstrom steigt in „Vorwärtsrichtung“ (Kationenfluß vom negativen zum positiven Kanalende) wesentlich stärker an als in „Rückwärtsrichtung“. Auf diese Weise können durch chemische Modifikation Ionenkanäle mit Gleichrichtereigenschaften erhalten werden.

Experimente mit ionischen Derivaten von Gramicidin können auch zur Entscheidung zwischen verschiedenen Kanalmodellen herangezogen werden. Hierzu wurde die Membranaktivität des *N*-Pyromellityl-Derivates von Desformylgramicidin A untersucht, welches einen Pyromellitylest anstelle der Formylgruppe am Aminoterminus gebunden enthält^[162]. Bei einer doppelsträngigen Helix würden sowohl die Aminotermini als auch die Carboxytermini in der Membrangrenzfläche liegen. Da das *O*-Pyromellityl-Derivat Kanäle bildet, sollte im Doppelstrang-Modell auch das *N*-Pyromellityl-Derivat aktiv sein. Im Modell von *Urry*, bei dem die Aminotermini im Membraninneren liegen, wäre eine Membranaktivität jedoch nicht zu erwarten, da aus energetischen Gründen eine Lokalisation der negativ geladenen Pyromellitsäurereste im apolaren Membraninnern unwahrscheinlich ist. Experimentell konnte, in Übereinstimmung mit dem Modell von *Urry*, eine Kanalbildung mit dem *N*-Pyromellityl-Derivat nicht beobachtet werden^[162].

5.5. Mechanismus des Ionendurchtritts durch den Kanal

Verglichen mit einem Ionencarrier wie Valinomycin hat der Gramicidin-Kanal eine wesentlich geringere Selektivität. Innerhalb der Reihe der Alkalimetall-Ionen entspricht die Permeabilitätssequenz der Sequenz der Beweglichkeit in Wasser ($\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$). Das Permeabilitätsverhältnis $P(\text{K}^+)/P(\text{Na}^+)$ beträgt nur etwa 3–4^[102], während für Valinomycin $P(\text{K}^+)/P(\text{Na}^+)$ größer als 10^3 ist. Der Kanal ist für Anionen und höherwertige Kationen praktisch impermeabel. Ca^{2+} und Ba^{2+} blockieren bei hohen Konzentrationen den Durchtritt einwertiger Kationen^[164–166].

Die Selektivität eines Ionenkanals hängt von der Geometrie und der Flexibilität des Ligandensystems ab^[167]. Die Bevorzugung von Kationen gegenüber Anionen erklärt sich durch die günstige elektrostatische Wechselwirkung des Kations mit den partiell negativ geladenen Sauerstoffatomen der Carbonylgruppen. Die Tatsache, daß alle Alkalimetall-Ionen (innerhalb einer Zehnerpotenz) ähnlich gut den Kanal passieren, steht sehr wahrscheinlich mit der früher erwähnten Libration der Carbonylgruppen in Zusammenhang. Es ist plausibel anzunehmen, daß das Kation beim Eintritt in den Kanal nur einen Teil seiner primären Hydrathülle abstreift und mit einem vorausgehenden und einem nachfolgenden Wassermolekül zusammen durch den Kanal wandert^[168, 179, 180].

Es existieren direkte experimentelle Hinweise, daß der Gramicidin-Kanal normalerweise mehrere Wassermoleküle enthält. Die Wasserpermeabilität einer Gramicidindotierten Membran läßt sich auf zweierlei Weise messen: durch Anlegen eines osmotischen Gradienten oder durch Isotopenflußexperimente^[169, 170]. Für enge Poren, in denen kein Platzwechsel zwischen Wassermolekülen möglich ist, sagt die Theorie voraus, daß das Verhältnis beider Permeabilitätskoeffizienten $P_{\text{osm}}/P_{\text{iso}}$ gleich der Zahl N der Was-

sermoleküle in der Pore ist^[170]. Experimentell ergibt sich auf diese Weise $N \approx 6$. Dieser Wert von N wurde unabhängig durch Messung des sogenannten Strömungspotentials bestätigt^[170–172]. Es muß in einer Pore, die gleichzeitig Ionen und Wassermoleküle enthält, eine Kopplung von Ionentransport und Wassertransport auftreten. Da in einem 0.4 nm weiten Kanal der Platzwechsel zwischen Ionen und Wasser zumindest stark behindert ist, muß man annehmen, daß die Kopplung ziemlich eng ist^[178, 179]. Ein osmotisch induzierter Wassertransport bewirkt auf diese Weise einen Transport von Ladung und erzeugt (bei offenem äußeren Kreis) eine elektrische Potentialdifferenz über der Membran. Aus dem experimentell beobachteten Wert des Strömungspotentials wurde N unter geeigneten Annahmen zu 6–7 abgeschätzt^[170].

Durch die Wechselwirkung des durchtretenden Ions mit den Liganden entsteht eine Serie von lokalen Minima und Maxima der potentiellen Energie entlang des Transportweges im Kanal^[173–177]. Diesem Potential überlagert ist die dielektrische Wechselwirkung des Ions mit der wäßrigen Phase und dem Kohlenwasserstoffmedium der Membran. Die dielektrische Wechselwirkung erzeugt eine breite Energiebarriere mit einem Gipfel in der Mitte der Membran^[181, 182]. Auf der Basis dieser Überlegungen ergibt sich das in Abbildung 20 dargestellte Potentialprofil, welches je eine „Bindungsstelle“ in der Nähe der Kanalmündungen aufweist. Die Energiebarrieren an den Mündungen berücksichtigen das Auftreten energetisch ungünstiger Übergangszustände zwischen dem voll hydratisierten und dem Liganden-assoziierten Zustand des Ions.

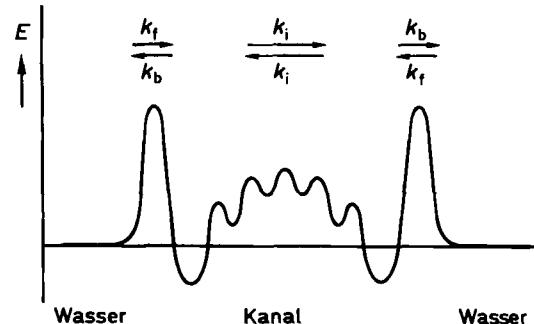


Abb. 20. Hypothetisches Profil der potentiellen Energie E eines Kations im Gramicidin-Kanal. Das Potentialprofil entsteht durch Überlagerung einer breiten dielektrischen Energiebarriere mit lokalen, durch Wechselwirkung mit dem Ligandensystem bedingten Potentialvariationen. Die Energiebarrieren an den Mündungen berücksichtigen das (wahrscheinliche) Auftreten energetisch ungünstiger Übergangszustände zwischen dem voll hydratisierten und dem Liganden-assoziierten Zustand des Ions. k_f ist die Geschwindigkeitskonstante für den Sprung des Ions über die gesamte zentrale Energiebarriere, k_r und k_i sind die Geschwindigkeitskonstanten für Ein- und Aussprung (zweite Bindungsstelle unbesetzt).

Das in Abbildung 20 skizzierte Modell führt zu folgenden Voraussagen: Ist eine der beiden Bindungsstellen besetzt, so ist die Einsprung- und Aussprungsgeschwindigkeit an der anderen Bindungsstelle durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Ionen verändert. Ferner sollte ein Sprung über die zentrale Barriere nur dann möglich sein, wenn die gegenüberliegende Bindungsstelle frei ist. Tatsächlich deutet eine große Zahl experimenteller Beobachtungen auf Wechselwirkungen zwischen Ionen im Kanal hin, insbesondere konzentrationsabhängige Permeabilitätsverhältnisse^[102, 183], Blockierungen durch Tl^+ ^[183–186],

die Form der Konzentrationsabhängigkeit der Kanalleitfähigkeit^[103, 183, 185, 187], Isotopenwechselwirkungen bei Flußexperimenten^[188] und das Leitfähigkeitsverhalten kürzerkettiger Gramicidin-Analoga^[189]. Wesentliche Information über den Transportmechanismus ist auch in der Strom-Spannungs-Charakteristik des Kanals enthalten^[103, 173, 190]. Die oben genannten Beobachtungen können mit dem in Abbildung 20 dargestellten Kanalmodell im wesentlichen wiedergegeben werden, wenn man annimmt, daß bei hohen Ionenkonzentrationen beide Bindungsstellen besetzt sein können. Das Modell ist durch fünf Geschwindigkeitskonstanten charakterisiert (Abb. 20): k_i (Sprung über die zentrale Barriere), k_f und k_b (Einsprung und Aussprung bei unbesetzter zweiter Bindungsstelle), sowie k_i^* und k_b^* (Einsprung und Aussprung bei besetzter zweiter Bindungsstelle). Die in Tabelle 2 angegebenen Werte der kinetischen Parameter wurden durch Anpassung des Modells an die experimentellen Daten erhalten^[191, 192]. Danach wird die erste Bindungsstelle bereits bei Ionenkonzentrationen von 1–10 mM besetzt ($k_b/k_f \approx 8$ mM für Na^+). Ein interessantes Resultat ist die starke Zunahme der Dissoziationsgeschwindigkeit nach Besetzung der zweiten Bindungsstelle ($k_b^*/k_b \approx 600$). Dieser Befund entspricht der postulierten elektrostatischen Abstoßung zwischen beiden Ionen. Es ist jedoch unklar, warum ein ähnlicher Effekt nicht auch bei den Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_f und k_i^* auftritt. Aus den in Tabelle 2 angegebenen Daten geht hervor, daß bei hohen Ionenkonzentrationen die Kanalleitfähigkeit durch die Geschwindigkeitskonstante des Übertritts über die zentrale Barriere ($k_i \approx 10^7 \text{ s}^{-1}$) limitiert ist. k_i -Werte dieser Größenordnung werden ebenfalls aus Messung der dielektrischen Relaxationen erhalten^[196].

Tabelle 2. Geschwindigkeitskonstanten des Ionentransports durch den Gramicidin-Kanal, entsprechend dem Modell von Abbildung 20 [191]. k_i : Geschwindigkeitskonstante des Sprungs über die zentrale Energiebarriere; k_f , k_b : Geschwindigkeitskonstante des Ein- bzw. Aussprungs bei unbesetzter zweiter Bindungsstelle, k_i^* , k_b^* : Geschwindigkeitskonstante des Ein- bzw. Aussprungs bei besetzter zweiter Bindungsstelle. Die Werte der ersten drei Spalten wurden aus Leitfähigkeits- und Permeabilitätsmessungen bestimmt [191], die Werte der letzten Spalte aus Kernresonanzdaten [194].

	Cs^+	K^+	Na^+	Na^+ (NMR)
$k_f [10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	1.8	1.6	0.55	0.3
$k_b [10^5 \text{ s}^{-1}]$	2.9	3.9	4.5	3
$k_i^* [10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	1.6	1.4	0.53	0.12
$k_b^* [10^8 \text{ s}^{-1}]$	1.6	2.1	2.6	0.4
$k_i [10^7 \text{ s}^{-1}]$	8.2	2.7	1.3	>0.03

Zur Untersuchung der Transportkinetik von Ionen im Gramicidin-Kanal können auch Kernresonanzmethoden eingesetzt werden^[193–195]. Zu diesem Zweck wurde Gramicidin A in Lysolecithin-Micellen eingebaut. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Rate der longitudinalen Relaxation von $^{23}\text{Na}^+$ wurde auf die Existenz einer hochaffinen und einer niederaffinen Bindungsstelle für Na^+ geschlossen. Aus der chemischen Verschiebung der ^{23}Na -Resonanz und aus Relaxationsdaten konnten die Bindungskonstanten $K = k_f/k_b$ und $K^* = k_i^*/k_b^*$ abgeschätzt werden. Wie Tabelle 2 zeigt, stimmen die aus den Kernresonanzexperimenten erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten innerhalb einer Größenordnung mit den aus Leitfähigkeitsdaten ermittelten Werten überein.

6. Einbau von Kanalproteinen in künstliche Lipidmembranen

Biologische Membranen enthalten Ionenkanäle, die durch das elektrische Feld in der Membran oder durch Bindung von „Agonisten“ gesteuert werden. Es handelt sich dabei, soweit bekannt, um verhältnismäßig große, wasserunlösliche Proteine. Beispiele sind der Na^+ -Kanal der Nervenmembran^[197] und der Acetylcholin-aktivierte Kanal der neuromuskulären Synapse^[6]. Der Na^+ -Kanal der Nervenmembran ist ein Glycoprotein, dessen Hauptkomponente ein Polypeptid der Molmasse $M \approx 260\,000 \text{ g/mol}$ ist. Der Acetylcholin-aktivierte Kanal hat eine Molmasse von $270\,000 \text{ g/mol}$ und setzt sich aus fünf Polypeptid-Untereinheiten zusammen.

Mit Detergentien können Kanalproteine aus biologischen Membranen isoliert und gereinigt werden. In den letzten Jahren wurden Methoden entwickelt, um isolierte Membranproteine in künstliche Lipidmembranen einzubauen^[8, 198]. Wird dem in Detergents solubilisierten Protein ein Phospholipid zugesetzt und das Detergent durch Dialyse entfernt, so entstehen geschlossene Lipidvesikel, welche das Protein in der Vesikelmembran eingebaut enthalten. Setzt man diese Lipid/Protein-Vesikel der einen Außenphase einer planaren Lipidmembran zu, so kommt es unter geeigneten Bedingungen zu einer Fusion der Vesikelmembran mit der planaren Lipidmembran unter Einbau des Proteins. Enthalten die Vesikelmembran und die planare Membran negativ geladene Lipide, kann die Fusion durch Zusatz von Ca^{2+} -Ionen eingeleitet werden. Günstig für die Fusion ist ferner ein osmotischer Überdruck im Innern der Vesikel^[199]. Eine hohe Fusionsrate wird beobachtet, wenn die Versuchstemperatur in der Nähe der Umwandlungstemperatur zwischen der flüssig-kristallinen und der gelartigen Phase des Membranlipids liegt^[200, 201].

Eine Alternative zum Fusionsverfahren besteht darin, Lipid/Protein-Vesikel an der Wasseroberfläche zu sprengen. Aus der so entstehenden Monoschicht kann mit Hilfe der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Technik eine bimolekulare Membran erzeugt werden. Diese Methode wurde zum Einbau des Acetylcholin-aktivierten Kanals in planare Lipidmembranen eingesetzt^[202–205].

Kanalproteine können auch direkt, ohne vorausgehendes Reinigungsverfahren, in planare Lipidmembranen eingebaut werden. Zu diesem Zweck werden aus der biologischen Membran durch mechanische Fragmentierung und Dichtegradienten-Zentrifugation Membranvesikel hergestellt, die mit der planaren Membran fusionieren können. Da bei diesem Verfahren in der Regel eine Vielzahl von Membranproteinen in die planare Membran transferiert werden, muß der zu untersuchende Ionenkanal anhand seines elektrischen Verhaltens und seiner pharmakologischen Eigenschaften identifiziert werden. Auf diese Weise wurden Cl^- -selektive Kanäle aus dem elektrischen Organ von Zitterrochen^[206, 207], K^+ -selektive Kanäle aus dem sarcoplasmatischen Reticulum^[208–211] und aus Nervenendigungen^[212, 213], Calcium-aktivierte K^+ -Kanäle aus Muskeln^[214, 215] sowie Na^+ -selektive Kanäle aus Nerven^[216, 217] in künstliche Lipidmembranen eingebaut.

Mit Hilfe hochempfindlicher Strom-Messungen (Abschnitt 5.1) können die elektrischen Eigenschaften einzelner Ionenkanäle nach Einbau in die künstliche Membran

studiert werden (Abb. 21). Durch derartige „Rekonstitutionsexperimente“ ist es möglich, Ionenkanäle auch in solchen Fällen einer Einzelkanal-Analyse zugänglich zu machen, in denen Experimente *in situ* wegen einer ungünstigen Zellgeometrie unmöglich sind. Dies trifft z. B. bei den in Abbildung 21 wiedergegebenen Strommessungen an spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen aus Nervenendigungen zu^[218]. Experimente mit künstlichen Membransystemen werden voraussichtlich in Zukunft eine zunehmende Bedeutung bei der Untersuchung strukturell modifizierter Ionenkanäle gewinnen.

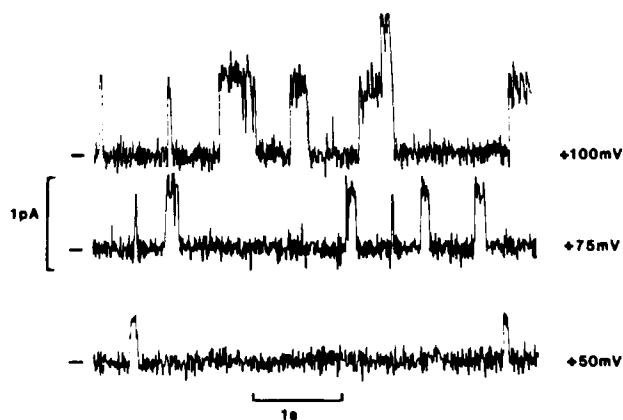


Abb. 21. Einzelkanalströme durch Ca^{2+} -Kanäle aus Nervenendigungen bei drei Membranpotenzialen [218]. Die Ionenkanäle wurden aus Nervenmembran-Vesikeln durch Fusion in planare Lipidmembranen eingebaut. Die Wahrscheinlichkeit des spontanen Öffnens und Schließens der Ionenkanäle hängt von der Spannung ab. Das dem geschlossenen Kanal entsprechende Grundniveau des Stromes ist durch eine horizontale Marke gekennzeichnet. Die Kanäle sind für Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} durchlässig; das Außenmedium enthält 0.25 M BaCl_2 .

7. Ionentransport

Die bisher besprochenen Ionencarrier und Ionenkanäle sind rein passive Transportsysteme; hier tritt ein Netto-transport nur dann auf, wenn über der Membran als treibende Kraft eine Differenz des elektrochemischen Potentials $\Delta\bar{\mu}$ des permeablen Ions vorhanden ist. $\Delta\bar{\mu}$ kann dabei in einer Konzentrationsdifferenz und/oder einer elektrischen Potentialdifferenz bestehen. Darüber hinaus enthalten die meisten biologischen Membranen aktive Transportsysteme, welche imstande sind, Ionen unter Ausnutzung einer Energiequelle gegen das Gefälle des thermodynamischen Potentials zu transportieren. Je nach der Art der Energiequelle können verschiedene Typen von aktivem Transport unterschieden werden. Bei den sekundären aktiven Transportsystemen wird der „bergauf“-Transport einer zweiten Substanz durch Kopplung an den „bergab“-Transport einer zweiten Substanz thermodynamisch ermöglicht. Im folgenden soll nur von primären aktiven Ionentransportsystemen („Ionentransporter“) die Rede sein, die als Energiequellen Licht, Redoxprozesse oder die freie Energie der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) verwenden.

7.1. Licht-getriebener Protonentransport: Bacteriorhodopsin

Halobakterien haben in ihrer Zellmembran Bacteriorhodopsin, ein Protein der Molmasse 26 000 g/mol, das Reti-

nal als Chromophor enthält und als Licht-getriebene Protonenpumpe wirkt^[219, 220]. Bacteriorhodopsin ist in Form inselartiger Bezirke, die zweidimensionale Proteingitter sind, in die Bakterienzellmembran eingelagert. Diese Membranbezirke können als sogenannte Purpurmembran-Fragmente aus den Zellen isoliert werden. Nach Absorption eines Lichtquants durchläuft Bacteriorhodopsin einen Cyclus von Konformationen, in dessen Verlauf ein bis zwei Protonen aus dem Cytoplasma in das Außenmedium befördert werden. Am Ende des Cyclus (nach etwa 10 ms) liegt das Protein wieder im Ausgangszustand vor.

Die einzelnen Zustände, die das Protein während des Reaktionszyklus durchläuft, wurden zunächst spektroskopisch charakterisiert^[219]. So kann z. B. eine schnelle *trans*-/*cis*-Umlagerung des Retinals am Anfang des Cyclus nachgewiesen werden. Offen bleibt dabei allerdings, wie die spektroskopisch feststellbaren Übergänge mit den eigentlichen Transportschritten korreliert sind. Information über die Transportkinetik liefern Experimente, in denen Purpurmembran-Fragmente an eine planare Lipidmembran orientiert angelagert werden (Abb. 22)^[221-227]. Nach Laserpuls-Anregung bei 575 nm (Pulsdauer 10 ns) werden im äußeren Meßkreis transiente Stromsignale beobachtet, die von Ladungsverschiebungen in Bacteriorhodopsin herühren^[226]. Das erste auflösbare Stromsignal hat eine Zeitkonstante von $\tau_1 \approx 1 \mu\text{s}$ und entspricht einer Verschiebung positiver Ladung in der Purpurmembran von der extrazellulären zur cytoplasmatischen Seite, d. h. entgegengesetzt zur Richtung des stationären H^+ -Transports bei Dauerbelichtung. Dieses negative Stromsignal röhrt wahrscheinlich von einer Konformationsänderung des Proteins her^[226-232]. Dem negativen Signal folgen Ladungsverschiebungen in positiver Richtung (von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite) mit $\tau_2 \approx 20$, $\tau_3 \approx 60$ und $\tau_4 \approx 400 \mu\text{s}$. Aufgrund der pH-Abhängigkeit und der H/D-Isotopeneffekte können die einzelnen Ladungsverschiebungen den spektroskopisch nachgewiesenen Übergängen zugeordnet werden. Auf diese Weise kann aus den Amplituden der photoelektrischen Signale Information über die relativen Anteile der Einzelprozesse am gesamten Ladungstransport erhalten werden.

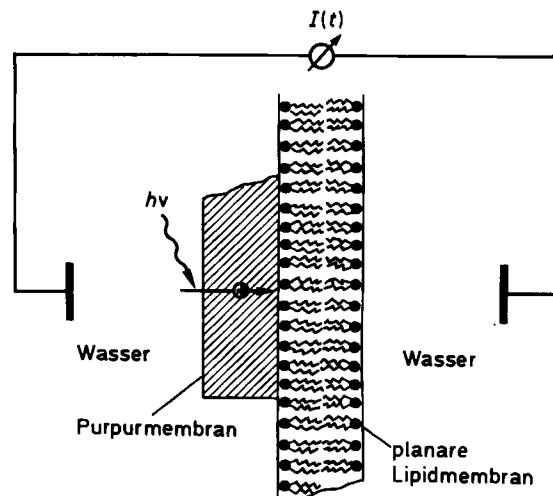


Abb. 22. Anordnung zur Durchführung photoelektrischer Experimente mit Bacteriorhodopsin [226]. Purpurmembran-Fragmente, die Bacteriorhodopsin in Form eines zweidimensionalen Gitters enthalten, lagern sich nach Zugabe zur wäßrigen Phase mit der extrazellulären Seite an die Lipid-Doppelschichtmembran an. Ladungsverschiebungen in Bacteriorhodopsin nach Blitzlicht-Anregung lassen sich als Stromsignale im äußeren Meßkreis nachweisen.

7.2. Rekonstitution der Natrium-Kalium-Pumpe

Die meisten tierischen Zellen sind imstande, im Cytoplasma eine gegenüber dem Außenmedium stark erhöhte K⁺-Konzentration und eine stark erniedrigte Na⁺-Konzentration aufrechtzuerhalten. Den aktiven Transport von Na⁺- und K⁺-Ionen bewirkt ein in die Zellmembran eingelagertes Protein, die Na,K-ATPase, die unter ATP-Spaltung K⁺ ins Cytoplasma und Na⁺ ins extrazelluläre Medium transportiert^[233-235]. Unter physiologischen Bedingungen werden bei Spaltung eines ATP-Moleküls drei Na⁺-Ionen nach außen und zwei K⁺-Ionen nach innen befördert. Die Na,K-Pumpe ist also (ebenso wie Bacteriorhodopsin) elektrogen, d.h. der Pumpvorgang ist mit einem Netto-Ladungstransport verknüpft. Mit Hilfe von Detergentien kann die Na,K-ATPase aus der Zellmembran isoliert werden. Sie besteht aus einer α- ($M \approx 110000$ g/mol) und einer β-Untereinheit ($M \approx 40000$ g/mol) und liegt in der Membran wahrscheinlich als Dimer $\alpha_2\beta_2$ vor.

Eine Rekonstitution der Na,K-Pumpe in planaren Lipidmembranen ist bisher nicht gelungen. Es ist jedoch möglich, die Na,K-ATPase in funktioneller Form in Lipidvesikeln einzubauen^[236-246]. Solubilisiert man das Protein in Detergents (Cholat) und entfernt das Detergent nach Zugabe eines Phospholipids (Phosphatidylcholin) durch Dialyse, so bilden sich einschalige Lipidvesikel, welche das Protein in der Membran eingebaut enthalten (Abb. 23). Während in der Zellmembran die Na,K-ATPase stets mit der ATP-Bindungsstelle zum Cytoplasma hin orientiert ist, kommen in den rekonstituierten Vesikeln beide Orientierungen vor. Bei Zugabe von ATP zum Außenmedium werden nur diejenigen ATPase-Moleküle aktiviert, die mit der ATP-Bindungsstelle nach außen orientiert sind (Abb. 23).

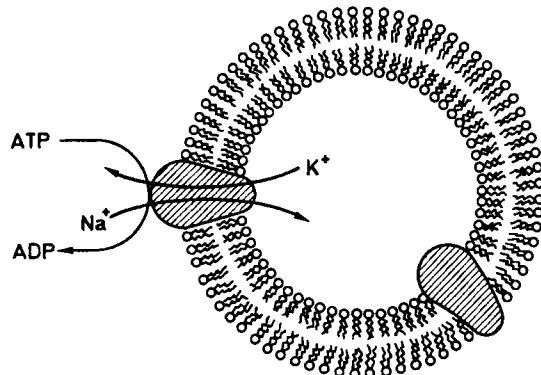


Abb. 23. Rekonstitution der Na,K-Pumpe in künstlichen Lipidvesikeln [246]. Protein-haltige Lipidvesikel bilden sich spontan, wenn aus einer wäßrigen Mischung von Protein, Lipid und Detergent durch Dialyse entfernt wird. Der Außendurchmesser der Vesikel beträgt etwa 90 nm. Bei Zugabe von ATP zum Außenmedium werden nur diejenigen ATPase-Moleküle aktiviert, die mit der ATP-Bindungsstelle nach außen orientiert sind.

Im rekonstituierten System kann man die Zusammensetzung beider wäßriger Phasen und der Membran leicht variieren; dadurch werden eine Reihe von Experimenten möglich, die mit ganzen Zellen nicht oder nur schwer durchführbar sind. Insbesondere kann man die ATP-getriebenen Flüsse von Na⁺ und K⁺ in einem weiten Bereich der Konzentration von ATP, Adenosindiphosphat (ADP), P_i, K⁺

und Na⁺ messen und so Information über den Transportmechanismus erhalten. Zur Messung des Na⁺- und K⁺-Flusses kann man radioaktive Ionen verwenden. Die Zeitauflösung der Isotopenmethode, die durch den Zeitbedarf für die Probenentnahme limitiert ist, ist allerdings gering. Eine wesentlich bessere Zeitauflösung erzielt man mit einem kürzlich entwickelten optischen Verfahren^[246]. Hierbei wird die K⁺-Innenkonzentration der Vesikel über das Nernst-Potential verfolgt. Macht man die Vesikelmembran durch Zugabe von Valinomycin selektiv permeabel für K⁺, so stellt sich über der Membran eine elektrische Spannung (das Nernst-Potential U) ein, welche vom Verhältnis der K⁺-Konzentrationen außen und innen ($c_K^{\text{a}}/c_K^{\text{i}}$) abhängt [Gl. (5)].

$$U = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_K^{\text{a}}}{c_K^{\text{i}}} \quad (5)$$

R ist die Gaskonstante, T die absolute Temperatur und F die Faraday-Konstante. Da man in eine 100 nm große Vesikel keine Elektrode einführen kann, muß man die Spannung U indirekt messen. Hierzu baut man in die Vesikelmembran einen Fluoreszenzfarbstoff ein, dessen Absorptions- und Emissionseigenschaften vom elektrischen Feld in der Membran abhängen^[247]. Mit einer Eichung bei bekanntem Konzentrationsverhältnis $c_K^{\text{a}}/c_K^{\text{i}}$ kann die Membranspannung U aus der gemessenen Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Bei dem in Abbildung 24 wiedergegebenen Experiment wurde zur Zeit t=0 dem Außenmedium ATP zugesetzt. Aus der zeitlichen Veränderung der Membranspannung U kann mit Hilfe von Gleichung (5) bei gegebenem c_K^{a} der Zeitverlauf der K⁺-Innenkonzentration, und damit der ATP-getriebene K⁺-Fluß ermittelt werden^[246].

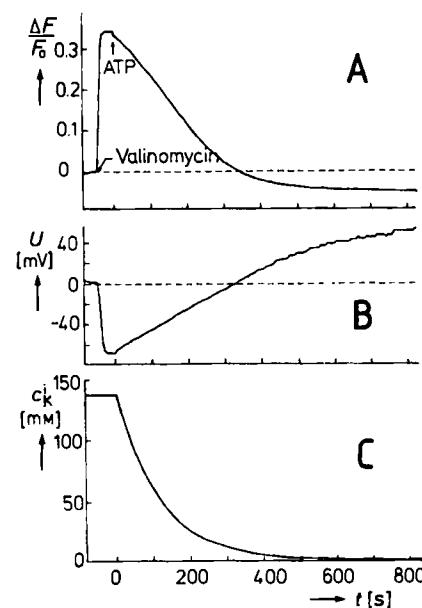


Abb. 24. Optische Messung des ATP-getriebenen Transports von K⁺ in künstliche Lipidvesikel [246]. Die einzelne Vesikel enthält im Mittel drei bis fünf mit der ATP-Bindungsstelle nach außen orientierte Na,K-ATPase-Moleküle. Die Anfangskonzentrationen im Innen- und Außenmedium waren $c_{Na}^{\text{a}} = 10 \text{ mM}$, $c_K^{\text{a}} = 140 \text{ mM}$, $c_{Na}^{\text{i}} = 140 \text{ mM}$, $c_K^{\text{i}} = 10 \text{ mM}$. Zur Zeit t=0 wurden 250 μM ATP außen zugegeben. A: relative Fluoreszenzänderung $\Delta F/F_0$ des Farbstoffs (1,3,3,1',3'-Hexamethylindodicarbocyanin); B: Membranspannung U; C: K⁺-Innenkonzentration c_K . T = 16°C.

8. Theoretische Konzepte zur Beschreibung des Ionentransports durch Kanäle

Zur mikroskopischen Beschreibung des Ionendurchtritts durch Kanäle führt man das Potentialprofil des Ions entlang des Transportweges ein, das aus einer Folge von Potentialminima und -maxima besteht. Potentialminima liegen an den Stellen, an denen das Ion in energetisch günstiger Weise von Ligandenatomen umgeben ist. Auf diese Weise kann der Transport eines Ions durch den Kanal als eine Serie von thermisch angeregten Sprüngen über Energiebarrieren beschrieben werden^[173-175, 248]. Entsprechend der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten ist die Geschwindigkeitskonstante k' für Sprünge über eine Energiebarriere der Höhe E näherungsweise durch

$$k' = v \cdot \exp(-E/kT) \quad (6)$$

gegeben. $v \approx 10^{12}-10^{13} \text{ s}^{-1}$ ist die Oszillationsfrequenz des Ions im Potentialminimum und k die Boltzmann-Konstante. Aus den Geschwindigkeitskonstanten der Sprünge über die einzelnen Barrieren kann die Gesamtgeschwindigkeit des Transports durch den Kanal auf einfache Weise berechnet werden^[173].

8.1. Kanäle mit multiplen Konformationen; Beziehung zwischen Carrier- und Kanalmechanismen

Die traditionelle Anwendung der Theorie absoluter Reaktionsgeschwindigkeiten beruht auf der Annahme, daß das Potentialprofil des Kanals fest vorgegeben ist, d. h. unabhängig ist von der Zeit und von der Bewegung des Ions im Kanal. Diese Vorstellung entspricht einem rein statischen Bild der Kanalstruktur. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß Proteine viele Konformationen annehmen können und bei physiologischen Temperaturen schnell vom einen zum anderen Zustand übergehen^[249, 250]. Evidenz für die dynamische Natur der Proteinstruktur ergibt sich aus Röntgenbeugungs- und Mössbauer-Untersuchungen^[251, 252], Fluoreszenzdepolarisations-Experimenten^[253] und Kernresonanzmessungen^[254]. Diese und andere Untersuchungen zeigen, daß die Zeitskala der inneren Bewegungen von Proteinen einen extrem weiten Bereich, zwischen Pikosekunden und Sekunden, umfaßt.

Von besonderem Interesse ist das Auftreten einer Kopplung zwischen Konformationsübergängen des Kanalproteins und Ionenbewegungen im Kanal^[255-258]. Eine derartige Kopplung kann sich z. B. aus der elektrostatischen Wechselwirkung des Ions mit dem Ligandsystem ergeben. Wenn ein Ion in eine Bindungsstelle springt, führt das starke Coulombfeld des Ions im allgemeinen zu einer Reorientierung der benachbarten Ligandendipole; Kopplung zwischen Ionenbewegung und Konformationsübergängen tritt dann ein, wenn der Zeitbedarf für den Konformationsübergang vergleichbar oder größer ist als die mittlere Verweilzeit des Ions in der Bindungsstelle. In diesem Fall hängt die Kanalleitfähigkeit von den Geschwindigkeitskonstanten der Konformationsübergänge ab^[256-258].

In dem in Abbildung 25 dargestellten Beispiel wird ein Kanal mit einer einzelnen Bindungsstelle betrachtet, die durch zwei geschwindigkeitsbestimmende Barrieren von den wäßrigen Außenphasen getrennt ist. Die Konforma-

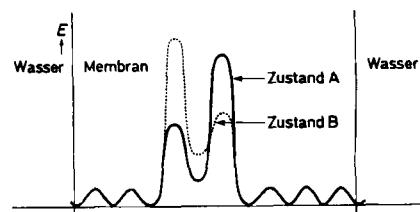


Abb. 25. Potentialprofil eines Ions in einem Kanal, der zwischen zwei Konformationen A und B fluktuiert. Der Kanal hat eine einzelne (wesentliche) Bindungsstelle, die durch geschwindigkeitsbestimmende Barrieren von den wäßrigen Kanalmündungen getrennt ist. An den Kanalmündungen befinden sich weitere niedrigere (nicht geschwindigkeitsbestimmende) Energiebarrieren.

tion des Kanalproteins soll zwischen zwei Zuständen A und B fluktuieren, die verschiedene Potentialprofile aufweisen. A könnte der bei unbesetzter Bindungsstelle bevorzugte Normalzustand des Kanals sein, B der bei besetzter Bindungsstelle bevorzugte „polarisierte“ Zustand. Für die Abhängigkeit der mittleren Leitfähigkeit Λ von der Ionenkonzentration c erhält man

$$\Lambda(c) = \frac{z^2 e_0^2}{kT} \cdot \frac{\alpha c + \beta c^2}{\gamma + \delta c + \varepsilon c^2} \quad (7)$$

z ist die Wertigkeit des Ions, e_0 die Elementarladung^[256], α , β , γ , δ und ε sind konzentrationsunabhängige Kombinationen der Geschwindigkeitskonstanten für die Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen des Kanals. Die Kanalleitfähigkeit ist somit eine nicht-lineare, quadratische Funktion der Ionenkonzentration c . Für einen Kanal mit einem einzigen Platz und starrem Potentialprofil sagt die Theorie dagegen ein einfaches Sättigungsverhalten voraus [Gl. (8)]^[173].

$$\Lambda(c) = \frac{z^2 e_0^2}{kT} \cdot \frac{pc}{q + rc} \quad (8)$$

p , q , und r sind konzentrationsunabhängige Konstanten. Abweichungen von dem durch Gleichung (8) vorausgesagten Verhalten werden gewöhnlich durch die Annahme einer Wechselwirkung von Ionen im Kanal oder die Existenz regulatorischer Ionenbindungsstellen gedeutet. In dem hier betrachteten Fall eines Kanals mit Konformationsfluktuationen beruht das Auftreten der quadratischen Terme in Gleichung (7) auf der Kopplung zwischen Ionentransport und Konformationsübergängen.

Eine besonders starke Kopplung tritt ein, wenn im einen Konformationszustand die Barriere nach rechts sehr hoch ist (Bindungsstelle hauptsächlich von links her zugänglich), im anderen Konformationszustand die Barriere nach links (Abb. 26). Hier ist in jedem der beiden Einzelzustände die Kanalleitfähigkeit verschwindend klein; ein Ionentransport wird jedoch möglich durch die in Abbildung 26 dargestellte cyclische Folge von Ionsprüngen und Konformationsübergängen, wobei die Bindungsstelle abwechselnd nach links und nach rechts exponiert wird^[257, 259-261]. In diesem Fall nähert sich der Kanal in seinen kinetischen Eigenschaften einem Carrier. Dies bedeutet, daß Carrier- und Kanalmechanismen nicht streng unterschieden werden können. Carrier-artiges Verhalten und das Verhalten von Kanälen mit fixierter Struktur sind eher als Grenzfälle eines allgemeinen Transportmechanismus

aufzufassen, der einem Kanal mit multiplen Konformationszuständen entspricht.

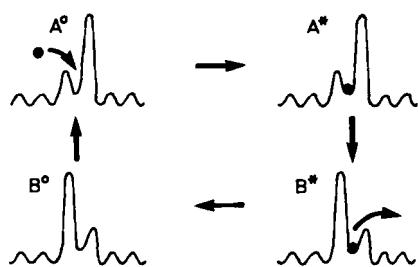


Abb. 26. Carrier-artiges Verhalten eines Ionenkanals. In der Konformation A ist die Barriere nach rechts sehr hoch (Bindungsstelle hauptsächlich von links her zugänglich), in der Konformation B die Barriere nach links. Im Laufe des Cyclus $A^{\circ} \rightarrow A^* \rightarrow B^* \rightarrow B^{\circ} \rightarrow A^{\circ}$ wird ein Ion von links nach rechts transferiert.

8.2. Energie-getriebene cyclische Konformationsübergänge: Ionenpumpen

Das Konzept eines Kanals mit multiplen Konformationszuständen kann auch auf die Beschreibung des aktiven Ionentransports angewendet werden. Ein Ionenkanal wirkt als Pumpe, wenn das Potentialprofil in geeigneter Weise durch eine energieliefernde Reaktion vorübergehend modifiziert wird^[259-263]. Absorption eines Lichtquants oder Phosphorylierung des Kanalproteins kann die Affinität einer Ionenbindungsstelle und zugleich die Höhe benachbarter Energiebarrieren verändern. Auf diese Weise kann ein Ion aus der Bindungsstelle vorzugsweise nach der einen Seite abgegeben werden, während bei der Rückkehr zum Ausgangszustand des Proteins ein anderes Ion von der gegenüberliegenden Seite in die Bindungsstelle eintritt.

Als Beispiel ist in Abbildung 27 das Minimalmodell einer durch ATP-Hydrolyse getriebenen Protonenpumpe dargestellt (derartige H^+ -Transport-ATPasen sind z.B. in Pflanzenzellmembranen nachgewiesen worden^[264, 265]). Im dephosphorylierten Zustand (HC) der Pumpe ist eine von der linken (cytoplasmatischen) Seite her zugängliche Bindungsstelle mit einem Proton besetzt. Phosphorylierung bringt das Pumpmolekül in den Zustand HE, in welchem die Energiebarrieren so verändert sind, daß das Proton bevorzugt nach der rechten (extrazellulären) Seite abgegeben wird. Nach der Dissoziation von H^+ wird das Protein dephosphoryliert, wobei es wieder die Konformation C annimmt, die eine niedrigere Barriere nach der cytoplasmatischen Seite hin aufweist. Der Ausgangszustand HC wird durch Bindung von H^+ von der cytoplasmatischen Seite wiederhergestellt. Im Verlaufe des Cyclus $HC \rightarrow HE \rightarrow E \rightarrow C \rightarrow HC$ wird ein Proton vom Cytoplasma zum extrazellulären Medium transportiert.

Die ATP-getriebene Ionenpumpe ist also eine thermodynamische „Maschine“, welche die freie Enthalpie der Reaktion $ATP \rightarrow ADP + P_i$ zum Aufbau eines Konzentrationsgradienten (und/oder eines elektrischen Potentialgradienten) verwendet. Für einen maximalen Wirkungsgrad der Energieumwandlung müssen zwei Bedingungen erfüllt sein. Die Energiebarrieren beidseits der Bindungsstelle müssen sehr verschieden hoch sein, so daß das Ion nicht nach der „falschen“ Seite die Bindungsstelle verlassen kann. Ferner darf eine spontane Dephosphorylierung (Ab-

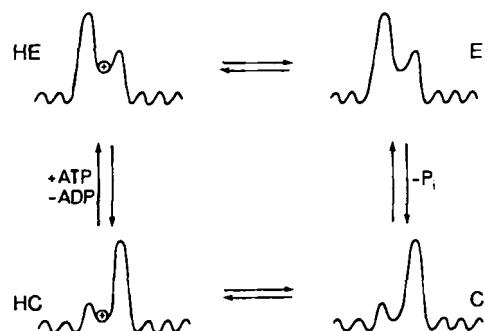


Abb. 27. Minimalmodell für eine durch ATP-Hydrolyse getriebene Protonenpumpe. Im dephosphorylierten Zustand (HC/C) der Pumpe ist die Protonenbindungsstelle von der linken (cytoplasmatischen) Seite zugänglich, im phosphorylierten Zustand (HE/E) von der rechten (extrazellulären) Seite. Im Verlaufe des Cyclus $HC \rightarrow HE \rightarrow E \rightarrow C \rightarrow HC$ wird ein Proton vom Cytoplasma zum extrazellulären Medium transportiert (Abkürzungen siehe Text).

spaltung von P_i vom phosphorylierten Protein) nur im deprotonierten Zustand E, nicht aber im protonierten Zustand HE stattfinden. Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, kann die freie Enthalpie ΔG der ATP-Hydrolyse völlig in osmotische und elektrische Energie umgewandelt werden. Da mit einem Protonentransport auch ein Ladungstransport verbunden ist, hängt das maximal mögliche Konzentrationsverhältnis $[H^+]_e/[H^+]_c$ von der Membranpotential $U = \psi_e - \psi_c$ ab (die Indices e und c beziehen sich auf die cytoplasmatische bzw. extrazelluläre Seite; ψ ist das elektrische Potential). Für eine Protonenpumpe mit einem stöchiometrischen Verhältnis von $1 H^+ : 1 ATP$ ist das maximal mögliche Konzentrationsverhältnis gegeben durch

$$\frac{[H^+]_e}{[H^+]_c} = \exp\left(\frac{UF - \Delta G}{RT}\right) \quad (9)$$

Mit $\Delta G \approx -50 \text{ kJ/mol}$ und $U = -0.1 \text{ V}$ berechnet sich $[H^+]_e/[H^+]_c$ zu 10^7 . Die tatsächlich beobachteten Werte von $[H^+]_e/[H^+]_c$ liegen wesentlich niedriger als der thermodynamische Maximalwert; dies ist auf die Existenz paralleler, passiver Transportwege für H^+ in der Membran sowie auf eine unvollständige Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und Protonentransport zurückzuführen.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Die Grundstruktur biologischer Membranen ist eine Doppelschicht aus orientierten Lipidmolekülen, die für Ionen nahezu undurchlässig ist. Der Ionendurchtritt durch die Membran ist an spezialisierte Transportmoleküle gebunden, die in die Lipidschicht eingelagert sind. Bei den möglichen Transportmechanismen kann man zwischen zwei Grenzfällen unterscheiden: Transport durch Ionencarrier und Ionenkanäle. Ein Carrier ist ein Transportmolekül mit einer Bindungsstelle für das zu transportierende Ion, die (aufgrund einer Konformationsänderung oder einer Bewegung des Carriers relativ zur Membran) abwechselnd von der einen und der anderen Seite der Membran her zugänglich ist, aber nicht von beiden Seiten gleichzeitig. Ein Ionenkanal ist dagegen ein Transmembran-Transportweg, der gleichzeitig nach beiden Seiten hin offen ist. Der Ionendurchtritt durch einen Kanal kann mit Konfor-

mationsänderungen des Kanalproteins verbunden sein; auf diese Weise kann ein Ionenkanal in seinen kinetischen Eigenschaften einem Carrier ähneln. Da die Membrandicke nur etwa 5 nm beträgt, ist die elektrische Feldstärke in der Membran bei physiologischen Werten der Membranspannung (≈ 0.1 V) sehr hoch (Größenordnung 10^7 V/m). Bei der Nervenerregung kann über feldinduzierte Konformationsänderungen die Permeabilität von Ionenkanälen gesteuert werden.

Carrier und Kanäle sind passive Transportwege; ein Netto-Ionentransport tritt hier nur dann auf, wenn das elektrochemische Potential des Ions auf beiden Seiten der Membran verschieden ist. Aktive Transportsysteme sind dagegen in der Lage, unter Ausnutzung einer Energiequelle Ionen entgegen dem Gefälle des thermodynamischen Potentials zu transportieren. Im Falle der „primären“ aktiven Ionentransportsysteme („Ionenpumpen“) stammt die Energie aus der Hydrolyse von ATP oder der Absorption von Licht. Die Funktionsweise aktiver Ionentransportsysteme, z.B. der Na,K-Pumpe, ist heute erst unvollständig bekannt; eine Reihe von Experimenten legt den Schluß nahe, daß das Transportprotein einen (energieliebenden) Cyclus von Konformationen durchläuft, in dessen Verlauf das zu transportierende Ion von der einen Seite gebunden und in einem späteren Schritt nach der anderen Seite abgegeben wird.

Bei der Untersuchung biologischer Ionentransportssysteme haben sich künstliche Lipidmembranen als wertvoll erwiesen. Planare Lipid-Doppelschichtmembranen können aus chemisch einheitlichen Lipiden mit Flächen zwischen $10 \mu\text{m}^2$ und 10 mm^2 in wäßriger Umgebung hergestellt werden. Nach Einbau biologischer Ionentransportssysteme in die künstliche Membran können die elektrischen Eigenschaften der Transportsysteme unter definierten Bedingungen studiert werden. Am besten untersucht worden sind bisher kleine bis mittelgroße Transportmoleküle, die als Ionencarrier oder -kanäle wirken. Für den K⁺-spezifischen Carrier Valinomycin ergeben sich aus elektrischen Relaxationsexperimenten Transportgeschwindigkeiten von 10^4 – 10^5 s⁻¹ pro Einzelmolekül. Die Geschwindigkeit der einzelnen Transportschritte hängt stark von der Struktur des Membranlipids ab.

Wesentlich höhere Transportgeschwindigkeiten als bei Carriern (10^7 – 10^8 s⁻¹) werden bei Ionenkanälen beobachtet. Eine Modellverbindung, mit deren Hilfe der Mechanismus des Ionentransports durch Kanäle untersucht werden kann, ist Gramicidin A, ein hydrophobes Pentadecapeptid, das aus *Bacillus subtilis* isoliert wurde. Gramicidin A bildet in Lipidmembranen helicale Kanäle, die durch Kopf-an-Kopf-Anlagerung zweier Monomere entstehen. Entlang der Helixachse befindet sich ein „Tunnel“ von 0.4 nm Durchmesser, der durch Carbonyl-Sauerstoffatome ausgekleidet ist. Der Gramicidin-Kanal ist für kleine einwertige Kationen (Alkalimetall-Ionen, NH₄⁺, H₃O⁺) gut durchlässig. Wegen der hohen Transportraten ist es möglich, durch empfindliche Strommessungen Bildung und Zerfall einzelner Gramicidin-Kanäle direkt nachzuweisen. Untersuchungen am Gramicidin-Kanal bieten die Möglichkeiten, die Beziehung chemischer Struktur und Transporteigenschaften eines Ionenkanals im Detail zu studieren. Gramicidin-Analoga mit modifizierter Aminosäuresequenz zeigen Änderungen in der Transportrate und der Io-

nenspezifität. Durch Einführung elektrisch geladener Reste an den Kanalmündungen können Ionenkanäle mit Gleichrichtereigenschaften erhalten werden.

Heute stehen Methoden zur Verfügung, die es ermöglichen, auch größere Membranproteine, z.B. Ionenkanäle aus Nervenmembranen oder Ionenpumpen, in künstliche Lipidmembranen einzubauen. Damit können einige der Meßtechniken, die bisher auf kleinere Transportmoleküle mit Erfolg angewendet wurden, auf die Untersuchung dieser komplizierten Transportsysteme übertragen werden. Aussichtsreich erscheint insbesondere auch die Möglichkeit, auf dem Wege der zellfreien Proteinsynthese Membranproteine direkt in künstliche Lipidmembranen zu inkorporieren. Durch gentechnologische Modifikation können Transportproteine erhalten werden, bei denen eine Aminosäure an einer bestimmten Stelle der Sequenz durch eine andere Aminosäure ersetzt ist. Die funktionelle Charakterisierung dieser modifizierten Transportproteine dürfte wesentliche Beiträge zum Verständnis biologischer Ionentransportmechanismen liefern.

Die in diesem Beitrag dargestellten Ergebnisse beruhen auf den Arbeiten zahlreicher Kollegen und Mitarbeiter. Mein Dank gilt insbesondere H. Alpes, H.-J. Apell, E. Bamberg, R. Benz, A. Fahr, E. Frehland, K. Janko, H.-A. Kolb, M. Marcus, G. Stark und W. Stephan. Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und durch den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Eingegangen am 19. November 1984 [A 557]

- [1] P. J. Quinn, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 38 (1981) 1.
- [2] H.-J. Gallia, W. Hartmann, U. Theilen, E. Sackmann, *J. Membr. Biol.* 47 (1979) 215.
- [3] R. I. Cherry, *Biochim. Biophys. Acta* 559 (1979) 289.
- [4] T. Hanai, D. A. Haydon, T. Taylor, *J. Gen. Physiol.* 48 (1965) 59.
- [5] P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 57 (1980) 163.
- [6] A. Maelicke, *Angew. Chem.* 96 (1984) 193; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 195.
- [7] B. Hille, *Ionic Channels*, Sinauer, Sunderland, MA 1984.
- [8] M. Montal, A. Darszon, H. Schindler, *Q. Rev. Biophys.* 14 (1981) 1.
- [9] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. D. Wescot, *Nature London* 194 (1962) 979.
- [10] M. Montal, P. Mueller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 3561.
- [11] V. Vodyanoy, P. Halverson, R. B. Murphy, *J. Colloid Interface Sci.* 88 (1982) 247.
- [12] V. Vodyanoy, R. B. Murphy, *Biochim. Biophys. Acta* 687 (1982) 189.
- [13] J. E. Hall, R. Latorre, *Biophys. J.* 15 (1976) 99.
- [14] O. Fröhlich, *J. Membr. Biol.* 48 (1979) 365, 385.
- [15] R. Benz, O. Fröhlich, P. Läuger, M. Montal, *Biochim. Biophys. Acta* 394 (1975) 323.
- [16] U. Wilmsen, C. Methfessel, W. Hanke, G. Boheim in G. Spach (Hrsg.): *Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions*, Elsevier, Amsterdam 1983.
- [17] W. Hanke, C. Methfessel, U. Wilmsen, G. Boheim, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 12 (1984) 329.
- [18] R. Coronado, R. Latorre, *Biophys. J.* 43 (1983) 231.
- [19] B. A. Suarez-Isla, K. Wan, J. Lindstrom, M. Montal, *Biochemistry* 22 (1983) 2319.
- [20] T. Schuerholz, H. Schindler, *FEBS Lett.* 152 (1983) 187.
- [21] A. D. Bangham (Hrsg.): *Liposome Letters*, Academic Press, New York 1983.
- [22] C. G. Knight (Hrsg.): *Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications*, Elsevier, Amsterdam 1981.
- [23] H.-J. Apell, M. M. Marcus, B. M. Aner, H. Oetliker, P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 85 (1985) 49.
- [24] J. H. Fendler: *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley, New York 1982.
- [25] A. K. Akimoto, L. Dorn, H. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* 93 (1981) 108; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 90.
- [26] J.-H. Fuhrhop, J. Mathieu, *Angew. Chem.* 96 (1984) 124; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 100.
- [27] Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. M. Shkrob: *Membrane-Active Complexones*, Elsevier, Amsterdam 1974.

- [28] W. Burgermeister, R. Winkler-Oswatitsch, *Top. Curr. Chem.* 69 (1977) 91.
- [29] E. Grell, T. Funk, F. Eggers in G. Eisenman (Hrsg.): *Membranes - A Series of Advances*, Vol. 3, Dekker, New York 1975, S. 1.
- [30] E. Grell, I. Oberbäumer in R. Rigler, I. Pecht (Hrsg.): *Chemical Relaxation in Molekular Biology*, Springer, Berlin 1976.
- [31] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, V. V. Antonov, E. I. Vinogradova, A. M. Shkrob, G. G. Malenkov, A. V. Estratov, I. A. Laine, E. I. Melnik, I. D. Ryabova, *J. Membr. Biol.* 1 (1969) 402.
- [32] M. Pinkerton, L. K. Steinrauf, P. Dawkins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35 (1969) 512.
- [33] K. Neupert-Laves, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* 58 (1975) 432.
- [34] G. D. Smith, W. O. Duax, D. A. Langs, G. T. DeTitta, G. W. Edmonds, D. C. Rohrer, C. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 7242.
- [35] I. L. Karle, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 4379.
- [36] J. A. Hamilton, M. N. Sabesan, L. K. Steinrauf, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5880.
- [37] V. T. Ivanov, I. A. Laine, N. D. Abdullaev, L. B. Senyavina, E. M. Popov, Yu. A. Ovchinnikov, M. M. Shemyakin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34 (1969) 803.
- [38] D. H. Haynes, A. Kowalsky, B. C. Pressman, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 502.
- [39] M. Onishi, D. W. Urry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36 (1969) 194.
- [40] E. Grell, F. Eggers, T. Funck, *Chimia* 26 (1972) 632.
- [41] T. Funck, F. Eggers, E. Grell, *Chimia* 26 (1972) 637.
- [42] E. Grell, T. Funck, H. Sauter, *Eur. J. Biochem.* 34 (1973) 415.
- [43] D. J. Patel, A. E. Tonelli, *Biochemistry* 12 (1973) 486.
- [44] D. J. Patel, *Biochemistry* 12 (1973) 496.
- [45] N. L. Max, *Biopolymers* 12 (1973) 1565.
- [46] E. Grell, F. Eggers, T. Funck, *J. Supramol. Struct.* 1 (1973) 307.
- [47] I. M. Asher, *Biopolymers* 16 (1977) 157.
- [48] H. W. Huang, C. R. Williams, *Biophys. J.* 33 (1981) 269.
- [49] H. Diebler, M. Eigen, G. Ilgenfritz, G. Maß, R. Winkler, *Pure Appl. Chem.* 20 (1969) 93.
- [50] M. Eigen, R. Winkler in F. O. Schmitt (Hrsg.): *The Neurosciences, Second Study Program*, Rockefeller University Press, New York 1970, S. 685.
- [51] P. B. Chock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 1939.
- [52] E. Grell, T. Funck, F. Eggers in E. Munoz, F. Garcia-Ferrandiz, D. Vasquez (Hrsg.): *Molecular Mechanism of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes*, Elsevier, Amsterdam 1972.
- [53] E. A. Liberman, V. P. Topaly, *Biochim. Biophys. Acta* 163 (1965) 125.
- [54] P. Mueller, D. O. Rudin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26 (1967) 398.
- [55] A. A. Lev, E. P. Buzhinsky, *Tsitolgiya* 9 (1967) 102.
- [56] T. E. Andreoli, M. Tiefenberg, D. C. Tosteson, *J. Gen. Physiol.* 50 (1967) 2527.
- [57] E. A. Liberman, V. P. Topaly, *Biochim. Biophys. Acta* 163 (1968) 125.
- [58] G. Eisenman, S. M. Ciani, G. Szabo, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27 (1968) 1289.
- [59] G. Stark, R. Benz, *J. Membr. Biol.* 5 (1971) 133.
- [60] G. Stark, B. Ketterer, R. Benz, P. Läuger, *Biophys. J.* 11 (1971) 981.
- [61] P. Läuger, *Science* 178 (1972) 24.
- [62] R. Benz, G. Stark, K. Janko, P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 14 (1973) 339.
- [63] R. Benz, G. Stark, *Biochim. Biophys. Acta* 382 (1975) 27.
- [64] R. Laprade, S. Ciani, G. Eisenman, G. Szabo in G. Eisenman (Hrsg.): *Membranes - A Series of Advances*, Vol. 3, Dekker, New York 1975, S. 127.
- [65] S. B. Hladky, *Biochim. Biophys. Acta* 375 (1975) 327.
- [66] S. W. Feldberg, G. Kissel, *J. Membr. Biol.* 20 (1975) 269.
- [67] W. Knoll, G. Stark, *J. Membr. Biol.* 25 (1975) 249.
- [68] R. Benz, P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 27 (1976) 171.
- [69] R. Benz, O. Fröhlich, P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 464 (1977) 465.
- [70] R. Benz, D. Cros, *Biochim. Biophys. Acta* 506 (1978) 265.
- [71] W. Knoll, G. Stark, *J. Membr. Biol.* 37 (1977) 13.
- [72] R. Benz, B. F. Gisin, *J. Membr. Biol.* 40 (1978) 293.
- [73] R. Benz, *J. Membr. Biol.* 43 (1978) 367.
- [74] H.-A. Kolb, P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 41 (1978) 167.
- [75] G. Stark, B. F. Gisin, *Biophys. Struct. Mech.* 6 (1979) 39.
- [76] W. Brock, G. Stark, P. C. Jordan, *Biophys. Chem.* 13 (1981) 329.
- [77] R. Latorre, J. J. Donavan, W. Koroshetz, D. C. Tosteson, B. F. Gisin, *J. Gen. Physiol.* 77 (1981) 387.
- [78] P. Läuger, R. Benz, G. Stark, E. Bamberg, P. C. Jordan, A. Fahr, W. Brock, *Q. Rev. Biophys.* 14 (1981) 513.
- [79] J.-Y. Lapointe, R. Laprade, *Biophys. J.* 39 (1982) 141.
- [80] B. Ketterer, B. Neumcke, P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 5 (1971) 225.
- [81] G. Schmidt, H. Eibl, W. Knoll, *J. Membr. Biol.* 70 (1982) 147.
- [82] R. Laprade, F. Grenier, J.-Y. Lapointe, S. Asselin, *J. Membr. Biol.* 68 (1982) 191.
- [83] M. Eigen, L. DeMayer in A. Weissberger (Hrsg.): *Techniques of Organic Chemistry*, Vol. 8, Teil 2, Interscience, New York 1963, S. 895.
- [84] R. Benz, *Dissertation*, Universität Konstanz 1972.
- [85] G. Stark in G. Giebisch, D. C. Tosteson, H. H. Ussing (Hrsg.): *Membrane Transport in Biology*, Vol. 1, Springer, Heidelberg 1978, S. 447.
- [86] R. Benz, P. Läuger, K. Janko, *Biochim. Biophys. Acta* 455 (1976) 701.
- [87] R. Benz, U. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta* 597 (1980) 637.
- [88] H. Staerk, G. Czerlinski, *Nature London* 205 (1965) 63.
- [89] H. Strehlow, R. N. Kalarickal, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 70 (1966) 139.
- [90] F. Gambale, A. Gliozzi, M. Robello, *Biochim. Biophys. Acta* 330 (1973) 325.
- [91] J. Sandblom, J. Hägglund, N. E. Erikson, *J. Membr. Biol.* 23 (1975) 1.
- [92] R. Benz, B. F. Gisin, H. P. Ting-Beall, D. C. Tosteson, P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 455 (1976) 665.
- [93] R. Latorre, J. J. Donavan, W. Koroshetz, D. C. Tosteson, B. F. Gisin, *J. Gen. Physiol.* 77 (1981) 387.
- [94] K. Janko, R. Benz, *Biochim. Biophys. Acta* 470 (1977) 8.
- [95] S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta* 318 (1973) 464.
- [96] S. G. A. McLaughlin, G. Szabo, G. Eisenman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67 (1970) 1268.
- [97] S. A. McLaughlin, *Curr. Top. Membr. Transp.* 9 (1977) 71.
- [98] R. Sarges, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 2011; 87 (1965) 2027; *Biochemistry* 4 (1965) 2491.
- [99] B. C. Pressman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53 (1965) 1076.
- [100] D. C. Tosteson, T. E. Andreoli, M. Tiefenberg, P. Cook, *J. Gen. Physiol.* 51 (1968) 373S.
- [101] G. Eisenman, J. Sandblom, E. Neher in B. Pullman, B. Goldblum (Hrsg.): *Metal-Ligand Interactions in Organic Chemistry and Biochemistry*, Teil 2, Reidel, Dordrecht 1977, S. 1.
- [102] V. P. Meyers, D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta* 274 (1972) 313.
- [103] S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta* 274 (1972) 294.
- [104] E. Bamberg, H. Alpes, H.-J. Apell, R. Benz, K. Janko, H.-A. Kolb, P. Läuger, E. Gros in G. Semenza, E. Carafoli (Hrsg.): *Biochemistry of Membrane Transport*, Springer, Berlin 1977, S. 179.
- [105] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. Sigworth, Pflügers, *Pflügers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* 391 (1981) 85.
- [106] E. Bamberg, K. Noda, E. Gross, P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 419 (1976) 223.
- [107] D. Busath, G. Szabo, *Nature London* 294 (1981) 371.
- [108] D. W. Urry, C. M. Venkatachalam, K. U. Prasad, R. J. Bradley, G. Parenti-Castelli, G. Lenaz, *Int. J. Quantum Chem. Quantum Biol. Symp.* 8 (1981) 385.
- [109] D. W. Urry, S. Alonso-Romanowski, C. M. Venkatachalam, R. D. Harris, K. U. Prasad, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 118 (1984) 885.
- [110] D. W. Urry, S. Alonso-Romanowski, C. M. Venkatachalam, T. L. Trapani, K. U. Prasad, *Biophys. J.* 46 (1984) 259.
- [111] D. A. Haydon, B. M. Hendry, S. R. Levinson, J. Requena, *Biochim. Biophys. Acta* 470 (1977) 17.
- [112] V. S. Rudnev, L. N. Ermishkin, L. A. Fonina, Yu. G. Rovin, *Biochim. Biophys. Acta* 642 (1981) 196.
- [113] H.-A. Kolb, E. Bamberg, *Biochim. Biophys. Acta* 454 (1977) 127.
- [114] E. Neher, H. Eibl, *Biochim. Biophys. Acta* 464 (1977) 37.
- [115] C. G. Pope, B. W. Urban, D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta* 688 (1982) 279.
- [116] J. R. Elliott, D. Needham, J. P. Dilger, D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta* 735 (1983) 95.
- [117] D. W. Urry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 672.
- [118] D. W. Urry, *Biochim. Biophys. Acta* 265 (1972) 115.
- [119] D. W. Urry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 1610.
- [120] G. N. Ramachandran, R. Chandrasekaran in S. Lande (Hrsg.): *Progress in Peptide Research*, Vol. 2, Gordon & Breach, New York 1972, S. 195; *Indian J. Biochem. Biophys.* 9 (1972) 1.
- [121] D. W. Urry, M. C. Godall, J. D. Glickson, D. F. Mayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 1907.
- [122] R. E. Koeppe II, K. O. Hodgson, L. Stryer, *J. Mol. Biol.* 121 (1978) 41.
- [123] R. E. Koeppe II, J. M. Berg, K. O. Hodgson, L. Stryer, *Nature London* 279 (1979) 723.
- [124] B. E. Isbell, C. Rice-Evans, G. H. Beaven, *FEBS Lett.* 25 (1972) 192.
- [125] D. W. Urry, J. D. Glickson, D. F. Mayers, J. Haider, *Biochemistry* 11 (1972) 487.
- [126] S. R. Byrn, *Biochemistry* 13 (1974) 5186.
- [127] W. R. Veatch, E. T. Fosset, E. R. Blout, *Biochemistry* 13 (1974) 5249.
- [128] W. R. Veatch, E. R. Blout, *Biochemistry* 13 (1974) 5257.
- [129] E. T. Fosset, W. R. Veatch, Yu. A. Ovchinnikov, E. R. Blout, *Biochemistry* 13 (1974) 5264.
- [130] F. Rondelez, J. D. Litster, *Biophys. J.* 27 (1979) 455.
- [131] S. V. Sychev, N. A. Nevskaia, St. Jordanov, E. N. Shepel, A. I. Miroshnikov, V. T. Ivanov, *Bioorg. Chem.* 9 (1980) 121.
- [132] S. V. Sychev, V. T. Ivanov in A. N. Martonosi (Hrsg.): *Membranes and Transport*, Vol. 2, Plenum, New York 1982, S. 301.
- [133] W. R. Veatch, R. Mathies, M. Eisenberg, L. Stryer, *J. Mol. Biol.* 99 (1975) 75.
- [134] S. Weinstein, B. A. Wallace, E. R. Blout, J. S. Morrow, W. R. Veatch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4230.

- [135] S. Weinstein, B. A. Wallace, J. S. Morrow, W. R. Veatch, *J. Mol. Biol.* 143 (1980) 1.
- [136] D. W. Urry, T. L. Trapani, K. U. Prasad, *Science* 221 (1983) 1064.
- [137] D. W. Urry, J. T. Walker, T. L. Trapani, *J. Membr. Biol.* 69 (1982) 225.
- [138] E. Bamberg, P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 11 (1973) 177.
- [139] E. Bamberg, P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 367 (1974) 127.
- [140] E. Bamberg, R. Benz, *Biochim. Biophys. Acta* 426 (1976) 570.
- [141] H.-J. Apell, E. Bamberg, H. Alpes, *J. Membr. Biol.* 50 (1979) 271.
- [142] G. Stark, M. Sträble, Z. Takacs, *J. Membr. Biol.*, im Druck.
- [143] H. P. Zingsheim, E. Neher, *Biophys. Chem.* 2 (1974) 197.
- [144] H.-A. Kolb, P. Läuger, E. Bamberg, *J. Membr. Biol.* 20 (1975) 133.
- [145] Yu. A. Ovchinnikov in S. G. van den Bergh (Hrsg.): *Federation of European Biochemical Societies. 8th Meeting, Vol. 28*, North Holland, Amsterdam 1972, S. 279.
- [146] M. C. Goodall, D. W. Urry, *Biochim. Biophys. Acta* 291 (1973) 317.
- [147] E. Bamberg, K. Noda, E. Gross, P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 419 (1976) 223.
- [148] H.-J. Apell, E. Bamberg, H. Alpes, P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 131 (1977) 171.
- [149] E. Bamberg, K. Janko, *Biochim. Biophys. Acta* 465 (1977) 486.
- [150] R. H. Tredgold, P. N. Hole, R. C. Sproule, M. Elgamal, *Biochim. Biophys. Acta* 513 (1978) 106.
- [151] W. R. Veatch, L. Stryer, *J. Mol. Biol.* 113 (1977) 89.
- [152] E. Bamberg, H.-J. Apell, H. Alpes, E. Gross, J. L. Morell, J. F. Harbough, K. Janko, P. Läuger, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 37 (1978) 2633.
- [153] D. W. Urry, R. J. Bradley, M. Onishi, *Nature London* 274 (1978) 382.
- [154] B. M. Henry, B. W. Urban, D. A. Hayson, *Biochim. Biophys. Acta* 513 (1978) 106.
- [155] G. Szabo, D. W. Urry, *Science* 203 (1979) 55.
- [156] J. S. Morrow, W. R. Veatch, L. Stryer, *J. Mol. Biol.* 132 (1979) 733.
- [157] F. Heitz, G. Spach, Y. Trudelle, *Biophys. J.* 40 (1982) 87.
- [158] J.-L. Mazet, O. S. Andersen, R. E. Koeppe II, *Biophys. J.* 45 (1984) 263.
- [159] K. Janko, J. Reinhardt, H.-J. Apell, H. Alpes, P. Läuger, E. Bamberg in V. H. Hruby, D. H. Rich (Hrsg.): *Peptides – Structure and Function*, Pierce Chemical Company, Rockford 1983.
- [160] R. J. Bradley, K. U. Prasad, D. W. Urry, *Biochim. Biophys. Acta* 649 (1981) 281.
- [161] E. Bamberg, H. Alpes, H.-J. Apell, R. Bradley, B. Härtter, M.-J. Quelle, D. W. Urry, *J. Membr. Biol.* 50 (1979) 257.
- [162] E. Bamberg, H.-J. Apell, H. Alpes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 2402.
- [163] H.-J. Apell, E. Bamberg, P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 552 (1979) 369.
- [164] E. Bamberg, P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 35 (1977) 351.
- [165] F. Heitz, C. Gavach, *Biophys. Chem.* 18 (1983) 153.
- [166] D. W. Urry, T. L. Trapani, J. T. Walker, K. U. Prasad, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 6659.
- [167] G. Eisenman, R. Horn, *J. Membr. Biol.* 76 (1983) 197.
- [168] D. W. Urry, *Int. J. Quantum Chem. Quantum Biol. Symp.* 2 (1975) 221.
- [169] P. A. Rosenberg, A. Finkelstein, *J. Gen. Physiol.* 72 (1978) 341.
- [170] A. Finkelstein, O. S. Andersen, *J. Membr. Biol.* 59 (1981) 155.
- [171] P. A. Rosenberg, A. Finkelstein, *J. Gen. Physiol.* 72 (1978) 327.
- [172] D. G. Levitt, S. R. Elias, J. M. Hautman, *Biochim. Biophys. Acta* 512 (1978) 436.
- [173] P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 311 (1973) 423.
- [174] B. Hille, W. Schwarz, *J. Gen. Physiol.* 72 (1978) 409.
- [175] H. Schröder, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 1997; *Biophys. Chem.* 20 (1984) 157.
- [176] A. Pullman, C. Etchebest, *FEBS Lett.* 163 (1983) 199.
- [177] C. Etchebest, C. Ranganathan, A. Pullman, *FEBS Lett.* 173 (1984) 301.
- [178] J. A. Dani, D. G. Levitt, *Biophys. J.* 35 (1981) 485, 501.
- [179] S. L. Fornili, D. P. Vercauteren, E. Clementi, *Biochim. Biophys. Acta* 771 (1984) 151.
- [180] D. H. J. Mackay, P. H. Behrens, K. R. Wilson, A. T. Hagler, *Biophys. J.* 46 (1984) 229.
- [181] D. G. Levitt, *Biophys. J.* 22 (1978) 209.
- [182] P. C. Jordan, *Biophys. Chem.* 13 (1981) 203; *Biophys. J.* 39 (1982) 157; 41 (1983) 189; *J. Membr. Biol.* 78 (1984) 91.
- [183] G. Eisenman, J. Sandblom, E. Neher, *Biophys. J.* 22 (1978) 307.
- [184] E. Neher, *Biochim. Biophys. Acta* 401 (1975) 540.
- [185] E. Neher, J. Sandblom, G. Eisenman, *J. Membr. Biol.* 40 (1978) 97.
- [186] G. Eisenman, J. Sandblom, E. Neher in B. Pullman, N. Goldblum (Hrsg.): *Metall-Ligand Interactions in Organic Chemistry and Biochemistry. Teil 2*, Reidel, Dordrecht 1977, S. 1.
- [187] B. W. Urban, S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 37 (1978) 2628.
- [188] L. V. Schagina, A. E. Grinfeldt, A. A. Lev, *Nature London* 273 (1978) 243.
- [189] D. W. Urry, S. Alonso-Romanowski, C. M. Venkatachalam, T. L. Trapani, E. D. Harris, K. U. Prasad, *Biochim. Biophys. Acta* 775 (1984) 115.
- [190] O. S. Andersen, *Biophys. J.* 41 (1983) 119, 135, 147.
- [191] S. B. Hladky, B. W. Urban, D. A. Haydon in C. F. Stevens, R. W. Tsien (Hrsg.): *Membrane Transport Processes. Vol. 3*, Raven, New York 1979, S. 89.
- [192] B. W. Urban, S. B. Gladky, *Biochim. Biophys. Acta* 554 (1979) 410.
- [193] H. Monoi, H. Ueda, *Biophys. J.* 25 (1979) 535.
- [194] D. W. Urry, C. M. Venkatachalam, A. Spisni, P. Läuger, M. A. Khaled, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2028.
- [195] D. W. Urry, C. M. Venkatachalam, A. Spisni, R. J. Bradley, T. L. Trapani, K. U. Prasad, *J. Membr. Biol.* 55 (1980) 29.
- [196] R. Henze, E. Neher, T. L. Trapani, D. W. Urry, *J. Membr. Biol.* 64 (1982) 233.
- [197] M. M. Tamkun, J. A. Talvenheimo, W. A. Caterall, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 1676.
- [198] R. Coronado, P. P. Labarca, *Trends NeuroSci. Pers. Ed.* 7 (1984) 155.
- [199] F. S. Cohen, M. H. Akabas, A. Finkelstein, *Science* 217 (1982) 485.
- [200] W. Hanke, H. Eibl, G. Boheim, *Biophys. Struct. Mech.* 7 (1981) 131.
- [201] G. Boheim, W. Hanke, F. J. Barrantes, H. Eibl, B. Sakmann, G. Fels, A. Maelicke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3586.
- [202] H. Schindler, U. Quast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3052.
- [203] U. Wilmsen, C. Methfessel, W. Hanke, G. Boheim in G. Spach (Hrsg.): *Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions*, Elsevier, Amsterdam 1983, S. 479.
- [204] B. A. Suarez-Isla, K. Wan, J. Lindstrom, M. Montal, *Biochemistry* 22 (1983) 2319.
- [205] P. Labarca, J. Lindstrom, M. Montal, *J. Gen. Physiol.* 83 (1984) 473.
- [206] M. M. White, C. Miller, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 10161; *J. Gen. Physiol.* 78 (1981) 1.
- [207] C. Miller, M. M. White, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 341 (1980) 534.
- [208] C. Miller, *J. Membr. Biol.* 40 (1978) 1; *Biophys. J.* 38 (1982) 227; *J. Gen. Physiol.* 79 (1982) 869.
- [209] R. Coronado, R. L. Rosenberg, C. Miller, *J. Gen. Physiol.* 76 (1980) 425.
- [210] P. P. Labarca, C. Miller, *J. Membr. Biol.* 61 (1981) 31.
- [211] R. Coronado, C. Miller, *J. Gen. Physiol.* 79 (1982) 529.
- [212] M. T. Nelson, M. Roudna, E. Bamberg, *Am. J. Physiol.* 245 (1983) C 151.
- [213] M. T. Nelson, R. Reinhardt, *Biophys. J.* 45 (1984) 60.
- [214] E. Moczydowski, R. Latorre, *J. Gen. Physiol.* 82 (1983) 511.
- [215] C. Verga, R. Latorre, *J. Gen. Physiol.* 82 (1983) 543.
- [216] B. K. Krueger, J. F. Worley III, R. J. French, *Nature London* 303 (1983) 172.
- [217] R. J. French, J. F. Worley III, B. K. Krueger, *Biophys. J.* 45 (1984) 301.
- [218] M. T. Nelson, R. J. French, B. K. Krueger, *Nature London* 308 (1984) 77.
- [219] W. Stoechenius, R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, *Biochim. Biophys. Acta* 505 (1979) 215.
- [220] R. Henderson, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6 (1977) 87.
- [221] Z. Danesházy, B. Karvály, *FEBS Lett.* 72 (1976) 136.
- [222] P. Shieh, L. Packer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 (1976) 603.
- [223] T. R. Herrmann, G. W. Rayfield, *Biophys. J.* 21 (1978) 111.
- [224] E. Bamberg, H.-J. Apell, N. A. Dencher, W. Sperling, H. Stieve, P. Läuger, *Biophys. Struct. Mech.* 5 (1979) 277.
- [225] P. Seta, P. Ormos, P. d'Epenoux, C. Gavach, *Biochim. Biophys. Acta* 591 (1980) 37.
- [226] A. Fahr, P. Läuger, E. Bamberg, *J. Membr. Biol.* 60 (1981) 51.
- [227] E. Bamberg, N. A. Dencher, A. Fahr, M. P. Heyn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7502.
- [228] L. A. Drachev, A. D. Kaulen, V. P. Skulachev, *FEBS Lett.* 87 (1978) 161.
- [229] F. T. Hong, M. Montal, *Biophys. J.* 25 (1979) 465.
- [230] L. Keszthelyi, P. Ormos, *FEBS Lett.* 109 (1980) 189.
- [231] H.-W. Trissl, *Biochim. Biophys. Acta* 723 (1983) 327.
- [232] P. Ormos, L. Reinisch, L. Keszthelyi, *Biochim. Biophys. Acta* 722 (1983) 471.
- [233] K. C. Skou, *Q. Rev. Biophys.* 7 (1975) 401.
- [234] L. C. Cantley, *Curr. Top. Bioenerg.* 11 (1981) 201.
- [235] P. L. Jørgensen, *Biochim. Biophys. Acta* 694 (1982) 27.
- [236] S. M. Goldin, S. W. Tong, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 5907.
- [237] S. Hilden, H. M. Rhee, L. E. Hokin, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7432.
- [238] E. Racker, L. W. Fisher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67 (1975) 1144.
- [239] B. M. Anner, L. K. Lane, A. Schwartz, B. J. R. Pitts, *Biochim. Biophys. Acta* 467 (1977) 340.
- [240] R. L. Jackson, A. J. Verkleij, E. J. J. van Zoelen, L. K. Lane, A. Schwartz, L. L. M. van Deenen, *Arch. Biochem. Biophys.* 200 (1980) 269.
- [241] M. Forgac, G. Chin, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5652.
- [242] S. J. D. Karlish, W. R. Lieb, W. D. Stein, *J. Physiol.* 328 (1982) 333.
- [243] M. Y. Abeywardena, T. M. Allen, J. S. Charnock, *Biochim. Biophys. Acta* 729 (1983) 62.

- [244] J. R. Broderus, L. Jacobsen, P. L. Jørgensen, *Biochim. Biophys. Acta* 731 (1983) 290.

[245] F. Cornelius, J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta* 772 (1984) 357.

[246] H.-J. Apell, M. M. Marcus, B. M. Aner, H. Oetliker, P. Läuger, *J. Membr. Biol.*, im Druck.

[247] A. S. Waggoner, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 8 (1979) 47.

[248] B. I. Zwolinski, H. Eyring, C. E. Reese, *J. Phys. Chem.* 53 (1949) 1426.

[249] H. Frauenfelder, G. A. Petsko, D. Tsernoglu, *Nature London* 280 (1979) 558.

[250] M. Karplus, J. A. McCammon, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 263.

[251] R. Huber, J. Deisenhofer, P. M. Colman, M. Matsushima, W. Palm, *Nature London* 264 (1976) 415.

[252] F. Parak, E. N. Frolov, R. L. Mössbauer, V. I. Goldanskii, *J. Mol. Biol.* 145 (1981) 825.

[253] J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, H. Cherek, A. Balter, *Biochemistry* 22 (1983) 1741.

[254] G. Wagner, *Q. Rev. Biophys.* 16 (1983) 1.

[255] E. Frehland, *Biophys. Struct. Mech.* 5 (1979) 91.

[256] P. Läuger, W. Stephan, E. Frehland, *Biochim. Biophys. Acta* 602 (1980) 167.

[257] P. Läuger, *J. Membr. Biol.* 57 (1980) 163.

[258] P. Läuger, *Biophys. J.*, im Druck.

[259] C. S. Patlak, *Bull. Math. Biophys.* 19 (1957) 209.

[260] O. Jardetzky, *Nature London* 211 (1960) 969.

[261] M. Klingenberg, *Nature London* 290 (1981) 449.

[262] P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 553 (1979) 143.

[263] P. Läuger, *Biochim. Biophys. Acta* 779 (1984) 307.

[264] A. Goffeau, C. W. Slayman, *Biochim. Biophys. Acta* 639 (1981) 197.

[265] R. J. Poole, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 29 (1978) 437.

ZUSCHRIFTEN

Autoren, die eine „Zuschrift“ veröffentlichen wollen, sollten vor der Abfassung ihres Manuskripts unbedingt die „Hinweise für Autoren“ lesen, die jeweils im Januarheft eines Jahrgangs nach dem Inhaltsverzeichnis gedruckt sind; auf Anforderung können sie auch von der Redaktion erhalten werden.

Neue bicyclische Ketone und die Stereochemie ihrer Reaktion mit Carbanionen**

Von *Petra Baierweck, Detlef Hoell und Klaus Müllen**
Professor Rolf C. Schulz zum 65. Geburtstag gewidmet

Die Kenntnis des Reaktionsprofils für den nucleophilen Angriff auf Carbonylverbindungen ist von großer theoretischer und praktischer Bedeutung^[1]. Läßt man Ketone des Typs 1 oder 2 mit Carbanionen reagieren, so erhebt sich die Frage, ob die intermediäre assoziative Wechselwirkung der Organometallverbindung mit dem Ethylen- oder Benzol- π -System einen diastereoselektiven Verlauf der Addition bewirken kann. Unsere Aufmerksamkeit wurde auf die Ketone 2 und 3 gelenkt, da die Befunde für 1a^[2] kein geschlossenes Bild liefern. Wir beschreiben einen verblüffend einfachen Zugang zu den neuen Ketonen 2b und 3 (Tabelle 1) und berichten über die Stereochemie ihrer Reaktion mit Organometallverbindungen.

Unsere jüngsten Untersuchungen der reduktiven Alkylierung von ungesättigten Kohlenwasserstoffen zeigen^[3], daß die Umsetzung von Dianionen mit difunktionellen Alkylierungsmitteln, z. B. 1,n-Dihalogenalkanen 4, eine Fülle

$$\text{Hal}-(\text{CH}_2)_n-\text{Hal} \quad 4$$

neuer Cycloanellierungs- und Überbrückungsprodukte zugänglich macht. Zur Synthese von 2 lag es nach diesen Er-

fahrungen nahe, das durch Deprotonierung von 2-Indanon (1. NaH, 1.2 Äquiv., 0°C; 2. *n*-Butyllithium, 1 Äquiv., Tetrahydrofuran (THF), -78°C → 0°C) erhältliche Dianion **5** (sowohl **6a** als auch **5** sind NMR-spektroskopisch charakterisiert^[4]) mit **4** umzusetzen. Die Kernfrage bestand darin,

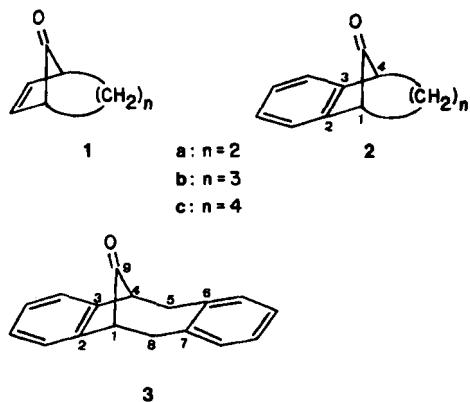


Tabelle 1. Spektroskopische Daten einiger neuer Verbindungen [a].

2b: ¹³C-NMR (CDCl₃, 20 MHz): δ = 217.4 (C-Carbonyl), 139.1, 127.5, 122.6 (C-aron.), 52.4 (C-1, C-4), 34.3 (C-5, C-7), 17.4 (C-6); ¹H-NMR (CDCl₃, 90 MHz): δ = 7.25 (4 H, arom.), 3.37 (2 H, m), 2.15–1.90 (4 H, m), 1.57–0.78 (2 H, m); IR (KBr): ν(C=O) = 1760 cm⁻¹

3: $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 219.0 (C-9); 140.3, 136.0, 131.5, 127.5, 126.9, 123.7 (C-areom.), 52.2 (C-4, C-1), 41.1 (C-5, C-8); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60 MHz): δ = 7.05 (4 H, arom.), 6.90 (4 H, arom.), 3.65 (2 H, m), 3.20 (4 H, m); IR (KBr): $\nu(\text{CO})$ = 1750 cm^{-1} ; F_p = 153.5 °C

12a: $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 20 MHz): $\delta = 146.6$ (*ipso*-Phenyl), 143.6 (C-2, C-3); 127.7, 126.7, 126.5, 122.5 (C-arom.), 82.0 (C-8), 49.2 (C-1, C-4), 24.5 (C-5, C-7), 16.7 (C-6); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 90 MHz): $\delta = 7.4\text{--}7.1$ (9 H, arom.), 3.32 (2 H, m), 2.46–2.09 (2 H, m), 1.99 (1 H, s), 1.79–1.20 (3 H, m), 1.02–0.5 (1 H, m); $\text{Fp} = 70^\circ\text{C}$

[a] Alle Verbindungen weisen die korrekte Elementarzusammensetzung auf.

ob das durch Erstalkylierung in 1-Stellung erhältliche Monoanion **6b** zur *C*-Alkylierung in Position 3 (Produkt **2**), zur *O*-Alkylierung (Produkte **7** und **8**) oder - nach Protonenwanderung - zur *C*-Alkylierung in Stellung 1 (Produkt **9**) neigen würde.

[*] Prof. Dr. K. Müllen, Dipl.-Chem. P. Baierweck, Dipl.-Chem. D. Hoell
Institut für Organische Chemie der Universität
J.-I.-Becher-Weg 18-20, D-6500 Mainz 1

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.