

Konrad Kaufmann

Proton Transport



Caruaru 1989

**Manfred Eigen
gewidmet**

PROTONENKONTROLLE
DES IONENTRANSPORTS DURCH
BIOLOGISCHE MEMBRANEN

von Konrad Kaufmann

copyright Konrad Kaufmann
Erste Auflage 1982
Zweite Auflage 1989

Dem Fachbereich Physik der Universität Göttingen vorgelegte
Habilitationsschrift

Göttingen, Juli 1982

Vorwort

Alle biologischen Membranen zeigen bei näherer Analyse eine einheitliche Grundstruktur: die Lipid-Doppelschicht-Membran. Im Vergleich zu den komplex anmutenden Membranproteinen erscheint das Lipid-Molekül die einfachst denkbare membranbildende Struktur: hydrophobe Kohlenwasserstoffketten und hydrophile, protonierbare Kopfgruppen stellen Prinzipien dar, welche der Bildung der Membranbarriere und, wie wir im folgenden begründen wollen, auch der Kontrolle des Transports durch Membranen zugrundeliegen.

Die von Danielli und Davson¹ sowie Robertson² vorgeschlagene Einheitsmembran (Abb. 1) leitete viele Untersuchungen früherer Jahre in diesem Sinne. Aus verschiedenen Gründen wird aber seit geraumer Zeit der membranbildenden Lipiddoppelschicht keine direkte Rolle bei den Transportprozessen durch diese Membran mehr zugesprochen. Unter dem Eindruck der Induktion solcher Vorgänge durch Proteine wurden statt dessen Transportproteine in einer fluiden Mosaikmembran entworfen.^{3,4}

Da Proteine alleine aber keine Membranen bilden, enthalten die Systeme sämtlicher Untersuchungen von Membrantransporten notwendig auch Lipide. Schon deshalb kann gar nicht entschieden werden, ob der Transport tatsächlich durch die Proteine hindurch beziehungsweise mit diesen gemeinsam durch die Membran, oder aber unmittelbar durch die Lipid-Komponente der Membranen hindurch geschieht. In diesem Sinne ist also das Modell des Transportproteins nicht falsifizierbar.

Anders ist die Situation bei Untersuchungen an reinen Lipidmembranen, da diese alleine bereits Doppelschichtmembranen bilden.⁵ Zeigten diese nämlich keinerlei Transporteigenschaften, so könnte streng geschlossen werden, daß die reine Lipidkomponente keine direkte Rolle beim Transport durch biologische Membranen spielen kann. Diese Falsifizierbarkeit impliziert natürlich, daß im gegenteiligen Falle gesicherte Erkenntnisse über den Transport durch reine Lipidmembranen möglich sind.

Vorsorglich erwähnen wir den dann immer noch möglichen Einwand, unmeßbare Verunreinigungen mit Protein könnten auch Transporterscheinungen durch synthetische Lipidmembranen erklären. Sollten sich diese "Verunreinigungen" aber nicht von Lipiden unterscheiden lassen, können sie im Rahmen beobachtbarer Aussagen ausgeschlossen werden; denn behielte man das Bild des "Transportproteins" auch in diesem Falle bei, begäbe man sich in den Bereich nicht falsifizierbarer und damit inhaltsleerer Aussagen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Evidenz des Ionen-transportes durch Lipidmembranen (Petrov⁶, 1978; Boheim et al.⁷ 1980; Kaufmann und Silman⁸, in Vorbereitung). Insbesondere betonen wir die Bedingungen, unter denen Proteine Ionen-transport durch Lipidmembranen auslösen können. Als Beispiel erklären wir die Induktion von Ionenkanälen durch Acetylcholin wie folgt:⁹

die Erregersubstanz Acetylcholin wird bei Applikation an cholinerge Membranen von dem Protein Acetylcholinesterase zunächst hydrolysiert; die dabei produzierten Protonen stören die Ordnung der Lipide und lösen auf diese Weise Ionenkanäle durch die Lipiddoppelschicht der Membran aus (Abb. 2).

Insbesondere zeigen wir in Kapitel

1. daß synthetische Lipidmembranen Ionenkanäle bilden können;
2. daß diese Eigenschaft auf den engen Bereich einer Ordnungsumwandlung beschränkt ist; und schließlich
3. daß unter anderem enzymatische Hydrolyse geeignet ist, eine solche Membranerregung auszulösen.

Im Versuch einer theoretischen Deutung dieser Befunde beschreiben wir

- die durch Protonierung in Lipidmembranen auslösbaren makroskopischen Ordnungsfluktuationen (2.2);
- diejenigen mikroskopischen Defekte der Membran, welche zu den beobachteten Leitfähigkeitssprüngen ("Ionenkanäle") führen können (2.2);
- eine mikroskopische Grundlage elektrochemischer Diffusion durch solche Defekte (3.3).

Zum Schluß kommen wir auf die wesentliche Rolle der Proteine bei diesen Vorgängen zurück. Es wird gezeigt daß, abgesehen von der enzymatischen Kontrolle der Protonierung der Lipide, im Falle solch einfacher Diffusion durch Lipiddefekte die Proteine aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften

- Spezifität bezüglich transportierter Ionen, auslösender Erregersubstanz, sowie gegebenenfalls "aktiver" Richtung des Transports aufprägen (Abb. 3).

Auf diese prinzipiell einfache Weise kann die als Beispiel diskutierte Na^+ - K^+ -ATPase zum Aufbau eines spezifischen Na^+ - K^+ -Gradienten über der Membran führen, welcher sodann durch die Aktivität der Acetylcholinesterase abgebaut wird.

1. Ionentransport durch Lipidmembranen

Um die Bedeutung der Untersuchung von Transporteigenschaften durch reine Lipidmembranen zu unterstreichen, fassen wir in Kapitel 1.1. die umfangreichen Belege zusammen, welche für die Lipiddoppelschicht als einheitliche Struktur aller biologischen Membranen sprechen. In Kapitel 1.2. werden die jüngsten Berichte wohldefinierter Ionenkanäle durch synthetische Lipidmembranen dargestellt; besonders betonen wir die quantitative Ähnlichkeit dieser Leitfähigkeitssprünge mit denjenigen biologischer Membranen. Die Argumente, welche bisher gegen eine Rolle der Lipide beim Membrantransport hervorgehoben wurden, werden in Kapitel 1.3. diskutiert. Wir kommen dabei zu dem Ergebnis, daß diese Gegenargumente nicht schlüssig sind; lediglich die Induktion von Membrantransport durch Proteine ist gesichert, dagegen gibt es für einen Transport durch Proteine hindurch keinerlei Beweise.

1.1. Untrennbarkeit von Lipiddoppelschicht und biologischer Membran

Lipide sind ein untrennbarer Bestandteil aller biologischen Gewebe. Der chemische Nachweis, die Analyse des molekularen Aufbaus, die künstliche Synthese fast aller bekannten natürlichen Lipide sind gesicherte Tatsachen. Dies stellt einen außerordentlich günstigen Ausgangspunkt der Untersuchung ihrer Funktion dar.

Lipide bilden auf wäßrigen Oberflächen spontan eine monomolekulare Schicht aus. Daraus folgt, daß jedes Molekül aus zumindest einer hydrophilen "Kopf"-Gruppe, welche also elektrostatisch mit H_2O wechselwirkt, sowie einer hydrophoben "Schwanz"-Gruppe besteht, welcher eine solche Wechselwirkung fehlt. Weiterhin folgt daraus, daß inmitten einer wäßrigen Umgebung, etwa in biologischen Geweben, Lipide Strukturen bilden, charakterisiert durch hydrophile Oberflächen, welche die hydrophoben Bereiche umschließen.

Eine dieser Strukturen ist die Doppelschichtmembran, und zwar die einzige, welche in der Lage ist, einen Raum in ein "Äußeres" und ein "Inneres" zu trennen. Umgekehrt ist diese Trennung wiederum Voraussetzung, um in einer "unendlich" großen wässrigen Umgebung kontrollierte chemische Reaktionen bei endlichen Konzentrationen zu realisieren. Genau dies geschieht aber in den biologischen Zellen und Organellen.

Die Einheitsmembran von Danielli und Davson trug dieser Erkenntnis Rechnung. Die Lipide, die einzigen, in Geweben nachgewiesenen membranbildenden Moleküle, übernehmen die Rolle der Trennung des Raumes in Zellen.

Die Mikroskopie hat diesen einleuchtenden Gesichtspunkt vorzüglich bestätigt. Es ist kein Gewebe bekannt, dem nach entsprechender Anfärbung die Charakteristika der Doppelschichtmembran fehlten.

Bemerkenswert ist die quantitative Übereinstimmung der Ausmaße mit denen synthetischer Lipiddoppelschichten; die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie sind dabei durch die Lage der Röntgenreflexe sowie durch die molekularen Modelle synthetischer Lipide hervorragend bestätigt. Darüberhinaus ergab die Methode des Gefrierbruchs biologischer Gewebe außerordentlich einheitliche und ästhetische Einblicke in die Einzelheiten der Doppelschicht, welche das Modell von Danielli und Davson bezüglich der Lipidkomponente der Membranen klar bestätigen.

Besonders reizvoll ist die Tatsache, daß synthetische wie natürliche Lipide determiniert an hydrophob-hydrophilen Grenzschichten manipuliert werden können. Wir erwähnen als Beispiel den Aufbau einer solchen molekularen Doppelschichtmembran aus zwei der erwähnten Monoschichten:

in die wässrige Phase ist lediglich ein dünner (z.B. 20 μ m) hydrophober Träger einzuführen (etwa Teflon; das Einführen geschieht durch Anheben der wässrigen Oberfläche, Abb. 4); die beiden Monoschichten, welche sich konsequent an den beiden eingeführten Grenzflächen bilden, haben bis auf den Träger in ihrer Mitte bereits die Struktur einer Doppelschicht. Eine kleine Bohrung in dem Träger (z.B. 100 μ m Durchmesser) stört diese Vorgänge nicht, und so gelingt es unmittelbar, eine reine Lipiddoppelschichtmembran

inmitten einer wässrigen Lösung zu rekonstituieren.

Diese von Müller, Rudin und Montal entwickelte Technik hat die Konzeption von Danielli und Davson nochmals direkt bestätigt.⁵ Dennoch ist die Folgerung, daß der Transport auch durch diese Einheitsmembran hindurch zu geschehen hat, natürlich nicht zwingend:

Warum sollte für die Transportprozesse nicht ein zweites Prinzip gelten, welches keinen Gebrauch von den membranbildenden Fähigkeiten der Lipide macht?

In Kapitel 1.3. werden wir auf die Argumente eingehen, welche zu dem letzteren Standpunkt geführt haben. Zunächst wollen wir aber experimentell direkt beweisen, daß Lipid-Doppelschichtmembranen in der Tat Ionenkanäle bilden können, welche sich von Ionenkanälen einer Reihe biologischer Membranen kaum unterscheiden lassen. Unterschiede, etwa in der Ionenspezifität, werden in Kapitel 3 behandelt. Es wird sich dort zeigen, daß hierzu in der Tat Proteine notwendig sind, allerdings nicht für den Transport selbst, sondern nur, um die Bedingungen des Transports durch die Lipid-Doppelschicht zu gewährleisten; dabei werden die spezifischen Proteineigenschaften de facto dem Lipid-Ionenkanal aufgeprägt. Bezüglich der Rolle der Proteine kommen wir also ebenfalls auf das grundlegende Konzept einer Einheitsmembran zurück.

1.2. Direkte Evidenz für Ionen-transport durch Lipidmembranen

Zu den bestuntersuchten Transportprozessen durch Membranen gehört der passive Ionen-transport im Verlauf der Nervenerregung.¹⁰ Aktionspotential, Miniaturpotential, und insbesondere die in jüngster Zeit aufgelösten einzelnen Leitfähigkeitssprünge stellen quantitativ etablierte Funktionen der Nervenmembran dar. Besondere Beachtung verdient die diskrete Natur dieser Leitfähigkeitssprünge.

Dieser sogenannte "Ionenkanal" von der Dimension A/V ist charakteristisch für einzelne Transportfunktionen biologischer Membranen. Er eignet sich daher vorzüglich als Vergleichsmaßstab bei der künstlichen Rekonstitution von Transportfunktionen aus molekular definierten Bestandteilen biologischer Membranen. In der Tat wurde dieser Ionenkanal zuerst an künstlichen Lipidmembranen in Gegenwart von Proteinen bzw. kleineren Polypeptiden entdeckt (Haydon und Hladky)¹¹, für die Nervenmembran vorgeschlagen (Katz und Miledi)¹² und einige Jahre später auch hier nachgewiesen¹³ (Neher et al). Inzwischen ist bekannt, daß die Gegenwart derselben Proteine in vivo und nach Rekonstitution in vitro quantitativ vergleichbare Ionenkanäle auslöst (Sakmann und Boheim)¹⁴. Es kann somit keine Frage bestehen:

die Rekonstitution dieser Ionenkanäle an definierten Untersystemen der Nervenmembran sollte die Klärung der molekularen Grundlagen der Erregung heute erlauben.

Beginnen wir dazu mit der membranbildenden Lipid-Doppelschicht. Kürzlich sind Ionenkanäle an folgenden synthetischen Lipidmembranen von unabhängigen Arbeitsgruppen eindeutig nachgewiesen worden:

1. an Distearoyllecithin;⁶
2. an Myristoyl-stearoyllecithin;⁷
3. an Diphytanoyllecithin^{8, 4, 5}.

Die definierten Bedingungen der Induktion dieser Ionenkanäle (vgl. Abb. 10) werden in Kapitel 2 besprochen. Im folgenden kommt es uns darauf an, die phänomenologische Übereinstimmung der Leitfähigkeiten der Ionenkanäle der Lipide mit denjenigen biologischer Membranen herauszustellen.

Es kann kein Zweifel darüber bestehen, daß die Erscheinungen an synthetischen Lipidmembranen der Definition eines "Ionenkanals" vollständig entsprechen:

wohl-aufgelöste, diskrete Stufen in der Membranleitfähigkeit. Die Vielfalt der möglichen Stufen, d. h. diskrete Stromsprünge im gesamten Meßbereich von 0.1 pA bis 10^3 pA (bei z.B. 200 mV elektrostatischer Potentialdifferenz zwischen den beiden Lösungsvolumen), erlaubt es, innerhalb der Fehlergrenzen jedem der bisher berichteten Ionenkanäle in vivo einen Lipid-Ionenkanal in vitro zuzuordnen. Diese Aussagen haben wir auch für Lipidmischungen bestätigt (Kapitel 2.2.).

Ein-eindeutige Zuordnung ist natürlich mit dem Kriterium der Vielfalt nicht möglich; doch können wir aus unseren Befunden schließen, daß synthetische und natürliche Lipidmembranen zur Ausbildung von Ionenkanälen aller bisher beobachteten Leitfähigkeitsstufen grundsätzlich in der Lage sind.

1.3. Indirekte Argumente gegen den Ionen-transport durch Lipidmembranen

Fünf besonders eindrucksvolle Argumente gegen eine unmittelbare Rolle der Lipide beim Ionen-transport sollen nun diskutiert werden, und zwar in Form eines Dialogs der Argumente A zugunsten des Transportproteins mit B zugunsten der Einheitsmembran.

Vorweg soll aber klargestellt werden, daß sich A und B darin einig sind,

- daß es ohne Lipiddoppelschicht keine biologischen Membranen gibt;
- daß die Induktion der wichtigsten Transportprozesse durch Proteine erwiesen ist.

Es geht also nur noch um die Art und Weise der Induktion, sowie um die molekulare und physikalische Natur des Transportprozesses selbst:

A betrachtet die Lipide als inerte Matrix; der Transport geschieht durch die darin eingebetteten Proteine, und zwar entweder gemeinsam mit diesen ("carrier") oder direkt durch die Proteine hindurch ("Pore"). B betrachtet dagegen die Proteine nicht als Pore oder Überträger; der Transport geschehe durch die Lipid-Doppelschicht hindurch; die Rolle der Proteine bestehe dabei darin, die impermeable Ordnung der Lipide zu stören.

- A.1. Die Leitfähigkeit reiner Lipidmembranen beträgt zwischen 10^{-8} und 10^{-10} A/Vcm² und ist damit viel zu klein, um die Leitfähigkeit biologischer Membranen (bis zu 10^{-2} A/Vcm²)¹⁵ zu erklären.
- B.1. Die Dimension der Ionenkanäle beträgt A/V, enthält also nicht die Fläche. Die einzelnen Ionenkanäle durch Lipidmembranen ähneln denjenigen biologischer Membranen quantitativ. Offenbar werden in letzteren vergleichsweise mehr Ionenkanäle pro Fläche ausgelöst.
- A.2. Biologische Membranen enthalten einen hohen Anteil an Proteinen (bis zu 1:1 Protein:Lipid)³. Es ist erwiesen, daß Proteine die niedrige Leitfähigkeit der Lipidmembranen wesentlich erhöhen können.
- B.2. Der Beweis der Induktion der Leitfähigkeit durch Proteine unterscheidet nicht, ob der Ionen-transport dabei durch die Proteine oder durch die Lipidkomponente der Membran hindurch führt

- A.3. Die Spezifität biologischer Membranen, welche nur auf gewisse Substanzen mit Leitfähigkeitserhöhung reagieren, kann in keiner Weise durch das einfach Lipidmolekül, sondern nur durch spezifische "Rezeptor"-Proteine realisiert werden.¹⁷
- B.3. Induziert ein spezifisches Protein die Bedingungen des Transports durch Lipidmembranen hindurch, dann zeigt der Membrantransport die Spezifität des Proteins. Dabei ist unerheblich, ob der Transport durch die eine oder die andere Komponente führt.
- A.4. Der Transport spezifischer Ionen durch biologische Membranen, also die Unterscheidung ähnlicher Ionenradien (z.B. Na⁺ 0,95 Å; K⁺ 1,33 Å nach Pauling)¹⁸, erfordert präzise Erkennungsstellen wie sie nur die Proteine besitzen können.
- B.4. Die Ionenspezifität ist nicht notwendig eine Eigenschaft des Ionenkanals; es reicht aus, wenn über der Membran anliegende Gradienten ionenspezifisch sind. In der Tat werden solche Gradienten beim aktiven Transport aufgebaut.
- A.5. Der aktive Transport entgegen der Richtung elektrochemischer Diffusion setzt eine thermodynamische Kopplung an den Stoffwechsel voraus; dieser wird nicht von Lipiden, sondern von Proteinen katalysiert.¹⁹
- B.5. Aktiven Transport (von Na⁺ und K⁺) entgegen dem Konzentrationsgradienten zwischen den Lösungsmittelvolumen führen wir in Kapitel 3 auf passiven Transport mit dem lokalen Gradienten zurück. Er erfordert allerdings ein Protein, welches nur bei (ionenspezifischen) Gradienten über der Membran die Bedingungen des Transports durch Lipide erfüllt. Ein solches Protein ist die Na⁺-K⁺-ATPase.

2. Notwendigkeit einer Ordnungsumwandlung der Lipidmembran

Die Notwendigkeit einer Ordnungsumwandlung der Lipidmembran (vgl. 1.3.), also eines begrenzten Bereiches der thermodynamischen Variablen, in welchem Ionenkanäle überhaupt auftreten, erklärt, daß diese in den Bereichen außerhalb "inert" erscheint. Andererseits ist auf diese Weise eine präzise Kontrolle der Membranleitfähigkeit überhaupt erst möglich. Es wird sich zeigen, daß die notwendigen "kritischen" Bedingungen insbesondere durch enzymatische Hydrolyse, also durch gewisse Proteine, erreichbar sind.

Proteine sind dann zwar nicht notwendig, aber hinreichend, um den Transport durch die Lipidkomponente dieser Membranen auszulösen. Hierauf kommen wir in Kapitel 3 zurück. Im folgenden beschreiben wir die Beobachtungen an reiner Lipidmembranen.

Zuerst wurde diese Erscheinung an der kalorischen Phasenumwandlungstemperatur homogener Lipidmembranen erkannt (2.1.); frühere Beobachtungen (Yafuso)²⁰ hatten das Phänomen nicht unter Kontrolle. Biologisch bedeutend aufgrund der Hydrolysevorgänge an Membranen in vivo ist aber besonders die Beobachtung, daß Protonen in einem definierten pH-Bereich ebenfalls Ionenkanäle auslösen können (Kapitel 2.2.). Obwohl die Theorie homogener Phasenumwandlungen zunächst ungeeignet erscheint, "Protonierungsumwandlungen" molekular inhomogener Lipidmembranen zu erfassen, werden wir die Verwandtschaft beider Erscheinungen im Rahmen der Träubleschen Theorie erläutern (2.3.). Später werden wir aber lediglich die phänomenologische Tatsache benötigen, daß in einem kritischen pH-Bereich die ansonsten inerte Lipidmatrix leitfähig wird (Abb. 7). Erscheinungen im alkalischen Bereich (pH > 9) berücksichtigen wir nicht, da dort die Lipide molekular instabil werden.

2.1. Ionenkanäle an der thermischen Phasenumwandlung

Vor einigen Jahren entdeckten Petrov et al., daß synthetische Distearoyllecithin-Membranen an der Umwandlungstemperatur bei neutralem Lösungsmittel ("bulk")-pH Ionenkanäle zeigten.⁶ Dies ist inzwischen für Stearoyl-myristoyllecithin-Membranen bestätigt worden (Boheim et al. 1980).⁷ Postulierte man Protein-"Verunreinigungen" für diese Erscheinungen, so wäre man gezwungen zu folgern, daß diese "Proteine" genau an der Lipid-Umwandlungstemperatur Ionenkanäle bildeten, und zwar je nach verwendetem Lipid an einer anderen.

Gesichert ist, daß im Bereich der thermischen Ordnungsfluktuationen dieser Lipide wohl-definierte Ionenkanäle durch eine Doppelschichtmembran entstehen. Überraschenderweise verschwindet die Leitfähigkeit aber weit oberhalb und weit unterhalb der Umwandlungstemperatur. Andersscheinende Meßspuren (Petrov 1978),²⁴ in welchen die Lipide von einer nicht leitfähigen in eine leitfähige Phase überzugehen scheinen, haben sich bisher nicht systematisch bestätigen lassen. Aufgrund des thermodynamisch äquivalenten Einflusses anderer Variabler auf die den Zustand charakterisierende freie Enthalpie

$$G = \sum \mu_i$$

muß im übrigen zur Beobachtung einer Schwelle ^{krit} bezüglich einer Variable, μ_i , gesichert sein, daß bis auf diese Variable alle anderen konstant gehalten werden:

Dies ist unter kritischen Bedingungen aufgrund von Fluktuationen zweifelhaft: eine "Hysterese" erscheint naheliegend und nicht schlußkräftig für die Phase des Systems. Dagegen interpretieren wir die beobachtete, mit Hysterese unvereinbare Rückkehr des Systems zu einer nicht leitfähigen Phase als eine vollzogene Ordnungsumwandlung.^{6,7}

Die "fluidere" sowie die "kristallinere" Lipidphase sind demnach beide nicht leitfähig. Die Leitfähigkeit der Lipidmembran stellt somit keinen Ordnungsparameter dar.

Zur Leitfähigkeit korreliert allerdings der Temperaturgradient des Ordnungsparameters, da auch dieser an der Umwandlung ein scharfes Extremum besitzt. Dieser Gesichtspunkt wird sich für die pH-Abhängigkeit der Leitfähigkeit hervorragend bestätigen (Abb. 6-8).

Damit könnten wir schon jetzt Modelle der Leitfähigkeit ausschließen, welche unmittelbaren Gebrauch von Ordnungsparametern der Lipidmembran machen. Wir werden diese Modelle aber mit dem zwingenden Kriterium ausschließen, daß die Ordnung der Lipidmoleküle per se grundsätzlich nicht in der Lage ist, diskrete Leitfähigkeits-sprünge darzustellen. Die in Abb. 10 abgeleiteten "Leerstellen"-Defekte können dagegen mit Gradienten eines Ordnungsparameters der Lipide, der mittleren molekularen Fläche, ohne weiteres realisiert werden.

Zusammenfassend interpretieren wir also die an der kalorischen Umwandlung auftretenden Ionenkanäle als Konsequenzen eines hinreichenden Temperatur-Gradienten des Ordnungsparameters; die thermischen Fluktuationen reichen offenbar nur hier aus, die Ordnung der Lipidmembran so erheblich zu stören, daß leitfähige Defekte durch diese hindurch nachgewiesen werden können. In der fluideren und in der kristallineren Phase, also mit Ausnahme der Umwandlung im gesamten Zustandsbereich, kann die Ordnung der Lipide, welche also einen Isolator darstellen, durch thermische Fluktuationen aufgrund des geringen Gradienten des Ordnungsparameters nicht hinreichend gestört werden, um Ionenkanäle "aufzureißen".

Wir stimmen insofern nicht mit der Interpretation einiger Autoren dieser Untersuchungen überein:

der Vorschlag der Fettsäuren als Überträger der Ionen (Petrov et al.)²² müßte zu einer kontinuierlichen, nicht aber diskreten, Leitfähigkeitsverteilung führen; der andere Versuch aber, die Leitfähigkeit synthetischer Lipide semantisch ("current fluctuations") von Ionenkanälen zu unterscheiden,⁷ erscheint uns angesichts der experimentellen Ununterscheidbarkeit absurd.

2.2. Ionenkanäle an der Protonierungsumwandlung

Titriert man eine synthetische Diphtanoyllecithin-Membran vernachlässigbarer Leitfähigkeit (2 pAV) wie angegeben (Abb. 4) mit Salzsäure, so findet man typisch folgendes Verhalten (Abb. 5):

1. zunächst reagiert die Membranleitfähigkeit nicht;
2. wird ein gewisser pH-Bereich erreicht (ca. pH 3 unter den Bedingungen von Abb. 5), so beobachtet man eine stufenweise Erhöhung der Membranleitfähigkeit;
3. schließlich (bei ca. pH 2) erlischt die Leitfähigkeit wieder auf einen vernachlässigbar kleinen Wert (2 pAV), und die Membran reagiert auf weitere Titration der Säure nicht mehr (schematisch dargestellt in Abb. 7).

Es kann wiederum kein Zweifel bestehen, daß es sich bei diesen Erscheinungen um Ionenkanäle handelt: per definitionem sind diese durch diskrete Sprünge der Leitfähigkeit der Membran hinreichend charakterisiert. Das in Zusammenarbeit mit H.-W. Strube bestimmte Histogramm weist überdies nach, daß die gezeigte Meßspur Sprünge um 5 pS enthält. In Abschnitt 1.2. sind wir bereits auf die Vielfalt der Leitfähigkeitsstufen eingegangen, welche in 1 M KCl den gesamten Leitfähigkeitsbereich (1 bis einige 10^4 pAV) bisher berichteter Ionenkanäle in vivo und in vitro umfaßt.

Im nächsten Abschnitt 2.3. wird gezeigt, in welcher Weise die Protonierung der Lipid-Kopfgruppen unter isothermen Bedingungen den Phasenübergang homogener Lipide auslösen kann. Nun aber wollen wir noch unsere Aufmerksamkeit heterogenen Lipidmembranen zuwenden, die makroskopisch keine kalorische Phasenumwandlung zeigen. Die Abwesenheit einer solchen homogenen Phasenumwandlung in heterogenen, biologischen Membranen hat bisher nämlich zu der verbreiteten Ansicht geführt, daß die Ordnungsumwandlung der Lipide für den Membrantransport keine unmittelbare Rolle spiele.

Wie aber in Abb. 6 zu sehen, zeigt die heterogene Lipidmischung des Sojabohnen-Lecithin-Extrakts, welche keine kalorische Umwandlung erkennen läßt, dennoch einen wohldefinierten kritischen pH-Bereich, welcher dem des synthetischen Lecithins (Abb. 5) ähnelt (pH ca. 3.7 bis 1.5 unter den angegebenen Bedingungen).

Die unterschiedlichen Kohlenwasserstoffketten der untersuchten Lecithine (Phytanoyl Abb. 5, Oleoyl in nicht gezeigten Resultaten, sowie die vermutlich heterogenen Ketten des Soja-Lipids Abb. 6) scheinen den kritischen pH-Bereich also nicht zu beeinflussen. Dagegen ist insbesondere die charakteristische, protonierbare²³ Kopfgruppe ($\mu\text{K um } 2$) der Lecithine dem überwiegenden Teil der biologischen Membranen, und allen bisher auf Ionenkanäle untersuchten Lipidmembranen gemeinsam. Die Protonen-Induktion der Ionenkanäle haben wir darüberhinaus dadurch belegt, daß Essigsäure und Salzsäure gleichermaßen wirksam waren. Daraus schließen wir:

Die Protonen-Induktion von Ionenkanälen durch Lipidmembranen stellt einen Mechanismus dar, welcher die Kontrolle der Leitfähigkeit heterogener biologischer Membranen erlaubt.

In der Tat sind (vgl. Abschnitt 3.1.) ein erheblicher Anteil der Membranproteine Hydrolasen, welche also unmittelbar an den Lipiddoppelschichten unter spezifischen Bedingungen Protonen erzeugen. (Zur Spannungsinduktion dieser Vorgänge vgl. Abschnitt 3.3.).

2.3. Thermodynamische Kopplung von Protonierung und Phase

Quantitativ exakte Theorien stellen ein anerkanntes Ziel der Untersuchung physikalischer Systeme dar. Dies rührt von den Erfolgen quantitativer Formulierung einer Reihe von Grundgesetzen. Allerdings ist die gesetzmäßige Ableitung einer mit dem Experiment vergleichbaren Zahl nicht in allen Fällen eine angemessene Zielsetzung, beispielsweise dann nicht, wenn angemessene Observable noch nicht zur Verfügung stehen.

Die Wahl einer Beschreibungsebene für das Objekt der Untersuchung muß frei sein und den verfügbaren Observablen entsprechen. Erkenntnistheoretisch erscheint es sinnlos, eine quantitative Theorie als "conditio sine qua non" zu fordern. Beispielsweise sind ja eine Reihe mathematischer Konzepte erst entwickelt worden, nachdem neue Einsichten dies forderten; damit stand also diese a posteriori nun geforderte Darstellungsform ursprünglich gar nicht zur Verfügung.

Zwar ist nach heutigen Erkenntnissen nicht zu erwarten, daß eine quantitative Ableitung biologischer Phänomene aus physikalischen Gesetzen nicht stets möglich sei; doch hilft uns eine nur scheinbar quantitative Theorie, welche nicht mehr leistet als eine Reihe phänomenologischer Parameter sozusagen zu definieren, keineswegs in unserem Ziel, die angemessene Ebene zum Verständnis der Vorgänge zu finden; denn sie stellt sich dieses Ziel nicht.

Oberstes Ziel erscheint uns alleine die Widerspruchsfreiheit einer Theorie. Dazu muß eine Ebene der Beschreibung gewählt werden, welche falsifizierbare Aussagen erlaubt, um Widersprüche aufdecken zu können. Die Präzision quantitativer Theorien ist dazu hervorragend geeignet, aber nur, wenn die Fragestellung durch Zahlen angemessen beantwortbar ist, und wenn diese Zahlen parameterfrei oder zumindest aus nicht mehr anpaßbaren Parametern abgeleitet

werden können. Die Widersprüche dieser Theorien treten nämlich oft nicht zahlenmäßig zutage.

Geht es uns beispielsweise um die Kopplung zwischen Protonierung und Phase der Lipide, so wird unser wichtigstes Ziel sein, Widersprüche im Konzept einer "Phase" der Lipide zu suchen, welche uns erlauben, die beobachtete "Protonierungsumwandlung" bei Abwesenheit einer kalorischen "Phasenumwandlung" zu deuten (Abschnitt 2.2.). In der Tat stellt die quantitative thermodynamische Theorie der Kopplung zwischen Protonierung und Phase diese Frage nicht, da hier a priori der Zustand der Membran durch einen Ordnungsparameter charakterisiert wird, der Kopfgruppen und Ketten der Lipide nicht unterscheidet.

Andererseits ist aber eine solche Reduktion des Systems methodische Voraussetzung, um in sukzessiver Weise komplexe Vorgänge aufzuklären. Die Aufklärung der Vorgänge am reduzierten System homogener Methylphosphatidsäure-Lipidmembranen, mit der einfachst denkbaren Lipidkopfgruppe und nur einer protonierbaren Stelle, gelang Träuble im Rahmen dieses Ordnungsparameters²⁴. Wir werden die entscheidenden Gesichtspunkte dieser Theorie rekapitulieren und dabei zu dem Ergebnis kommen,

1. daß bereits in homogenen Lipidmembranen eine Protonierungsumwandlung unabhängig von der Phasenumwandlung der Ketten möglich ist, daß also die Beobachtung der ersteren in Abwesenheit der letzteren keinen Widerspruch darstellt;
2. daß die Protonierung der allen Lipiden gemeinsamen Phosphatgruppen ein homogenes Funktionsprinzip darstellt; dagegen erscheinen uns Ladungen und Struktur der Kopfgruppen, Länge der Ketten, die "Abbildung" der Protonierungsordnung der Membranoberfläche im unendlich entfernten Lösungsmittel vermittels der Gouy-Chapman-Schicht, sowie der Wert einer Umwandlungstemperatur als Spezifika, welche entscheidend für eine quantitative Beschreibung sind, nicht aber für die Ableitung der Protonenkontrolle als in sich widerspruchsfreiem Funktionsprinzip biologischer Membranen.

2.3.1. Protonierung als homogenes Funktionsprinzip.

Beispielsweise erscheint es uns quantitativ korrekt, für das Prinzip aber irreführend, die nach Verschmierung der elektrostatischen Ladungen der Kopfgruppen streng aus dem Poissonschen Gesetz und der Boltzmannschen Verteilung im thermischen Gleichgewicht folgende diffuse Doppelschicht dazu heranzuziehen, um aus den im entfernten Lösungsvolumen gemessenen Verhältnissen, z.B. dem Wert pH_{∞} , auf die Vorgänge an der Oberfläche zu schließen, etwa durch die sich ergebende Beziehung

$$pH_0 = pH_{\infty} - e\varphi_0/kT.$$

Wir betrachten diese Beziehung für die Protonen-Oberflächenkonzentration als eine für das Modell exakte Relation, welche aber an den meisten Membranen lediglich eine phänomenologische Definition eines experimentell nicht nachprüfbaren Oberflächenpotentials φ_0 darstellt.

Der gravierendste Einwand betrifft die Verschmierung der Oberflächenladungen, der letzten Endes die negativ geladenen Gruppen im Falle zwitterionischer Lipide eliminiert; eines dieser Lipide, das Lecithin, ist Bestandteil aller hier berichteten Experimente und offenbar das häufigste Lipid in biologischen Membranen.

Ein weiterer Einwand betrifft die Ionenspezifität der Lipide für Protonen; Protonen haben einen viel größeren Einfluß auf die Lipidphase als andere monovalente Kationen²⁴ (bivalente Kationen besprechen wir hier nicht; Anionen betrachten wir als hinreichend von den

negativen Oberflächenladungen abgestoßen um sie bezüglich ihrer Wirkung auf die Vorgänge zunächst zu vernachlässigen).

Die Tatsache, daß die Protonenkonzentration sogar einen zu den anderen Kationen umgekehrten Einfluß auf die Lipidphase hat, steht dabei im Gegensatz zu einer weiteren Annahme der diffusen Doppelschicht: der Ununterscheidbarkeit von Ionen gleicher Ladung.

Träuble trug diesem Widerspruch dadurch Rechnung, daß er eine protonenspezifische Bindungsstelle postulierte



und den umgekehrten Einfluß der anderen monovalenten Kationen auf die resultierende Abschirmung der Protonen in der diffusen Doppelschicht zurückführte.

Die Schwierigkeiten, diese attraktive Theorie auf zwitterionische Lipide anzuwenden, bekräftigt nur unseren Einwand gegen eine Verschmierung der Ladungen; wir nehmen dies zum Anlaß, die Verhältnisse an der Membranoberfläche zunächst mikroskopisch mit sterischen Argumenten zu bestimmen; denn solche Randbedingungen gehören zur Definition des Systems und können daher nicht aus thermodynamischen Gesetzen abgeleitet werden.

Wir weisen auf eine verwandte Situation in der Frage des aktiven Transports hin, den wir in Kapitel 3.3 durch eine präzisere Definition des Membransystems auf rein passive Diffusion zurückführen wollen.

Ionenspezifität, und die Protonenspezifität der Lipide im besonderen, ist letztlich als sterische, mit den Ionenradien zusammenhängende Eigenschaft anzusehen. Erwarten wir daher für ähnliche Ionenradien wie die des Na^+ und K^+ allenfalls eine "relative" Spezifität (zu Modellen mit einer alles-oder-nichts-Spezifität zwischen Na^+ und K^+ nehmen wir in Abschnitt 3.2. Stellung), so

gibt es doch ein Ion mit solch offensichtlich geringerem Eigenradius, daß hier, und vielleicht nur hier, ein Phänomen vergleichsweise "absoluter" Spezifität physikalisch realisierbar erscheint: das Proton^x.

Die Hydrathüllen erscheinen dabei nicht als starres Gebilde von größerem Ionenradius per se, sondern als bewegliches Nahfeld, welches die Diffusion des Protons definiert, aber nicht notwendig selbst mitdiffundieren muß. Dann sind der Beweglichkeit der Protonen innerhalb der hydratisierten Oberfläche der Lipidmembranen keine wesentlichen Grenzen gesetzt, im Gegensatz zu den sehr viel größeren Kationen wie Na^+ und K^+ . Dieses Argument wird de facto nicht berührt von der präzisen Struktur der Kopfgruppe; auch im Falle zwitterionischer Lipide erwarten wir für die Protonen - im Gegensatz zu Na^+ und K^+ - eine höhere Beweglichkeit, sozusagen über die Potential-Sattelpunkte zwischen den positiven Kopfgruppenladungen hinweg.

Ohne hier den Ansatz zu einer quantitativen Beschreibung zu machen, folgern wir rein sterisch für die mikroskopische Doppelschicht die näherungsweise Gültigkeit des in Abb. 9 dargestellten Modells. Es ist klar, daß die mit unserem sterischen Argument abgeleiteten weiteren Freiheitsgrade ermöglichen, eine Oberflächenkonzentration von hydratisierten H^+ zu erreichen, die eher bei der nach der Gouy-Chapman-Theorie für negativ geladene als bei derjenigen für nach Verschmierung "ungeladene" zwitterionische Lipide liegen.

Mit diesen Vorbemerkungen gehen wir nun davon aus, daß

1. die Lipid-Membranoberfläche protonenspezifisch ist;
 2. die für die Ordnung der Lipide relevanten Ionen, die Protonen, im wesentlichen eine homogene, negativ geladene Membranoberfläche sehen, und zwar auch im Falle dominant zwitterionischer Lipide wie der Lecithine.
- x) Eine freie Diffusion des Protons ist aber nicht möglich aufgrund der Größe der freien Wechselwirkungsenergie mit dem umgebenden Wasser: 180 kcal/Mol H^+ bei Berücksichtigung je eines H_2O -Moleküls pro Proton, und 360 kcal/Mol H^+ für die gesamte (flüssige) Hydrathülle.

Vollständigkeithalber erwähnen wir aber noch den, wenn auch geringen, Anteil von Lipiden und Fettsäuren, welche völlig andersartige Kopfgruppen besitzen und hier unterschlagen werden, insbesondere das Cholesterol, das im Neutralen bereits protonierte Kephalin, die zweifach protonierbare Phosphatidsäure und Fettsäurereste von unabhängigem pK.

Wir betrachten also die Träublesche "Methylphosphatidsäure-Näherung" als prinzipiell angemessen, die Verhältnisse an biologischen Lipidmischungen bezüglich der einflußreichen Protonen zu charakterisieren. Wir erwarten aber, daß die Protonendiffusion an der Membranoberfläche nicht der einer dreidimensionalen diffusen Schicht gleicht, sondern daß vor allem die positiven Ladungen der Kopfgruppen (N^+) zu einer Begünstigung zweidimensionaler Oberflächendiffusion entlang den protonierbaren Phosphatgruppen führen.

2.3.2. Makroskopische Theorie der Phasenumwandlung

Ausgangspunkt der thermodynamischen Analyse ist daher für uns die Protonenkonzentration unmittelbar an dieser Oberfläche.

Allerdings ist die Dicke der Oberflächenschicht mikroskopisch und die Zahl der Protonen sehr gering; selbst ein ganzes Zellvolumen des Durchmessers 1 μm enthielte bei pH 7 weniger als 100 Protonen. Daher ist eine makroskopische Theorie nicht unbedingt gerechtfertigt. Es stellt eine Hypothese dar, die präzise definierten Begriffe der Thermodynamik zur Analyse der Vorgänge an solchen Membranen verwenden zu können. Beispielsweise können auch makroskopische Ionenströme durchaus einzelnen mikroskopischen Membranfluktuationen entsprechen (vgl. Abb.10).

Ein weiterer Einwand gegen die folgende Analyse betrifft die Annahme, es reiche zunächst aus, nur eine der beiden Lipid-Monoschichten zu betrachten, nämlich diejenige, welche bei der asymmetrischen Titration (Abb.4) protoniert wird.

Bei gegebener Lipidmembran ist also diese Protonenkonzentration an der Oberfläche die nach unserer Auffassung entscheidende thermodynamische Variable in isothermen isobaren Zustandsänderungen.

Wir nennen noch einen den Protonen vergleichbaren Einfluß von Ca^{2+} , ohne dessen komplexe Wirkungsweise weiter zu diskutieren. Andere der monovalenten Kationen haben wir aus sterischen Gründen ausgeschlossen; sie gelangen nicht hinreichend an die Oberflächen.

Eine weitere thermodynamische Variable von großem Interesse ist der Oberflächendruck, welcher selbst unter makroskopisch isobaren Bedingungen lokal etwa durch Proteine beeinflusst werden kann. Da unmittelbarer Oberflächendruck durch Konformationsänderungen (wie die der "Porenproteine" Gramacidin und Alamethicin in lipophiler Umgebung) durch den Stoffwechsel nicht kontrollierbar ist, erscheinen vor allem Substrat- oder Liganden-abhängige Proteineinflüsse biologisch bedeutsam. Interessanterweise werden im allgemeinen solche Liganden an Membranen auch hydrolysiert (Abschnitt 3.1.), so daß wiederum an eine Protoneninduktion gedacht werden muß.

In der Tat beeinflusst pH_0 unmittelbar den Oberflächendruck aufgrund der mikroskopischen Coulomb-Wechselwirkung zwischen den protonierbaren Kopfgruppen.

An dieser Stelle wollen wir die Wirkung der Protonen aber im Sinne der phänomenologischen Thermodynamik aus der analytischen Form der freien Gibbsschen Enthalpie ableiten:

$$f = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{n_{i+1}}$$

n_i ist die zur mittleren molekularen Fläche f (eine makroskopische Variable) kanonisch konjugierte thermodynamische Kraft; n_i stellt unter gewissen Idealisierungen den Oberflächendruck unmittelbar dar.

Die eigentliche Aufgabe besteht also darin, die analytische Form der freien Enthalpie

$$G(\{n_k\})$$

in Abhängigkeit von den Freiheitsgraden des Systems, insbesondere von pH_0 , zu bestimmen. Mit einem in der Thermodynamik üblichen "Trick" erhalten wir dann nämlich zugleich die makroskopische Kopplung zwischen Protonierung und Phase (wir folgen Träuble 1977):²⁴

kann ein System im Gleichgewicht nur in zweierlei Phasen 1 und 2 mit den thermodynamischen Potentialen $G_1(\{n_k\})$ und $G_2(\{n_k\})$ vorliegen, so definiert

$$G_1(\{n_k\}) = G_2(\{n_k\})$$

den (oder die) Umwandlungspunkt(e). An der Umwandlung ist also $\Delta G = 0$ oder, bei isothermer Führung,

$$G_2 - G_1 \equiv \Delta G = \Delta H - T_t \Delta S = 0.$$

Eigentlich sollten nun ΔH und ΔS aus einem mikroskopischen Modell bestimmt werden, so daß die Messung von T_t und ΔH das Modell testet. Der angekündigte "Trick" besteht nun aber darin, ΔH und T_t zu messen und obige Beziehung zur Berechnung von ΔS zu verwenden. Denn verwendet man Gesetze nur zur Definition einer weiteren Größe aus bekannten, so begibt man sich des eigentlichen Sinns eines Gesetzes: nichttriviale Aussagen zu machen, deren Überprüfung Fehler in der eigenen Betrachtungsweise aufdecken können.

Im Vertrauen auf die Richtigkeit der gewählten Betrachtungsweise folgen wir nun einer weiteren Annahme:

$$\Delta S = \Delta S^{n.el.} + \Delta S^{el.} \approx \Delta S^{n.el.};$$

das so bestimmte ΔS werde nicht elektrostatisch (n.el.) beeinflusst; dahinter steht die naheliegende Vorstellung,

ΔS rühre im wesentlichen von der Ordnung der polymeren

26 Ketten der Lipide, während die Kopfgruppen eine viel geringere Zahl mikroskopischer Freiheitsgrade besitzen, also die Komplexionenzahl W und damit die Entropie

$$S = k \log W$$

nur unwesentlich beeinflussen. Dagegen ändert sich bei T_t die Ordnung der Ketten erheblich und führt zu dem dominierenden Wert $\Delta S^{n.el.} > 0$.

Zerlegt man nun die Änderung der freien Enthalpie ebenfalls

$$\Delta G = \Delta G^{n.el.} + \Delta G^{el.} \approx \Delta H^{n.el.} + \Delta H^{el.} - T_t \Delta S^{n.el.}$$

so folgt für die Umwandlungstemperatur direkt

$$T_t \approx \frac{\Delta H^{n.el.}}{\Delta S^{n.el.}} + \frac{\Delta H^{el.}}{\Delta S^{n.el.}}$$

Ist $\Delta S^{el.}$ nicht nur gegenüber $\Delta S^{n.el.}$, sondern auch gegen $\Delta H^{el.}/T_t$ vernachlässigbar, so gilt

$$T_t \approx T_t^{n.el.} \left(1 + \Delta G^{el.} / \Delta H^{n.el.} \right)$$

Auf diese Weise ist schnell, wenn auch unter etwas unübersichtlichen Näherungen²⁷ zu sehen, daß die Protonierung der allein berücksichtigten negativen Ladungen die "Aufladungsarbeit" $G^{el.}$ und damit auch $\Delta G^{el.}$ zum Verschwinden bringt:



Dagegen erniedrigt sich die Umwandlungstemperatur umso mehr, je weniger die Lipide protoniert sind; denn die hier nicht abgeleitete analytische Form

$$G^{el.} = G^{el.} (f, n, f) \geq 0$$

folgt aus der Notwendigkeit, die Membranoberfläche (negativ) aufzuladen, und

$$\Delta T_t^{el.} = \frac{\Delta G^{el.}}{\Delta S^{n.el.}} \leq 0$$

folgt eigentlich bereits aus der durch Coulombabstoßung der Kopfgruppen abgegebenen Arbeit:

$$\Delta G^{el.} < 0 \text{ bei } \Delta f > 0.$$

Es ist somit klar, daß unter isothermen Bedingungen fluide Lipidmembranen durch Protonierung prinzipiell "auskristallisiert" werden können.

Quantitative Beziehungen können erhalten werden, wenn

1. die Theorie der diffusen Doppelschicht zur Bestimmung der Oberflächenkonzentration der Protonen herangezogen wird;
2. die Gleichgewichtskonstante des Massenwirkungsgesetzes der Protonierung der Kopfgruppen eingeführt wird;
3. sodann der sich ergebende Protonierungsgrad durch die mittlere molekulare Fläche dividiert wird, um die Oberflächenladungsdichte zu erhalten;
4. $\Delta G^{el.}$, die Aufladungsarbeit unter Einschluß der diffusen Doppelschicht, bestimmt wird.

Das Problem der Ausdehnung der Membranoberfläche an der Umwandlung

$$\Delta f = f_{T > T_t} - f_{T < T_t} > 0$$

ist dabei im Zusammenhang mit der Induktion leitfähiger Membrandefekte im Bereich der Protonierungsfluktuationen (Abschnitte 1.2. und 2.2.) besonders interessant.

Membranflächenfluktuationen treten im Rahmen der thermodynamische Beschreibung in zweierlei Hinsicht in Erscheinung:

1. als Konsequenz der Umwandlung;
 2. zugleich als eine Ursache von Protonierungsfluktuationen.
- Im Prinzip könnte die Phasenumwandlung als Protonenquelle oder, wenn man wie in Abschnitt 2.1. beschrieben, vom fluiden Zustand zum festeren Zustand führt, als Protonensenke angesehen werden. Diese scheinbar zusätzliche "Bindungsstelle" für Protonen aufgrund der Flächenkontraktion sollte beim Ionentransport im Bereich einer solchen Umwandlung die Vorgänge erheblich beeinflussen.

2.3.3. Protonierungsumwandlung

Betrachten wir zum Schluß die Kopplung von Protonierung und Ordnung der Lipidmembran nochmals von einer anderen Seite:

die Protonierung einer Lipidmembran ohne erkennbare kalorische Phasenumwandlung; beispielsweise eine Lipidmischung identischer Kopfgruppen, aber unterschiedlicher Kettenlängen, welche ja die Umwandlungstemperatur wesentlich beeinflussen (ca. um 5°C pro CH₂-Gruppe); oder aber völlig heterogene Lipide mit einem wesentlichen Anteil identischer Kopfgruppen, etwa der Lecithine.

Am Wesen der vorangegangenen Diskussion ändert sich auch für solche, biologisch ubiquitäre, Lipidmischungen nicht allzuviel:

1. die Theorie der diffusen Doppelschicht ist zu modifizieren und, wie eingangs argumentiert, begünstigt eine hohe Protonenkonzentration an der Membranoberfläche (welche sozusagen im Bereich der Protonierungsumwandlung gepuffert wird);
2. das Massenwirkungsgesetz der Protonierung hat wie zuvor unter isothermen isobaren (global) Bedingungen den dominierenden Einfluß auf den Zustand;
3. die Oberflächenladungsdichte wird sich auch hier im Bereich des pK_a wesentlich ändern, gleichgültig ob die heterogenen Lipide in "Clustern" oder homogenen Mischungen vorliegen;

4. die bei Deprotonierung erhöhte Aufladungsarbeit

$$G^{deprot.} > 0$$

führt im thermodynamische Gleichgewicht

$$\Delta G = G^{deprot.} - G^{prot.} = 0$$

notwendig und analog zum Phasenübergang zu

$$\Delta f = f^{deprot.} - f^{prot.} > 0.$$

Für $\Delta H > 0$ sollte sich also auch bei Lipidmischungen ein weniger protonierter Zustand geringerer Ordnung

$$\Delta S = S^{deprot.} - S^{prot.} > 0$$

vom protonierten Zustand höherer Ordnung unterscheiden lassen.

Selbstverständlich sollten sich Ordnungsparameter heterogener Lipidmembranen von solchen homogener Systeme unterscheiden, nicht nur bezüglich ihrer Größe, sondern insbesondere bezüglich ihrer Definition und gegebenenfalls sogar ihrer Existenz.²⁸

Für die von uns hervorgehobene "Protonierungsumwandlung" heterogener Lipidmembranen sehen wir aber keine Schwierigkeiten: Ordnungsparameter ist der Protonierungsgrad der Kopfgruppen an der Membranoberfläche.^{x)}

Die Kopplung von Protonierung der Kopfgruppen mit der Phase der Ketten ist aus thermodynamischen Gründen intrinsisch. Dabei erscheint uns unerheblich, ob durch Protonierung "die" Phasenumwandlung ausgelöst wird; Fluktuationen des Oberflächendrucks sind in jedem Falle zu erwarten. Unter dem Eindruck der beobachteten Ionenkanäle in heterogenen Lipidmembranen (Abschnitt 2.2.) im Vergleich zu den bisher in homogenen Systemen beschriebenen schließen wir:

Heterogene Systeme erscheinen noch geeigneter zur Erzeugung leitfähiger Defekte als homogene; heterogene Lipidmembranen erlauben dabei dank im wesentlichen homogener Kopfgruppen, die Vorgänge wie beobachtet im engen Bereich einer Protonierungsumwandlung zu kontrollieren (Abb. 8).

x) Die in zweidimensionaler Abbildung "homogenen" CH_2 - Ketten (Abb. 10) brechen an der Protonierungsumwandlung die Symmetrie (genauer: die Gitterkonstante) des näherungsweise hexagonalen Punktgitters; die Umwandlung ist allerdings eher kontinuierlich als scharf aufgrund des Massenwirkungsgesetzes der Protonierung.

3. Spezifität protein-induzierten Ionentransports

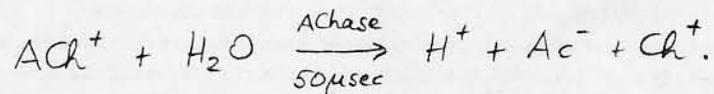
Die beobachtete hohe Spezifität der Transportvorgänge durch biologische Membranen erfordert die Induktion solcher Vorgänge durch Proteine (1.3.). In diesem Kapitel soll aber der Beweis erbracht werden, daß einfache elektrochemische Diffusion durch leitfähige, vermutlich H_2O -enthaltende Defekte in der Lipidmembran, also vergleichsweise unspezifische Ionenkanäle, dadurch de facto zu spezifischem Ionentransport führen, daß die Bedingungen der Induktion der Kanäle spezifisch sind:

- wird der kritische pH-Bereich nur durch die Aktivität eines Enzyms erreicht, so ist die Induktion dieser Ionenkanäle substrat-spezifisch (3.1.);
- ist die Aktivität eines solchen Enzyms nur in Anwesenheit einer spezifischen Ionensorte dazu hinreichend, so erscheint der Ionenkanal a posteriori spezifisch (3.2.);
- ist die Anwesenheit dieser spezifischen Ionen aber nur auf einer der beiden Membranoberflächen notwendig und hinreichend zur Induktion dieser Ionenkanäle, so führt lokal passive Diffusion zu global aktivem Transport dieser Ionen (3.3.).

In dieser sehr einfachen Weise (Abb. 3) führt nach unseren Vorstellungen die Na_{int}^+ -aktivierte ATPase zum aktiven Na^+ -Transport in den Außenraum mit der Konsequenz eines negativen elektrostatischen Potentials im Zellinnern. Der so aufgebauete Na^+ -Gradient wird durch die entsprechende Aktivität der ionen-un-spezifischen AChase wieder abgebaut, und die Membran depolarisiert. Eine besondere Rolle erwarten wir dabei für die Protonen, welche diese Vorgänge kontrollieren (3.3.3.). Eine Diskussion der zusätzlichen Effekte der K_{ext}^+ -Aktivierung (oder der $\text{Ca}_{\text{ext}}^{2+}$ -Aktivierung) von ATPasen unterbleibt hier übersichtshalber, doch ist leicht nachzuvollziehen, daß analog wieder die tatsächlich beobachtete Richtung und Ionenspezifität aktiven Transports dieser Ionen ergibt, und zwar alleine auf der Grundlage passiver Diffusion durch die Ionenkanäle der Lipidmembran.

3.1. Substratspezifität

Als Beispiel wird hier die Wirkung der Acetylcholinesterase (AChase, ACh-Hydrolase, E.C. 3.1.1.7.) besprochen. Es handelt sich um die schnellste in biologischen Geweben verbreitete Hydrolase: sie spaltet ihr natürliches Substrat Acetylcholin (ACh) in 50 μsec :¹⁷



AChase ist in fast allen Nervengewebe nachgewiesen, in höchstem Maße aber in den Membranen des elektrischen Organs des elektrischen Aals, dem Gewebe also, in welchem Ionen-transport und resultierende elektrische Spannungsänderung in höchstem Maße auftreten: 700 V beim elektrischen Schlag. Aus diesem Organ wurde die in den nun dargestellten Untersuchungen verwendete AChase gewonnen.²⁹

AChase und die durch enzymatische Hydrolyse des ACh induzierten Ionenkanäle wurden in früheren Berichten theoretisch^{9,30} und experimentell^{31,32} bereits beschrieben; daher wird die Diskussion im folgenden auf Aspekte beschränkt, welche mit den Eigenschaften der Lipidmembran zusammenhängen.

3.1.1. Substratspezifische Protonen-Induktion

Die Substratspezifität der AChase ist in der biochemischen Literatur etabliert. Sie ist nur eine "relative", das heißt auf eine Wahrscheinlichkeit der stereochemischen Erkennung bezogene. Butyrylcholin wird beispielsweise typisch 10 mal langsamer hydrolysiert als ACh, Carbamylcholin typisch 10^3 mal langsamer; Phenylacetat dagegen wird sogar noch schneller hydrolysiert als ACh.

Wie in Abb. 11 gezeigt, konnte Phenylacetat (PhA) ebenso Ionenkanäle induzieren wie ACh.³² PhA ist elektrisch neutral, im Gegensatz zu ACh^+ , dessen quaternäres Ammonium (N^+) mit der negativ geladenen, anionischen Bindungsstelle der AChase wechsel-

wirkt. Eine solche reversible Protein-Liganden-Wechselwirkung spielt also für die Induktion der Kanäle keine ursächliche Rolle.

Die substrat-induzierten Ionenkanäle beruhen nicht, wie in der Rezeptor-Hypothese postuliert, auf der Wirkung des Substrats selbst, sondern auf der Wirkung der Reaktionsprodukte der Hydrolyse an der AChase; dies geht eindeutig aus der Tatsache hervor, daß nach dem hydrolytischen Abbau des Substrats das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle nicht versiegt, sondern im Gegenteil beliebig lange Zeit andauern kann: Kontrollmessungen im Rahmen des Ellman-Assays ergaben die vollständige Hydrolyse des ACh in 15 Sekunden nach Applikation unter unseren Bedingungen, doch die Ionenkanäle konnten oft viele Stunden später noch beobachtet werden!

Das Reaktionsprodukt Cholin ist nicht in der Lage, die Vorgänge hier auszulösen, wie Kontrollmessungen zeigten, in welchen Cholinchlorid an Sojabohnen-Lecithinmembranen appliziert wurde. Das Reaktionsprodukt Acetat ist ebenfalls auszuschließen, da Salzsäure dieselben Effekte wie Essigsäure im selben pH-Bereich zeigte, so daß die Wirkung des Substrats nur auf dem einzigen verbleibenden Reaktionsprodukt beruht: dem Proton (Abb. 2).

Die Eigenschaften protonen-induzierter Ionenkanäle durch die Lipidmembran sind daher auf die ACh-induzierten Ionenkanäle übertragbar, insbesondere:

1. es muß eine der pH-Schwelle (2.2.) entsprechende Schwelle der Menge des applizierten ACh existieren, oberhalb derer die Membran erst leitfähig wird;
2. oberhalb einer zweiten pH-Schwelle (2.2.) sollte die Ordnungsumwandlung in einen zweiten, nicht mehr leitfähigen Membranzustand vollzogen sein; nach hinreichender Applikation sollte die Membran daher nicht mehr auf ACh reagieren (Desensibilisierung).

3.1.2. Oberflächen-Kontrolle der Protonierung

Quantitative Übertragbarkeit der Eigenschaften der Lipidmembran auf die substrat-induzierten Ionenkanäle sollte eigentlich aus den vorangegangenen Überlegungen folgen: das heißt beispielsweise gleiche Effekte bei Applikation von 1 mM ACh in Anwesenheit von AChase einerseits, und pH 3 durch direkte Applikation von Säure andererseits. Dies ist aber nicht der Fall:

- in der Literatur wird in vivo und in vitro die Induktion von Ionenkanälen bereits nach Applikation von wenigen μ M ACh berichtet;
- darüber hinaus sind die meisten dieser Untersuchungen bei neutralem pH gepuffert (z.B. pH 7.4 in ³²); ein Vergleich mit Effekten zwischen pH 4 und pH 1 erscheint also völlig abwegig;
- auch die meisten biologischen Lösungen enthalten Puffer, welche den pH des Lösungsvolumens, und damit den hieraus berechneten Oberflächen-pH, konstant halten sollten, also protonen-induzierte Ionenkanäle zu verhindern scheinen.

Dies stellt einen Widerspruch dar. Wie ist es möglich, daß die logische Analyse des molekularen Systems (3.1.1.) nur die Protonen-Induktion zuläßt, obwohl doch die Effekte auch in Anwesenheit von Puffern auftreten?

Dieser Widerspruch läßt sich auflösen. Ein logischer Widerspruch ist dann aufgelöst, wenn die Gründe, ihn zu erheben, entfallen. Genau dies soll nun durch eine andere Betrachtungsweise der Vorgänge an den Oberflächen der Membranen erreicht werden. Da es aber nicht gelingen wird, auf der Grundlage der bisherigen Beobachtungen, eine quantitative Theorie aufzustellen (vgl. dazu 2.3.), kann die Protonen-Induktion ACh-induzierter Kanäle bisher nicht quantitativ bewiesen werden. Dennoch folgt die Protonen-Induktion aus der vorangegangenen logischen Analyse des molekularen Systems nach unserer Auffassung zwingend.

Ich schlage nun folgende Betrachtungsweise der Vorgänge an der Oberfläche vor:

1. Lokale Erzeugung von Protonen an der Oberfläche im Verlauf der Hydrolyse³³ ist a priori unabhängig vom pH_∞ des Lösungsvolumens.
2. Die zweidimensionale Membranoberfläche ist durch die Kopfgruppen der Lipide gepuffert.

In mathematischer Idealisierung ergäbe sich sogar eine unendlich hohe, δ -funktionsförmige Pufferkonzentration (Abb. 9). Dieser Puffer-Bereich ist aber unabhängig vom Lösungsmittel und allein durch den pK der Lipide bestimmt. Die Folge davon ist, daß die Lipidoberfläche sich selbst im Bereich, und in den Bereich, der Protonierungsumwandlung puffert!

Puffern der "unendlich" entfernten Lösung legt also den Oberflächen-pH₀ nicht fest, sondern "verfälscht" lediglich den aus pH₀ folgenden pH_∞ der Lösung. Solange das System nicht im thermischen Gleichgewicht ist, die Reaktion also noch nicht vollendet ist, sind thermodynamische Berechnungen des Oberflächen-pH₀ nach der Debye-Hückel-Theorie ohnehin ungültig.

AChase und Lipide kontrollieren sozusagen selbst die Vorgänge an der Oberfläche, und damit die Leitfähigkeit; im entfernten Lösungsvolumen bilden sich diese Vorgänge nach kinetischen und thermodynamischen Gesetzen ab, doch der umgekehrte Schluß von pH_∞ auf pH₀ führt in vielen Fällen in die Irre.

Dennoch zeigt die Lipidleitfähigkeit nach Ansäuern des Lösungsvolumens zum kritischen Bereich (2.2.), daß eine Kontrolle des Zustands der Lipidmembran auch durch pH_∞ möglich ist. Allerdings wurden diese Messungen

- ohne Hydrolysevorgänge und
 - ohne Zusatz von Puffern
- durchgeführt.

Schließlich haben die angegebenen Werte pH_{∞} im Zusammenhang mit dem Lipidzustand nur Sinn, wenn die anderen thermodynamischen Variablen bei allen Messungen dieselben waren (vgl. 2.3.). Sicherlich rührte die überraschend gute Kontrolle der Induktion des kritischen Zustandsbereichs durch einfaches Ansäuern des Lösungsvolumens auch daher, daß wir (etwa beim Sojabohnen-Lipid) in den genannten Experimenten außerdem

- die elektrische Spannung konstant (auf +40 mV bezüglich des neutralen Kompartments auf der anderen Seite der Membran) hielten;
- den Oberflächendruck (bzw. -spannung) der Membran zwar nicht kontrollierten, aber durch Verwendung identischer Randbedingungen (membrantragende Bohrung 200 μm ϕ , 20 μm Dicke) in gewissen Grenzen hielten.

3.2. Ionenspezifität

Die Messung elektrischer Ströme per se ist ein ungeeignetes Mittel, Ionenspezifität nachzuweisen. Alle Untersuchungen zur Ionenspezifität der Membrankanäle, also der aufgelösten einzelnen Leitfähigkeitssprünge, sind aber auf Messung des Membranstroms gegründet. Hierin liegt ein Dilemma.

Es soll nicht darauf eingegangen werden, welche Wege schon beschritten wurden, um die offensichtliche Spezifität der Transportprozesse durch Membranen auf ihren Mechanismus zurückzuführen. Weder ionenspezifische Markierung durch Isotope, noch Zuordnung per definitionem des aus Strommessung gewonnenen Umkehrpotentials zu einem ionenspezifischen Gradienten konnte dieses Dilemma beseitigen: der Mechanismus der Ionenspezifität ist bis heute nicht auf physikalische Grundgesetze zurückgeführt.

Im Gegenteil ergaben sich scheinbar widersprüchliche Eigenschaften der Ionenkanäle in vitro und in vivo:

die außerordentliche Ähnlichkeit der Ionenkanäle, soweit die Phänomenologie der stufenförmigen Membranströme^{13,32} zu schließen erlaubt, legt dieselben Mechanismen in vivo und in vitro natürlich nahe; in der Tat lassen sich auch bei detailliertem Vergleich charakteristischer Ionenkanäle, wie sie von dem Polypeptid Alamethicin in vitro, aber auch in vivo induziert werden, die Verhältnisse in der biologischen Membran von denen in der künstlichen Lipidmembran nach den Untersuchungen von Sakmann und Boheim¹⁴ kaum unterscheiden;

dagegen deuten die gemessenen Umkehrpotentiale auf eine Ionenspezifität der Kanäle in vivo, z.B. K^+ - Kanäle oder Na^+ - Kanäle,¹⁶ welche in vitro nicht zu bestätigen ist: direkte Messung des Membranstroms in beispielsweise 1 M KCl, verglichen mit 1 M NaCl, ergab in unseren sowie in der großen Zahl früherer Untersuchungen an künstlichen Membranen keinerlei Hinweise auf spezifische K^+ - Kanäle, die sich von Na^+ - Kanälen direkt unterscheiden ließen. Die indirekte Wirkung pharmakologischer

"ionenspezifischer Kanalblocker" hilft uns bezüglich des Mechanismus auch nicht weiter; die Ionenspezifität könnte hier ja durch die Modifikation der Membran, nicht aber durch den Ionenkanal selbst, verursacht sein.

Quantitativ etwas unterschiedliche Leitfähigkeit der Ionenkanäle in verschiedenen Elektrolyt-Lösungen wurden aber auch in vitro bemerkt. Unter den vielen Fragen, die dabei offen gelassen werden, erwähnen wir nur die, welchen Anteil



an den gemessenen Strömen durch die Membran eigentlich hat. Berücksichtigen wir darüber hinaus Anionen- (oder auch, wie gelegentlich vorgeschlagen, Elektronen-) Leitung durch Membranen, so stehen wir vor der unlösbar erscheinenden Aufgabe, einer einzigen Strommessung eine große Anzahl ionenspezifischer Komponenten zuzuordnen.

Bedenken wir noch, daß die Protonenspezifität der Lipid-Oberfläche (Abschnitt 2.3.1.) dazu führen kann, daß in wäßriger Lösung (z.B. von KCl) gemessene Membranströme in der Tat nahezu reine Protonenströme sein könnten, so ist einzusehen, daß (wie schon in 1.3. diskutiert) die Ionenspezifität der Kanäle auf der Grundlage reiner Strommessungen in keiner Weise etabliert werden kann.

Aus diesem Grunde verzichten wir im folgenden darauf, Ionenspezifität der Kanäle zu postulieren.

Überraschenderweise wird sich zeigen, daß auch völlig ionenspezifische Kanäle in biologischen Membranen zu spezifischen Ionenströmen führen können. Zum Beweis stellen wir uns vor, der Ionenkanal durch die Lipidmembran sei ein wassergefüllter Defekt im Gitter der Lipid-Schwanzgruppen, sozusagen ein Loch, das nur völlig (oder näherungsweise) unspezifische elektrochemische Diffusion der Ionen erlaubt. Eine gewisse "relative"

Ionenspezifität der Diffusion in H_2O berührt die Argumentation dabei nicht (2.3; Abb. 10).

Der zentrale Gesichtspunkt ist nun:

selbst ein völlig unspezifischer Ionenkanal kann nur solche spezifischen Ionen transportieren, welche sich auch tatsächlich während der Lebensdauer des Kanals an der lokalen Membranoberfläche, sozusagen "vor" dem Kanal, befinden.

Öffnet ein ionen-un-spezifischer Kanal nur in Anwesenheit spezifischer Ionen, so muß er zwangsläufig ionenspezifisch erscheinen, denn der Ionenstrom ist dann notwendig ionenspezifisch. Die Ionenspezifität ist dann nicht eine Eigenschaft des Ionenkanals, sondern der ionenspezifischen Umgebung des Kanals, insbesondere ionenspezifischer Gradienten über der Membran.

Der in Abb. 12 skizzierte, völlig unspezifische Ionenkanal kann beispielsweise nur

- spezifisch Na^+ nach dem Zellinnern (int), und
- spezifisch K^+ nach dem Zelläußeren (ext) transportieren.

Da in der Tat solche spezifischen Konzentrationsgradienten über den biologischen Membranen aufgebaut werden, sollte die Induktion völlig unspezifischer (oder nur "relativ" spezifischer) Ionenkanäle durch die Lipiddoppelschicht ausreichen, Influx von Na^+ und Efflux von K^+ nach Applikation des ACh an die Membran zu erklären. Insofern ist also die substrat-spezifische Hydrolyse auch in der Lage, ionenspezifische Transportprozesse durch die Membran auszulösen (Abb. 3).

Die Ionenspezifität der (z.B. Na^+ -, K^+ -)Kanäle in vivo stellt damit keinen Widerspruch zu den in vitro gemessenen, vergleichsweise ionen-un-spezifischen Ionenkanälen dar. Die letzteren erscheinen im Gegenteil sehr wohl geeignet, die ersteren unter Berücksichtigung der über der Membran anliegenden ionenspezifischen Gradienten zu erklären.

Das Problem der Ionenspezifität ist damit aber nicht gelöst, sondern nur auf das Problem verschoben worden, entsprechende ionenspezifische Gradienten über der Membran zu erzeugen.

Diese aufzubauen, ist Thema des letzten Abschnitts 3.3.

Während der ionenspezifische Membrantransport bei gegebenen Gradienten auch ohne Proteine durch reine Lipidmembranen auftreten sollte, wird sich nun zeigen daß der Aufbau dieser ionenspezifischen, "aktiven" Konzentrationsgradienten nur zu realisieren ist,

- wenn eine durch spezifische Ionen aktivierte Störung den Zustand der Lipidmembran in den leitfähigen kritischen Bereich verschiebt;
- wenn diese Störung nur für eine wohldefinierte Asymmetrie über der Membran auftritt, nämlich nur in Anwesenheit ionen-spezifischer Konzentrationsgradienten über der Membran von umgekehrter vektorieller Richtung zu den aufzubauenden Gradienten.

Dies wird aber, wie nun zu zeigen, durch ionen-abhängige, membran-asymmetrische Aktivierung von Hydrolasen erreicht, und damit durch ionenspezifische Lipidprotonierung.

3.3. Asymmetrie

Wir werden im folgenden die Konsequenzen der Hydrolyse von Adenosin-tri-phosphat (ATP) an der membrangebundenen $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, einer sogenannten "aktiven Transport-ATPase", diskutieren. Es wird sich ergeben, daß eine Konsequenz, die Protonen-Induktion von Ionenkanälen durch die Lipid-doppelschicht infolge hinreichender ATP-Hydrolyse, zwangsläufig zum Aufbau ionenspezifischer Gradienten über der Membran führt, und zwar Gradienten von der beobachteten Ionenspezifität und in der beobachteten vektoriellen Richtung. Diese Möglichkeit stellt einen neuen, molekular detaillierten Mechanismus aktiven Transports durch biologische Membranen dar.³⁷ Eine Falsifikation dieses Mechanismus berührt aber wegen zusätzlicher Annahmen die bislang in dieser Arbeit gemachten Aussagen nicht notwendig.

Bekanntlich bezeichnet man als "aktiv" solche Transportvorgänge, welche Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden durch die Membran getrennten Lösungsvolumen aufbauen. Üblicherweise werden die beiden Teilsysteme als ständig in Verbindung stehend betrachtet, beispielsweise durch einen Überträger-Mechanismus ("Transportprotein"). Daraus ergibt sich dann die Notwendigkeit einer direkten chemi-osmotischen Kopplung im Onsagerschen Sinne. Man stellt sich beispielsweise vor, die bei der Hydrolyse von ATP an der ATPase erzeugte freie Energie werde, sozusagen stöchiometrisch, zum Aufbau der Gradienten verwandt (Mitchell,¹⁹ Skou,³⁴ Kyte³⁵).

In der Tat geht der aktive Transport ganz allgemein mit Hydrolyse, insbesondere von energiereichen Triphosphaten, einher. Der entscheidende Einwand gegen diese deskriptiv erfolgreiche Konzept ist aber, daß zwar eine Parallelität chemischer und osmotischer Vorgänge zu beobachten ist, daß aber die Art und Weise, wie diese stöchiometrische Kopplung zustande gebracht werden soll, im Dunkeln bleibt. Das aktive Transportprotein muß als Modell verstanden werden, welches keiner direkten kritischen Prüfung zugänglich ist. Die mangelnde Falsifizierbarkeit rührt, wie bereits für

passive Transportproteine diskutiert (vgl. Vorwort), von der Unmöglichkeit, Membranen herzustellen, welche nur aus Proteinen bestehen. Die Lipidkomponente der Membranen ist auch bei den aktiven Transportprozessen notwendige Voraussetzung für die Existenz der Doppelschicht und damit der Möglichkeit eines Membrantransports per se. Darüber hinaus ist die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase ohne Lipide gar nicht enzymatisch aktiv: die Hydrolyse des Substrats ATP und der dabei induzierte aktive Transport von Na^+ und K^+ erfordert die Anwesenheit der Lipide, und zwar als Doppelschicht.³⁶

In jedem Falle sind die Transport-ATPasen membrangebunden. Schon daraus ergibt sich der für das folgende entscheidende Gesichtspunkt:

die Konsequenzen der ATP-Hydrolyse für die Leitfähigkeit der Lipid-Doppelschicht (vgl. 3.1.), sowie die gegebenenfalls spezifische Ionen-Diffusion durch dieselbe (3.2.), sind also unvermeidliche Vorgänge im Verlauf des ionenspezifischen, aktiven Membrantransports.

Im nächsten Abschnitt 3.3.1. wird der thermodynamische Grundgedanke ausgeführt, wie durch passive Diffusion ein aktiver Konzentrationsgradient aufgebaut werden kann, wenn die ATPase nur unter gradienten-spezifischen Bedingungen die Ionenkanäle öffnet.

Im letzten Abschnitt 3.3.2. wird aber gezeigt, daß die Protonenkontrolle dieser Vorgänge ein im Detail wesentlich differenzierteres Bild ergibt, unsere Theorie also nicht hinreichend ist.

Für den im folgenden vorgeschlagenen Mechanismus spricht aber,

1. daß der resultierende, global aktive Transport allein aus lokal passiver, elektrochemischer Diffusion folgt, das heißt auf physikalisch gesicherten Mechanismen gründet;
2. daß aktiver, ionenspezifischer Transport in der beobachteten Richtung direkt aus den etablierten Eigenschaften der besprochenen $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase und der von uns nachgewiesenen Protoneninduktion der Ionenkanäle folgt;
3. daß sich direkt falsifizierbare Aussagen ergeben.

Beispielsweise muß jede durch irgendein Ion X^+ an einer der beiden Membranoberflächen aktivierte Hydrolase zu aktivem Transport von X^+ zur anderen Seite der Membran hin führen. Dieser aktive Transport darf aber nur in einem kritischen, substrat-induzierten pH-Bereich auftreten; er muß weiterhin bei hinreichend saurem pH reversibel erlöschen, und zwar unabhängig vom chemischen Metabolismus und den osmotischen Gradienten. Eine Voraussage zur antagonistischen Protonenkontrolle durch enzymatische Hydrolyse respektive elektrostatische Membranspannung findet sich in 3.3.3.

3.3.1. Maxwell's Dämon im aktiven Transport

- Es ist bekannt, daß die aktive $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase nur dann Protonen erzeugt (durch ATP-Hydrolyse), wenn im Innern der Zelle Na^+_{int} vorhanden ist.³⁴ Diese Konzentration beziehen wir auf eine Oberflächenkonzentration Na^+_{int} am Ort der membrangebundenen ATPase (dies ist eine Annahme).
- Es ist weiterhin nach unseren Ergebnissen (2.2.) davon auszugehen, daß Lipid-Membranen, welche Lecithin enthalten, oberhalb der Schwelle der Oberflächen-Konzentration der Protonen

$$H^{\text{thr } 1} \leq H_0 < H^{\text{thr } 2}$$

und unterhalb einer zweiten Schwelle passive Ionenkanäle ausbilden (Abb. 7).

Halten wir bis auf Na (künftig sind hier Konzentrationen gemeint) alle anderen thermodynamischen Variablen konstant, insbesondere die Konzentration des Substrats ATP, so folgt daß passive Ionenkanäle nur auftreten, wenn Na^+_{int} einen gewissen Schwellwert überschreitet:

$$X^+_{\text{int}} \leq X^{\text{thr}}_{\text{int}} \cdot X^+ \equiv H^+ \text{ bzw. } \text{Na}^+$$

Dabei ist gleichgültig, ob diese Schwelle durch thermodynamische (und unwahrscheinliche) Konzentrationsfluktuationen, oder durch deterministische Bildung von X^+ an der Oberfläche³³ erreicht wird.

Daraus folgt bereits für passive, Ionen-unspezifische Diffusion durch diese Ionenkanäle (vgl. 3.2.), daß X^+ nach außen diffundiert, bis sich im Außenraum die mittlere Konzentration

$$X_{ext} = X_{int}^{thr}$$

eingestellt hat.

X_{int}^{thr} ist durch die lokalen Eigenschaften der Lipide und der gebundenen ATPase festgelegt, also a priori unabhängig von den globalen osmotischen Bedingungen. Ist die Schwelle, z.B. Na_{int}^{thr} , größer als die mittlere Konzentration im Innenraum (wir gehen auf Oberflächen-Korrekturen hier nicht ein, da sie das Wesen des Arguments nicht berühren) so folgt

$$Na_{ext} = Na_{int}^{thr} > Na_{int}$$

Das System hat durch lokal passive Diffusion einen global aktiven Gradienten aufgebaut. Hier besteht eine gewisse Analogie zum alternativen "carrier"-Mechanismus: der Ion-Protein-Komplex diffundiert ebenfalls passiv beim aktiven Transport.³⁴ Anstatt den Transport aber durch unterschiedliche Bindungskonstanten für das Ion, je nach der Oberfläche, an welcher sich das Protein befindet, zu erzwingen, folgt bei unserem Vorschlag der aktive Transport aus der meßbaren Schwelle für die Leitfähigkeit der Lipidmembran. Thermodynamische Kraft ist (bis auf den Temperatur-Faktor) der lokale osmotische Druckgradient; die bei der Hydrolyse selbst erzeugte freie Energie erscheint als unabhängige Größe; es existiert keine direkte chemi-osmotische Kopplung (vgl. aber 3.3.2).

Der aktive Transport arbeitet hierbei nach dem Prinzip eines Gefängnistors, das nur geöffnet wird, wenn "vor" dem Tor, nicht aber, wenn "hinter" dem Tor Na^+ auftritt. Das Gefängnis füllt sich so allein durch passive Diffusion (Abb. 13).

Der in 3.3.2. besprochene Einfluß des Protonierungsgradienten ist wesentlich subtiler, möglicherweise aber quantitativ dominierend.

Eine Berücksichtigung der ionenspezifischen "Randbedingungen" der beiden Teilsysteme, welche oberhalb einer ionenspezifischen Schwelle offen, unterhalb dieser Schwelle aber geschlossen sind, stellt eine interessante Variante thermodynamischer Systeme dar, deren Gesetze die Form bedingter, lokaler Onsagerrelationen annehmen sollten (Abb. 8):

- falls $pH_0 \approx pK$ Membran offen; Onsagerkoeffizienten $\neq 0$;
- falls $pH_0 \neq pK$ Membran geschlossen; Onsagerkoeffizienten $= 0$.

Global haben wir es hier mit einem Maxwell'schen Dämon zu tun: die Entropie des (nicht ganz abgeschlossenen) Ionensystems im Innern und Äußeren der Membran nimmt ab, obwohl die Transportprozesse selbst dem lokalen Gleichgewicht zustreben.³⁸

Der aktive K^+ -Transport wirft keine grundsätzlich neuen Probleme auf: die elektrostatische Membranspannung, welche durch den aktiven Transport von Na^+ und H^+ ins Zelläußere aufgebaut wird, zieht Kationen ins Zellinnere. Ist außer Na^+ , H^+ nur noch K^+ im System enthalten, folgte bereits hieraus zwangsläufig ein scheinbar aktiver K^+ -Influx ins Zellinnere.

3.3.2. Protonierungs-Asymmetrie

Unter den sehr vielen Fragen zum aktiven Transport, die ich offenlassen muß, ist die besonders schmerzlich, daß das quantitativ vermutlich dominierende der transportierten Ionen, das Proton, wegen seiner besonderen Rolle bei

- Protonentransport
- enzymatischer Lipidprotonierung einer Oberfläche (Asymmetrie)
- Lipidprotonierung der anderen Oberfläche als Folge des Protonentransports (Symmetrie),

dem einfachen Mechanismus eines asymmetrischen Gefängnistors nicht gehorchen wird. So sollte der Protonentransport durch Membranen eine ganze Reihe von Eigenschaften zeigen, die nicht in leicht überschaubarer Weise (und damit falsifizierbar) darzustellen sind.

Ganz abgesehen von der Rolle der Proteine und ihrer pH-abhängigen Aktivität³³ (vgl. 3.3.1. für H^+ statt Na^+) sollte bereits die Lipiddoppelschicht zwar oberhalb einer Schwelle der Protonenkonzentration öffnen (analog 3.3.1.), oberhalb einer zweiten Schwelle aber wieder schließen. Der Ionen-transport wäre näherungsweise protonenspezifisch (vgl. 2.3.1.) und sollte die Lipidmembran durch Protonierung der anderen Oberfläche symmetrisieren.

Beschränken wir uns aber darauf, eine reine Lipidmembran negativ geladener Phosphatgruppen wie in Abb. 14 nur auf einer (entsprechend der Wirkung der ATPase der "inneren") Oberfläche zu protonieren, so ergibt sich ohne Berücksichtigung von elektrischen Feldeffekten aufgrund thermischer Diffusion

- oberhalb der ersten (Induktions-)Schwelle der Protonenkonzentration ein vektorieller Protonentransport nach "außen", der aber
- oberhalb der zweiten (Desensibilisierungs-)Schwelle der Protonenkonzentration wieder erlischt (Abb. 7).

Wird die Protonierung durch das angelegte elektrische Membranpotential erreicht, so ist dieser vektorielle Protonentransport per definitionem global passiv. Lokal ist der vektorielle Transport von Ionen nach unserer Auffassung in jedem Falle passiv (3.3.1.). Aufgrund der Bindung der Protonen an die Membranoberfläche sollten Protonierungsgradienten zu besonders hohen elektrischen Feldstärken innerhalb der Membran führen, welche den passiven lokalen Ionen-transport kontrollieren. Die Größenordnung läßt sich aus dem Membranpotential (typisch 10^{-1} V) und der Dicke der Doppelschicht (weniger als 10^2 \AA) zu über 10^5 V/cm abschätzen. Bei solch hohen Feldstärken muß sogar mit Dissoziations-Feld-Effekten gerechnet werden.³⁹ Mit Sicherheit sollte der Ionen-transport aufgrund asymmetrischer Protonierung durch Hydrolase-Aktivität erheblich beeinflusst sein.⁴⁰

In diesem Sinne sollte die an der "inneren" Zelloberfläche lokalisierte Na^+ -ATPase zu einem weit größeren Na^+ -Transport nach "außen", angetrieben durch den Protonierungsgradienten, führen als dies nach dem einfachen Prinzip des Gefängnistors (Abb. 13) zu erwarten wäre.

Der Maxwell'sche Dämon erklärt den vorgeschlagenen Mechanismus global aktiven Transports auf der Grundlage lokal passiver Diffusion. Die Protonenkontrolle der elektrochemischen Diffusion verziert diese Vorgänge jedoch mit wesentlichem Detail.

Der nächste Schritt ist nun ein kritisches Experiment, welches unsere Vorstellungen zum aktiven Protonentransport falsifizieren kann. Besonders reizvoll erscheint uns ein Experiment zum Antagonismus

- elektrische Lipidprotonierung durch das angelegte Membranpotential gegen
- enzymatische Lipidprotonierung durch eine membrangebundene Hydrolase umgekehrter Asymmetrie (Abb. 14).

Ich sage voraus, daß unterhalb eines gewissen Betrages des angelegten Membranpotentials membran gebundene Hydrolase, beispielsweise auch die Acetylcholinesterase, bei antagonistischer Asymmetrie im kritischen pH_0 -Bereich zu global aktivem Protonentransport führt.

Eine Falsifikation dieser Voraussage widerlegt sowohl die in 3.3.2. wie die in 3.3.1. dargestellte Betrachtungsweise. Eine experimentelle Verifikation beweist sie aber dennoch nicht. Bestenfalls stellt sie die chemiosmotische Kopplung von enzymatischer Hydrolyse und pH-Gradienten auf eine mögliche mikroskopische Grundlage: die Protonenkontrolle der Lipid-Doppelschicht-Membran.

Zusammenfassung

Aus der vorliegenden Untersuchung ergeben sich folgende Prinzipien des Ionentransports durch biologische Membranen:

- A. Lipide sind notwendig zum Ionentransport per se.
- B. Eine Ordnungsumwandlung der Lipidkomponente der Membran ist hinreichend für passiven Ionentransport.
- C. Die "kritische" Bedingung einer Ordnungsumwandlung kann "multipel" durch mehrere thermodynamische Variable erreicht werden.
- D. Zellmembranen werden nur im Bereich "kritischer" Störungen der Lipidkomponente "lokal" permeabel.
- E. Proteine sind notwendig zur lokalen Kontrolle dieser Störungen.
- F. Die Spezifität der Proteine prägt sich dem Ionentransport auf.
- G. Enzymatische Hydrolyse ist im kritischen Bereich hinreichend, substrat-, ionen- und richtungs-spezifische Transportprozesse auszulösen.
- H. Acetylcholin-induzierter passiver sowie ATP-abhängiger aktiver Ionentransport können durch enzymatische Hydrolyse ausgelöst werden.
- I. Protonen sind im kritischen Bereich hinreichend zur synaptischen Übertragung passiver Membranpermeabilität.
- K. Protonen-induzierter Ionentransport erscheint in biologischen Membranen infolge der Wirkung chemischer Hydrolyse oder elektrischer Membranspannung unvermeidlich.

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen waren die Arbeiten David Nachmansohn's zur Acetylcholinesterase. Auf die Rolle der Protonen machte mich zuerst Manfred Eigen aufmerksam. Robert Graham verdanke ich entscheidende Argumente zur Theorie des Ionenkanals. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Israel Silman und Wolfgang Hanke realisiert. Und warum soll ich nicht sagen, was Du, Regine, mir in diesen Zeiten bedeutet hast?

Lipid ————— Doppelschicht

Abb. 1. Die Danielli-Davson-Doppelschichtmembran.

Die protonierbaren, hydrophilen Kopfgruppen (—) und die hydrophoben Schwanzgruppen (||||) der Lipidmoleküle stabilisieren in wäbrigem Milieu eine Doppelschichtmembran (nach Danielli und Davson). Im allgemeinen zeigt eine solche Lipidmembran nur vernachlässigbar geringe Leitfähigkeit.

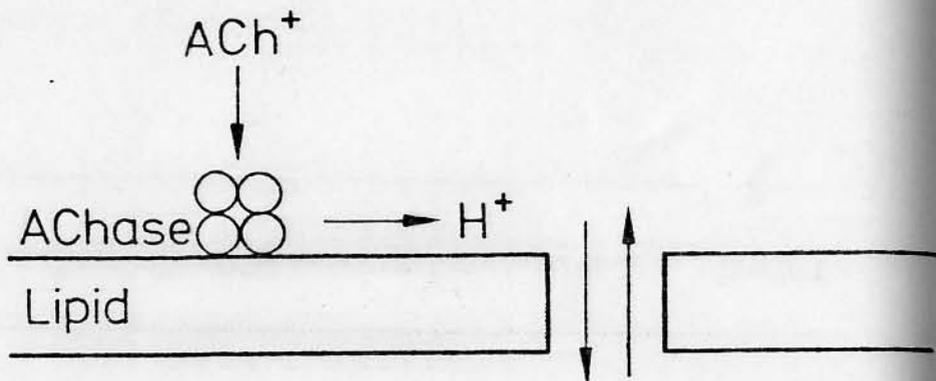


Abb.2. Acetylcholin-induzierter Ionenkanal.

Acetylcholin ist in Anwesenheit der Acetylcholin Hydrolase (Acetylcholinesterase, AChase) in der Lage, leitfähige Ionenkanäle in der Lipidmembran zu erzeugen (Kaufmann und Silman). Die Ionenkanäle sind eine Konsequenz von Protonierungs-Fluktuationen der Lipid-Doppelschicht (vgl. Abb.5,6,11).

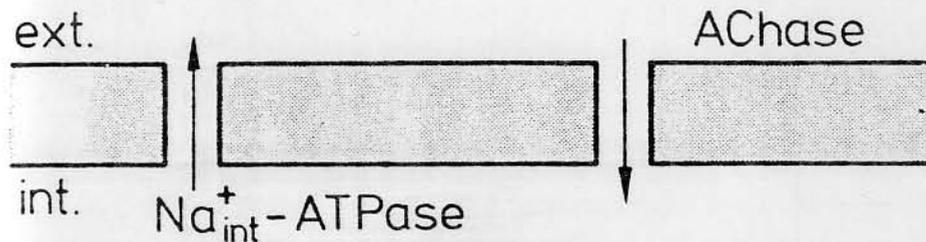


Abb.3. Hydrolase-induzierter Ionentransport.

Na_{int}^+ -aktivierte ATPase sollte entsprechend Abb.2 lokal passive elektrochemische Na^+ -Diffusion nach ext. auslösen, welche nach unseren Vorstellungen (Abb.12,13,14) zu einem global aktiven, ionenspezifischen Na^+ -Gradienten über der Membran führt.

Membranstrom

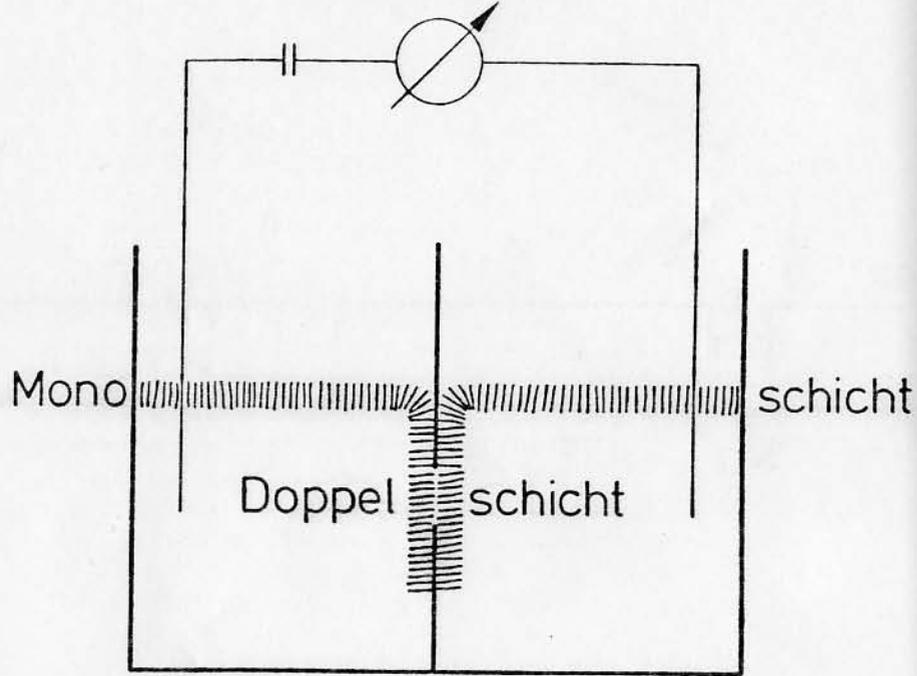
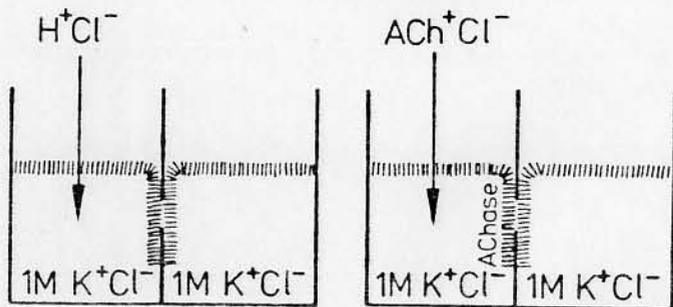


Abb. 4. Die Müller-Rudin-Montal-Membran.

Die künstliche Rekonstitution einer Lipidmembran in wässrigem Milieu nach Müller et al. und Montal et al. erlaubt die direkte Beobachtung des Membranstromes an molekular definierten Systemen. Die hydrophoben Schwanzgruppen der Lipidmonoschicht auf der Oberfläche werden entlang den hydrophoben Teflon.Wänden so geführt, daß im Bereich einer kleinen Bohrung (200 μ Ø) eine Doppelschichtmembran entsteht. Die in Abb.2 behauptete Wirkungsweise des ACh^+ folgt dann aus der entsprechenden Wirkung titrierter Säure (z.B. H^+Cl^-) an reinen Lipidmembranen (Abb.5,6,11). Die Titration erfolgt asymmetrisch wie angegeben, ohne zu rühren. Das nicht titrierte Lösungsvolumen befindet sich auf dem elektrostatischen Referenzpotential (0 mV), das titrierte Volumen gewöhnlich zwischen 0 und +100 mV, so daß H^+ von der zugehörigen Oberfläche angezogen wird. Die Verhältnisse an den Membran oberflächen selbst sind aber nicht quantitativ bekannt. Der Membranstrom wird rauscharm verstärkt nach Sigworth und Neher. Alle Messungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt (20 - 22°C). Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus gibt Hanke.⁴¹



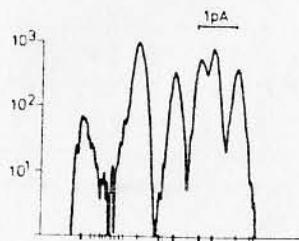
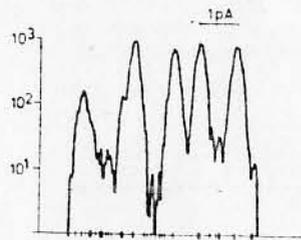
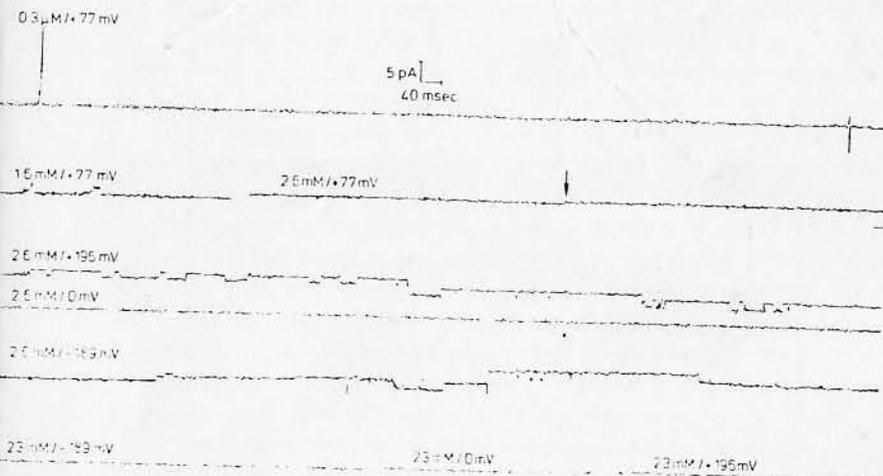


Abb.5. Protonen-induzierte Ionenkanäle durch eine synthetische, homogene Diphytanyllecithin-Membran.

In ungepufferter 1 M KCl (ca. $0,3 \mu\text{M H}^+$) und +77 mV entsprechend Abb.4 angelegten elektrostatischen "Membran"-Potentials des titrierten Lösungsvolumens besaß die Membran eine geringe Leitfähigkeit von nur 5 pA/V und zeigte keine aufgelösten Ionenkanäle (erste Meßspur). Doch können kurze (3 msec) Strompulse passiver (Ströme zum nicht titrierten Volumen hin sind nach oben eingezeichnet) und gelegentlich auch aktiver Richtung entgegen dem angelegten Membranpotential beobachtet werden. Erst nach Ansäuern entsprechend Abb.4 mit HCl bis $1,6 \text{ mM H}^+$ bei demselben Membranpotential +77 mV werden diskrete Sprünge des Membranstroms ("Ionenkanäle") beobachtet, und bei $2,6 \text{ mM H}^+$ ist die Lipidmembran stationär leitfähig. Bei \downarrow ist ein Ionenkanal der Leitfähigkeit von 5 pA/V zu beobachten. Die bei $2,6 \text{ mM H}^+ / +196 \text{ mV}$; 0 mV ; -189 mV für selben Ordinatenursprung gezeichneten Meßspuren zeigen eine Abhängigkeit der Ionenkanäle vom Membranpotential. Die Membranleitfähigkeit ist nun ca. 100 pA/V , die gezeigten Leitfähigkeitssprünge ca. 5 pA/V . Beobachtet wurden Sprünge im gesamten Meßbereich (1 pA/V bis 10^4 pA/V). Nach weiterem Ansäuern bis 23 mM H^+ treten selbst bei hohem angelegtem Membranpotential keine Ionenkanäle mehr auf, die stationäre Leitfähigkeit ist wieder vernachlässigbar klein (unter 3 pA/V) und reagiert nicht mehr auf weitere Titration von Säure (nach Kaufmann und Silman, 1982). Der kritische Zustandsbereich, in welchem die Lipidmembran leitfähig wird, liegt also um pH 2 bis 3. Entsprechende Eigenschaften zeigten Membranen aus Dioleoyllecithin: Cholesterin 9:1 (nicht gezeigt) und aus der in Abb.6 gezeigten Lipidmischung, und zwar nach Ansäuern mit HCl oder mit Essigsäure.

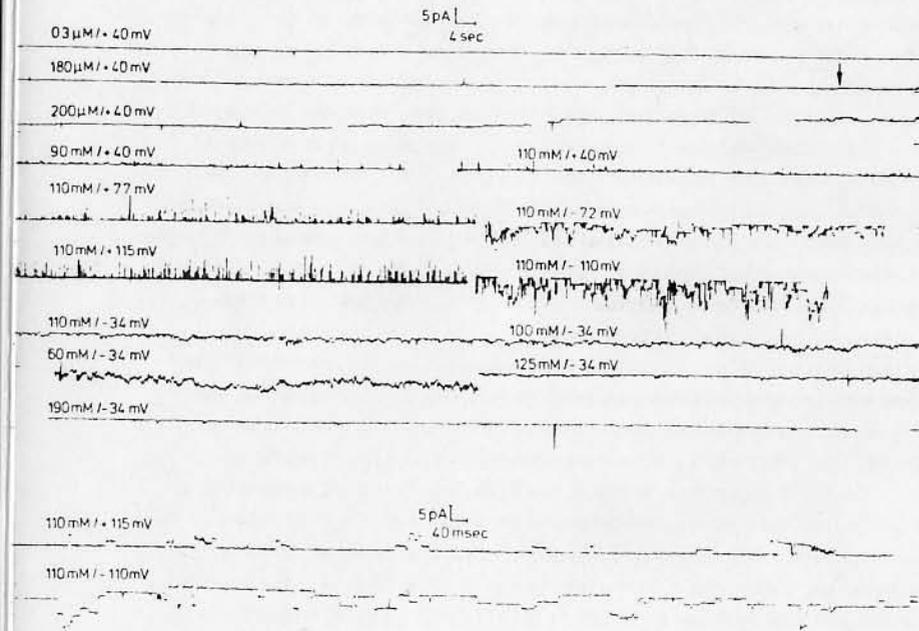
Abb.6. Protonen-induzierte Ionenkanäle durch eine heterogene Sojabohnen-Lecithin-Membran.

Versuchsbedingungen wie in Abb.5. Die Membran zeigt zunächst eine geringe Leitfähigkeit (2 pA/V) und gelegentliche Strompulse (erste Meßspur, 0,3 $\mu\text{M H}^+$ /+40 mV). Die Membran erhöhte die Leitfähigkeit nach Ansäuern bis 180 $\mu\text{M H}^+$ (\downarrow zeigt das Öffnen eines Ionenkanals von 6 pA/V). Bei 200 $\mu\text{M H}^+$ ist eine weitere Erhöhung der Leitfähigkeit in diskreten Sprüngen bis zu 30 pA/V zu beobachten. Die Membran erreichte später bis zu 10^4 pA/V Leitfähigkeit (nicht gezeigt).

Weiteres Ansäuern bis 90 mM H^+ führte zu einem neuen Zustand geringer Leitfähigkeit. Die Membran antwortet nicht mehr auf weitere Zugabe von Protonen (110 mM H^+).

Die Spannungsabhängigkeit der Ionenkanäle zeigen die folgenden Meßspuren bei 110 mM H^+ . Die Stromrichtung ist passiv in Richtung des angelegten elektrischen Membranpotentials.

Die Reversibilität der Wirkung der Protonen wird anschließend durch Zugabe von KOH bei -34 mV gezeigt: bei auf 100 mM und 60 mM verringerter Protonenkonzentration des Lösungsvolumens ist die Membran wieder deutlich leitfähiger. Auch diese Reaktivierung ist reversibel: Zugabe von HCl bis zu 125 mM und 190 mM H^+ reduziert die Membranleitfähigkeit wieder auf einen sehr geringen Wert (nach Kaufmann und Silman, im Druck). Die zeitlich gestreckten Ausschnitte bei 110 mM H^+ weisen aufgelöste Ionenkanäle nach.



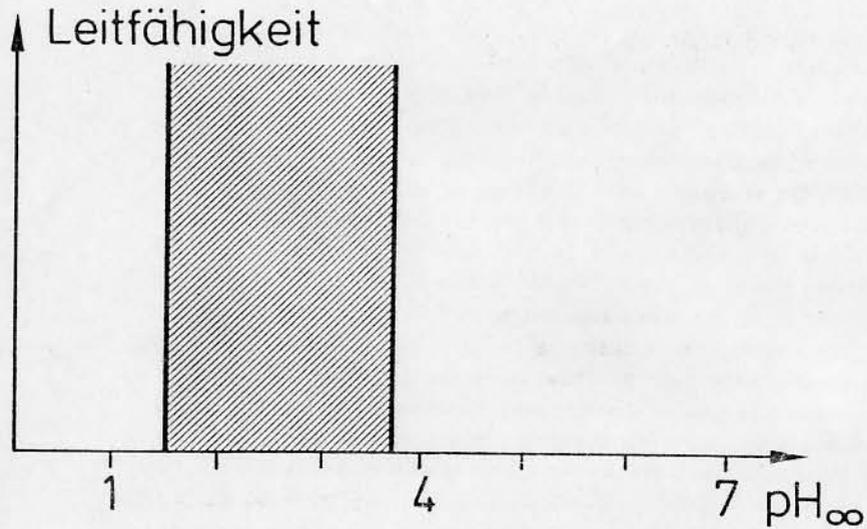


Abb.7. Leitfähigkeitsverhalten der Membran.

Schematisch nach Abb.6, vgl. auch Abb.5. Nicht gezeigte Ergebnisse an synthetischen Dioleoyllecithin Membranen, welche 10% Cholesterol enthielten, stimmen hiermit qualitativ überein. pH_{∞} stellt den meßbaren pH-Wert des titrierten Lösungsvolumens bei +40 mV dar. Der Oberflächen- pH_0 kann über eine Einheit niedriger liegen.

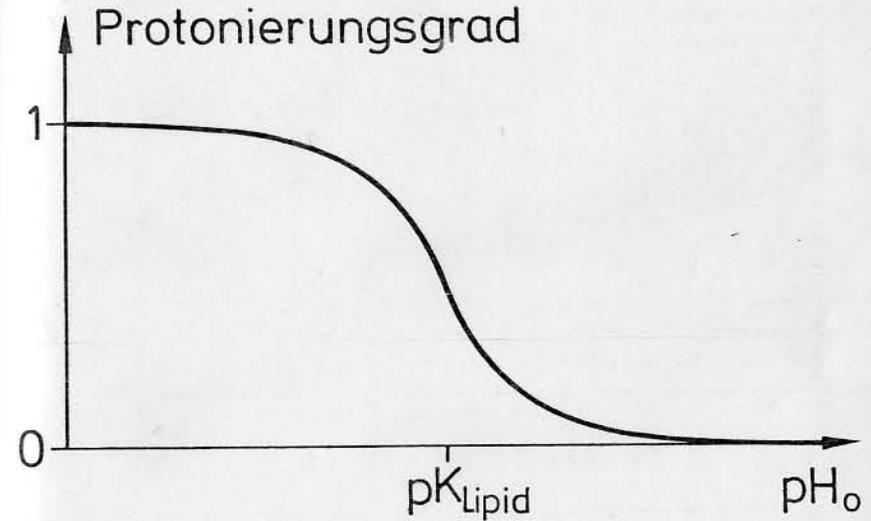


Abb.8. Protonierungs-Umwandlung.

Im leitfähigen pH-Bereich (Abb.7) wechselwirken die Protonen mit den Phosphatgruppen der Lipide. Eine "Protonierungs-Umwandlung" von einem deprotonierten, nicht leitfähigen, in einen protonierten und ebenfalls nicht leitfähigen Zustand ist zu erwarten. Im Bereich einer Ordnungsumwandlung ist mit extremalen Fluktuationen zu rechnen.

diffuse Doppelschicht	positive Kopfgruppenladungen	Protonen	negative Kopfgruppenladungen	Kettengruppe
X^+A^-	N^+	H^+	P^-	$(CH_2)_n$
pK_{Puffer}		pK_{Lipid}		

Symmetrieebene

Abb.9. Protonierung der Lipide als homogenes Funktionsprinzip.

Die hohe Beweglichkeit der Protonen in strukturiertem Wasser (Eigen und deMaeyer 1958)²⁵ sollte zu einer näherungsweise protonenspezifischen Membran-Oberflächenschicht führen. Diese Schicht wird de facto durch die protonierbaren Phosphatgruppen bei pK_{Lipid} gepuffert (um pH 2). Es ist deshalb möglich, daß der Puffer des Lösungsvolumens nur eine geringe Wirkung an der Membranoberfläche besitzt. In der Tat lassen sich protonen-induzierte Ionenkanäle auch bei Überschuß von neutralem Puffer (Abb.11) beobachten.

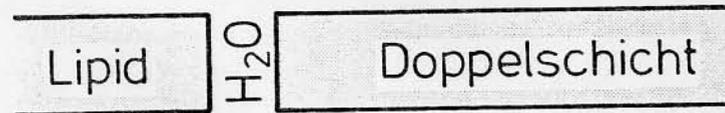
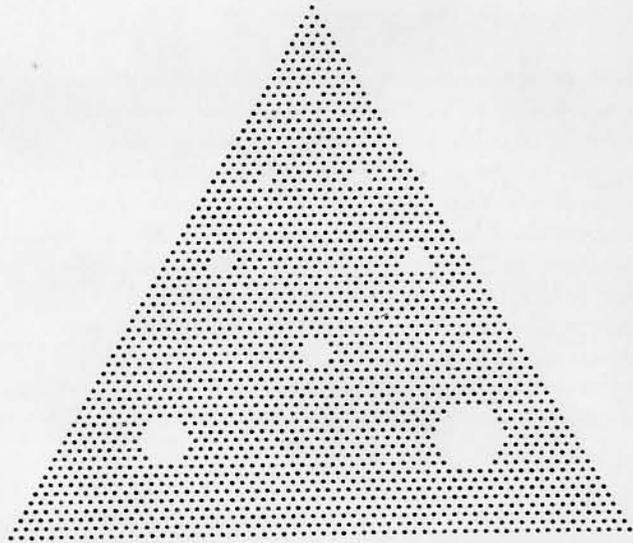


Abb.10. Leerstellen-Defekte als Ionenkanäle.

Im Bereich einer Ordnungsumwandlung der Lipide stehen zwei Phasen von unterschiedlicher mittlerer molekularer Membranfläche miteinander im Gleichgewicht. Die hier extremalen Fluktuationen lassen erwarten, daß vorübergehend Defekte durch die Doppelschichtmembran entstehen. Die Membranaufsicht zeigt das näherungsweise hexagonale Punktgitter der CH₂-Ketten. Die Gitterkonstante ist um 5 Å und läßt bei starken Fluktuationen Leerstellen-Defekte definierter mikroskopischer Fläche erwarten, welche die Permeation von H₂O erlauben und so zu diskreten Sprüngen der Leitfähigkeit der Lipid-Doppelschicht führen. Die folgenden Defekte sind eingetragen: 2,3,4,6 nicht besetzte Kettenpositionen sowie die ersten Glieder 1,7,19,37 der hexagonalen Defektserie $1 + \sum_{\nu=0} 6\nu$.

Eine theoretische Ableitung dieser Interpretation der Ionenkanäle ist wie folgt möglich:

1. Die zu erklärenden Observablen sind diskrete Sprünge des Membranstroms bei einem gewissen elektrostatischen Membranpotential.
2. Es wird angenommen, die Ströme rühren von einer gewissen Ionenbeweglichkeit und werden durch den Gradienten des elektrostatischen Potentials durch die Membran angetrieben.
3. Dann entsprechen diskrete Sprünge des Membranstroms diskreten Änderungen der leitfähigen Membranfläche (Poren-Modell der Ionenkanäle).
4. Die einzige diskrete Größe parallel reinen Lipid-Doppelschichten ist nach der Röntgenanalyse die Gitterkonstante der CH₂- Ketten der Lipide.
5. Daher stellen die Ionenkanäle leitfähige Membranflächen dar, deren Größe durch das (nicht leitfähige und daher umgebende) Gitter der Lipidketten determiniert sind.
6. Da CH₂ und H₂O sterisch verwandt sind, ermöglichen durch das umgebende Gitter determinierte Flächen die Permeation von H₂O und damit eine hohe Ionenbeweglichkeit.
7. Mikroskopische Leerstellen-Defekte ermöglichen so diskrete Werte des makroskopischen Membranstroms.

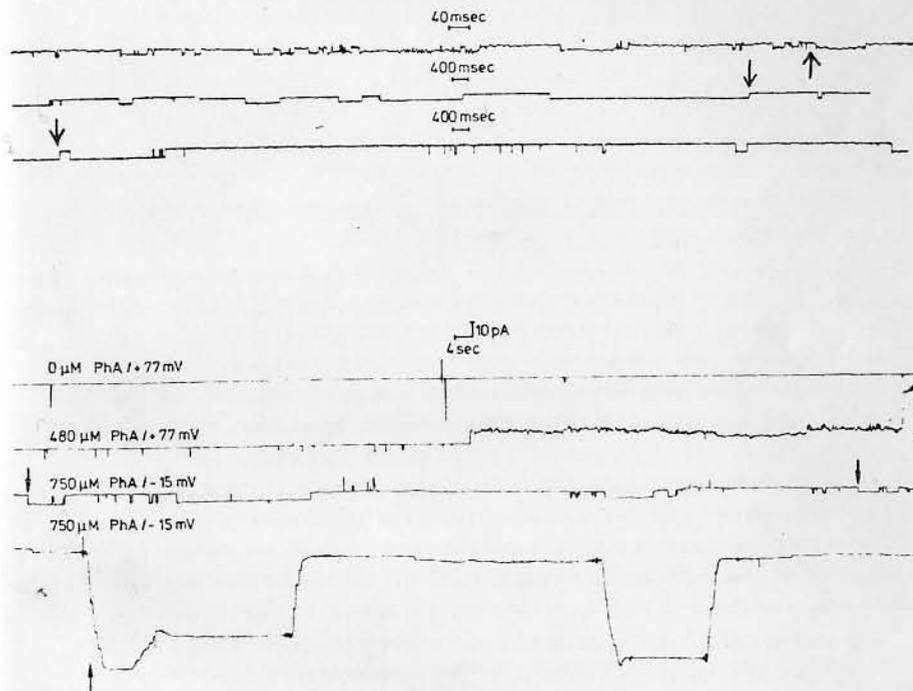


Abb.11. Substrat-spezifische Induktion von Ionenkanälen durch Acetylcholinesterase (AChase).

Titriert man eine Sojabohnen-Lecithin-Membran in 1 M KCl, 2 mM Tris Puffer (pH 7.4) nach Einbau von AChase wie in Abb.4 angegeben, so lassen sich oberhalb einer gewissen Schwelle substrat-induzierte Ionenkanäle auslösen. Hier wurde als Substrat der neutrale Ester Phenylacetat verwendet. Oberhalb 480 μ M PhA (entspricht 960 μ M durch Hydrolyse erzeugten Protonen, über das Lösungsvolumen gemittelt) lassen sich Stromsprünge von der ursprünglich sehr niedrigen zu hoher Membranleitfähigkeit erkennen (\uparrow zeigt 50 pA/V-Ionenkanäle). Die folgende Meßspur bei 750 μ M PhA/-15 mV zeigt den Übergang von einem stationären 400 pA/V (\downarrow) zu einem 200 pA/V (\downarrow) Zustand der Membran. Später ließen sich 1000 pA/V-Kanäle beobachten (\uparrow). Die hohe Leitfähigkeit wurde ebenfalls (vgl. Abb.5,6) durch weiteres Ansäuern unterdrückt (nicht gezeigt). Zur Induktion der Ionenkanäle durch das natürliche Substrat Acetylcholin vgl.³²

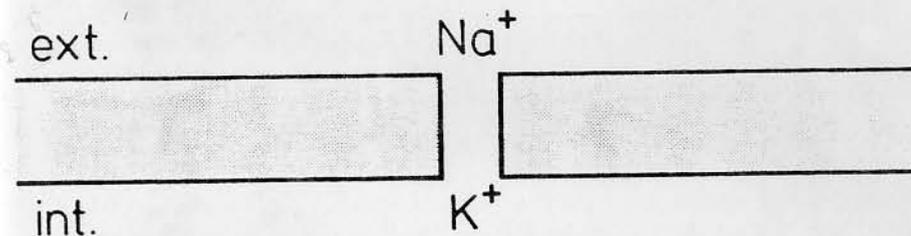


Abb.12. Ionen-spezifischer Transport durch unspezifische Kanäle.

Selbst völlig unspezifische elektrochemische Diffusion durch Ionenkanäle (vgl. Abb.10) führt dann zu ionen-spezifischem und richtungs-spezifischem Transport, wenn über der Membran in der lokalen Umgebung des Kanals entsprechende Gradienten anliegen. Im angezeichneten Falle ist Na^+ -Influx und K^+ -Efflux zu erwarten, obwohl der Kanal Na^+ und K^+ nicht unterscheidet.

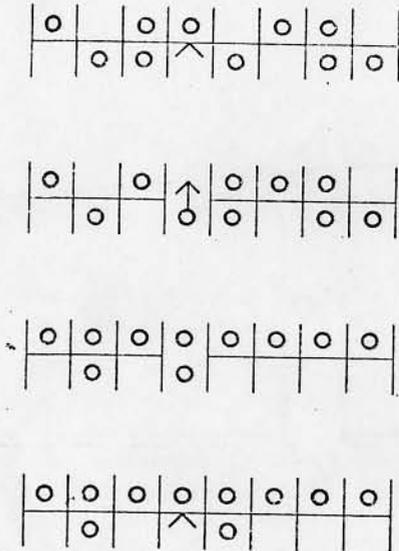


Abb.13. Gefängnistor-Analogie zum aktiven Transport.

Öffnet ein "Gefängnistor" \wedge dann und nur dann, wenn "vor" dem Tor jemand erscheint, so füllt sich das Gefängnis durch rein passive Diffusion. Der stationäre Zustand ist erreicht, wenn die Wahrscheinlichkeit 1 ist, "hinter" dem Tor jemand anzutreffen.

Öffnet die Lipid-Doppelschicht Ionenkanäle dann und nur dann, wenn eine asymmetrisch "vor" der Membran lokalisierte Hydrolase hinreichend Protonen erzeugt, um den leitfähigen pH-Bereich lokal zu erreichen, so füllt sich das Volumen "hinter" der Membran durch rein passive elektrochemische Diffusion. Der stationäre Zustand ist bei lokalem Gleichgewicht im Bereich der leitfähigen Membran erreicht, das heißt, wenn hinter der Membran global die der lokalen Umgebung des Enzyms vor der Membran entsprechenden Bedingungen herrschen. Global erscheint ein solcher passiver Transport

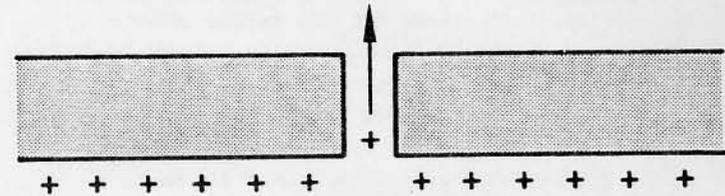


Abb.14. Aktiver Protonentransport durch asymmetrische Hydrolyse.

Wird der leitfähige Oberflächen-pH-Bereich einer Lipiddoppelschicht asymmetrisch (vgl. Abb.4,7) durch einseitig membran-gebundene Hydrolasen erreicht, so sieht ein induzierter Ionenkanal in global neutralem Milieu einen lokalen Protonengradienten. Die elektrochemische Diffusion erreicht einen stationären Zustand, wenn sich die globale Protonenkonzentration der nicht-enzymatischen Seite dem kritischen pH-Bereich nähert. Die enzymatisch aktive Seite wird dann elektrostatisch negativ aufgeladen. Die Protonierungs-Asymmetrie der Lipid-Membran vermag auch andere monovalente Kationen zur nicht-enzymatischen Seite zu transportieren, zum Beispiel das zur Aktivierung der $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase erforderliche Na^+ aus dem Zellinnern. Das so aufgebaute Membranpotential könnte a posteriori durchaus zu einem K^+ -Transport ins Zellinnere führen. Alle diese Prozesse folgen passiv der lokalen elektrochemischen Diffusion. Bei Vergleich mit den globalen, experimentell beobachtbaren Gradienten erscheinen sie aber vektoriell, ggf. aktiv, und an den Stoffwechsel gekoppelt.

Nachbemerkungen

Proteine sind, wie in der vorangegangenen Abhandlung gezeigt, weder notwendig, um Doppelschichtmembranen zu bilden, noch, um Ionentransport durch diese Membranen auszulösen. Die in den biologischen Membranen enthaltene Lipidkomponente (Abschnitt (1.1.) scheint, den in vitro gewonnenen Einsichten zufolge (1.2.), im Bereich einer Protonierungsumwandlung (2.2.) oder anderer Störungen ihrer Ordnung (2.3.) per se die beobachteten Ionenkanäle auszubilden. Darüber hinaus bieten die bei solchen Störungen erwarteten Defekte des Lipidgitters (1.2.) hinreichende Vielfalt, um ohne weitere Annahmen die Mannigfaltigkeit der beobachteten Leitfähigkeitsstufen zu erwarten. Wieso sollten also biologische Membranen nicht ganz auf Proteine verzichten können?

In der Tat bietet die Lipid-Doppelschichtmembran aufgrund der multiplen Induzierbarkeit der Ordnungsfluktuationen (2.3.) bereits eine ganze Reihe interessanter Funktionen an.

Zunächst ist die Notwendigkeit einer Ordnungsumwandlung (2.) der Lipide schon hinreichend, äußere Störungen ("Reize") zu klassifizieren in

- unterschwellige,
- erregende, und
- desensibilisierende,

je nachdem, ob die Störung den kritischen Bereich der thermodynamischen Variablen der Lipidmembran

- noch nicht erreicht,
- erreicht, oder
- überschritten hat.

Es braucht nicht betont zu werden, daß eine derartige Klassifizierung in der Membranphysiologie bis hin zur Psychophysik allgemeine Verwendung findet und seit langem zur Forderung nach einer "Konformationsänderung" von Membrankomponenten geführt hat.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen aber die Möglichkeiten der multiplen Induktion (2.3.) der Leitfähigkeit durch alle thermodynamischen Variablen, welche die freie Enthalpie hinreichend beeinflussen und in einen kritischen Bereich führen können. Heterogene Lipidmembranen sind somit auch in Abwesenheit von Proteinen grundsätzlich in der Lage, folgende biologische Funktionen wahrzunehmen:

1. Stationäre Erhöhung der Membranleitfähigkeit nach Ansäuern bis zum Bereich der Protonierungsumwandlung; wir denken etwa an die primäre Nahrungsaufnahme in den dem Magen folgenden Verdauungstrakten;
2. Erhöhung der Leitfähigkeit der Zellmembran durch Änderungen osmotischer Partialdrucke allgemeinerer Art; wir denken hierbei auch an resultierende Formveränderungen wie die der Amöbe;
3. Erhöhung der Leitfähigkeit durch unmittelbare Störung des Oberflächendrucks der beiden Schichten der Lipidmembran; als möglich Anwendung nennen wir die mechanische Induktion der Ionenleitung durch die Härchen der Rezeptor-Zelle des inneren Ohrs;
4. besonders reizvoll erscheint aber die analoge Induktion leitfähiger Kanäle durch die elektrostatische Spannung über der Membran, welche vermittels des induzierten Protonierungsgradienten den Oberflächendruck in den beiden Monoschichten stört. Wir haben beobachtet, daß die angelegte Spannung die pH-Schwelle der Ionenkanäle beeinflusst, wie dies auch thermodynamisch (2.3.) zu erwarten ist; und es ist längst bekannt, daß hinreichend hohe elektrostatische Spannung selbst bei neutralem pH_{∞} Ionenkanäle vornehmlich sehr kurzer Dauer (10^{-3} sec) induziert.

Die verblüffende Ähnlichkeit dieser Strompulse durch reine Lipidmembranen mit denjenigen der Nervenmembranen (dem Rauschen, den Miniaturpotentialen, und den Aktionspotentialen, vgl. Abb. 5) ist kurioserweise in den vielen Publikationen zur Rekonstitution biologischer Membranfunktionen kaum notiert worden.

Trotz dieser bemerkenswerten Phänomenologie reiner Lipid-doppelschichten können jedoch ohne Proteine nur vergleichsweise niedrige Membranfunktionen realisiert werden. Dies folgt bereits aus der hier notwendigen "globalen" Induktion der thermodynamischen Umwandlung. Dadurch gerät zwangsläufig ein makroskopischer Membranbereich in einen Zustand extremerer und mikroskopisch statistischer, also unkontrollierbarer, Fluktuationen der Ordnung. Den resultierenden Leitfähigkeitsänderungen fehlt also eine "lokale" Kontrolle, wie dies für höhere Funktionen, etwa im Verlauf der Nervenerregung, charakteristisch ist.

Zwar erlaubt die elektrische Membranspannung durchaus eine direkte Kontrolle des Oberflächen-



innerhalb der mikroskopisch dicken Grenzschicht (Abb. 9), doch erstreckt sich die Membran in den beiden anderen, nicht kontrollierten Dimensionen makroskopisch. (Von den bisher genannten Beispielen bietet nur die Härchenzelle eine hinreichend "lokale" Kontrolle; und bereits diese einfachst denkbare lokale Kontrolle des Oberflächendrucks der Membranschichten geschieht durch ein Protein: das härchenbildende Aktin).

"Lokale" Kontrolle erfordert allgemein in zumindest zwei der drei Dimensionen begrenzte Gebilde, welche den Zustand der Lipide stören können. Da der "Zustand" eine dann zwar lokale, aber nach wie vor makroskopische Lipideigenschaft im Sinne Prigogine's darstellt, muß die Störung eine makroskopische Anzahl von Lipidmolekülen (z.B. 10^2 und mehr) kontrollieren. Daraus resultiert aber, daß dieses lokal begrenzte Gebilde die Ausdehnung eines Makromoleküls besitzt.

Die Notwendigkeit der Membranproteine folgt also eigentlich bereits aus der Forderung der lokalen Zustandsstörung; denn Makromoleküle bieten die Kohlenstoffchemie nur in Form zweierlei Polymerer an: der Kohlenwasserstoffketten und der Polypeptide. Erstere erscheinen aufgrund ihrer Ähnlichkeiten mit

den Kohlenwasserstoffketten der Lipide für eine Membranstörung weniger geeignet. Letztere aber konstituieren die Primärstruktur der Proteine.

Zwingend folgt die Notwendigkeit der Membranproteine andererseits aus der vielseitigen "Spezifität" der Transportprozesse (siehe Abschnitt 1.3., Argumente A.4.-7.). So sind die höheren Membranfunktionen überhaupt erst dadurch möglich, daß gewisse Substanzen in die Zelle gelangen, andere aber nicht, so daß ein stationärer Zustand des die Membran umgebenden Milieus weg vom thermischen Gleichgewicht entsteht. Dies aber ist Voraussetzung, soll das System schwache Reize, die nur vernachlässigbare Arbeit verrichten, verstärken. (Das eindrucksvollste Beispiel ist hier wohl die auf ein oder wenig $h\nu$ Photonenenergie makroskopisch antwortende Photo-Rezeptor-Zelle).

Solch a posteriori, d.h. nach vollzogenem Membrantransport, beobachtete Spezifität muß aber keineswegs, wie zumeist angenommen, auf a priori spezifischen Ionenkanälen beruhen. Denken wir uns völlig unspezifische "Löcher" in der Membran, welche für alle Art Substanzen durchlässig sind. Natürlich können nur solche Substanzen durch diese Löcher transportiert werden, welche sich während der Öffnung dieser Löcher auch tatsächlich zu beiden Seiten der Membran, sozusagen vor den Löchern, befinden. Spezifische Bedingungen der Induktion, sofern sie die Oberflächenkonzentrationen betreffen, prägen sich daher zwangsläufig der phänomenologischen Spezifität des Ionentransports durch, gegebenenfalls unspezifische, Ionenkanäle auf.

Die Spezifität beruht in diesem Sinne nicht auf den Eigenschaften der Kanäle, sondern den Bedingungen der Induktion derselben.

Dies ist der zentrale Gesichtspunkt dieses Kapitels³. Er soll den Widerspruch auflösen, daß Ionenkanäle in vitro vergleichsweise unspezifisch sind, in vivo dagegen spezifisch zu sein scheinen. Vom Gesichtspunkt der Evolution, etwa in der Ontogenese der Zellsysteme, erscheint dabei besonders interessant, daß eine Zelle nur diejenigen sie unmittelbar umgebenden

Substanzen aufnimmt, welche den Membranzustand a posteriori im leitfähigen Zustandbereich halten. Es wird sozusagen nur dauerhaft aufgenommen, was anregend ist. Die Zellmembran wird nur in dem Bereich leitfähig, und sich nur in der Richtung hin durch Substanzaufnahme (z.B. von Wasser) vergrößern können, in welcher die Umgebung erregende Reize (z.B. den kritischen pH-Bereich) bietet.

Synaptogenese im Nervensystem aufgrund multipler und insbesondere aufgrund von pH-Reizen der Umgebung ist zwar noch spekulativ, doch physikalisch durchaus begründbar. Für gesichert halten wir aufgrund der außerordentlich schnellen Hydrolyse des sogenannten Transmitters an cholinergen Synapsen, welche in der Tat eine materielle Übertragung des Acetylcholins kinetisch ausschließt, daß die Nervenerregung durch die erzeugten Protonen zur nächsten Zelle übertragen wird. Die an der Außenseite der Zellmembranen lokalisierte Acetylcholinesterase, sowie das kleine Volumen des synaptischen Spaltes, in welchem hinreichend Acetylcholin hydrolysiert wird, um den mittleren pH in den kritischen Bereich zu bringen, erzwingen nach unserer Auffassung eine postsynaptische Protoneninduktion von Ionenkanälen nach präsynaptischer Stimulation.

Die multiple Induktion ermöglicht allgemein eine vielfältige Anpaßbarkeit der Kommunikation und Evolution von Zellsystemen. Wäre das System dagegen allein auf Induktion durch spezifische Rezeptoren angewiesen, wäre es in einer sich ändernden Umwelt gegenüber der Lipidmembran wohl im Darwinschen Sinne unterlegen.

Zusammenfassend erscheinen uns die Lipide als Membranbildner sowie, in einem kritischen Bereich der thermodynamischen Variablen, zugleich als Kanalbildner durch die Membran. Die Protonenspezifität (Abb. 9) der Oberfläche läßt eine Protonenspezifität des Ionentransports auch dann erwarten, wenn der leitfähige Ionenkanal-Defekt (Abb. 10) selbst keine wesentliche Spezifität der Ionenbeweglichkeit aufweist.

Die Proteine dienen nach unserer Auffassung

1. zur lokalen Kontrolle der Bedingungen der Leitfähigkeit, etwa durch enzymatische Kontrolle des Oberflächen-pH₀;
2. Spezifitäten des Ionentransports, welche von Lipiden allein nicht geleistet werden können, insbesondere (vgl. 1.3.)
 - die Induktion der Leitfähigkeit durch spezifische Erregersubstanzen, beispielsweise sogenannte Neurotransmitter wie das Acetylcholin (Abschnitt 3.1.);
 - die Induktion der (unspezifischen) Leitfähigkeit bei Anwesenheit spezifischer Ionen, beispielsweise des Na⁺ und des K⁺ (Abschnitt 3.2.);
 - die Induktion der (passiven) Leitfähigkeit in Anwesenheit spezifischer (aktiver) Ionengradienten über der Membran (Abschnitt 3.3.).

Die Spezifität protein-induzierten Ionentransports diskutieren wir in Kap. 3. für verschiedene membrangebundene Hydrolasen; von den multiplen Induktionsmöglichkeiten beschränken wir uns also auf die durch Spaltung von H₂O erzeugten Protonen.

Nicht in diese Kategorie fallen insbesondere Antibiotika wie die kleineren Polypeptide Gramicidin, Alamethicin, und andere, welche ebenfalls Ionenkanäle in Lipidmembranen induzieren können, aber offenbar keine hydrolytische Wirkung haben. Bisher wurde als gesichert angesehen, daß die induzierten, charakteristischen Leitfähigkeitsstufen auf Poren innerhalb der Polypeptide oder Polypeptid-Komplexe beruhen müssen. Da nun aber bereits Lipidmembranen solche Leitfähigkeitsstufen einnehmen können (Abb. 5), ist unsere Interpretation der genannten Ionenkanäle als Eigenschaft der Lipid-Doppelschicht experimentell belegt. Dagegen rückt die Hypothese eines zweiten, von den beobachteten Lipid-Kanalstufen nicht unterscheidbaren, Ionenkanals durch Peptidstrukturen hindurch, welche in die Lipiddoppelschicht eingebettet sind, in den Bereich nicht nachprüfbarer und daher inhaltsleerer Aussagen.

Wir interpretieren diese polypeptid-induzierten Ionenkanäle als Konsequenzen definierter lokaler Kontrolle des Oberflächen-drucks der Lipidmembran im Verlauf gewisser Konformations-änderungen dieser Polypeptide in lipophiler Umgebung. Die Konformationsänderung dient also der Störung der Lipidordnung mit der Konsequenz leitfähiger Ionenkanäle durch die Lipid-Doppelschicht. Wir können aber nur die tatsächliche Möglichkeit dieser Interpretation belegen (Abschnitt 2.3.).

Die sogenannte "Dimerisierung" des "Gramicidin-Kanals", in realiter die quadratische Abhängigkeit der Kanal-Häufigkeit von der Gramicidin-Konzentration, resultiert vielleicht von der "Doppel"-Schichtmembran, welche eine Störung beider Monoschichten erfordert; im Falle statistischer Unabhängigkeit ergäbe sich dann ja ebenfalls ein quadratisches Gesetz.

Die genannten Polypeptide kommen in vivo kaum vor. Dagegen sind härchenförmige Proteinstrukturen, wie des erwähnten Aktins, welche ebenfalls den Oberflächendruck der beiden Monoschichten direkt beeinflussen, im Bereich somatosensorischer Rezeptor-Zellen des Tastsinns (besonders eindrucksvoll die Schnurrhaare der Maus), des Gleichgewichtsorgans (etwa seines Vorläufers, des Seitenlinienorgans der Fische), sowie des inneren Ohres (Rezeptor-Zelle für akustische

Signale) ubiquitär. Offensichtlich erlaubt hier die eindimensionale Ausdehnung senkrecht zur Membranebene, in kontrollierter Weise äußere Reize (Druckgradienten) hinreichend (unter Hebelwirkung) auf die Lipiddoppelschicht zu übertragen.

Die Möglichkeiten der multiplen Induktion implizieren also allerlei Art von "Rezeptoren". In solchen Fällen, in denen tatsächlich nur eine einzige thermodynamische Variable (z.B. Druck, oder pH_0 , oder elektrische Membranspannung, oder Acetylcholin, oder die Photonendichte) zur Induktion des leitfähigen Zustandsbereiches eingesetzt wird, erscheinen dann diese Rezeptoren "spezifisch": Druck-Rezeptoren, Protonen-Rezeptoren, spannungs-induzierte Kanäle, Acetylcholin-Rezeptoren, etc. sind etablierte, nach unserer Ansicht aber irreführende

und nur scheinbar spezifische Prinzipien zur Beschreibung multipel induzierbarer, doch einheitlicher Prinzipien der Leitfähigkeit und Permeabilität der Lipidkomponente biologischer Membranen.

Wenden wir uns aber derjenigen Klasse von Proteinen zu, welche wir in nahezu jeder Zellmembran finden, welche nahezu jede transport-induzierende Erregersubstanz unter Erzeugung von Protonen spaltet, sei es beim aktiven Transport, induziert durch ATP (gespaltet durch ATPase), durch GTP (GTPase), oder durch Photonen (beeinflussen die ATPase-Aktivität), sei es beim passiven Transport nach Induktion durch Acetylcholin (gespaltet durch AChase);

die spezifischen Hydrolasen.

Protonen-Induktion spezifischer Transportvorgänge durch die Lipidkomponente biologischer Membranen erscheint nach unseren Ergebnissen dabei im kritischen Bereich unvermeidlich.

Es ist wohl die Rolle des Wassers für die Biologie, welche der enzymatischen Hydrolyse und damit den Protonen bei der Induktion der Transportprozesse eine so dominierende Stellung in den Lebensvorgängen einräumt.

Literaturverzeichnis

1. Danielli, J.F., and Davson, H.: *J.Cell.Comp.Physiol.* 5 (1935) 495.
2. Robertson, J.D.: *J.Biophys.Biochem.Cytol.* 3 (1957) 1043.
3. Singer, S.J., and Nicolson, G.L.: *Science* 175 (1972) 720.
4. Boheim, G., et al.: *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 78 (1981) 3586.
5. Müller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., and Wescot, W.C.: *Nature* 194 (1962) 979;
Montal, M., and Müller, P.: *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 69 (1972) 3561;
Schindler, H., and Rosenbusch, J.P.: *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 75 (1978) 3751.
6. Petrov, V.V., et al.: *Dokl.Acad.N.SSR* 239 (1978) 1245;
Antonov, V.F., et al.: *Nature* 283 (1980) 585.
7. Boheim, G., Hanke, W., and Eibl, H.: *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 77 (1980) 3403.
8. Kaufmann, K., and Silman, I.: to be published.
9. Kaufmann, K.: *Int.J.Quant.Chem.* 12 Suppl. 2 (1977) 169;
Kaufmann, K.: in "Molecular Mechanisms of Biological Recognition", Ed. M. Balaban, Elsevier/North Holland Biomedical Press 1979, p. 373.
10. Katz, B.: "Nerve, Muscle, and Synapse." McGraw-Hill, London 1966.
11. Haydon, D.A., and Hladky, S.B.: *Quart.Rev.Biophys.* 5 (1972) 187.
12. Katz, B., and Miledi, R.: *J.Physiol.(London)* 224 (1972) 665.
13. Neher, E., and Sakmann, B.: *Nature* 260 (1976) 799.
14. Sakmann, B., and Boheim, G.: *Nature* 282 (1979) 336.
15. Jain, M.K.: "The Bimolecular Lipid Membrane: A System." Van Nostrand Reinhold, New York 1972.
16. Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F.: *J.Physiol.(London)* 117 (1952) 500.
17. Nachmansohn, D.: "Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity." Academic Press, New York 1959.
18. Pauling, L.: "Chemie. Eine Einführung." Übers. F. Helfferich, Verlag Chemie, Weinheim 1956.
19. Mitchell, P.: *Nature* 191 (1961) 144.
20. Yafuso, M., Kennedy, S.J., and Freeman, A.R.: *J.Membr.Biol.* 17 (1974) 201.
21. Petrov, V.V., et al.: *Biofisika* 23 (1978) 61.
22. Kocherginskii, N.M., et al.: *Biofisika* 25 (1980) 846.
23. Papahadjopoulos, D.: *Biochim.Biophys.Acta* 163 (1968) 240.
24. Träuble, H., and Eibl, H.: *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 71 (1974) 214;
Träuble, H., in: "Structure of Biological Membranes", Eds. S. Abrahamsson and I. Pascher, Plenum Press, New York 1977, p. 509.
25. Eigen, M., and deMaeyer, L.: *Proc.Roy.Soc.(London)* A 247 (1958) 505.
26. Flory, P.: *Proc.Roy.Soc.(London)* A 234 (1956) 60.
27. Jacobson, K., and Papahadjopoulos, D.: *Biochemistry* 14 (1975) 153.
28. Landau, L.D., and Lifshitz, E.M.: "Statistical Physics", Course of Theoretical Physics, Vol.5, Pergamon Press, London 1958.
29. Dudai, Y., and Silman, I.: *Biochim.Biophys.Acta* 268 (1972) 138.
30. Kaufmann, K.: "Acetylcholinesterase und die physikalischen Grundlagen der Nervenerregung", Göttingen 1980, unveröffentlicht.
31. Kaufmann, K., and Silman, I.: *Neurochem.Int.* 2 (1980) 205.
32. Kaufmann, K., and Silman, I.: *Naturwissenschaften* 67 (1980) 608.
33. Silman, I., and Karlin, A.: *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 58 (1967) 1664.
34. Skou, J.C.: *Quart.Rev.Biophys.* 7 (1975) 401.
35. Kyte, J.: *Nature* 292 (1981) 201.
36. Kimelberg, H.K., and Papahadjopoulos, D.: *Biochim.Biophys. Acta* 282 (1972) 277.
37. Kaufmann, K.: to be published.
38. Maxwell, J.C.: "Theorie der Wärme", Übers. F. Neesen, Vieweg, Braunschweig 1878.
39. Wien, M., and Schiele, I.: *Phys.Z.* 32 (1931) 545.
40. Blumenthal, R., Caplan, S.R., and Kedem, O.: *Biophys.J.* 7 (1967) 735.
41. Hanke, W.: Dissertation, Ruhruniversität Bochum 1981.

Übersicht

Vorwort	2
1. Ionentransport durch Lipidmembranen	5
1.1. Untrennbarkeit von Lipiddoppelschicht und biologischer Membran	5
1.2. Direkte Evidenz für den Ionentransport durch Lipidmembranen	8
1.3. Indirekte Argumente gegen den Transport durch Lipidmembranen	10
2. Notwendigkeit einer Ordnungsumwandlung der Lipidmembran	12
2.1. Ionenkanäle an der thermischen Phasenumwandlung	13
2.2. Ionenkanäle an der Protonierungsumwandlung	16
2.3. Thermodynamische Kopplung von Protonierung und Phase	18
2.3.1. Protonierung als homogenes Funktionsprinzip	20
2.3.2. Makroskopische Theorie der Phasenumwandlung	23
2.3.3. Protonierungsumwandlung	28
3. Spezifität protein-induzierten Ionentransports	31
3.1. Substratspezifität	32
3.1.1. Substratspezifische Protonen-Induktion	32
3.1.2. Oberflächenkontrolle der Protonierung	34
3.2. Ionenspezifität	37
3.3. Asymmetrie	41
3.3.1. Maxwell's Dämon im aktiven Transport	43
3.3.2. Protonierungs-Asymmetrie	46
Zusammenfassung	49
Abbildungen	51
Nachbemerkungen	70
Literaturverzeichnis	78
Übersicht	80