

Diss ETH 6248

TRANSPORT VON  $\text{Ca}^{++}$  DURCH BIMOLEKULARE  
MEMBRANEN MITTELS NEUTRALER SYNTHETISCHER CARRIER

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
PAUL VUILLEUMIER  
dipl. Natw. ETH  
geboren am 25. August 1947  
von La Sagne (Kt. Neuenburg)  
und Tramelan (Kt. Bern)

angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. W. Simon, Referent  
Prof. Dr. E. Carafoli, Korreferent

1978

1. The first part of the document is a list of the names of the members of the committee who have been appointed to study the problem of the shortage of housing in the city of New York.

2. The second part of the document is a list of the names of the members of the committee who have been appointed to study the problem of the shortage of housing in the city of New York.

3. The third part of the document is a list of the names of the members of the committee who have been appointed to study the problem of the shortage of housing in the city of New York.

## Leer - Vide - Empty

4. The fourth part of the document is a list of the names of the members of the committee who have been appointed to study the problem of the shortage of housing in the city of New York.

5. The fifth part of the document is a list of the names of the members of the committee who have been appointed to study the problem of the shortage of housing in the city of New York.

Mein grosser Dank gilt meinem verehrten Lehrer und Doktorvater

Herrn Prof. Dr. W. Simon.

Unter seiner grosszügigen Leitung ist diese Arbeit entstanden. Ich danke ihm für sein Vertrauen, für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und seinen Optimismus auch in Zeiten des Misserfolges.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. E. Carafoli und allen Mitarbeitern des Institutes Biochemie III für die herzliche Gastfreundschaft, die ich in ihrem Institut erfahren durfte, insbesondere aber auch Dr. Paolo Gazzotti für die fruchtbaren Diskussionen und seine grosse Hilfe bei vielen Experimenten.

Ich danke auch Dr. W. E. Morf für seine Hilfe am theoretischen Teil dieser Arbeit.

Einen tiefen Dank möchte ich meinen lieben Eltern aussprechen für ihre grosszügige Unterstützung, die ich jederzeit von ihnen erfahren durfte.

# Leer - Vide - Empty

**Für Brigitte**

**für ihre Liebe, ihr Verständnis**

**und ihre Hilfe**

Leer - Vide - Empty

## INHALTSVERZEICHNIS

1.	<b>EINLEITUNG</b>	11
2.	<b>KUENSTLICHE BIMOLEKULARE MODELLMEMBRANEN</b>	14
2.1.	Historisches	14
2.2.	Die Bildung von Schwarzen Filmen	15
2.3.	Materialien zur Herstellung von Schwarzen Filmen	16
2.4.	Eigenschaften von Schwarzen Filmen	17
2.4.1	Dicke	17
2.4.2	Elektrische Eigenschaften	19
2.4.3	Optische Eigenschaften	20
2.4.4	Zusammensetzung von Schwarzen Filmen	22
2.4.5	Permeabilitätseigenschaften von Schwarzen Filmen	23
2.5.	Liposomen	24
2.6.	Lösungsmittelfreie planare bimolekulare Membranen	28
2.6.1	Physikalische Eigenschaften	29
2.7.	Zusammenfassung und Diskussion der verschiedenen Modellsysteme	50
3.	<b>BIOLOGISCHE MEMBRANEN</b>	31
3.1.	Historisches	31
3.2.	Aufgaben und Zusammensetzung biologischer Membranen	34
3.3.	Die Erythrocytenmembran	35
3.4.	Das sarcoplasmatische Reticulum	37
3.5.	Die Mitochondrien	38
3.5.1	Der Citronensäure-Zyklus	39
3.5.2	Die Atmungskette und oxydative Phosphorylierung	40
3.5.3	Kopplung der Atmungskette mit der oxydativen Phosphorylierung: Die chemiosmotische Hypothese	42
3.5.4	Andere Wege der Energieverwendung	43

3.6.	Vergleich von biologischen Membranen mit künstlichen Modellmembranen	43
4.	EIGENSCHAFTEN VON CARRIERN	45
4.1.	Komplexbildner für einwertige Ionen	45
4.2.	Komplexbildner für zweiwertige Ionen	48
4.3.	Porenbildende Moleküle	50
4.4.	Allgemeine Anforderungen an Ionencarrier	50
4.5.	Eigenschaften einiger synthetischer Liganden	51
5.	LEITFAEHIGKEITSMESSUNGEN AN SCHWARZEN MEMBRANEN IN ANWESENHEIT VON SYNTHETISCHEN NEUTRALEN LIGANDEN	55
5.1.	Apparatur	55
5.2.	Resultate	56
5.2.1	Einfluss der Ligandlöslichkeit	60
5.2.2	Einfluss der Adsorption	60
5.3.	Zusammenfassung	61
6.	AUSFLUSS VON $\text{Ca}^{++}$ AUS LIPOSOMEN	61
6.1.	Photometrische Messungen	61
6.2.	Radioaktive Messungen	63
6.2.1	Durch neutrale Liganden induzierter Ausfluss von $\text{Ca}^{++}$	65
6.2.2	Einfluss von FCCP	67
6.2.3	Transportselektivität	68
6.2.4	Zusammenfassung und Diskussion	71
7.	EINSATZ DER SYNTHETISCHEN NEUTRALEN LIGANDEN IN BIOLOGISCHEN MEMBRANEN	74
7.1.	Wirkung auf Erythrocyten	74
7.2.	Wirkung auf sarcoplasmatisches Reticulum	76
7.3.	Mitochondrien	78
7.4.	Diskussion	81



8.	MECHANISTISCHE BETRACHTUNGEN DES IONENTRANSPORTES DURCH BIMOLEKULARE MEMBRANEN MITTELS NEUTRALER IONENCARRIER	82
8.1.	Kurze Darstellung der Morf'schen Theorie	83
8.2.	Spezialfälle	89
8.2.1	Vereinfachungen nach dem Modell von Läger und Stark	89
8.2.2	Vereinfachungen nach dem Modell von Ciani, Eisenman und Krasne	90
9.	UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON LIPOPHILEN ANIONEN AUF DEN CARRIER-INDUZIERTEN IONENTRANSPORT AN BIMOLEKULAREN MEMBRANEN	95
9.1.	Einfluss der Anionen-Konzentration	95
9.2.	Einfluss von lipophilen Anionen auf die Transport-Stöchiometrie	97
9.3.	Einfluss von lipophilen Anionen auf die Strom-Spannungscharakteristik	98
9.4.	Andere lipophile Anionen	101
9.5.	Diskussion	103
10.	EXPERIMENTELLER TEIL	104
10.1.	Leitfähigkeitsmessungen an Schwarzen Membranen	104
10.2.	Experimente mit Liposomen und biologischen Membransystemen	105
10.3.	Chemikalien	105
	ZUSAMMENFASSUNG	107
	LITERATURVERZEICHNIS	109

**Leer - Vide - Empty**

## 1. EINLEITUNG

Membranen sind auffallende Strukturen jeder eukaryontischen Zelle. Nicht nur machen die Membransysteme in gewissen Zellen bis zu 80% des Trockengewichtes aus, sie erfüllen vor allem lebenswichtige Funktionen [1]. Jede Zelle ist durch eine Membran gegen aussen abgegrenzt (Plasmamembran). Ihre Aufgabe ist es, die Zusammensetzung im Zellinnern trotz Änderungen im Aussenmedium konstant zu halten. Sie darf aber die Zelle nicht hermetisch abschliessen, sondern muss ihr erlauben, mit der Aussenwelt in Kontakt zu bleiben. Sie muss, als ein Charakteristikum des Lebendigen, Stoffaustausch sowie die Aufnahme und Weiterleitung von Informationen ermöglichen.

Aber nicht nur die ganze Zelle, auch die verschiedenen Zellorganelle sind durch eigene Membranen nach aussen abgegrenzt. Diese Organelle haben die verschiedensten Aufgaben innerhalb der Zelle zu erfüllen, so die Mitochondrien als Ort des Zitronensäurezyklus, der Elektronentransportkette und der ATP-Synthese, der Zellkern als Sitz der Chromosomen, das Endoplasmatische Retikulum mit der Aufgabe der Proteinsynthese und weitere Organelle je nach Art der Zelle [1].

Membranen dienen somit nicht nur als Phasengrenze, sie haben auch Funktionen des Stoffwechsels, des Wachstums, der Differenzierung und die wichtige Aufgabe des aktiven und passiven Stofftransportes zu erfüllen.

Aus den vielfältigen Funktionen der Membranen greift die vorliegende Arbeit nur einen Aspekt heraus, nämlich den Transport von Erdalkalitionen mittels künstlicher Moleküle, die an unserem Laboratorium synthetisiert wurden.

Gegen Ende des letzten Jahrhunderts wurde auf Grund von Experimenten über die Eintrittsrates verschiedener Substanzen in die Zelle festgestellt, dass Zellmembranen aus Lipiden aufgebaut sein müssen [2]. Dieser

Beobachtung widersprach jedoch die Tatsache, dass kleinere hydrophile Substanzen wie Wasser, Glucose oder  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen viel rascher diese Barriere durchdringen konnten, als auf Grund ihrer Lipidlöslichkeit möglich sein sollte, aber auch das Faktum, dass Zellen  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen entgegen einem Konzentrationsgradienten transportieren konnten [1].

Um die unerwartet hohen Transportraten zu erklären, postulierte man in der Folge verschiedenste durch Proteine gebildete Kanäle oder Poren. Man vermutete Ionenpumpen mit der Fähigkeit, Konzentrationsgradienten aufzubauen. In neuerer Zeit ist es auch gelungen, einige der Membranproteine zu isolieren, die an diesen Transportvorgängen beteiligt sind, und bis heute sind bereits grosse Fortschritte in der Charakterisierung dieser Proteine zu verzeichnen.

Diese Forschung nach Ionentransportsystemen erhielt 1964 kräftige, neue Impulse durch die Entdeckung von Moore und Pressmann [4], dass das Antibiotikum Valinomycin die  $\text{K}^+$ -Transportrate in Mitochondrien dramatisch erhöht. Es zeigte sich, dass Valinomycin die Fähigkeit hat  $\text{K}^+$ -Ionen durch Komplexierung in eine lipidlösliche Form überzuführen und ihnen so den Durchgang durch die Lipidmembranen zu ermöglichen.

In den folgenden Jahren wurden weitere Antibiotika gefunden [5], welche auch andere Alkaliionen zu komplexieren und durch Lipidmembranen zu transportieren vermögen, darunter eine ganze Reihe von geladenen Carriern. Später wurden auch Moleküle entdeckt, die fähig waren, Erdalkaliionen zu transportieren. Im Jahre 1972 wurde erstmals über die Eigenschaft des Antibiotikums A 23187 berichtet, Lipidmembranen für  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen durchlässig zu machen [6].

Kurze Zeit später wurden X-537 A [7], Beauvericin [8] und möglicherweise Avenaciolid [7,9] als wirksame Transportsysteme für gewisse zweiwertige Ionen erkannt. Doch blieb die Auswahl an erdalkaliionen-transportierenden Substanzen spärlich.

Parallel zu dieser Entwicklung lief die Forschung über die Wirkung dieser Substanzen auf makroskopische Membranen. Eingeleitet wurde sie 1966 durch die Entdeckung von Stefanac & Simon [10], dass Lösungsmittelmembranen, die Valinomycin enthalten, ein ausgesprochen  $K^+$ -selektives Verhalten zeigen und dass dies durch die selektive Komplexbildung zwischen dem Antibiotikum und  $K^+$  bedingt ist. Durch weitere Anstrengungen auf diesem Gebiet konnte nachgewiesen werden, dass Antibiotika, die in biologischen Systemen kationenselektives Verhalten zeigen, Komplexbildner für diese Ionen sind [14 - 16] und auch in makroskopischen Membranen Transporteigenschaften aufweisen [11,12].

Angeregt durch diese Erfolge wurde auf Grund theoretischer Ueberlegungen [5,17] eine ganze Reihe synthetischer Komplexbildner hergestellt, die zum Teil beachtliche Ionenselektivitäten zeigten [105]. In kurzer Zeit gelang es in unserem Laboratorium, Liganden herzustellen, die beim Einbau in Flüssigmembranen hochselektive  $Ca^{++}$ -Sensoren ergaben. Da für viele dieser Liganden Ionentransporteigenschaften in makroskopischen Membranen nachgewiesen werden konnten stellte sich die Frage, ob sie auch geeignet seien, Erdalkalitionen durch biologische Membranen zu transportieren. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die biochemische Forschung an weiteren  $Ca^{++}$ -Carriern interessiert ist.

Die vorliegende Arbeit versuchte deshalb in einem ersten Schritt festzustellen, ob gewisse dieser synthetischen Liganden fähig sind,  $Ca^{++}$ -Ionen durch künstliche bimolekulare Membranen zu transportieren. In weiteren Experimenten wurde ihr Verhalten in bezug auf biologische Membranen geprüft. Des weiteren wird versucht, einige mechanistische Aspekte dieses Transportes zu beleuchten.

## 2. KUNSTLICHE BIMOLEKULARE MODELLMEMBRANEN

### 2.1. Historisches

Die hohe Komplexität von biologischen Membranen (vgl. Kap. 3) führte schon frühzeitig zu Versuchen, ihre Eigenschaften an einfacheren Modellen zu untersuchen.

So versuchte bereits 1914 Beutner [18] biologische Membranen zu simulieren, indem er aus polaren Ölen Membranen formte und daran erste detaillierte Untersuchungen anstellte. Diese 'Oelmembranen' studierte auch Baur [19]. Später wurden von Michaelis und Wech [20] Colloidfilme und von Teorell [21] Cellophan-Filme für das Studium von Membraneigenschaften herangezogen.

Als nach dem Zweiten Weltkrieg die ersten künstlichen Ionenaustauscherharze erhältlich waren, wurden selbst aus diesem Material Modellmembranen hergestellt und von verschiedenen Forschern untersucht [22].

Zusätzlich zu diesen Arbeiten wurden auch viele Untersuchungen an monomolekularen Schichten ausgeführt, welche an der Luft-Wasser- oder Oel-Wasser-Grenzfläche ausgebildet wurden [23, 24].

Der grosse Durchbruch gelang jedoch den amerikanischen Forschern Mueller, Rudin, Tien und Wescott. Angeregt vor allem durch Newton's Studien an Seifenblasen und das Modell der bimolekularen Membran von Gorter und Grendel (vgl. Kap. 3.1.), versuchten sie durch ein völlig neues experimentelles Vorgehen die Bildung von bimolekularen Schichten in wässriger Lösung zu induzieren. In einer Arbeit - die heute wohl als historisch bezeichnet werden darf - präsentierten sie 1963 die Resultate ihrer Studien [30]. Es gelang ihnen, in wässriger Lösung bimolekulare Membranen aus lipidhaltigen Lösungen herzustellen, die in ihren Eigenschaften den biologischen Membranen sehr nahe stehen, aber in ihrer Zusammensetzung um ein Vielfaches weniger komplex sind.

Dieser Erfolg wurde bis heute durch zwei weitere Entdeckungen abgerundet. Zum einen erkannte Bangham 1965 [27], dass sich Phospholipide in wässrigem Medium suspendiert spontan zu sphärischen Gebilden assoziieren, die gegen aussen durch bimolekulare Membranen abgegrenzt sind. Zum andern entwickelten Montal und Mueller [28] 1972 eine Methode, um lösungsmittelfreie bimolekulare Lipidmembranen herzustellen. Gerade weil sie keine unnatürlichen Lösungsmittelmoleküle enthalten, sind sie ein noch besseres Modell für Biomembranen.

## 2.2. Die Bildung von Schwarzen Filmen

Die Herstellung von ebenen bimolekularen Lipidmembranen ist relativ einfach. Als Apparatur dient eine Zelle aus Teflon oder Plexiglas, die durch eine Zwischenwand in zwei Räume geteilt ist (Fig. 1). Die Zwischenwand enthält ein kreisrundes Loch von bis zu einigen Millimetern Durchmesser, über welches die Membran gespannt wird. Mit einem feinen Pinsel, einer Pipette oder einer Mikroliterspritze wird eine Probe einer Lipidlösung auf das Blendenloch aufgebracht. Der Lipid-Lösungsmittelfilm, der das Blendenloch überspannt, wird nun durch Abwandern von Material an den Rand zusehends dünner (Fig. 2a, b)

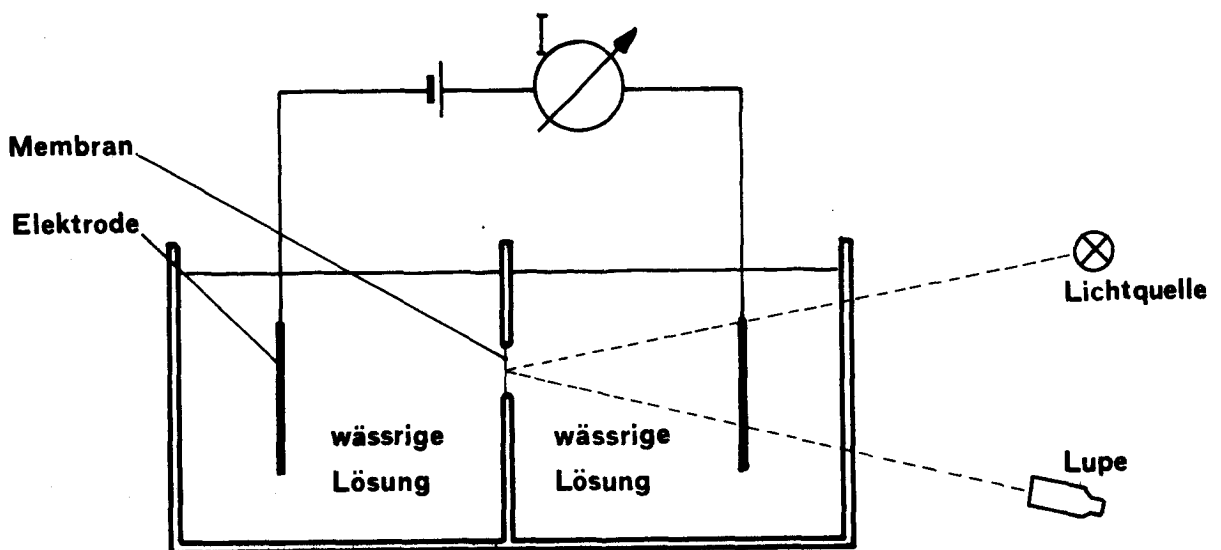
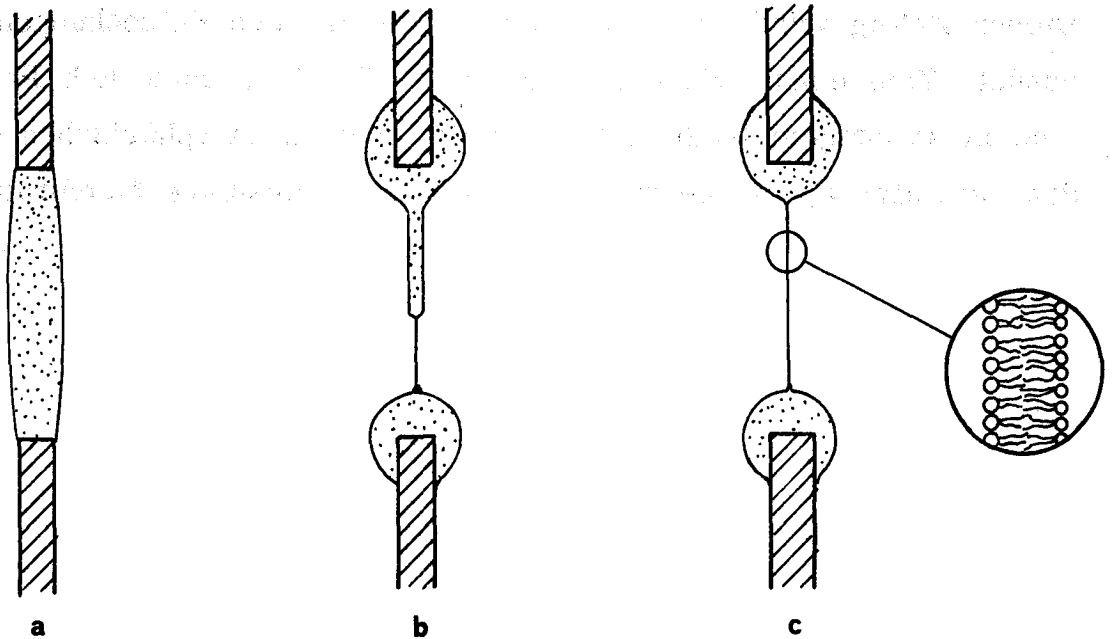


Fig. 1: Apparatur zur Herstellung von Schwarzen Filmen



**Fig. 2:** Bildungsprozess einer bimolekularen Lipidmembran

und zeigt im reflektierten Licht bald leuchtende Interferenzfarben entsprechend einer Dicke von einigen Mikrometern. Man beobachtet dann an einer Stelle einen abrupten Uebergang zu einer viel geringeren Lamellendicke. Dieser Bezirk, auf dem die Lichtreflexion fast vollständig verschwindet, breitet sich von unten her (bei Lösungsmittel, die dichter sind als Wasser, von oben her) aus, bis nach einigen Minuten die ganze Fläche der Blendenöffnung von einer einheitlichen, das Licht nur noch schwach reflektierenden Membran überzogen ist.

Wegen ihres geringen Reflexionsvermögens bezeichnet man solche Membranen auch als 'Schwarze Filme' oder 'Schwarze Membranen' ('black films'). In diesem Zustand sind die Membranen nur noch zwei Moleküllagen dick.

### 2.3. Materialien zur Herstellung von Schwarzen Filmen

Zur Herstellung von Schwarzen Filmen eignet sich eine ganze Reihe von verschiedensten Materialien. Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie aus einem organischen Lösungsmittel (im allgemeinen ein geradkettiger



Kohlenwasserstoff) und einer amphipatischen Substanz bestehen. Amphipatische Moleküle sind dadurch charakterisiert, dass sie sowohl stark polare wie auch stark unpolare Molekülgruppen enthalten. Der polare Teil wird als 'polare Kopfgruppe' bezeichnet, und der unpolare Rest besteht meist aus Kohlenwasserstoffketten.

Auf Seite 18 ist eine Auswahl solcher Moleküle gezeigt, wobei R im allgemeinen eine meist gesättigte, geradkettige Kohlenwasserstoffkette mit 15 - 17 C-Atomen symbolisiert. Weiter bilden auch Lösungen von oxydiertem Cholesterin, Chlorophyll oder Retinal [29] stabile Membranen. Als Lösungsmittel werden meist n-Alkane mit 8 - 14 C-Atomen verwendet.

Eine typische und häufig verwendete Lösung zur Herstellung von stabilen Membranen ist z. B. eine 1%-ige Lösung von Lecithin (1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin) in n-Decan mit oder ohne Zusatz von Cholesterin.

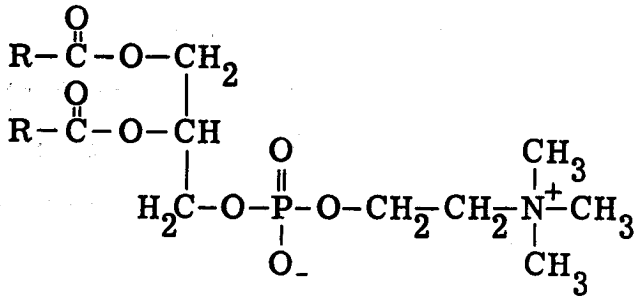
Neben solchen Lösungen mit mehr oder weniger definierter Zusammensetzung werden oft auch erfolgreich Extrakte aus biologischem Material zur Membranherstellung verwendet, so z. B. Extrakte aus Ochsenhirn, Hefe, Erythrozyten, Mitochondrien oder verschiedenen Mikroorganismen. Tien beschreibt in [29] eine ganze Reihe von Methoden zur Gewinnung von solchen Extrakten.

Allgemein ist zu erwähnen, dass Material, das aus mehr als zwei Komponenten zusammengesetzt ist, stabilere Membranen ergibt.

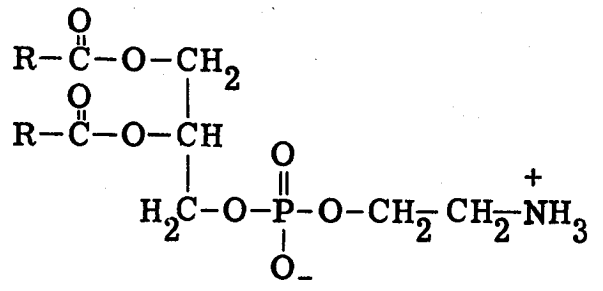
## 2.4. Eigenschaften von Schwarzen Filmen

### 2.4.1 Dicke

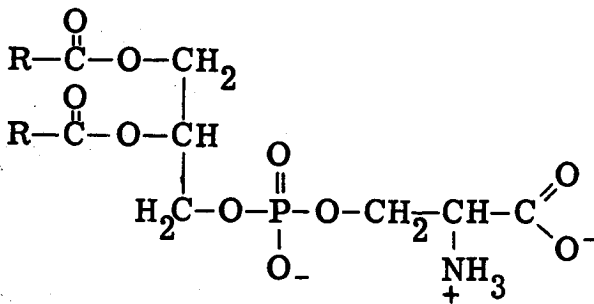
Verschiedene Methoden sind geeignet, um die Dicke von solchen Membranen zu messen (optische, elektronenoptische und elektrische) [30 - 34]. Sie ergeben, je nach Methode, übereinstimmend Werte



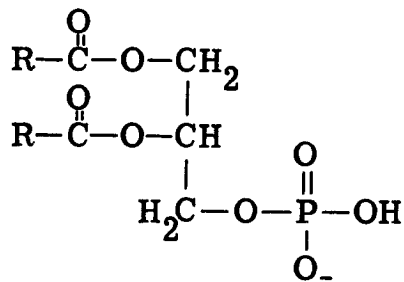
Phosphatidylcholin  
(Lecithin)



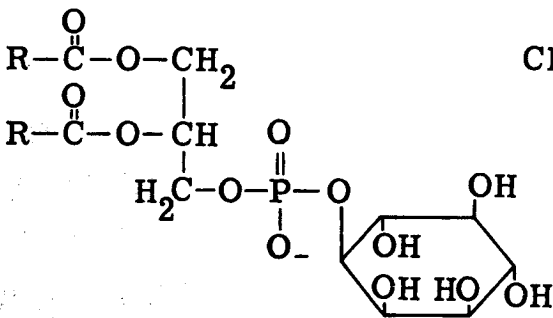
Phosphatidyläthanolamin  
(Kephalin)



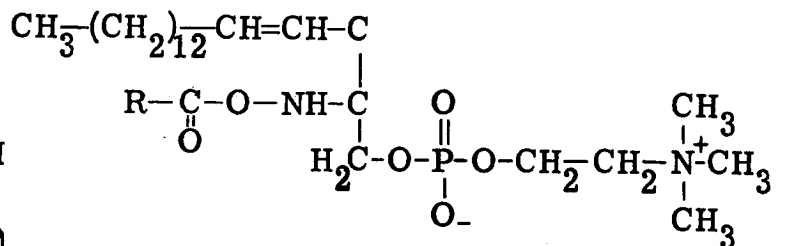
Phosphatidylserin



Phosphatidsäure



Phosphatidylinositol



Sphingomyelin

Konstitution einiger Lipide zur Herstellung Schwarzer Filme

zwischen 40 - 150 Å, wobei man Werte zwischen 60 und 80 Å als am wahrscheinlichsten betrachtet. Diese Werte sind etwas höher als die doppelte Länge des ausgestreckten Lecithinmoleküls, so dass man annehmen muss, dass eine geringe Menge Lösungsmittel in die Membran eingelagert ist.

#### 2.4.2 Elektrische Eigenschaften

Trotz ihrer geringen Dicke ist der elektrische Widerstand von bimolekularen Membranen ausserordentlich hoch. Er liegt für unmodifizierte Membranen im Bereich um  $10^8 - 10^9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Lecithin in 0.1 M NaCl).

Eine andere oft gemessene Grösse ist die elektrische Durchbruchspannung. Wird die Spannung über einer Membran erhöht, so wird ein Punkt erreicht, an dem die Membran der elektrischen Spannung nicht mehr standhält und in der Folge zusammenbricht. Diese Spannung liegt um 200 mV (Lecithin in 0.1 M NaCl), hängt aber stark von der Art der Aussenlösung und von Verunreinigungen (oder Modifikatoren) in der Membran [29] ab.

Eine einfache Rechnung zeigt, dass bei 200 mV über der Membran eine elektrische Feldstärke von  $3 \cdot 10^5 \text{ V/cm}$  herrscht, was durchaus im Bereich der Durchbruchspannung für Kohlenwasserstoffe, wie z.B. für Paraffin ( $\epsilon = 2.0 - 2.5$ ) mit  $10^5 - 10^6 \text{ V/cm}$  liegt [29].

Eine weitere elektrische Grösse ist die Kapazität von Membranen. Das System wässrige Salzlösung / Membran / wässrige Salzlösung kann als Kondensator aufgefasst werden mit den Salzlösungen als Kondensatorplatten und der Membran als Dielektrikum. Theoretisch errechnet sich für einen solchen Kondensator eine Kapazität von  $0.25 \mu\text{F cm}^{-2}$  ( $\epsilon = 2$ ,  $d = 70 \text{ Å}$ ). Kapazitätsmessungen an Lipidmembranen ergeben Werte um 0.3 bis  $1.3 \mu\text{F cm}^{-2}$  [29], was in guter Uebereinstimmung mit dem theoretischen Werte steht.

### 2.4.3. Optische Eigenschaften

Um die optischen Phänomene an Schwarzen Membranen zu verstehen, sollen kurz zwei Tatsachen aus der physikalischen Optik erwähnt werden [35]:

1. Damit zwei Lichtstrahlen interferieren können, müssen sie
  - a. kohärent sein
  - b. aus der gleichen Lichtquelle stammen.
2. Wird ein aus dem Medium 1 (Brechungsindex  $n_1$ ) kommender Lichtstrahl an der Phasengrenze zum Medium 2 (Brechungsindex  $n_2$ ) reflektiert, so erfährt der Strahl einen Phasensprung um  $180^\circ$ , sofern der Brechungsindex  $n_2 > n_1$ . Ist  $n_1 > n_2$  erfolgt kein Phasensprung.

Ein Lichtstrahl a, der von einer Lichtquelle S kommend auf eine Lipidmembran in wässrigem Medium auftrifft (Fig. 3), wird an der Phasengrenze im Punkt A zum einen Teil ins Wasser zurückreflektiert (Strahl a'), zum andern Teil zum Punkt B hin gebrochen (Strahl b), dort ebenfalls reflektiert und unter Brechung im Punkt A' wieder ins Wasser zurückgestrahlt (Strahl b'), wo er mit dem direkt reflektierten Strahl a' interferiert.

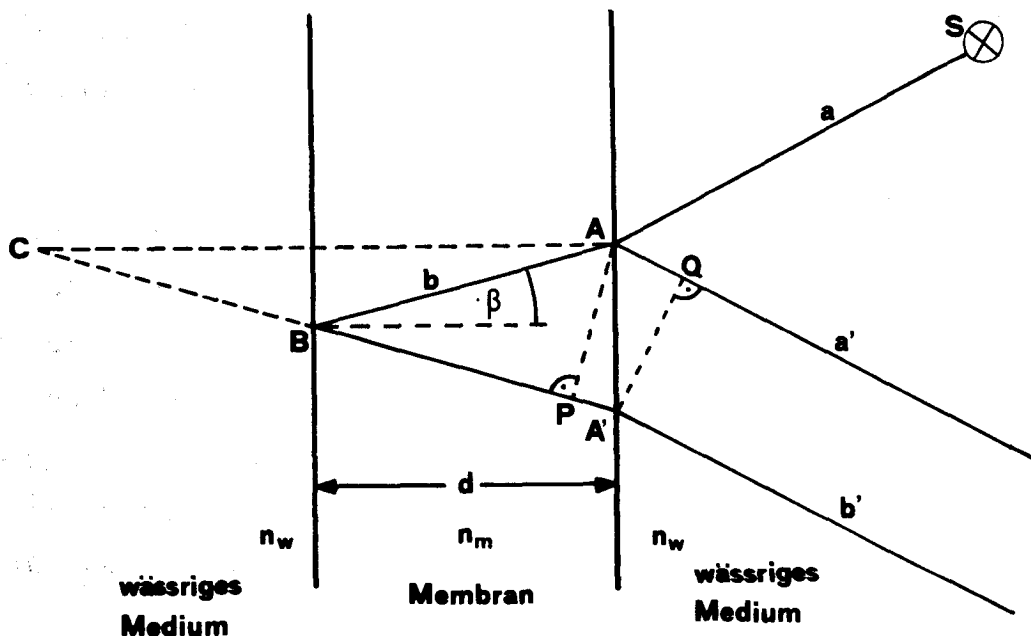


Fig. 3: Optisches Verhalten einer Schwarzen Membran

Unter der Bedingung, dass  $n_m > n_w$ , erfährt der Strahl a bei der Reflexion in A einen Phasensprung um  $180^\circ$ . Strahl b' seinerseits ist durch die grössere Weglänge relativ zu a' in der Phase verschoben. Die von Strahl b' zusätzlich durchlaufene Strecke  $\Delta$  beträgt [36]

$$\Delta = AB + BA' - AQ \quad (1)$$

$$\Delta = CA' - AQ \quad (2)$$

Da die Lichtgeschwindigkeit durch das Medium beeinflusst wird, müssen zur Berechnung der optischen Wegdifferenz  $\Delta'$  die Brechungsindices  $n_m$  und  $n_w$  eingeführt werden [36].

$$\Delta' = n_m \cdot CA' - n_w \cdot AQ \quad (3)$$

Weiter gilt

$$CA' = CP + PA' \quad (4)$$

$$n_w \cdot AQ = n_m \cdot PA' \quad (5)$$

$$CP = CA \cdot \cos \beta = 2d \cdot \cos \beta \quad (6)$$

Werden die Gleichungen (4), (5) und (6) in Gleichung (3) eingesetzt, ergibt sich als optische Wegdifferenz

$$\Delta' = 2d \cdot n_m \cdot \cos \beta \quad (7)$$

Werden Lipidmembranen, die sich im Bildungsprozess zur Schwarzen Membran befinden, mit weissem Licht bestrahlt, so erscheinen im reflektierten Licht durch konstruktive und destruktive Interferenz vorerst alle möglichen Interferenzfarben.

Ist eine Membran so dünn geworden, dass die Membrandicke  $d$  ungefähr einen Viertel der mittleren Wellenlänge des einfallenden Lichtes erreicht hat, kommen wegen des Phasensprunges des Strahles a/a' im Punkt A die Strahlen a' und b' in Phase (Gleichung 7, Fig. 4b). Dadurch wird die konstruktive Interferenz maximal, und die Membran leuchtet im reflektierten Licht in goldgelbem und silbernem Glanz auf.

Erreicht die Membran durch weiteres Dünnerwerden den Zustand der

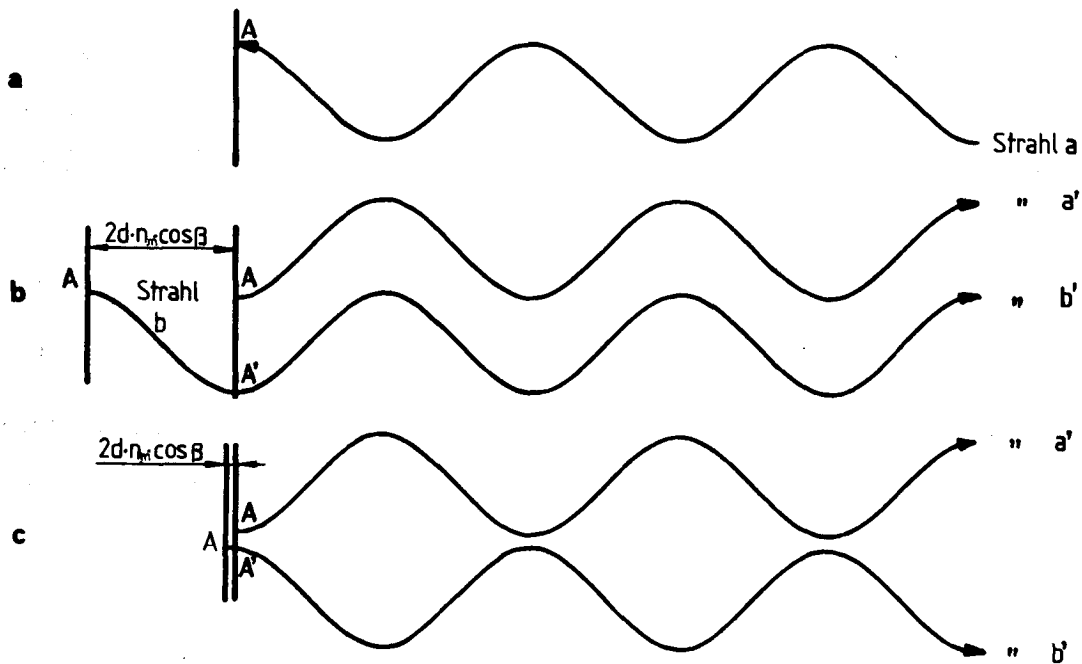


Fig. 4: Interferenz der Lichtstrahlen an der Membran. a, eintreffender Strahl; b, c, reflektierte Strahlen.

bimolekularen Membran, so ist die Wegdifferenz der beiden Strahlen a' und b' nur noch minimal (Membrandicke  $\ll \lambda$ ).

Wegen des Phasensprunges beim Punkt A sind die beiden Strahlen in ihrer Phase jedoch um  $180^\circ$  verschoben, und destruktive Interferenz tritt ein: Das von der Membran reflektierte Licht verschwindet praktisch, und die Membran erscheint 'schwarz' (Fig. 4c).

#### 2.4.4 Zusammensetzung von Schwarzen Filmen

Die genaue Zusammensetzung von Schwarzen Filmen anzugeben, ist ausserordentlich schwierig, selbst wenn die Zusammensetzung der membranbildenden Lösung bestens bekannt ist.

Nimmt man nämlich in der Membran eine mittlere Packungsdichte von  $50 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$  an, so finden sich darin nur  $2 \cdot 10^{12}$  Moleküle/ $\text{mm}^2$ , entsprechend  $\sim 10^{-9}$  g. Trotz dieser Beschränkung haben es Henn und Thompson [37] unternommen, mit Tracermethoden Lecithin-Decan-Membranen auf ihre Zusammensetzung zu untersuchen. Sie fanden in

der Membran ein Lecithin : Decan-Verhältnis von 1 : 10 verglichen mit 1 : 700 in der membranbildenden Lösung (0.5 % Lecithin in Decan), so dass es scheint, dass sich das Lipid in der Membran anreichert und bevorzugt Lösungsmittel in die Randzone abwandert.

#### 2.4.5 Permeabilitätseigenschaften von Schwarzen Filmen

Entsprechend dem lipophilen Charakter der membranbildenden Komponenten ist zu erwarten, dass bevorzugt lipophile Substanzen die Membran durchdringen können.

Die theoretische Ableitung des Permeabilitätskoeffizienten  $P_d$  [38] zeigt erwartungsgemäss, dass  $P_d$  vor allem vom Verteilungskoeffizienten  $\gamma$  abhängt, da der Diffusionskoeffizient  $D$  wenig von der Struktur der permeierenden Substanz beeinflusst wird:

$$P_d = \frac{\gamma \cdot D}{d}$$

$\gamma$  = Verteilungskoeffizient

$D$  = Diffusionskoeffizient

$d$  = Membrandicke

Die Proportionalität zwischen  $P_d$  und  $\gamma$  konnte für zahlreiche Nichtelektrolyte annähernd bestätigt werden (vgl. Tab. 1); Ausnahmen bilden jedoch kleine, hydrophile Moleküle wie Harnstoff oder Wasser.

**Tab. 1:** Verteilungskoeffizient  $\gamma$  und Permeabilitätskoeffizient  $P_d$  verschiedener Nichtelektrolyte (nach [39])

Molekül	$\gamma^*$	$P_d^{**}$	$10 \cdot P_d / \gamma$
1,6 Hexandiol	$540 \cdot 10^{-6}$	$225 \cdot 10^{-6}$	4.2
Isobutyramid	370 "	198 "	5.4
1,4 Butandiol	43 "	20 "	4.6
H <sub>2</sub> O	42 "	573 "	136
Formamid	7.9 "	27 "	34
Harnstoff	3.5 "	0.61 "	1.7

\*  $\gamma$  = Verteilungskoeffizient zwischen n-Hexadecan und Wasser

\*\*  $P_d$  = Permeabilitätskoeffizient für Lecithin:Cholesterin(1:2)Membran

Die ausgesprochen hohe Durchlässigkeit der Membranen für Wasser hat viele Theorien über den Mechanismus der Wasser-Permeation aufkommen lassen. Einerseits liessen Experimente mit tritiiertem Wasser und osmotische Flussmessungen darauf schliessen, dass Schwarze Membranen eigentlich Wasserporen haben sollten [40], andererseits zeigen aber andere Experimente (z. B. Ionenpermeabilitäten) und der hohe elektrische Widerstand der Membran, dass diese Theorie unhaltbar ist [41,42], so dass bis heute die Frage nach dem eigentlichen Durchtrittsmechanismus von Wasser noch ungelöst ist.

Die Durchlässigkeit von unmodifizierten Schwarzen Membranen für Ionen ist hingegen ausserordentlich gering [43], ausgenommen für lipophile Ionen, entsprechend dem Grad ihrer Lipophilie.

Dies lässt sich jedoch schlagartig durch Zugabe von gewissen Substanzen (Modifikatoren) ändern, welche die Membran für gewisse Ionen mehr oder weniger selektiv durchlässig machen.

## 2.5. Liposomen

Beim Versuch, Lecithin-Suspensionen in wässrigem Medium für die Elektronenmikroskopie zu präparieren, beobachtete Bangham 1963 unter dem Lichtmikroskop Strukturen, die sich je nach osmotischen Eigenschaften und Ionenstärke der umgebenden Lösung änderten [44]. Genauere Untersuchungen dieses Sachverhaltes zeigten, dass sich die Lipide zu membranösen Strukturen organisierten. Obwohl analoge Beobachtungen auch von andern Forschern gemacht wurden [45,46], erkannte Bangham erstmals, dass dies ein weiteres Modellsystem für die Membranforschung sein könnte [47,48]. Tatsächlich wurde es auch zu einem der heute am häufigsten verwendeten Systeme bei Untersuchungen von Modellmembranen.



Verschiedene Vorteile gegenüber Schwarzen Membranen haben diesem System zum Durchbruch verholfen, unter anderem die einfache Präparation. Dazu wird in einem Rundkolben eine Lösung eines geeigneten Lipids in organischem Lösungsmittel (meist Chloroform oder Chloroform-Methanol) abgedampft und die auf dem Kolbenboden zurückbleibende Lipidschicht mit wässriger Lösung überschichtet. Nun folgt ein Prozess, der unter dem Polarisationsmikroskop ein farbenprächtiges Schauspiel bietet: In der Suspension formen sich sehr rasch selbständig Vesikel, die durch ihre doppelbrechende Eigenschaft im Mikroskop mit gekreuzten Polarisatoren in leuchtenden Regenbogenfarben erscheinen [49]. Dieser Bildungsprozess der Vesikel kann durch Schütteln oder durch Rühren mit einem Magnetstab unterstützt werden.

Die so gebildeten Strukturen sind abgeplattete oder gestreckte, zylindrische bis kugelförmige Gebilde, deren Wände aus einer Vielzahl von konzentrischen, bimolekularen Membranen bestehen und als multilamellare Liposomen bezeichnet werden (Fig. 5 A). Zwischen den Wänden und in ihrem Innern schliessen sie eine bestimmte Menge der Aussenlösung ein. Der Durchmesser dieser Liposomen ist ausgesprochen uneinheitlich und geht von ungefähr  $0.1\mu$  bis  $20\mu$  [50].

Die multilamellaren Liposomen können in diesem Zustand für Experimente verwendet oder durch Ultraschallbehandlung weiter modifiziert werden. Dabei wird die Lecithinsuspension während 10 - 30 Minuten

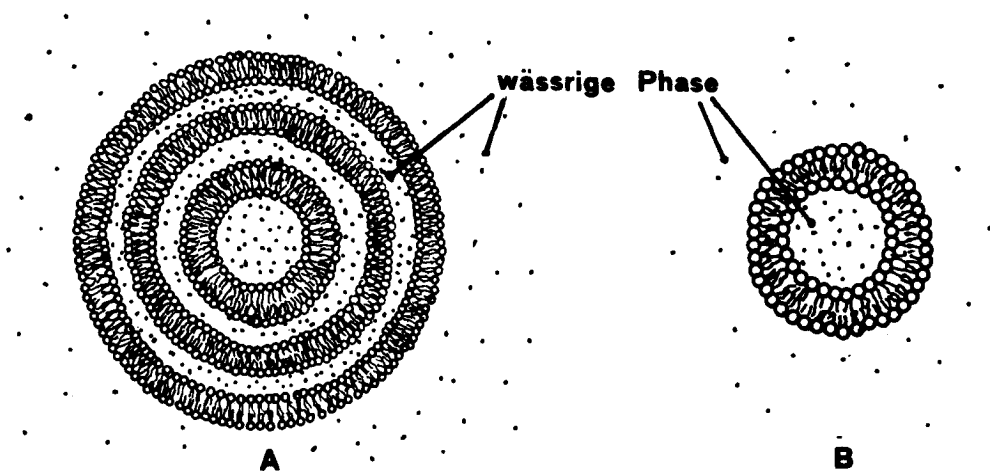


Fig. 5: Schematische Darstellung von Liposomen (A: multilamellare, B: monolamellare)

beschallt, und die multilamellaren Liposomen lagern sich in wesentlich kleinere Vesikel von einheitlicher Grösse um, die nun als wesentliches Charakteristikum nur mehr von einer einzigen Membranschicht umgeben sind. Die daraus resultierenden Liposomen haben eine einheitliche Grösse um 250 Å (Ei-Lecithin in 0.145 M NaCl) [51] und werden als monolamellare Liposomen bezeichnet (Fig. 5.B). Sie sind - unter der Bedingung, dass alle Operationen unter Inertgas ausgeführt wurden - ungefähr für eine Woche stabil [52].

Durch anschliessende Ultrazentrifugation bei 100'000 g werden noch vorhandene grössere Strukturen und Verunreinigungen abzentrifugiert (die monolamellaren Liposomen sedimentieren dabei nicht). Gelpermeation an Sephadex G25 erlaubt weiter, die Liposomen von ihrer anfänglichen Aussenlösung abzutrennen, da sie vom Innern des Gels ausgeschlossen sind und durch Elution mit isoosmotischer Lösung mit dem Leervolumen erscheinen.

Trotz der etwas aufwendigeren Präparationstechnik werden monolamellare Liposomen häufiger verwendet da einige schwerwiegende Nachteile gegen die Verwendung von multilamellaren Liposomen sprechen. Einmal sind hier die bereits erwähnte sehr uneinheitliche Grösse der multilamellaren Liposomen und die unbekannte Anzahl von Lamellen pro Liposom zu nennen, die eine Bestimmung von absoluten Parametern bei Ausflussmessungen sehr erschweren. Ein weiterer ernsthafter Nachteil liegt darin, dass einige dieser Partikel - vermutlich auf Grund von spiralig aufgewundenen Membranen - Defekte enthalten, durch welche Innenlösung ausfliessen kann [51]. Dazu kommt bei multilamellaren Liposomen noch das 5 - 6 mal geringere Verhältnis von äusserer Oberfläche zu Innenvolumen [49].

Dem gegenüber sind die monolamellaren Liposomen dank ihrer sehr einheitlichen Grösse ausserordentlich geeignet für Flusseexperimente. Weitere Vorteile sind auch ihre dichten Membranen und die hohe

Membranoberfläche, die mit  $2950 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$  Lipid (Lecithin) [49, 51] ohne weiteres erlaubt, Membranoberflächen von einigen Quadratmetern pro Milliliter Suspension zu erhalten.

Diesen Vorteilen stehen aber auch zwei Nachteile gegenüber. Zum einen wurde berichtet [53], dass durch die Beschallung ein merkbarer Abbau der Lipide erfolgen kann. Der zweite Nachteil ist durch die geringe Dimension der Liposomen bedingt: Bei einem Aussendurchmesser von  $250 \text{ \AA}$  und einer Membrandicke von  $46 \text{ \AA}$  [54] errechnet sich ein Innendurchmesser von  $158 \text{ \AA}$  und dadurch ein Innenvolumen von  $2.1 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^3$  pro Liposom [55]. Wird die Präparation der Liposomen beispielsweise in einer  $10^{-3} \text{ M}$   $\text{CaCl}_2$ -Lösung vorgenommen, so finden sich somit durchschnittlich 1.3  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen pro Liposom. Hier noch von einer eigentlichen  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration der Innenlösung zu sprechen, ist wohl vermessen. Gemäss den Gesetzen der Statistik, enthalten die einen Vesikel kein  $\text{Ca}^{++}$ -Ion, andere hingegen haben 4 oder vielleicht 5 Ionen eingefangen und somit ist die 'Innenkonzentration' keine einheitliche Grösse mehr.

Die Lösung dieses Problems scheint nur möglich zu sein, wenn die Liposomen als eine statistische Gesamtheit betrachtet und auf Grund ihrer grossen Zahl die einfachen Gesetze der Statistik anwendbar werden, was jedoch nicht ganz ohne Einschränkung der Fall zu sein scheint [49].

Tab. 2: Eigenschaften von Liposomen (Lecithin) ; (nach [55])

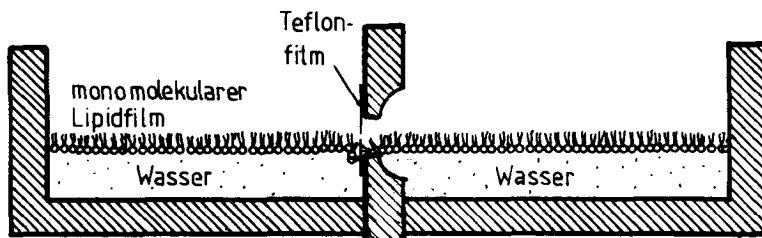
	monolamellare	multilamellare
Aussendurchmesser	$250 \pm 8 \text{ \AA}$	$0.1 - 20 \mu$ [50]
Membrandicke	$46 \text{ \AA}$	
Lecithinmoleküle/Vesikel	4000 **	
Moleküle an der Membranaussenseite	2820 ** (70.5 %)	
" " " Membraninnenseite	1180 ** (29.5 %)	
Totale Aussenoberfläche/ $\mu\text{Mol}$ Lipid	$2950 \pm 30 \text{ cm}^2$	$500 - 900 \text{ cm}^2$ [29,30]
Totales Innenvolumen/ $\mu\text{Mol}$ Lipid	$0.33 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$	

\*\* berechnete Werte

## 2.6. Lösungsmittelfreie planare bimolekulare Membranen

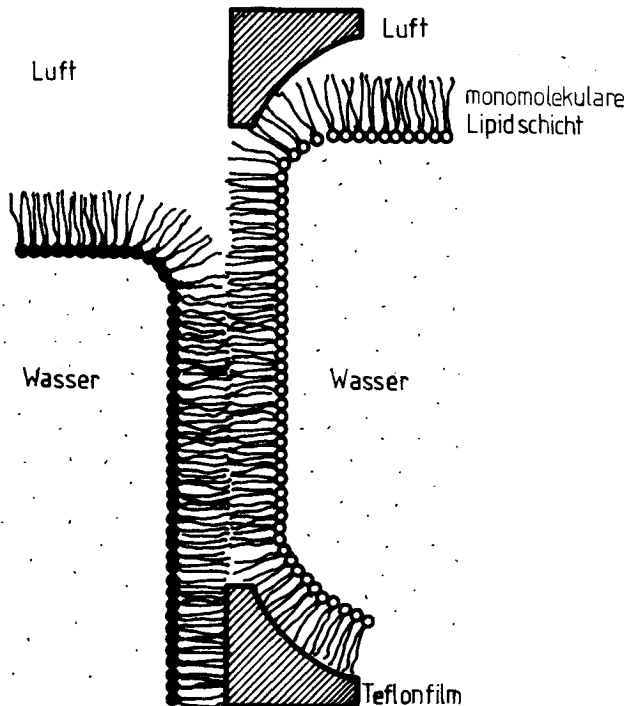
Zusätzlich zu den Modellsystemen der Schwarzen Filme und der Liposomen veröffentlichten 1972 Montal und Mueller [56] eine Methode, lösungsmittelfreie planare bimolekulare Membranen, ausgehend von monomolekularen Lipidschichten auf Wasser herzustellen. Die Idee, zwei monomolekulare Schichten zu bimolekularen Membranen zu vereinigen, wurde schon früher geäußert [57,58], aber erst durch Montal und Mueller wurde sie zu einer brauchbaren Methode.

Die Apparatur dazu besteht aus zwei Kammern, die durch eine Zwischenwand voneinander getrennt sind, und in deren Mitte eine grössere Oeffnung ausgespart ist (Fig. 6). Ueber die Oeffnung wird ein dünner Teflonfilm (ca. 0.01 mm dick) gespannt, in den mit einem glühenden Platindraht oder einer abgeschliffenen Spritzenadel ein kleines Loch (Durchmesser 0.1 - 0.5 mm) angebracht wird. Die beiden Kammern werden bis unterhalb des Loches mit Lösung gefüllt. Auf die saubere Wasseroberfläche wird beidseitig eine sehr geringe Menge eines Lipides, gelöst in einem leicht verdunstenden Lösungsmittel (z. B. Hexan, Chloroform), aufgebracht. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels bildet das Lipid auf der Wasseroberfläche einen monomolekularen Film.



**Fig. 6:** Apparatur zur Herstellung bimolekularer Membranen ausgehend von monomolekularen Lipidschichten

Durch Absenken der Trennwand oder einfacher durch Anheben der Flüssigkeitsspiegel mittels Einspritzen von wässriger Lösung in beide Kompartimente werden die beiden monomolekularen Filme von beiden



Seiten über die Teflonfolie und das darin eingefügte Loch gelegt (Fig. 7). Membranen, die die heikle Phase der Membranbildung überstehen, sind meist für Stunden stabil.

Die Methode bietet ausserdem eine attraktive Möglichkeit, asymmetrische Membranen durch Zusammenfügen von monomolekularen Schichten unterschiedlicher Lipide herzustellen. Dies ist vor allem interessant angesichts der Tatsache, dass viele biologische Membranen ebenfalls asymmetrisch gebaut sind (z. B. innere Mitochondrienmembran, Erythrocytenmembran) [1, 73].

**Fig. 7:** Bildung einer bimolekularen Membran aus zwei ungleichen monomolekularen Lipidschichten

### 2. 6. 1 Physikalische Eigenschaften

Die physikalischen Eigenschaften der so gebildeten Membranen sind denjenigen der Schwarzen Membranen recht ähnlich.

Der elektrische Widerstand ist mit  $10^6 - 10^8 \Omega \cdot \text{cm}^2$  gleich gross wie bei den Schwarzen Membranen [56]. Die Kapazität der lösungsmittelfreien Membranen ist hingegen deutlich höher und wird mit  $0.75 - 0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  [56, 59, 60] angegeben, was ungefähr der doppelten Kapazität von Schwarzen Membranen [29] entspricht. Damit erreichen diese Membranen die Kapazitätswerte, welche für biologische Membranen [29] angegeben werden. Auch in der Dicke unterscheiden sie sich deutlich von den Schwarzen

Membranen. Die Abmessung des Kohlenwasserstoffanteils in der Membran wird mit 26 Å (Dioleoyl-lecithin) [60] angegeben, was nur ungefähr der halben Länge von zwei gestreckten Kohlenwasserstoffanteilen entspricht. Wird für die polare Kopfgruppe eine Abmessung von 6 Å [61] eingesetzt, ergibt sich eine totale Membrandicke von 38 Å gegenüber 60 - 62 Å (Lecithin/Decan) [61] bei Schwarzen Membranen. Diese Diskrepanz wird dadurch erklärt, dass entweder Wasser tief in die lösungsmittelfreie Membran eindringen kann [59], das durch das Lösungsmittel bei Schwarzen Membranen ausgeschlossen bleibt, und somit eine geringere Dicke vorgetäuscht wird oder dass der Kohlenwasserstoffanteil in der Membran schraubenförmig aufgewunden ist [60].

## 2.7. Zusammenfassung und Diskussion der verschiedenen Modellsysteme

Die Methode der planaren bimolekularen Membranen (Schwarze Membranen und lösungsmittelfreie Lipidmembranen) erlaubt wegen der leichten Zugänglichkeit der beiden Kompartimente elektrische Messungen und die Veränderung der Zusammensetzung beidseits der Membran. Bei Liposomen sind solche Manipulationen unmöglich, da ihr Innenvolumen nicht zugänglich ist. Dem gegenüber bilden aber Liposomen die bevorzugte Methode für Flussmessungen, da ihre Membranoberfläche um Zehnerpotenzen grösser ist (einige  $\text{m}^2$  gegenüber einigen  $\text{mm}^2$ ).

Wesentliche Nachteile der Schwarzen Membranen sind ihre nicht genau bekannte Zusammensetzung und der Lösungsmittelgehalt, der es bis heute unmöglich gemacht hat, Membranproteine in funktioneller Form zu inkorporieren [62], da Proteine durch das Lösungsmittel vermutlich denaturiert werden [63]. Mit lösungsmittelfreien Membranen sind dagegen bereits einige Erfolge zu verzeichnen [64, 65]. Der Vorteil der Schwarzen Membranen gegenüber den lösungsmittelfreien liegt darin, dass sie problemloser hergestellt werden können und wegen ihrer höheren Stabilität mit wesentlich grösserer Oberfläche gebildet werden können ( $20 \text{ mm}^2$  gegenüber  $0.2 \text{ mm}^2$ ).

### 3. BIOLOGISCHE MEMBRANEN

#### 3.1. Historisches

Mitte des letzten Jahrhunderts beobachtete der Zürcher Botaniker K. Nägeli [70], dass Farbstoffe durch eine lichtmikroskopisch unsichtbare Schranke am Eintritt in lebende Zellen gehindert werden. Er schloss daraus auf die Existenz einer Barriere, der Plasmamembran, und vermutete, dass diese für das osmotische Verhalten einer Zelle verantwortlich sei. Im Jahre 1899 veröffentlichte Charles Overton in Zürich [2] die Ergebnisse seiner Beobachtungen über den Eintritt einer Reihe von Verbindungen in die Zelle. Er fand, dass mit abnehmender Polarität eines Moleküls die Eintrittsrate in die Zelle zunahm, und schloss daraus, dass die Zellmembran, welche die Eintrittsrate von Substanzen in die Zelle kontrolliert, von fettähnlicher Natur sei und dass Cholesterin und andere Lipide an ihrem Aufbau beteiligt seien. So wurde 1899 der Gedanke an eine Lipidmembran geboren, welche die Zelle umgibt.

Im Jahre 1925 extrahierten Gorter und Grendel [67] die Lipide einer genau bekannten Anzahl von Erythrocyten und bestimmten die Fläche, welche dieses Extrakt auf einer Wasseroberfläche beanspruchte. Von Langmuir's Experimenten [68] wussten sie, dass Lipide auf Wasser monomolekulare Schichten bilden. Aus dem errechneten Verhältnis von 2 : 1 (Lipidoberfläche auf Wasser : Erythrocytenoberfläche) schlossen sie, dass die Lipide in der Zellmembran in einer bimolekularen Schicht angeordnet sein müssen (Fig. 8 a).

Auf Grund von Messungen fanden 1935 Davson und Danielli [69], dass die Oberflächenspannung von Zellmembranen bedeutend geringer war, als es vom Modell der Doppelschichtmembran her zu erwarten wäre. Sie vermuteten daher, dass die Lipidmembran beidseitig mit Proteinen beschichtet sei (Fig. 8 b).

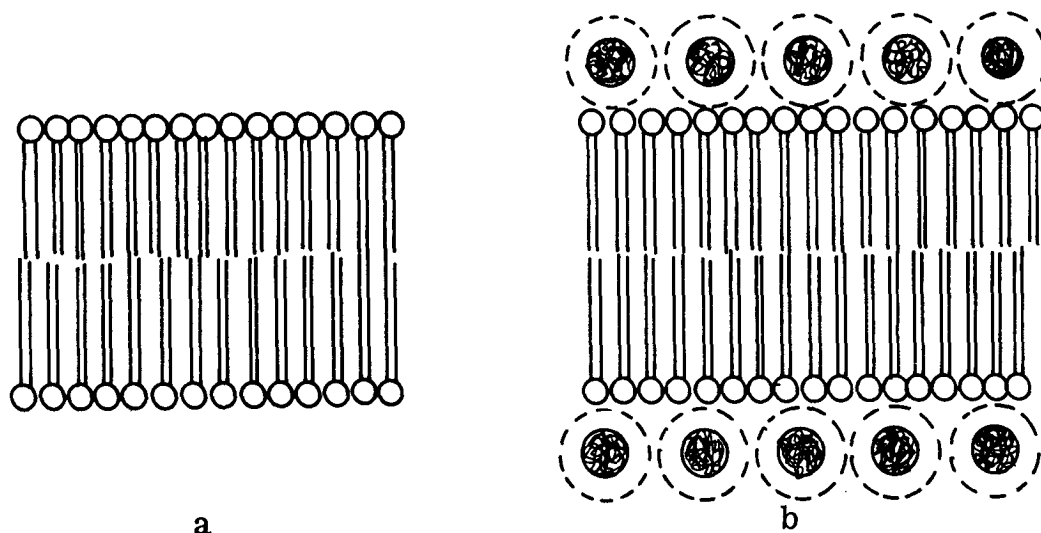


Fig. 8: Membranmodelle (a) nach Gorter und Grendel (1925)  
resp. (b) nach Danielli und Davson (1935)

Die Elektronenmikroskopie, die sich nach 1930 entwickelte, zeigte denn auch für biologische Membranen unterschiedlichster Herkunft die typische dreischichtige Anordnung, die mit Hilfe des Protein-Lipid-Protein-'Sandwich'-Modells von Davson und Danielli erklärt werden kann [70]. Die weite Verbreitung solcher, auf den ersten Blick sehr ähnlicher Membranen gab Robertson [71] Anlass um 1960 seine Vorstellungen über eine allgemein gültige Elementarmembran ('unit membrane'), die in pflanzlichen und tierischen Zellen verbreitet ist, zu entwickeln. Weiter zeigte die Elektronenmikroskopie aber auch, dass die Zelle nicht nur gegen aussen mit einer Elementarmembran abgeschlossen, sondern mit Membransystemen buchstäblich angefüllt ist, die alle diesem Bild der Elementarmembran entsprechen: Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Zellkern, Dictyosomen, Lysosomen etc.

Dieses Modell der Einheitsmembran wurde nur mehr geringfügig modifiziert. Beispielsweise wurde beobachtet, dass gewisse Proteine nur mit drastischen Methoden und oft unter Verlust ihrer biologischen Aktivität extrahiert werden können, während andere sich bereits mit milden Methoden entfernen lassen. Die schwer entfernbaren Proteine, sogenannte integrale Proteine, sind vermutlich in die Membran eingebaut. Grössere Proteine



dürften sogar die Membran durchdringen und üben möglicherweise Transportfunktionen aus. Die andern, leicht extrahierbaren Eiweisse, die peripheren Proteine, sind wahrscheinlich nur der Membranoberfläche angelagert und lassen sich zum Teil bereits durch Aenderung der Ionenstärke oder des pH-Wertes von der Membran entfernen [72].

Das neueste Membranmodell von Singer und Nicolson [73] berücksichtigt alle diese Beobachtungen und zeigt die integralen Proteine, die auf ihrer Oberfläche selbst hydrophile und hydrophobe Bereiche aufweisen, mit ihrem hydrophoben Teil in die bimolekulare Lipidmembran eingetaucht (Fig. 9). Die peripheren Proteine verbleiben wie bei den früheren Modellen an die Membranoberfläche angelagert. Die Lipidmoleküle selbst bilden die bekannte bimolekulare Membran, die aber recht flüssig (fluid) ist und den integralen Proteinen eine hohe Beweglichkeit erlaubt. Singer und Nicolson nennen deshalb dieses Modell selbst 'fluid mosaic model'.

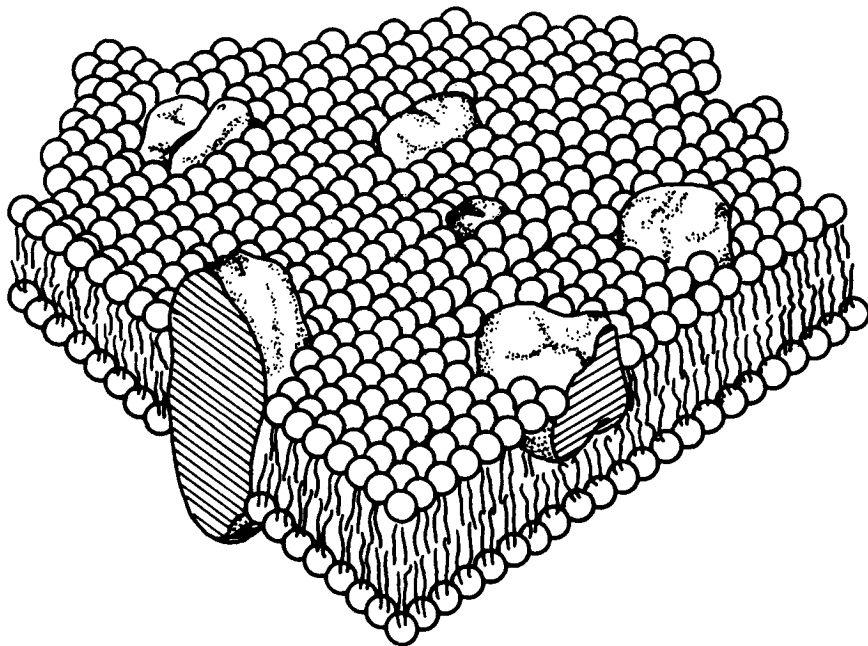


Fig. 9: 'Fluid mosaic'-Modell von Singer und Nicolson [73]

### 3. 2. Aufgaben und Zusammensetzung biologischer Membranen

Die äusserste Membran einer Zelle ist die Plasmamembran. Sie bildet ein Hindernis für den freien Durchtritt von Wasser und gelösten Stoffen. Ihre wichtigste Funktion besteht darin, die Zelle gegen das äussere Medium abzugrenzen. Durch sie kann die Zelle ein konstantes inneres Milieu ohne Rücksicht auf Veränderungen im Aussenmedium aufrechterhalten. Die Membran darf jedoch die Zelle nicht hermetisch von ihrer Umwelt abschliessen, sondern muss selektiven Austausch mit dem Aussenmedium ermöglichen. Vorrichtungen für den kontrollierten Eintritt von Nahrungstoffen in die Zelle und für die Ausschleusung von Abbauprodukten aus ihr heraus müssen vorhanden sein. Die Plasmamembranen müssen daher mit einer Reihe von Transportsystemen ausgestattet sein, mit deren Hilfe Moleküle die Membran in einer bestimmten Weise passieren können.

Weiter ist eine Zelle in submikroskopisch kleine Räume (Organelle) unterteilt. Die intrazellulären Membranen dienen als Mittel, um eine hohe lokale Konzentration an Substraten zu sichern, indem sie durch die Bildung von Organellen kleine Reaktionsräume, Kompartimente, schaffen. Die Eintrittsrate eines Substrates in ein Kompartiment und damit auch die Umsatzrate eines bestimmten Stoffwechselprozesses hängen von den Permeabilitätseigenschaften der Grenzmembran des betreffenden Kompartiments ab. Auf diesem Wege können Membranen einen kontrollierenden Einfluss auf den Ablauf metabolischer Reaktionen ausüben, wenn diese in Organellen vollzogen werden. Prozessabläufe, welche um einen gemeinsamen Metaboliten wetteifern, können voneinander getrennt werden, indem die entsprechenden Enzymsysteme in verschiedenen Kompartimenten untergebracht und ihre Reaktionsgeschwindigkeit durch eine unterschiedliche Eintrittsrate des Metaboliten kontrolliert werden. Somit erleichtert also ein gut entwickeltes intrazelluläres Membransystem die Kontrolle über Stoffwechselfvorgänge [70].

Um diese anspruchsvollen und vielfältigen Aufgaben erfüllen zu können, müssen die Membranen auch entsprechend unterschiedlich zusammengesetzt sein. Zur Illustration sei in Tab. 3 die Zusammensetzung einiger Membranen gezeigt.

Tab. 3 : Zusammensetzung einiger Membransysteme: Protein zu Lipid-Verhältnis und Zusammensetzung des Lipidanteiles (in % des Gesamtlipidgehaltes)

	Erythro- zyten [74]	Endopl. Retic. [75]	Mitochondrien [75]	
			innere	äussere
Protein:Lipid-Verhältnis (Gew.)	2.5:1	0.8:1	3.3:1	2.5:1
Phosphatidylcholin	23	48	37.5	
Phosphatidyläthanolamin	20	19	28.5	
Phosphatidylserin	11	4	2.5	
Sphingomyelin	18	5	0	
Cholesterin	25	5.5	2.5	
Rest	30	18.5	29	

Drei Beispiele sollen Art und Vielfältigkeit der Membranfunktionen demonstrieren: Die Erythrocytenmembran als Beispiel einer Plasmamembran, die Membran des Sarcoplasmatischen Reticulums und die Mitochondrienmembranen.

### 3.3. Die Erythrocytenmembran

Die Membran der Erythrocyten (rote Blutkörperchen) ist wohl die bestuntersuchte Membran, da sie leicht und in grossen Mengen zu gewinnen ist.

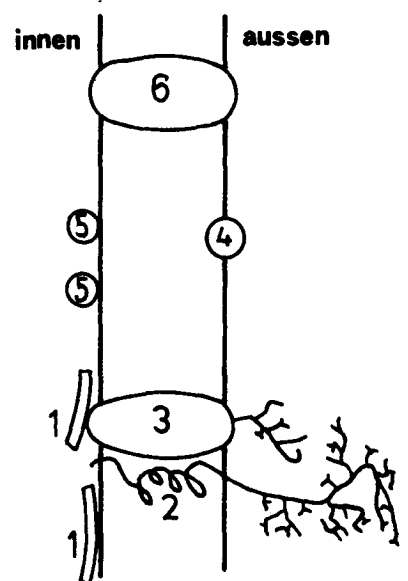
Erythrozyten sind kernlose Zellen ohne Zellorganelle; es sind also eher untypische Zellen. Die Membran enthält eine grosse Reihe von Enzymen, zeigt spezifische, gerichtete Transporteigenschaften und besteht aus einer Rei-

he von Lipiden und Proteinen, die von denen anderer Plasmamembranpräparate nicht stark verschieden sind [70].

Um die Membran zu isolieren, muss die Innenlösung der Zellen (Cytoplasma) mit ihrem hohen Hämoglobingehalt entfernt werden, ohne dabei die Membran allzusehr zu zerstören. Dazu werden die Zellen in destilliertes Wasser gegeben, in dem sie aufschwellen und leck werden. Dadurch diffundieren das Hämoglobin und die anderen cytoplasmatischen Bestandteile hinaus (Hämolyse). Die so präparierten Erythrocyten werden 'Ghosts' genannt. In isotoner Kochsalzlösung schrumpfen sie wieder auf ihre normale Grösse, und ihre Membranen kehren in den normalen, relativ impermeablen Zustand zurück.

Die Erythrocytenmembran ist ein klassisches Beispiel einer asymmetrischen Membran. Sie enthält 7-9 Hauptprotein-komponenten mit Molmassen zwischen  $3 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^5$ . Ungefähr 30 % davon werden durch das Spectrin repräsentiert, welches sich ausschliesslich auf der inneren Membranoberfläche befindet und leicht entfernbar ist (peripheres Protein). Weitere 30 % bilden zwei Glycoproteine, die sog. Band-III-Komponente und das Glycophorin.

Beide durchdringen die Membran (integrale Proteine) und besitzen einen Zuckerteil, der auf der äusseren Membranseite herausragt. Der Kohlehydratanteil des Glycophorin bildet einen Teil der Blutgruppenspezifität [70].



**Fig.10:** Schematische Darstellung einer Erythrocytenmembran. 1: Spectrin, 2: Glycophorin, 3: Band-III-Protein, 4, 5: weitere Enzyme, 6:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [70]

Ein weiteres integrales Membranprotein ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ein Transportsystem, welches unter Verbrauch von ATP aktiv  $\text{Na}^+$  aus den

Erythrocyten und  $K^+$  in die Zellen pumpt [70]. Ein weiteres Transportsystem scheint auch für  $Ca^{++}$  vorhanden zu sein, da über der Erythrocyten-Membran ein  $Ca^{++}$ -Gradient von  $10^3 - 10^4$  besteht ( $Ca^{++}$ -Konzentration innen  $< 10^{-6}$  M) [63, 76].

### 3.4. Das sarcoplasmatische Retikulum

Normale Zellen sind von einem weitverzweigten Membransystem, dem endoplasmatischen Retikulum, durchzogen. Seine Aufgabe ist die Synthese verschiedener Stoffwechselprodukte, aber auch die Verteilung von Biosyntheseprodukten. In den Muskelzellen ist dieses Membransystem zum sogenannten sarcoplasmatischen Retikulum (SR) umgewandelt worden, das eine zentrale Rolle in der Auslösung von Muskelkontraktionen spielt.

Unter normalen Bedingungen ist die  $Ca^{++}$ -Konzentration im Cytoplasma einer Muskelzelle ausserordentlich gering ( $< 2 \cdot 10^{-7}$  M). Erregt ein Nervenimpuls die Muskelzelle, steigt die intrazelluläre  $Ca^{++}$ -Konzentration durch Ausströmen von  $Ca^{++}$  aus dem SR innerhalb Sekundenbruchteilen dramatisch an, weil die Permeabilität der Membran für  $Ca^{++}$  stark zunimmt. Diese erhöhte  $Ca^{++}$ -Konzentration löst die Muskelkontraktion aus. Wenn die Nervenimpulse aufhören, kehrt die SR-Membran in ihren ursprünglichen Zustand zurück. Das ausgeströmte  $Ca^{++}$  wird aktiv unter ATP-Verbrauch durch ein  $Ca^{++}$ -Transportsystem ( $Ca^{++}$ -ATPase) ins SR zurückgebracht, und die ursprüngliche, niedrige  $Ca^{++}$ -Konzentration im Zellplasma stellt sich wieder ein [1].

Dieser energieverbrauchende Transport von  $Ca^{++}$  in das SR kann direkt mit biochemischen Methoden verfolgt werden.

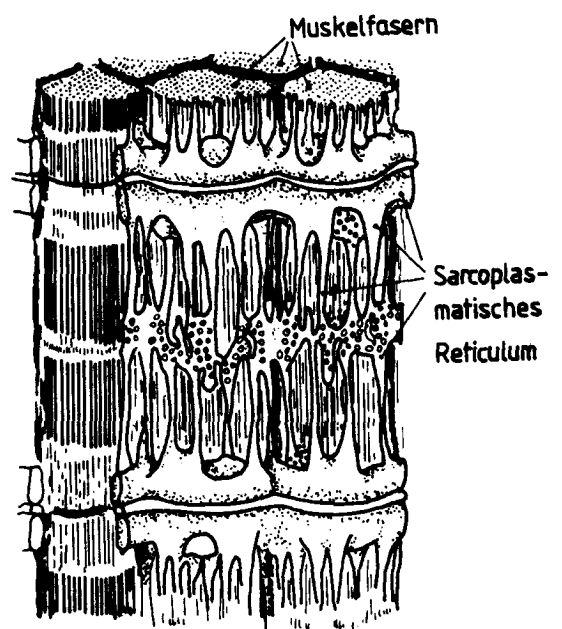


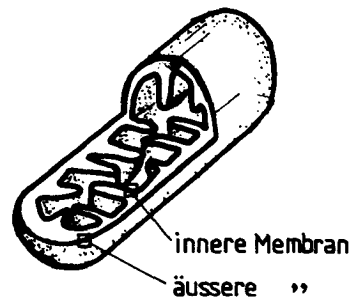
Fig. 11: Sarcoplasmatisches Retikulum

Bei der Homogenisation von Skelettmuskeln wird das SR zu kleinen, in sich geschlossenen Vesikeln fragmentiert, die durch Differentialzentrifugation leicht isoliert werden können. Suspensionen solcher Vesikel akkumulieren zugegebenes  $\text{Ca}^{++}$  sehr rasch in Gegenwart von genügend ATP und einem passenden Anion (z. B.  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Für jedes hydrolysierte ATP werden zwei  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen zusammen mit Phosphat akkumuliert. Solche Vesikelpräparationen können  $\text{Ca}^{++}$  aus dem umgebenden Medium bis zu einer Konzentration von  $<10^{-7}$  M entfernen [1, 77].

### 3.5. Die Mitochondrien

Mitochondrien sind mit einer Abmessung von 1 - 2  $\mu$  die grössten Zellorganelle. Ihre Anzahl pro Zelle scheint für jeden Zelltyp ungefähr konstant zu sein. In einer Rattenleberzelle z. B. befinden sich ungefähr 800 Mitochondrien [1].

Mitochondrien besitzen zwei Membranen, deren innere Einbuchtungen, sogenannte Cristae, aufweist (Fig. 12). Im Innern der Mitochondrien, der sogenannten Matrix, findet sich eine gelartige Phase, die zu ungefähr 50 % aus Proteinen besteht. In den Mitochondrien finden sich hauptsächlich die Enzyme des Citronensäurezyklus, der Atmungskette (= Elektronentransportkette) und der oxydativen Phosphorylierung. Hier vollzieht sich die Gewinnung von chemischer Energie; deshalb werden die Mitochondrien auch als 'Kraftwerke' der Zelle bezeichnet [78, 108].



**Fig. 12:** Schematische Darstellung eines Mitochondriums

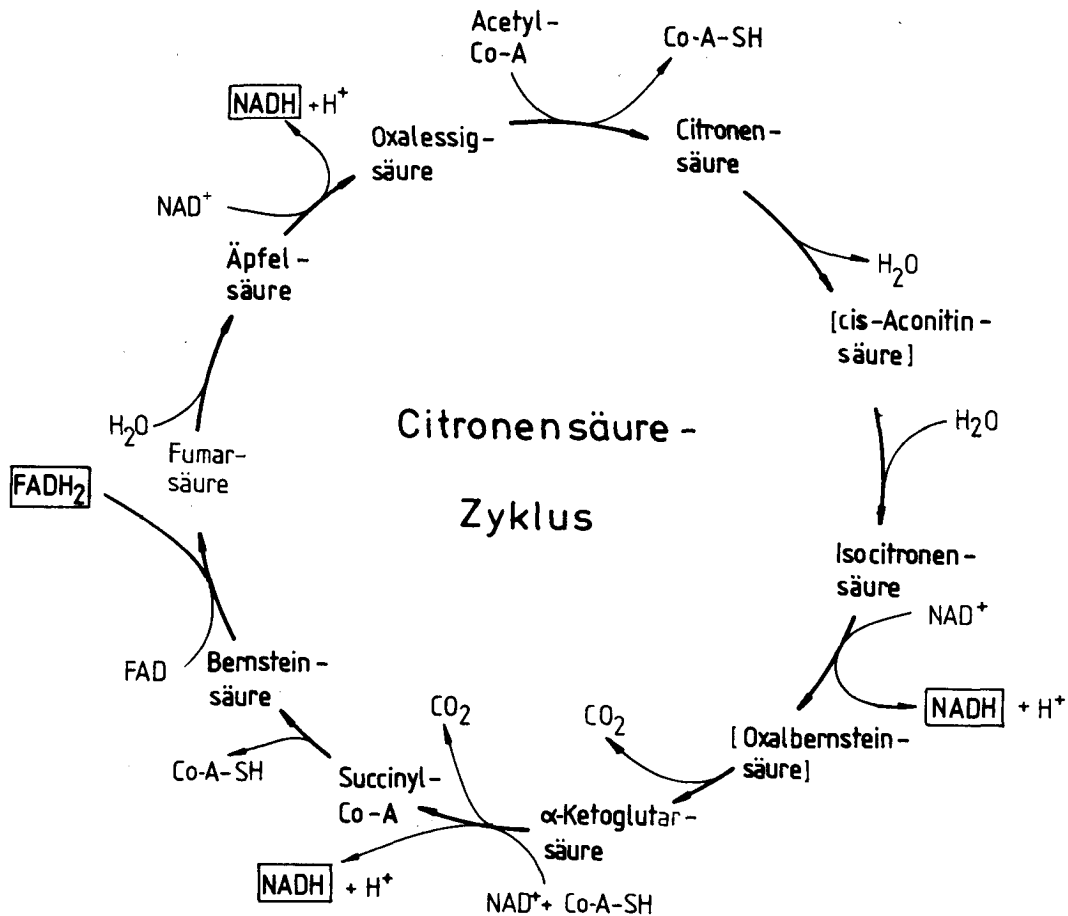
Wegen der hohen Stoffwechselrate in den Mitochondrien findet ein reger Stoffaustausch durch die Mitochondrienmembran statt: Pyruvat, Carbon-säuren, ADP und Phosphat werden ständig eingeschleust,  $\text{CO}_2$  und ATP werden an das Zellplasma abgegeben.

Die beiden Mitochondrienmembranen unterscheiden sich in ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrem Permeabilitätsverhalten und ihrer Enzy-mausstattung stark von einander (vgl. auch Tab. 3). Die äussere Membran besteht zu ungefähr 50 %, die innere gar zu ungefähr 80 % aus Proteinen. Die Enzyme der Atmungskette und der oxydativen Phos-phorylierung sind in der inneren Membran lokalisiert, diejenigen des Citronensäurezyklus befinden sich zum grössten Teil in der Matrix.

Die äussere Mitochondrienmembran ist für die meisten gelösten Stoffe frei permeabel. Die innere Membran besitzt diese Durchlässigkeit nicht, verfügt aber über spezifische Transportsysteme für Stoffe wie Phosphat, ADP, ATP, Dicarbonsäuren, Tricarbonsäuren, bestimmte Aminosäuren und  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen. Diese Stoffe können auch gegen einen bestehenden Kon-zentrationsgradienten transportiert werden [1].

### 3.5.1 Der Citronensäurezyklus

Der Citronensäurezyklus (Krebs-Zyklus, Tricarbonsäurezyklus) läuft in der Mitochondrienmatrix ab. Er hat die Aufgabe, das Pyruvat resp. Acetyl-CoA, das von der Glycolyse, vom Fettsäure- resp. Aminosäuren-Abbau stammt, unter Gewinnung von NADH und  $\text{FADH}_2$  zu  $\text{CO}_2$  zu oxydieren (Fig. 13).



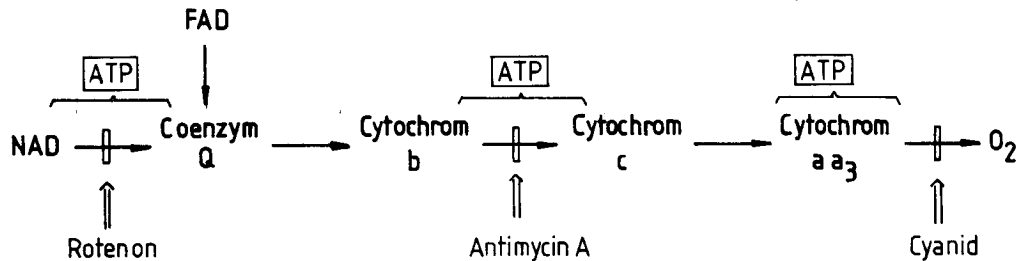
**Fig. 13:** Der Citronensäure-Zyklus (Tricarbonsäure-Zyklus, Krebs-Zyklus)

### 3.5.2. Die Atmungskette und oxydative Phosphorylierung

Die Enzyme dieser beiden Prozesse sind in die innere Mitochondrienmembran eingebaut. Die Atmungskette (Elektronentransportkette) überträgt die Reduktionsäquivalente von NADH resp. FADH<sub>2</sub>, die im Citronensäurezyklus gebildet wurden, über eine ganze Reihe von Enzymen (von denen jedes ein geringeres Redoxpotential besitzt als das vorhergehende) auf Sauerstoff (Fig. 14) [108]. Dabei werden pro umgesetztes Elektronenpaar 3 ATP gebildet.

Die Atmungskette lässt sich an verschiedenen Stellen mit spezifischen Inhibitoren hemmen (vgl. Fig. 14, Fig. 15).

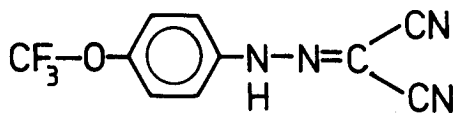




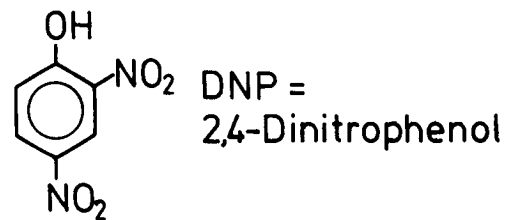
**Fig. 14:** Vereinfachte Abfolge der Enzyme der Atmungskette mit Wirkungsort von Inhibitoren und wahrscheinlichen Orten der ATP-Synthese (Reihenfolge der Enzyme nicht gesichert).

Durch sogenannte Entkoppler (z. B. DNP, FCCP, siehe Fig. 15) lässt sich jedoch die ATP-Synthese, auch oxydative Phosphorylierung genannt, blockieren, ohne die Atmungskette zu beeinflussen: Die Atmungskette ist von der oxydativen Phosphorylierung entkoppelt [1].

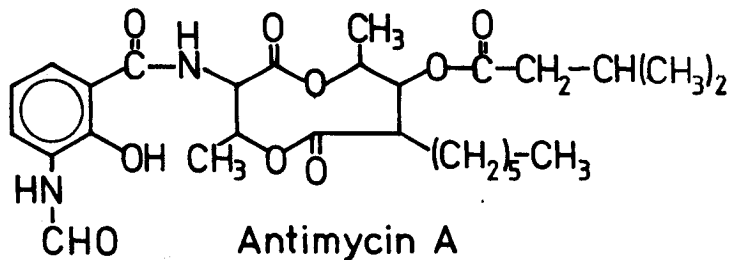
**Fig. 15:** Moleküle verschiedener auf die oxydative Phosphorylierung einwirkender Substanzen



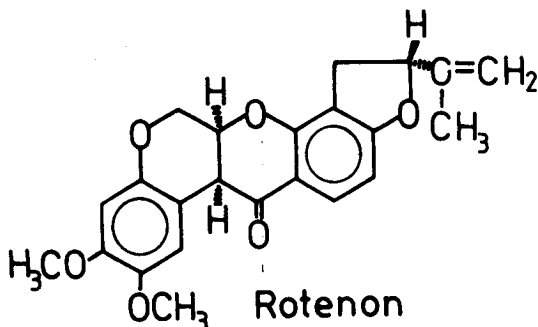
FCCP = Carbonylcyanid -  
p-trifluoromethoxyphenylhydrazon



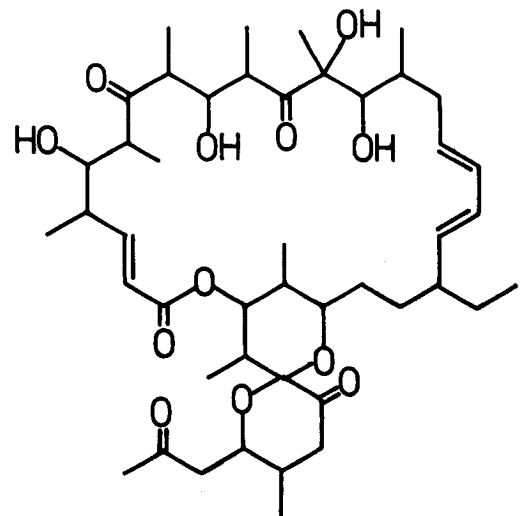
DNP =  
2,4-Dinitrophenol



Antimycin A



Rotenon



Oligomycin B

### 3.5.3 Kopplung der Atmungskette mit der oxydativen Phosphorylierung: Die chemiosmotische Hypothese

Die Theorie über die Kopplung von Atmungskette und oxydativer Phosphorylierung, die heute am meisten Anhänger hat, ist die 1961 von Mitchell [79,80,82] aufgestellte chemiosmotische Hypothese. Sie postuliert über der innern Mitochondrienmembran einen durch die Atmungskette erzeugten pH-Gradienten. Durch die asymmetrisch angeordneten Membranenzyme werden von der Innenseite der Mitochondrien Protonen aufgenommen und auf die Aussenseite abgegeben (Fig. 16). Dadurch wird im Vergleich zur Matrix das Aussenmedium sauer. Als Folge des pH-Gradienten baut sich über der Membran ein Potentialgradient von  $\sim 220$  mV (innen negativ) auf. Die Energie dieser Gradienten wird zur ATP-Synthese gebraucht, deren Ablauf noch weitgehend unbekannt ist [1, 108].

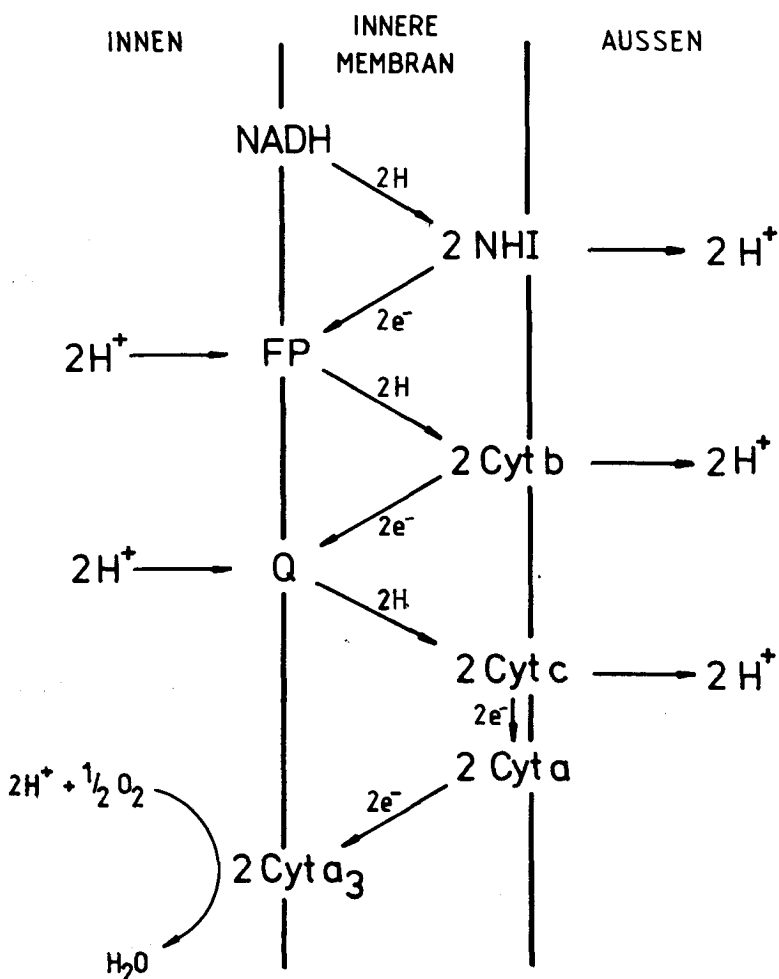


Fig. 16 :

Atmungskette nach der chemiosmotischen Hypothese. In Vergleich zu Fig. 14 sind die Anzahl und die Reihenfolge einiger Enzyme geändert.

NHI: Fe-haltiges Enzym  
ohne Häm-Gruppe  
(Non-heme-iron)

FP: Flavoprotein

Cyt: Cytochrom

Q: Coenzym Q

Diese Theorie erklärt die meisten experimentellen Befunde.

- Sie erklärt, warum Entkoppler, die schwache, lipidlösliche Säuren mit einem pK im Bereich des physiologischen pH sind, die ATP-Synthese, nicht aber die Atmungskette blockieren: Entkoppler wirken als Protonencarrier und bauen den pH-Gradienten wieder ab [81].
- Sie erklärt, warum für die ATP-Synthese intakte, geschlossene Vesikel nötig sind, da sonst die Gradienten über das Leck abgebaut werden.
- Sie erklärt, warum Oligomycin - ein Inhibitor für das ATP-synthetisierende Enzym - die Atmungsrate reduziert, da die akkumulierten Protonen auf die Atmungskette rückwirken. Die Zugabe eines Entkopplers kann jedoch die Atmungskette wieder stimulieren.
- Sie erklärt, warum neutrale Ionencarrier (wie z. B. Valinomycin) ebenfalls entkoppelnd wirken können, da sie den Potentialgradienten abbauen.

#### 3.5.4 Andere Wege der Energieverwendung

Anstatt zur ATP-Synthese kann die durch die Atmungskette bereitgestellte Energie auch für andere Prozesse gebraucht werden. Es können mit spezifischen Pumpen Stoffwechselprodukte aktiv durch die Membran transportiert werden. Ein anderes System pumpt aktiv  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen in die Mitochondrien. Diese  $\text{Ca}^{++}$ -Pumpe wird durch den Inhibitor Rutheniumrot  $[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6$  oder  $\text{La}^{3+}$  blockiert [1, 104, 106, 107].

#### 3.6. Vergleich von biologischen Membranen mit künstlichen Modellmembranen

Wie die besprochenen Beispiele deutlich zeigen, bestimmen die Proteine oft wesentlich die Membraneigenschaften. Andererseits bilden sie aber auch häufig die grosse Unbekannte, da ihre Eigenschaften

noch weitgehend unerforscht sind.

Dieser unbekannte Einfluss der Proteine zwingt die Membranforschung häufig dazu, das Studium von grundlegenden Eigenschaften an einfacheren Modellen, wie sie in Kapitel 2 dargestellt wurden, auszuführen. Doch sind die Resultate dieser Experimente mit Vorsicht aufzunehmen und nur beschränkt auf biologische Membranen übertragbar. Diese Modellmembranen geben ja nur einen Teilaspekt, nämlich denjenigen der bimolekularen Lipidregionen der Biomembranen wieder. Was die Proteine, die oft mehr als die Hälfte der Membranmasse ausmachen, zu den Membraneigenschaften beitragen, wird dabei leicht übersehen.

Trotz der starken Vereinfachung, die mit diesen Modellen verbunden ist, sind die physikalischen Eigenschaften der Modellmembranen und biologischen Membranen einander erstaunlich ähnlich. Der auffallendste Unterschied liegt im elektrischen Widerstand, der bei Biomembranen  $10^3 - 10^4$  mal geringer ist. Doch kann, wie schon in Kapitel 2.4. erwähnt wurde, durch Zugabe von Modifikatoren der Widerstand von Modellmembranen demjenigen von Biomembranen leicht angeglichen werden.

**Tab. 4:** Gegenüberstellung der Eigenschaften von Modellmembranen und biologischen Membranen

	lösungsmittelhaltige bimolekulare Membranen	lösungsmittelfreie bimolekulare Membranen	biologische Membranen
Zusammensetzung	Lipid + Lösungsmittel	Lipid	Lipid + Protein
Dicke	60 - 80 Å [29]	40 Å [61]	30 - 150 Å [29]
el. Widerstand [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	$10^6 - 10^8$ [29]	$10^6 - 10^8$ [56]	$10^2 - 10^5$ [56]
el. Kapazität [ $\mu\text{F cm}^{-2}$ ]	0.5 [29]	0.9 [59]	0.8 - 1.2 [56]
Wasserdurchlässigkeit [ $10^{-4}\text{ cm s}^{-1}$ ]	8 - 50 [29]	32 [75]	0.25 - 400 [29]
Oberflächen-spannung [ $\text{erg cm}^{-2}$ ]	0.2 - 6.0 [29]	0.5 - 2 [75]	0.03 - 3.0 [29]

## 4. EIGENSCHAFTEN VON CARRIERN

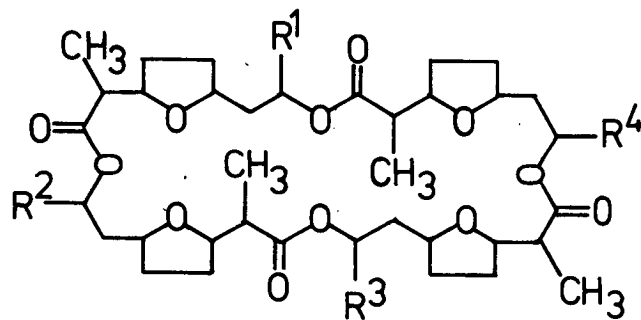
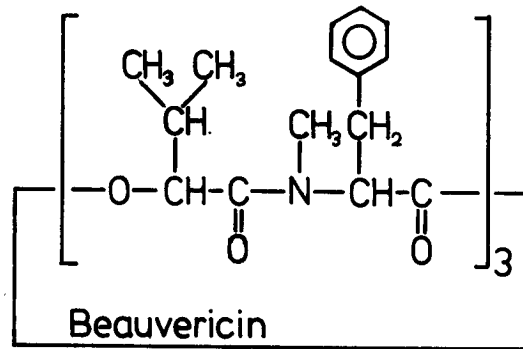
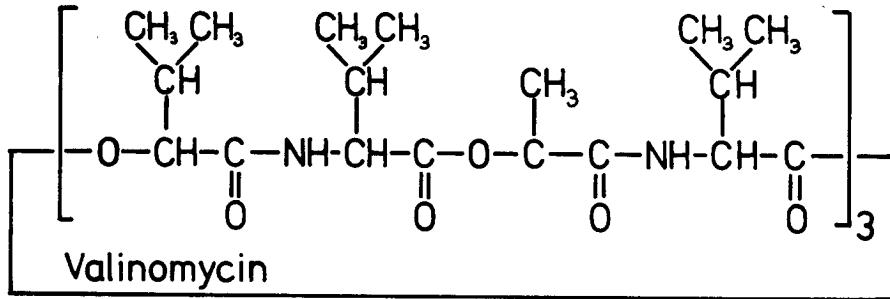
### 4.1. Komplexbildner für einwertige Ionen

Im Jahre 1966 konnte mittels EMK-Messungen gezeigt werden [10], dass die Ionenselektivität gewisser Antibiotika, welche als Carrier einen spezifischen Transport von Alkaliionen durch biologische Membranen [4,83] und künstliche Modellmembranen [11,12,84] ermöglichen, weitgehend auf selektive Komplexbildung zurückzuführen ist [85].

Anfangs wurde vor allem das Verhalten dieser Komplexbildner gegenüber Alkaliionen untersucht. Zum Teil fand man beachtliche Selektivitäten zugunsten bestimmter einwertiger Ionen [16,17]. Im Laufe der Zeit wurde eine ganze Reihe von geladenen und ungeladenen Komplexbildnern entdeckt [5].

Unter den ungeladenen ist in erster Linie der hochselektive  $K^+$ -Carrier Valinomycin [86] (Fig. 17) zu nennen. Weiter wurden Beauvericin [87], die Makrotetrolide [88] (Fig. 17) und einige andere Komplexbildner [5] gefunden. Alle diese Moleküle sind zyklische Verbindungen und bilden, da sie selbst neutral sind, positiv geladene Komplexe.

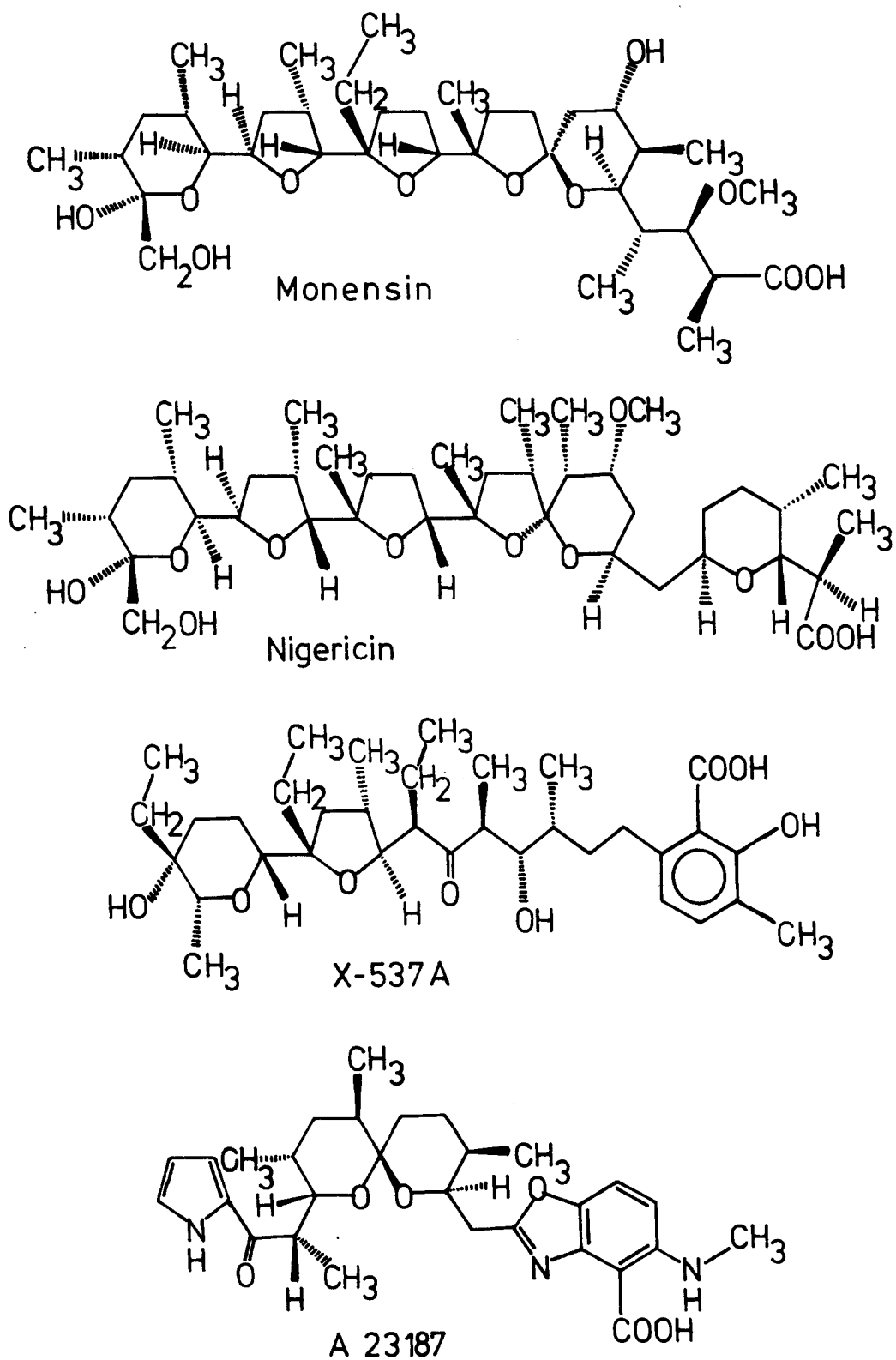
Die geladenen Carrier weisen als wesentliches Charakteristikum eine freie Carboxylatgruppe auf. Unter ihnen findet sich Monensin [89] (Fig. 18), der einzige Komplexbildner, der  $Na^+$  schwach bevorzugt, sowie auch Nigericin [90] und X-537A [91] (Fig. 18). Die Komplexe dieser Moleküle mit einwertigen Kationen sind neutral, da in den Komplexen die Liganden als Carboxylatanionen vorliegen.



MAKROTETROLIDE :

$R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = \text{CH}_3$	Nonactin
$R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$	$R^4 = \text{C}_2\text{H}_5$ Monactin
$R^1 = R^2 = \text{CH}_3$	$R^3 = R^4 = \text{C}_2\text{H}_5$ Dinactin
$R^1 = \text{CH}_3$	$R^2 = R^3 = R^4 = \text{C}_2\text{H}_5$ Trinactin
$R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = \text{C}_2\text{H}_5$	Tetranactin

Fig. 17 : Konstitution elektrisch neutraler Komplexbildner



**Fig. 18** : Struktur carboxylgruppenhaltiger Komplexbildner

## 4.2. Komplexbildner für zweiwertige Ionen

Um 1970 wurde das Verhalten der Antibiotika auch gegenüber zweiwertigen Ionen intensiver untersucht. Dabei wurden einige gute Komplexbildner für Erdalkalitionen gefunden.

Diese Untersuchungen zeigten, dass die beiden Alkaliionen-Carrier X-537A [92 - 94] und Beauvericin [8] auch fähig sind, Erdalkalitionen zu komplexieren. Dieselbe Eigenschaft wurde am neuentdeckten Antibiotikum A 23187 [6] (Fig. 18) gefunden, dessen Struktur erst kürzlich [95] aufgeklärt wurde. Ferner wurde beobachtet, dass das Fungizid Avenaciolid [9, 96] (Fig. 19), ein ungeladenes

Tab. 5: Eigenschaften erdalkalitionen-komplexierender Liganden

Ligand	Stöchiometrie Ion : Ligand	Selektivitätsreihe	Methode
X-537 A	1:2 [93]	Ba » Sr » Ca » Mg	Komplexstabilität [93]
	1:2 [99]	Mg ≈ Ca ≈ Sr » Ba	Bulkphasetransp. ** [93]
	1:2, 1:1* [98]	Mg ≈ Ca ≈ Sr » Ba	Schwarze Membr. [93]
		Ba » Ca » Sr » Mg	Schwarze Membr. [99]
		H » Cs » Rb, K » Na » Li	Schwarze Membr. [99]
A 23187	1:2 [100]	Ca » Mg » Sr » Ba	Extraktion [100]
	1:2 [98]	Li » Na » K ≈ 0	Extraktion [100]
Beauvericin	2:2 oder	Ca » K » Cs » Li » Na	Liposomen [8]
	4:4 [101]	Rb » Ba » K » Na » Ca » Li	Bulkphasetransp. ** [101]
Avenaciolid	1:3 - 1:10 [7]	(transportiert Mg, Ca und K)	Mitochondrien und Extraktion [96]

\* bei kleinen Ligandkonzentrationen ( $< 10^{-5}$  M)

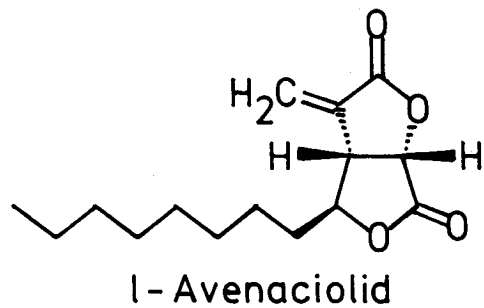
\*\* Transport durch dicke, organische Phasen



Molekül, Erdalkalitionen durch biologische Membranen transportieren kann. Ueber seine weiteren Eigenschaften, insbesondere über die Komplexbildungseigenschaften, ist jedoch bis heute recht wenig bekannt geworden [7]. Die Eigenschaften dieser Komplexbildner bezüglich Selektivität und Stöchiometrie sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Fig. 19 :

Struktur des Fungicides  
l-Avenaciolid



Mit diesen vier Liganden ist die Auswahl an natürlich vorkommenden Verbindungen, die fähig sind Erdalkalitionen zu transportieren, bereits erschöpft. Es ist daher recht attraktiv, ihnen einige synthetische Verbindungen zuzufügen.

### 4.3. Porenbildende Moleküle

Neben diesen eigentlichen Carriern wurden einige Substanzen gefunden, die bimolekulare Membranen für Ionen durchlässig machen können, indem sie Poren bilden. Die bekanntesten darunter sind Alamethicin [109] und Gramacidin A [110,111].

Die Moleküle bauen schraubenförmige Strukturen auf, die einen 'Tunnel' bilden, der mit polaren Atomgruppen ausgekleidet ist. Diese Strukturen durchspannen die Membran vollständig und erlauben den Ionen den Durchtritt. Es konnte gezeigt werden, dass solche porenbildende Moleküle nur in bimolekularen Membranen Ionenpermeabilität erzeugen. Dickere Membranen bleiben unbeeinflusst [112].

### 4.4. Allgemeine Anforderungen an Ionencarrier

Moleküle mit der Fähigkeit, Ionen zu komplexieren und durch lipophile Membranen zu transportieren, die deshalb auch Ionophore oder Ionencarrier genannt werden, sind im allgemeinen Moleküle mit eher geringer Molmasse, die sich ausserdem durch folgende Eigenschaften auszeichnen sollen [5,17,102,103]:

1. Ein Carriermolekül muss aus polaren und unpolaren Molekülgruppen zusammengesetzt sein.
2. Das Molekül soll eine stabile Konformation einnehmen können, die im Innern eine Kavität aufweist, welche mit den polaren Atomgruppen ausgekleidet und geeignet ist, Ionen aufzunehmen. In dieser Konformation sollen die unpolaren Gruppen nach aussen zeigen und dem Molekül Lipidlöslichkeit verleihen.
3. Für Carrier von Alkali- und Erdalkaliionen gilt: Unter den polaren Atomgruppen, die die Kavität auskleiden, sollen mehrere Koordinationsstellen, im allgemeinen Sauerstoffzentren, enthalten sein. Die Anzahl dieser Ligandgruppen soll in der Regel zwischen 5 und 8 liegen, aber 12 nicht übersteigen.

4. Zur Erreichung einer hohen Selektivität sollen die polaren Ligandgruppen möglichst starr um den Hohlraum angeordnet sein. Dies kann durch überbrückte Strukturen bzw. Wasserstoffbrücken erreicht werden. Jenes Kation, das innerhalb derselben Elementgruppe im Periodensystem am besten in diesen Hohlraum passt, wird durch den Liganden bevorzugt komplexiert.
5. Im Gegensatz zu diesem Erfordernis soll der Ligand aber so flexibel sein, dass die Kinetik der Komplexbildungs- und Komplextrennungsreaktion genügend schnell ist. Dies ist nur möglich, wenn die Lösungsmittelhülle des Kations schrittweise durch die Ligandgruppen substituiert wird.
6. Um eine genügend hohe Beweglichkeit zu erlangen, sollen die äußeren Abmessungen des Carriers relativ bescheiden sein.

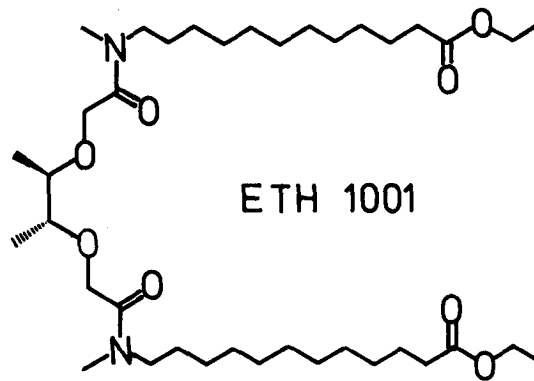
Zur Erreichung bestimmter Selektivitäten müssen weitere Forderungen erfüllt sein [17, 102, 103]:

7. Neutrale Liganden, die für  $\text{Li}^+$  oder  $\text{Na}^+$  selektiv sind, dürfen maximal 6 koordinierende Ligandatome aufweisen.
8. Ungeladene Liganden, welche Erdalkalitionen (ausgenommen  $\text{Be}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ ) komplexieren, sollen bei möglichst geringer Ausdehnung eine relativ hohe Koordinationszahl aufweisen und andererseits in Lösungsmitteln mit relativ hoher Dielektrizitätskonstante ( $\geq 10$ ) eingesetzt werden.

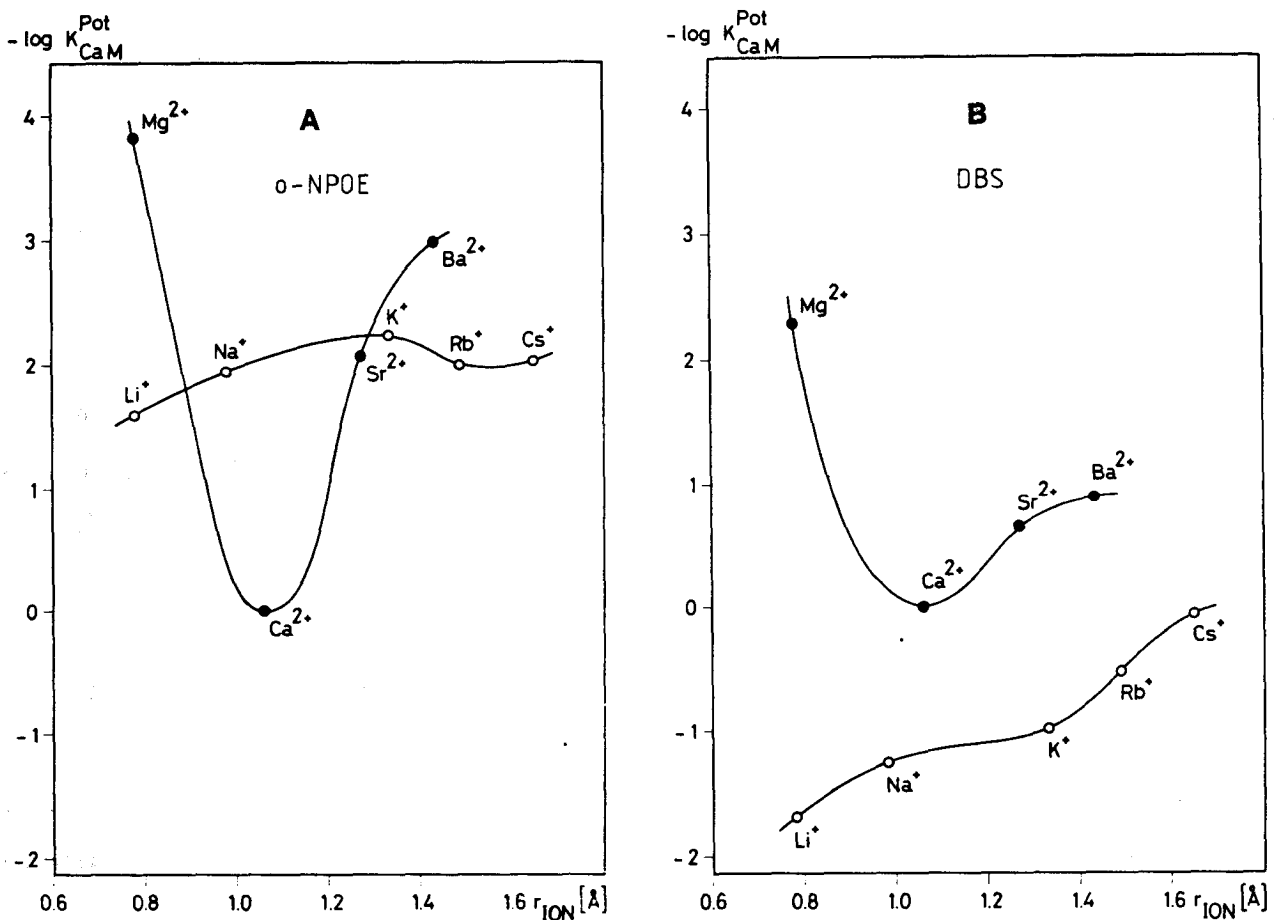
#### 4.5. Eigenschaften einiger synthetischer Liganden

Basierend auf diesen Modellüberlegungen wurden in unserem Laboratorium über 200 Verbindungen synthetisiert, die in Flüssigmembranelektroden zum Teil ausgezeichnete Selektivitäten aufweisen [113].

Eine der erfolgreichsten Verbindungen ist der in Fig. 20 dargestellte Ligand ETH 1001 [114]. In Flüssigmembranen mit einem Lösungsmittel hoher Dielektrizitätskonstante (z. B. o-Nitrophenyl-octyläther, o-NPOE;



**Fig. 20:** Ligand ETH 1001; (-)-(R, R)-N, N'-Di[(11-äthoxycarbonyl)undecyl] N, N', 4, 5-tetramethyl-3, 6-dioxaoctandiamid

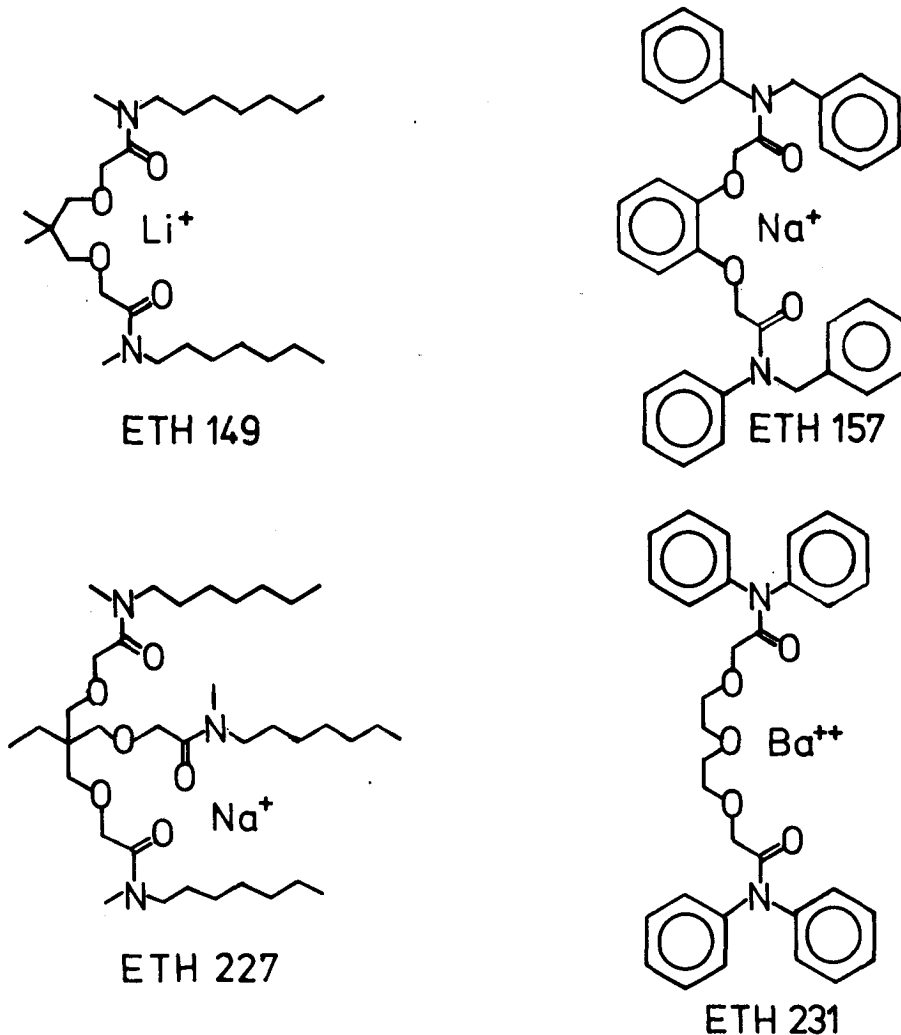


**Fig. 21:** Selektivität des Liganden ETH 1001, in Flüssigmembranen verschiedener Dielektrizitätskonstanten eingebaut. Membranlösungsmittel: A, o-Nitrophenyloctyläther; B, Dibutylsebacat [105]

$\epsilon \approx 24$ ) eingebaut, ergibt dieser Ligand eine hochselektive  $\text{Ca}^{++}$ -Elektrode (Fig. 21 A) [113].

In Fig. 21 B wird das Verhalten des gleichen Liganden (ETH 1001) in einer Flüssigmembranelektrode mit tiefer Dielektrizitätskonstante (Dibutylsebacat,  $\epsilon \approx 4$ ) dargestellt, um den Einfluss der Polarität des Membranlösungsmittels (Kapitel 4.4., Punkt 8) aufzuzeigen [105]. Die Selektivitätsreihenfolge innerhalb der Erdalkalitionen bleibt sich gleich, doch werden durch die geringe Dielektrizitätskonstante der Membranphase die Alkaliionen stark bevorzugt. Das System wird so eher zu einer  $\text{Li}^+$ -Elektrode.

Andere Liganden konnten zur Herstellung von  $\text{Li}^+$ -,  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Ba}^{++}$ -selektiven Elektroden eingesetzt werden (Fig. 22) [102,113].



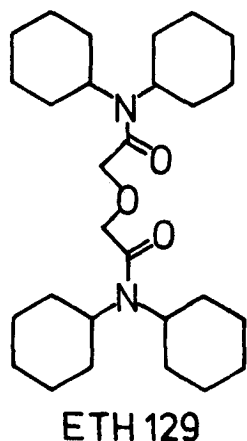
**Fig. 22:** Liganden zur Herstellung von  $\text{Li}^+$ -,  $\text{Na}^+$ - resp.  $\text{Ba}^{++}$ -selektiven Flüssigmembranelektroden

Zum weiterführenden Studium der Eigenschaften solcher Liganden wurden mit einigen dieser Verbindungen Extraktionsexperimente ausgeführt [115, 116]. Es wurden ihre Transporteigenschaften an makroskopischen PVC-Membranen untersucht [13, 117, 118] und ihre Konformation und Stöchiometrie in Komplexen mit Kernresonanz [119] und Röntgenstrukturanalyse [103] studiert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Ligand ETH 1001 bei Extraktion von  $\text{Ca}^{++}$  in Methylenchlorid bevorzugt 1:2 (Metall:Ligand) - Komplexe, mit Alkaliionen hingegen eher 1:1 - Komplexe bildet. Ähnliche Resultate ergaben Untersuchungen der Komplexbildung in Aethanol [115, 116]. Transportexperimente an makroskopischen PVC-Membranen bestätigten die theoretischen Voraussagen [13] und zeigten einmal mehr die ausgezeichneten Selektivitäten gewisser Liganden [117, 118, 120].

Bei kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen wurden vor allem 1:2-Komplexe gefunden, daneben aber auch Komplexe anderer Stöchiometrie. Weiter zeigte sich, dass bei der Komplexbildung die Aethersauerstoffe und die Amidcarbonylgruppen an der Koordination beteiligt sind [119, 133].

Bestätigung dieser Stöchiometrie in kristallinen Komplexen ergaben auch Röntgenstrukturanalysen. Sie zeigten, dass gewisse Liganden in der festen Phase 1:2-Komplexe bilden. Neueste Resultate zeigen allerdings in einem Fall (Ligand ETH 129, Fig. 23) auch eine 1:3-Stöchiometrie [102, 150].



Soeben wurde berichtet, dass im Laboratorium von Scarpa ähnliche Liganden, sowohl geladener wie auch ungeladener Natur, synthetisiert wurden, die in Transportexperimenten durch dicke organische Phasen zum Teil beachtliche Selektivitäten für  $\text{Ca}^{++}$  aufwiesen [152].

Fig. 23: Ligand ETH 129

## 5. LEITFAEHIGKEITSMESSUNGEN AN SCHWARZEN MEMBRANEN IN ANWESENHEIT VON SYNTHETISCHEN NEUTRALEN LIGANDEN

Aus früheren Experimenten, die zum Teil in anderen Laboratorien ausgeführt wurden [134], war bekannt, dass die bis anhin in Schwarzen Membranen eingesetzten Liganden deren Leitfähigkeit in Anwesenheit von Alkali- oder Erdalkalitionen nur unwesentlich beeinflussen. Es war deshalb anzunehmen, dass jene Liganden kaum fähig waren, solchen Ionen den Durchtritt durch bimolekulare Modellmembranen zu erleichtern.

In ersten Experimenten war deshalb abzuklären, ob sich in der grossen Auswahl synthetische Komplexbildner finden lassen, die in Schwarzen Membranen erfolgreichere Carrier sind.

### 5.1. Apparatur

Für die Messung der Leitfähigkeit der Schwarzen Membranen wurde die in Fig. 24 gezeigte Apparatur verwendet. Messgrösse war der Strom  $I$  oder die Spannung über der Membran, da das Paar Membran - externer Widerstand  $R$  (s. Fig. 24) als Spannungsteiler betrachtet werden kann.

Die über  $R_{\text{var}}$  abgegriffene Spannung betrug 30 mV, so dass über die Membran eine Spannung von  $\approx 30$  mV angelegt war.

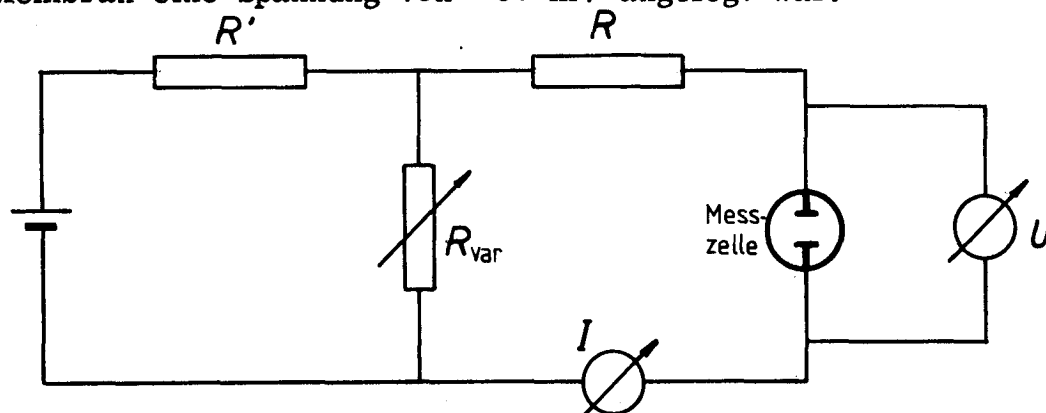


Fig. 24: Vorrichtung zur Messung der Membranleitfähigkeiten

## 5.2. Resultate

Die in  $10^{-3}$  M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung an Lecithin-Decan (1:99) - Membranen gemessenen Veränderungen der Leitfähigkeit sind in Fig. 25 festgehalten. Die Ligandkonzentration in wässriger Phase betrug durchwegs  $2.0 \cdot 10^{-5}$  M.

Die Graphen zeigen, dass die Erhöhung der Leitfähigkeit bei den verschiedenen Liganden unterschiedlich rasch und stark erfolgt. Eine Interpretation dieser Differenzen ist im einzelnen kaum möglich. In der Uebersicht ist aber zu erkennen, dass stark hydrophile Liganden (z. B. sekundäre Amide, Säuren wie ETH 116, ETH 1110, ETH 1039) auf die Membranleitfähigkeiten nur einen unwesentlichen Einfluss ausüben, da sie offensichtlich kaum in die lipophile Membranphase eintreten. Weiter ist zu beobachten, dass Liganden mit aromatischen Gruppen (Ligand ETH 67, ETH 157, ETH 231) ebenfalls nur schwache Effekte zeigen, was schwierig zu deuten ist.

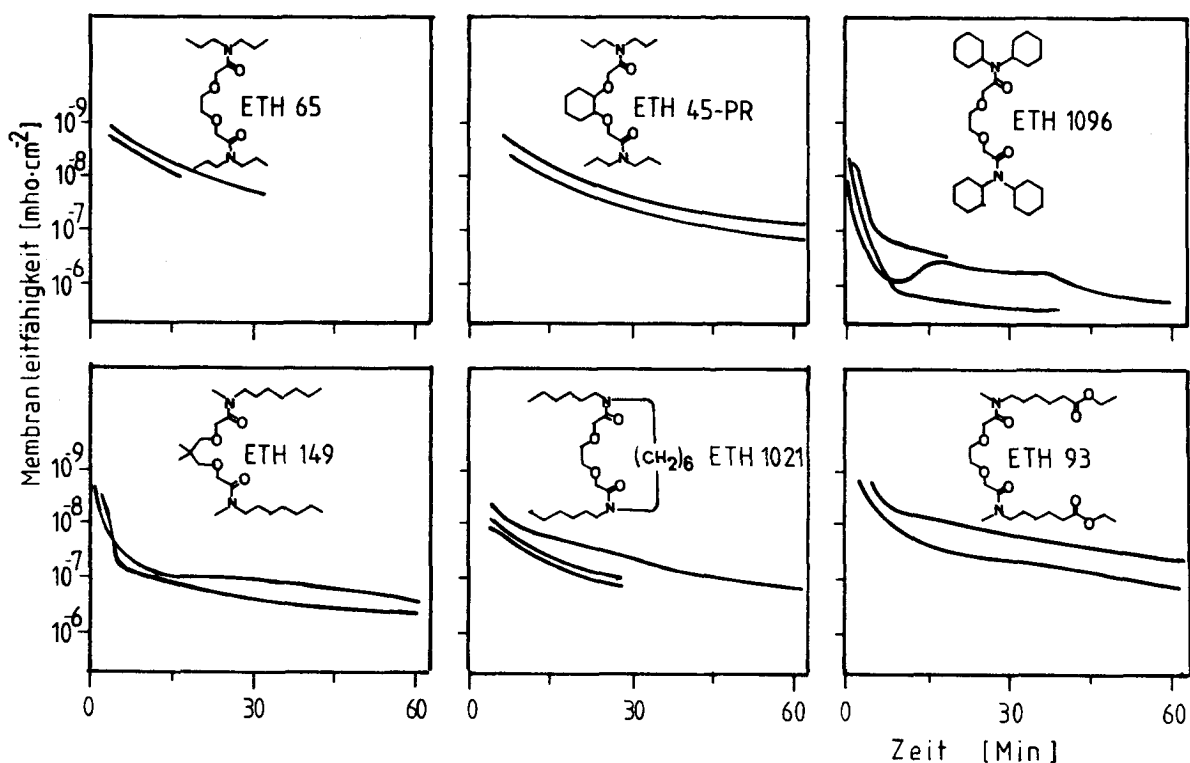
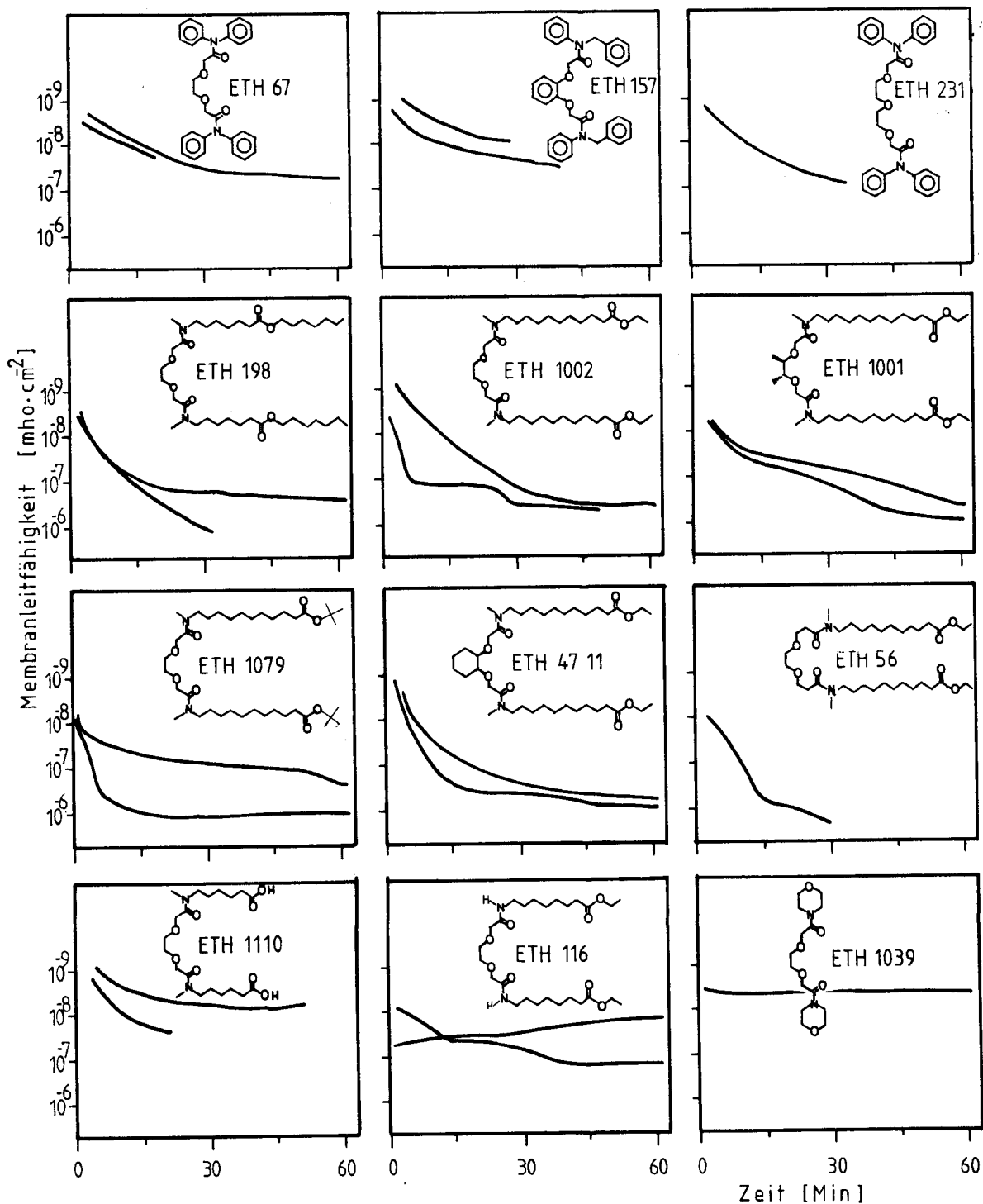


Fig. 25 (1. Teil)

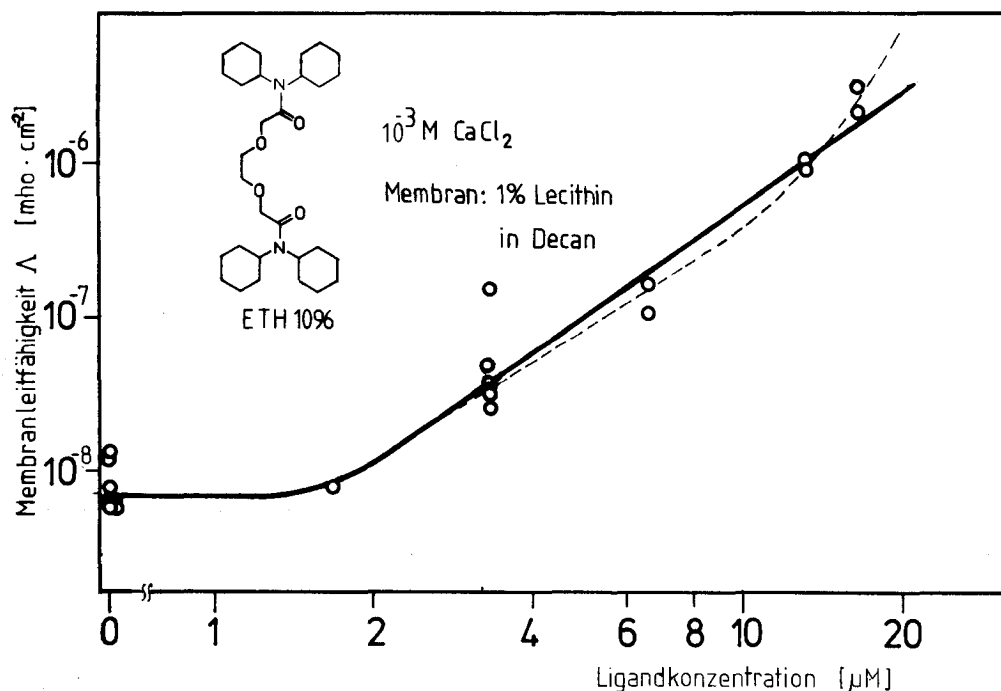




**Fig. 25 (2. Teil):** Veränderung der Membranleitfähigkeit in Funktion der Zeit in Anwesenheit verschiedener Liganden. Ligandkonzentration in der wässrigen Phase  $20\ \mu\text{M}$ . Wässrige Phase:  $10^{-3}\ \text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ; Membran: 1% Lecithin in Decan.

Unter den geprüften Liganden zeigt der Tetracyclohexyl-Ligand ETH 1096 die rascheste und ausgeprägteste Zunahme der Leitfähigkeit. Er wurde deshalb für weitere Experimente verwendet. Obwohl der Ligand ETH 1001 sich in diesen Experimenten nicht speziell auszeichnete, wurde er seiner interessanten Eigenschaften in makroskopischen Membranen wegen für spätere Experimente ebenfalls ausgewählt.

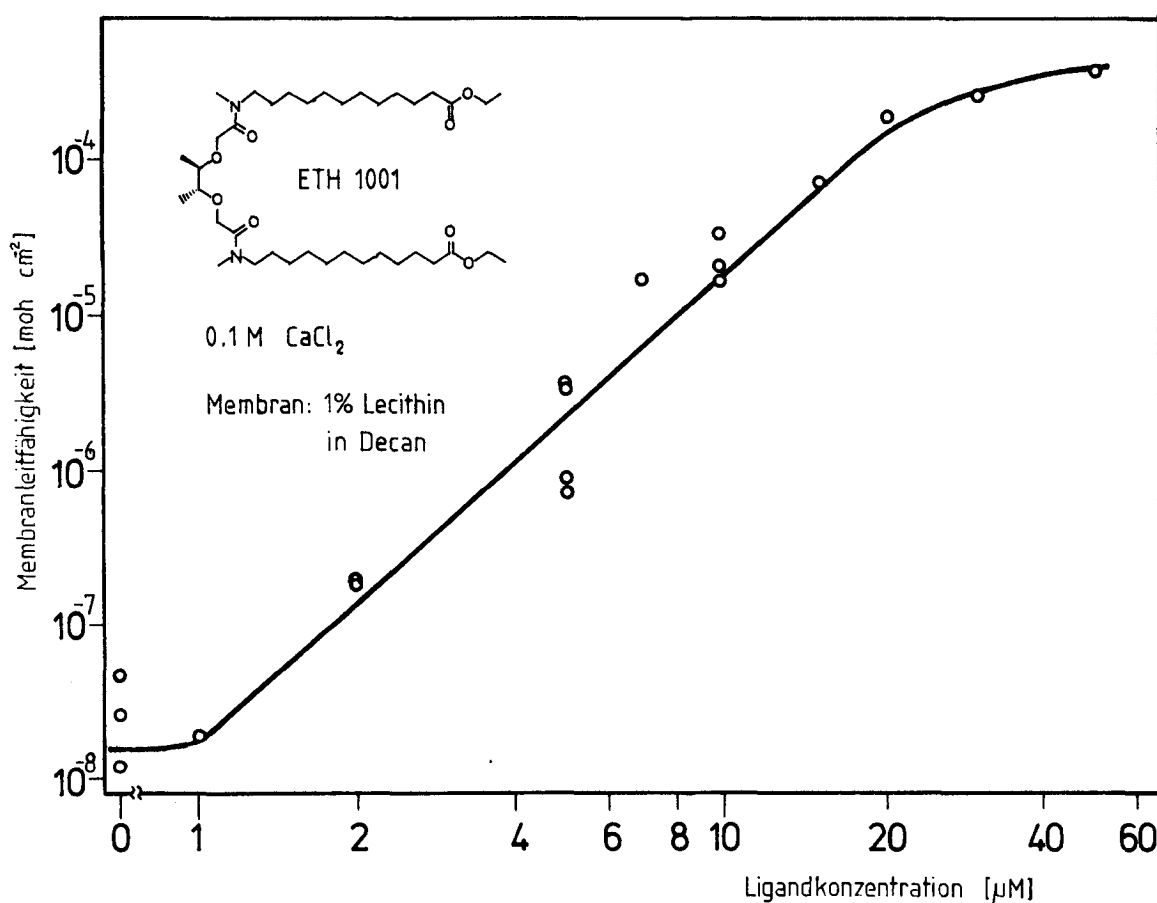
In weiteren Experimenten mit dem Tetracyclohexyl-Liganden ETH 1096 wurde die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Konzentration untersucht. In Fig. 26 sind die gemessenen Werte doppeltlogarithmisch gegen die Ligandkonzentration in der wässrigen Phase aufgetragen. Eine durch die Messpunkte gelegte Gerade ergibt eine Steigung von 2.38, was darauf hinweist, dass die  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen als 1:2- bis 1:3-Komplexe durch die Membran transportiert werden dürften.



**Fig. 26:** Abhängigkeit der Leitfähigkeit von Schwarzen Membranen von der Ligandkonzentration des Liganden ETH 1096. Steigung der Geraden im linearen Bereich (—) 2.38 resp. (-----) 1.94.

Das Diagramm kann aber auch so interpretiert werden, dass bei kleineren Ligandkonzentrationen ( $<10 \mu\text{M}$ ) die Ionen in 1:2-Komplexen transportiert werden (gestrichelte Linie; Steigung = 1.94). Bei grösseren Ligandkonzentrationen ( $>10 \mu\text{M}$ ) verschiebt sich die Stöchiometrie gegen höhere Werte.

Eine analoge Experiment-Serie wurde mit dem Liganden ETH 1001 durchgeführt. Fig. 27 zeigt die Messresultate, ebenfalls doppeltlogarithmisch gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. Die optimale Gerade durch die Punkte für Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$  und  $\leq 20 \mu\text{M}$  zeigt eine Steigung von 3.08.



**Fig. 27:** Abhängigkeit der Leitfähigkeit von Schwarzmembranen von der Ligandkonzentration des Liganden ETH 1001. Steigung der Geraden im linearen Bereich = 3.08

Entsprechende Experimente wurden mit ähnlichen Liganden (ETH 1097, ETH 1002) von Amblard und Gavach [121] durchgeführt. Sie bestimmten die Grenzleitfähigkeit (stromloser Zustand) von Glycerylmonooleat-Membranen bei Ligandvorgabe in die Lipidlösung. Für den Liganden ETH 1002 fanden sie bei Messung der Konzentrationsabhängigkeit eine Steigung von  $\sim 3.7$ .

### 5.2.1 Einfluss der Ligandlöslichkeit

Im Diagramm Fig. 27 flacht für Konzentrationen  $> 20 \mu\text{M}$  (Ligand ETH 1001) die Kurve deutlich ab. Dieser Effekt wird durch die begrenzte Löslichkeit des Liganden in der wässrigen Lösung verursacht, was sich rein optisch durch eine zunehmende Trübung der wässrigen Phase bei Ligandzugaben  $\geq 20 \text{ nmol/ml}$  anzeigt. Die so ableitbare Löslichkeit des Liganden ETH 1001 von  $\sim 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$  ( $0.1 \text{ M CaCl}_2$ ) ist jedoch deutlich höher als der früher von Kirsch [116] gemessene Wert von  $\leq 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/kg}$  (reines Wasser,  $\sim 25^\circ \text{ C}$ ).

### 5.2.2 Einfluss der Adsorption

Bei sehr kleinen Ligandkonzentrationen könnte möglicherweise durch die Adsorption von Ligand an den Wänden der Messzelle eine Verfälschung der angenommenen Konzentration eintreten.

Die benetzte Oberfläche in der verwendeten Messzelle beträgt  $\sim 17.5 \text{ cm}^2$ . Wird angenommen, dass sich diese Fläche mit einer monomolekularen Ligandschicht belegt (kugelförmige Moleküle, Durchmesser  $9 \text{ \AA}$ ), reduziert sich die Ligandkonzentration in der wässrigen Phase ziemlich genau um  $1 \mu\text{M}$ .

Wird diese Korrektur im Diagramm Fig. 27 ausgeführt, verringert sich die Steigung der Geraden auf  $2.0 \div 2.5$ . Die Korrelationskoeffizienten der linearen Regression verbessern sich jedoch nicht, so dass aus diesen Tatsachen nicht auf wesentliche Adsorption geschlossen werden kann.

### 5.3. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Grossteil der geprüften Liganden eine eindeutige Erhöhung der Membranleitfähigkeit bewirkt; doch tritt dieser Effekt nur langsam ein. Im allgemeinen dauert es 3-5 Stunden, bis das Gleichgewicht erreicht ist, was die Aufnahme von Messdaten mühsam gestaltet, da die Lebensdauer der Membranen häufig kürzer ist.

Die Diagramme in Fig. 26 und Fig. 27 und die erwähnten Resultate von Amblard und Gavach zeigen alle Steigungen von  $\approx 2$ , was so interpretiert werden kann, dass die  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen als 1 : 2 (Metall : Ligand) - Komplexe, möglicherweise auch als 1 : 3 - Komplexe durch die Membran transportiert werden.

## 6. AUSFLUSS VON $\text{Ca}^{++}$ AUS LIPOSOMEN

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Experimente zeigen deutlich, dass die verwendeten Liganden eine Erhöhung der Leitfähigkeit der bimolekularen Membranen bewirken. Sie lassen jedoch nicht eindeutig erkennen, wodurch diese Aenderung bedingt ist.

Mit den im Folgenden beschriebenen Experimenten soll bewiesen werden, dass die Liganden  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen durch die Membran transportieren. Es wurden Liposomen (multilamellare und monolamellare) mit  $\text{Ca}^{++}$  geladen und dessen Ausfluss in Anwesenheit des Liganden verfolgt.

### 6.1. Photometrische Messungen

Liposomen wurden in  $\text{CaCl}_2$ - und Indikator- haltigem Puffer aus einem Phosphatidylcholin - Phosphatidylserin (10 : 1) - Lipidgemisch hergestellt. Dieses Gemisch war notwendig, da multilamellare Liposomen aus nur

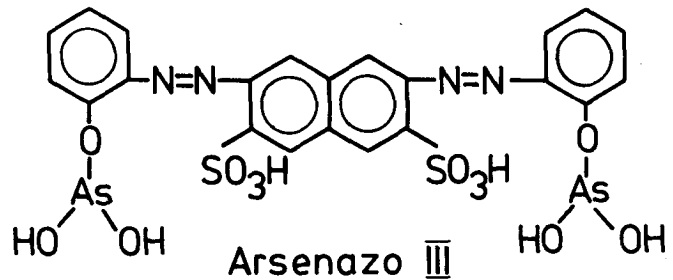
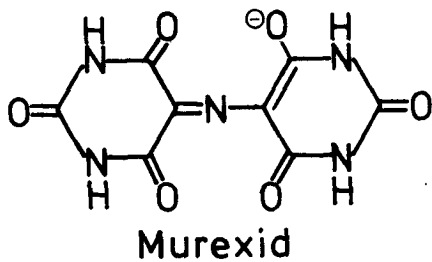


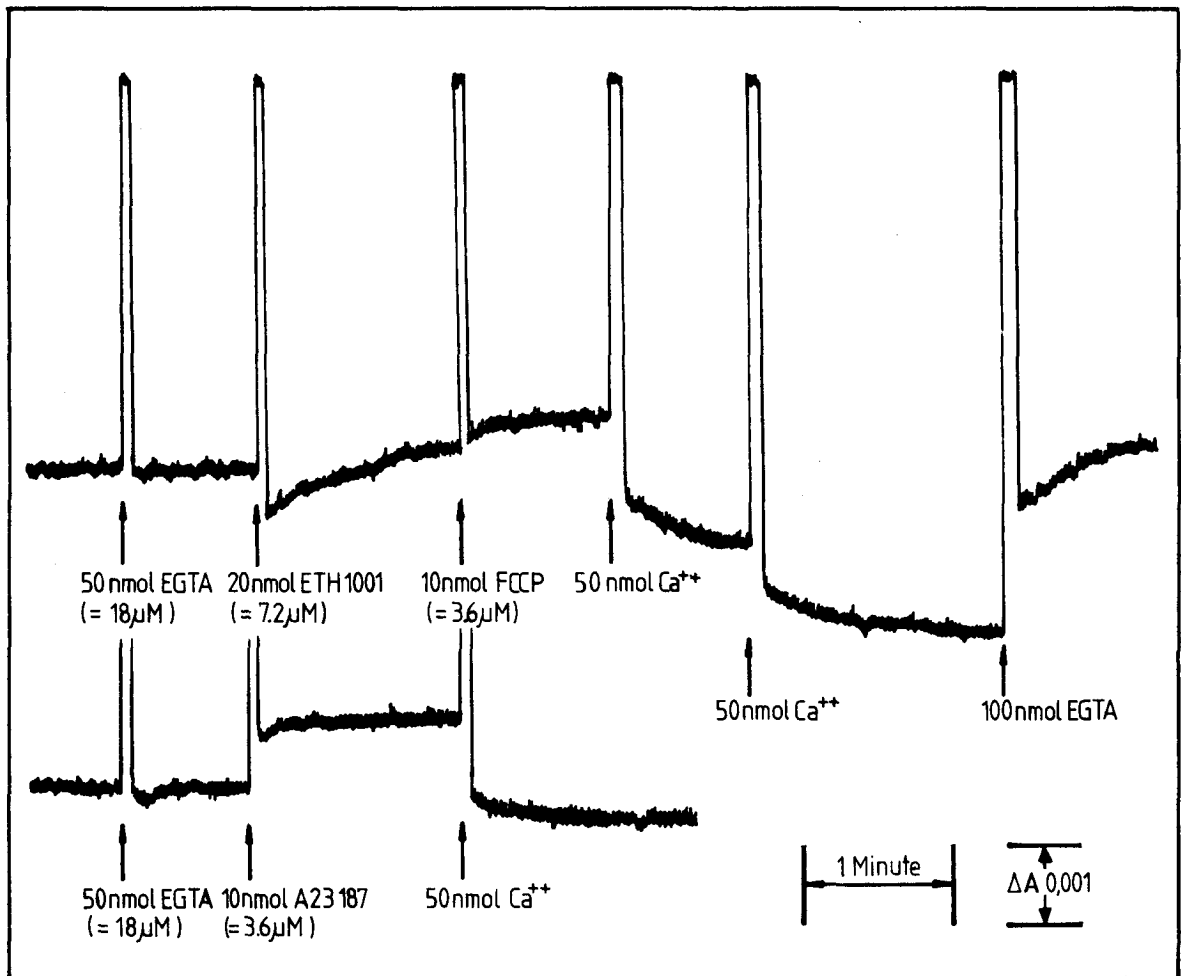
Fig. 28: Indikatoren für  $\text{Ca}^{++}$

ungeladenen Lipiden leicht aggregieren und sedimentieren. Die Liposomen wurden von ihrer Aussenlösung mittels Gelpermeation abgetrennt, so dass zu Beginn der Flussexperimente die Innenlösung  $\text{Ca}^{++}$  und Indikator enthielt, die Aussenlösung war hingegen indikatorfrei. Als Indikatoren dienten Murexid (Ammoniumpurpurat) oder in einigen Experimenten auch Arsenazo III (Fig. 28). Für spätere Experimente wurden die Liposomen zur Erreichung von monolamellaren Gebilden zusätzlich beschallt und zentrifugiert.

Die Farbänderung des Indikators wurde auf einem Doppelwellenlängenspektrometer verfolgt, wobei die Wellenlänge des Referenzstrahles auf den isosbestischen Punkt des Indikators eingestellt war.

Fig. 29 zeigt ein Beispiel einer photometrischen Messung an multilamellaren Liposomen. Die obere Kurve gibt die Absorptionsänderungen bei Einsatz des Liganden ETH 1001 wieder, die untere als Vergleich das Verhalten mit dem geladenen Antibiotikum A 23 187. Daraus ist ersichtlich, dass der synthetische Ligand bedeutend langsamer wirkt als der natürliche Carrier A 23 187 und dass sich seine Wirkung durch Zugabe von FCCP steigern lässt. Aehnliche Resultate wie mit dem Liganden ETH 1001 ergaben sich mit dem Tetracyclohexyl-Liganden ETH 1096.

Obwohl die Ausführung dieser Messungen einfach ist, wurde das System nur zur Optimierung der Bedingungen verwendet, da es vermutlich auf Grund der in Kap. 2.5 erwähnten Vesikeldefekte wenig empfindlich und schlecht reproduzierbar ist. Die optimierten Bedingungen wurden ziemlich unverändert auf die radioaktiven Messungen übertragen.



**Fig. 29:** Photometrische Messung des Ausflusses von  $\text{Ca}^{++}$  aus multi-lamellaren Liposomen. Bedingungen zu Beginn der Experimente: Innenlösung: Puffer mit  $\text{Ca}^{++}$  und Indikator; Aussenlösung: Puffer mit  $\text{Ca}^{++}$ . Indikator: Murexid. Die geringe Zunahme der Absorption bei Zugabe des Liganden ETH 1001 ist durch Eigenabsorption der Ligandlösung bedingt.

## 6.2. Radioaktive Messungen

Unter sonst gleichen Bedingungen wie bei den photometrischen Experimenten wurden monolamellare Liposomen mit dem radioaktiven Ca-Isotop  $^{45}\text{Ca}^{++}$  geladen. Dessen Ausfluss in die anfänglich tracerfreie Aussenlösung wurde verfolgt.  $^{45}\text{Ca}$  ist ein relativ schwacher  $\beta$ -Strahler ( $E_{\beta, \text{max}} = 0.258 \text{ MeV}$ , Reichweite in Wasser = 0.6 mm) mit einer Halb-

wertszeit von ~160 Tagen [123]. Die Messung der Radioaktivität wurde in Szintillatorlösung vorgenommen.

Die Liposomen wurden durch Beschallung in Pufferlösung (pH 7.5), die  $10^{-3}$  M  $^{45}\text{CaCl}_2$  enthielt, präpariert. Mittels Gelpermeation wurden sie von ihrer Aussenlösung abgetrennt und im Eluat durch Messung der Radioaktivität nachgewiesen. Fig. 30 zeigt das Elutionsprofil eines Experimentes, bei dem neben  $^{45}\text{Ca}^{++}$  auch  $^3\text{H}$ -Saccharose eingesetzt wurde. Theoretisch errechnet sich für die Liposomen in diesen Experimenten ein Innenvolumen von ~1.5 % [33]. Aus dem Chromatogramm ergibt sich, dass ~1.4 % der gesamten Saccharose von den Liposomen eingefangen wurde, was etwa dem theoretischen Wert entspricht. Der  $^{45}\text{Ca}^{++}$ -Anteil in den Liposomen liegt jedoch wesentlich über dem erwarteten Wert. Es wurden im allgemeinen zwischen 45 % und 60 % des gesamten  $^{45}\text{Ca}^{++}$

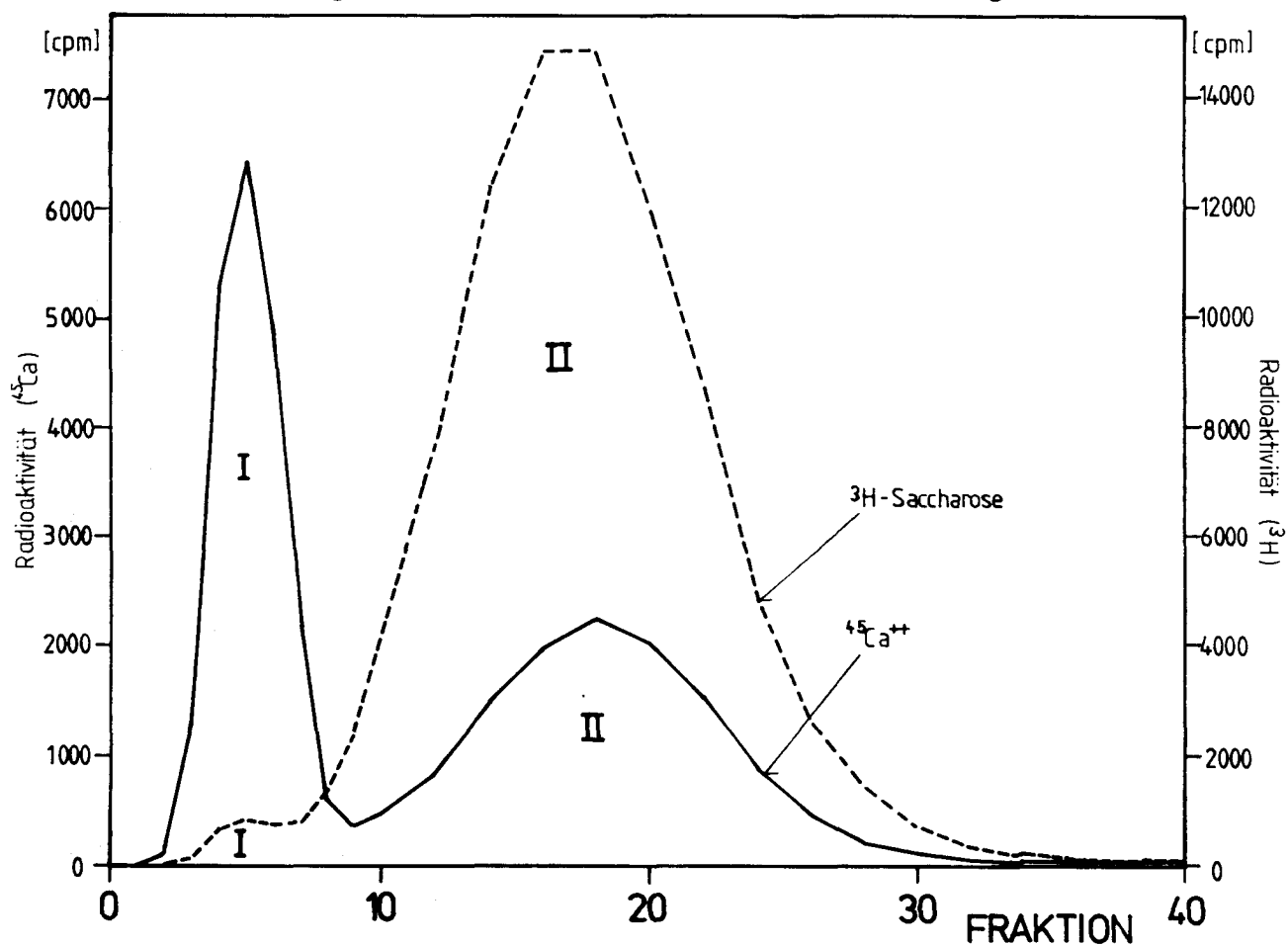


Fig. 30: Chromatogramm einer Liposomensuspension an Sephadex G 25. Liposomen mit  $^{45}\text{Ca}^{++}$  und  $^3\text{H}$ -Saccharose geladen. Fraktion I: Liposomen; Fraktion II: Radioaktivität der Aussenlösung.

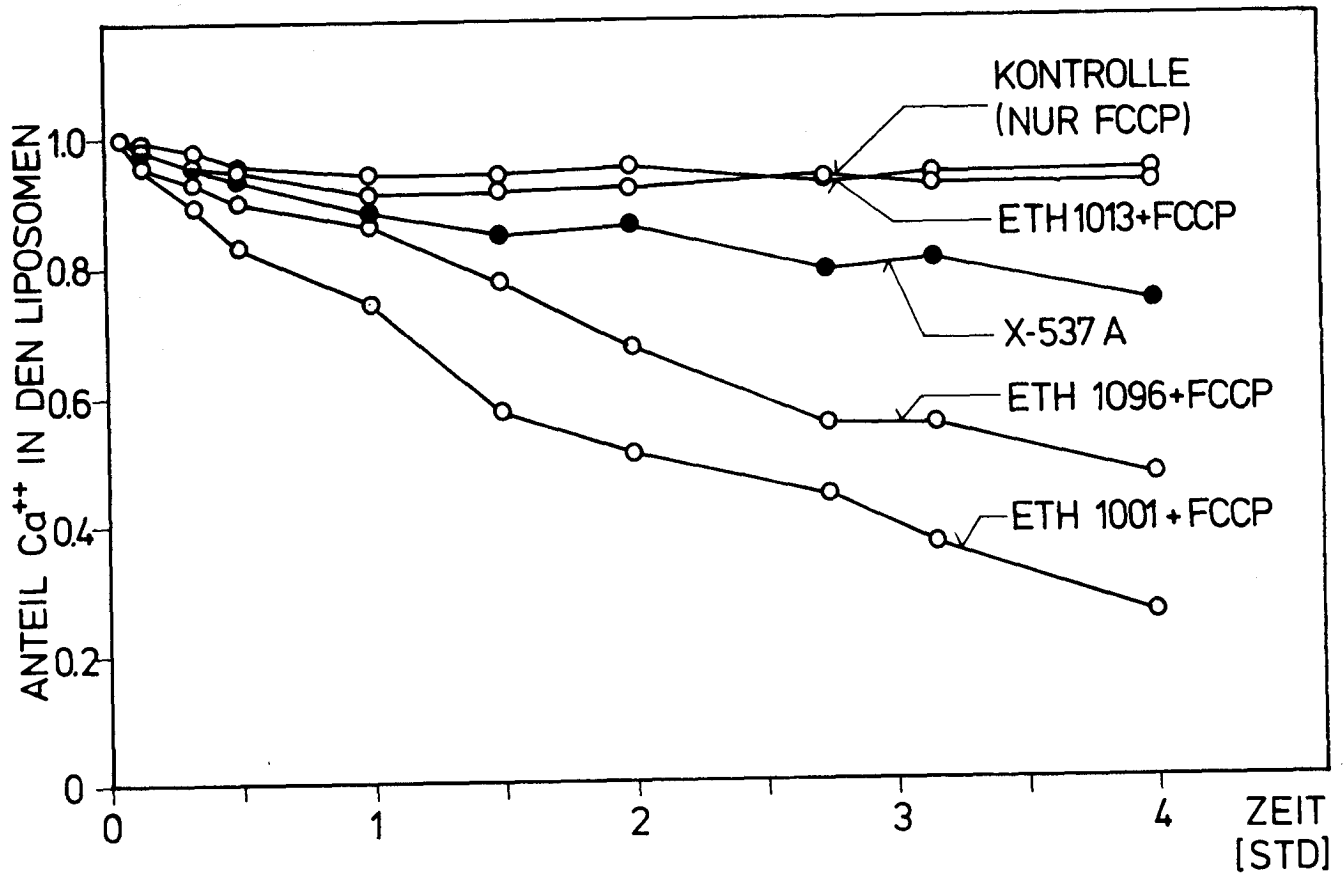


in den Liposomen gefunden. Diese Erscheinung kann damit erklärt werden, dass das negativ geladene Phosphatidylserin sich vornehmlich an der Innenwand der Liposomenmembran befindet und die  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen elektrostatisch bindet. Die Tatsache, dass die innere Membranschicht prozentual mehr Phosphatidylserin enthält als die äussere, wurde von J. A. Berden et al. [124] auf Grund von NMR-Messungen bestätigt und kann dadurch erklärt werden, dass Phosphatidylserin wegen seiner kleineren Kopfgruppe bevorzugt in die stark gebogene Membraninnenschicht eingelagert wird. Zusätzlich lässt sich der hohe  $\text{Ca}^{++}$ -Gehalt auch mit rein quantitativen Ueberlegungen erklären. Die Lipidsuspension, die beschallt wird, enthält 4.2 mM Phosphatidylserin, wovon  $\geq 90\%$  in den Liposomen erscheint. Auch bei einer 1:1-Verteilung zwischen den beiden Membranschichten finden sich immer noch genügend negativ geladene Bindungsstellen für die  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen auf der Membraninnenseite, um diese Tatsache erklären zu können.

Die radioaktiv geladenen Liposomen wurden nach Verdünnen zur Messung des  $\text{Ca}^{++}$ -Ausflusses gegen eine angepasst grosse Menge Aussenlösung dialysiert. Die Probennahme erfolgte aus der liposomenhaltigen Dialyserschlauch-Innenlösung. Um einen  $\text{Ca}^{++}$ -Gradienten über der Liposomenmembran zu erzeugen, wurden in die Aussenlösung 2 mM EGTA zugegeben.

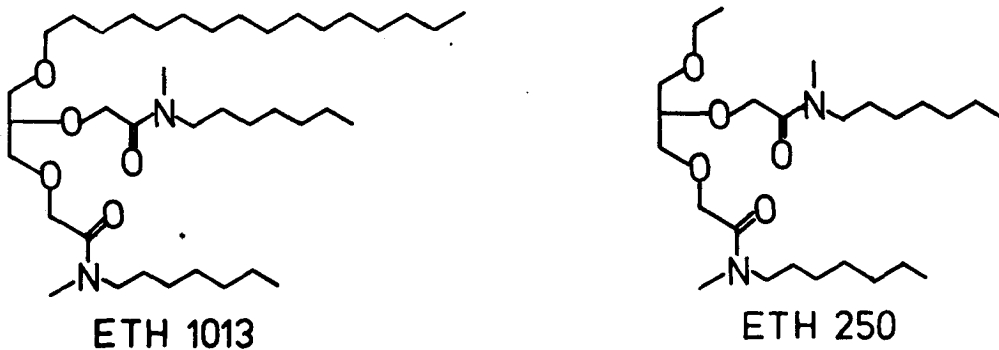
### 6.2.1 Durch neutrale Liganden induzierter Ausfluss von $\text{Ca}^{++}$

Wird zu den Liposomen nur Ligand zugegeben, ist selbst bei hohen Ligandkonzentrationen ein nur geringer  $\text{Ca}^{++}$ -Ausfluss beobachtbar. Wird hingegen zusätzlich der Entkoppler FCCP beigegeben, kann mit einigen Liganden ein  $\text{Ca}^{++}$ -Ausfluss aus den Liposomen induziert werden (Fig. 31). Als Vergleich wurde ein Parallelexperiment mit einer geringeren Konzentration des geladenen Ionophors X-537A durchgeführt. Die beiden Liganden ETH 1001 und ETH 1096 unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, die Liposomenmembran für  $\text{Ca}^{++}$  durchlässig zu machen, nicht sehr stark. Im Gegensatz dazu hat der Ligand ETH 1013 keinen Effekt. Vielleicht wird er wegen seiner strukturellen Aehnlichkeit mit den Phospho-



**Fig. 31:** Wirkung verschiedener Liganden auf den Ausfluss von  $\text{Ca}^{++}$  aus Liposomen in Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  FCCP. Konzentrationen: Neutrale Liganden  $50 \mu\text{M}$ ; X-537 A  $5 \mu\text{M}$ .

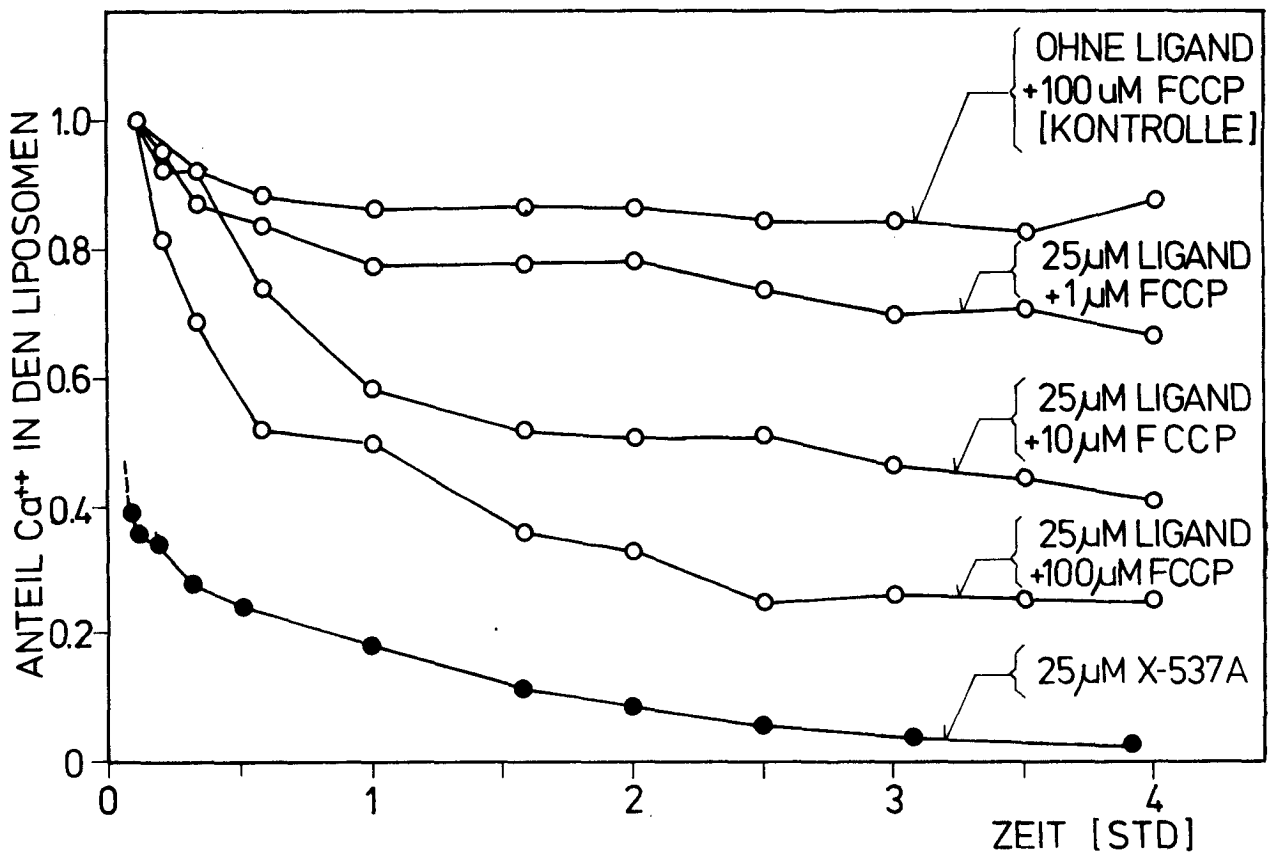
lipiden einfach in die Membran eingebaut. Ein aufgrund von ETH 1013 modifizierter Ligand, bei dem eine Seitenkette auf eine Methylgruppe verkürzt wurde (Ligand ETH 250, Fig. 32) zeigt später ebenfalls keinen Effekt an Schwarzen Membranen.



**Fig. 32:** Liganden ETH 1013 und ETH 250

## 6.2.2 Einfluss von FCCP

Wird FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon, s. Seite 41) in steigenden Konzentrationen zugegeben, steigert sich die Ausflussrate deutlich, wobei aber FCCP in Abwesenheit von Ligand ineffektiv ist (Fig. 33). Dieser Einfluss wurde ursprünglich damit erklärt, dass FCCP als potentieller Protonencarrier das Potential, das sich durch den Durchtritt des geladenen  $\text{Ca}^{++}$ -Ligand-Komplexes über der Membran aufbauen kann, durch Protonengegengentransport wieder abbaut und dadurch den weiteren  $\text{Ca}^{++}$ -Transport ermöglicht [125]. Neuere Betrachtungen deuten jedoch eher darauf hin, dass FCCP vor allem als lipophiles Anion wirkt und die Kinetik des Transportes beeinflusst. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass in Experimenten, in denen FCCP als Protonencarrier funktioniert, eine FCCP-Konzentration um  $10^{-7}$  M [126] für eine optimale Wirkung genügt. In diesem System ist jedoch bei bis zu  $10^3$  mal höheren



**Fig. 33:** Einfluss von FCCP auf die Ausflussrate von  $\text{Ca}^{++}$  aus Liposomen in Anwesenheit von  $25 \mu\text{M}$  Ligand ETH 1001.

Konzentrationen noch eine Wirkungssteigerung zu beobachten (Fig. 33).

Die Frage, ob FCCP nur zum Potentialabbau dient, könnte auch dadurch beantwortet werden, dass es durch das System  $K^+$ -Valinomycin ersetzt wird. Experimente in dieser Art misslingen jedoch über längere Zeit grundsätzlich, so dass diese Frage bis heute noch unbeantwortet ist. Die Aussagekraft solcher Experimente wäre aber auch dadurch limitiert, dass die verwendeten Liganden ebenfalls zum  $K^+$ -Transport (eventuell sogar bevorzugt vor  $Ca^{++}$ ) befähigt sein dürften (vgl. nächstes Kapitel).

Sollte FCCP nur als lipophiles Anion wirken, das den Phasenübergang der Ionen erleichtert oder als Ionenpaarbildner mit dem geladenen Komplex durch die Membran wandert, müsste es auch durch andere lipophile Anionen (Tetraphenylborat, Rhodanid etc.) ersetzbar sein. Der Versuch diese Frage experimentell zu beantworten, blieb aber ebenfalls erfolglos. Hinweise dazu geben indessen später beschriebene Experimente (Kapitel 7).

Eine quantitative Ueberlegung zu diesem Problem sei hier jedoch noch angefügt. Wird angenommen, dass sich die Membranoberflächen mit dem lipophilen Anion belegen, um den  $Ca^{++}$ -Ionen den Phasenübergang zu erleichtern, kann berechnet werden, wie gross der Bedarf an FCCP für eine ungefähr monomolekulare Belegung sein muss. Ausgehend von der durchschnittlichen Lipidkonzentration in den Dialyseproben von  $\sim 3$  mM Lipid und einer Membranfläche (Innenseite und Aussenseite) von  $4200 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol Lipid}$  (errechnet aus Tab. 2) und der Annahme, dass sich FCCP bei der Belegung von bimolekularen Membranen ähnlich verhält wie andere lipophile Anionen (interionischer Abstand  $45 \text{ \AA}$  [135]), errechnet sich ein FCCP-Bedarf von  $0.1 \text{ mM}$ , was die Notwendigkeit hoher FCCP-Konzentrationen ohne weiteres erklärt.

### 6.2.3 Transportselektivität

Die relativ tiefe Dielektrizitätskonstante der Membranphase [29] lässt vermuten, dass die Selektivitäten der Liganden von den Erdalkalitionen zu den einwertigen Ionen gleicher Grösse hin verschoben werden [102,103,

105]. Der experimentelle Nachweis dieser Vermutung wurde durch Co-transport von radioaktivem  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{++}$  aus den Liposomen erbracht.

Damit beide Strahler mit genügender Genauigkeit nebeneinander erfasst werden konnten, musste für  $\text{Na}^+$  ein Tracer verwendet werden, dessen  $\beta$ -Energie genügend weit von derjenigen von  $^{45}\text{Ca}$  entfernt liegt [128]. Das Isotop der Wahl war das kurzlebige  $^{24}\text{Na}$  ( $t_{1/2} = 15.0$  Stunden) mit einer maximalen  $\beta$ -Energie von 1.39 MeV (Reichweite in Wasser 6.4 mm) [123]. Der massive Nachteil dieses Isotopes ist jedoch, dass es neben der  $\beta$ -Strahlung noch harte  $\gamma$ -Strahlung von 2.75 MeV und 1.37 MeV [125] aussendet, die ein Arbeiten unter entsprechenden Schutzmassnahmen notwendig macht.

Die Liposomen wurden gleichzeitig mit  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{++}$  (Konzentration je  $10^{-3}$  M) geladen und der Ausfluss der beiden Ionensorten separat ver-

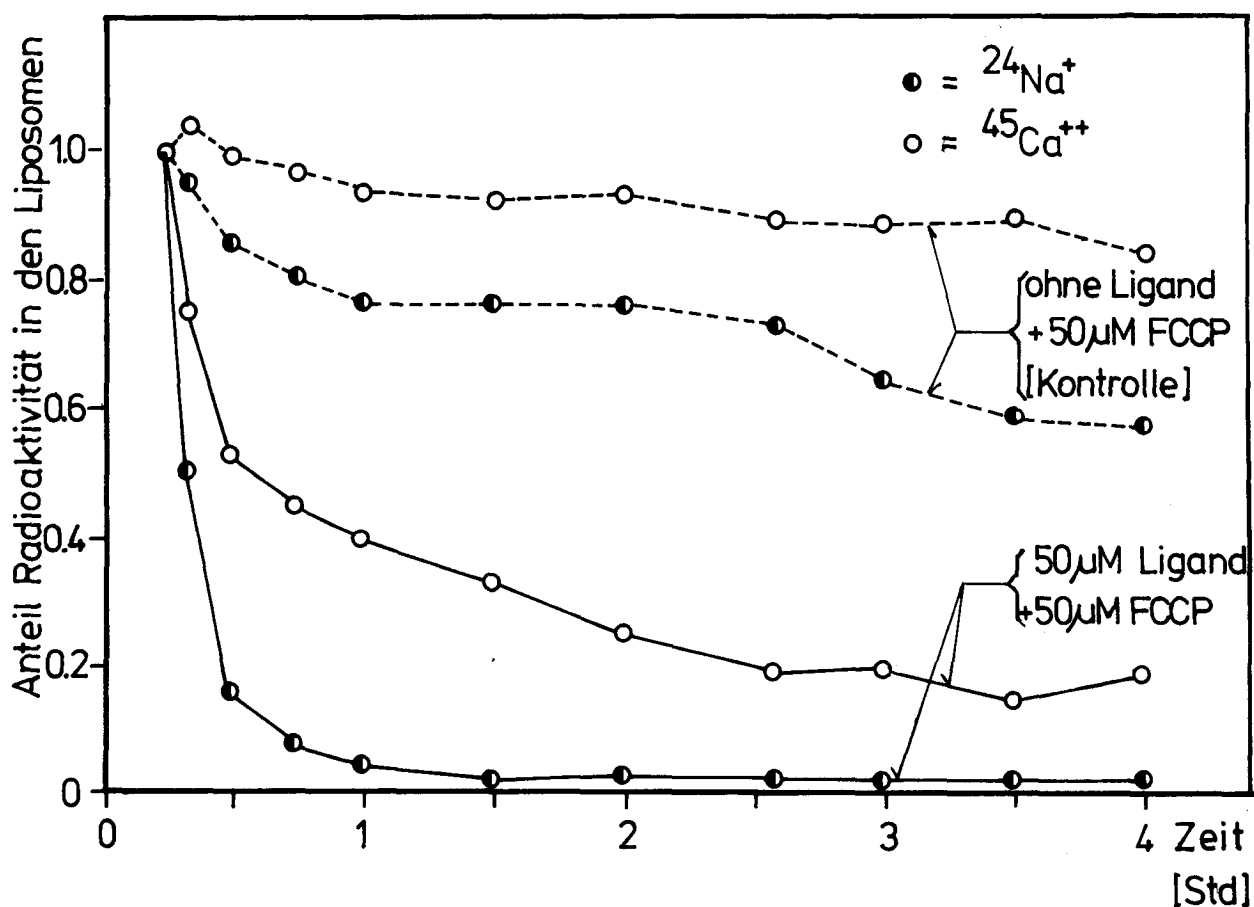


Fig. 34: Ausfluss von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{++}$  aus Liposomen unter dem Einfluss von Ligand ETH 1001 und FCCP. Die Liposomen waren mit gleichen Konzentrationen  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{++}$  geladen.

folgt. Die Messungen zeigten erwartungsgemäss einen rascheren Ausfluss von  $\text{Na}^+$  als von  $\text{Ca}^{++}$  (Fig. 34). Rein quantitativ sind die relativen Ausflussgeschwindigkeiten mit Vorbehalt aufzunehmen, da auch Liposomen ohne Ligand für  $\text{Na}^+$  stärker durchlässig sind als für  $\text{Ca}^{++}$  [129], wie dies auch in Fig. 34 gezeigt wird. Ein weiterer Einwand (Einfluss des Dialysierschlauches) wird in Kapitel 6.2.4 diskutiert.

Wegen der vergleichsweise hohen Ligand- und FCCP-Konzentrationen ist nicht ohne weiteres auszuschliessen, dass die Liposomenmembranen strukturell geschädigt sein könnten und eine unspezifische Durchlässigkeit für alle Stoffe aufweisen. Diese Möglichkeit wurde durch Ausflussmessung von  $^3\text{H}$ -Saccharose aus den Liposomen untersucht. Fig 35 zeigt, dass das Erscheinen von  $^3\text{H}$ -Saccharose in der Aussenlösung von der Ligandkonzentration unabhängig ist. Eine gewisse Permeabilität von Liposomenmembranen für Saccharose ist normal [129].

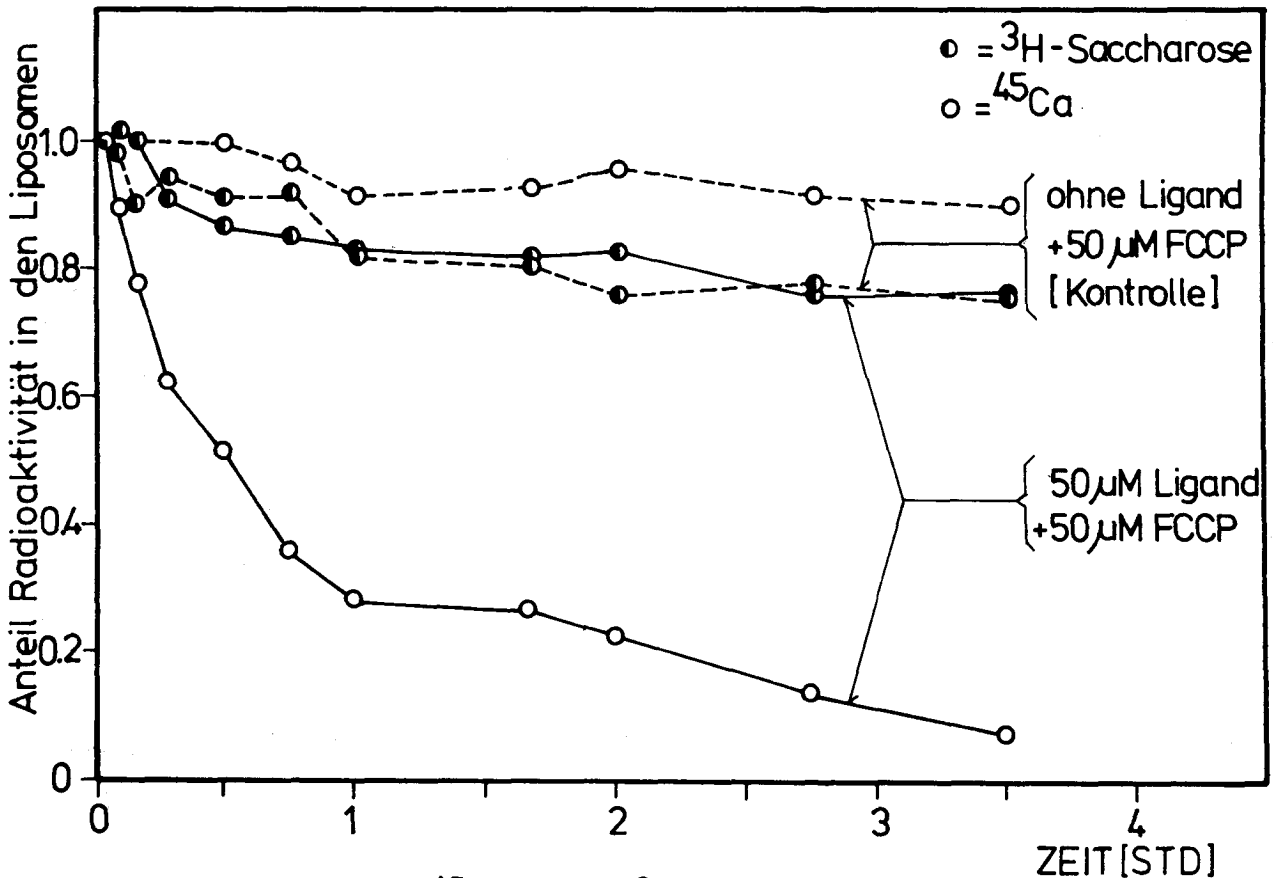


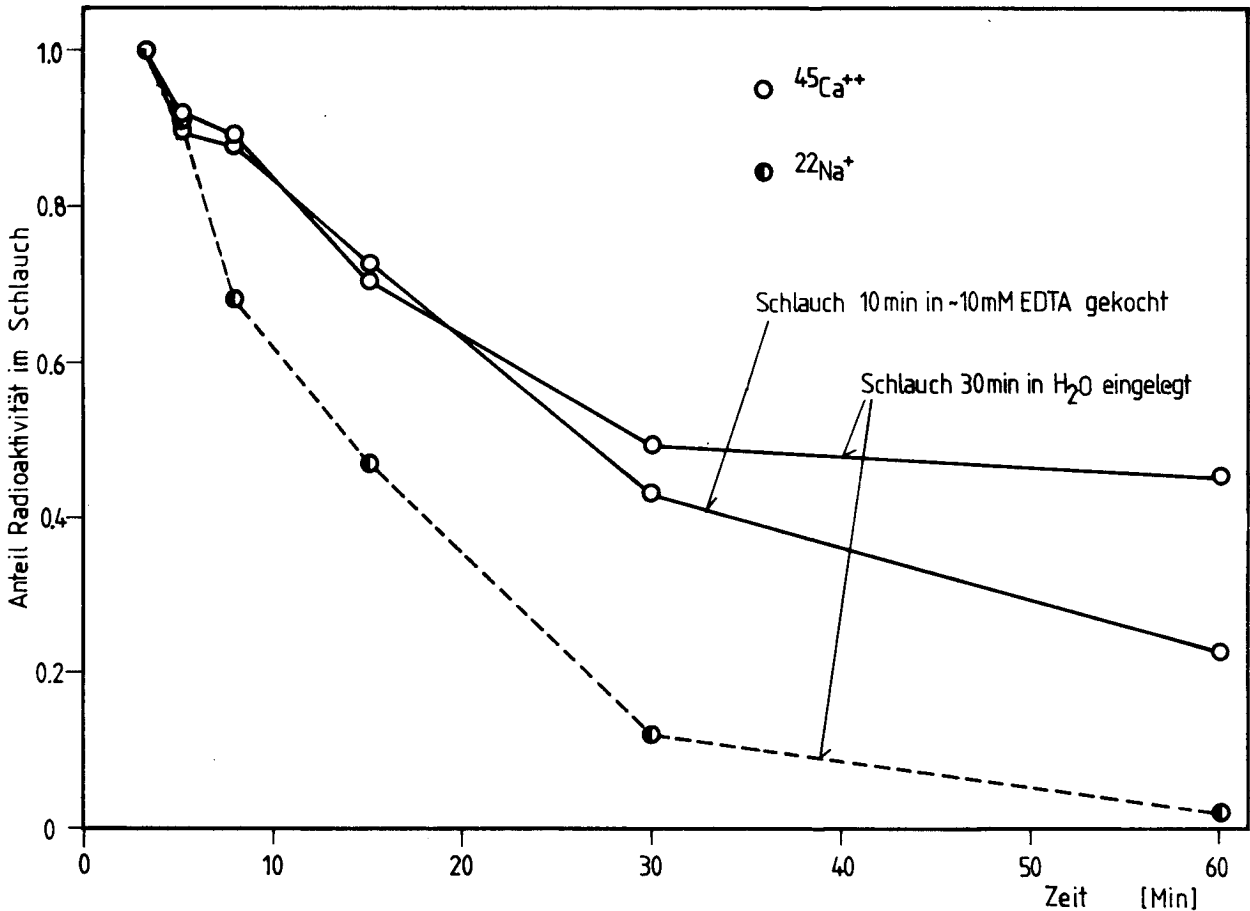
Fig. 35: Ausfluss von  $^{45}\text{Ca}^{++}$  und  $^3\text{H}$ -Saccharose aus Liposomen zum Nachweis der strukturellen Integrität der Liposomenmembranen. Die Liposomen waren mit  $^{45}\text{Ca}^{++}$  und  $^3\text{H}$ -Saccharose geladen.

#### 6.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die dargestellten Versuchsergebnisse zeigen deutlich, dass der hauptsächlich verwendete Ligand ETH 1001 fähig ist, bei Anwesenheit von relativ hohen FCCP-Konzentrationen  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen aus Liposomen durch die bimolekulare Lipidmembran zu transportieren. Damit wurde erstmals direkt gezeigt, dass ein neutraler Komplexbildner  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen durch künstliche bimolekulare Membranen transportieren kann. Die Wirksamkeit des Transportes ist jedoch im Vergleich zum geladenen Ionophor X-537A relativ gering, da der neutrale Ligand in ungefähr 5-10 mal höherer Konzentration eingesetzt werden muss, um eine vergleichbare Wirkung zu entfalten. Die Bedeutung, die FCCP bei diesem Transport hat, ist noch nicht ganz klar, doch dürfte es weniger die Rolle eines Protonencarriers als die eines lipophilen Anions spielen.

Bei der Betrachtung der Ausflussraten wurde bis jetzt der Einfluss des Dialysierschlauches vernachlässigt. Doch spielt er zweifelsfrei eine Rolle, da bei der Probenahme aus dem Dialysierschlauch nicht nur die Radioaktivität in den Liposomen, sondern auch jene, die bereits aus den Liposomen transportiert, aber noch nicht aus dem Dialysierschlauch diffundiert ist, erfasst wird. In einem separaten Experiment wurde deshalb die Diffusionsgeschwindigkeit von  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Na}^+$ -Ionen aus dem Dialysierschlauch untersucht. Aus Fig. 36 sind die Diffusionsgeschwindigkeiten aus verschieden vorbehandelten Dialysierschläuchen ersichtlich. Sie zeigt deutlich, dass die Vorbehandlung keinen wesentlichen Einfluss hat, dass jedoch die Art des diffundierenden Ions entscheidend ist. Weitere hier nicht näher beschriebene Experimente zeigten auch, dass die Art der Innen- oder Aussenlösung (Zusatz von Puffer und/oder EGTA) keine Bedeutung hat.

Unter Berücksichtigung, dass  $\text{Na}^+$  rasch und  $\text{Ca}^{++}$  relativ langsam (Halbwertszeit für die Herausdiffusion ~30 min) aus dem Dialysierschlauch diffundiert ist die in Fig. 34 dargestellte erhöhte Ausflussrate von  $\text{Na}^+$  relativ zu  $\text{Ca}^{++}$  mit grosser Vorsicht aufzunehmen. Das  $\text{Na}^+$  diffundierte



**Fig. 36:** Diffusion von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{++}$  aus dem Dialysierschlauch. Innenlösung: 1 mM Metallchloridlösung; Aussenlösung:  $\text{H}_2\text{O}$ .

2 - 3 mal schneller aus dem Dialysierschlauch als  $\text{Ca}^{++}$ .

Selektivitätsmessungen an Schwarzen Membranen stehen jedenfalls im Widerspruch zu dem in Fig. 34 gezeigten Resultat. Amblard und Gavach [121] fanden mit dem Liganden ETH 1002 an Schwarzen Membranen ähnliche Selektivitätsreihen, wie sie in makroskopischen Flüssigmembranen [130] beobachtet wurden (Bevorzugung von  $\text{Ca}^{++}$ ). Bei eigenen Messungen wurden mit Alkaliionen ebenfalls geringere Leitfähigkeiten gefunden als mit Erdalkaliionen, was auch auf eine Bevorzugung von zweiwertigen Ionen hinweist.

Weiteren Experimenten, die zur Beantwortung verschiedener offener Fragen zum Teil mehrmals ausgeführt wurden, war leider wenig Erfolg be-



schieden. So wurde versucht, die gleichen Transportexperimente mit Liposomen aus synthetischem Dipalmitoyllecithin anstelle von Ei-Lecithin durchzuführen. Dipalmitoyllecithin hat einen Transitionsunkt von  $41^{\circ}\text{C}$  [66]. Oberhalb dieser Temperatur sind bimolekulare Membranen aus diesem Lipid im flüssig-kristallinen, unterhalb befinden sie sich im fest-kristallinen Zustand (Transitionsunkt von Ei-Lecithin  $\sim 0^{\circ}\text{C}$ ). Die Diffusion unterhalb von  $41^{\circ}\text{C}$  ist in Dipalmitoyl-Lecithin-Membranen praktisch blockiert und damit auch die Diffusion von Ion-Ligand-Komplexen durch die Membran. Porenbildende Moleküle können jedoch auch unterhalb des Transitionsunktes die Durchlässigkeit der Membranen für Ionen aufrechterhalten [136]. Auf Grund dieses Faktums kann gezeigt werden, ob ein Ionentransport durch Carrier oder Poren erfolgt, indem während des Experimentes die Temperatur auf einen Wert unterhalb des Transitionsunktes abgesenkt wird.

Ein Versuch, bei dem verschiedene Liposomenproben bei verschiedenen pH-Werten inkubiert wurden, hätte zeigen können, ob FCCP mit dem Protonentransport beschäftigt ist. Aber beide letztgenannten Experimente, wie auch das früher beschriebene Experiment mit  $\text{K}^+$ -Valinomycin und dasjenige mit verschiedenen lipophilen Anionen, fielen in eine lange Serie von Misserfolgen, in der alle Experimente vollständig missglückten.

## 7. EINSATZ DER SYNTHETISCHEN NEUTRALEN LIGANDEN IN BIOLOGISCHEN MEMBRANEN

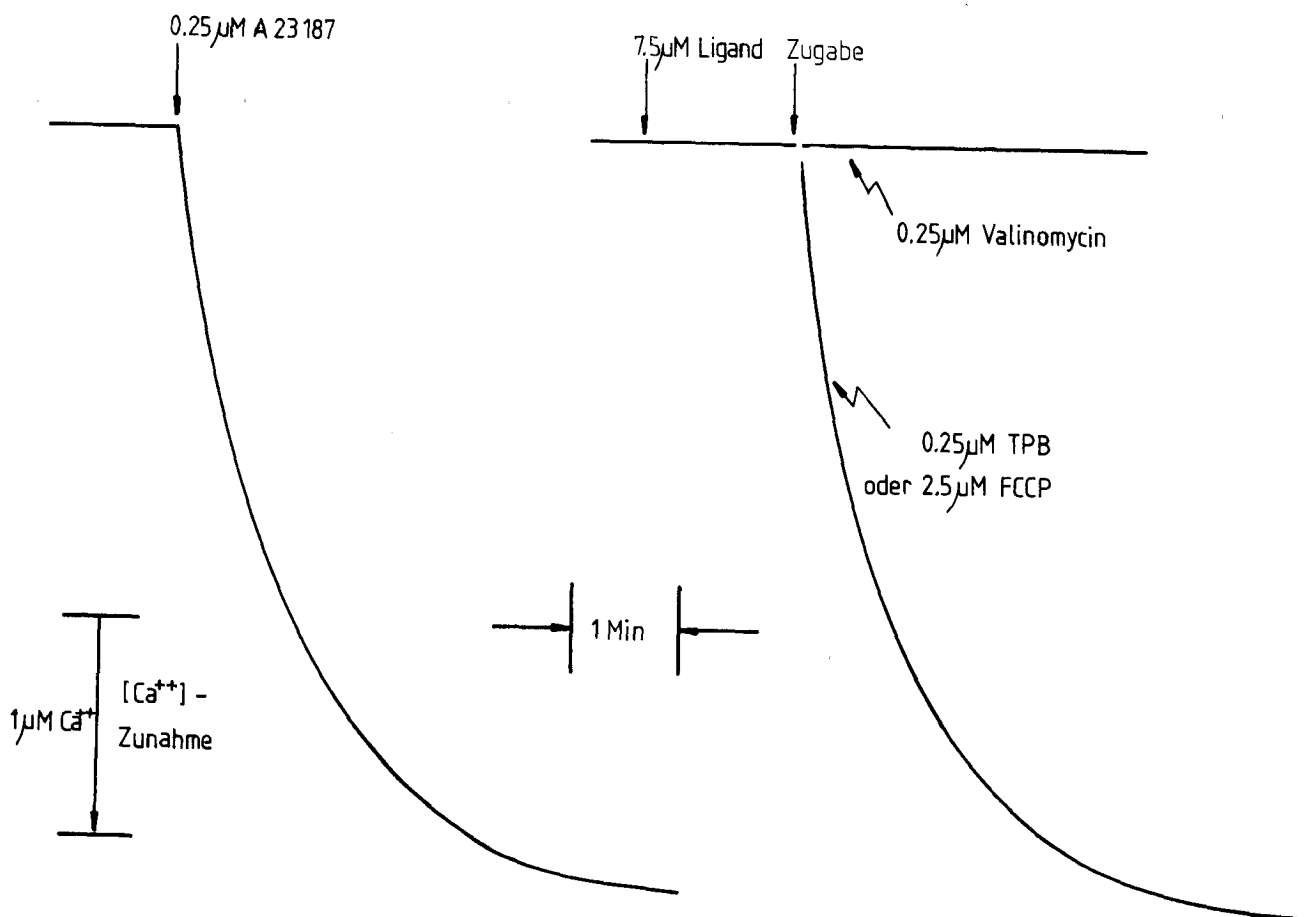
Wie früher beschrieben wurde, unterscheiden sich die biologischen Membranen von den künstlichen Modellmembranen durch ihren zum Teil recht hohen Proteingehalt und die dadurch bedingten, zum großen Teil unbekanntem Veränderungen der Membraneigenschaften.

Im Rahmen einer Diplomarbeit [131] wurde deshalb der Einfluss der synthetischen Liganden auf biologische Membranen speziell untersucht. Es wurde der Ionentransport an Erythrocyten, am sarcoplasmatischen Reticulum und an Mitochondrien unter Einfluss der Liganden beobachtet. Die Eigenschaften dieser Membranen sind in Kapitel 3.3 bis 3.5 beschrieben.

### 7.1. Wirkung auf Erythrocyten

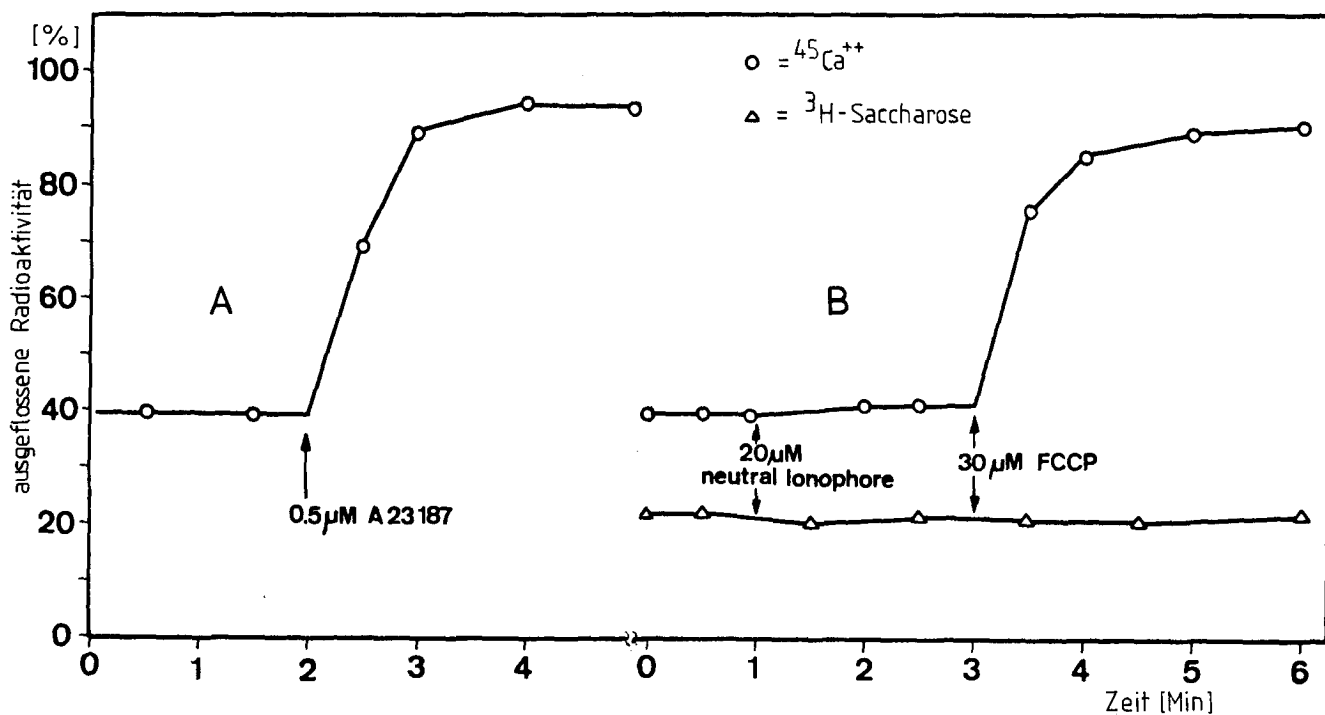
Der Einfluss des Liganden ETH 1001 auf die  $\text{Ca}^{++}$ -Permeabilität von roten Blutkörperchen wurde an ATP-freien Zellen untersucht, um den aktiven  $\text{Ca}^{++}$ -Transport durch die membrangebundene Ca-Mg-ATPase zu unterbinden. Die Erythrocyten wurden in gepuffertem Medium mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  geladen und dessen Ausfluss einerseits photometrisch, andererseits mittels Radioaktivität verfolgt. Als Indikator bei den photometrischen Experimenten diente Arsenazo III (siehe Seite 62).

Wie erwartet wurde, zeigt sich bei Zugabe des Antibiotikums A 23187 zu geladenen Erythrocyten ein rascher Ausfluss von  $\text{Ca}^{++}$ , welches von A 23187 im Austausch gegen  $\text{H}^+$  aus den Zellen transportiert wird (Fig. 37 A, Fig. 38 A). Beim neutralen  $\text{Ca}^{++}$ -Ionophor ETH 1001 ist jedoch nur bei Anwesenheit von FCCP oder Tetraphenylborat eine Abnahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration beobachtbar. Bei Zugabe von Valinomycin ( $\text{K}^+$  im Medium vorhanden) ist keinerlei  $\text{Ca}^{++}$ -Ausfluss festzustellen (Fig. 37 B, Fig. 38 B).



**Fig. 37:** Photometrische Bestimmung des  $\text{Ca}^{++}$ -Ausflusses aus Erythrocyten unter dem Einfluss des Liganden ETH 1001. Medium: Puffer, 130 mM KCl,  $50 \mu\text{M}$  Arsenazo III und  $10 \mu\text{l}$  Erythrozyten (mit  $\text{Ca}^{++}$  geladen). Endvolumen 1 ml. TPB: Tetrphenylborat.

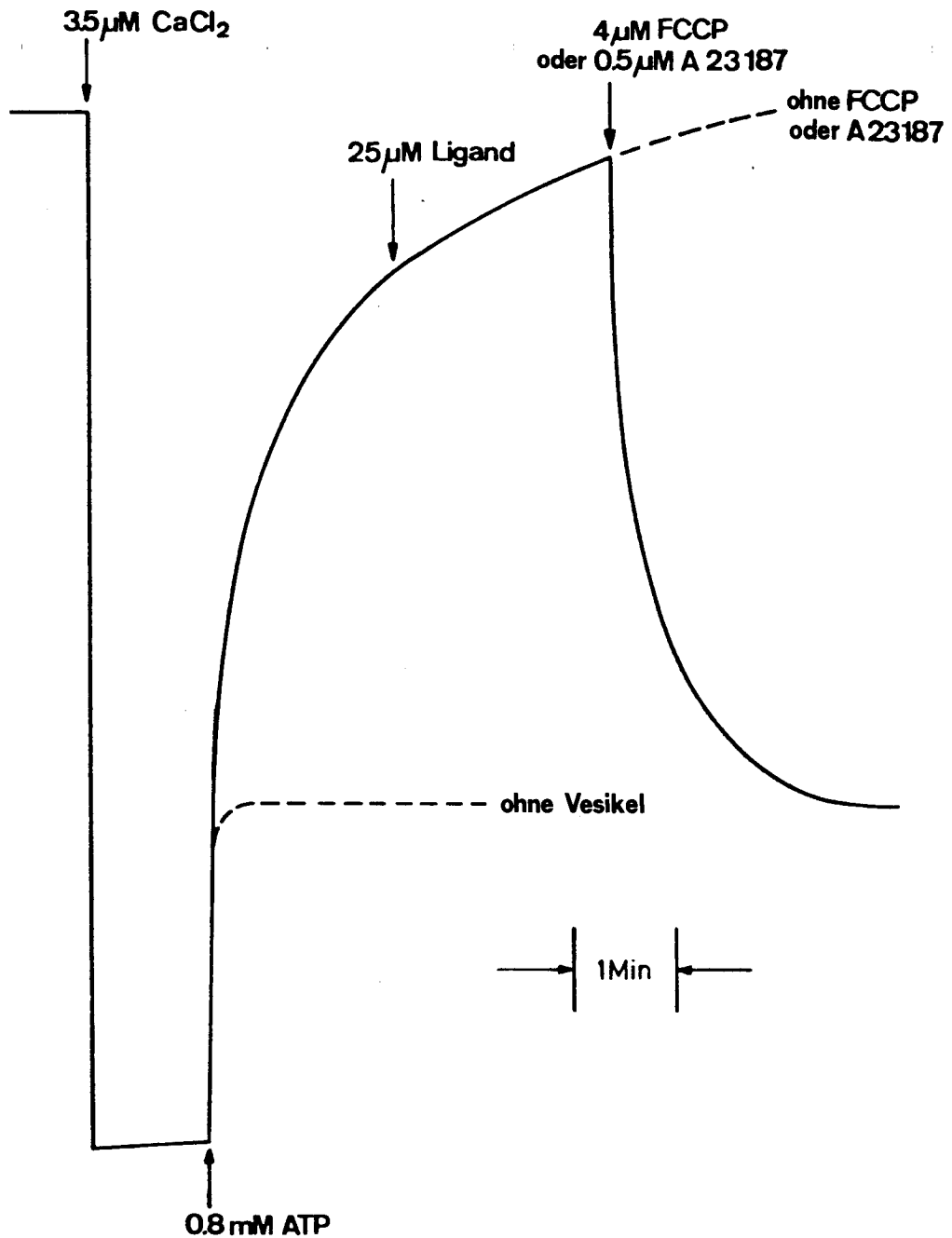
Diese Experiment gibt in zweierlei Hinsicht Aufschluss über die Funktion von FCCP: Einerseits kann es nicht durch das System  $\text{K}^+$ -Valinomycin ersetzt werden, was vermuten lässt, dass seine Aufgabe nicht im Protonentransport liegt; andererseits vermag Tetrphenylborat den  $\text{Ca}^{++}$ -Ausfluss zu induzieren, ohne selbst Protonen transportieren zu können (pK von Tetrphenylborat  $< 2$ ). Diese beiden Fakten scheinen eindeutig die Notwendigkeit von lipophilen Anionen für den  $\text{Ca}^{++}$ -Transport mittels des verwendeten synthetischen Carriers zu belegen.



**Fig. 38:** Bestimmung des Ausflusses von Radioaktivität aus Erythrocyten.  
 A: Ausfluss von  $^{45}\text{Ca}^{++}$  unter Einfluss von A 23187. B: Ausfluss von  $^{45}\text{Ca}^{++}$  und  $^3\text{H}$ -Saccharose mit dem Liganden ETH 1001.

## 7.2. Sarcoplasmatisches Reticulum

Der synthetische Ligand ETH 1001 erhöht auch die Permeabilität der Membranen des sarcoplasmatischen Reticulums. Bei Aktivierung mit ATP beginnt die sarcoplasmatische  $\text{Ca}^{++}$ -Pumpe (siehe Kapitel 3.4)  $\text{Ca}^{++}$  zu akkumulieren (Fig. 39) und baut einen  $\text{Ca}^{++}$ -Gradienten auf, bis alles ATP hydrolysiert ist. Wird Ligand zugegeben, ist vorerst keine Änderung zu beobachten. Erst bei Zugabe von FCCP fließt ein grosser Teil des akkumulierten  $\text{Ca}^{++}$  wieder aus. Die Reihenfolge der Zugabe kann auch umgekehrt werden.

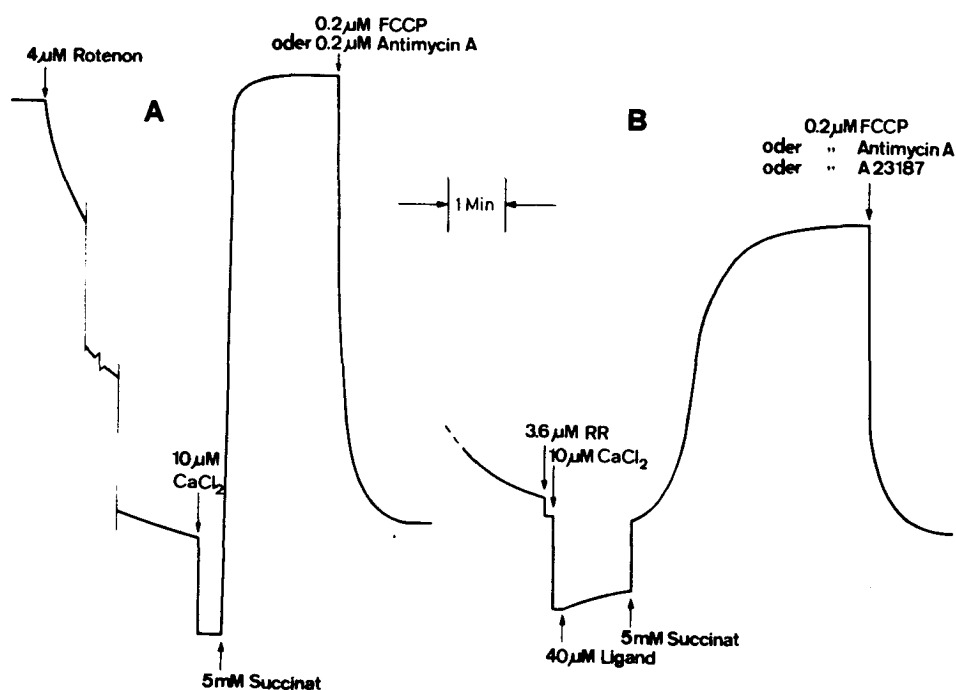


**Fig. 39 :** Ausfluss von  $\text{Ca}^{++}$  aus sarcoplasmatischem Reticulum unter Einfluss des Liganden ETH 1001. Reaktionsmedium: Puffer pH 7.2 mit 50 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  Arsenazo III und 0.3 mg Membranprotein/ml Medium. Die Abnahme der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration bei Zugabe von ATP zum vesikelfreien Medium ist vermutlich durch Komplexierung von  $\text{Ca}^{++}$  durch ATP bedingt.

## 7.3. Mitochondrien

Atmende Mitochondrien halten im Normalfall ein Membranpotential um 220 mV (innen negativ) aufrecht (siehe Kapitel 3.5). Sie sind deshalb ein ideales System für das Studium der Wirksamkeit von neutralen Ionophoren, da die geladenen Metallion-Ligand-Komplexe dank dem Membranpotential in die Mitochondrien transportiert werden dürften.

In Fig. 40 A und B ist gezeigt, dass der Ligand ETH 1001 den natürlichen  $\text{Ca}^{++}$ -Carrier substituieren kann. Zur Blockierung der Atmungskette wurden die Mitochondrien in beiden Experimenten mit Rotenon vorinkubiert. Dadurch strömt das im Normalzustand akkumulierte  $\text{Ca}^{++}$  aus. Im Experiment A wurde nach Zugabe von weiterem  $\text{Ca}^{++}$  Succinat addiert, welches die Blockierung der Atmungskette aufhebt, da dessen Reduktionsäquivalente später in die Atmungskette eintreten. Dadurch werden die Mitochondrien wieder energetisiert, und durch das sich von neuem aufbauende Potential akkumulieren sie  $\text{Ca}^{++}$  mit dem natürlichen  $\text{Ca}^{++}$ -Carrier. Im Experi-



**Fig. 40:** Aktive Aufnahme von  $\text{Ca}^{++}$  durch Mitochondrien in Anwesenheit des neutralen Liganden ETH 1001. Reaktionsmedium: Puffer pH 7.2 mit 210 mM Mannitol, 70 mM Saccharose, 40  $\mu\text{M}$  Arsenazzo III. RR Rutheniumrot.

ment B wurde der natürliche  $\text{Ca}^{++}$ -Carrier durch Rutheniumrot blockiert. An dessen Stelle tritt nun ETH 1001, das den energetisierten Mitochondrien erlaubt, trotz blockiertem natürlichem Carriersystem  $\text{Ca}^{++}$  aufzunehmen. Durch Zugabe eines Entkopplers (FCCP) oder eines geladenen Ionophors (A23187) oder durch erneute Blockierung der Atmungskette (Antimycin A) kann die  $\text{Ca}^{++}$ -Akkumulation wieder rückgängig gemacht werden.

Die Mitochondrien erlauben ebenfalls, Hinweise auf die Selektivität des Liganden bezüglich anderer Ionen zu erhalten. Werden in isotonischem Medium in Anwesenheit von Acetat Kationen durch die Membran transportiert, wandert das Acetatanion als Ionenpaar durch die Membran. In der Folge steigt die intramitochondriale Salzkonzentration, wodurch die isotonische Bedingung aufgehoben wird. Dadurch strömt Wasser ein, und die Mitochondrien schwellen. Die Schwellung kann turbidimetrisch verfolgt werden. Fig. 41 zeigt die Schwellung der Mitochondrien bei Anwesenheit verschiedener Acetat-Salze. Sie zeigt, dass  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{++}$  bei Anwesenheit des Liganden sehr leicht durch die Membran transportiert werden.  $\text{Ba}^{++}$  wird bereits wesentlich schlechter und  $\text{Mg}^{++}$  und  $\text{Li}^+$  kaum mehr transportiert. Eine Messung mit  $\text{Na}^+$  ist nicht sinnvoll, da die Mitochondrienmembran ein eigenes  $\text{Na}^+$ -Transportsystem enthält, für welches keine Inhibitoren bekannt sind.

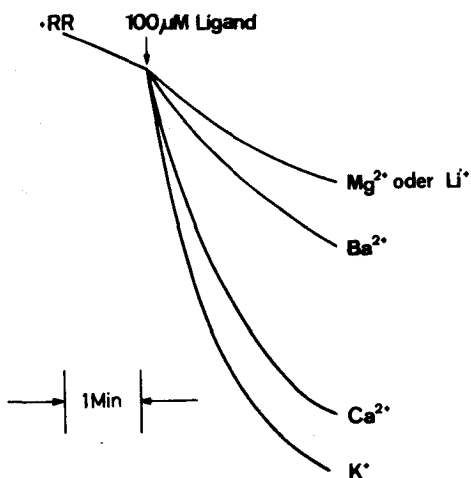
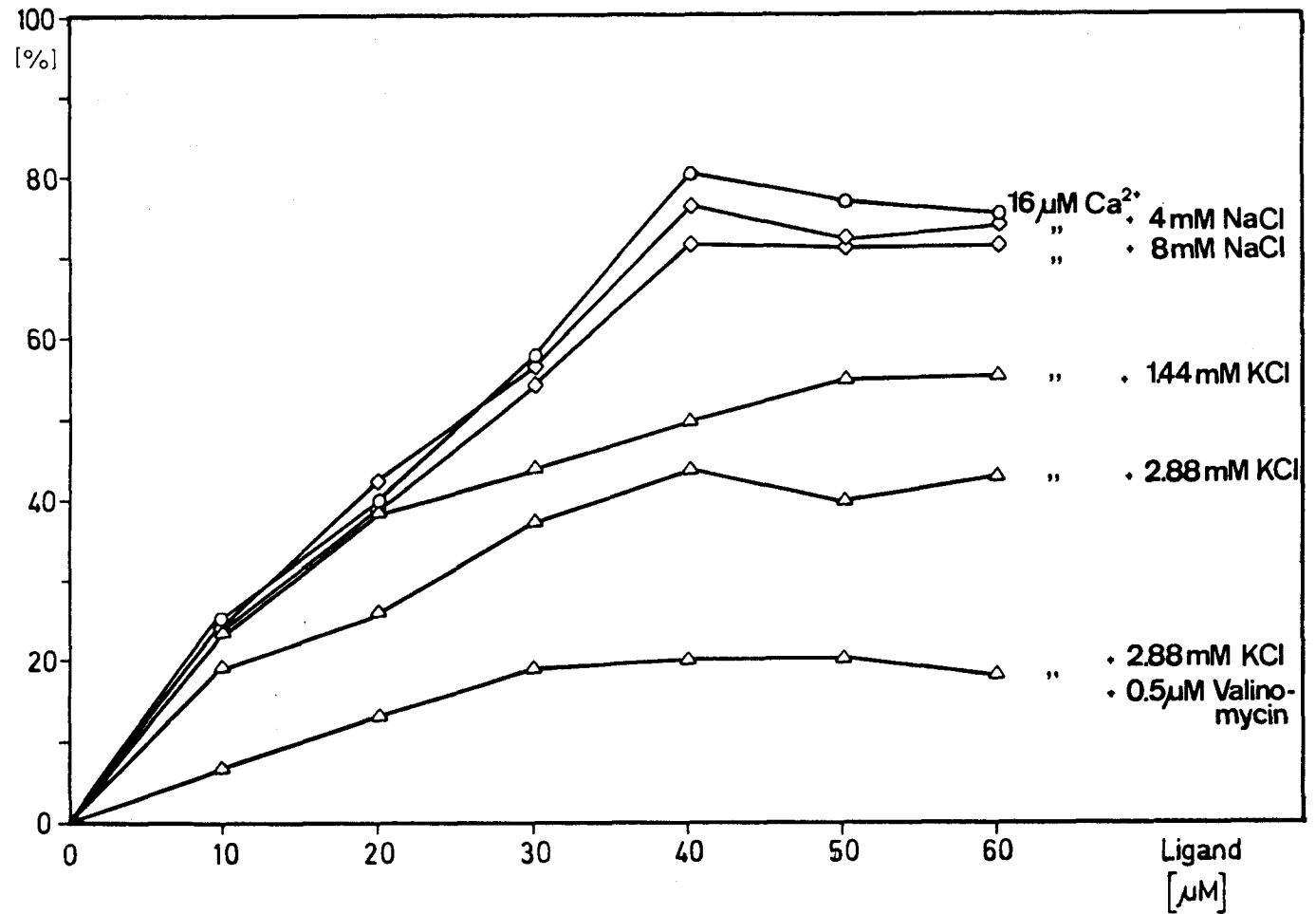


Fig. 41:

Schwellen von Mitochondrien in Anwesenheit von Acetatsalzen verschiedener einwertiger (Konzentration 120 mM) resp. zweiwertiger Kationen (Konzentration 80 mM). Medium: Puffer, 4  $\mu\text{M}$  Rutheniumrot (RR), 1.2 mg Protein/ml.



**Fig. 42:** Aufnahme von Ca<sup>++</sup> in Mitochondrien bei Anwesenheit anderer Kationen und verschiedenen Ligandkonzentrationen.

Einen weiteren Hinweis auf die Transportselektivität des Liganden in Mitochondrienmembranen gibt Fig. 42. Sie zeigt die Aufnahme von Ca<sup>++</sup> in Anwesenheit von hohen Konzentrationen anderer Ionen. Die Anwesenheit von Na<sup>+</sup> beeinflusst den Ca<sup>++</sup>-Transport nur unwesentlich. Dagegen konkuriert K<sup>+</sup> kräftig mit dem Ca<sup>++</sup> um die Aufnahme durch den Liganden.



#### 7.4. Diskussion

Die Fähigkeit des Liganden ETH 1001, Ionen durch biologische Membranen zu transportieren, ist hier an drei Beispielen deutlich aufgezeigt. Bei den Membranen, an denen ein Konzentrationsgradient die treibende Kraft bildet, entfaltet der Ligand seine Wirkung erst bei Anwesenheit von FCCP oder Tetraphenylborat. Dass FCCP die Rolle eines lipophilen Anions spielt, zeigt sich darin, dass es durch  $K^+$ -Valinomycin nicht ersetzbar ist. Wohl aber ist es durch Tetraphenylborat ersetzbar.

Die Notwendigkeit von lipophilen Anionen fällt in den Mitochondrien wohl wegen des hohen Membranpotentials als treibende Kraft für den Ionen-transport weg.

Zwei interessante Experimente geben Hinweise auf die Selektivität des Liganden ETH 1001 bezüglich anderer Alkali- und Erdalkalitionen. Theoretische Voraussagen diesbezüglich sind kaum möglich, da die Dielektrizitätskonstanten von biologischen Membranen weitgehend unbekannt sind. Sie werden stark von den Membranproteinen beeinflusst. Die Experimente zeigen, dass der Ligand die Bevorzugung von  $Ca^{++}$  innerhalb der Erdalkalimetallionen nicht verliert. Innerhalb der Alkalimetalle scheint er  $K^+$  vor  $Na^+$  und insbesondere vor  $Li^+$  zu bevorzugen. Diese Tatsache ist erstaunlich, da bei potentiometrischen Messungen innerhalb der Alkalimetalle  $Li^+$  in jedem Fall das bevorzugteste Ion ist. Eine Aussage über die Stellung der Alkalimetalle relativ zu den Erdalkalimetallen ist kaum möglich, da bei den Messungen die Alkaliionen immer im Ueberschuss eingesetzt wurden.

Weiter ist zu berücksichtigen, dass es sich hier um Transportselektivitäten handelt, die nicht unbedingt mit den potentiometrisch gemessenen Selektivitäten identisch sein müssen [102].

## 8. MECHANISTISCHE BETRACHTUNGEN DES IONEN - TRANSPORTES DURCH BIMOLEKULARE MEMBRA- NEN MITTELS NEUTRALEN IONENCARRIERN

Die grossen Wegbereiter in der theoretischen Beschreibung des Ionen-transportes mittels Carriermolekülen in bimolekularen Membranen waren die Gruppen von Eisenman und Läuger. In einem ersten Versuch zur quantitativen Beschreibung des Carrier-Effektes im Jahre 1968 betrachteten Eisenman et al. [138,139] die Membran als eine dünne, lipophile Flüssigkeitsschicht. Sie wendeten darauf die klassischen, für makroskopische Systeme hergeleiteten Gleichungen der Thermodynamik nach dem Nernst-Planck-Formalismus an. Im Jahre 1970 postulierten Läuger und Stark [137] für den Durchtritt von Teilchen durch die Membran eine scharfe Aktivierungsbarriere nach dem Eyring-Typ. Da dieses Modell nicht fähig war, das Carrier-induzierte Ionentransportverhalten von bimolekularen Membranen richtig zu beschreiben, entwickelte Hladky [112,140] und später auch Ciani [141,142] eine Theorie, die sowohl auf die Grenzflächenreaktionen (Komplexierungs- und Dekomplexierungsreaktion) wie auch auf eine trapezförmige Energiebarriere im Membraninnern anwendbar ist. Diese Theorie war in der Beschreibung von Membranleitfähigkeiten und stromlosen Membranpotentialen an bimolekularen Membranen ausserordentlich erfolgreich [142,143]. Die Ueberzeugungskraft dieser Theorie wird jedoch dadurch geschwächt, dass Gleichungen, die sich für bestimmte Grenzfälle ableiten lassen im Widerspruch zu den Gleichungen für die gleichen Grenzfälle stehen, die nach dem früheren Modell von Läuger und Stark abgeleitet wurden [122].

Ein anderes Modell, das auf Ionentransporte mittels neutralen Carriern in dicken Membranen anwendbar ist, wurde von Morf entwickelt [13,117,120]. In Anlehnung an dieses Modell und an frühere Arbeiten von Cussler [147] wurde von ihm auch eine Theorie entworfen, bei der ein chemischer Potentialgradient die treibende Kraft bildet [118]. Neulich ist es Morf [144] ebenfalls gelungen, in einer hervorragenden Arbeit eine allgemei-

ne Theorie aufzustellen und alle wichtigen Resultate der früheren Theorien in einer einzigen Gleichung zusammenzufassen.

### 8.1. Kurze Darstellung der Morf'schen Theorie

Ausgehend von zwei verschiedenen Modellen, die die Form der Energiebarriere in der Membran beschreiben, können zwei formal identische Gleichungen hergeleitet werden. Das eine Modell postuliert eine trapezförmige Energiebarriere, wie sie von Hladky und Ciani eingeführt worden ist; das andere Modell geht von einem Multibarrieren-Konzept nach dem Eyring-Typ [145] aus.

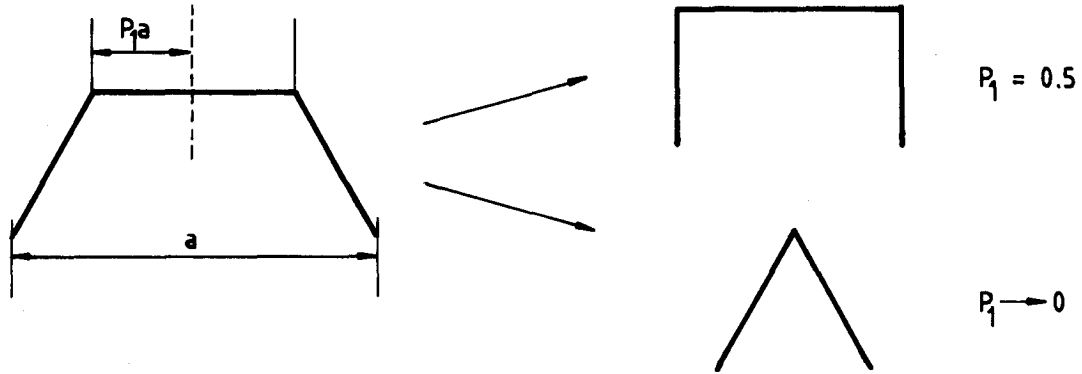
#### a. Trapezförmige Energiebarriere

Ausgangspunkt bei dieser Entwicklung ist die Nernst-Planck-Gleichung in ihrer allgemeinen Form

$$J_i = D_i \frac{c_i' e^{f_i'} - c_i'' e^{f_i''}}{\int_{(1)}^{(2)} e^{f_i(x)} dx} ; f_i(x) = \frac{\mu_i^0(x)}{R T} + \frac{z_i F \phi(x)}{R T} \quad (8);(9)$$

wobei:	$J_i$	Flussdichte	} bezogen auf I in der Membran
	$D_i$	Diffusionskoeffizient	
	$c_i', c_i''$	Konzentration an der Stelle (1) resp. (2)	
	$z_i$	Ladung	
	$f_i(x)$	reduzierte Freie Energie-Funktion	
	$f_i', f_i''$	Wert von $f_i(x)$ an der Stelle (1) resp. (2)	
	$\mu_i^0(x)$	chemisches Standardpotential	
	$\phi(x)$	elektrisches Potential	
	R	Gaskonstante	
	T	absolute Temperatur	
	F	Faraday-Konstante	

Zur Beschreibung der Form der Energiebarriere wird ein Parameter  $P_1$  eingeführt, der Werte zwischen 0 und 0.5 einnehmen kann, wobei  $a$  die Länge der Basis des Trapezes ist (Fig. 43).



**Fig. 43:** Form der Energiebarriere und Parameter  $P_1$ . Die Figur rechts zeigt die beiden möglichen Extremfälle.

Wenn die Höhe ( $\omega_i$ ) und die Breite ( $2a P_1$ ) der Energiebarriere genügend gross sind, kann das Integral im Nenner der Gleichung (8) durch den Anteil des Integrals entlang des flachen Plateaus der Barriere ersetzt werden

$$\int_{(1)}^{(2)} e^{f_i(x)} dx = \frac{a}{z_i \phi_m} \left[ e^{f_i(d/2+P_1 a)} - e^{f_i(d/2-P_1 a)} \right]$$

$$= 2P_1 a e^{f_i(d/2)} \frac{\sinh(P_1 z_i \phi_m)}{P_1 z_i \phi_m} \quad (10)$$

wobei:  $d$  Membrandicke  
 $\phi_m$  reduzierte membraninterne Potentialdifferenz

Durch Einsetzen von (10) in (8) ergibt sich eine Gleichung, die allgemeiner ist als diejenige, die Ciani [141] auf Grund des gleichen Modells hergeleitet hat:

$$J_i = \frac{k_i}{F_i(\vartheta)} \left[ c_i e^{-z_i \vartheta m/2} - c_i'' e^{z_i \vartheta m/2} \right] \quad (11)$$

mit:

$$F_i(\vartheta) = \frac{\sinh(P_1 z_i \vartheta m)}{P_1 z_i \vartheta m} \quad (12)$$

und

$$k_i = D_i/2P_1 a e^{\omega_i} \quad (13)$$

$F_i(\vartheta)$  ist eine Funktion der angelegten Spannung  $\vartheta$  und  $k_i$  ist die Geschwindigkeitskonstante für die Translokation von Ionen durch das Membraninnere.

Gleichung (11) führt zu zwei interessanten Spezialfällen. Wird  $P_1 = 0.5$  gesetzt (rechteckiges Energieprofil) erhält man aus Gleichung (11) die bekannte Goldman-Gleichung [146]. Setzt man für  $P_1$  hingegen den Wert 0 ein (dreieckiges Energieprofil), führt (11) zur selben Gleichung, die Läger und Stark [137] aus ihrem Modell hergeleitet hatten.

#### b. Modell mit mehreren Energiebarrieren

Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass ein Teilchen beim Durchqueren der Membran  $N$  scharfe Aktivierungsbarrieren der Höhe  $f_i(n)$  zu überqueren hat (Fig. 44).

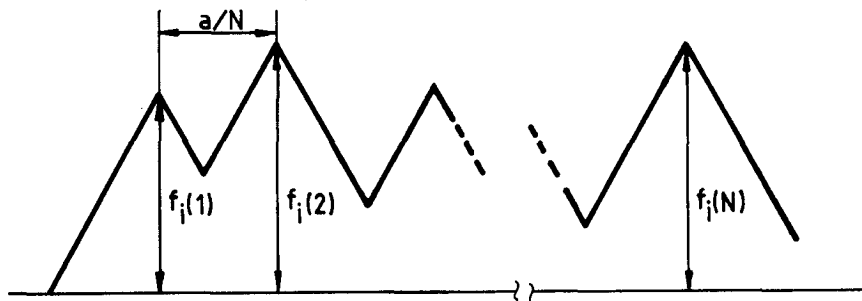


Fig. 44: Behandlung der Membran als eine Serie von  $N$  scharfen Aktivierungsbarrieren nach dem Modell von Eyring.

$$J_i = \frac{kT}{h} l_i \frac{c_i' e^{f_i'} - c_i'' e^{f_i''}}{\sum_{n=1}^N e^{f_i(n)}} \quad (14)$$

wobei  $f_i(n)$  Höhe der n-ten Aktivierungsbarriere  
 $l_i$  Abstand zwischen der Barriere an der Phasengrenze und der ersten Aktivierungsbarriere im Membraninnern  
 $k$  Boltzmann Konstante  
 $h$  Planck Konstante

Der Einfachheit halber wird angenommen, dass alle  $N$  Barrieren die gleiche Höhe  $\omega_i$  (d. h.  $f_i(n)$  für  $\vartheta = 0$ ) und die Basislänge  $a/N$  haben. Dadurch können wir Gleichung (14) zu einer Gleichung umschreiben, die formal identisch ist mit (11)

$$J_i = \frac{k_i}{F_i(\vartheta)} \left[ c_i' e^{-z_i \vartheta m / 2} - c_i'' e^{z_i \vartheta m / 2} \right] \quad (11)$$

mit:

$$F_i(\vartheta) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \exp \left[ - \frac{N+1-2n}{2N} z_i \vartheta m \right] \quad (15)$$

und

$$k_i = \frac{kT}{h} \frac{l_i}{N} e^{-\omega_i} \quad (16)$$

Aus (11), (15) und (16) lassen sich interessanterweise wieder die gleichen Grenzfälle ableiten wie aus (11), (12) und (13).

Für  $N = 1$  (dreieckiges Energieprofil) ergibt sich die Gleichung von Läger und Stark [137] und für  $N \rightarrow \infty$  die Goldman-Gleichung [146].

### c. Kombinationen mit weiteren Gleichungen

Für das weitere Vorgehen werden noch zwei Parameter definiert:

$P_2$  beschreibt den Anteil der angelegten Spannung, die über der der halben Länge des flachen Plateaus der trapezförmigen Energiebarriere abfällt.

$P_3$  beschreibt den Anteil des Spannungsabfalles zwischen der Membranzmitte und der Spitze einer Aktivierungsbarriere an der Phasengrenze.

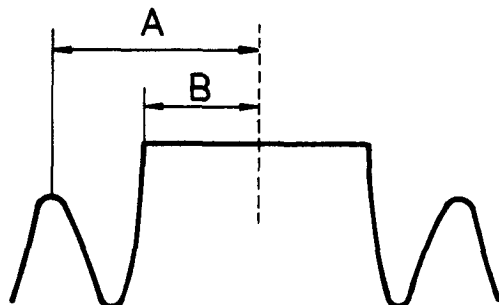


Fig. 45: Mögliche Form eines Energieprofils

Fig. 45 zeigt eine mögliche Form eines Energieprofils in der Membran, wobei  $P_2$  den über  $B$  abfallenden Spannungsanteil,  $P_3$  den über  $A$  abfallenden Anteil bezeichnet.

Für  $P_1$ ,  $P_2$  und  $P_3$  gilt weiter

$$P_2 \approx P_1 (4 P_3 - 1) \quad (17)$$

$$P_2 \leq P_3 \leq 0.5 \quad (18)$$

$$0 \leq P_2 \leq 0.5 \quad (19)$$

$$0.25 \leq P_3 \leq 0.5 \quad (20)$$

- Grenzfälle:  $P_3 = 0.5$  gesamte Spannung fällt im Membraninnern ab (kein Phasengrenzpotential)
- $P_3 = 0.25$  gesamte Spannung fällt über der Phasengrenze ab
- $P_2 = 0$  ( $P_3 = 0.5$  und/oder  $P_1 = 0$ ) dreieckiges Energieprofil
- $P_2 = 0.5$  ( $P_3 = P_1 = 0.5$ , siehe Gleichung (18)) rechteckiges Energieprofil

Wird die im vorherigen Kapitel hergeleitete Gleichung (11) kombiniert

- mit Gleichungen zur Beschreibung der Phasengrenzkinetik unter Berücksichtigung von Phasengrenzpotentialen.
- mit Gleichungen die den geschlossenen Fluss des Carriers berücksichtigen (im steady-state-Zustand: totaler Fluss von Carrier = 0),

ergibt sich für  $J_i$  die folgende allgemeine Gleichung [144]

$$J_i \left\{ F_i(\vartheta) + \frac{k_i}{k_i} \left[ \frac{\exp(P_3 z_i \vartheta)}{\exp(z_i \vartheta'_0/2)} + \frac{\exp(-P_3 z_i \vartheta)}{\exp(z_i \vartheta''_0/2)} \right] \right\} \quad (21)$$

$$= k_i c_{i,0}' \left[ 1 - \frac{\sum n_i J_i}{2k_s c_s} \right]^{n_i} \exp(z_i \vartheta/2) - k_i c_{i,0}'' \left[ 1 + \frac{\sum n_i J_i}{2k_s c_s} \right]^{n_i} \exp(-z_i \vartheta/2)$$

mit

$$F_i(\vartheta) = \frac{\sinh(P_2 z_i \vartheta)}{P_2 z_i \vartheta} \quad (\text{trapezförmige Barriere}) \quad (22)$$

oder

$$F_i(\vartheta) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \exp \left[ \frac{N+1-2n}{2N} (4P_3 - 1) z_i \vartheta \right] \quad (\text{Multibarrieren-Modell}) \quad (23)$$



wobei:	$k_i$	Geschwindigkeitskonstante für den Durchtritt der Ionen durch die Membran
	$\overleftarrow{k}_i$	Geschwindigkeitskonstante für den Austritt der Ionen aus der Membran (Dekomplexierungsreaktion)
	$\phi$	reduzierte angelegte Spannung (in Einheiten von $RT/F \approx 25 \text{ mV}$ )
	$\phi'_0, \phi''_0$	reduzierte Oberflächenpotentiale an den Phasengrenzen bei Spannung $\phi \approx 0$
	$c'_{i,0}, c''_{i,0}$	Gleichgewichtswerte für $c'_i$ resp. $c''_i$ , d.h. für die Ionenkonzentration in der Membran am Ort lokaler Energieminima nahe den Phasengrenzen
	$c_s$	Gleichgewichtskonzentration des Carriers in der Membran
	$k_s$	Geschwindigkeitskonstante für den Durchtritt freier Carrier durch die Membran
	$n_i$	Stöchiometrie des $1:n_i$ -Komplexes

Gleichung (21) bietet einen universalen Ausdruck zur Beschreibung des durch Carrier induzierten Ionenflusses, des Flusses von freien Ionen oder auch von ungeladenen Teilchen durch bimolekulare Membranen wie auch durch makroskopische Membranen.

## 8.2. Spezialfälle

Werden gewisse Annahmen getroffen, kann Gleichung (21) zur Beschreibung dieser Spezialfälle zum Teil wesentlich vereinfacht werden.

### 8.2.1. Vereinfachungen nach dem Modell von Läger und Stark

Das Modell von Läger und Stark [137] beinhaltet folgende Annahmen:

- dreieckige Aktivierungsbarriere ( $P_2 = 0$  resp.  $N = 1$ , vgl. Gleichung (22) resp. (23))  $\implies F_i(\phi) = 1$
- Membran symmetrisch  $\implies \phi'_0 = \phi''_0 = \phi_0$
- nur eine Sorte Kationen, Ladung  $z_i = 1$
- 1:1-Komplexe  $\implies n_i = 1$
- wässrige Lösung auf beiden Seiten identisch

Dadurch wird Gleichung (21) stark vereinfacht und wird identisch zur Gleichung, die Länger und Stark [137] aus ihrem Modell hergeleitet haben.

Diese Gleichung eignet sich zur quantitativen Beschreibung des Flusses von lipophilen Anionen durch bimolekulare Membranen, versagt jedoch bei Anwendung auf Carrier-induzierte Ionentransportvorgange. Offenbar haben lipophile Anionen beim Durchtritt durch die Membran tatsächlich eine einzige scharfe Aktivierungsbarriere zu iberwinden, wohingegen für Ion-Ligand-Komplexe eher eine trapezförmige bzw. mehrere scharfe Barrieren vorhanden zu sein scheinen.

### 8.2.2 Vereinfachung nach dem Modell von Ciani, Eisenman und Krasne

Durch Annahme

- einer symmetrischen Membran  $\implies \phi'_0 = \phi''_0 = \phi_0$
  - einer symmetrischen Ligandverteilung in der Membran  $\implies \sum_i n_i J_i \ll k_s c_s$
- [141, 144]

kann aus (21) die folgende vereinfachte Flussgleichung abgeleitet werden

$$J_i = \frac{k_i c_{i,0}' \exp(z_i \phi / 2) - k_i c_{i,0}'' \exp(-z_i \phi / 2)}{F_i(\phi) + 2w_i \cosh(P_3 z_i \phi)} \quad (24)$$

$$\text{mit } w_i = \frac{k_i}{k_i} \exp\left[\frac{z_i \phi_0}{2}\right] \quad (25)$$

Aus  $w_i$  ist die Art des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes erkennbar.

$w_i \cong 0$  Translokation der Ionen durch die Membran geschwindigkeitslimitierend

$w_i \gg 1$  Kinetik an der Phasengrenze geschwindigkeitslimitierend

Aus einer gründlichen Analyse der experimentellen Werte von Eisenman et al. [142] konnte die bemerkenswerte Tatsache erkannt werden,

dass die Parameter  $P_2$  und  $P_3$  für alle Kationen und für alle Carrier-Membran-Systeme praktisch die gleichen Werte annehmen [144]

$$\begin{aligned} P_2 &\cong 0.35 \\ P_3 &\cong 0.46 \end{aligned} \quad (26)$$

Daraus kann abgeleitet werden, dass der flache Anteil der trapezförmigen Aktivierungsbarriere ungefähr 70% der gesamten Länge der Barriere ausmacht und dass fast die gesamte Spannung im Membraninnern abfällt.

Aus diesen Werten kann eine interessante Parallelität zwischen dem Nernst-Planck'schen und dem Eyring-Modell aufgezeigt werden.

Bei Behandlung des Eyring'schen Energieprofils als eine Doppelbarriere ( $N = 2$ ), wird (23) zu

$$F_i(\vartheta) = \cosh \left[ (4P_3 - 1) z_i \vartheta / 4 \right] \quad (27)$$

Dieser Ausdruck ist für die gebräuchlichen Spannungen bis  $\sim 150$  mV praktisch identisch mit (22)

$$F_i(\vartheta) = \frac{\sinh (P_2 z_i \vartheta)}{P_2 z_i \vartheta} \quad (22)$$

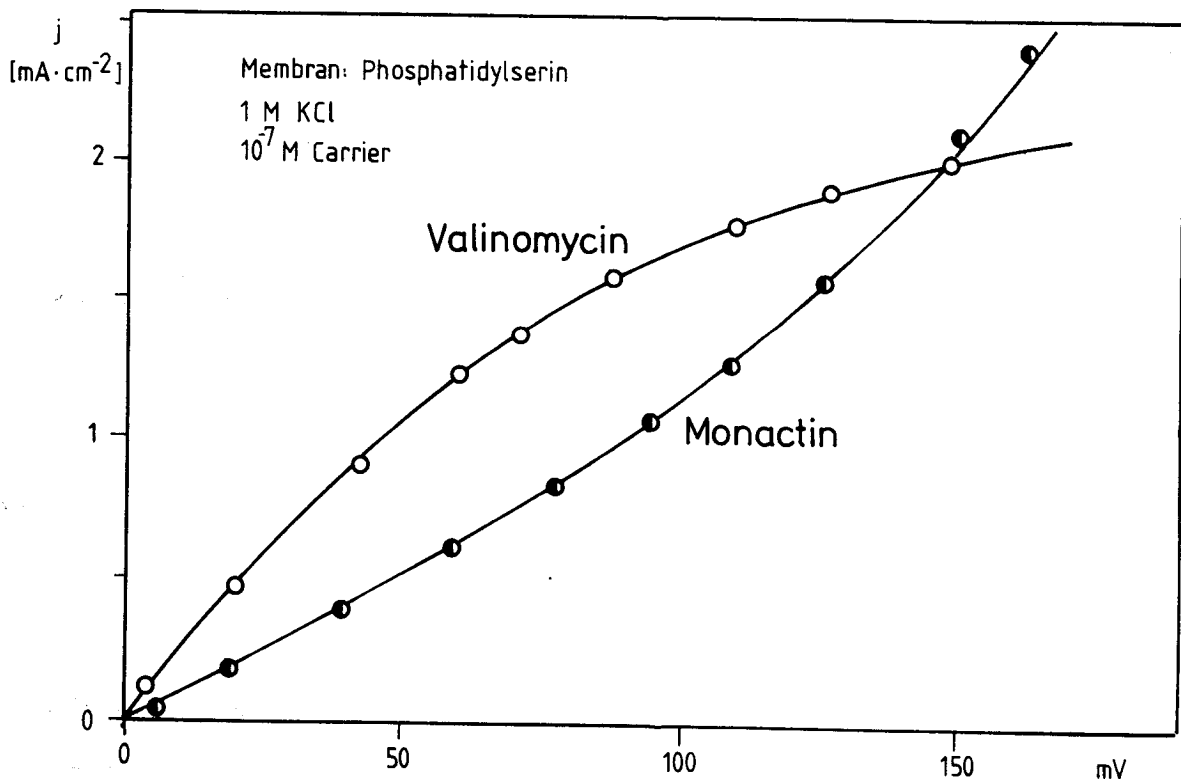
Für ein symmetrisches System ( $c'_{i,0} = c''_{i,0} = c_i$ ) und in Anbetracht der Gleichwertigkeit von (27) und (22) kann Gleichung (24) nochmals vereinfacht werden zur leicht handhabbaren Gleichung

$$J_i = \frac{2k_i c_i \sinh(z_i \phi / 2)}{\cosh(P_3 z_i \phi - z_i \phi / 4) + 2w_i \cosh(P_3 z_i \phi)} \quad (28)$$

Für die Approximation  $P_3 = 0.5$  und die Annahme  $w_i \cong 0$  (Durchtritt der Ionen durch das Membraninnere geschwindigkeitslimitierend) wird (28) zum einfachen Ausdruck

$$J_i = 4k_i c_i \sinh(z_i \phi / 4) \quad (29)$$

In der Literatur finden sich Beispiele für beide Möglichkeiten. Der  $K^+$ -Transport mittels Monactin durch Phosphatidylserin-Membranen lässt sich mit Gleichung (29) beschreiben (d. h.  $w_i \cong 0$ , 'hyperbolische' Kurve), der  $K^+$ -Transport mittels Valinomycin durch die gleichen Membranen



**Fig. 46:** Strom-Spannungskurve für  $K^+$ -Transport mit Valinomycin resp. Monactin durch Phosphatidylserin-Membranen. Experimentelle Werte aus [148]. Ausgezogene Kurve für Valinomycin berechnet nach Gleichung (28) ( $P_3=0.5$ ,  $w_i=0.46$ ), Kurve für Monactin berechnet nach Gleichung (29) ( $P_3=0.5$ ,  $w_i=0$ ). Nach [144].

durch Gleichung (28) (d. h.  $w_i > 0$ , 'Sättigungs'-Kurve, Fig. 46) [144, 148].

Analoge Strom-Spannungskurven wurden auch für den in dieser Arbeit ausgedehnt untersuchten Liganden ETH 1001 erhalten (Kapitel 9.3).

Lässt man in Gleichung (28) und (29) die Spannung  $\phi$  gegen 0 streben, erhält man die stromlose Leitfähigkeit  $G_0$ . Für (28) erhält man

$$G_0 = \lim_{\phi \rightarrow 0} \frac{z_i F J_i}{(RT/F) \phi} = \frac{(z_i F)^2}{RT} \frac{k_i c_i}{1+2 w_i} \quad (30)$$

resp. für (29) ( $w_i \cong 0$ )

$$G_0 = \frac{(z_i F)^2}{RT} k_i c_i \quad (31)$$

Interessanterweise erhält man aus allen hier abgeleiteten Gleichungen je nach Annahmen für  $G_0$  den gleichen Ausdruck, der formal unabhängig von den Parametern  $P_3$  und  $P_2$  oder  $N$  ist.

Setzt man in (30) für  $c_i$  den vollen Ausdruck (32) ein [144]

$$c_i = \frac{\vec{k}}{\overleftarrow{k}} a_i c_s^{n_i} e^{-z_i \phi_0} \quad (32)$$

wobei  $\vec{k}$  Geschwindigkeitskonstante für den Durchtritt von Ionen aus der wässrigen Phase in die Membran (Geschwindigkeit der Komplexierungsreaktion)

$a_i$  Aktivität der unkomplexierten Spezies I in der wässrigen Phase

erhält man

$$G_0 = \frac{(z_i F)^2}{RT} \frac{k_i}{1+2 w_i} \frac{\bar{k}}{\bar{k}} a_i c_s^{n_i} e^{-z_i \phi_0} \quad (33)$$

Diese stromlose Leitfähigkeit  $G_0$  ist eine häufig gemessene Grösse. Gründliche Untersuchungen an bimolekularen Membranen zeigten in Uebereinstimmung mit Gleichung (33) die daraus ableitbaren Tatsachen [102]:

- $G_0$  ist proportional zur Aktivität  $a_i$  des permeierenden Ions in der wässrigen Phase [122, 135-137, 148].
- $G_0$  ist proportional zur n-ten Potenz der Carrier-Konzentration  $c_s$  [122, 136, 137, 148].
- $G_0$  wird stark beeinflusst durch das Oberflächenpotential  $\phi_0$  der Membran, welches hauptsächlich durch die Art des Lipides bedingt ist [136, 149].

Die in dieser Arbeit ausgeführten Leitfähigkeitsmessungen erfolgten fast durchwegs bei 30 mV. Trotz dieser wesentlich von Null verschiedenen Spannung gelten Gleichung (33) und die daraus ableitbaren Schlüsse im allgemeinen immer noch, da auch in den andern Flussgleichungen ((28) und (29))  $c_i$  nur im linearen Term vorkommt.

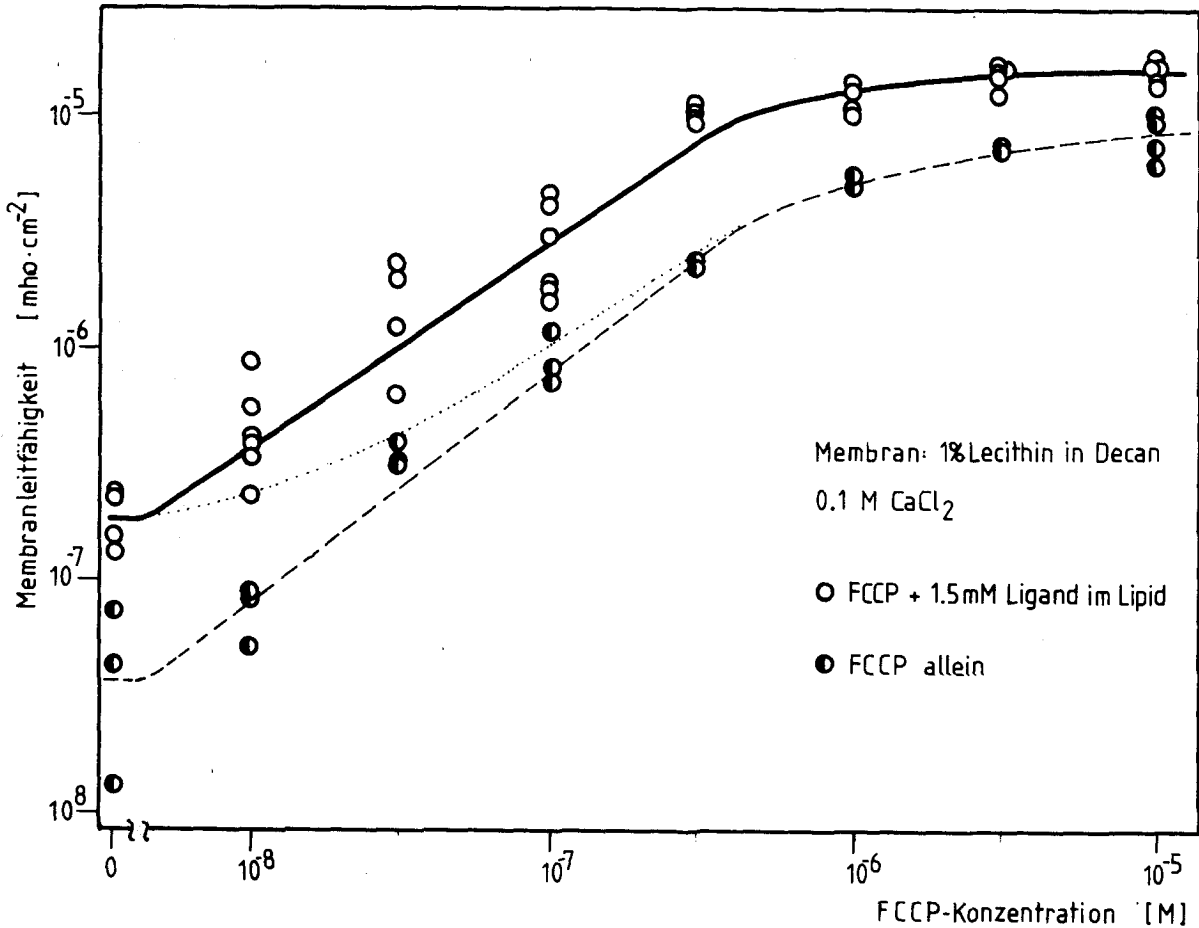
## 9. UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON LIPOPHILEN ANIONEN AUF DEN CARRIER-INDUZIERTEN IONENTRANSPORT AN BIMOLEKULAREN MEMBRANEN

Bei Ionentransportexperimenten an Liposomen und an biologischen Membranen wurde festgestellt, dass lipophile Anionen beim Ionentransport mit den untersuchten Liganden eine tragende Rolle spielen. Es wurde deshalb versucht, durch genauere Untersuchungen an Schwarzen Membranen die Rolle, die die lipophilen Anionen bei diesem Transport spielen aufzuhellen.

### 9.1. Einfluss der Anionen-Konzentration

In diesen Experimenten wurde der Einfluss von steigenden Konzentrationen eines lipophilen Anions auf den carrierinduzierten Ionentransport untersucht. Um die Zeit zur Gleichgewichtseinstellung (vgl. Kapitel 5.3) zu verkürzen, wurde in diesen Experimenten der Ligand direkt in die Lipidlösung, die zur Herstellung der Membranen verwendet wurde, vorgegeben.

In Fig. 47 ist die Veränderung der Leitfähigkeit einer Lecithin-Decan (1:99)-Membran, die 1.5 mM Ligand ETH 1001 enthielt gezeigt. Ins wässrige Medium (0.1 M  $\text{CaCl}_2$ ) wurden steigenden Mengen FCCP gegeben. Es zeigte sich, dass FCCP bereits in geringen Mengen die Fähigkeit hat, die Leitfähigkeit der ligandhaltigen Membran stark zu erhöhen. Die Leitfähigkeit steigt annähernd linear mit der FCCP-Konzentration (Steigung der ausgezogenen Kurve im linearen Teil = 0.87,  $r^2 = 0.83$ ). Zum Vergleich wurde die Membranleitfähigkeit auch in Abwesenheit von Ligand gemessen (gestrichelte Linie, Steigung = 0.99,  $r^2 = 0.96$ ). Um zu zeigen, dass die gemessenen Leitfähigkeiten nicht einfach die Summe der Leitfähigkeiten der einzelnen Komponenten sind, wurde in



**Fig. 47:** Einfluss von steigenden Konzentrationen FCCP auf den Ionentransport mit dem Liganden ETH 1001. Der Ligand wurde in die Lipidlösung vorgegeben. Steigungen: ausgezogene Linie 0.87, gestrichelte Linie 0.99. Punktierte Linie: algebraische Summe der Leitfähigkeiten der Einzelkomponenten.

Fig. 47 die algebraische Summe der Einzelleitfähigkeiten eingezeichnet. Auf welche Art FCCP hier jedoch die Leitfähigkeit beeinflusst ist aus diesen Kurven nicht ersichtlich.



## 9.2. Einfluss von lipophilen Anionen auf die Transport-Stöchiometrie

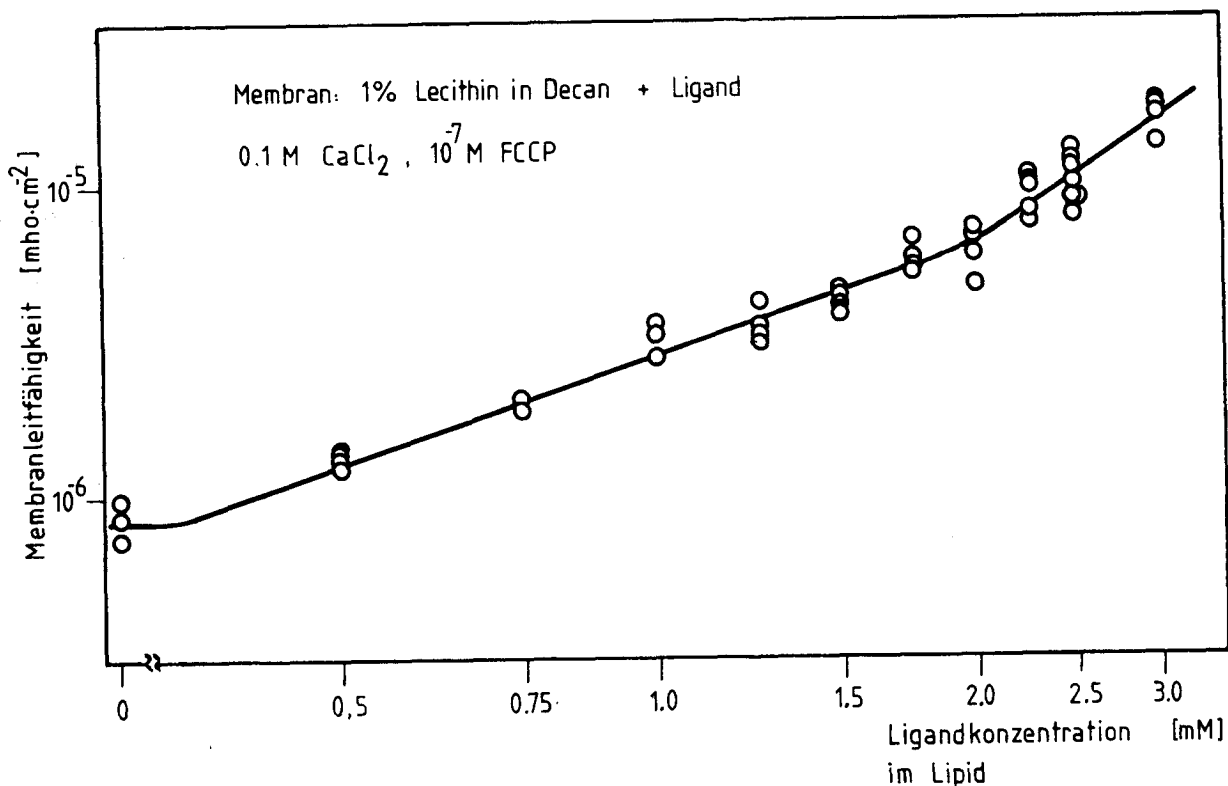
Lipophile Anionen erhöhen die Leitfähigkeit von ligandhaltigen Membranen stark. Ob damit eine Änderung der Stöchiometrie der durchtretenden Ion-Ligand-Komplexe einhergeht, wurde dadurch geprüft, dass bei konstanter  $\text{Ca}^{++}$ - und FCCP-Konzentration die Ligandkonzentration variiert wurde.

Fig. 48 zeigt die Resultate dieser Messungen. Zur Lipidlösung wurden steigende Mengen Ligand ETH 1001 gegeben. Die wässrige Lösung bestand aus 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  und  $10^{-7}$  M FCCP. Im Diagramm lässt sich ohne weiteres erkennen, dass die Messpunkte bei Konzentrationen  $\geq 2.0$  mM von der linearen Korrelation gegen oben abweichen. Diese Beobachtung wird durch die Korrelationskoeffizienten der linearen Regressionen erhärtet. Sie sind am grössten, wenn für die Punkte im Konzentrationsbereich  $< 2.0$  mM und für diejenigen im Bereich  $\geq 2.0$  mM unterschiedliche Geraden angepasst werden.

Die Regressionsgerade im unteren Teil des Diagrammes zeigt eine Steigung von 1.11 ( $r^2 = 0.96$ ), die bei höheren Konzentrationen in eine Steigung von 2.25 ( $r^2 = 0.78$ ) übergeht.

In früheren Diagrammen der gleichen Art (Fig. 26 und Fig. 27, Kapitel 5.2) wurden Steigungen um 2 resp. 3 erhalten. Es scheint damit tatsächlich zuzutreffen, dass durch die Anwesenheit von lipophilen Anionen die Zusammensetzung der durchtretenden Komplexe verändert wird. Waren es in den früheren Experimenten 1:2 bis 1:3-Komplexe, die durch die Membran wanderten, dürften es hier  $[\text{Ca}_1 : \text{L}_1 : \text{A}_1]$ -Assoziate (A = lipophiles Anion) sein, die die Leitfähigkeit verursachen. Dass auch ein Anion A an der Assoziat-Bildung beteiligt sein dürfte, kann aus der Steigung 0.83 im Diagramm Fig. 47 gefolgert werden.

Diese Annahme der Assoziate scheint nicht unvernünftig zu sein, da damit erklärbar wird, dass bereits recht geringe Ligandkonzentrationen eine erhöhte Membranleitfähigkeit verursachen können, da hier nur noch ein Ligandmolekül für die Bildung eines Komplexes notwendig ist.



**Fig. 48:** Veränderung der Membranleitfähigkeit durch steigende Konzentrationen Ligand ETH 1001 in Anwesenheit von FCCP. Der Ligand wurde in die Lipidlösung vorgegeben. Wässrige Lösung: 0.1 M CaCl<sub>2</sub> mit 10<sup>-7</sup> M FCCP. Steigung der Geraden für Konzentration < 2.0 mM : 1.11 ; Steigung für Konzentrationen ≥ 2.0 mM : 2.25.

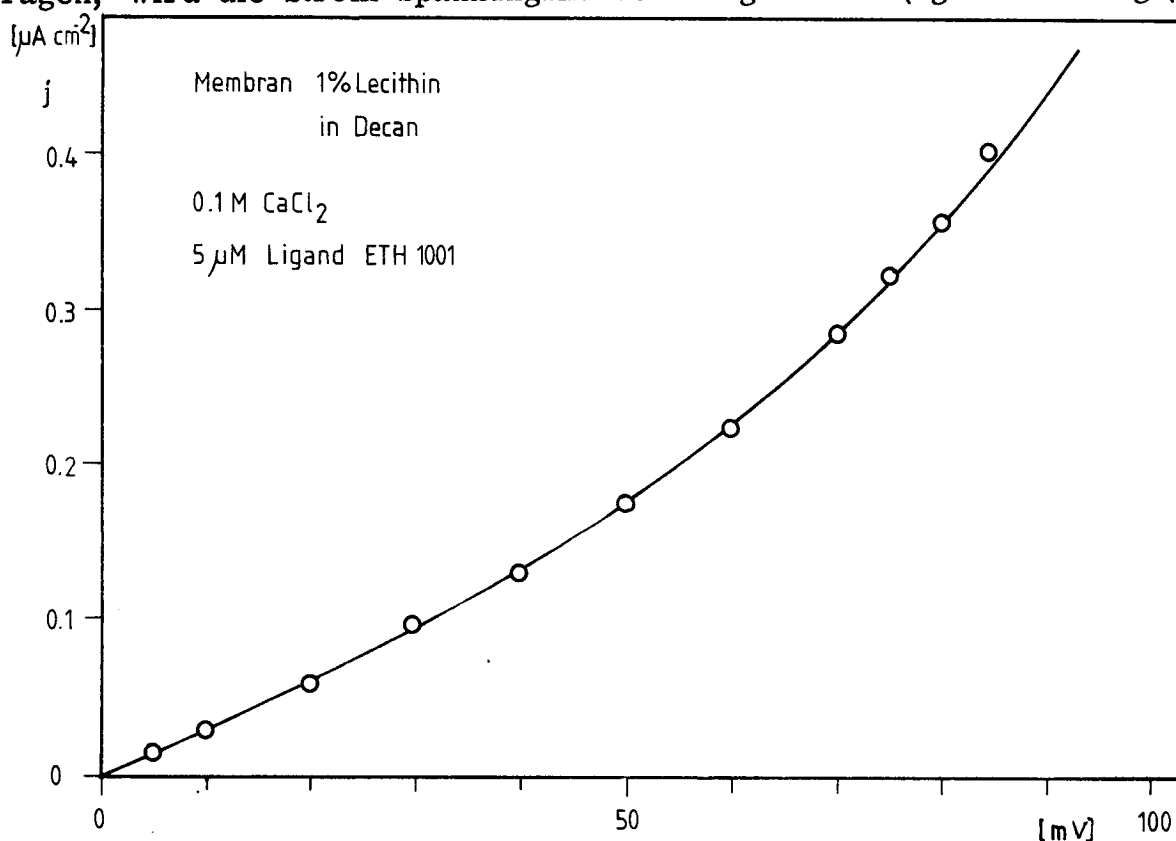
### 9.3. Einfluss von lipophilen Anionen auf die Strom-Spannungscharakteristik

Wie in Gleichung (28), (29) und in Fig. 46 gezeigt wurde ist die Form der Strom-Spannungskurve eines Transportsystems in erster Linie abhängig vom geschwindigkeitslimitierenden Schritt im Transportmechanismus. Ist der Durchtritt der Ionen durch die Membran limitierend ( $w_1 \cong 0$ ), zeigt die Strom-Spannungskurve einen 'hyperbolischen' Verlauf (siehe Fig. 46, Monactin). Ist hingegen die Kinetik an der Phasengrenze limitierend ( $w_1 > 0$ ) zeigt die Kurve 'Sättigung' (Fig. 46, Valinomycin).

Welches im Ionentransport mit dem Liganden ETH 1001 der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist und ob die lipophilen Anion die Kinetik dieses Schrittes beeinflussen, wurde mittels Aufnahme von Strom-Spannungskurven zu beantworten versucht.

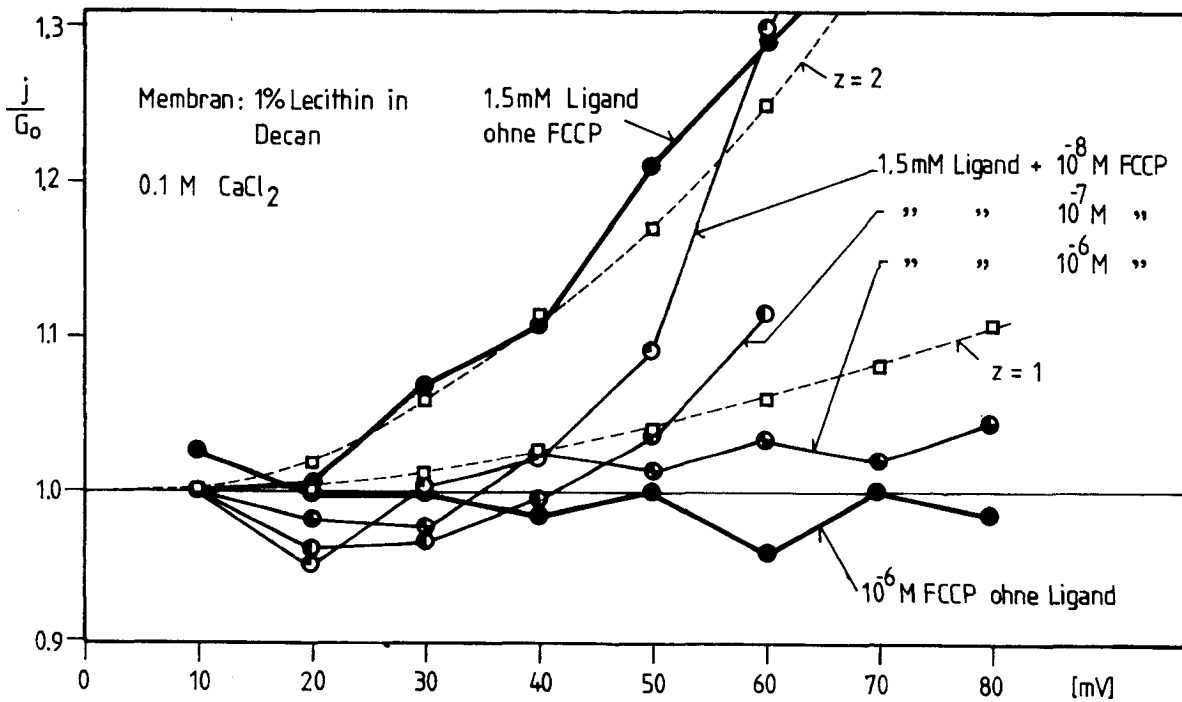
Fig. 49 zeigt eine Strom-Spannungskurve des Liganden ETH 1001 in 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  an einer Lecithin-Membran. Die ausgezogene Kurve wurde nach Gleichung (29) berechnet. Sie zeigt, dass für diesen Transport  $w_i = 0$  ist und dass damit der Durchtritt der Ionen durch das Membraninnere geschwindigkeitslimitierend ist.

Trifft die im vorherigen Kapitel getroffene Annahme zu, dass sich  $[\text{Ca:L:A}]^+$ -Assoziate bilden, sollte dies in der Strom-Spannungscharakteristik sichtbar sein. Da die durchtretenden Assoziate nunmehr die Ladung  $z_i = 1$  tragen, wird die Strom-Spannungskurve weniger steil (vgl. Gleichung (29)).



**Fig. 49:** Strom-Spannungskurve für eine Lecithin-Membran in Anwesenheit des Liganden ETH 1001. Wässrige Lösung: 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ , 5  $\mu\text{M}$  Ligand. Ausgezogene Kurve nach Gleichung (29) berechnet. Ordinate:  $j = z_i F J_i$ .

In Fig. 50 sind die für die Leitfähigkeitsverhältnisse  $j/G_0$  ( $j = z_i F J_i$ ), nach Gleichung (29) und (31) berechneten Kurven für  $z_i = 1$  und  $z_i = 2$  (gestrichelte Linien), zusammen mit Messkurven für Membranen verschiedener Zusammensetzung eingezeichnet. Die Strom-Spannungskurve der Membran, die nur Ligand enthielt, läuft annähernd parallel zur theoretischen Kurve für  $z_i = 2$  (vgl. auch Fig. 49), diejenige der ligandfreien Membran ( $10^{-6}$  M FCCP) zeigt sogar eine leicht abwärts geneigte Tendenz. Für die ligandhaltigen Membranen, denen steigende Mengen FCCP zugesetzt wurden, biegen mit steigender FCCP-Konzentration die Strom-Spannungskurven von einer beinahe übertheoretischen Steigung nahe zu zur Steigung Null ab. Diese Aenderung kann dadurch bedingt sein, dass die mittlere Ladung der permeierenden Spezies kleiner wird oder dass sich die Kurven durch Ueberlagerung immer mehr derjenigen von reinem FCCP angleichen.



**Fig. 50:** Leitfähigkeitsverhältnisse  $j/G_0$  von Lecithin-Membranen verschiedener Zusammensetzung. Wässrige Phase: 0.1 M CaCl<sub>2</sub> + verschiedene Konzentrationen FCCP. Angegebene Ligandkonzentrationen beziehen sich auf die Lipidlösung. (---□---) Kurve berechnet nach Gleichung (29) und (31) (—○—) experimentelle Kurven.

Wie schon in Fig. 47 gezeigt wurde, ist die Leitfähigkeit der FCCP und ligandhaltigen Membranen deutlich höher als die Summe der Leitfähigkeitsbeiträge der einzelnen Komponenten, so dass angenommen werden kann, dass der Transport der postulierten Assoziante den grössten Beitrag zur Leitfähigkeit ausmacht.

Trifft diese Vermutung zu, so darf wahrscheinlich auch erwartet werden, dass hauptsächlich die Eigenschaften der Assoziante die Form der Strom-Spannungskurve prägen. Daraus müsste folgen, dass die Streckung der Strom-Spannungskurven durch die verminderte Ladung der durchtretenden Teilchen bedingt ist.

Wird aber die Existenz solcher Assoziante ausgeschlossen, könnte die Verringerung des 'hyperbolischen Charakters' der Strom-Spannungskurve dadurch erklärt werden, dass  $w_i$  in Gleichung (28) grösser Null wird. Das heisst, die Geschwindigkeitskonstante  $k_i$  für den Durchtritt der Ionen durch die Membran wird grösser (vgl. Gleichung (25)). Diese Vergrösserung könnte eine Folge eines veränderten Energieprofils in der Membran sein.

#### 9.4. Andere lipophile Anionen

Neben dem bis jetzt hauptsächlich beschriebenen Anion FCCP wurden auch andere lipophile Anionen auf ihre Wirkung auf ligandhaltige Schwarze Membranen geprüft.

Die verwendeten Substanzen wurden auf Grund experimenteller Erfahrung an dicken Membranen ausgewählt [118] (Fig. 51). Wie Fig. 52 zeigt, ist jedoch die Wirkung dieser Anionen verglichen mit derjenigen von FCCP gering, obwohl sie an dicken Membranen FCCP zum Teil in der Wirksamkeit übertrafen [118]; es ist dies eine Beobachtung, die nur schwer zu interpretieren ist.

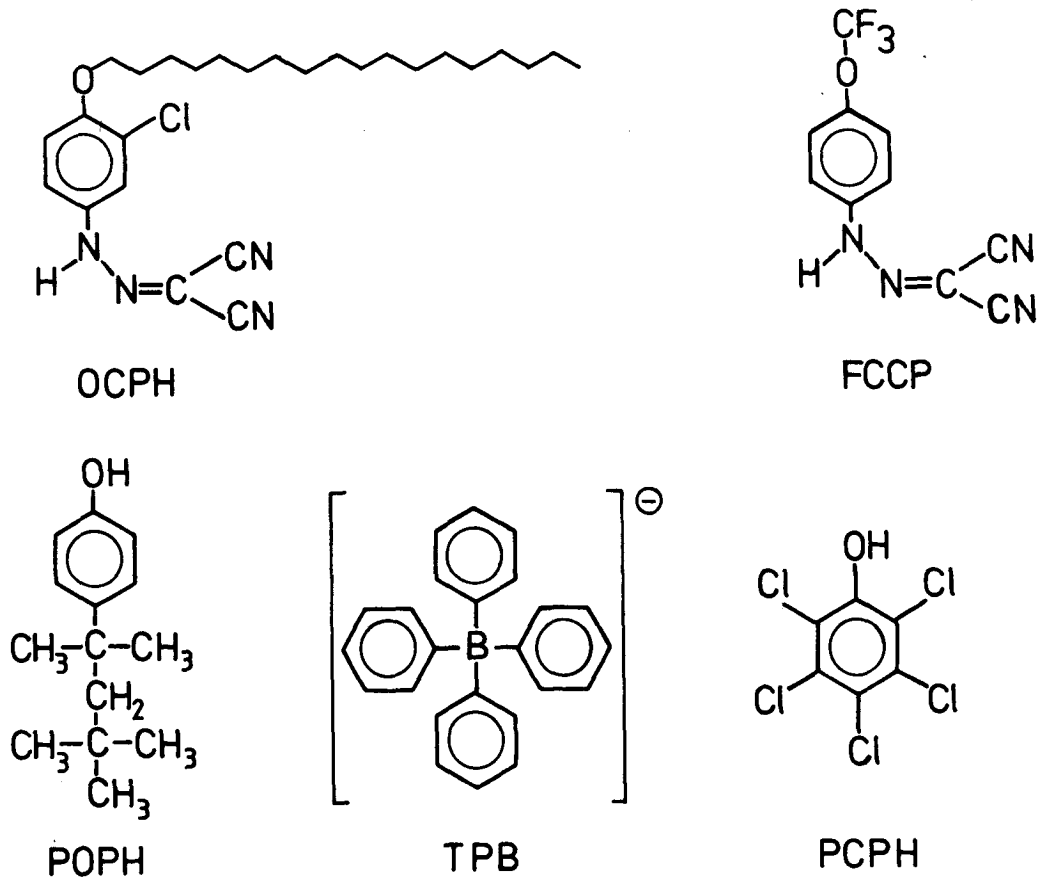


Fig. 51: Struktur der untersuchten lipophilen Anionen

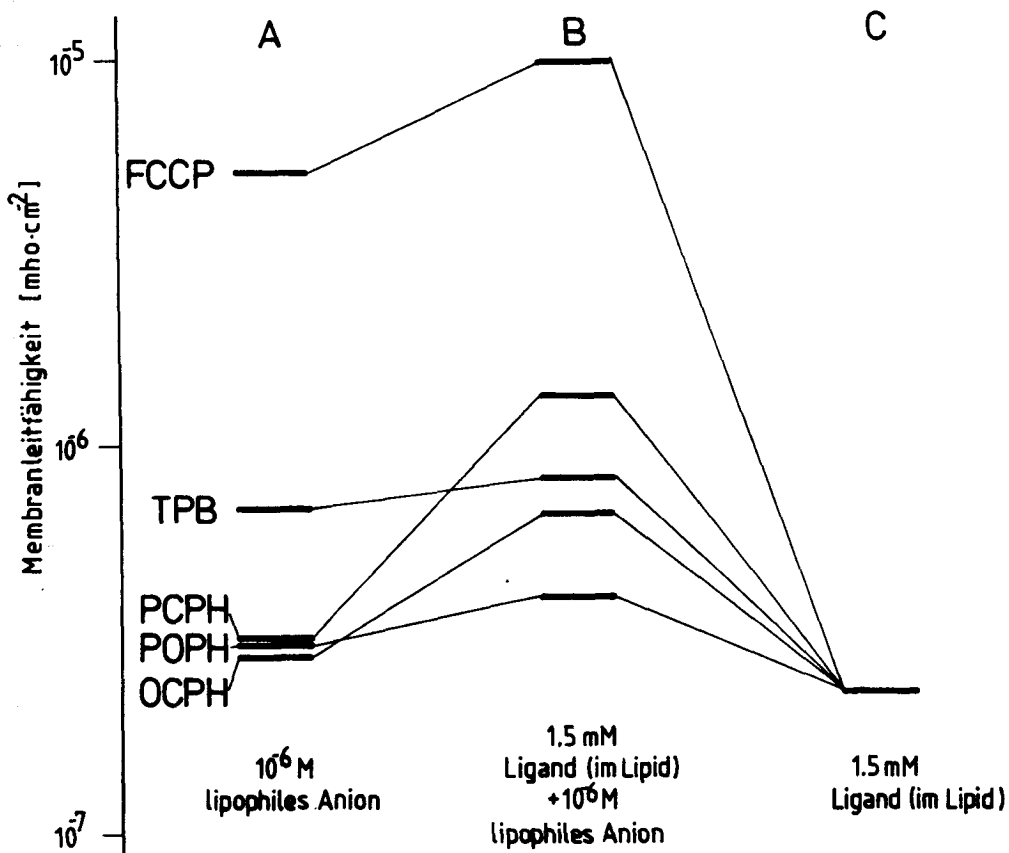


Fig. 52: Leitfähigkeit von Membranen in Anwesenheit von (A)  $10^{-6}$  M lipophilem Anion, (C) 1.5 mM Ligand (im Lipid), (B)  $10^{-6}$  M lipophilem Anion + 1.5 mM Ligand

## 9.5. Diskussion

Die hier beschriebenen Experimente zeigen deutlich, dass FCCP im Gegensatz zu andern geprüften lipophilen Anionen den Carrier-induzierten  $\text{Ca}^{++}$ -Transport in Schwarzen Membranen stark stimulieren kann.

Die experimentellen Resultate können so interpretiert werden, dass FCCP mit dem  $\text{Ca}^{++}$ -Ligand-Komplex ein Assoziat der Zusammensetzung  $\text{Ca}^{++}:\text{Ligand}:\text{FCCP}$  (1:1:1) bildet, das als solches durch die Membran wandert. Dadurch wird die für einen  $\text{Ca}^{++}$ -Transport notwendige Ligand-Konzentration kleiner als dies für eine höhere  $\text{Ca}^{++}:\text{Ligand}$ -Stöchiometrie der Fall ist.

Andere Wirkungsmechanismen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. So könnte sich FCCP auch auf der Aussenseite der Membran anlagern [155] und dadurch die Oberflächenladung der Membran verändern und möglicherweise auch das Energieprofil im Membraninneren beeinflussen. Dies könnte tiefgreifende Änderungen in der Kinetik dieses Transportes zur Folge haben.

## 10. EXPERIMENTELLER TEIL

### 10.1. Leitfähigkeitsmessungen an Schwarzen Membranen

Für die in Kapitel 5.2 beschriebenen Experimente wurden zum Teil eine Messzelle aus Plexiglas mit einem Lochdurchmesser von 2.8 mm verwendet. Für die Experimente in denen der Ligand ETH 1001 eingesetzt wurde, fand eine Messzelle mit einem Lochdurchmesser von 1.3 mm Verwendung.

Die zur Membranherstellung verwendete Lipidlösung wurde präpariert, indem von der Lecithinlösung das Lösungsmittel im Stickstoffstrom oder am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene trockene Lipid im Ultraschallbad in einer entsprechenden Menge Decan gelöst wurde. Für Experimente, in denen der Ligand ins Lipid vorgegeben wurde, ist vor dem Abdampfen des Lösungsmittel der Ligand in alkoholischer Lösung zugegeben worden.

Die Membranen wurden hergestellt, indem das Blendenloch der trockenen Zelle ein- bis zweimal mit Lipidlösung imprägniert wurde. Nach Verdunsten des Lösungsmittels wurde die wässrige Lösung in die Messzelle eingefüllt und die Membran über das Loch gezogen, indem mit einem sehr feinen Pinsel die Lipidlösung über das Blendenloch gestrichen wurde.

Als Messgeräte wurden verwendet:

- pH/mV - Ion Activity Meter, Phillips PW 9411
- Mikroampèremeter Keithley 150 B
- Schreiber: Tarkan, Kontron, Zürich

Als Ableitelektroden dienten selbst hergestellte Ag/AgCl-Elektroden in einem Glasschaft mit Glasdiaphragma.

Die Schaltung zum Abgriff verschiedener Spannungen wurde im Laboratorium von Prof. P. Läger (Universität Konstanz) hergestellt.



## 10.2. Experimente mit Liposomen und biologischen Membransystemen

Die experimentellen Details der Versuche mit monolamellaren und multilamellaren Liposomen sind andernorts [125] ausführlich beschrieben worden. Die Phosphatbestimmung erfolgte nach der Methode von Chen et al. [151].

Die Präparation der biologischen Membranen wurde in [132] ausführlich beschrieben.

Die Bestimmung des pK-Wertes von Tetraphenylborat wurde im Mikrolabor der ETH durch Titration in Methylcellosolve:H<sub>2</sub>O (80:20) vorgenommen.

## 10.3. Chemikalien

Die verwendeten synthetischen Liganden wurden durchwegs in unserem Laboratorium synthetisiert [105]. Der Ionophor A 23187 wurde von Eli Lilly, Research Lab., Indianapolis, und X-537 A von F. Hoffmann-La Roche und Co. AG, Basel als Geschenk erhalten. Die Liganden wurden in alkoholischer Lösung angesetzt.

Als Lipide wurden Ei-Lecithin und Phosphatidylserin von Lipid Products, Nutfield, Grossbritannien verwendet.

Decan wurde in der Qualität 'puriss.' von der Firma Fluka AG, Buchs, erworben.

Die lipophilen Anionen wurden in Säureform (ausgenommen Tetraphenylborat) eingesetzt und in analytischer Reinheit verwendet und ebenfalls in alkoholischer Lösung angesetzt. Tetraphenylborat wurde ausgehend vom Na-Salz mit Ionentauscher in das Ca-Salz übergeführt und in wässriger Lösung verwendet.

Die Elektrolytlösungen wurden aus Chemikalien der Reinheit 'pro  
Analyse' der Firma Fluka AG, Buchs, oder Merck AG, Darm-  
stadt, BRD, hergestellt.

Es wurde für alle Experimente doppelt quarz-destilliertes Wasser  
verwendet.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Schwester L. Rohner für die  
mit unendlicher Sorgfalt ausgeführte Abschrift dieser Arbeit.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde der Einfluss verschiedener synthetischer, nichtzyklischer, neutraler Liganden vom 3,6-Dioxaoctandiamid-Typ auf die Leitfähigkeit von Schwarzen Membranen (Lecithin in Decan) in Calciumchlorid-Lösung geprüft. Einige Liganden bewirkten eine deutliche Zunahme der Leitfähigkeit dieser Membranen.
2. Das Transportverhalten der Liganden ETH 1096 (N, N, N', N'-Tetracyclohexyl-3,6-dioxaoctandiamid) und ETH 1001 ((-)-(R, R)-N, N'-Di[(11-äthoxycarbonyl)undecyl] N, N', 4, 5-tetramethyl-3,6-dioxaoctandiamid) an Schwarzen Membranen wurde genauer untersucht und es wurde gefunden, dass diese Liganden  $\text{Ca}^{++}$  als 1:2 bis 1:3 (Metall:Ligand)-Komplexe durch die Membran transportieren.
3. Es wurde gezeigt, dass der Ligand ETH 1001 in Anwesenheit von relativ hohen FCCP-Konzentrationen den Ausfluss von radioaktivem  $\text{Ca}^{++}$  aus monolamellaren Liposomen induzieren kann.
4. An Erythrocyten und an sarcoplasmatischem Reticulum wurde gezeigt, dass der Ligand ETH 1001 in Anwesenheit von lipophilen Anionen  $\text{Ca}^{++}$  durch deren Membranen transportieren kann. In Mitochondrien ist der Ligand fähig, auch ohne lipophile Anionen das natürliche  $\text{Ca}^{++}$ -Transportsystem zu substituieren.
5. Auf Grund einer von W. E. Morf entwickelten allgemeinen Theorie über den Stofftransport durch Membranen wurde gezeigt, dass im  $\text{Ca}^{++}$ -Transport mittels des Liganden ETH 1001 der Transport des Ion-Ligand-Komplexes durch das Membraninnere der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist.
6. Es wurde versucht, die Rolle der lipophilen Anionen im Transportmechanismus aufzuklären. Auf Grund experimenteller Resultate kann vermutet werden, dass sich bei Anwesenheit von FCCP

Ca : Ligand : FCCP (1:1:1)-Assoziat bilden, die als solche durch die Membran transportiert werden dürften. Andererseits könnte durch Anlagerung von lipophilen Anionen an die Membranoberfläche die Form der Aktivierungsbarriere für den Durchtritt der Ion-Ligand-Komplexe und dadurch die Transportkinetik verändert werden.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. L. Lehninger, *Biochemistry* (2nd Ed.), Worth Publisher, New York, 1975
- [2] E. Overton, *Viertelj. Naturf. Ges. Zürich*, 40, 149, 1899
- [3] J. F. Danielli, in *Cell Membranes* (G. Weissmann, R. Claiborne, Eds.), H. P. Publishing Co. Inc., New York, 1975, pp. 3 - 11
- [4] C. Moore, B. C. Pressman, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 15, 562, 1964
- [5] W. Simon, W. E. Morf, P. Ch. Meier, in *Structure and Bonding*, Vol. 16, Springer Verlag, Berlin, pp. 113 - 160
- [6] P. W. Reed, H. A. Lardy, *J. Biol. Chem.*, 247, 6970, 1972
- [7] M. R. Truter, in *The Regulation of Intracellular Calcium* (C. J. Duncan, Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 1976, pp. 19 - 40
- [8] R. C. Prince, A. R. Crofts, L. K. Steinrauf, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59, 697, 1974
- [9] E. J. Harris, J. M. Wimhurst, *Nature New Biol.*, 245, 271, 1973
- [10] Z. Stefanac, W. Simon, *Chimia*, 20, 436, 1966; *Microchem. J.*, 12, 125, 1967
- [11] H. K. Wipf, W. Simon, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 34, 707, 1969
- [12] H. K. Wipf, A. Olivier, W. Simon, *Helv.*, 53, 1605, 1970
- [13] A. P. Thoma, A. Viviani-Nauer, S. Arvanitis, W. E. Morf, W. Simon, *Anal. Chem.*, 49, 1567, 1977
- [14] H. Diebler, M. Eigen, G. Ilgenfritz, G. Maas, R. Winkler, *Pure Appl. Chem.*, 20, 93, 1969
- [15] H. K. Wipf, L. A. R. Pioda, Z. Stefanac, W. Simon, 51, 377, 1968
- [16] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, V. K. Antonov, A. M. Shkrob, I. I. Mikhaleva, V. Evstratov, G. G. Malenkov, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 29, 834, 1967
- [17] W. E. Morf, *Diss. ETH Nr. 4916*, 1972

- [18] R. Beutner, J. Am. Chem. Soc., 36, 2040, 1914
- [19] E. Baur, Z. Elektrochem., 32, 547, 1926
- [20] L. Michaelis, N. Weech, J. Gen. Physiol., 12, 55, 1928
- [21] T. Teorell, J. Gen. Physiol., 21, 107, 1937
- [22] K. Sollner, Ann. N. Y. Acad. Sci., 57, 177, 1953 und weitere Referenzen darin
- [23] J. T. Davies, E. K. Rideal, Interfacial Phenomena, Academic Press, New York, 1961
- [24] G. L. Gaines, Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, Interscience, New York, 1965
- [25] J. M. Tobias, Agin, Pawlowski, J. Gen. Physiol., 45, 989, 1962
- [26] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, Nature, 194, 979, 1962
- [27] A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, J. Mol. Biol., 13, 238, 1965
- [28] M. Montal, P. Mueller, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3561, 1972
- [29] H. T. Tien, Bilayer Lipid Membranes, Marcel Dekker Inc., New York, 1974
- [30] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, Recent Progress in Surface Science, Vol. I, Acad. Press, New York, 1964, pp. 379 - 393
- [31] T. Hanai, D. A. Haydon, J. Taylor, Proc. Roy. Soc. London, 281 A 377, 1964
- [32] P. Luger, W. Lesslauer, E. Marti, J. Richter, Biochim. Biophys. Acta, 135, 20, 1967
- [33] T. E. Thompson, C. Huang, J. Mol. Biol., 16, 576, 1966
- [34] R. J. Cherry, D. Chapman, J. Theoret. Biol., 24, 137, 1969
- [35] C. Gethsen, H. O. Kneser, H. Vogel, Physik, 12. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1974, p. 515 und p. 548
- [36] H. T. Tien, J. Mol. Biol., 16, 577, 1966
- [37] F. A. Henn, T. E. Thompson, J. Mol. Biol., 31, 227, 1968
- [38] G. Adam, P. Luger, G. Stark, Physikalische Chemie und Biophysik, Springer Verlag, Berlin, 1977, p. 279

- [39] A. Finkelstein, *J. Gen. Physiol.*, 68, 127, 1976
- [40] C. Huang, T.E. Thompson, *J. Mol. Biol.*, 15, 539, 1966
- [41] A. Cass, A. Finkelstein, *J. Gen. Physiol.*, 50, 1765, 1967
- [42] R.J. Levin, *The Living Barrier*, W. Heinemann Medical Books, Ltd., London, 1969, p. 62
- [43] T.E. Andreoli, V.W. Dennis, A.M. Weigl, *J. Gen. Physiol.*, 53, 133, 1969
- [44] A.D. Bangham, *Adv. Lipid Res.*, 1, 65, 1963
- [45] J.Y. Johnson, British Patent No. 417715. Accepted Oct. 1, 1934. Patent on behalf of I. G. Farbenindustrie AG, 1932
- [46] R. Rendi, *J. Cell Biol.*, 27, 83 A, 1965
- [47] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 13, 238, 1965
- [48] A.D. Bangham, J. de Gier, G.D. Greville, *Chem. Phys. Lipids*, 1, 225, 1967
- [49] A.D. Bangham, in *Methods in Membrane Biology*, Vol. 1 (E. D. Korn, Ed.), Plenum Press, New York-London, 1972, p. 1 - 68
- [50] H. Hauser, persönliche Mitteilung
- [51] H. Hauser, M.C. Phillips, M. Stubbs, *Nature*, 239, 342, 1972
- [52] C. Huang, T.E. Thompson, in *Methods in Enzymology*, Vol. 32, (S. Fleischer, L. Packer, Eds.), Academic Press, 1974, p. 485 - 489
- [53] H. Hauser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, 1049, 1971
- [54] H. Hauser, L. Irons, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353, 1579, 1972
- [55] H. Hauser, D. Oldani, M.C. Phillips, *Biochemistry*, 12, 4507, 1973
- [56] M. Montal, P. Mueller, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 3561, 1972
- [57] M. Takagi, K. Azuma, U. Koshimoto, *Ann. Report Biol*, 13, 107, 1965
- [58] H. J. van den Berg, *J. Mol. Biol.*, 12, 290, 1965
- [59] M. Montal, in Ref. [52], pp. 545 - 554
- [60] R. Benz, O. Fröhlich, P. Läger, M. Montal, *Biochim. Biophys. Acta*, 394, 323, 1975

- [61] T. E. Andreoli, in Ref. [52], pp. 513 - 539
- [62] A. Finkelstein, in Ref. [52], pp. 489 - 501
- [63] A. E. Shamoo, D. A. Goldstein, *Biochim. Biophys. Acta*, 472, 13, 1977
- [64] S. B. Hwang, J. I. Korenbrot, W. Stoeckenius, *J. Membr. Biol.*, 36, 115, 1977
- [65] M. Montal, in *Perspectives in Membrane Biology* (S. Estrada, C. Gitler, Eds.), Academic Press, New York, 1974, pp. 591 - 622
- [66] M. C. Phillips et al., *Chem. Phys. Lipids*, 3, 234, 1969
- [67] E. Gorter, R. Grendel, *J. Exp. Med.*, 41, 439, 1925
- [68] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.*, 39, 1848, 1917
- [69] J. F. Danielli, H. Davson, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 5, 495, 1935
- [70] R. Harrison, G. G. Lunt, *Biological Membranes*, Blackie & Son Ltd., London, 1975
- [71] J. D. Robertson, *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, 3, 1043, 1957
- [72] S. J. Singer, in *Structure and Function of Biological Membranes* (L. I. Rothfield, Ed.), Academic Press New York, 1971, p. 145
- [73] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science*, 175, 720, 1972
- [74] S. K. Malhotra, in *Membranes and Ion Transport* (E. E. Bittar, Ed.) Wiley Interscience, London, 1970, pp. 1 - 22
- [75] G. B. Robinson, in *Biological Membranes* (D. S. Parson, Ed.), Clarendon Press, Oxford, 1975, pp. 8 - 54
- [76] H. J. Schatzmann, in *Current Topics in Membranes and Transport*, Vol. 6, Academic Press, 1975, pp. 125 - 168
- [77] W. Hasselbach, in *Enzymes X*, Academic Press, New York, 1974 pp. 431 - 467
- [78] E. Carafoli, *Chem. Rundschau*, 28 (48), 1, 1975
- [79] P. Mitchell, *Nature*, 191, 144, 1961
- [80] P. Mitchell, in *Chemiosmotic Coupling and Oxidativ and Phospho-synthetic Phosphorylation*, Glynn Research Ltd., Bodmin, 1966
- [81] P. Mitchell, *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*, Glynn Research Ltd., Bodmin, 1968
- [82] G. D. Greville, in *Current Topics of Bioenergetics*, Vol. 3,



- Academic Press, New York, 1969, pp. 1 - 77
- [83] H. A. Lardy, N. S. Graven, S. Estrada, *Fed. Proc.*, 26, 1355, 1967
- [84] P. Läuger, *Science*, 178, 24, 1972
- [85] H. K. Wipf, W. Simon, *Helv.*, 53, 1732, 1970
- [86] H. Brockmann, *Chem. Ber.*, 88, 57, 1955
- [87] R. L. Hamill, C. E. Higgens, H. E. Boaz, M. Gorman, *Tetrahedron Letters*, 1969, 4255
- [88] W. Keller - Schierlein, H. Gerlach, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe*, 26, 161, 1968
- [89] M. E. Haney, M. M. Hoehn, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1967, 349
- [90] R. L. Harned, P. H. Hidy, C. J. Corum, K. L. Jones, *Proc. Indiana Acad. Sci.*, 59, 38, 1950
- [91] J. Berger, A. I. Rachlin, W. E. Scott, L. H. Sternbach, M. W. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 5295, 1951
- [92] A. Scarpa, G. Inesi, *FEBS-Letters*, 22, 273, 1972
- [93] B. C. Pressman, *Fed. Proc.*, 32, 1968, 1973
- [94] S. M. Johnson, J. Herrin, S. J. Lin, I. C. Paul, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 4428, 1970
- [95] M. O. Chaney, P. V. Demarco, N. D. Jones, J. L. Occolowitz, *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 1932, 1974
- M. O. Chaney, N. D. Jones, M. Debono, *J. of Antibiotics*, 29, 424, 1976
- [96] E. J. Harris, J. M. Wimhurst, *Arch. Biochem. Biophys.*, 162, 426, 1974
- [97] D. Brookes, B. K. Tidd, W. B. Turner, *J. Chem. Soc.*, 1963, 5385
- [98] A. Hyono, Th. Hendriks, F. J. M. Daemen, S. L. Bonting, *Biochim. Biophys. Acta*, 389, 34, 1975
- [99] H. Celis, S. Estrada-O., M. Montal, *J. Membr. Biol.* 18, 187, 1974
- [100] D. R. Pfeiffer, P. W. Reed, H. A. Lardy, *Biochem.*, 13, 4007, 1974
- [101] R. W. Roeske, S. Isaac, T. E. Küng, L. K. Steinrauf, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57, 554, 1974

- [102] W. E. Morf, D. Ammann, R. Bissig, W. Simon, in *Multidentate Macrocyclic Molecules* (J.J. Christensen, R. M. Izatt, Eds.), Wiley Interscience, New York, im Druck
- [103] W. Simon, W. E. Morf, D. Ammann, in *Calcium Binding Proteins and Calcium Function* (R. H. Wassermann et al., Eds.), North Holland, New York, 1977, pp. 50 - 62
- [104] E. Carafoli, M. Crompton, in *Calcium in Biological Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 1976, pp. 89 - 115
- [105] D. Ammann, R. Bissig, M. Guggi, E. Pretsch, W. Simon, I. J. Borowitz, L. Weiss, *Helv.*, 58, 1535, 1975
- [106] E. Carafoli, K. Malmstöm, E. Sigel, M. Crompton, *Clinical Endocrinology*, 5, 49s, 1976
- [107] E. Carafoli, in *Mitochondria*, Academic Press, New York, 1976, pp. 47 - 60
- [108] P. Gazzotti, in *Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, J. Wiley Interscience, London, im Druck
- [109] G. Boheim, *J. Membr. Biol.*, 19, 277, 1974
- [110] S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta*, 274, 294, 1972
- [111] D. W. Urry, *Biochim. Biophys. Acta*, 265, 115, 1972
- [112] D. A. Haydon, S. B. Hladky, *Quart. Rev. Biophys.*, 5, 187, 1972
- [113] D. Ammann, R. Bissig, Z. Cimmerman, U. Fiedler, M. Guggi, W. E. Morf, M. Oehme, H. Osswald, E. Pretsch, W. Simon, in *Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine* (M. Kessler et al., Eds.), Urban und Schwarzberg, München, 1976, pp. 22 - 37
- [114] D. Ammann, M. Guggi, E. Pretsch, W. Simon, *Anal. Letters*, 8, 709, 1975
- [115] N. N. L. Kirsch, W. Simon, *Helv.*, 59, 357, 1976
- [116] N. N. L. Kirsch, *Diss. ETH Nr. 5842*, 1976
- [117] W. E. Morf, P. Wuhrmann, W. Simon, *Anal. Chem.*, 48, 1031, 1976
- [118] S. Arvanitis, *Diss. ETH Nr. 6261*, 1978
- [119] R. Büchi, E. Pretsch, *Helv.*, 58, 1573, 1975

- [120] W. Simon, W. E. Morf, E. Pretsch, P. Wuhrmann, in *Calcium Transport in Contraction and Secretion* (E. Carafoli et al., Eds.), North Holland Publ. Comp., Oxford, 1975, pp. 15 - 23
- [121] G. Amblard, C. Gavach, *Biochim. Biophys. Acta*, 448, 284, 1976
- [122] S. M. Ciani, G. Eisenman, R. Laprade, G. Szabo, in *Membranes, A Series of Advances* (G. Eisenman, Ed.), Vol. 2, Marcel Dekker, Inc., New York, 1973, pp. 61 - 177
- [123] K. Diem, C. Lentner, *Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen*, 7. Aufl., J. R. Geigy, Basel, 1968
- [124] J. A. Berden, R. W. Barker, G. K. Radda, *Biochim. Biophys. Acta* 375, 186, 1975
- [125] P. Vuilleumier, P. Gazzotti, E. Carafoli, W. Simon, *Biochim. Biophys. Acta*, 467, 12, 1977
- [126] J. B. Chappell, K. N. Haarhoff, in *Biochemistra of Mitochondria* (E. Slater et al., Eds.), Academic Press, New York, 1967, pp. 75 - 91
- [127] *Handbook of Chemistry and Physics*, 52nd ed., The Chemical Rubber Comp., 1971 - 1972
- [128] R. Tykva, in *Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen* (H. Simon, Ed.), Springer Verlag, Berlin, 1974, pp. 199 - 224
- [129] J. Brunner, Diss. ETH Nr. 5987, 1978
- [130] D. Ammann, E. Pretsch, W. Simon, *Tetrahedron Letters*, 24, 2473, 1972
- [131] P. Caroni, Diplomarbeit ETH Zürich, 1977
- [132] P. Caroni, P. Gazzotti, P. Vuilleumier, W. Simon, E. Carafoli, *Biochim. Biophys. Acta*, 470, 437, 1977
- [133] R. Büchi, E. Pretsch, W. Simon, *Helv.*, 59, 2327, 1976
- [134] P. Läger, F. Conti, persönliche Mitteilung
- [135] P. Läger, B. Neumcke, in Ref. [122], pp. 1 - 60
- [136] G. Szabo, G. Eisenmann, R. Laprade, S. M. Ciani, S. Krasne, in Ref. [122], pp. 179 - 328
- [137] P. Läger, G. Stark, *Biochim. Biophys. Acta*, 211, 458, 1970

- [138] G. Eisenman, S. M. Ciani, G. Szabo, *Fed. Proc.*, 27 (6), 1289, 1968
- [139] S. M. Ciani, G. Eisenman, G. Szabo, *J. Membr. Biol.*, 1, 1, 1969
- [140] S. B. Hladky, *Biochim. Biophys. Acta*, 352, 71, 1974
- [141] S. Ciani, *J. Membr. Biol.*, 30, 45, 1976
- [142] G. Eisenman, S. Krasne, S. Ciani, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 264, 34, 1975
- [143] S. Krasne, G. Eisenman, *J. Membr. Biol.*, 30, 1, 1976
- [144] W. E. Morf, in Vorbereitung
- [145] B. Parlin, H. Eyring, *Ion Transport across Membranes* (H. T. Clarke, Ed.), Academic Press, New York, 1954
- [146] D. E. Goldman, *J. Gen. Physiol.*, 27, 37, 1943
- [147] E. L. Cussler, D. F. Evans, M. A. Matesich, *Science*, 172, 377, 1971
- [148] P. Läuger, *Science*, 178, 24, 1972
- [149] D. A. Haydon, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 264, 2, 1975
- [150] K. Neupert-Laves, M. Dobler, *Helv.*, in Vorbereitung
- [151] P. S. Chen, T. Toriba, H. Warner, *Anal. Chem.*, 28, 1756, 1956
- [152] M. J. Umen, A. Scarpa, *J. Med. Chem.*, 21, 505, 1978

## LEBENS LAUF

Am 25. August 1947 wurde ich in Sevelen (SG) geboren. Die Volksschule besuchte ich in Herisau. Nach 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Jahren Berufslehre als Uhrmacher trat ich in das Gymnasium ein. Im Sommer 1970 bestand ich am Gymnasium Friedberg, Gossau, die Maturaprüfung Typus A. Im Herbst desselben Jahres immatrikulierte ich mich an der Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Im Frühjahr 1975 erwarb ich das Diplom als Naturwissenschaftler. Im Sommer desselben Jahres begann ich die vorliegende Promotionsarbeit am Laboratorium für Organische Chemie an der ETH unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Simon. Seit 1972 bin ich mit Brigitte, geb. Ehrbar, verheiratet. Wir sind glückliche Eltern eines Kindes.

Zürich, im August 1978

Paul Vuilleumier

## LEBENS LAUF

Am 25. August 1947 wurde ich in Sevelen (SG) geboren. Die Volksschule besuchte ich in Herisau. Nach 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Jahren Berufslehre als Uhrmacher trat ich in das Gymnasium ein. Im Sommer 1970 bestand ich am Gymnasium Friedberg, Gossau, die Maturaprüfung Typus A. Im Herbst desselben Jahres immatrikulierte ich mich an der Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Im Frühjahr 1975 erwarb ich das Diplom als Naturwissenschaftler. Im Sommer desselben Jahres begann ich die vorliegende Promotionsarbeit am Laboratorium für Organische Chemie an der ETH unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Simon. Seit 1972 bin ich mit Brigitte, geb. Ehrbar, verheiratet. Wir sind glückliche Eltern eines Kindes.

Zürich, im August 1978

Paul Vuilleumier