

Aus dem Institut für Medizinische Physik und Biophysik
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Komm. Direktor: Prof. J. Holtz)

**Membrannahe Konzentrationspolarisation als Indikator für den
osmotisch getriebenen Volumenfluss**

Habilitation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med. habil.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Dr. med. Peter Pohl
geboren am 20. August 1965 in Kayna (Krs. Zeitz)

Verteidigung: 19.12.2000
Probvorlesung: 06.02.2001
Beschlußdatum: 06.02.2001

Gutachter: Herr Prof. Dr. K. Arnold, Leipzig
Herr Prof. Dr. A. Blume, Halle
Herr Prof. Dr. U. Seydel, Borstel

Kurzreferat

Der osmotische Wasserfluss führt aufgrund des Elektrolytrückhalts zur Änderung der Elektrolytkonzentration in der unmittelbaren Membrannähe. Die experimentell registrierte Elektrolytanreicherung bzw. -verarmung an der hypotonischen bzw. hypertonischen Phasengrenze konnte mit einem neuen, hydrodynamischen Modell beschrieben werden. Letzteres berücksichtigt, dass die Konvektionsgeschwindigkeit mit zunehmender Entfernung von der Membranoberfläche allmählich und kontinuierlich ansteigt. Bisher wurde die Konzentrationspolarisation als Superposition des osmotisch initiierten Substratflusses und der Rückdiffusion in einer stationären Flüssigkeitsschicht beschrieben. Diese Nernstsche Filmtheorie zeigte erhebliche Diskrepanzen zur tatsächlichen Konzentrationsverteilung, die mit ionensensitiven Mikroelektroden in der Nähe einer Bilipidmembran erfasst wurde. Das vorgeschlagene hydrodynamische Modell erlaubt, den osmotischen Volumenfluss und auch die hydraulische Membranpermeabilität aus der membrannahen Ionenkonzentrationsverteilung zu berechnen. Die Auswirkungen der Konvektionslimitierung an der Phasengrenze bedürfen somit keiner Korrektur mehr, vielmehr wird die Konzentrationspolarisation selbst zur Messgröße. Neben einer quantitativ exakten Untersuchung des Wasserflusses durch die Bilipidmembran selbst ermöglichte dieser methodische Ansatz die Demonstration einer lectininduzierten Membrandehydratation, die Erfassung des Volumenflusses durch Wasserproteinkanäle (Aquaporin 1 und Aquaporin Z) und die Registrierung gekoppelter Ionen- und Wasserflüsse durch membranüberspannende Peptidkanäle (Gramicidin und Desformylgramicidin). Am Beispiel der Peptidkanäle gelang die Quantifizierung des Anteils an transportierten Ionen, die allein aufgrund ihrer Trägheit mit dem Wasserfluss mitgeführt wurden, d. h. der Nachweis des Solvent drag.

Pohl, Peter: Membrannahe Konzentrationspolarisation als Indikator für den osmotisch getriebenen Volumenfluss. Halle, Univ., Med. Fak., Habilitation, 149 Seiten, 2000

Inhalt

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Überblick	4
2.1	Mechanismen des Membrantransports von Wasser	4
2.2	Wasserdiffusion durch die Lipiddoppelschicht	5
2.2.1	Computersimulationen	5
2.2.2	Osmotische und diffusive Wasserpermeabilitäten	7
2.2.3	Wasserleitfähigkeit als Funktion der Membranbeschaffenheit	8
2.2.4	Wechselwirkung von Lipiden und Lectinen der Ricinfamilie	9
2.3	Wassertransport durch Kanäle	11
2.4	Bedeutung membrannaher ungerührter Schichten	13
2.5	Kopplung von Wasser- und Ionenfluss	16
2.5.1	Kinetische und diffusive Anteile des Ionenflusses	16
2.5.2	Modellkanäle: Gramicidin und Desformylgramicidin	18
2.5.3	Aquaporine	20
3	Theorie	23
3.1	Definition der ungerührten Schicht	23
3.2	Nernstsches Filmmodell	23
3.3	Staupunktströmung	26
3.4	Rotierende Scheibe	27
3.5	Ausdehnung der ungerührten Schicht	29
3.6	Hydrodynamisches Modell der ungerührten Schicht	30
3.7	Wasserfluss durch eine membranüberspannende Pore	31
3.8	Mitnahmeeffekt des Wassers: Solvent drag	32
3.9	Zusammenfassung	35
4	Materialien und Methoden	37
4.1	Lipide	37
4.2	Pufferlösungen	37

4.3	Proteine	37
4.4	Peptide	38
4.5	Liposomen	38
4.6	Proteoliposomen	38
4.7	Ebene Membranen	39
4.7.1	Lösungsmittelhaltige Membranen	39
4.7.2	Lösungsmittelfreie Membranen	40
4.8	Proteinrekonstruktion durch Fusion	41
4.9	Osmose	41
4.10	Erleichterter Ionentransport durch Carrier	42
4.11	Mikroelektroden	42
4.12	Messung von Konzentrationsprofilen	43
4.13	Membrankapazität	44
4.14	Elektrische Leitfähigkeit	44
4.15	Messung der elektrischen Einzelkanalleitfähigkeit	45
4.16	Lokale Dielektrizitätskonstante	46
5	Resultate	47
5.1	Osmotischer Fluss durch eine unmodifizierte Bilipidmembran	47
5.2	Lectininduzierte Änderung von Wasserpermeabilität und Oberflächenhydrophobizität einer Membran	54
5.3	Substratspezifische Grenzschichtdicke	64
5.4	Volumenfluss durch Gramicidinkanäle	69
5.5	Wasserselektivität von Desformylgramicidin	78
5.5.1	Permeabilität für Protonen	80
5.5.2	Leitfähigkeit für Kationen	82
5.5.3	Hydraulische Leitfähigkeit	84
5.5.4	Die Länge des Desfomylkanals	86
5.6	Wasserfluss durch rekonstruierte Aquaporine	88
6	Diskussion	95
6.1	Konzentrationspolarisation in der ungerührten Schicht	95

6.1.1	Berechnung von P_f aus der Nernstschen Filmtheorie	96
6.1.2	Berechnung von P_f aus dem hydrodynamischen Modell	98
6.1.3	Polarisation als Funktion des Diffusionskoeffizienten	100
6.1.4	Vergleich des Nernstschen und hydrodynamischen Modells	102
6.2	Membrandehydratation infolge von Lectin-Lipid-Wechselwirkungen	104
6.3	Solvent drag	109
6.5	Wasserselektivität der Peptidkanäle	112
6.6	Wasser- und Ionenleitfähigkeit der Aquaporine	114
7	Schlussfolgerungen und Ausblick	117
8	Zusammenfassung	119
9	Literatur	122
10	Danksagung	148
11	Tabellarischer Lebenslauf	149

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

BLM	Ebene Bilipidmembran
DPE	Dansylphosphatidylethanolamin
DPhPC	Diphytanoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPC	Phosphatidylcholin vom Ei
ER	Endoplasmatisches Retikulum
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS-Na	Natriumsalz der 3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MLI	Mistletoe lectin I
MLIII	Mistletoe lectin III
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PTFE	Polytetrafluorethylen
PS	Phosphatidylserin
RCA60	Ricin
RCA120	Ricinus communis agglutinin
RTA	A Kette von Ricin
RTB	B Kette von Ricin
RIP	Ribosomen inaktivierendes Protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USL	Ungerührte Schicht
VBL	Viskose Grenzschicht

A	Membranfläche
a	Maß für die Konvektionsgeschwindigkeit
a_2	Maß für die Konvektionsgeschwindigkeit (proportional zu a)
b	Fläche eines Lipidmoleküls
c	Konzentration einer impermeablen gelösten Substanz (ortsabhängig)
c_b	c in der wässrigen Hauptphase
c_s	c an der Membranoberfläche
c_p	Konzentration des permeablen Kations
$c_{p,s}$	c_s an der Membranoberfläche
$c_{p,b}$	c_s in der wässrigen Hauptphase
Dc^{max}	Differenz zwischen c_s und c_b
D_w	Diffusionskoeffizient des Wassers im Kanal
d	Membrandicke
G	Membranleitfähigkeit
g	Leitfähigkeit eines Einzelkanals
I	Stromdichte
J	Dichte des transmembranen Kationenflusses
J_w	Wasserfluss
J_v	Geschwindigkeit des Volumenflusses (Wasser- und Ionenfluss)
L	Kanallänge
N	Anzahl der Wassermoleküle im Kanal
N_A	Avogadro-Zahl
N_L	Anzahl der Lipidmoleküle in der Membran
n	Anzahl der Kanäle in der Membran ($n = G/g$)
P_f	Osmotische Membranpermeabilität
P_d	Diffusive Membranpermeabilität
P_d	Permeabilität der ungerührten Schicht
r	Molares Lipid/Proteinverhältnis
u	Geschwindigkeit der viskosen Strömung in y -Richtung
v_x	Geschwindigkeit der viskosen Strömung in x -Richtung
U	Geschwindigkeit der reibungsfreien Strömung in y -Richtung
v	Geschwindigkeit der osmotischen Volumenströmung in x -Richtung

VIII

v_l	Lipidkomponente der Geschwindigkeit des Wasserflusses
Dv	Kanalkomponente der Geschwindigkeit des Wasserflusses
V_w	molares Volumen von Wasser
W	Geschwindigkeit der reibungsfreien Strömung in z-Richtung
x	Entfernung zur Membran
y	Ortskoordinate parallel zur Membran
a	Proportionalitätsfaktor der v und J_v verbindet
d	Dicke der ungerührten Schicht
ϵ	Dielektrizitätskonstante im polaren Bereich der Bilipidmembran
I	Wellenlänge im Maximum des Emissionsspektrums von DPE
t	Reziproker Wert der Transportrate von Wasser
v_k	Kinematische Viskosität
ω	Winkelgeschwindigkeit der rotierenden Scheibe

1 Einleitung und Zielstellung

Der osmotisch getriebene Wassertransport ist von zentraler Bedeutung für das Leben einer Zelle. Deshalb verfügt letztere über eine Fülle regulativer Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Wasserbalance dienen. Signaltransduktionskaskaden ermöglichen beispielsweise die Adaptation der Zelle an einen veränderten osmotischen Druck [Brewster et. al, 1993; Droillard et. al, 2000]. Mechanosensitive Kanäle sorgen für eine Umwandlung des osmotischen Signals in ein elektrisches [Oliet und Bourque, 1993]. Ungeachtet ihrer fundamentalen Bedeutung sind die Mechanismen des Wassertransports durch biologische Membranen, Zellen und Epithelien nicht vollständig geklärt.

Widersprechenden Hypothesen zufolge passiert das Wasser die Lipiddoppelschicht entsprechend seiner Löslichkeit in Kohlenwasserstoffen [Paula et. al, 1996; Paula et. al, 1998] oder aber nutzt transiente Poren [Deamer und Bramhall, 1986; Jansen und Blume, 1995]. Auch nach einem Jahrhundert angestrengter Untersuchungen sind die Auffassungen über die Wege des epithelialen Wassertransport kontrovers [Spring, 1999]. Die allgemeine Lehrbuchmeinung ist, dass der Wassertransport von einem transepithelialen osmotischen Gradienten getrieben wird [Spring, 1998]. Alternativ wird eine molekulare Wasserpumpe beschrieben, die in einer Art Mikropinozytose Wasser notfalls auch gegen den osmotischen Gradienten transportiert. Materialisiert wird die Pumpe von Transportproteinen, z. B. vom Na^+ -Glukose-Cotransporter, die den Wasserfluss mit dem Transport anderer Substanzen koppeln [Loo et. al, 1999]. Kritiker dieser Theorie bezweifeln, dass die gemessenen Transportvolumina auf diesem Wege zu realisieren sind [Spring, 1999]. Insbesondere wird auf die besondere Rolle der Wasserkanalproteine (Aquaporine) verwiesen, die für 80 % der Permeabilität proximaler Nierentubuli verantwortlich sind [Schnermann et. al, 1998]. Letztlich ist aber auch der Wassertransport durch Aquaporine, d. h. Wasserkanalproteine, hinsichtlich eines Cotransports von Ionen umstritten. Berichte über eine Ionenpermeabilität [Yool et. al, 1996; Ehring et. al, 1990; Lee et. al, 1995; Weaver et. al, 1994] konnten von anderen Laboratorien nicht

bestätigt werden [Mulders et. al, 1995; Rivers et. al, 1997; Agre et. al, 1997; Sasaki et. al, 1997; Verkman und Yang, 1997; Deen et. al, 1997].

Zeitgleich durchgeführte Untersuchungen von Wasser- und Ionenflüssen könnten ganz wesentlich zur Lösung der oben genannten Widersprüche beitragen. Erschwert werden derartige Forschungen durch stationäre Wasserschichten, die sich der Membran größerer Untersuchungsobjekte unmittelbar anlagern. Der Volumenfluss durch Epithelien, ebene Bilipidmembranen, Oozyten und andere große Zellen ist häufig durch diese ungerührten Schichten und nicht durch die Membran selbst limitiert [Folkesson et. al, 1996; Verkman, 2000]. Experimentell erfassbar ist nicht die Permeabilität, die die Membran inklusive der darin befindliche Transporter für den Substratfluss aufweist, sondern die Summe der, durch eine Reihenschaltung aus Membran und den als Transportbarriere fungierenden ungerührten Schichten, resultierenden Permeabilitäten. Darüber hinaus ist bei Stofftransportvorgängen zu berücksichtigen, dass die Konzentration in dieser Grenzschicht ansteigt oder absinkt. Die Konzentrationspolarisation wiederum führt dazu, dass sich auch der osmotische Gradient und folglich der Volumenfluss verringern. Vorhersagen über die Größe dieser Effekte werden auf der Grundlage des Nernstschen Filmmodells [Nernst, 1904] gemacht, dass von einer perfekt gerührten wässrigen Phase ausgeht, die dann in Membrannähe von einer vollständig ruhenden Flüssigkeitsschicht abgelöst wird, durch die der Stofftransport ausschließlich durch Diffusion erfolgt [Barry und Diamond, 1984]. Theoretische Arbeiten belegen, dass das zu stark vereinfachende Filmmodell Transportvorgänge unzureichend wiedergibt [Levich, 1962; Pedley, 1980b; Pedley, 1981]. Es wird aber in Ermangelung einer besseren Approximation noch immer zur Interpretation von Transportstudien verwendet [Xiang und Anderson, 1993; Levitt et. al, 1996; Jensen et. al, 1997; Wang et. al, 1998].

Das Ziel dieser Arbeit ist daher, einerseits die Diskrepanzen zwischen herkömmlicher Theorie der ungerührten Schicht und der tatsächlichen Konzentrationspolarisation experimentell nachzuweisen und andererseits ein verbessertes Modell der Grenzschicht vorzuschlagen. Der Wert des neuen

hydrodynamischen Ansatzes wird dann an seiner Verwendbarkeit für die Lösung von vier bisher unbewältigten Aufgaben gemessen, die den transmembranen Wasserfluss bzw. seine Kopplung an einen Ionenfluss betreffen:

- 1) Die durch Solvent drag verursachte Teilchenmitführung ist quantitativ von der dem transmembranen Konzentrationsgefälle folgenden Teilchendiffusion zu trennen. Da ein osmotischer Fluss in der Regel beide Phänomene verursacht, d. h. Teilchen infolge ihrer Trägheit mitreißt und aufgrund des Teilchenrückhalts einen Konzentrationsgradienten induziert [Barry und Diamond, 1984], fehlte bisher eine überzeugende Lösung für dieses Problem [Finkelstein, 1987; Wilson et. al, 1997].
- 2) Der Nachweis der Elektroneutralität des Wasserflusses durch Wasserkanalproteine (Aquaporine) ist nach Rekonstruktion in ebene Bilipidmembranen zu führen. Eine eindeutige Klärung der Widersprüche aus Literaturdaten (siehe oben) ist nur herbeizuführen, wenn hochsensitive elektrische Messungen, die die Registrierung der Ionenleitfähigkeit einzelner Proteinmoleküle erlauben, simultan zur Erfassung der hydraulischen Membranleitfähigkeit durchgeführt werden.
- 3) Insofern die Famile der Gramicdinkanäle als Modell für die Erforschung des Single file-Transportmodus der Wasserkanalproteine anzusehen ist, ist zu dokumentieren, dass mit einer Derivatisierung von Gramicidin A eine Verbesserung seiner Wasserselektivität erreichbar ist.
- 4) Es ist zu zeigen, dass eine Protein - Lipid Wechselwirkung, die nicht zur Entstehung von elektrisch leitenden Defekten in der Membran führt, dennoch Einfluss auf die Wasserleitfähigkeit einer Membran nehmen kann. Ein Teil der im folgenden beschriebenen Ergebnisse ist bereits an anderer Stelle publiziert worden [Pohl et. al, 1997; Pohl et. al, 1998a; Pohl et. al, 1998b; Pohl und Saparov, 2000; Saparov et al, 2000]. Neue, bisher nicht veröffentlichte Ergebnisse betreffen die Rekonstruktion von Aquaporinen und Untersuchungen mit dem Modellpeptid Desformylgramicidin.

2 Überblick

2.1 Mechanismen des Membrantransports von Wasser

Der Transport von Wasser durch die Zellmembran ist von zentraler Bedeutung für viele Funktionen eines jeden Organismus. Deshalb wurde der transmembrane Wasserfluss in den letzten Jahren mit großem Aufwand untersucht [für Übersichtsartikel vgl. z.B. Haines, 1994; van Os et. al, 1994; Verkman et. al, 1996; Borgnia et. al, 1999a]. Wasser diffundiert zum einen passiv durch die Zellmembran und wird zum anderen durch sekundär aktiven Transport (Abb. 1) zusammen mit Ionen in das Zellinnere bzw. in der Gegenrichtung befördert [Zeuthen, 1995]. Zwei Arten passiver Wasser-permeabilität von Biomembranen werden beschrieben [Sansom et. al, 1996; Hill, 1995; Sansom, 1998], die von membranüberspannenden Poren vermittelte und die der Lipidmatrix selbst. Diffusion durch die Lipidschicht kann auf zwei voneinander unabhängigen unspezifischen Wegen erfolgen:

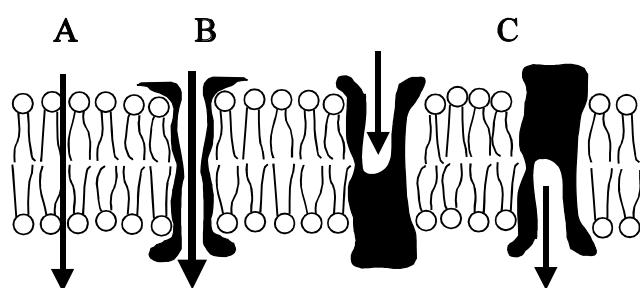


Abbildung 1 Mechanismen des Membrantransports von Wasser sind (A) die einfache Diffusion durch die Lipiddoppel-Schicht bzw. durch darin enthaltene transiente Defekte, (B) die erleichterte Diffusion durch Kanäle und (C) der proteinvermittelte Cotransport mit carrierspezifischen Substraten, z.B. mit Natrium und Glukose.

- 1) Wasser überquert die Lipiddoppelschicht dem einfachen Lösungsmodell folgend [Hanai und Haydon, 1966; Paula et. al, 1996]. Letzteres besagt, dass die Permeabilität einer Membran dem Koeffizienten, der die Verteilung der jeweiligen Substanz zwischen der Membran und der Lösungsphase beschreibt und dem Diffusionskoeffizienten proportional ist.
- 2) Es ist ebenfalls möglich, dass der Wassertransport durch transiente Defekte [Deamer und Bramhall, 1986; Jansen und Blume, 1995] erfolgt. Diskrepanzen zwischen der tatsächlich gemessenen Leitfähigkeit und der vom Lösungsmodell vorhergesagten können auch dadurch entstehen, dass die Bilipidmembran nicht wirklich homogen ist. Molekulardynamische Computersimulationen zeigen eine diskontinuierlichen Bewegung zwischen Vakanzen, die zwischen den Acyl-Ketten der Fettsäuren entstehen [Bassolino-Klimas et. al, 1993; Bassolino-Klimas et. al, 1995].

2.2 Wasserdiffusion durch die Lipiddoppelschicht

2.2.1 Computersimulationen

Hinsichtlich des Widerstandes, der der Diffusion kleiner Moleküle (z. B. Wasser) entgegengesetzt wird, haben Marrink und Berendsen [1996a; 1996b] die Lipiddoppelschicht in vier Regionen unterteilt (Abb. 2 und 3). Obwohl das Modell auf der Simulation einer aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) bestehenden Membran basiert, ist es generell für Lipiddoppelschichten im flüssigkristallinen Zustand anwendbar. Region 1 zeichnet sich durch eine beginnende Orientierung der Wassermoleküle aus, die durch die Gegenwart dipolarer Lipidkopfgruppen bedingt ist. Die Dichten von Lipid und Wasser sind miteinander vergleichbar. Dieses Gebiet ist wahrscheinlich die, für die Wechselwirkung mit anderen Membranen oder Proteinen, wichtigste Region der Membran. Region zwei umfasst eine ungefähr 0.8 nm breite Zwischenphase die durch eine dramatische Abnahme der Wasserdichte auf nahezu null gekennzeichnet ist. Sie weist die höchste Dichte im System auf. Sämtliche Kopfgruppenatome sind hier zu finden. Die Wassermoleküle in diesem Gebiet

sind Teil der Hydrathülle der Phospholipidkopfgruppen. Die Diffusionskoeffizienten von Wasser und anderen kleinen Molekülen sind in diesem Teil der Bilipidschicht am niedrigsten. Region drei verhält sich wie ein weiches Polymer. Sie erstreckt sich über ebenfalls 0.8 nm und wird durch eine hohe Dichte der Fettsäureketten und ein geringes freies Volumen charakterisiert. Sie beginnt mit den Karbonylgruppen, die vorwiegend für die Begrenzung des Wasser-eintritts verantwortlich sind. Diese Region ist das Haupthindernis für die Permeation kleiner Moleküle. Region vier, die Mitte der Doppelschicht, wird von einer niedrigen Dichte, die vergleichbar etwa mit der des Lösungsmittels Decan ist und einem hohen Anteil freien Volumens charakterisiert. Die Ordnungsparameter der fast vollkommen hydrophoben Phase streben gegen null.

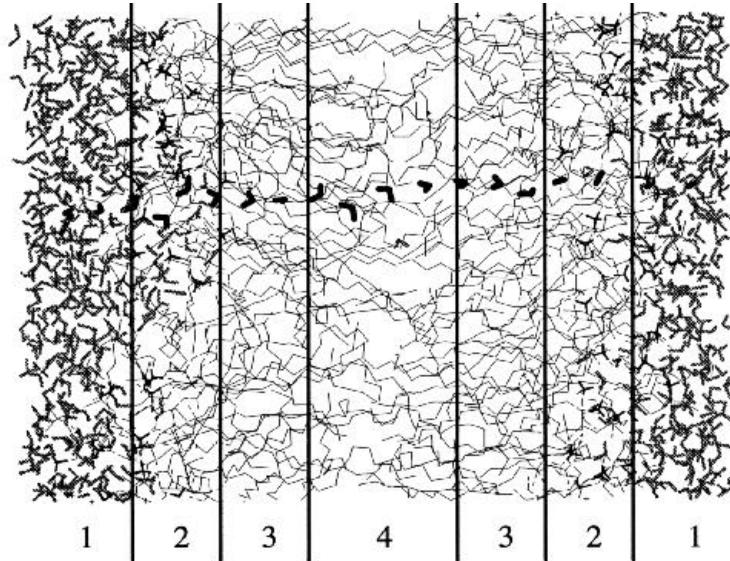


Abbildung 2 Momentaufnahme einer Kette von Wassermolekülen in einer DPPC-Bilipidschicht nach erfolgreicher Porenbildung. Die Moleküle in der Pore wurden mit fetten schwarzen Linien gezeichnet; die anderen Wassermoleküle mit dünneren Linien. Die vier Gebiete unterscheiden sich im Widerstand, den sie einer Wasserbewegung entgegensetzen (reproduziert aus [Marrink, et al., 1996]).

2.2.2 Osmotische und diffusive Wasserpermeabilitäten

Einen Hinweis auf den Weg, den das Wasser durch die Membran nimmt, liefert ein Vergleich der unter verschiedenen Bedingungen gemessenen Wasserpermeabilitäten. Letztere kann ermittelt werden, indem man den von einem osmotischen Druckgradienten induzierten Volumenfluss misst oder aber die dem Konzentrationsgradienten folgende transmembrane Diffusion eines Indikatormoleküls (z.B. THO - superschweres Wasser) unter den Bedingungen eines osmotischen Gleichgewichts erfassst. Die so bestimmten Permeabilitäten werden entsprechend mit P_f und P_d bezeichnet. Das Verhältnis P_f/P_d ist gleich eins, wenn die Diffusion dem Lösungsprinzip folgt. Sind transiente Poren [Jansen

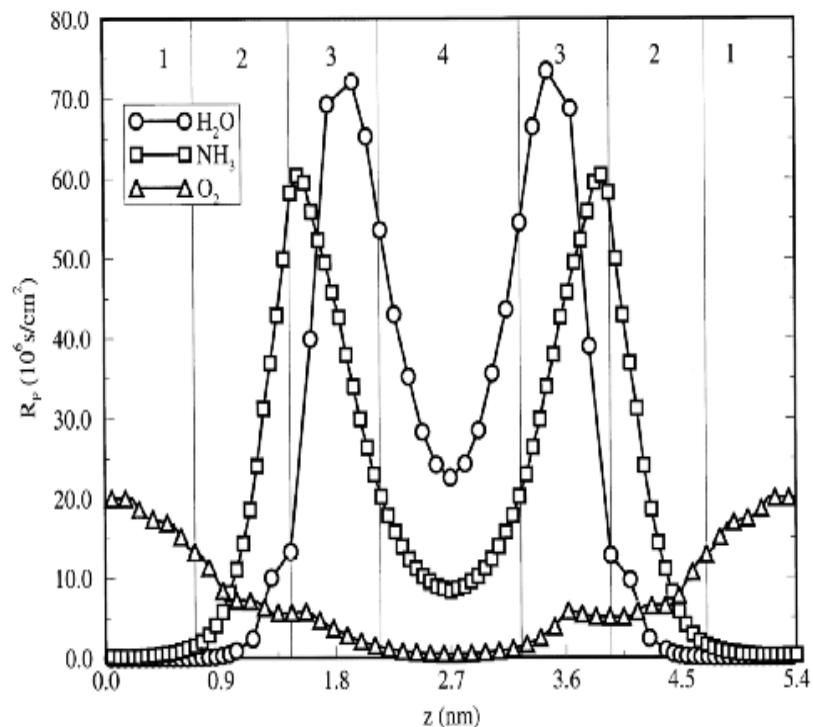


Abbildung 3 Lokaler Widerstand, der der Permeation von Wasser, Ammoniak und Sauerstoff in der Membran entgegengesetzt wird. Die Mitte der Wasserschicht befindet sich in Gebiet 1. Zum Zwecke der besseren Übersichtlichkeit wurden die Profile von Ammoniak und Sauerstoff um einen Faktor von 10 beziehungsweise 10^4 gestaucht (reproduziert aus [Marrink und Berendsen, 1996])

und Blume, 1995] oder fest in die Membran integrierte Peptid- oder Proteinkanäle vorhanden, wird der Quotient größer als eins [Schafer und Andreoli, 1987].

2.2.3 Wasserleitfähigkeit als Funktion der Membranbeschaffenheit

Die Wasserdiffusion durch die hydrophobe Membranbarriere hängt von der Membranfluidität [Lande et. al, 1995] und -struktur [Subczynski et. al, 1994] ab. Eine Senkung der Lipidpackungsdichte, bedingt beispielsweise durch eine Erhöhung des Anteils der Lipide mit ungesättigten Fettsäuren, lässt die Wasserpermeabilität der Membran anwachsen. Umgekehrt führt eine Erhöhung der Lipidpackungsdichte durch den Einbau von Phosphatidylethanolamin (PE), das Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, zu einer Senkung der hydraulischen Leitfähigkeit [Huster et. al, 1997]. Auch Cholesterin senkt Wasserpermeabilität [Finkelstein und Cass, 1967], selbst wenn die Verbindung in nur einer der beiden Lipidschichten enthalten ist [Negrete et. al, 1996]. Ursache ist die Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften der Membran [Needham et. al, 1988]. Nicht nur für Wasser sondern auch für andere kleine Moleküle gilt, dass ihre Penetration in eine Lipidmonoschicht von deren mechanischen Eigenschaften abhängt [Needham, 1995]. Generell ist eine Zunahme der Membrankompressibilität (d.h. eine Abnahme der Spannung) von einer tieferen Wasserpenetration in die Bilipidschicht und einer progressiven Zunahme ihrer Wasserpermeabilität begleitet [Bloom et. al, 1991].

Es ist anzunehmen, dass auch der Einbau eines Proteins in die Membran zu Defekten in der Membranstruktur und verbunden damit zur Erhöhung der Membrankompressibilität und Wasserpermeabilität (P_ρ) führt. Infolge der hydrophoben Bindung kleiner Peptide an die Lipiddoppelschicht wird diese von einer größeren Wassermenge durchdrungen, was sich in einer höheren Wasserpermeabilität niederschlägt [Jacobs und White, 1989]. Eine Verallgemeinerung dieser Beobachtung auf Protein-Lipid-Wechselwirkung ist nicht statthaft, wird doch der von einigen galaktosespezifischen Lectinen vermittelte

Schutz isolierter Thylakoide gegen Frostschäden wahrscheinlich durch eine Verringerung der hydraulischen Membranleitfähigkeit bewirkt [Hincha et. al, 1993]. Der für diese widersprüchlichen Beobachtungen verantwortliche Mechanismus ist unbekannt.

2.2.4 Wechselwirkung von Lipiden und Lectinen der Ricinfamilie

In molekulardynamischen Simulationen wird davon ausgegangen, dass die Phospholipidkopfgruppen von Wasser umgeben sind, das dann periodisch in das Gebiet der hydrophoben aliphatischen Ketten der Fettsäuren eintaucht [Haines und Liebovitch, 1995]. Anteile des membrannahen Wassers werden wahrscheinlich bei der Proteinadsorption von der Membranoberfläche verdrängt [Hoekstra und Wilschut, 1989]. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass der Teil der Membranoberfläche, der vom Protein bedeckt ist, eine deutlich geringere Wasserpermeabilität aufweist als nicht bedeckte Teil.

In der vorliegenden Arbeit wird dieses Problem anhand der Wechselwirkungen zwischen Bilipidmembranen und Lectinen der Ricinfamilie untersucht. Die potenzen Pflanzengifte (vgl. Tab. 1) Ricin (RCA60), Mistletoe Lectin I (MLI) und III (MLIII) sind Heterodimere. Die A-Kette besitzt N-Glykosidaseaktivität, die gegen die ribosomale RNA der 28S-Untereinheit gerichtet ist. Die an sie gebundene B-Kette ist ein galaktose- und/oder N-Acetyl-D-Galaktosamin-spezifisches Lectin [Lee et. al, 1994]. Der Bindung der B-Kette an Galaktose enthaltende Proteine, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, folgt die Endozytose des Toxins [Sandvig und van Deurs, 1994]. Die anschließende Translokation durch die Membran eines intrazellulären Kompartiments, die für den Eintritt in das Zytosol erforderlich ist, ist der am wenigsten erforschte Transportschritt im gesamten Zellintoxikationsprozess [Raso, 1994; Wellner et. al, 1995].

Viel spricht derzeit dafür, dass Zelleintritt und Migration der Toxine innerhalb der Zellen nicht toxinspezifisch sind, sondern dass sie den Weg zelleigener Moleküle nutzen [Barbieri et. al, 1993]. Es wird angenommen, dass

die Lectine von den Proteintransportern des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ins Zytosol transferiert werden, nachdem sie durch das trans Golgi Netzwerk in retrograder Richtung transportiert wurden [Sandvig und van Deurs, 1996]. Alternativ könnte auch eine Membrandestabilisierung, die infolge einer direkten Lipid-Protein-Wechselwirkung eintritt, einen Translokationsmechanismus darstellen [Utsumi et. al, 1989; Agapov et. al, 1997; Pohl et. al, 1998c].

Protein	Funktion	M_D (kDa)	Untereinhei- ten	Quellen
Ricin (RCA60)	Ribosomen-inaktivieren- des Protein	63	1 A-Kette 1 B-Kette	[Lord et. al, 1994]
Ricinus communis Agglutinin (RCA120)	Ribosomen-inaktiviren- des Protein	120	2 A-Ketten 2 B-Ketten	[Saltvedt, 1976]
Viscumin (MLI)	Ribosomen-inaktiviren- des Protein	120*	2 A-Ketten 2 B-Ketten	[Olsnes et. al, 1982]
Mistletoe lectin III (MLIII)	Ribosomen-inaktiviren- des Protein	60	1 A-Kette 1 B-Kette	[Eifler et al, 1994]
A Kette vom Ricin (RTA)	spaltet die N-glycosi- dische Bindung von Adenine ₄₃₂₄ in der 28S rRNA	30		[Endo und Tsurugi, 1987]
B Kette vom Ricin B (RTB)	bindet an endständige Galaktose- oder N- acetylgalaktosaminreste	33		[Sandvig und van Deurs, 1996]

Tabelle 1 Proteine der Ricinfamilie

* In konzentrierten Lösungen

Ein Vergleich der Wechselwirkungen verschiedener Lectine mit der Lipiddoppelschicht lässt auch Rückschlüsse auf mögliche Translokationsmechanismen zu, deren sich die Lectine bedienen, um die auf dem Weg ins Zytosol befindliche intrazelluläre Membranbarriere zu überwinden. Die Kenntnis dieses Transportschrittes ist für eine Verwendung der RIP zur Therapie von Tumoren

[Brinkmann und Pastan, 1994], Autoimmunkrankheiten [Raso, 1994] und der Abstoßungsreaktion von Transplantaten von entscheidender Bedeutung. Das Studium der Wechselwirkung von Lectinen mit Lipidmembranen ist auch deshalb von Interesse, weil der Einbau wasserlöslicher Proteine auch während der Membranbiosynthese und Sekretion stattfindet [Montich et. al, 1995; Ladokhin et. al, 1997].

Die Untersuchungen wurden mit Bilipidschichten verschiedener Zusammensetzung ausgeführt, weil zu erwarten war, dass Modifikationen der Lipid-Lipid-Wechselwirkung in der polaren Randzone einer Membran auch von Änderungen der Lipid-Protein-Wechselwirkungen begleitet sind [Gawrisch et. al, 1995]. In der hier vorliegenden Untersuchung wird dies für unspezifische nichtelektrostatische Wechselwirkungen zwischen RIP und Bilipidschicht gezeigt. Die Hypothese, dass nicht nur der Membraneintritt von Wasser [Huster et. al, 1997], sondern auch der von Proteinen mit der lockeren Packung mehrfach ungesättigter Lipide an der Lipid-Wasser-Grenzfläche korreliert, wird überprüft.

2.3 Wassertransport durch Kanäle

Zwischen dem Wassertransport entsprechend dem Lösungs-Diffusionsmodell und einem Fluss durch permanente membranüberspannende Poren (Abb. 4) kann experimentell mit Hilfe der Messungen von P_f und P_d unterschieden werden. Ist der Quotient aus beiden Parametern größer als eins, gibt er die Anzahl der Wassermoleküle, N , an, die der Kanal auf einmal aufnehmen kann, vorausgesetzt der Kanal ist so schmal, dass keines der Wassermoleküle ein vor ihm in der Reihe befindliches Molekül passieren kann (Abb. 5), d. h. dass der Transport nach dem sogenannten Single file-Prinzip abläuft [Levitt et. al, 1978b]. Bei einem Wert von eins geht man davon aus, dass das Wasser die Membran auf dem Wege der einfachen Diffusion durch die Lipiddoppelschicht passiert.

Aus der Kenntnis von N , das sich auch aus Strom- und Spannungsmessungen bestimmen lässt [Rosenberg und Finkelstein, 1978a], kann auf die Länge des schmalen Kanalabschnitts geschlossen werden. Für Gramicidinkanäle (Abb. 4) wurden beispielsweise fünf bis neun Wassermoleküle gemessen [Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Levitt, 1984]. Geklonte epitheliale **abg** Natriumkanäle brachten es nach der Rekonstruktion in ebene Bilipidmembranen auf zwei bis drei Wassermoleküle [Ismailov et. al, 1997] und für die Membran menschlicher Erythrozyten ließ sich ein Wert von sieben ermitteln [Terwilliger und Solomon, 1981; Brahm, 1982]. Aus diesem hohen Wert für das Verhältnis aus P_f und P_d wurde trotz der fehlenden elektrischen Leitfähigkeit auf das Vorhandensein von wasserleitenden Membrankanälen geschlossen. Erst ein

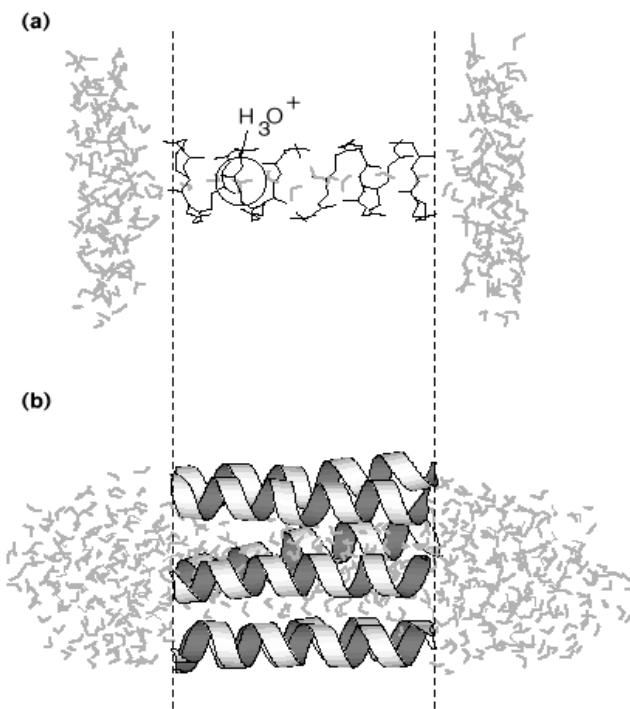


Abbildung 4 Zwei einfache Ionenkanäle: (a) Gramicidin und (b) Alamethicin (ein Bündel aus sechs Helices). In beiden Diagrammen sind die Wasser-Moleküle mit grauen Linien gezeichnet. Die senkrechten punktierten Linien bezeichnen die ungefähre Grenze der Bilipidschicht. Der Kanal enthält ein Hydronium-Ion (Kreis). Die Abbildung ist einer Arbeit von Sansom [1998] entnommen.

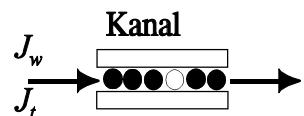
Jahrzehnt später wurden mit CHIP28 [Preston et. al, 1992; Zeidel et. al, 1992], heute als Aquaporin 1 (AQP1) bezeichnet, die vorhergesagten Wasserkanäle identifiziert. Aus dem Vergleich von Erythrozyten, die AQP1 enthielten, mit Spendererythrozyten, die in Bezug auf das korrespondierende Colton Blutgruppenantigen negativ waren, konnten P_d ($1,5 \cdot 10^{-3}$ cm/s) und P_f ($19 \cdot 10^{-3}$ cm/s) des Aquaporin-vermittelten Wassertransports bestimmt werden [Mathai et. al, 1996]. Aus ihrem Verhältnis wurde eine Kanallänge von 36 Ångström abgeleitet.

Das Verhältnis von P_f und P_d kann in Gegenwart einer membrannahen wässrigen Grenzschicht, der sogenannten ungerührten Schicht (USL) leicht überbewertet werden, da selbige als zusätzliche Diffusionsbarriere fungiert [Barry und Diamond, 1984].

2.4 Bedeutung membrannaher ungerührter Schichten

Das Konzept der ungerührten Schichten geht auf Nernst [1904] zurück. Demzufolge ist die sich der Membran unmittelbar anschließende wässrige Schicht frei von Konvektion, während die darauf folgende Volumenphase als ideal durchmischt angenommen wird. Transportprozesse durch die USL beruhen folglich ausschließlich auf Diffusion. Die in Membrannähe ruhende Wasserschicht kann durch die Wahl geeigneter Konvektionsbedingungen minimiert, niemals jedoch ganz entfernt werden. Sie induziert Konzentrationsunterschiede, d. h., Wasser, das durch eine Membran tritt, verdünnt die Lösung, in die es hineingelangt und konzentriert die Lösung, die es verlässt [Fettiplace und Haydon, 1980]. Größe und Bedeutung der Lösungsmittelgradienten innerhalb der USL hängen von der Geschwindigkeit der Rückdiffusion und verschiedenen Rühreffekten ab. Große Konzentrationsunter-

Abbildung 5 Single file-Transport durch einen Gramicidinkanal. Wassermoleküle (●) und Kationen (○) können einander nicht überholen.



schiede können beispielsweise Dichtegradienten induzieren [Hanai und Haydon, 1966], die dann wiederum von Strömungserscheinungen des Lösungsmittels in Membrannähe begleitet sind [Eckert und Drake, 1959]. Es ist offensichtlich, dass eine Aussage über den Transportmechanismus von Wasser nicht nur die traditionelle Messung von P_f und P_d , sondern auch eine explizite Analyse der Effekte der USL erfordert [Andreoli et. al, 1971; Schafer et. al, 1974]. Trotz der großen Anzahl von Arbeiten, die diesem Problem gewidmet sind [vgl. folgende Übersichtsartikel: Barry und Diamond, 1984; Fettiplace und Haydon, 1980; Schafer und Andreoli, 1987] steht eine experimentelle Überprüfung, d. h. eine Messung von Konzentrationsprofilen in unmittelbarer Membrannähe, noch aus. Die genaue Kenntnis der membrannahen Elektrolytkonzentration ist aber Voraussetzung für die korrekte Beschreibung verschiedener Transportphänomene. Zum Beispiel wird die elektrische Leitfähigkeit einer Membran, die für wenigstens ein Ion permeabel ist, durch die Polarisation des Elektrolyten reduziert [Neumcke und Bamberg, 1975]. Ein weiteres Beispiel ist die Berechnung von Ionenbindungskonstanten, die eine gleichzeitige Messung der Wasser- und Ionenflüsse durch eine Membran, die Poren enthält, erfordert. Auch hier ist eine exakte Kenntnis der Elektrolytkonzentration in unmittelbar Membrannähe Voraussetzung [Dani und Levitt, 1981a].

Die physiologische Bedeutung der USL ist beispielsweise an Modellen der intestinalen Adaptation demonstriert worden, in denen die Nährstoffaufnahme durch Änderungen der passiven Permeabilität der Membran des intestinalen Bürstensaums erhöht wurde [Thomson et. al, 1996]. In der Nähe von Enterozyten setzt die USL der Aufnahme hydrophober Xenobiotica (polychlorierter Biphenyle), die im Fett der Nahrung gelöst sind, einen signifikanten Diffusionswiderstand entgegen [Dulfer et. al, 1996]. Die dem Endothel von Kapillaren anliegende USL ist verantwortlich für die Abhängigkeit der Adsorption vom Blutstrom [Chiou, 1996]. Auch der Fluss von Cholesterin aus Zellmembranen wird von der Diffusion der Cholesterinmoleküle durch die extrazelluläre ungerührte Wasserschicht beeinflusst [Rothblat et. al, 1992]. Die Diffusion durch die USL im Disse-Raum einer isolierten und perfundierten

Leber begrenzt die Aufnahmerate proteingebundener Liganden [Schwab und Goresky, 1996; Ichikawa et. al, 1992] und die von Drogen mit extrem hoher Membranpermeabilität [Miyauchi et. al, 1993]. Der Transport des schnell diffundierenden Ammoniak durch die Erythrozytenmembran ist bei basischen pH-Werten von der Diffusionsgeschwindigkeit durch die USL limitiert [Labotka et. al, 1995]. Die Existenz der USL verlangsamt die Aufnahme von Sauerstoff durch menschliche rote Blutkörperchen um einen Faktor von zwei [Holland et. al, 1985]. Der USL wird auch eine entscheidende Rolle im epithelialen Wassertransport zugeschrieben [Spring, 1998]. Laut Theorie der lokalen Osmose sind Natrium- und Wasserfluss indirekt gekoppelt. Erster wird von einer Konzentrationspolarisation in der membrannahen ungerührten Schicht begleitet, die als osmotische Triebkraft wirkt [Nielsen, 1997].

Nicht nur die Aufnahme schnell permeierender Substanzen, sondern auch die Regulation der Sekretion wird von der ruhenden Wasserschicht gesteuert. Die Zunahme der luminalen Strömungsgeschwindigkeit vergrößert zum Beispiel die H^+ -Sekretion der apikalen Membran im proximalen Tubulus, wahrscheinlich durch die Modifikation der luminalen ungerührten Schicht [Preisig, 1992]. Der hämodynamische Fluss moduliert die Wirkungen von Adeninnukleotiden auf vaskuläre endotheliale Zellen, indem er die Nukleotid-konzentration auf der Zelloberfläche verändert [Shen et. al, 1993].

Das konventionelle, in der Physiologie noch immer verwendete Modell der ungerührten Schicht geht davon aus, dass ihre Ausdehnung, δ , einzig durch die örtlichen Konvektionsbedingungen bestimmt wird. Theoretischen Arbeiten von Levich and Pedley zufolge hat aber die USL keine klar definierte Grenze. d ist nicht nur eine Funktion der physikalischen Beschaffenheit und der Strömungsgeschwindigkeit des Lösungsmittels, sondern ist auch abhängig vom Diffusionskoeffizienten des jeweils diffundierenden Agens [Levich, 1962; Pedley, 1980b]. In der vorliegenden Arbeit wird nicht nur gezeigt, dass dieser Effekt tatsächlich zu beobachten ist, sondern auch, dass er groß genug ist, um physiologisch von Relevanz zu sein.

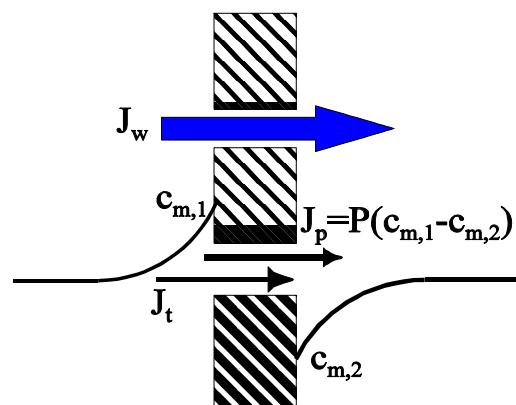
2.5 Kopplung von Wasser- und Ionenfluss

2.5.1 Kinetische und diffusive Anteile des Ionenflusses

Sind permanente wassergefüllte Poren nicht nur für Wasser, sondern auch für die darin gelösten Teilchen permeabel, ist eine Flusskopplung zu beobachten [Hill, 1995]. Letztere werden aufgrund ihrer Trägheit mit dem Wassertransport mitgeführt, d. h. der Teilchenfluss nimmt in Richtung der Wasserströmung zu und in Gegenrichtung ab. Dieses Phänomen wird als Solvent drag bezeichnet. Sollte ein transmembraner Konzentrationsunterschied bereits bestehen oder durch den Volumenfluss generiert werden, setzt sich der Gesamtsubstratfluss durch die Membran aus einem diffusiven und einem konvektiven Anteil zusammen, letzterer verursacht durch Solvent drag (Abb. 6).

Weil für die Kopplung der Flüsse von Lösungsmittel und gelöstem Stoff im Lösungs-Diffusions-Modell kein Raum ist, sind Solvent drag-Studien häufig genutzt worden, um den Wassertransport durch Poren nachzuweisen [Rippe und Haraldsson, 1994]. Aus dieser Art von Experimenten wurde beispielsweise geschlussfolgert, dass in Speichelepithelien die Passage von Nichtelektrolyten entlang des Wassertransportweges erfolgt [Nakahari et. al, 1996]. In Mikrogefäßen des perfundierten Mesenteriums vom Hamster werden Lipoproteine geringer Dichte vom Lösungsmittel durch die Poren der endothelialen Barriere getragen [Rutledge et. al, 1995]. Die parazelluläre intestinale Adsorption von Nährstoffen wird ebenfalls vom Solvent drag realisiert [Pappenheimer et. al, 1994] und erfolgt wenigstens zum Teil entlang ihres Konzentrationsgradienten.

Abbildung 6 Der Wasserfluss, J_w , führt Ionen mit sich und baut ein Ionenkonzentrationsgefälle, $c_{m,1} - c_{m,2}$, über der Membran auf, welches seinerseits einen Ionenfluss, J_p , hervorruft. Der Gesamtsubstratfluss hat damit zwei Anteile, einen konvektiven, J_t , der als Solvent drag bezeichnet wird und einen diffusiven.



Die Kaliumreabsorption in den proximalen Nierentubuli der Ratte wird vom Solvent drag und von der K^+ -Diffusion entlang des existierenden Konzentrationsgradienten vermittelt. Es ist jedoch sehr schwierig, ihre Beiträge voneinander zu trennen [Wilson et. al, 1997].

Eine parallel beobachtete Zunahme von Wasser- und Teilchenstrom bedeutet nicht notwendigerweise, dass tatsächlich Solvent drag involviert ist. Ein Konzentrationsgefälle, Dc , wird über der Membran aufgebaut, welches seinerseits einen Fluß, $J_{m,p}$, des gelösten Stoffes hervorruft. $J_{m,p}$ hat die gleiche Richtung wie der Wasserfluss, J_w (Abb. 6). Generiert wird das Konzentrationsgefälle durch die osmotische Strömung. Bedingt durch den Rückhalt an der Membran verdünnt das durch die Membran permeierende Wasser die hypertonische Lösung, während die hypotonische konzentriert wird [Fettiplace und Haydon, 1980]. Diese Konzentrationsänderungen sind auf die USL beschränkt, die selbst in perfekt gerührten Systemen unvermeidlich sind. Dc erzeugt einen Fluss des gelösten Stoffes, der unter der Maske des Solvent drag in Erscheinung tritt und deshalb als pseudo-Solvent drag bezeichnet wird [Barry und Diamond, 1984]. Außerdem wird innerhalb der USL auch die osmotisch aktive Substanz verdünnt. Folglich tendiert die stationäre Strömungsgeschwindigkeit zu geringeren Werten.

Sogar in einem so gut definierten System, wie dem der ebenen Bilipidmembranen ist es sehr schwierig, einen echten Solvent drag-Effekt zu demonstrieren. Der einzige veröffentlichte Versuch wurde mit Amphotericin-dotierten Membranen ausgeführt [Andreoli et. al, 1971]. Weil ein eher indirekter Beweis für den Solvent drag-Effekt erbracht wurde, besitzen die Untersuchungen wenig Überzeugungskraft [Finkelstein, 1987]. Die Visualisierung des echten Solvent drag erfordert, dass die Polarisationseffekte innerhalb der USL berücksichtigt werden. Mit Potentialmessungen in der Gegenwart von Valinomycin wird eine Abschätzung der Konzentrationspolarisation möglich, die die Wasserdiffusion durch die Bilipidschicht verursacht. [Rosenberg und Finkelstein, 1978a]. Während die Valinomycintechnik für Strömungspotentialmessungen korrekte Ergebnisse liefert, kann das Verfahren nicht auf Experimente angewendet

werden, in denen eine hohe Konzentration der Kanalbildner eingesetzt wird, d.h., es ist ungeeignet für Solvent drag-Experimente. Von der Volumenströmung durch eine große Anzahl von wasserführenden Kanälen werden zusätzliche Polarisationseffekte verursacht. Wie im experimentellen Teil gezeigt wird, können sie die in Abwesenheit der Kanäle gemessenen um eine Größenordnung übertreffen.

2.5.2 Modellkanäle: Gramicidin und Desformylgramicidin

Peptide können mit einer Aminosäuresequenz synthetisiert werden, die der transmembraner Domänen von Kanalproteinen entspricht, um nach Einbau in die Bilipidschicht als Modelle für strukturelle und funktionelle Studien zu dienen [Marsh, 1996]. Gramicidin wird besonders häufig als ein Modell für den Ionentransport in biologischen Membranen benutzt, weil die vom Gramicidin gebildeten Strukturen am besten von allen membrangebundenen Polypeptiden oder Proteinen charakterisiert sind [Ketcham et. al, 1997]. Am Gramicidinkanal wurde beispielsweise getestet, ob ein Einzelstrang von Wasser fähig ist, Protonen mit der Geschwindigkeit zu leiten, die für die $F_1\text{-}F_0$ -ATP-Synthase erforderlich ist [Akeson und Deamer, 1991]. Auch die Bedeutung elastischer Membran deformationen, die aus einer Konformationsänderung der Proteine erwachsen, können am Gramicidin abgeschätzt werden [Andersen et. al, 1999]. Die Korrelation zwischen mechanischer Membranspannung und Häufigkeit der Kanalöffnungen einerseits und ihrer Lebensdauer im geöffneten Zustand andererseits sprechen für ein phänomenologisches Modell der Membranelastizität, in dem die Spannung die Ungleichheit der Dicken des Gramicidindimers und der Membran moduliert [Goulian et. al, 1998]. Der Ersatz von Tryptophanresten im Gramicidin A durch das polarere 5-F-Tryptophan zeigt, dass die grenzflächennahe Lage der aromatischen Aminosäurereste Tryptophan und Tyrosin signifikant für Struktur und Funktion von Membranproteinen ist [Busath et. al, 1998; Andersen et. al, 1998]. Die Familie der Gramicidinkanäle hat sich zu einem aussagekräftigen Modellsystem für das

Verständnis wesentlicher Eigenschaften, Wechselwirkungen und der Dynamik von Proteinen und Lipiden im allgemeinen und von Ionenkanälen im speziellen entwickelt [Greathouse et. al, 1999].

Auch die Erforschung des Massenstromes durch Gramicidinkanäle erwies sich als wichtig für die Interpretation der mit Proteinkanälen erzielten Ergebnisse. Die Diffusion von Ionen und Wasser durch fast den ganzen Gramicidinkanal erfolgt in Einzelstrangmanier, als single File-Transport (Abb. 5), d. h. im Inneren des Kanals können Kationen und Wassermoleküle einander nicht überholen [vgl. die Übersichtsartikel von Finkelstein und Andersen, 1981; Hladky und Haydon, 1984]. Die Anwesenheit eines Kations im Kanal reduziert dessen hydraulische Permeabilität [Dani und Levitt, 1981b].

Unter der Annahme, dass die Wände des Gramicidinkanals repräsentativ für ungeladene polare Proteinoberflächen sind, dem Wasser im Inneren also kein nennenswerter Widerstand entgegengesetzt wird, lässt sich die hydraulische Permeabilität des Einzelkanals, p_f , aus der Kanallänge, L , der Anzahl der Wassermoleküle im Kanal, N , ihrem Diffusionskoeffizienten, D_w , dem molaren Volumen von Wasser, V_w und der Avogadro-Zahl, N_A , voraussagen [Finkelstein, 1987]:

$$p_f = \frac{V_w D_w N}{N_A L^2} \quad (1)$$

Geht man ferner davon aus, dass [vgl. z. B. Mathai et. al, 1996]:

$$L = 2,72 \cdot 10^{-10} m \cdot N \quad (2)$$

ergibt sich für $D_w = 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und $N = 5$ [Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Rosenberg und Finkelstein, 1978a] ein Wert von $2 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$. Der von Rosenberg und Finkelstein [1978a] experimentell ermittelte Wert ist mehr als eine Größenordnung kleiner als der theoretische. Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte darin zu finden sein, dass die Diffusion durch den Kanal bzw. der Eintritt in denselben doch nicht ganz reibungsfrei vorstatten geht. Klärung wurde von der Untersuchung des Wasserflusses durch Derivate des Gramicidinmoleküls erwartet. Ausgewählt wurde die Desformylverbindung, da

dieses Peptid eine positive Ladung trägt. Letztere verhielt größere Änderungen der Wasser-, Kationen- und Protonenpermeabilitäten. Einem älteren Bericht zufolge besitzt dieses Derivat eine um vier Größenordnungen kleinere Kationenpermeabilität als Gramicidin A [Goodall, 1971]. Im Unterschied dazu soll aber die Protonenleitfähigkeit beider Peptide identisch sein [Bezrukov et. al, 1984].

Die aus Gleichung 2 abgeleitete Kanallänge befindet sich in guter Übereinstimmung mit der aus der Peptidstruktur vorhergesagten [Levitt et. al, 1978b; Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Tripathi und Hladky, 1998]. Denselben Ansatz nutzend, konnten die Dimensionen der schmalsten Teile anderer Kanäle abgeschätzt werden, z.B. vom K^+ -selektiven Kanal [Miller, 1982] oder vom Ca^{2+} -Kanal des sarkoplasmatischen Retikulums [Tu et. al, 1994] bzw. vom klonierten, in ebene Bilipidmembranen rekonstruierten epithelialen Na^+ -Kanal [Ismailov et. al, 1997]. Ähnlich dem Gramicidin stellen auch die Aquaporine schmale Kanäle dar, in denen der Transport in Einzelstrangmanier erfolgt [Walz et. al, 1994]. Das Verhältnis aus den durch das humane AQP1-Wasserkanalprotein vermittelten osmotischen und diffusiven Wasserpermeabilitäten deutet auf eine 36 \AA° lange Wasserpore hin [Mathai et. al, 1996].

2.5.3 Aquaporine

Aquaporine (AQP) sind Proteine, die die transmembrane Diffusion von Wasser erleichtern. Sie wurden in Mikroben, Pflanzen, Amphibien und Säugetieren gefunden. Allein in Mammalia unterscheidet man wenigstens 10 verschiedene AQP, die zwei Untergruppen bilden, wasserselektive Kanäle (orthodoxe AQP) und Kanäle (Aquaglyceroporine), die neben Wasser auch für Glycerol und andere kleinere Moleküle permeabel sind [Borgnia et. al, 1999a].

Die hohe Wasserpermeabilität von Epithelien der Nierentubuli, Hirnventrikel und Lungenalveolae oder auch der Erythrozyten beruht auf Aquaporinen [Agre et. al, 1995]. Noch ist die Funktion nicht aller Proteine geklärt und doch ist bereits jetzt zu erkennen, dass ein Ausfall der AQP zu schweren

Krankheitsbildern führen kann. Dysfunktion bzw. Fehlen der Aquaporine führt beispielsweise in der Augenlinse zum Katarakt und in der Niere zum nephrogenen Diabetes insipidus [King und Agre, 1996]. Der autosomal rezessive und dominant nephrogene Diabetes insipidus (NDI), eine Krankheit die durch fehlendes Ansprechen der Niere auf Vasopressin, d. h. ihre Unfähigkeit, den Urin zu konzentrieren, charakterisiert ist, wird durch Mutationen im Gen des Aquaporin-2 (AQP2) verursacht. NDI ist das erste Beispiel einer dominanten Krankheit, in der der Funktionsverlust im Phänotyp durch eine Störung des Proteintransports zum Wirkungsort hervorgerufen wird, nicht aber durch Dysfunktion des Proteins selbst. [Kamsteeg et. al, 1999]. Auch der Ausfall von AQP1 beeinträchtigt die Fähigkeit der Niere, Harn zu konzentrieren, da die transzelluläre NaCl-getriebene Wasserdiffusion durch die absteigenden Vasa recta inhibiert wird [Pallone et. al, 2000]. AQP4 fungiert als Ventil für Hirnwasser, dessen Überschuss bei zerebralem Ödem letale Folgen haben kann [Manley et. al, 2000].

Die Entdeckung der membranständigen Transportproteine für Wasser [Preston et. al, 1992] war entscheidend für das Verständnis der molekularen Grundlagen des Wassertransports durch Plasmamembranen. Eine der unge lösten biophysikalischen Fragestellungen berührt den Zusammenhang zwischen Wasserpermeabilität und Leitfähigkeit für Ionen bzw. Protonen [Agre et. al, 1997]. Widersprüchliche Ergebnisse wurden mit AQP0 und seinem pflanzlichen Analog Nodulin 26 erzielt. Während nach Rekonstruktion in ebene Bilipidmembranen Einzelkanäle registriert werden konnten [Ehring et. al, 1990; Lee et. al, 1995], blieben sie nach Transfektion in X. laevis-Oocyten aus, obwohl sich die Wasserleitfähigkeit der Oozytenmembran erhöhte [Mulders et. al, 1995; Rivers et. al, 1997]. Ein Bericht über eine forskolinstimulierte Kationenpermeabilität der X. laevis-Oozytenmembran nach AQP1-Exprimierung [Yool et. al, 1996] konnte von anderen Forschergruppen weder für AQP1 noch für AQP2 bestätigt werden [Agre et. al, 1997; Sasaki et. al, 1997; Verkman und Yang, 1997; Deen et. al, 1997]. Die beschriebene Undurchlässigkeit von AQP1 für neutrale Stoffe, wie etwa Harnstoff lässt sich

durch die Größe der Pore erklären, nicht aber der Widerstand gegenüber Protonen und Kationen, der durch einen elektrischen Filter bedingt sein muss [Zeidel et. al, 1994]. Unstrittig ist bislang nur die Ionenleitfähigkeit des AQP6 [Yasui et. al, 1999], das schon allein aufgrund seiner intrazellulären Lokalisation eine Sonderstellung einnimmt. Berichte über Funktionsstudien des gereinigten AQP6 fehlen allerdings noch.

Da die Leitfähigkeiten der *X. laevis*-Oozytenmembran und die ebener Membranen um mehrere Größenordnungen differieren, könnten relativ seltene elektrogene Ereignisse das Auflösungsvermögen von unter den Bedingungen der Spannungsklemme getätigten Strommessungen an Oozyten überfordern. Folglich wird ein definiertes System für die simultane Analyse von Wasserbewegung und Ionenleitfähigkeit benötigt. Das ideale Modell für die Untersuchung eines transmembranen Ionenflusses ist, aufgrund der mit großer Empfindlichkeit zu erfassenden elektrischen Parameter, die ebene Bilipidmembran. Kombiniert mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode zur mikroelektrodengestützten Messung des transmembranen Wasserflusses ist in der Erfassung des Stromflusses durch eine Membran ein erfolgversprechender Ansatz für die Lösung des Problems der Ionenleitfähigkeit der Aquaporine zu sehen.

3 Theorie

3.1 Definition der ungerührten Schicht

An der Phasengrenze Membran-Pufferlösung bildet sich aufgrund von Stofftransportvorgängen eine Zone mit höherer oder niedrigerer Stoffkonzentration als in der Hauptlösung aus. Eine derartige Anreicherung oder Verarmung wird als Polarisation bezeichnet. Diese Erscheinung kann durch die Wahl geeigneter Konvektionsbedingungen gemildert, jedoch nicht ausgeschlossen werden. Für die reine Diffusion folgt im stationären Fall aus dem zweiten Fickschen Gesetz:

$$\frac{dc}{dt} = D \left(\frac{d^2 c}{dx^2} \right) = 0, \quad (3)$$

dass innerhalb einer ungerührten Schicht (USL), die nach ihrem Erstbeschreiber auch als Nernstsche Grenzschicht bezeichnet wird, die Konzentration, c , einer gelösten Substanz eine, von ihrem Diffusionskoeffizienten, D , abhängige, lineare Funktion der Entfernung, x , zur Membran ist. Sie unterscheidet sich von der jeweiligen Konzentration, c_b , in der perfekt durchmischten wässrigen Hauptphase. Die Lösung von Gleichung 3 führt direkt zur Definition der Schichtdicke, d . Sie ergibt sich aus dem Konzentrationsgradienten, der sich an der Phasengrenze Membran-Wasser herausbildet [Dainty und House, 1966]:

$$\frac{c_s - c_b}{d} = \left. \frac{\frac{dc}{dx}}{c} \right|_{x=0}, \quad (4)$$

wobei mit c_s die Konzentration an der Membranoberfläche bezeichnet ist.

3.2 Nernstsches Filmmodell

Zur Abschätzung der Konzentrationspolarisation von den Annahmen ausgegangen, dass die einzige Flüssigkeitsbewegung innerhalb der USL der osmotische Fluss selbst ist und das c nur von x abhängt [Dainty, 1963]. Im stationären Zustand ist die Flussdichte, J , durch die USL gleich null, vorausgesetzt, die Membran ist für diese Substanz impermeabel:

$$J = D(dc/dx) + vc = 0, \quad (5)$$

wobei v die lineare Geschwindigkeit der osmotischen Volumenströmung ist. Nach Integration zwischen dem Rand der USL ($x = \pm d$) und der Membranoberfläche ($x = 0$), führt die Annahme, dass

$$c(d) = c(-d) = c_b \quad (6)$$

auf der hypotonischen Seite der Membran (Abb. 7) zu folgender Lösung der Differentialgleichung 5:

$$c(x) = c_b e^{(d-x)v/D}. \quad (7)$$

Die Konzentrationsabnahme auf der anderen Seite der Membran wird durch die Gleichung

$$c(x) = c_b e^{(x-d)v/D} \quad (8)$$

beschrieben, die sich ergibt, wenn in Gleichung 5 v durch $-v$ ersetzt wird [Barry und Diamond, 1984]. Aus der Geschwindigkeit des transmembranen Wasserflusses, v , kann mit Kenntnis des transmembranen osmotischen Gradienten, c_{osm} , und des osmotischen Koeffizienten, c , die Wasserpermeabilität der Membran berechnet werden:

$$P_f = v / c c_{osm} V_w \quad (9)$$

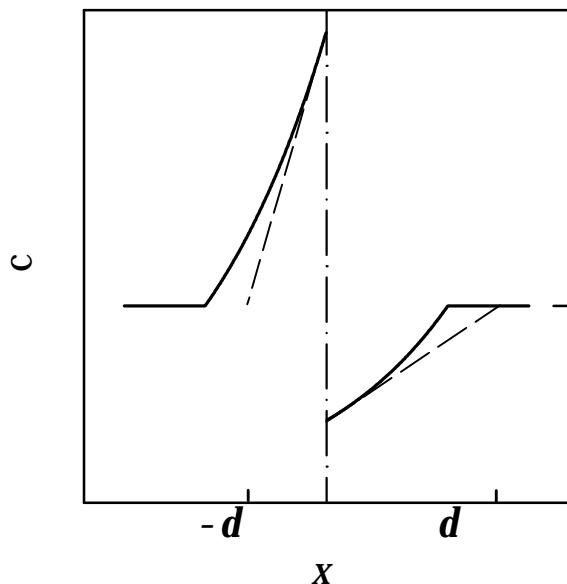


Abbildung 7 Änderung der Konzentration c in Abhängigkeit von der Entfernung x zur Membran (dargestellt als Strich-Punkt-Linie). Die theoretischen Konzentrationsprofile wurden mit Hilfe der Gleichungen 7 und 8 berechnet. Aus dem Konzentrationsgradienten (gestrichelt) an der Phasengrenze ergibt sich die Dicke der Grenzschicht d .

In Ermangelung einer korrekten theoretischen Beschreibung des Konzentrationsverlaufs innerhalb der ungerührten Schicht wird bei der Herleitung der Gleichungen 7 und 8 stillschweigend in Kauf genommen, dass die verwendete Ausgangsbedingung (Gleichung 6) stark idealisiert. $c(x)$ an der Stelle \mathbf{d} unterscheidet sich deutlich von c_b [Finkelstein, 1987]. Das entsprechend seiner Definition (Gleichung 4) aus dem Konzentrationsgradienten an der Phasengrenze ermittelte \mathbf{d} ist daher als effektive Dicke der USL zu betrachten [Finkelstein, 1987] und nicht als der Ort, an dem $c(x)$ den Wert c_b erreicht (Abb. 7). Mit der Kenntnis von \mathbf{d} lässt sich aus den zuletzt hergeleiteten Gleichungen die membrannahe Konzentration, c_s , abschätzen [Finkelstein, 1987].

Die aus der Differentialgleichung berechnete theoretische Konzentrationsverteilung weist weitere Unzulänglichkeiten auf. Ihr zufolge ist der größte Konzentrationsgradient nicht an der Phasengrenze, sondern am äußeren Rand der dem hypertonischen Kompartiment zugewandten USL zu finden (vgl. Abb. 7). Dieses Ergebnis ist Folge der Inkonsistenz des klassischen Modells der USL, das einen abrupten Übergang zwischen ungerührter und vollkommen gerührter Schicht vorsieht [Pedley und Fischbarg, 1978].

Wird eine allmähliche Änderung der Rührbedingungen in Betracht gezogen, ist die Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment wesentlich besser. Hauptschwierigkeit dabei ist die mathematische Modellierung des von den geometrischen Rahmenbedingungen abhängenden Profils der Konvektionsgeschwindigkeit in Membrannähe. Aus der Literatur sind Lösungen für zwei ganz spezielle geometrische Anordnungen bekannt: die Staupunktströmung und die rotierende Scheibe.

3.3 Staupunktströmung

Im ersten Fall wird die Rührbewegung als zweidimensionale Staupunktströmung gegen eine unendliche Ebene dargestellt, die von der Membran eingenommen wird [Pedley, 1983]. Die vom Rührer verursachte konvektive Strömung fällt in Richtung der x -Achse ein, d. h. senkrecht zur Membran und trifft an der Stelle $x = 0$ auf die Membran (Abb. 8). Dort teilt sie sich in zwei Teile, die parallel zur Membranoberfläche in die beiden Richtungen $-y$ und $+y$ strömen. Die viskose Strömung in unmittelbarer Membrannähe ist langsamer als die reibungsfreie Strömung in einiger Entfernung [Schlichting und Gersten, 1997]. Die Geschwindigkeitsverteilung einer reibungsfreien Strömung in der Nähe des Staupunktes, gelegen bei $x = y = 0$, wird durch die Funktion:

$$V = -a_2 x; U = a_2 y \quad (10)$$

beschrieben. Hierbei ist a_2 (Einheit: s^{-1}) ein die Konvektionsgeschwindigkeit beschreibender Parameter, V die Strömungsgeschwindigkeit in x -Richtung und U die in y -Richtung. In der Nähe der Membran wird eine viskose Grenzschicht (VBL) definiert, in der sich die Strömungsgeschwindigkeit v_x entlang der x -Achse von V unterscheidet. In Abwesenheit eines transmembranen Volumenflusses lässt sich die Geschwindigkeit der viskosen Strömung als quadratische

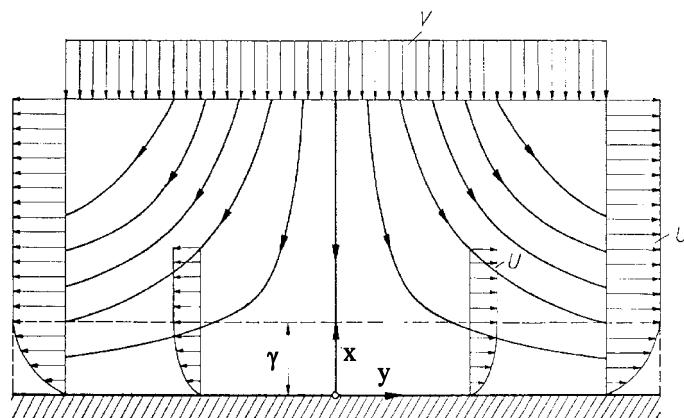


Abbildung 8 Ebene Staupunktströmung (graphische Darstellung nach Schlichting und Gersten [1997])

Funktion der Entfernung x zur Membran darstellen [Schlichting und Gersten, 1997]:

$$v_x = -0.6165(a_2^{3/2} / v_k^{1/2})x^2 = -ax^2 . \quad (11)$$

v_k ist die kinematische Viskosität der Flüssigkeit. v_x kann nach Gleichung 11 nur in unmittelbarer Membrannähe berechnet werden, da die Voraussetzung $v_x \ll V$ erfüllt sein muss. Innerhalb der USL ($-d < x < d$) wird angenommen, dass Gleichung 11 gilt, da hydrodynamische Studien demonstriert haben, dass d normalerweise viel kleiner als g , die Dicke der VBL, ist [Dainty und House, 1966]. g ist durch den Geschwindigkeitsgradienten an der Phasengrenze definiert. Da angenommen werden kann, dass g entlang der Membran nicht variiert [Schlichting und Gersten, 1997], ist das Modell der Staupunktströmung eine sehr zweckmäßige Vereinfachung. Hilfreich ist insbesondere, dass u und folglich auch c nicht von y abhängen [Pedley, 1983]. Obwohl die Strömung in y -Richtung die Konzentration des gelösten Stoffes beeinflusst, da sie diesen mit sich reißt, hängt dessen stationäre Konzentration nur von x ab.

3.4 Rotierende Scheibe

Auch in Abwesenheit eines transmembranen Volumenflusses werden Konzentrationsgradienten innerhalb der USL erzeugt, wenn die betreffende Substanz eine hohe Membranpermeabilität aufweist. Ihre transmembrane Diffusion kann als heterogene Reaktion aufgefasst werden, die in mehreren Schritten abläuft. Der erste ist der Stofftransfer zur Membranoberfläche. In einem zweiten Schritt findet die heterogene Reaktion selbst statt. Beispiele sind die Bindung an einen Carrier [Winne, 1973], die Protonaufnahme durch einen Protonophor [McLaughlin und Dilger, 1980], die Dissoziation schwacher Säuren und Basen [Gutknecht und Tosteson, 1973], Adsorption oder Desorption, etc. Schließlich werden die Reaktionsprodukte von dem Reaktionsort abtransportiert. Insofern eine Diffusionskinetik vorliegt, wird die Gesamtgeschwindigkeit der hetero-

genen Reaktion durch die Geschwindigkeit des Ab- oder Antransports der Reaktanzen bestimmt [Levich, 1962]. Die in Lösung befindlichen Partikel werden nicht nur von dem konvektiven Flüssigkeitsstrom mitgenommen, sie diffundieren auch entlang ihres Konzentrationsgradienten. Die Lösung der Differentialgleichungen für die kombinierten Prozesse von Konvektion und Diffusion lässt sich stark vereinfachen, wenn die Oberfläche einer sich drehenden Scheibe als Reaktionsort angenommen wird. Es wird davon ausgegangen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit so groß ist, dass alle Teilchen, die sich der Oberfläche nähern, unverzüglich reagieren. Es sind in allen drei Richtungen Geschwindigkeitskomponenten vorhanden, die mit u , v_x und w bezeichnet werden (Abb. 9). Die einer rotierenden Scheibe benachbarte Diffusionsgrenzschicht besitzt über jedem beliebigen Punkt der gesamten Oberfläche die gleiche Ausdehnung, d. h. sie ist von der Entfernung zur Drehachse unabhängig. Hierin gleicht die mathematische Behandlung konvektiver Diffusionsprozesse der der Staupunktströmung.

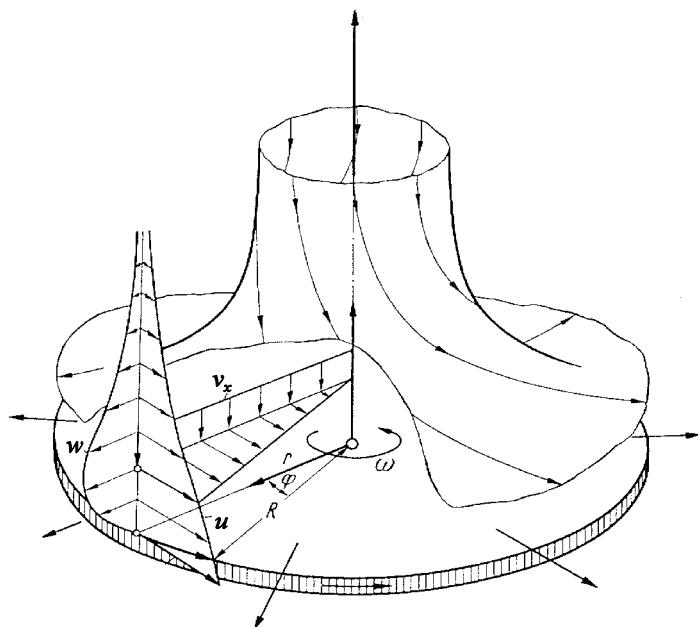


Abbildung 9 Strömung in der Umgebung einer im ruhenden Fluid rotierenden Scheibe (Darstellung aus Schlichting und Gersten [1997])

3.5 Ausdehnung der ungerührten Schicht

In Analogie zur Permeabilität der Membran lässt sich die der USL definieren:

$$P_d = D / d . \quad (12)$$

d wird meistens mit Hilfe von Messungen der Zeit, die für das Auftauchen oder den Schwund eines gelösten Stoffes in der Nähe des interessierenden Membranhindernisses erforderlich ist, bestimmt [Dainty und House, 1966; Burczynski et. al, 1989; Cotton und Reuss, 1989]. **d** kann auch durch die Messung eines Indikatorflusses ermittelt werden, wenn dieser einen so großen Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten hat, dass der Fluss durch die Membran vollständig von der Permeabilität der USL limitiert ist [Holz und Finkelstein, 1970].

Im allgemeinen wird angenommen, dass die Dicke der USL vom Diffusionskoeffizienten des gelösten Stoffes unabhängig ist [Levitt et. al, 1984; Antonenko et. al, 1993; Xiang und Anderson, 1993; Strocchi et. al, 1996; Jensen et. al, 1997; Antonenko et. al, 1997]. Einmal durch Experimente mit einem Indikator bestimmt, wird **d** benutzt, um die Diffusionslimitierungen für andere Verbindungen abzuschätzen [Holz und Finkelstein, 1970; Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Orbach und Finkelstein, 1980; Barry und Diamond, 1984; Xiang und Anderson, 1994; Burczynski et. al, 1995]. Die Gültigkeit dieses Ansatzes ist allerdings fragwürdig. Die Strecke von der Membran, die ein Teilchen via Diffusion zurücklegt, ist abhängig von der Diffusions- und Konvektionsgeschwindigkeit. Sie wird durch kräftiges Rühren kürzer oder im Gegenteil durch eine Zunahme der Mobilität des Teilchens länger.

Tatsächlich zeigt eine ausführliche theoretische Analyse der Wechselwirkung zwischen Konvektion und Osmose, dass die Größe der USL vom Diffusionskoeffizienten der in Membrannähe befindlichen, gelösten Substanz abhängt [Pedley, 1980b]. Der analoge Schluß gilt auch für den transmembranen Stofftransport in Abwesenheit eines Volumenflusses [Levich, 1962].

Für ein Experiment, in dem der Stoffabtransport mit der osmotischen Volumenströmung nur durch den Rücktransport mit der konvektiven Strömung, nicht aber durch Diffusion limitiert wird, kann, auf dem Modell der Staupunktströmung aufbauend, die USL-Dicke d wie folgt berechnet werden [Pedley, 1980b]:

$$d = 1.6 \left(\frac{D}{n_k} \right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{n_k}{a_2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (13)$$

wobei v_k die kinematische Viskosität der Flüssigkeit ist. Gemäß Gleichung 13, ist die Größe der ungerührten Schicht unabhängig von der Geschwindigkeit des Volumenflusses. Für zwei verschiedene, mit den Indizes 1 und 2 bezeichnete Molekülsorten lässt sich aus Gleichung 13 folgende Beziehung ableiten:

$$\frac{d_1}{d_2} = \sqrt[3]{\frac{D_1}{D_2}}. \quad (14)$$

Eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten um eine Größenordnung verdoppelt d . Aufgrund der Ähnlichkeit der mathematischen Behandlung konvektiver Diffusionsprozesse im Modell der Staupunktströmung und der rotierenden Scheibe (vgl. Kapitel 3.4), genauer aufgrund identischer Randbedingungen, beschreibt Gleichung 13 auch die Membranpermeation in Lösung befindlicher Substanzen [Levich, 1962]. In diesem Fall ersetzt die Winkelgeschwindigkeit, w , der Scheibe (Abb. 9) den Rührparameter a_2 .

3.6 Hydrodynamisches Modell der ungerührten Schicht

Eine Realisierung der speziellen geometrischen Anordnungen von Staupunktströmung [Pedley, 1980b; Pedley, 1981] und rotierender Scheibe [Levich, 1962] ist im Experiment nur schwer möglich und im Hinblick auf die gewünschte Extrapolation auf Biomembranen auch wenig zweckdienlich. Es erscheint jedoch sehr wahrscheinlich, dass die in beiden Fällen gefundene

Lösung für die Ortsabhängigkeit der Rührgeschwindigkeit eine Approximation darstellt, die der tatsächlichen Situation an ebenen Bilipidmembranen wesentlich näher kommt als das Nernstsche Filmmodell. Eine weitere, für die Entwicklung des hydrodynamischen Modells entscheidende Annahme ist, dass es sich bei der Geschwindigkeit des Volumenflusses und der ebenfalls senkrecht zur Membran stehenden Komponente der Rührgeschwindigkeit um additive Größen handelt. Wird v in Gleichung 5 gegen die Summe beider Geschwindigkeiten substituiert, erhält man für alle v_x , die die Bedingung v_x kleiner v erfüllen, eine eindimensionale Differentialgleichung:

$$J = D(dc / dx) + (v - ax^2)c = 0. \quad (15)$$

Mit Hilfe der Randbedingung

$$c(x) \rightarrow c_s \text{ für } x \rightarrow 0 \quad (16)$$

ergibt sich die Konzentrationsverteilung innerhalb der USL als:

$$c(x) = c_s e^{\frac{-vx}{D} + \frac{ax^3}{D}} \quad (17)$$

sowohl auf der hypertonischen als auch hypotonischen Seite der Membran. Auf beiden Seiten der Membran wird der von der osmotischen Strömung induzierte Konzentrationsgradient durch die vom Rührer verursachte Konvektion vermindert. Unter Verwendung von Gleichung 17 erlaubt die Berechnung der nichtlinearen Regression aus den gemessenen Konzentrationsprofilen den unbekannten Parameter v und damit die osmotische Wasserpermeabilität bzw. den transmembranen Wasserfluss zu bestimmen.

3.7 Wasserfluss durch eine membranüberspannende Pore

Auch nach der Insertion von wasser- oder kationenselektiven Poren, z. B. von Gramicidinkanälen, in ebene Bilipidmembranen ist die membrannahe Elektrolytpolarisation nur auf den transmembranen Wasserfluss zurückzuführen, vorausgesetzt der Stromkreis wird nicht geschlossen. Unter diesen Bedingungen kommt es nicht zu einem Nettotransport von Ionen durch die Membrananäle, weil anderenfalls Ladung in einem der Kompartimente akkumulieren würde

[Dani und Levitt, 1981a]. Vornehmlich die ionenfreien Kanäle tragen zur Erhöhung der osmotischen Membranleitfähigkeit, P_f , bei. Sie kann als die Summe aus der Wasserpermeabilität der Bilipidschicht, $P_{f,l}$ und der der Kanäle, $P_{f,c}$, dargestellt werden:

$$P_f = (P_{f,l} + P_{f,c}). \quad (18)$$

Auf die gleiche Weise können eine Lipid- und eine Kanalkomponente der Geschwindigkeit des Wasserflusses, entsprechend mit v_l und Dv bezeichnet, unterschieden werden:

$$\begin{aligned} v &= v_l + \Delta v \\ \text{mit: } v_l &= P_{f,l} c c_{osm} V_w \quad \text{und} \quad \Delta v = P_{f,c} c c_{osm} V_w. \end{aligned} \quad (19)$$

Dv spiegelt die Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit des Wassers wider, die nach Gramicidineinbau in die Bilipidschicht beobachtet wird. Der Parameter ergibt sich aus dem Produkt der Geschwindigkeit der Wasserströmung durch die Kanäle und dem Anteil der Querschnittsfläche, die alle Kanäle an der Gesamtfläche der Membran haben. Es wird angenommen, dass keine Inhomogenität der Flussgeschwindigkeit zu berücksichtigen ist, weil die Gramicidinkanäle schmale Poren sind, die nur bei einem sehr hohen Peptid-Lipid-Verhältnis zur Aggregation tendieren [Ge und Freed, 1999].

Die Summe aus v_l und Dv steht in Beziehung zum Wasserfluss, J_w , der wie folgt berechnet werden kann [Barry und Diamond, 1984]:

$$J_w = v / V_w. \quad (20)$$

3.8 Mitnahmeeffekt des Wassers: Solvent drag

Unter Kurzschlussbedingungen wird der osmotische Fluss durch kationenselektive Membrankanäle (z. B. Gramicidin) von einem Kationenfluss begleitet, d. h. J in Gleichung 15 ist verschieden von null. In diesem Fall hat Gleichung 15 keine einfache analytische Lösung. Ungeachtet dessen, kann die Differentialgleichung gelöst werden, wenn der konvektive Term ax^2 vernachlässigbar klein

ist. In einer der Membran unmittelbar benachbarten Flüssigkeitsschicht, in der die Bedingung $v \gg ax^2$ erfüllt ist und unter der Voraussetzung, dass die Konzentration des permeablen Kations, c_p , bei $x = 0$ gleich $c_{p,s}$ ist, nimmt Gleichung 17 folgende Gestalt an:

$$c_p(x) = \frac{J}{v} + \left(c_{p,s} - \frac{J}{v} \right) e^{-\frac{vx}{D_p}}. \quad (21)$$

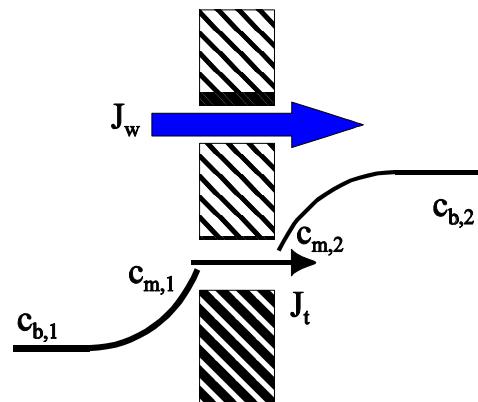
J hat zwei Komponenten. Die erste, J_p , erwächst aus der Permeabilität der Membran für die gelösten Teilchen, d. h. sie ist proportional zu deren transmembranem Konzentrationsgradienten (Fig. 6). Die zweite, J_t , besteht aus Kationen, die vom Wasser durch die Poren mitgeführt werden. Sie verschwindet auch in Abwesenheit eines transmembranen Kationengradienten nicht [Barry und Diamond, 1984]. Demnach gleicht J genau dann J_t , wenn $Dc_{p,s}$ den Wert null annimmt (Abb. 10).

Paralleler Wasser- und Ionenfluss addieren sich zu einem Volumenfluss. Dessen Geschwindigkeit, J_v , lässt sich aus v und einem Proportionalitätsfaktor a berechnen:

$$J_v = v / a. \quad (22)$$

Wird die Membranleitfähigkeit, G , simultan zu v aufgezeichnet, können die Wasserleitfähigkeit, p_r , eines Einzelkanals und die Anzahl der Wassermoleküle, N , die benötigt werden, um ein Ion durch den Kanal zu transportieren, berechnet werden. Levitt et al. [1978b] zufolge sind J_v und die Dichte des

Abbildung 10 Ungeachtet der durch den Wasserfluss, J_w , erzeugten Konzentrationspolarisation ist $c_{m,1} = c_{m,2}$, wenn eine entsprechende Differenz zwischen den Konzentrationen der Hauptphase $c_{b,1}$ und $c_{b,2}$ etabliert wird. Der Gesamtsubstratfluss ist dann ausschließlich auf Solvent drag zurückzuführen.



transmembranen Stromes, I , als lineare Kombination des elektrischen Potentials, Dy , und der osmotischen Druckdifferenz, Dp , darstellbar:

$$J_v = \frac{V_w P_f}{RT} a \Delta p + L_{12} \Delta y , \quad (23)$$

$$I = L_{21} a \Delta p + G \Delta y , \quad (24)$$

Die Kreuzkoeffizienten, L_{12} und L_{21} , sind nach Onsager's Theorem gleich. Sie können ermittelt werden, indem die Grenzbedingungen (a) $Dp = 0$ und (b) $I = 0$ nacheinander auf beide Gleichungen angewendet werden:

a) Gleicher osmotischer Druck auf beiden Seiten der Membran ist charakteristisch für elektroosmotische Experimente. Hier ist die Anzahl der pro Ion transportierten Wassermoleküle gleich dem Quotienten aus Wasser- und Ionenfluss:

$$N = J_w / J . \quad (25)$$

Mit dieser Definition folgt aus den Gleichungen 23 und 24 [Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Levitt et. al, 1978b]:

$$\left(\frac{J_v}{I} \right)_{\Delta p=0} = \frac{J_w V_w + JV_c}{zFJ} = \frac{V_w}{zF} \left(N + \frac{V_c}{V_w} \right) = \frac{L_{12}}{G} . \quad (26)$$

V_c steht für die Volumenänderung der Lösung, wenn ein Kation die Membran passiert.

b) Alternativ kann N mit Hilfe von Messungen des Strömungspotentials bestimmt werden. Im offenen Stromkreis ist die Bedingung $I = 0$ erfüllt [Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Levitt et. al, 1978b; Tripathi und Hladky, 1998]:

$$\left(\frac{\Delta y}{\Delta p} \right)_{I=0} = \frac{L_{12} a}{G} = - \frac{V_w}{zF} N . \quad (27)$$

Die Gleichungen 26 und 27 erlauben, die Kreuzkoeffizienten zu bestimmen, deren Verwendung Gleichung 24 für $Dy = 0$ vereinfacht:

$$J_t = R T c c_{osm} V_w NG / z^2 F^2 . \quad (28)$$

Gleichung 28 gestattet, N aus Solvent drag-Experimenten zu berechnen. Der für N ermittelte Wert muss unabhängig von der Art der Bestimmung sein, d. h. idealerweise liefern Elektroosmose (Gl. 25), Strömungspotential (Gl. 27) und Solvent drag (Gl. 28) den gleichen Wert.

Der hydraulische Permeabilitätskoeffizient eines Einzelkanals, p_f , ist gleich der absoluten hydraulischen Leitfähigkeit aller Kanäle geteilt durch die Anzahl der Kanäle, n . Es wird angenommen, dass n gleich dem Quotienten aus der über die Membranfläche, A , gemessenen Membranleitfähigkeit, G , und der Leitfähigkeit eines Einzelkanals, g , ist [Finkelstein, 1987]:

$$p_f = P_f A / n = P_{f,c} A g / G . \quad (29)$$

Eine Kombination der Gleichungen 19 und 29 führt zu:

$$p_f = \frac{\Delta v}{V_w c c_{osm}} \frac{g}{G} A . \quad (30)$$

c_{osm} und die Volumenkonzentration der osmotisch aktiven Substanz, $c_{osm,b}$, sind nicht identisch. Zwar kann c_{osm} nicht direkt gemessen, wohl aber aus der Differenz zwischen membrannaher und Volumenkonzentration des impermeablen Kations, symbolisiert durch $c_{i,s}$ und $c_{i,b}$, berechnet werden. Eine zu diesem Zweck durchgeführte Kombination der Gleichungen 4 und 17 ergibt:

$$\nu = - D_{osm} (c_{osm} - c_{osm,b}) / d_{osm} c_{osm} = - D_i (c_{i,s} - c_{i,b}) / d_i c_{i,s} . \quad (31)$$

Gleichung 31 kann mit Hilfe von Gleichung 14 vereinfacht werden:

$$\sqrt[3]{\frac{D_i^2}{D_{osm}^2}} \left[1 - \frac{c_{i,b}}{c_{i,s}} \right] = 1 - \frac{c_{osm,b}}{c_{osm}} . \quad (32)$$

3.9 Zusammenfassung

Das vorstehend entwickelte hydrodynamische Modell der membrannahen Grenzschicht orientiert sich an den Beschreibungen der Staupunktströmung [Pedley, 1980b; Pedley, 1981] und der rotierenden Scheibe [Levich, 1962].

Wie die Nernstsche Filmtheorie ist auch das hydrodynamische Modell nicht das Ergebnis einer exakten mathematischen Herleitung, da letztere nur für einige ganz spezielle geometrische Anordnungen möglich ist. Die Unterschiede zwischen beiden Ansätzen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Nernstsches FilmmodeLL	Hydrodynamisches Modell
Abrupte Änderung der Konvektionsgeschwindigkeit (stationäre Wasserschicht grenzt an perfekt gerührte Hauptphase)	Mit wachsender Entfernung von der Membran steigt die Konvektionsgeschwindigkeit kontinuierlich an
Einheitliches d für alle Teilchen	d ist eine Funktion des Diffusionskoeffizienten
Größter Konzentrationsgradient an der Grenze der USL zur wässrigen Phase des hyperosmotischen Kompartiments (vgl. Abb. 7)	Größter Konzentrationsgradient an der Phasengrenze Membran - Puffer
d ist unabhängig vom Volumenfluss	d ist eine Funktion der Geschwindigkeit des Volumenflusses

Tabelle 2 Vergleich der Schichtmodelle

4 Materialien und Methoden

4.1 Lipide

Für die Herstellung der Modellmembranen kamen verschiedene synthetische und natürliche Lipide bzw. Lipidgemische zum Einsatz. Diphyanoylphosphatidylcholin (DPhPC), Phosphatidylcholin von Ei (EPC), Monosialoganglioside (GM1), Cholesterin und das Lipidextrakt von *E. coli* wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Asolektin von Fluka (Buchs, Schweiz) und Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserine (PS) und Ergosterol von Sigma (Dreisenhofen, Deutschland) bezogen.

4.2 Pufferlösungen

Zur Herstellung der die Membran umspülenden Pufferlösungen wurden folgende Reagenzien benutzt: Tris (Fluka), MES (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und MOPS (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die zugefügten Salze NaCl, KCl und Ca₂Cl waren auch von Merck. Die Pufferlösungen in beiden Kompartimenten wurden von Magnetstäbchen gerührt.

4.3 Proteine

Die ribosominaktivierenden Proteine, RCA60, RCA120, MLI, MLII, MLIII sowie ihre Untereinheiten wurden im Labor unter Leitung von Herrn Dr. habil. biol. Tonevitsky (Moskau, Russische Föderation) gereinigt. Aquaporin Z stammt aus dem Labor von Herrn Prof. Dr. Agre (Baltimore, USA) und Aquaporin 1 bereiteten Herr PD Dr. Rothe und Frau Glanz (Halle, Deutschland) für die beschriebenen Untersuchungen vor.

4.4 Peptide

Die Zugabe von Gramicidin A (Fluka) oder Desformylgramicidin zur BLM erfolgte aus hochkonzentrierten Stammlösungen der in Ethanol gelösten Peptide. Prof. Koeppe (Fayetteville, USA) synthetisierte das Peptid Desformylgramicidin nach einem von Weiss & Koeppe [1985] publizierten Protokoll. Es ist anzumerken, dass Desformylgramicidin nicht in der für das ungeladene Gramicidin A charakteristischen Reinheit hergestellt werden kann [Weiss und Koeppe, 1985; Koeppe et. al, 1985; Andersen et. al, 1998].

4.5 Liposomen

Die Lipide wurden in einer Chloroform-Methanol-Mischung aufgelöst. Zur Messung der Oberflächendielektrizitätskonstante wurde dem Lipid der Farbstoff Dansylphosphatidylethanolamin (DPE; Avanti Polar Lipids) im molaren Verhältnis Lipid/DPE: 1/100 bis 1/200 beigemischt. Beim Verdampfen des Lösungsmittels entstand ein dünner Lipidfilm an der Innenwand des Reagenzglases. Die anschließende Zugabe der Pufferlösung führte durch intensives Schütteln unmittelbar zur Bildung multilamellarer Vesikel. Beim mehrfachen Pressen durch Filter mit einer Porengröße von 100 nm verwandelten sich letztere in große unilamellare Vesikel [MacDonald et. al, 1991]. Dabei kam ein aus zwei Hamiltonspritzen und einer Filterhalterung bestehendes und als LiposoFast bezeichnetes Gerät zum Einsatz (Avestin Inc., Ottawa, Canada).

4.6 Proteoliposomen

In Anlehnung an veröffentlichter Protokolle für die Rekonstruktion von AQP1 [Zeidel et. al, 1994; Zeidel et. al, 1992] und Aquaporin Z [Borgnia et. al, 1999b] erfolgte der Proteineinbau nach einem einheitlichen Schema. Zu einer Pufferlösung, die 100 mM MOPS-Na, 5 mM Mercaptoethanol (Merck) und

1,25 % Octyl- β -D-glucopyranosid (Merck) enthielt, wurde das gereinigte Eiweiß gegeben, so dass seine Endkonzentration ca. 0,1 mg/ml betrug. Die Beigabe der, nach der unter 4.5 beschriebenen Prozedur aus *E. coli*-Lipid in 100 mM MOPS-Na hergestellten, unilamellaren Vesikel zur gekühlten Eiweiß-Detergent-Lösung erfolgte per Injektion. Nach intensivem Schütteln der Suspension und einer einstündigen Verweildauer derselben im Eisbad begann die zur Entfernung des Detergenten erforderliche Dialyse. Als am besten geeignet erwies sich der Film Spectra/Por 2.1 (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) der für den Rückhalt von Makromolekülen mit einem Molekulargewicht größer 15 kDa geeignet ist. Zum Schutz des Proteins enthielt der Dialysepuffer 1 mM NaN₃ (Merck). Nach frühestens 30 Stunden konnten die Proteoliposomen vom Rekonstruktionspuffer durch Zentrifugieren (eine Stunde bei 140 000 g) getrennt werden.

4.7 Ebene Membranen

Nach der Art der Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten ebenen Bilipidmembranen können zwei verschiedene Typen der Modellmembranen unterschieden werden: lösungsmittelhaltige und lösungsmittelfreie Membranen.

4.7.1 Lösungsmittelhaltige Membranen

Diese Membranen kamen am häufigsten zum Einsatz, da ihre Herstellung [Mueller et. al, 1963] besonders einfach ist. Kommerziell erhältliches Lipid wurde in einer Konzentration von ein bis zwei Prozent in n-Decan (Merck) gelöst. Aus dieser Lösung ließ sich mit Hilfe einer Pipette, eines Teflondrahtes oder eines Pinsels ein Fettfilm über ein kreisförmiges Loch in einer Wand aus Polytetrafluorethylen (PTFE), die zwei wässrige Phasen einer PTFE-Kammer

voneinander trennte, spannen. Unter Wirkung der Oberflächenspannung und der Schwerkraft verringerte sich die Dicke dieses Films spontan. Die Ausbildung der Bilipidmembran (BLM) konnte sowohl optisch, mit einem Auflichtmikroskop, als auch elektrisch, durch Bestimmung der Membrankapazität, kontrolliert werden. Der Durchmesser der Membranen variierte von 0,4 bis 1,5 mm.

4.7.2 Lösungsmittelfreie Membranen

Fehlt das den Bilipidmembranen gewöhnlich Stabilität verleihende Lösungsmittel Dekan, erhöht sich der Schwierigkeitsgrad der Experimente erheblich. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Technik [vgl. Schindler, 1989] entstand in Anlehnung an eine von Montal und Mueller vorgeschlagene Methode zur Herstellung ebener Membranen [Montal und Mueller, 1972], die von dieser nur in der Herkunft der Monoschichten differiert. Letztere können, Montal und Mueller zufolge, direkt aus in Hexan gelöstem Lipid hergestellt werden. Nach Zugabe der Lipidlösung auf die Oberfläche der wässrigen Phase verflüchtigt sich das Lösungsmittel und zurück bleibt eine Lipidmonoschicht. Zur Rekonstruktion von Membranproteinen in ebene Lipidmembranen eignet sich diese Methode wegen der Verwendung leicht flüchtiger Lösungsmittel nur bedingt. Den Gebrauch letzterer kann man umgehen, da an jeder Luft-Wasser-Phasengrenze über einer Suspension proteinhaltiger Vesikel spontan Monoschichten entstehen [Pattus et. al, 1978; Schindler, 1979]. Schindler [1980a] verwendete als erster die Technik zur Rekonstruktion von Proteinen in die Membran, indem er diese aus zwei, nur durch ein Teflonseptum getrennte, Monoschichten formierte. Durch Anheben der Flüssigkeitsspiegel über die in der dünnen PTFE-Zwischenwand befindliche Bohrung bildet sich an der Kontaktstelle beider Monoschichten eine Bilipidmembran [Schindler, 1989]. Die Poren im Teflonfilm wurden durch eine Vorbehandlung mit einem Hexadecan-Hexangemisch (Verhältnis der Volumenanteile: 0,5/99,5) verschlossen.

Mit der Schindler-Technik ist ein hoher Proteingehalt der Membran zu erzielen. Dieser ist Voraussetzung dafür, dass eine aquaporinvermittelte Erhöhung der hydraulischen Membranleitfähigkeit messbar wird. Ein alternativer Weg zur Inkorporation von Proteinen in ebene Bilipidmembranen ist die Fusion von Proteoliposomen mit einer bereits bestehenden Lipiddoppelschicht.

4.8 Proteinrekonstruktion durch Fusion

Auf diesem Wege sind Aquaporine bereits mehrfach erfolgreich rekonstruiert worden [Ehring et. al, 1990; Weaver et. al, 1994; Lee et. al, 1995]. Zur Annäherung zweier Membranen ist nicht nur die Überwindung etwaiger elektrostatischer Abstoßungskräfte erforderlich, sondern auch eine Dehydratation der Oberflächen. Erreicht wird diese mit Hilfe eines osmotischen Druckgradienten. Dessen Existenz ist gleichzeitig Bedingung für die im nächsten Schritt folgende Erfassung der hydraulischen Permeabilität der ebenen Bilipidmembran. Nach erfolgreicher Membranaggregation folgt eine Fusion, wenn auf geeignete Weise Punktdefekte gesetzt werden. Für diese Zwecke wurde in der vorliegenden Arbeit Nystatin eingesetzt [Woodbury und Miller, 1990]. Ist die ebene Bilipidmembran frei von Sterolen, dissoziiert nach erfolgter Fusion der Nystatin-Sterol-Komplex. Die dank funktionierender Nystatinkanäle kurzzeitig gestiegene Leitfähigkeit der Membran sinkt auf ihr Ausgangsniveau ab. Auf diese Weise lässt sich die Fusion eines jeden Vesikels mit der Membran nachweisen.

4.9 Osmose

In fast allen Experimenten diente Harnstoff zum Aufbau des osmotischen Gradienten. Die osmotisch aktive Substanz wurde auf nur einer Seite der Membran (vorzugsweise dem trans-Kompartiment) zugegeben. Die Wahl fiel

auf Harnstoff, weil er die Viskosität und damit d nur unwesentlich beeinflusst. Ein weiterer Vorteil ist seine geringe Membranpermeabilität, die mit 0,04 $\mu\text{m/s}$ [Finkelstein, 1976] viel niedriger als die von Wasser ist. Harnstoff kann deshalb als impermeable Verbindung angesehen werden, die von der Membran vollständig reflektiert wird [Holz und Finkelstein, 1970; Rosenberg und Finkelstein, 1978a]. Die transportierte Wassermenge ist so klein, dass während des Experiments eine Verringerung des effektiven osmotischen Gradienten zwischen den Pufferlösungen (3 ml in jedem der Kompartimente) nicht zu erwarten ist.

4.10 Erleichterter Ionentransport durch Carrier

In Abwesenheit eines transmembranen Volumenflusses wurde durch die Zugabe von A23187 oder Nigericin (beide Calbiochem, La Jolla, CA, USA) die transmembrane Diffusion von Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten induziert. Die Ionophore wurden entweder in DMSO gelöst und dann der Pufferlösung zugegeben oder direkt dem in Decan gelösten Lipid beigemischt, das dann der Herstellung der BLM diente. Beide Ionophore gewährleisten einen nichtelektrogenen Kationen-Protonen-Austausch [Antonenko und Yaguzhinsky, 1988; Pohl et. al, 1990].

4.11 Mikroelektroden

Herstellung und Kalibrierung der ionsensitiven Mikroelektroden erfolgten nach den von Amman [1986] beschriebenen Methoden. Sowohl Glaskapillaren aus Borosilikat als auch aus Aluminiumsilikat fanden Verwendung. Die Kapillaren wurden mit einem Ziehgerät (Modell PP81, Narishige, Tokyo, Japan) an einem Ende verjüngt. Die Kapillarspitze hatte einen Durchmesser von ungefähr 1 bis 2 μm .

Nach erfolgter Hydrophobisierung der Kapillarinnenwandung mit Bis (dimethylamino)-dimethylsilan (Aldrich, Dreisenhofen, Deutschland) wurde die ausgezogene Spitze mit einem ionsensitiven Cocktail der Firma Fluka gefüllt. Verwendung fanden der Natrium Ionophor II Cocktail A, Hydrogen Ionophor II Cocktail A, Kalzium Ionophor I Cocktail A und Kalium Ionophor I Cocktail B. Zum Einsatz kamen Elektroden, die innerhalb von 0.6 s nach Konzentrationsänderung 90% des Gleichgewichtswertes anzeigen. Artefakte, die auf eine vergleichsweise langsame Bewegung der Elektroden zurückzuführen wären, waren deshalb unwahrscheinlich. Trotzdem wurden die Auswirkungen einer begrenzten Zeitauflösung oder Störungen der USL geprüft, indem Messungen sowohl während der Vorwärtsbewegung der Elektrode in Richtung Membran als auch in Gegenrichtung ausgeführt wurden. Da keine Hysterese vorlag, konnte angenommen werden, dass die verwendeten Elektroden über ein ausreichendes zeitliches Auflösungsvermögen verfügten und das ihre Bewegung darüber hinaus ohne Wirkung auf die Konzentrationsverteilung in den USL blieb.

4.12 Messung von Konzentrationsprofilen

Die experimentelle Anordnung ist schematisch in Abb. 11 wiedergegeben. Die Messung des Potentialunterschieds zwischen ionensensitiver Elektrode und Ag/AgCl Referenzelektrode erfolgte mittels Elektrometer (Modell 617, Keithley Instruments, Cleveland, Ohio), das einen sehr großen Eingangswiderstand ($> 10^{15} \text{ } \Omega$) besitzt. Die Steuerung des Gerätes und die Speicherung der Messdaten erfolgten durch einen Personalcomputer, der über eine IEEE-Schnittstelle mit dem Elektrometer verbunden war. Programmiersprache war Asyst (Keithley Instruments, Taunton, MA, USA). Ein hydraulisch entkoppelter Mikromanipulator (Modell MO81, Narishige, Tokyo, Japan) bewegte die Mikroelektrode senkrecht zur Oberfläche der BLM. Eine Membranberührung führte zu einer steilen Änderung des Elektrodenpotentials [Antonenko und Bulychev, 1991], die als Referenz für die Position der

Membran diente. Je nach Geschwindigkeit der Elektrodenbewegung (1.0 bis 4.0 $\mu\text{m s}^{-1}$) wurde die Genauigkeit der Entfernungsmessung auf \pm 5 bis 10 μm geschätzt.

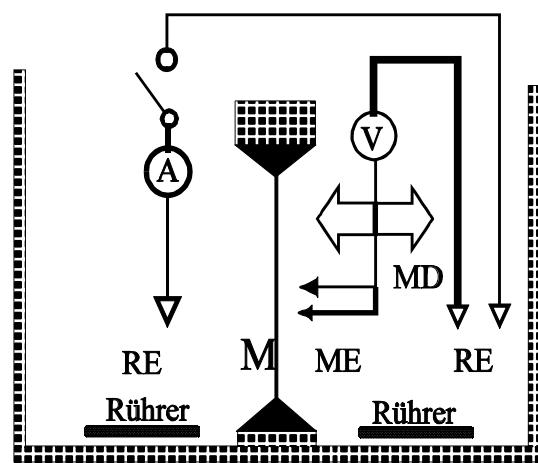
4.13 Membrankapazität

Zur Messung der Kapazität einer ebenen Lipiddoppelschicht wurde eine Sinusspannung an die Membran angelegt (Quelle: Funktionsgenerator Modell 33120A, Hewlett-Packard, Loveland, Colorado, USA). Das Ausgangssignal wurde von einem Picoamperemeter verstärkt (Modell 428, Keithley Instruments, Cleveland, Ohio) und auf einem Oszilloskop zur Darstellung gebracht.

4.14 Elektrische Leitfähigkeit

Leitfähigkeitsmessungen ebener Membranen wurden sowohl im Gleich- als auch im Wechselstromkreis mit Hilfe eines Picoamperemeters (Modell 428, Keithley Instruments Inc., Cleveland, Ohio) durchgeführt. Die dazu erforderliche Gleichspannung wurde von der eingebauten Spannungsquelle des Verstärkers generiert, während die Wechselspannung vom Funktionsgenerator (Modell 33120A, Hewlett-Packard, Loveland, Colorado) geliefert wurde.

Abbildung 11 Experimenteller Aufbau. V - Elektrometer, A - Picoamperemeter, ME - Mikroelektrode (hier im Bild doppelläufig), RE - Referenzelektrode, M - Membran, MD - Mikromanipulator. In einigen Experimenten wurde zwischen RE und Schalter eine Wechsel- oder Gleichspannungsquelle geschaltet. In Solvent drag-Experimenten machte sich darüber hinaus die Verwendung eines weiteren Elektrodenpaares und eines Impedanzwandlers erforderlich.



Messungen im Wechselstromkreis erfolgten, um einer scheinbaren Erhöhung des Membranwiderstandes, verursacht durch eine zusätzliche Elektrolytpolarisation im elektrischen Feld, vorzubeugen. Gewöhnlich fanden die Leitfähigkeitsmessungen unmittelbar vor und nach den Flussmessungen statt, um zeitliche Konzentrationsschwankungen der Kanalbildner zu registrieren. Experimente mit einer sehr hohen Membranleitfähigkeit machten zusätzlich auch Messungen der Membranspannung erforderlich. Die Aufzeichnung derselben geschah mittels Impedanzwandler (AD549, Analog Devices, Norwood, MA), der über ein zweites Paar Ag/AgCl-Elektroden an die Membran gekoppelt war. Eine gleichzeitige Darstellung von Membranspannung und Strom auf dem Bildschirm des Oszilloskops erlaubte die Berechnung der Membranleitfähigkeit, d. h. die Korrektur des Kopplungswiderstandes [Dani und Levitt, 1981a].

4.15 Messung der elektrischen Einzelkanalleitfähigkeit

Das beste Signal-Rausch-Verhältnis ist durch eine Minimierung der Membrankapazität, d. h. durch eine Verringerung der Membranfläche zu erzielen. Letzteres ist am einfachsten dadurch zu erreichen, dass ein kleines Membranfragment vom Rest der Lipiddoppelschicht isoliert wird. Verwendung fand eine ausgezogene Glaspipette, die nach Berührung mit der cis-Membranoberfläche einen stabilen hochohmigen Kontakt mit der Membran bildete. Die Spitze der Pipette hatte einen Durchmesser von etwa $5\text{ }\mu\text{m}$. Sie entstand durch Ausziehen einer Glaskapillare mit einem kommerziellen Ziehgerät (Modell PP-83, Narishige, Tokyo, Japan). Die Annäherung an die Membranoberfläche erfolgte mit einem Mikromanipulator. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops ließ sich das Aufsetzen auf die Membran verfolgen. Referenzelektroden befanden sich in der Pipette und in der Pufferlösung auf der trans-Seite der BLM. Zur Aufzeichnung des Stromflusses durch das Membranfragment fand ein Patch-clamp-Verstärker Verwendung (EPC-9, HEKA Electronics, Lambrecht, Germany). Die

experimentellen Daten wurden mit Hilfe des TAC-Softwarepaketes (Bruxton Corporaton, Seattle, WA, USA) analysiert.

4.16 Lokale Dielektrizitätskonstante

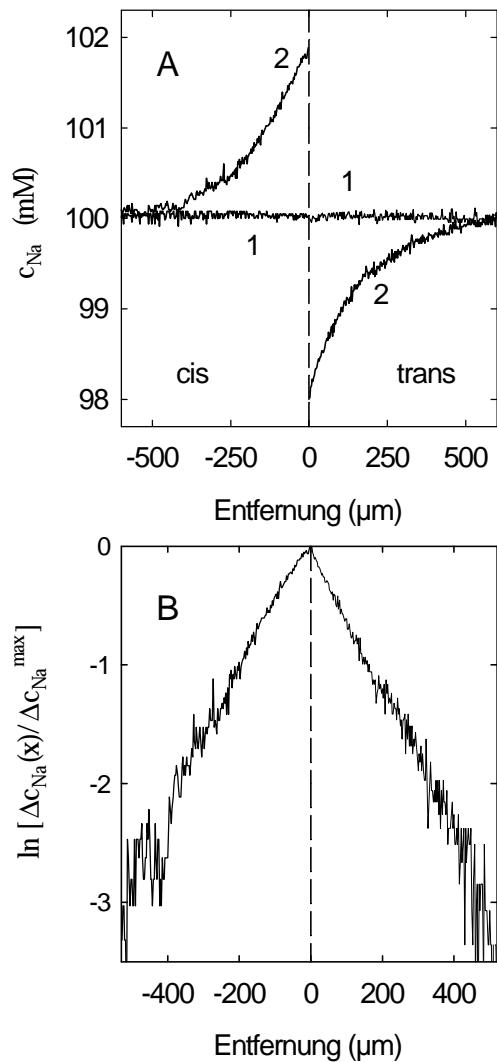
Lectininduzierte Änderungen der Dielektrizitätskonstanten im polaren Bereich der Bilipidmembran wurden aus dem Emissionsspektrum einer in unilamellare Liposomen integrierten Fluoreszenzsonde abgeleitet [Kimura und Ikegami, 1985; Ohki und Arnold, 1990]. Die Dielektrizitätskonstante, e , der Umgebung des in die Lipidmembran eingebetteten DPE ließ sich aus der Wellenlänge, λ , im Maximum des Emissionsspektrums berechnen. Eine Eichung erfolgte mit DPE Fluoreszenzspektren, die in verschiedenen organischen Lösungsmitteln mit bekanntem e aufgenommen wurden [Kimura und Ikegami, 1985; Ohki und Arnold, 1990]. Die Messungen wurden bei einer konstanten Temperatur von 20°C ausgeführt.

5 Resultate

5.1 Osmotischer Fluss durch eine unmodifizierte Bilipidmembran

Zur Induktion eines transmembranen Wasserflusses wurde ein osmotischer Gradient aufgebaut. Die durch den Volumenfluss in unmittelbarer Membrannähe induzierte Änderung der Natriumkonzentration ließ sich mit Hilfe einer selektiven Mikroelektrode erfassen. Es ist davon auszugehen, dass qualitativ

Abbildung 12 (A) Konzentrationsprofile von Natriumionen in unmittelbarer Umgebung einer aus DPhPC hergestellten BLM. Die Zugabe von 400 mM Harnstoff in das trans-Kompartiment erzeugt einen osmotischen Volumenfluss der von einer Polarisation der Natriumionen begleitet ist (Kurve 2). Vor der Harnstoffzugabe war die Natriumkonzentration ortsunabhängig (Kurve 1). (B) Die von der osmotischen Volumenströmung induzierte Konzentrationsverteilung (Kurve 2 in A) im semilogarithmischen Maßstab. $Dc_{Na}(x)$ steht für die Differenz der Natriumkonzentrationen in Entfernung x von der Membran und im Volumen der wässrigen Phase. An der Membranoberfläche ($x=0$) gleicht sie Dc_{Na}^{\max} .



ähnliche Konzentrationsänderungen auch für jeden anderen gelösten Stoff zu beobachteten wären. Natriumionen wurden ausgewählt, da natriumsensitive Mikroelektroden leicht herstellbar sind und außerdem Wechselwirkungen zwischen Natriumionen und anderen Bestandteilen des experimentellen Systems (d. h. der Lipidmembran) vernachlässigbar sind.

Bei gleicher Osmolarität der Lösungen links und rechts der Membran konnte keine Ortsabhängigkeit der Elektrolytkonzentration in unmittelbarer Membrannähe gemessen werden (Abb. 12 A, 1). Der von einem osmotischen Gradienten getriebene Wasserfluss führt zu einer Verdünnung der Natriumionen auf der hypertonischen Seite innerhalb der USL (Abb. 12 A, 2). Eine Zunahme der

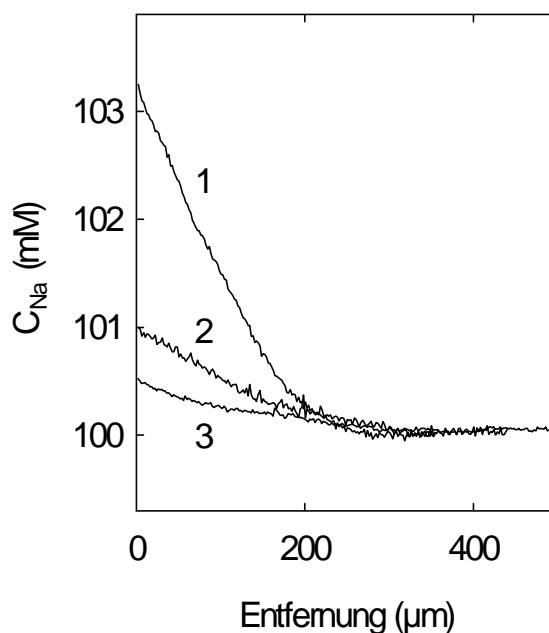


Abbildung 13 Wirkung von Cholesterin auf die vom Volumenfluss induzierte Polarisation der Natriumionen. $D_{C_{\text{Na}}}^{\max}$ wird durch die Beimischung von Cholesterin zur membranbildenden Lösung erheblich verringert (1 - reines Asolektin; 2 - Cholesterin : Asolektin = 1 : 2; 3 - Cholesterin : Asolektin = 1 : 1). Das trans-Kompartiment enthielt 0,5 M Harnstoff.

Ionenkonzentration konnte auf der gegenüberliegenden Seite der Membrane beobachtet werden (Abb. 12A, 2). Die Differenz, Dc_{Na}^{max} , zwischen den Natriumionenkonzentrationen an der Membranoberfläche, c_s und in unendlicher Entfernung von der Membran, c_b , war für die cis- und trans-Seiten der Membran gleich. Wie in Abb. 12 B demonstriert, hängt die experimentell ermittelte Konzentration exponentiell von der Ortskoordinate x ab:

$$c(x) = (c_s - c_b) e^{-x/C1} + c_b \quad (33)$$

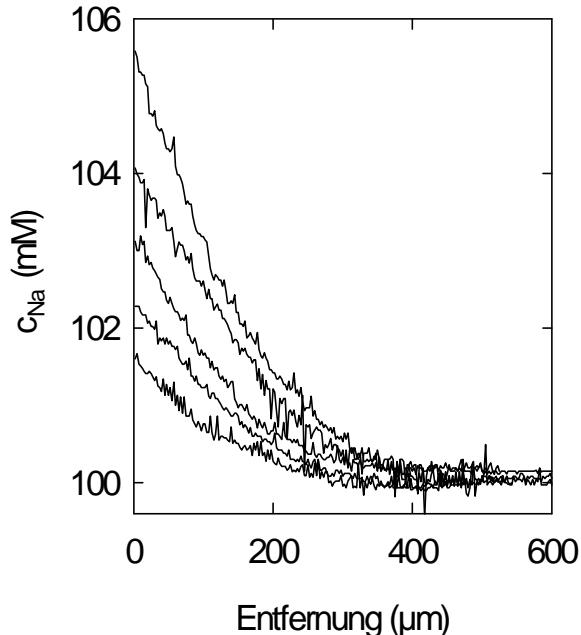


Abbildung 14 Eine Zunahme der Harnstoff-Konzentration (0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 M) im trans-Kompartiment war von einer zunehmenden Polarisation der Natriumionen innerhalb der cis-USL begleitet. Die Pufferlösungen auf beiden Seiten der Asolektin-Membran wurden intensiv gerührt.

Aus der empirischen Gleichung 33 und der Definition der USL (Gleichung 4) lässt sich der unbekannte Parameter C1 ermitteln:

$$c(x) = (c_s - c_b) e^{-x/d} + c_b \quad (34)$$

Gleichung 34 erlaubt, d aus dem gemessenen Konzentrationsprofil zu berechnen. Zu diesem Zweck werden die Parameter der Gleichung 34 in einem iterativen Verfahren so gewählt, das die berechnete Konzentration minimal von der gemessenen abweicht. Für die Minimierung der kleinsten quadratischen Abweichung wurde das Programm SigmaPlot (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) benutzt. Das Regressionsverfahren zur Berechnung von d ist der von Gleichung 4 geforderten numerischen Differenzierung des Konzentrations-

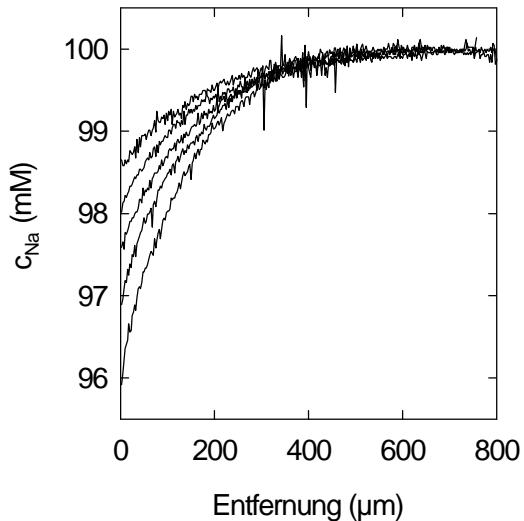


Abbildung 15 Eine Zunahme der Harnstoff-Konzentration (300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM) im trans-Kompartiment war von einer zunehmenden Polarisation der Natriumionen innerhalb trans-USL begleitet. Die Rührgeschwindigkeit der Pufferlösungen auf beiden Seiten der Membran war niedrig. Die BLM bestand aus DPhPC.

profils vorzuziehen, weil so das Rauschen der Mikroelektrode gemittelt und die Standardabweichung klein gehalten wird.

Von Cholesterin ist bekannt, dass es die hydraulische Membranleitfähigkeit verringert [Finkelstein, 1987]. Tatsächlich reduziert der Einbau von Cholesterin in eine Membran aus Asolektin die durch den Volumenfluss bedingte Polarisation, d. h. Dc_{Na}^{max} , erheblich (Abb. 13).

Im Gegensatz dazu, ist eine Vergrößerung von Dc_{Na}^{max} zu erwarten, wenn der transmembrane Wasserfluss wächst. Diese Situation wurde durch eine Vergrößerung des osmotischen Gradienten erreicht. Das experimentelle Ergebnis (Abb. 14) ging mit dieser Annahme konform. Innerhalb des unter-

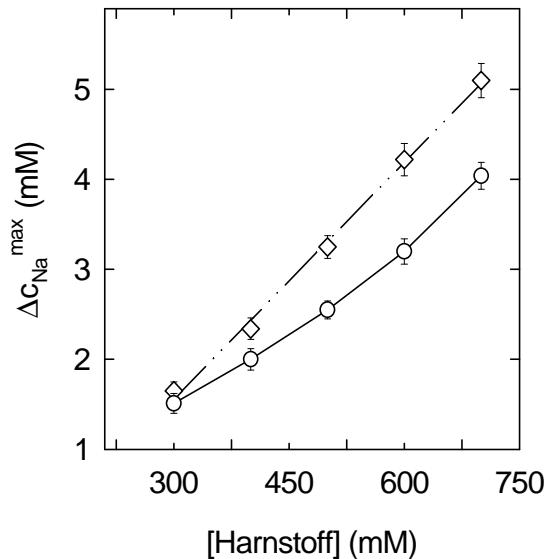


Abbildung 16 Zunahme der Polarisation des Elektrolyten als Funktion des Harnstoffkonzentrationsgradienten. Die BLM bestanden aus Asolectin (Rhomben) bzw. DPhPC (Kreise). Bei hoher Geschwindigkeit des Magnetrührers ist Dc_{Na}^{max} proportional dem osmotischen Gradienten (Rhomben), bei niedrigerer Rührgeschwindigkeit (Kreise) hingegen nicht.

suchten osmotischen Druckintervalls war Dc_{Na}^{max} dem osmotischen Gradienten nur dann proportional, wenn die Pufferlösungen in der Messkammer sehr gut gerührt wurden (Abb. 16). Die Nichtlinearität bei geringer Rührgeschwindigkeit (Abb. 16) ist als Beweis für die Abhängigkeit der Dicke der USL vom osmotischen Volumenfluss zu werten (Abb. 15, 17). Bei hohen Rührgeschwindigkeiten hingegen nahm das nach Gleichung 34 bestimmte d , unabhängig vom osmotischen Gradienten, einen Wert von $140 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$ an (Abb. 14).

Anhand der in Abb. 16 gezeigten Ergebnisse ist es nicht möglich, irgendwelche Schlüsse über die Wirkung der Rührgeschwindigkeit auf Dc_{Na}^{max} zu

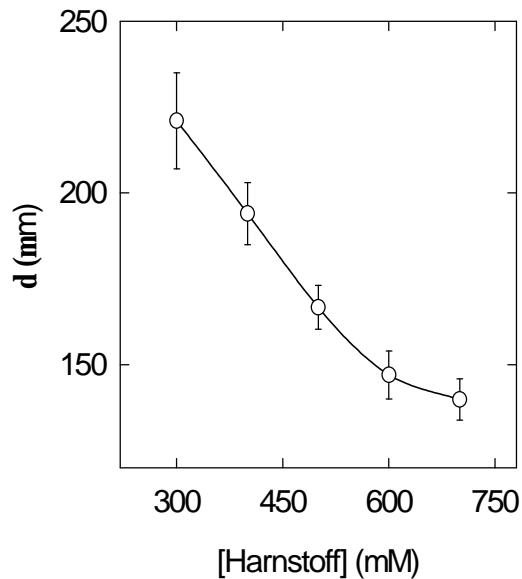


Abbildung 17 Bei einer niedrigen Rührgeschwindigkeit ist die Dicke der ungerührten Schicht eine Funktion des osmotischen Gradienten. Letzterer wurde durch den unilateralen Zusatz von Harnstoff zur Pufferlösung variiert. Die Bestimmung von d aus den experimentellen Konzentrationsprofilen (für repräsentative Datensätze vgl. Abb. 15) erfolgte durch die Berechnung der nichtlinearen Regression nach Gleichung 34.

ziehen, da die Lipidzusammensetzung der Membranen differierte. Abb. 18 zeigt, dass die vom osmotischen Volumenstrom induzierte Polarisation des Elektrolyten mit zunehmender Rührgeschwindigkeit abnimmt. Bedingt durch die Erhöhung der Transferrate gelöster Substanzen aus der USL in das Volumen der wässrigen Phase führt eine verbesserte Konvektion darüber hinaus auch zu einem Anwachsen des osmotischen Volumenflusses [Pedley, 1980b].

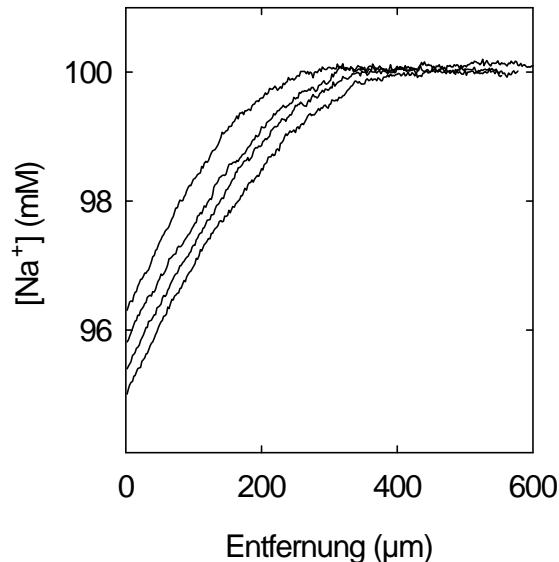
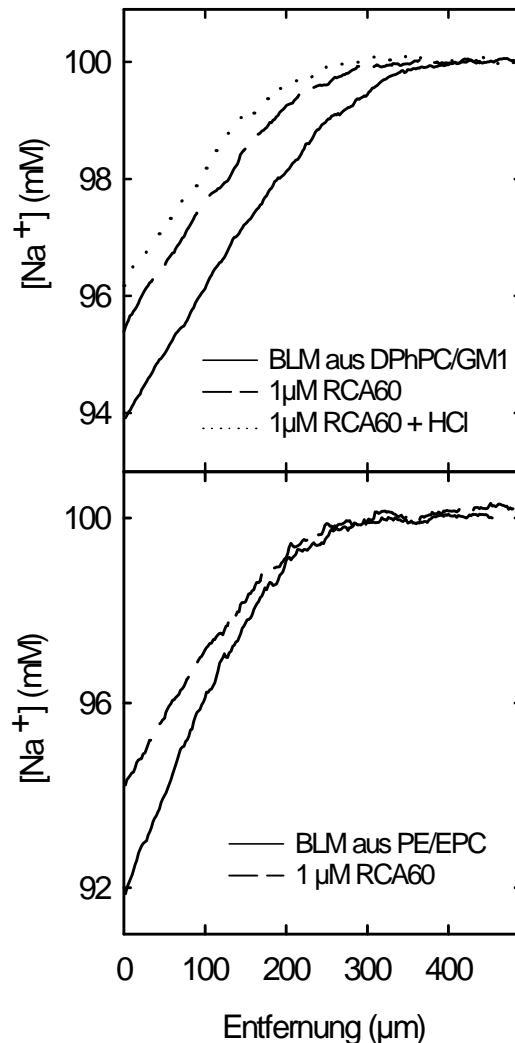


Abbildung 18 Konzentrationsprofile von Natriumionen bei verschiedenen Geschwindigkeiten der Magnetrührer. Die oberflächennahe Konzentration verringert sich mit zunehmender Konvektion (von unten nach oben) während der Konzentrationsgradient konstant bleibt. Die Harnstoffkonzentration auf der hypertонischen Seite der Membrane betrug 600 mM. Die BLM bestanden aus Asolektin.

5.2 Lectininduzierte Änderung von Wasserpermeabilität und Oberflächenhydrophobizität einer Membran

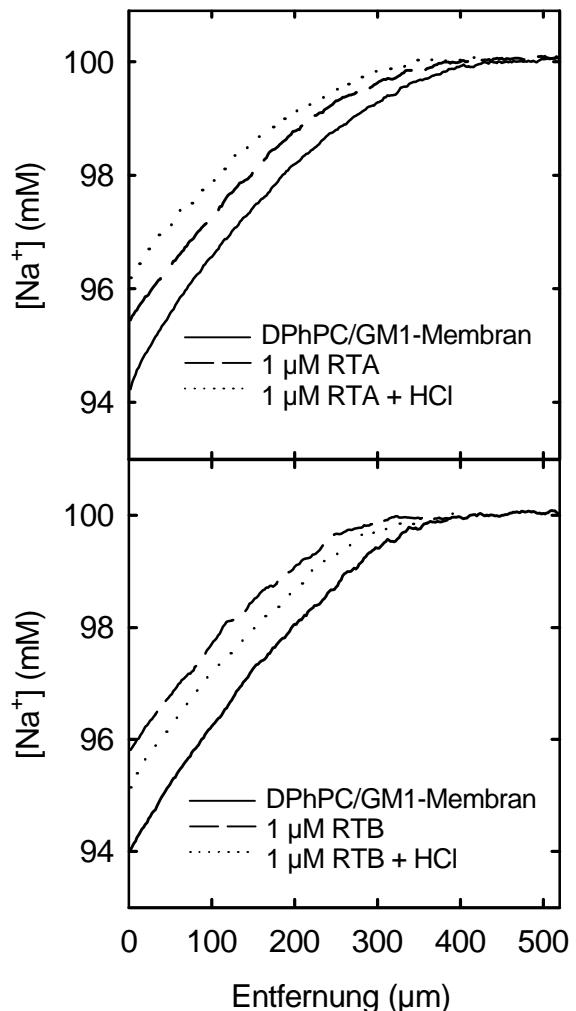
Weder Leitfähigkeit noch Kapazität ebener Membranen wurden durch die Zugabe der RIP beeinflusst. Erstere lag bei $1,2 \pm 0,3 \text{ nS cm}^{-2}$, $1,7 \pm 0,3 \text{ nS cm}^{-2}$ beziehungsweise $28 \pm 1 \text{ nS cm}^{-2}$, für Bilipidschichten aus DPhPC/GM1, EPC/PE und EPC/Ergosterol. Die jeweiligen Membrankapazitäten betrugen

Abbildung 19 Gemittelte Natriumkonzentrationsprofile auf der trans-Seite einer aus 90 mol % DPhPC und 10 mol % Mono-sialogangliosid (50 mol % PE und 50 mol % EPC) hergestellten ebenen Bilipidmembran. Der osmotische Wasserfluss wurde von 0,8 M Harnstoff induziert. 1 μM RCA60 verminderten die membrannahe Polarisation der Natriumionen. Die entsprechenden hydraulischen Permeabilitäten, P_f betrugen 25 $\mu\text{m/s}$ (47 $\mu\text{m/s}$) und 23 $\mu\text{m/s}$ (33 $\mu\text{m/s}$). Eine anschließende pH-Senkung von 7.5 auf 4.5 führte zu einer Senkung von P_f auf 21 $\mu\text{m/s}$. Der Puffer bestand aus 10 mM TRIS, 10 mM MES und 100 mM NaCl.



$0,39 \pm 0,7 \mu\text{F cm}^{-2}$, $0,42 \pm 0,5 \mu\text{F cm}^{-2}$ und $0,47 \pm 0,6 \mu\text{F cm}^{-2}$. Es kann folglich ausgeschlossen werden, dass sich der Lösungsmittelgehalt ebener Membranen durch die Zugabe der RIP verändert. Auch kann eine eventuelle Erhöhung der Wasserpermeabilität nicht auf Porenbildung zurückgeführt werden. Dieses Ergebnis widerspricht Literaturdaten, denen zufolge RCA60 die Erhöhung der Leitfähigkeit ebener Bilipidmembranen aus Glycerolmonooleat induziert [Kayser et. al, 1981]. Fehlender Carboxifluorescein-Verlust von

Abbildung 20 Wirkung der A- und B-Ketten von RCA60 auf die Konzentrationspolarisation. Gezeigt sind gemittelte Profile (4 - 6 Experimente). Der GM1-Gehalt der DPhPC-Membran belief sich auf 10 mol %. Die experimentellen Bedingungen glichen ansonsten denen in Abb. 19. Die A-Kette induzierte eine Verminderung von P_f von 25 $\mu\text{m}/\text{s}$ auf 19 $\mu\text{m}/\text{s}$ (pH 7.5) bzw. 17 $\mu\text{m}/\text{s}$ (pH 4.5). Die B-Untereinheit hingegen bewirkte einen Abfall von P_f auf 20 $\mu\text{m}/\text{s}$ (pH 7.5) bzw. 21 $\mu\text{m}/\text{s}$.



mit RCA60 behandelten Liposomen [Utsumi et. al, 1984] spricht allerdings auch gegen die hypothetische Kanalbildung.

RCA60, RCA120 und MLI hatten keine Wirkung auf die hydraulische Permeabilität (P_f) reiner DPhPC-Membranen. Die im Beisein der RIP gemessenen Natriumkonzentrationsprofile waren nicht von denen in ihrer Abwesenheit aufgezeichneten zu unterscheiden. Erst der Einbau von Mono-sialogangliosid GM1 (10 mol %), das als Lectinrezeptor fungiert [Utsumi et. al, 1987; Tonevitsky et. al, 1990], versetzte RCA60 in die Lage, P_f messbar zu beeinflussen (Abb. 19). Allerdings ist der Effekt gering. Er ist vergleichbar mit

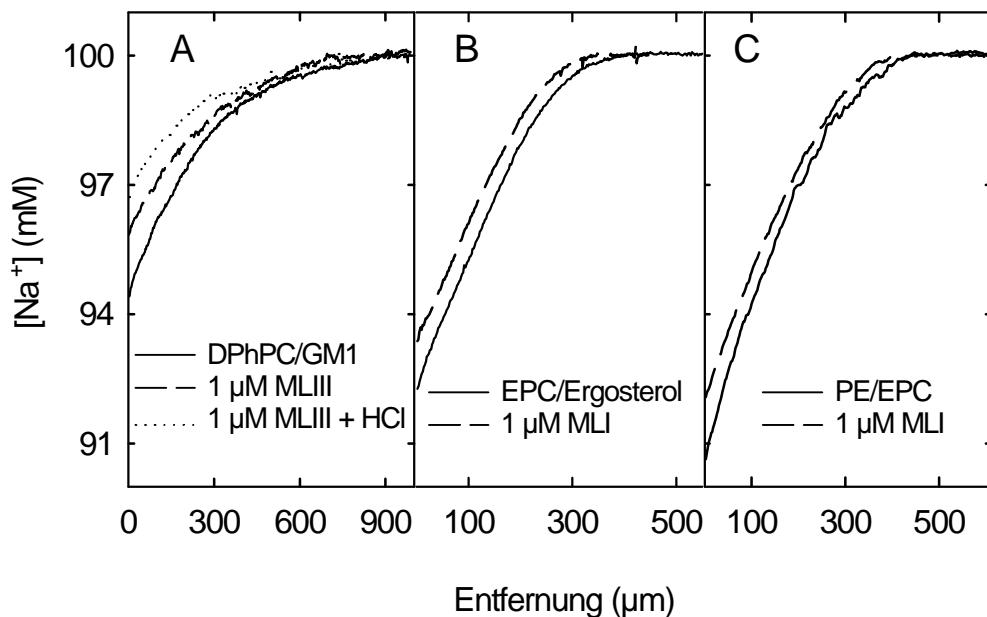
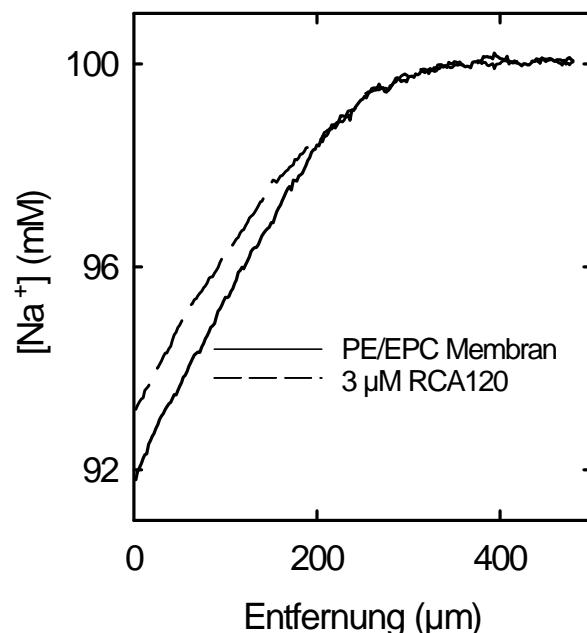


Abbildung 21 Repräsentative Natriumkonzentrationsprofile, die vor und nach der Zugabe von: (A) 1 μM Mistletoe lectin III zu einer DPhPC/GM1-Membran, (B) 1 μM Mistletoe lectin I zu einer PE/EPC-Membran oder (C) 1 μM Mistletoe lectin I zu einer EPC/Ergosterol-Membran gemessen wurden. Die berechneten hydraulischen Permeabilitäten betrugen jeweils (A) 25 und 17 $\mu\text{m}/\text{s}$, (B) 47 und 36 $\mu\text{m}/\text{s}$ und (C) 34 und 30 $\mu\text{m}/\text{s}$. Im Fall (A) wurden 14 $\mu\text{m}/\text{s}$ nach einem pH-Sprung von 7,5 auf 4,5 registriert. Triebkraft des Volumenflusses waren 600 mM (A) oder 800 mM (B, C) Harnstoff. Bis auf die geringere Rührgeschwindigkeit glichen die experimentellen Bedingungen denen in Abb. 19.

den Abweichungen, die gewöhnlich zwischen den Permeabilitäten verschiedener Membranen bestehen (das Verhältnis von Ausgangs- zu Endwert der Membranpermeabilität beläuft sich auf $0,92 \pm 0,05$). Anhand der Na^+ -Konzentrationsverteilung konnte nachgewiesen werden, dass eine Senkung des pH-Wertes von 7,5 auf 4,5 von einer weiteren Reduzierung der hydraulischen Permeabilität von $23 \mu\text{m/s}$ auf $21 \mu\text{m/s}$ begleitet wird. Die Bindung an den Galaktose enthaltenden Rezeptor GM1 war spezifisch, wie die Wiederherstellung der ursprünglichen osmotischen Permeabilität von $25 \mu\text{m/s}$ nach Galaktosezugabe (1 mM) zur Pufferlösung beweist. Auch der pH-Effekt war umkehrbar. Nach erneuter Einstellung eines neutralen pH-Wertes in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ RCA60 oder nach Neuformierung einer geplatzten Membran im sauren Milieu betrug P_f $23 \mu\text{m/s}$. Kontrollexperimente haben ergeben, dass die hydraulische Permeabilität eiweißfreier Bilipidschichten aus einem DPhPC/GM1-Gemisch im Intervall von 4,5 bis 7,5 nicht vom pH-Wert abhängt.

Analog zu RCA60 sind auch die von RTA hervorgerufenen Effekte eine Funktion des pH-Wertes. Abb. 20 zeigt Na^+ -Konzentrationsprofile, die in der Nähe einer GM1-haltigen Membran gemessen wurden. P_f sank von 25 auf $19 \mu\text{m/s}$ bei einem pH-Wert von 7,5 und verringerte sich weiter auf $17 \mu\text{m/s}$

Abbildung 22 Änderungen gemittelter Natriumkonzentrationsprofile in der Nähe einer PE/EPC - Membran (50 mol % beide), verursacht durch die Zugabe von $3 \mu\text{M}$ RCA120. Die korrespondierenden P_f -Werte beliefen sich auf $46 \mu\text{m/s}$ (durchgezogene Linie) bzw. $39 \mu\text{m/s}$ (gestrichelte Linie). Alle übrigen Bedingungen glichen denen in Abb. 19

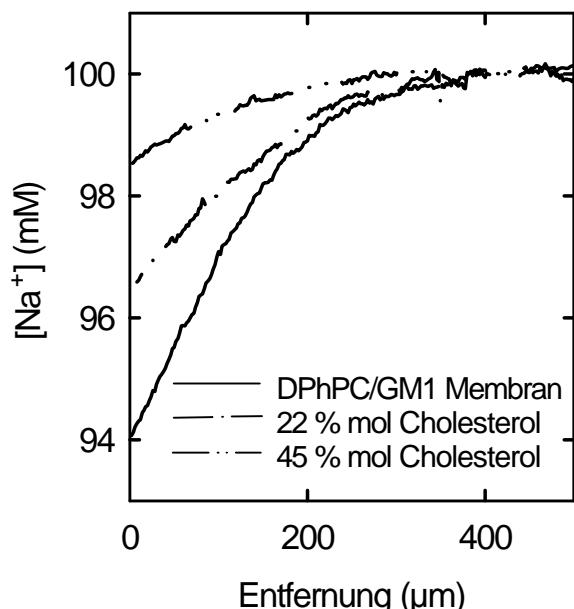


bei pH-Wert 4,5. Das Verhältnis der anfänglichen Wasserpermeabilität zu der in Gegenwart von RTA gemessenen unterschied sich nicht für GM1-haltige und GM1-freie Membranen und wurde auch durch die Zugabe von Galaktose nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da nur die B-Kette von RCA60 Galaktoseaffinität besitzt. RTB entwickelte den maximalen Effekt bei neutralem pH-Wert. Eine Permeabilität von $20 \mu\text{m/s}$ wurde nach dem Zusatz von $1 \mu\text{M}$ RTB gemessen (Abb. 20). Eine Senkung des pH-Wertes führte nicht zu einer stärkeren Bindung von RTB an die BLM ($P_f = 21 \mu\text{m/s}$).

Im Fall von DPhPC-Membranen reduzierten die Lectine die Parameter P_f und e am wirksamsten im saurem Milieu, vorausgesetzt, dass ein Lectinrezeptor integriert worden ist. Am wahrscheinlichsten entspricht die geringere osmotische Permeabilität bei niedrigen pH-Werten einer Konformationsänderung der A-Kette, weil nur die isolierte A-Kette eine Drosselung von P_f im sauren pH-Bereich induzierte.

Bei neutralem pH-Wert reduzierten sowohl MLI als auch MLIII die hydraulische Leitfähigkeit einer 10 mol % GM1 enthaltenden BLM. Der Effekt dieser Lectine, wie auch schon der von RCA60 und RTA, war im sauren Milieu am größten. Die in Abb. 21 gezeigten Profile entsprechen einer Ver-

Abbildung 23 Der Effekt von Cholesterin auf repräsentative Natriumkonzentrationsprofile in Membrannähe. Die Membranen bestanden aus 90 mol % DPhPC, 10 mol % GM1 (—); 68 mol % DPhPC, 10 mol % GM1 und 22 mol % Cholesterin (—); 45 mol % DPhPC, 10 mol % GM1 und 45 mol % Cholesterin (—). P_f betrug 26, 19 und $12 \mu\text{m/s}$. Die experimentellen Bedingungen glichen denen in Abb. 19.

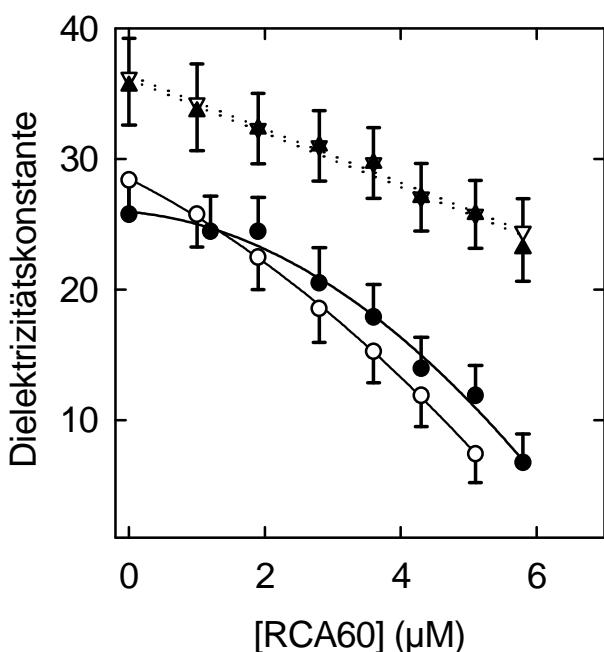


ringierung der hydraulischen Permeabilität von 25 $\mu\text{m}/\text{s}$ auf 17 $\mu\text{m}/\text{s}$ bei pH 7,5 und auf 14 $\mu\text{m}/\text{s}$ im sauren Milieu. Nach Zusatz von Galaktose, die sich kompetitiv zur endständigen Galaktose des Membranrezeptors verhält [Lee et. al, 1994], konnte ein erneuter Anstieg von P_f auf den anfänglichen Wert von 25 $\mu\text{m}/\text{s}$ beobachtet werden.

Der Effekt der RIP auf die Wasserpermeabilität von DPhPC/GM1-Membranen wurde mit dem von Cholesterin verglichen. Letzteres verdrängt Wasser aus zentralen Gebieten der Bilipidschicht und verringert dadurch P_f [Subczynski et. al, 1994]. In saurem Millieu ist MLIII beinahe so effektiv wie Cholesterin in der höchsten, einer Bilipidschicht zusetzbaren Konzentration. 45 mol % Cholesterin in der Lipidlösung, die zur Formierung der Membran benutzt wurde, reduzierten unter unseren Bedingungen P_f auf 12 $\mu\text{m}/\text{s}$ (Abb. 23). Die Hälfte dieser Cholesterolkonzenztration induziert einen Effekt der vergleichbar mit dem bei physiologischen pH-Werten von MLI, MLIII, RTA oder RTB hervorgerufenen ist (Abb. 23).

Im Unterschied zu RCA60 beeinflusste das strukturell sehr ähnliche Agglutinin RCA120 die hydraulischen Membranpermeabilität einer reinen oder 10

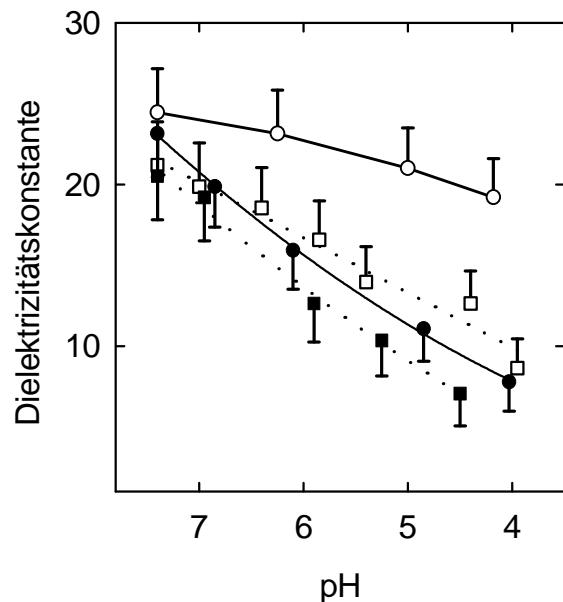
Abbildung 24 Oberflächendielektrizitätskonstante unilamellärer Vesikel aus DPhPC (Dreiecke) oder aus einem Lipidgemisch (20 mol % PS, 20 mol % Ergosterol, 10 mol % PC, 50 mol % PE; Kreise) nach Zugabe von RCA60. Schwarze Kreise oder Dreiecke kennzeichnen die zusätzliche Inkorporation von 10 mol % GM1 in die Modellmembranen.



mol% GM1 enthaltenden DPhPC Membran weder im physiologischen noch im sauren pH-Bereich, obwohl seine Konzentration auf bis zu 5 μM gesteigert wurde. Membranen, die aus einer equimolaren Mischung von EPC und PE oder EPC und Ergosterol hergestellt waren, traten effektiver mit dem Agglutinin in Wechselwirkung. Der Zusatz von 3 μM RCA120 verringerte P_f nachweislich (Abb. 22). Die Permeabilität von Membranen dieser Zusammensetzung war im Beisein von MLI (Abb. 21), MLIII oder RCA60 (Abb. 19) stark rückläufig. Hier brachte die Erhöhung der Konzentration über 1 μM keinen zusätzlichen Effekt.

Diese erheblichen Veränderungen der hydraulischen Leitfähigkeit der Bilipidschicht sind das Ergebnis unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Membran und hydrophoben Domänen der Proteine, die im Verlauf der Membranbindung wahrscheinlich Wasser von der Grenzfläche verdrängen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die lectininduzierte Zunahme der Oberflächenhydrophobizität der Membran erfasst. Letztere ist als Reduzierung der

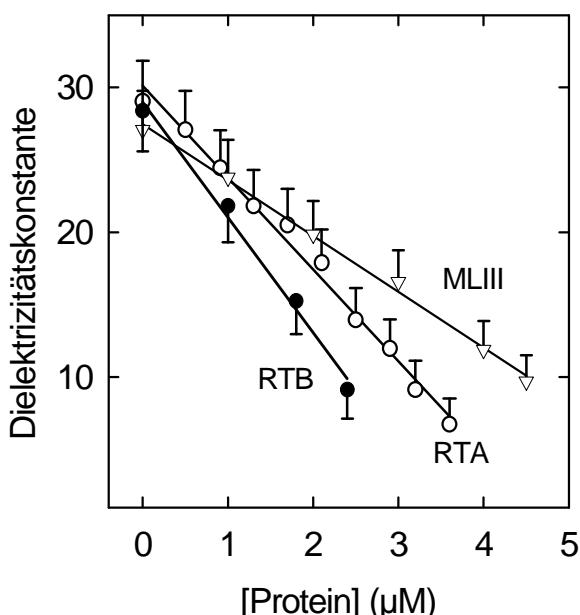
Abbildung 25 pH-Abhängigkeit der Oberflächendielektrizitätskonstanten unilamellarer Vesikel, die mit 5,8 μM (Kreise) oder 3,0 μM (Quadrat) RCA60 vorbehandelt wurden. Die Vesikel bestanden aus DPhPC (Kreise) oder einem Lipidgemisch (20 mol % PS, 20 mol % Ergosterol, 10 mol % PC, 50 mol % PE; Quadrat). Schwarze Kreise oder Quadrate kennzeichnen die zusätzliche Inkorporation von 10 mol % GM1 in die Modellmembranen.



scheinbaren Dielektrizitätskonstante im Kopfgruppenbereich der Phospholipiddoppelschicht messbar [Kimura und Ikegami, 1985]. Für die Registrierung der lokalen Polarität wurde eine fluoreszierende Sonde benutzt. Vesikuläre DPhPC-Membranen, die 1 % DPE enthielten, wiesen eine Dielektrizitätskonstante von 32 bis 35 auf (Abb. 24). Dieser Wert entspricht den Literaturdaten für Phosphatidylcholinmembranen [Kimura und Ikegami, 1985; Ohki und Arnold, 1990].

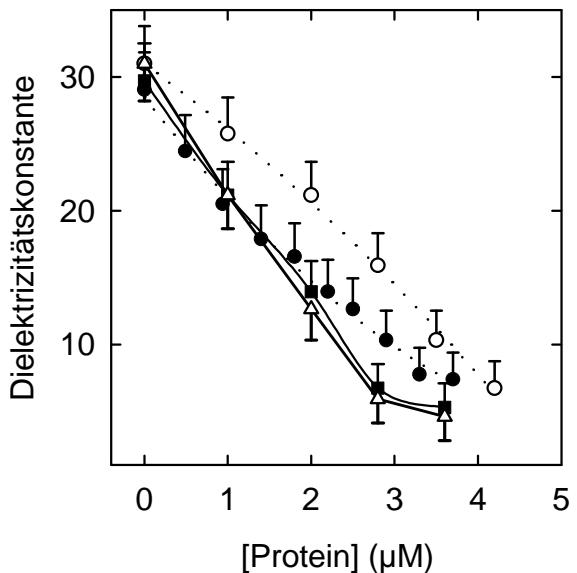
Die Experimente an Liposomen erforderten eine höhere Proteinkonzentration als die an ebenen Membranen. Ein direkter Vergleich der Konzentration ist jedoch wenig zweckdienlich, weil das Protein-Lipid-Verhältnis in BLM-Versuchen nur schwer zu beurteilen ist. RCA60 zeigte einen moderaten Effekt auf die Oberflächendielektrizitätskonstante von DPhPC-Vesikeln, der auch nicht durch den Einbau von 10 mol % GM1 in die Bilipidschicht erhöht wurde (Abb. 24). Während der Farbstoff im Gebiet des Glycerolgerüsts der Bilipidschicht gefunden wird [Waggoner und Stryer, 1970], ragt der Oligosaccharidanteil des GM1-Moleküls weit über die PC-Kopfgruppe in die wässrige Phase hinein, d. h. die von der Bilipidschichtoberfläche ausgehende GM1-Kopfgruppe ist beinahe vollständig gestreckt [McIntosh und Simon,

Abbildung 26 Dielektrizitätskonstante an der Oberfläche unilamellarer aus 50 mol % PC und 50 mol % PE bestehender Vesikel nach Zugabe von MLIII (Dreiecke), RTB (leere Kreise) oder RTB (gefüllte Kreise). Der pH-Wert betrug 7,4.



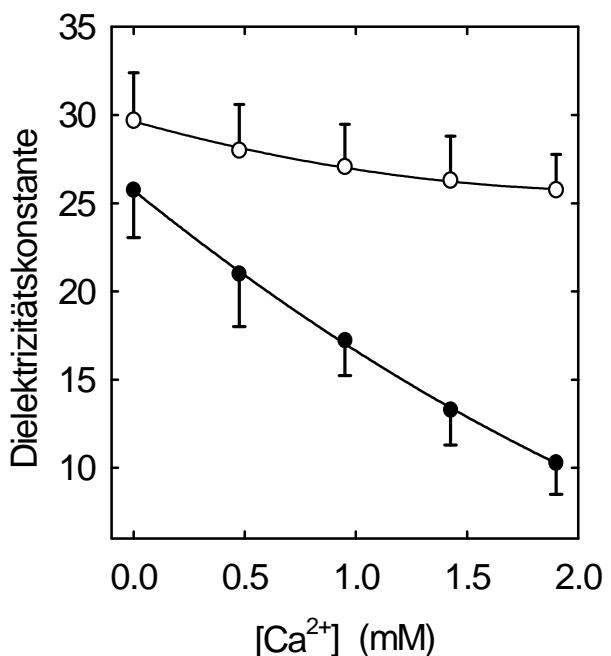
1994]. Nach Ansäuerung sank die Polarität der Membranoberfläche unter 12. Dieser deutliche Effekt wurde nur in der Gegenwart von GM1 in der vesikulären Membran (10 mol%) beobachtet (Abb. 25). Diese Beobachtung geht mit einem Literaturbericht konform, demzufolge RCA60 bei neutralem pH-Wert an endständige Galaktose auf der Membranoberfläche bindet, um dann bei Ansäuerung mit der Bilipidschicht zu assoziieren [Utsumi et. al, 1987]. Ausgehend davon wurde angenommen, dass die spezifische Bindung an den Rezeptor (GM1) Voraussetzung für hydrophobe Protein-Lipid-Wechselwirkungen sei. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ist das nur für vollständig gesättigte DPhPC-Membranen korrekt. Abb. 24 zeigt, dass RCA60 sehr effizient mit Bilipidschichten in Wechselwirkung tritt, die aus einem Lipidgemisch (50 mol % PE, 20 mol % PS, 10 mol % EPC, 20 mol % Ergosterol) bestehen. Das gleiche gilt für MLIII (Abb. 26) und alle anderen der untersuchten RIP. Der Einbau von 10 mol% GM1 fördert nur die proteininduzierte Dehydratation im sauren Milieu (Abb. 27). Auch die Oberfläche vollständig ungeladener Membranen (50 mol % EPC und 50 mol % PE) wird

Abbildung 27 e an der Oberfläche unilamellarer Vesikel nach der Zugabe von MLI (gestrichelte Linie) oder RCA120 (volle Linie). Die Liposomen bestanden aus 50 mol % PC und 50 mol % PE (schwarze Quadrate und Kreise) oder aus 50 mol % PC und 50 mol % Ergosterol (Dreiecke) oder aus einem Lipidgemisch (20 mol % PS, 20 mol % Ergosterol, 10 mol % PC, 50 mol % PE; weiße Kreise).



dehydratisiert (Abb. 27). Elektrostatische Anziehung oder Abstoßung sind offensichtlich von untergeordneter Bedeutung da weder GM1, das eine negative Ladung pro Molekül trägt, noch das geladene Phosphatidylserin (20 mol %) in der Lage waren, die Änderungen der Oberflächenhydrophobizität zu inhibieren oder zu katalysieren (Abb. 24, 25, 27). Die Substitution von PE durch Ergosterol, zum Beispiel, hatte keinen Einfluss auf den dehydratisierenden Effekt von RCA120 (Abb. 27). In Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen [Hoekstra und Düzgünes, 1986] konnte ein modulierender Effekt von RCA120 auf Ca^{2+} -Lipid-Wechselwirkungen beobachtet werden (Abb. 28). Freies Ca^{2+} in einer Konzentration unter 1 mM reichte aus, um einen Abfall von ϵ unter 12 zu induzieren, ein Wert bei dem Membranfusion möglich wird [Ohki und Arnold, 1990; Köhler et. al, 1997].

Abbildung 28 Der Effekt von Ca^{2+} auf die Oberflächendielektrizitätskonstante unilamellärer Vesikel (20 mol % PS, 20 mol % Ergosterol, 10 mol % PC, 50 mol % PE), die mit 0,7 μM RCA120 (schwarze Kreise) inkubiert wurden. Die Dielektrizitätskonstante unbehandelter Vesikel (weiße Kreise) war nahezu konstant. Die Pufferlösung (pH 7,4) enthielt 1 mM EDTA.



5.3 Substratspezifische Grenzschichtdicke

Membrannahe Konzentrationsprofile von Kalziumionen wurden gleichzeitig mit der Verteilung von Natrium- oder Kaliumionen erfasst. In dem in Abb. 29 gezeigten repräsentativen Beispiel betragen die aus dem exponentiellen Konzentrationsprofil (Gleichung 34) abgeleiteten Dicken der ungerührten Schichten 153 μm für K^+ bzw. 116 μm für Ca^{2+} . Die den Na^+ - und Ca^{2+} -Profilen zugehörigen Dicken unterschieden sich mit 130 μm bzw. 105 μm ebenfalls deutlich voneinander (Abb. 30). Die Abweichungen zwischen den für die jeweiligen Ionen gefundenen d waren signifikant, wie die nachfolgende Wiederholung der Experimente (10 Wiederholungen pro Ionenpaar) bewies. Die Werte für d differierten jeweils um weniger als 10%. Überdies stellte die Verwendung von doppelläufigen Mikroelektroden sicher, dass die Konzen-

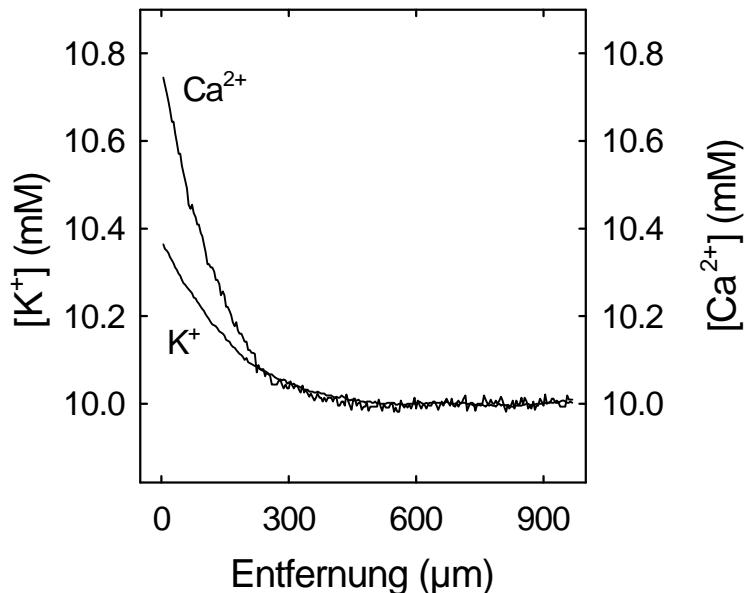


Abbildung 29 Repräsentative Kalzium- und Kaliumkonzentrationsprofile auf der trans-Seite einer BLM. Mit Hilfe einer doppelläufigen Mikroelektrode wurden beide Profile gleichzeitig registriert. Der Zusatz von 0,8 M Harnstoff auf der cis-Seite induzierte einen transmembranen Volumenfluss. Die Pufferlösung auf beiden Seiten enthielt 10 mM Tris, 10 mM Mes, 10 mM KCl, 10 mM CaCl_2 . Mit Hilfe einer nichtlinearen Regression (Gleichung 34) wurden aus den exponentiellen Profilen die Ausdehnungen der USL von K^+ und Ca^{2+} mit 153 und 116 μm bestimmt.

trationsverteilungen beider Ionen unter absolut gleichen Bedingungen gemessen wurden. Experimentelle Fehler, wie beispielsweise geringfügige Änderungen der Rührgeschwindigkeit oder der Temperatur, konnten so ausgeschlossen werden.

Die experimentellen Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit theoretischen Voraussagen (Gleichung 14). Zwei simultan gemessene d verhalten sich zueinander wie die dritten Wurzeln ihrer Diffusionskoeffizienten ($D_K = 1,96 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_{Na} = 1,33 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_{Ca} = 7,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Für die simultan gemessenen Kationenprofile ($\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ und $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$) ist Gleichung 14 erfüllt (vgl. Abb. 33).

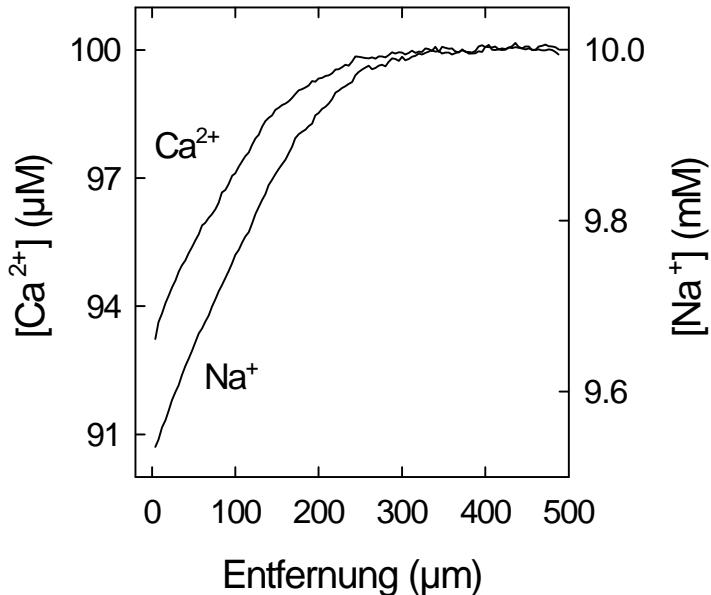


Abbildung 30 Repräsentative Kalzium- und Natriumkonzentrationsprofile auf der cis-Seite der BLM. Sie wurden mit einer doppelläufigen Mikroelektrode gleichzeitig aufgezeichnet. 0,3 M Cholinchlorid auf der cis-Seite induzierte einen transmembranen Wasserfluss. Die Pufferlösung auf beiden Seiten enthielt 10 mM Tris, 10 mM Mes, 10 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 . Mit Hilfe einer nichtlinearen Regression (Gleichung 34) wurden aus den exponentiellen Profilen die Ausdehnungen der USL von Na^+ und Ca^{2+} mit 130 und 105 μm bestimmt.

In einer nachfolgenden Serie von Experimenten wurden Konzentrationsprofile in Abwesenheit eines osmotischen Gradienten gemessen. Der Transport

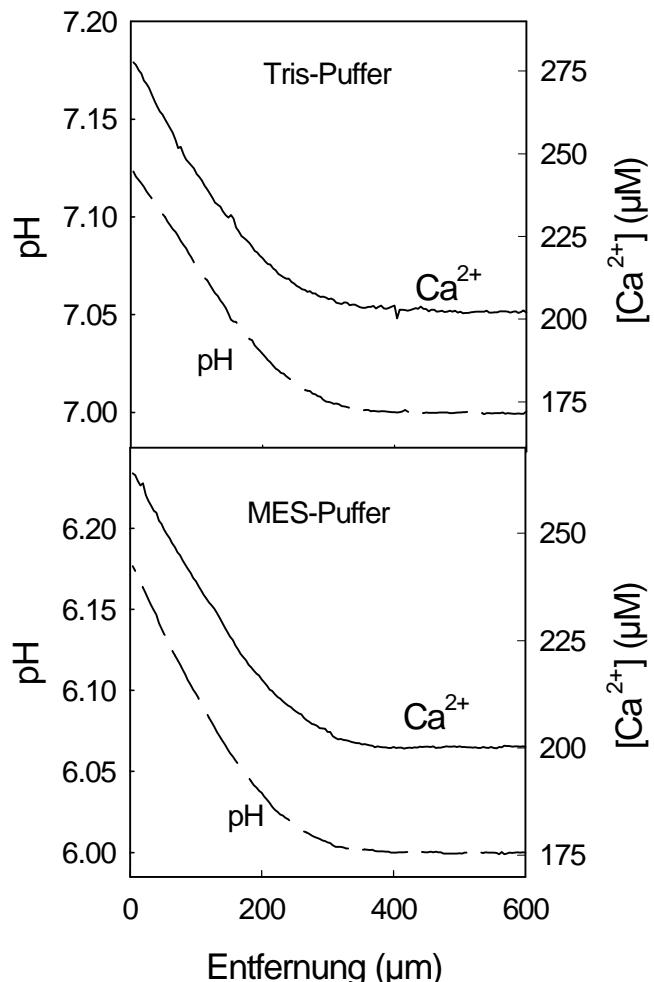


Abbildung 31 Repräsentative Kalziumkonzentrations- und pH-Profile induziert von A23187. Die Konzentration des Ionophors im cis-Kompartiment betrug 5 µM. Die doppel-läufige Mikroelektrode befand sich auf der trans-Seite der Membran. Die wässrige Phase enthielt 0,1 (0,1) M Cholin-chlorid und 2,0 (0,2) mM CaCl₂ auf der cis- (trans-) Seite der BLM. Obere Tafel: Die Lösungen auf beiden Seiten der Membran waren mit 1 mM Tris gepuffert. Der Unterschied in den vom Ca²⁺- (135 µm) und pH-Profil (139 µm) abgeleiteten Dicken der USL ist nicht signifikant. Untere Tafel: Die Lösungen auf beiden Seiten der Membran waren mit 1 mM MES gepuffert. Die für das Ca²⁺- (148 µm) und das pH-Profil (130 µm) ermittelten **d** unterscheiden sich geringfügig.

entlang eines Kalzium- oder Kaliumkonzentrationsgradienten wurde nach Einbau der Ionophore A23187 oder Nigericin in die BLM beobachtet. Ziel war die Verifizierung von Gleichung 14 für die gleichzeitige Diffusion von Kalzium, MES oder Tris. Die Diffusionskoeffizienten der Puffer ($D_{MES} = 4.9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$, $D_{Tris} = 6.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$) wurden aus ihrer molekularen Masse berechnet. Repräsentative Kationenkonzentrations- und pH-Profile werden von Abb. 31 wiedergegeben. Übereinstimmend mit den theoretischen Vorhersagen konnte keine signifikante Differenz zwischen den Dicken der USL von Ca^{2+} (135 μm) und Tris (139 μm) beobachtet werden. Auch die simultan für Ca^{2+} (148 μm) und MES (130 μm) gemessenen d differieren nur leicht (Abb. 31). Einen überzeugenden Beweis für die These substanzabhängiger Schichtdicken lieferten Experimente, in denen A23187 durch Nigericin ersetzt wurde (Abb.

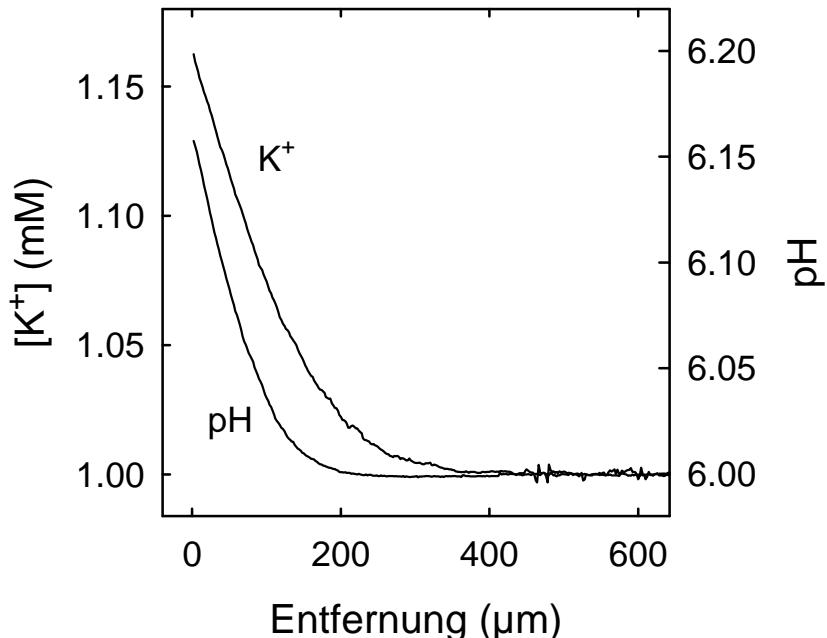


Abbildung 32 Simultan gemessene K^+ -Konzentrations- und pH-Profil. Die Pufferlösung bestand aus 1 (1) mM MES, 0,1 (0,1) M Cholinchlorid und 1 (10) mM KCl auf der trans- (cis-) Seite der BLM. 16 μM Nigericin wurden dem cis-Kompartiment zugegeben. Die Schichtdicken für K^+ und für MES (abgeleitet aus dem pH-Profil) beliefen sich auf 108 bzw. 67 μm .

32). Da K^+ -Ionen viel schneller als MES-Moleküle diffundieren, war auch ihre USL wesentlich ausgedehnter (108 und 67 μm entsprechend). Aufgrund der höheren Rührgeschwindigkeit in diesem Experiment waren die Schichtdicken kleiner als die in den Abbildungen 29 bis 31 gezeigten.

Alle Experimente sind in Abb. 33 zusammengefasst. Mit Rücksicht auf Unterschiede in den experimentellen Bedingungen (z.B. Rührgeschwindigkeit) ist der Quotient simultan gemessener Schichtdicken anstelle der absoluten Werte aufgetragen. Sowohl im Falle einer transmembranen Volumenströmung als auch des Ionentransports ist die Dicke der USL eine Funktion des Diffusionskoeffizienten.

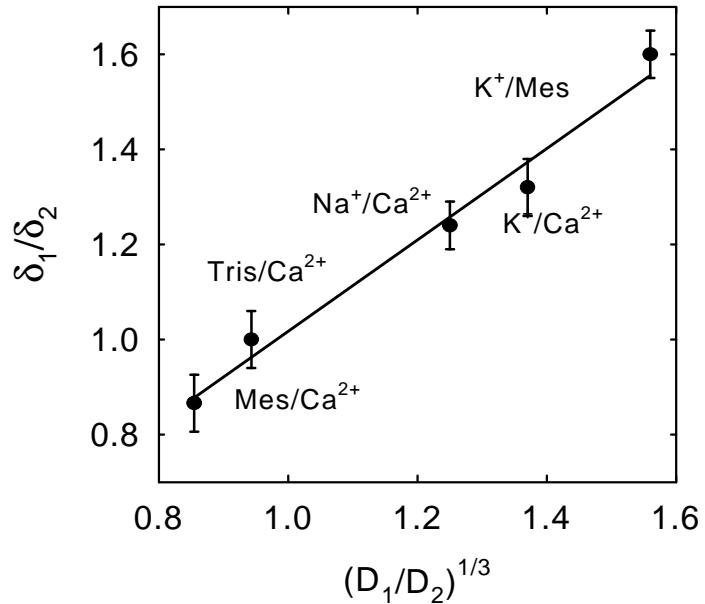


Abbildung 33 Alle unter den in Abb. 29 - 32 gezeigten Bedingungen ausgeführten Experimente wurden zusammengefasst, um die Abhängigkeit der Dicke der USL vom Diffusionskoeffizienten zu zeigen. Mit Rücksicht auf Unterschiede in den experimentellen Bedingungen (z.B. Rührgeschwindigkeit) ist der Quotient simultan gemessener Schichtdicken anstelle der absoluten Werte aufgetragen.

5.4 Volumenfluss durch Gramicidinkanäle

Unter Verwendung einer doppelläufigen Mikroelektrode erfolgte die zeitgleiche Aufzeichnung von Kalzium- und Natriumkonzentrationsprofilen (Abb. 34). Die aus den Profilen auf beiden Seiten der ebenen Membran berechnete Geschwindigkeit des durch 0,3 M Cholinchlorid induzierten transmembranen Volumenflusses betrug $1,2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$. In der ungerührten Schicht auf der cis-Seite war eine Verarmung an Ionen zu registrieren, da der osmotische Fluss diese von der Membran wegtransportierte. Im Gegensatz dazu brachte der osmotische Fluss Ionen in die trans-USL. Die Zugabe von

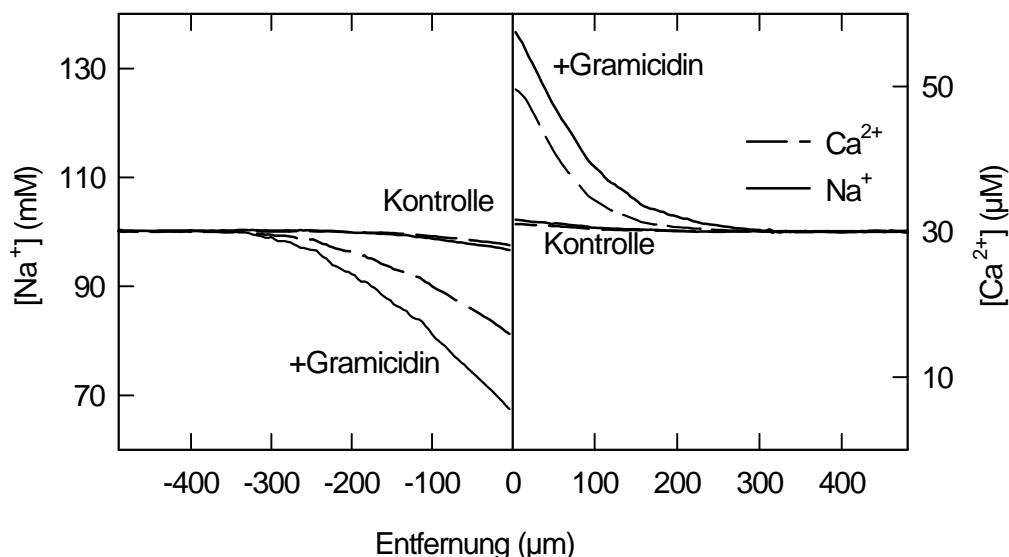


Abbildung 34 Repräsentative Kalzium- und Natrium-Konzentrationsprofile im offenen Stromkreis. Die Zugabe von 0,3 M Cholinchlorid zur cis-Seite induzierte einen transmembranen Massenfluss ($1,2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). Dieser riss Kationen aus der trans-USL mit und brachte Kationen zur cis-USL (Kontrolle). Die Zugabe von Gramicidin (Endkonzentration 3 $\mu\text{g/ml}$) erhöhte die Polarisation erheblich. Ein transmembraner Natriumfluss wurde nicht registriert. Der aus den Kalzium- und Natriumprofilen zu beiden Seiten der Membran berechnete Wasserfluss belief sich auf $17 \mu\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Der Puffer enthielt 10 mM Tris und MES, 100 mM NaCl und 30 μM Ca²⁺. Der pH-Wert betrug 7,5.

Gramicidin erhöhte die Polarisationseffekte in hohem Maße. Ursache war der Anstieg des Wasserflusses von 6 auf $17 \mu\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$, der aus den Gradienten der impermeablen Kalziumionen vor und nach der Gramicidinzugabe berechnet (Gleichung 17) wurde. Ein Transport der Natriumionen durch die Membran fand nicht statt, da auch die Natriumkonzentrationsprofile auf beiden Seiten der Membran oben genannten Wert ergaben. Aufgrund der in beiden Kompartimenten zu wahren Elektroneutralität, war ein anderes Ergebnis auch nicht zu erwarten, d. h. in einem offenen Stromkreis ist ein Nettoionenfluss durch

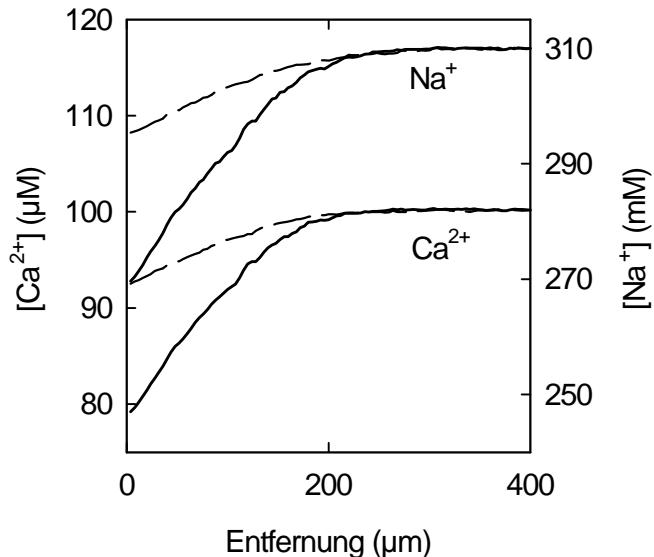


Abbildung 35 Repräsentative Kalzium- und Natriumkonzentrationsprofile auf der trans-Seite einer BLM. Der NaCl-Konzentrationsgradient (10 mM auf der cis- und 310 mM auf der trans-Seite) induzierte einen transmembranen Massenfluss. 0,5 µg/ml Gramicidin erhöhten ihn von $1,5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ auf $8 \mu\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Ein transmembraner Na^+ -Fluss war im offenen Stromkreis nicht nachweisbar. Die Pufferlösung enthielt 10 mM Tris, 10 mM MES und 0,1 mM CaCl_2 .

eine nur kationenselektive Poren enthaltende Membran nicht möglich [Dani und Levitt, 1981a].

Die Substitution des Cholinchloridgradienten durch einen Natriumchloridgradienten änderte nichts an dieser Tatsache (Abb. 35). Aus den im Bild gezeigten repräsentativen Kalzium- und Natriumkonzentrationsprofilen, deren Aufzeichnung mit doppelläufigen Mikroelektroden auf der trans-Seite einer mit Gramicidin modifizierten Membran erfolgte, ergab sich ein Volumenfluss von $8 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Auch in diesem Fall ließ sich ein transmembraner Natriumfluss

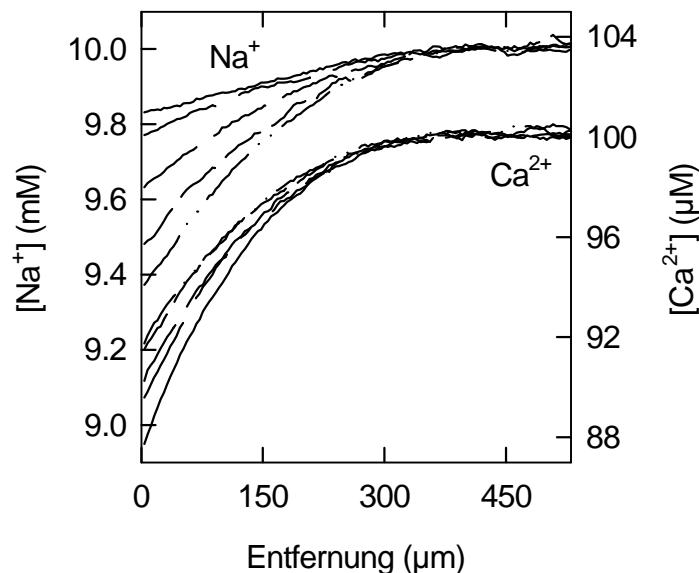
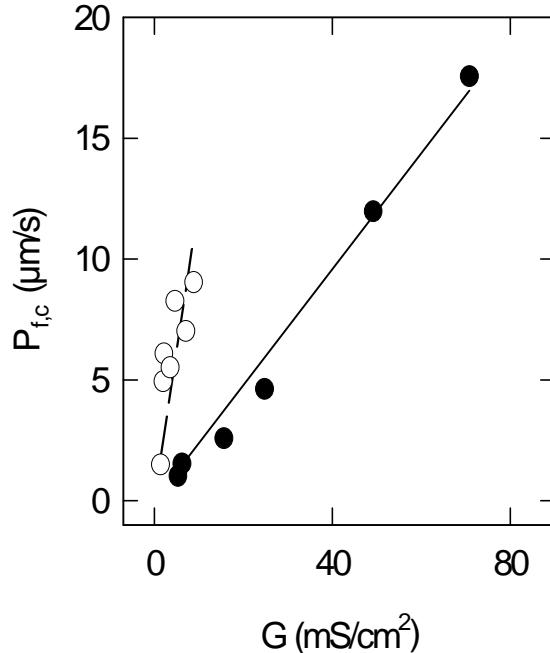


Abbildung 36 Die Verdünnung membranpermeabler Na^+ - und impermeabler Ca^{2+} -Ionen unter Kurzschlussbedingungen. Ihre Polarisation änderte sich durch Erhöhung der Gramicidinkonzentration symbolisiert durch die Strichlänge, Maximalwert (20 ng/ml) gegenläufig. Die in der Nähe einer gramicidinfreien Membran gemessenen Profile sind durch eine Strichpunktlinie gekennzeichnet. Die Pufferlösungen enthielten 10 mM Tris, 150 mM Cholinchlorid, pH 8,4. Das trans-Kompartiment, enthielt außerdem 1 M Harnstoff.

nicht nachweisen. Gramicidin verursachte nur ein Anwachsen des Wasserflusses, der sich in der kanalfreien Membran auf $1,5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ belief.

Im Unterschied zu den im offenen Stromkreis beobachteten Effekten war die Insertion von Kanälen in eine kurzgeschlossene Membran von einer Verringerung der osmotisch induzierten Polarisation der permeablen Kationen begleitet (Abb. 36). Verantwortlich für dieses Phänomen war deren transmembrane Migration. Eine steigende Anzahl von Gramicidinkanälen verlieh der Membran eine immer höhere Leitfähigkeit. Im Ergebnis wuchs auch die Anzahl der Ionen, die entlang ihres Konzentrationsgefälles durch die Membran diffundieren konnten. Mit Erreichen einer sehr hohen Kanaldichte verschwand der Konzentrationsgradient des monovalenten Kations (Abb. 36). Gleichzeitig verursachte der steigende transmembrane Volumenfluss eine stärkere Polarisation der impermeablen Kationen. Berechnet wurde die zusätzliche, porenvermittelte Wasserpermeabilität aus den Ca^{2+} -Konzentrationsprofilen. Aus dem

Abbildung 37 Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit des Einzelkanals. Grundlage war das in Abb. 4 gezeigte Experiment und zwei Wiederholungen desselben (●). Analoge Experimente wurden auch nach Verringerung der NaCl von 10 auf 1 mM durchgeführt (○). Der Anstieg der Regressionsgeraden entspricht einem $P_{f,c}$ von $1,4 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{s}^{-1}$ (○) bzw. $1,7 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{s}^{-1}$ (●).



experimentellen Datensatz wurde v als Regressionsparameter (Gleichung 17) bestimmt. Der Vergleich mit der unmodifizierten Membran ließ auf Dv schließen. Mit Hilfe der Gleichung 19 konnte dann in einem zweiten Schritt $P_{f,c}$ ermittelt werden. Die korrespondierende Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit ist in Abb. 37 wiedergegeben. Der Anstieg der linearen Regressionsgeraden in 10 bzw. 1 mM NaCl entspricht einem hydraulischen Leitwert von 1,7 bzw.

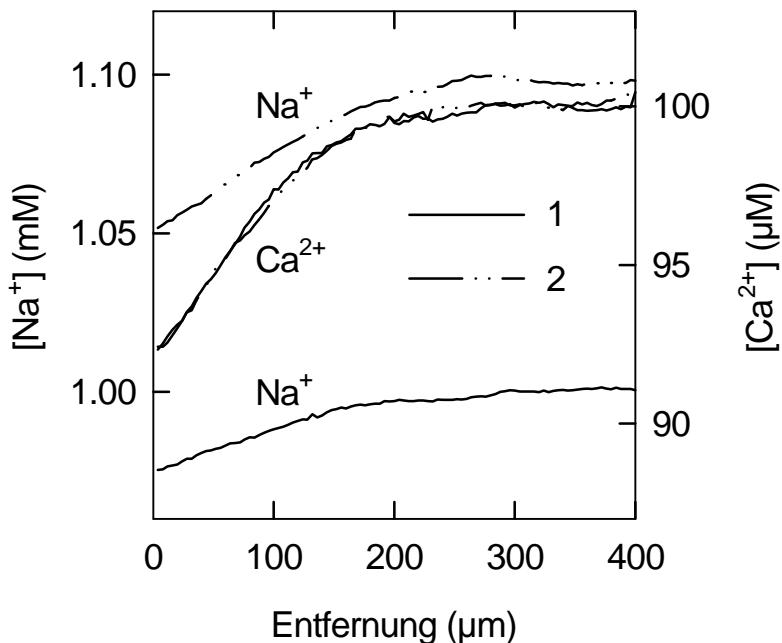


Abbildung 38 Solvent drag-Effekt. Unter Kurzschlussbedingungen (Experiment 1) erfolgt der Natriumnettotransport ($26 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durch Diffusion und Solvent drag (volle Linie). Die selektive Erhöhung der trans-Na⁺-Konzentration von 1 auf 1,1 mM minimierte ihren Konzentrationsgradienten und damit den Diffusionsanteil. Der verbleibende Solvent drag-Anteil war für einen Na⁺-Fluss von $16 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Strichpunktlinie) verantwortlich. Bei einer Leitfähigkeit von $0,74 \text{ mS cm}^{-2}$ entspricht das 5,2 Wassermolekülen, die sich mit einem Ion im Kanal befanden. Simultan durchgeführte Strommessungen ergaben $13 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ oder 4,4 Wassermoleküle.

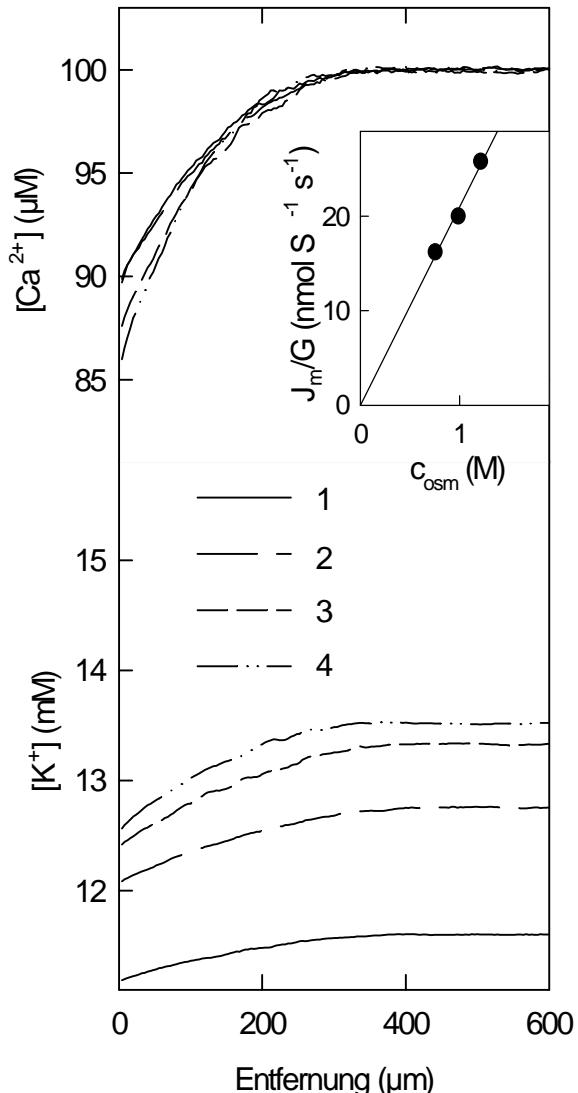
$1,4 \cdot 10^{-14}$ cm 3 s $^{-1}$ pro Kanal. Den Berechnungen gemäß Gleichung 30 liegt eine elektrische Einzelkanalleitfähigkeit von 5,1 pS [Andersen, 1983; Busath et. al, 1998] zugrunde. Diese an DPhPC-Membranen in 100 mM NaCl ermittelte Leitfähigkeit musste aufgrund der geringeren Elektrolytkonzentration im vorliegenden Experiment einer Korrektur unterzogen werden. In Anlehnung an eine Arbeit von Neher et al. [1978c] ergab diese eine Einzelkanalleitfähigkeit von 0,7 bzw. 0,11 pS für 10 bzw. 1 mM NaCl.

Neben der Wasserleitfähigkeit des Gramicidinkanals wurde auch der kompetitive Ionenfluss untersucht. Im ersten Experiment aus Abb. 38 beträgt die Natriumflussdichte 26 pmol cm $^{-2}$ s $^{-1}$. Ihre Bestimmung erfolgte durch nichtlineare Regression (Gleichung 21) im Intervall $0 < x < 50$ μm des experimentellen Datensatzes. Wie die Analyse der Ca $^{2+}$ -Konzentrationsverteilung (Gleichung 17) zeigte, ist in diesem Abschnitt die Bedingung $ax^2 << v$ erfüllt. Die Bestimmung aller drei Parameter J_m , v und $c_{p,s}$ ist im nämlichen Intervall nicht mit hinreichender Genauigkeit möglich. Eine befriedigende Regression mit Gleichung 21 gelang erst, nachdem v auf den aus dem Kalziumkonzentrationsprofil ermittelten Wert fixiert wurde. Für die beiden verbliebenen Parameter J und $c_{p,s}$ war die Standardabweichung kleiner als 5 % und die Parameterabhängigkeit größer als 98 %. Der gemäß dieser Prozedur aus dem zweiten Experiment von Abb. 38 ermittelte Na $^+$ -Fluss betrug 16 pmol cm $^{-2}$ s $^{-1}$. Die Differenz zwischen den Na $^+$ -Flüssen beider Experimente erwuchs aus dem Beitrag des pseudo-Solvent drag. Während im ersten Experiment sowohl pseudo-Solvent drag als auch echter Solvent drag zu verzeichnen waren, fehlte im zweiten Experiment die erstgenannte Komponente.

Die beiden Experimente (Abb. 38) unterschieden sich lediglich durch die An- bzw. Abwesenheit des transmembranen Natriumkonzentrationsgradienten. Die Kompensation der wasserflussinduzierten Konzentrationsabnahme auf der hypertonischen Seite der Membran und der gleichgroßen Konzentrationszunahme auf der hypotonischen Seite der Membran erfolgte durch NaCl-Titration (vgl. Abb. 10). Eine Zugabe von nur 0,1 mM NaCl war ausreichend um die membrannahen NaCl-Konzentrationen auf beiden Seiten der

Bilipidschicht einander anzugleichen (Experiment 2). In Abb. 38 ist lediglich das Konzentrationsprofil der hyperosmotischen Seite dargestellt. Die Symmetrie des experimentellen Systems rechtfertigt die Annahme, dass die absolute Konzentrationsänderung auf der anderen Membranseite identisch ist. Diese Annahme ist zumindest für kleine Konzentrationsänderungen berechtigt. Die Differenz zwischen Oberflächen- und Volumenkonzentration unterscheidet sich für die cis- und trans-USL nur im Vorzeichen (siehe z. B. Abb. 12). Während der Titrationsprozedur blieb der osmotische Gradient von 1 M Harnstoff unverändert.

Abbildung 39 Anzahl der Wassermoleküle pro K^+ -Ion. Der im Experiment (1) registrierte pseudo-Solvent drag-Effekt (11,6 mM KCl im cis- und trans-Kompartiment) fehlte nach Erhöhung der trans- K^+ -Konzentration auf 12,8 mM (2), 13,3 mM (3) und 13,5 mM (4) bei Harnstoffkonzentrationen von 1 M (2), 1,3 M (3) und 1,6 M (4). Strommessungen widerspiegeln eine Abnahme des K^+ -Flusses von $0,19 \text{ nmol s}^{-1}\text{cm}^{-2}$ (1) auf $86 \text{ pmol s}^{-1}\text{cm}^{-2}$ (2). Der Quotient aus dem Kationenfluss und der Leitfähigkeit der Membran, J_m/G , ist dem effektiven osmotischen Gradienten, c_{osm} , proportional. Der Anstieg der Regressionsgeraden entspricht einer Anzahl von 4,3 Wassermolekülen, die sich zusammen mit einem Ion im Kanal befinden.



Parallel zu den mikroelektrodengestützten Messungen der Flussdichte erfolgte die Erfassung der Stromdichte, I . I und J sind durch folgende Gleichung miteinander verbunden:

$$I = zFJ \quad (35)$$

Gemäß Gleichung 35 beträgt die Flussdichte für das zweite Experiment aus Abb. 38 $13 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Strommessungen einen über die gesamte Membranfläche gemittelten Wert liefern, während die Mikroelektrodentechnik den Maximalwert der Flussdichte im Membranzentrum wiedergibt, ist eine gute Übereinstimmung beider Methoden festzustellen.

Die Berechnung der Anzahl der Wassermoleküle, die sich zusammen mit einem Natriumion im Kanal befinden (Gleichung 28), erfolgte unter Berücksichtigung der Membranleitfähigkeit und der volumenflussinduzierten Verdünnung des Harnstoffs (Gleichung 32). Mikroelektroden- bzw. Strommessungen ergaben im oben beschriebenen Experiment (Abb. 38) einen Wert von 5,2 oder 4,4 für N . Der Mittelwert aus Strommessungen in fünf weiteren Experimenten lag bei $4,8 \pm 0,7$. Da der systematische Fehler der Strommessungen kleiner als der der mikroelektrodengestützten Konzentrationsmessungen ist, dienten erstere als Grundlage für weitere Berechnungen. Der Fehler der Strommessungen lag bei nur etwa 2 %, weil in allen Kurzschlussexperimenten der Kopplungswiderstand (Elektrodenwiderstand) wenigstens zwei Größenordnungen kleiner war als der Membranwiderstand. Im Unterschied dazu führte ein kleiner Fehler in der Bestimmung von v aus Konzentrationsprofilen zu einem vergleichsweise großen Fehler von J , da v als Ausgangsparameter zu dessen Berechnung diente (vgl. Gleichung 21).

Die gleichen Experimente wurden mit Kaliumionen durchgeführt. Abb. 39 zeigt repräsentative, unter Kurzschlussbedingungen gemessene K^+ - und Ca^{2+} -Profile in unmittelbarer Membrannähe. Wie schon im Fall der Na^+ -Ionen ließ sich der Solvent drag-Anteil am Gesamtfluss des K^+ -Flusses durch KCl-Zugabe zum hypertonischen Kompartiment bestimmen. In Abwesenheit eines transmembranen K^+ -Konzentrationsgradienten (Kurve 2) belief sich der K^+ -Fluss

durch die Membran auf $86 \text{ pmol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Ein Vergleich mit dem anfänglich gemessenen Kaliumgesamtfluss (Kurve 1) von $0,19 \text{ nmol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ lässt erkennen, dass Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten und Solvent drag etwa zu gleichen Teilen als Triebkraft dienten. Die Menge der vom Wasser durch die Gramicidinkanäle mitgeführten Kaliumionen hing von der Geschwindigkeit des Volumenflusses ab. Mit einer Erhöhung des osmotischen Gradienten (Kurven 3 und 4) wuchs der Wasser- und folglich auch der Kationenfluss. Gemäß Gleichung 21 muss der auf die Kanaldichte normierte Fluss J proportional zum osmotischen Druck sein. Diese Voraussage fand, wie in Abb. 39 gezeigt, experimentelle Bestätigung. Aus dem Anstieg der Geraden ließ sich die Anzahl der Wassermoleküle, die sich zusammen mit einem K^+ durch den Kanal bewegen, berechnen. In dem gezeigten Beispiel belief sich N auf 4,3. Fünf weitere Experimente ergaben ein Mittel von $4,6 \pm 0,6$.

5.5 Wasserselektivität von Desformylgramicidin

Wie schon der Einbau von Gramicidin A in ebene Bilipidmembranen führte auch der von Desformylgramicidin zu einer Erhöhung des osmotischen Wasserflusses, $J_{W,I}$. Eine entsprechend ausgeprägte Polarisation der membranimpermeablen Kalziumionen war zu beobachten (Abb. 40). Der zusätzliche,

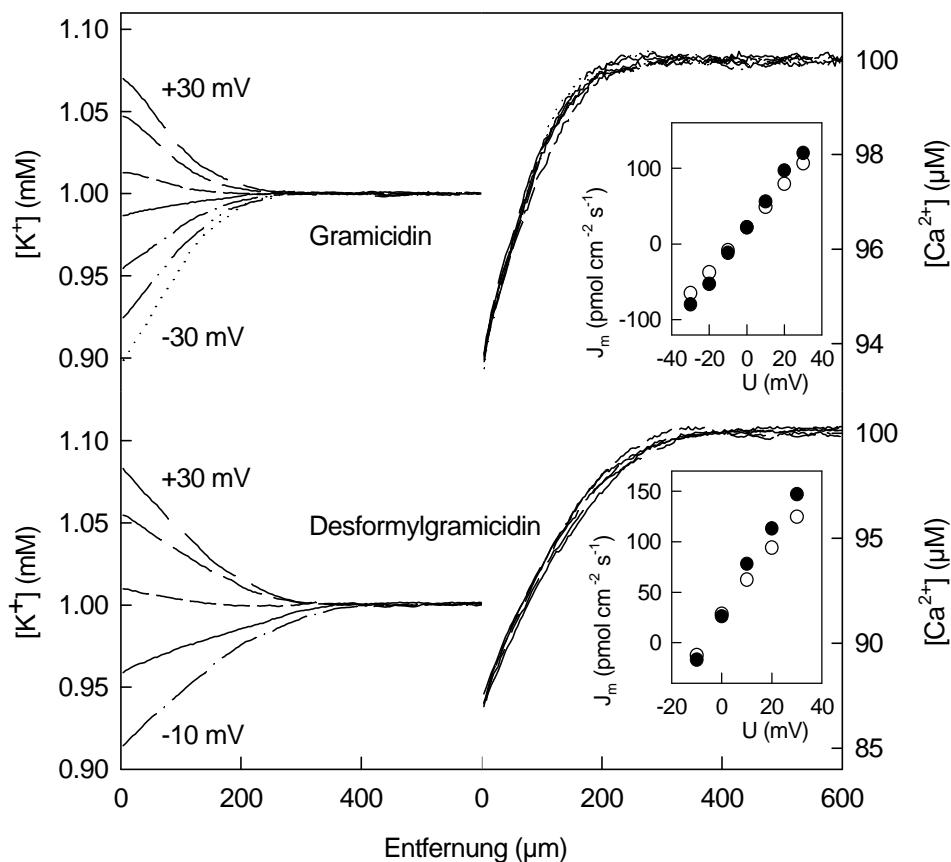


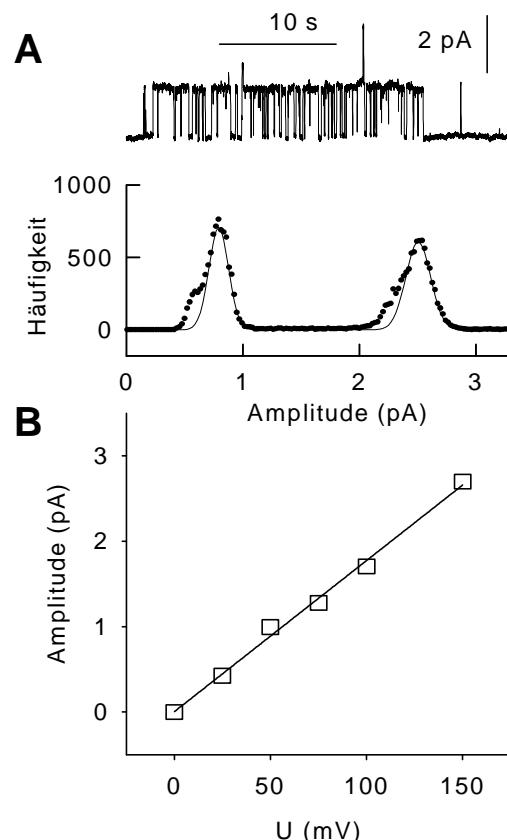
Abbildung 40 Vergleich der durch Gramicidin A (12,5 ng/ml) bzw. Desformylgramicidin (740 ng/ml) induzierten Konzentrationspolarisation. Ersteres erhöhte die Wasserleitfähigkeit der Membran um $0,1 \mu \text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, letzteres um $1 \mu \text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Dieser unter Kurzschlussbedingungen gemessene, von 0,8 M Harnstoff getriebene Wasserfluss war potentialunabhängig. Die spannungsabhängigen Kaliumflussdichten, J , wurden aus der Stromdichte (\circ) bzw. den K^+ -Konzentrationsprofilen (\bullet) berechnet. Der Puffer (pH 8,4) enthielt 20 mM TRIS, 150 mM Cholinchlorid, 1 mM KCl und 100 μM Ca^{2+} .

durch die Kanäle induzierte Wasserfluss, $J_{W,c}$, ließ sich aus dem Ca^{2+} -Konzentrationsprofil berechnen. Das dafür erforderliche v ergab sich aus der nichtlinearen Regression mit Hilfe von Gleichung 17. v besteht aus zwei Komponenten, der Geschwindigkeit des Wasserflusses durch das Lipid, v_l , und durch den Kanal, Dv :

$$J_w = v / V_w = J_{W,l} + J_{W,c} = (v_l + \Delta v) / V_w \quad (36)$$

In dem in Abb. 40 gezeigten Beispiel betrug die Dichte des Wasserflusses durch die Gramicidinkanäle $0,1 \mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, während durch die Desformylgramicidinkanäle $1 \mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ Wasser diffundierten. Beide Peptidkanäle ließen einen spannungsabhängigen Natriumfluss zu (Abb. 40), dessen Umfang gemäß Gleichung 21 aus v und der Konzentrationsverteilung des permeablen Ions zu berechnen ist. Schon ein sehr kleines Potential von nur 20 mV war ausreichend, um nicht nur die durch den Massenfluss induzierte Verdünnung

Abbildung 41 A - Patch-Clamp-Messung des Protonenflusses durch einen geöffneten Desformylgramicidinkanal. Das zugehörige Histogramm (Quadrate) zeigt die Anzahl der Ereignisse pro Leitfähigkeitsniveau. In der Anpassung (Gauss-Kurve, volle Linie) sind 2 Maxima bei $0,81$ und $2,50 \text{ pA}$ erkennbar. Der erste Wert spiegelt den Stromfluss (100 mV Spannungsklemme) durch die Lipidmatrix, der zweite auch den durch einen offenen Kanal wider. **B** - Spannungsabhängigkeit der Einzelkanalleitfähigkeit. Der Puffer ($\text{pH } 2,5$) enthielt 100 mM Cholinchlorid und 10 nM Desformylgramicidin.



der Kationen auf der hyperosmotischen Seite zu kompensieren, sondern um darüber hinaus eine Akkumulation der Kationen zu bewirken (Abb. 40). Aufgrund der ausgeprägten Polarisationseffekte ist das in Abb. 40 gezeigte Experiment nicht für einen quantitativen Vergleich der hydraulischen und Ionenleitfähigkeiten von Gramicidin A und Desformylgramicidin verwendbar. Es ist jedoch offensichtlich, dass die höhere Wasserpermeabilität im zweiten Fall nicht von einer höheren Ionenleitfähigkeit begleitet wird.

5.5.1 Permeabilität für Protonen

Die Experimente erfolgten im sauren Milieu (pH 2,5) in Abwesenheit monovalenter Kationen. Statt dessen enthielt die wässrige Phase 100 mM Cholinchlorid. Bei einer Konzentration von 10 nM Desformylgramicidin betrug der

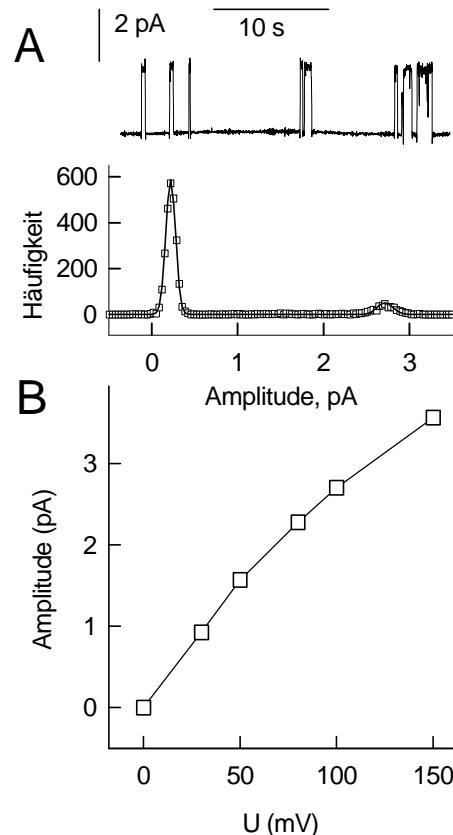


Abbildung 42 A Experimentelle Aufzeichnung des Protonenflusses durch einen Gramicidin A-Kanal. Das zugehörige Histogramm (Quadrate) bzw. dessen Behandlung als Gauss-Verteilung gibt einen Strom von 2,71 pA für einen geöffneten Kanal incl. der 0,22 pA Basisleitfähigkeit der Membran wider (100 mV Spannungsklemme). **B** - Spannungsabhängigkeit der Einzelkanalleitfähigkeit. Der Puffer (pH 2,5) enthielt 100 mM Cholinchlorid und 2 nM Gramicidin A.

Membranwiderstand etwa $3 \cdot 10^6 \text{ } W^1$. Die Aufzeichnung der Einzelkanalleitfähigkeit erfolgte nach dem Andocken der Pipette an die Membran bei einer fixierten Spannung von 100 mV. Unter diesen Bedingungen betrug die Lebensdauer eines Kanals mehr als 10 Sekunden. Seine Leitfähigkeit belief sich auf 17,0 pS. Schnelle Fluktuationen, d. h. sich häufig wiederholende Schwankungen der Leitfähigkeit kennzeichneten den geöffneten Zustand (Abb. 41 A). Die aus dem Histogramm berechnete Öffnungswahrscheinlichkeit war mit 0,8 s sehr hoch. Zwischen angelegter Spannung und dem durch einen einzelnen Kanal fließenden Strom bestand ein linearer Zusammenhang (Abb. 41 B).

Zum Vergleich mit den Desformylgramicidindaten erfolgte die Aufzeichnung der Protonenleitfähigkeit von Gramicidin A unter identischen

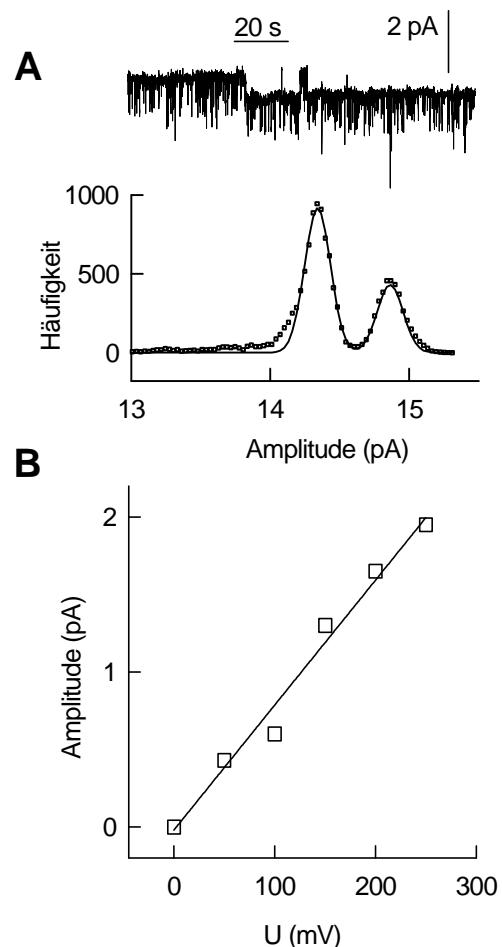


Abbildung 43 A - Experimentelle Aufzeichnung des Kaliumstromes durch Desformylgramicidinkanäle. Das zugehörige Histogramm zeigt bei Öffnung eines weiteren Kanals eine Erhöhung des Stromes von 14,30 auf 14,82 pA. Die über das eine Vielzahl von Kanälen enthaltende Membranfragment angelegte Spannung betrug 100 mV. **B** - Spannungsabhängigkeit der Einzelkanalleitfähigkeit. Die Elektrolytlösung bestand aus 100 mM KCl.

Bedingungen (Abb. 42). Bei einer Konzentration von 2 nM in der wässrigen Phase induzierte Gramicidin A eine integrale Membranleitfähigkeit von $0,1 \cdot 10^{-6} W^{-1}$. Auch hier ermöglichte erst die elektrische Isolierung eines Membranfragments die Registrierung von Einzelereignissen (Abb. 42 A). Leitfähigkeit bzw. Lebenszeit der Kanäle betragen 25 pS bzw. 0,30 s. Mit 0,1 ist die Öffnungswahrscheinlichkeit von Gramicidin A wesentlich kleiner als die von Desformylgramicidin (vgl. Abb. 41 A und 42 A). Die Unterschiede in der Öffnungswahrscheinlichkeit sind für die höhere integrale Leitfähigkeit, G , verantwortlich, die erforderlich ist, um einzelne Desformylgramicidinkanäle zu messen. Vorausgesetzt, dass die isolierten Fragmente immer die gleiche Fläche einnehmen, kann G wie folgt berechnet werden:

$$G = n_t g g \quad (37)$$

n_t , g und g bezeichnen die Gesamtzahl der Kanäle in der Membran, ihre Einzelleitfähigkeit und die Wahrscheinlichkeit, dass sie sich im geöffneten Zustand befinden. Da g beider Peptide vergleichbar ist, war eine gleiche Anzahl geöffneter Kanäle bei sehr verschiedenen Werten von G zu finden.

5.5.2 Leitfähigkeit für Kationen

Es gelang nicht, einzelne natrium- oder kaliumleitende Kanäle zu registrieren, ganz im Unterschied zu den oben beschriebenen Protonenkanälen. Dieses Ergebnis deckt sich mit einem älteren Literaturbericht von Bezrukow [1984]. Zwar beobachteten die Autoren Stromschwankungen, konnten diese aber keinem Einzelereignis zuordnen.

Mit wachsender Peptidkonzentration wuchs auch die Leitfähigkeit des Membranfragments. Abb. 43 A zeigt eine repräsentative Aufzeichnung des Stromes durch ein solches Fragment. Bei einem Niveau des Stromes von etwa 14 pA (die transmembrane Spannung betrug 100 mV) konnten zwei verschiedene Ereignisse unterschieden werden:

- a) schnelle Fluktuationen, die auf wiederholtes Öffnen und Schließen ein und desselben Kanals zurückzuführen waren und
- b) langandauernde Stromstufen (messbar in Minuten). Ein Beispiel ist in der oberen Ecke der Abb. 43 A zu sehen. In Analogie zur gewöhnlichen Kanalaktivität zeigt das Histogramm zwei gehäuft auftretende Ereignisse, deren Differenz einer Kanalamplitude von 0,53 pA entspricht. Letztere muss langlebigen Desformylgramicidinkanälen zugeschrieben werden.

Aus dem Verhältnis der Leitfähigkeiten von Membranfragment und Einzelkanal konnte gefolgert werden, dass in der Aufzeichnung von Abb. 43 A etwa 26 Kanäle dauerhaft geöffnet waren. Im Mittel (19 Ereignisse) verstrichen etwa 30 s zwischen einer Kanalöffnung und -schließung. Zwischen angelegter Spannung und Einzelkanalstrom bestand, wie schon im Fall der Protonenleitung, ein linearer Zusammenhang (Abb. 43 B). Die mittlere Leitfähigkeit

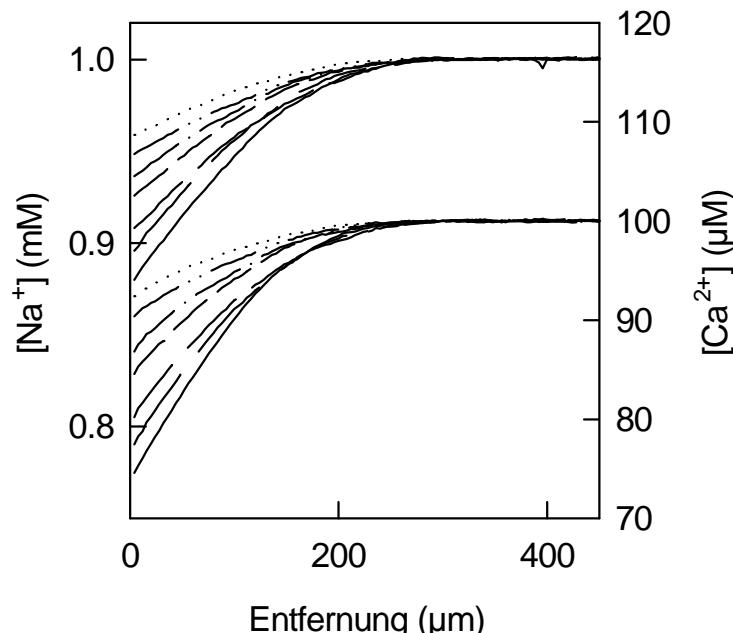


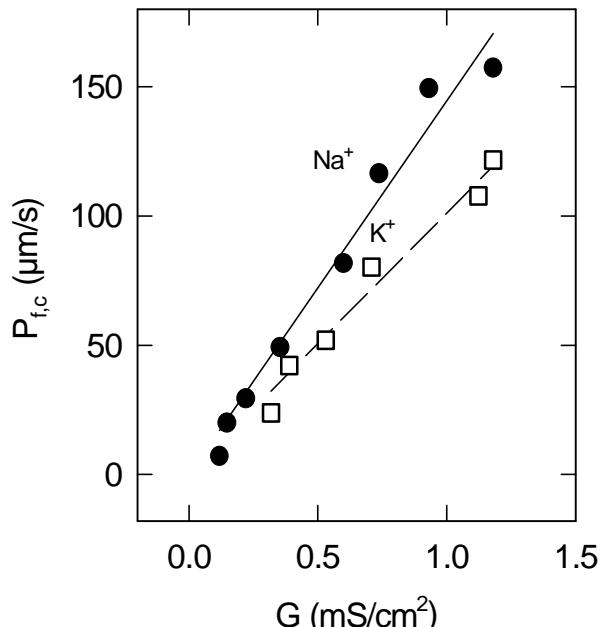
Abbildung 44 Die Konzentrationspolarisation von Ca^{2+} und Na^+ nahm mit steigender Desformylkonzentration, die durch die Strichlängen symbolisiert wird, zu. Ihr Maximalwert (volle Linie) betrug 1,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Der Puffer enthielt 20 mM Tris, 150 mM Cholinchlorid, 1 mM NaCl und 100 μM Ca^{2+} . Der pH-Wert betrug 8,4. Das trans-Kompartiment enthielt zusätzlich 0,8 M Harnstoff.

betrug 7 pS. Messungen in 100 mM NaCl brachten qualitativ analoge Ergebnisse. Die Einzelkanalleitfähigkeit betrug 3 pS.

5.5.3 Hydraulische Leitfähigkeit

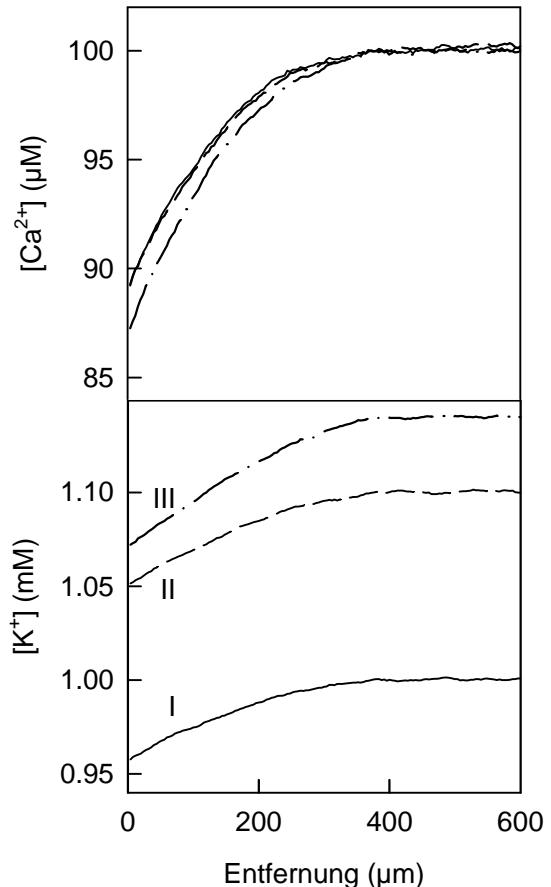
Die Kanalinsertion in eine kurzgeschlossene Membran führte zu einer stärkeren Ausprägung der osmotisch induzierten membrannahen Polarisation sowohl des permeablen als auch des impermeablen Kations (Abb. 44). Der Fluss des monovalenten Ions durch den Desformylgramicidinkanal war zu klein, um die Verdünnung durch den Wasserfluss zu kompensieren. Im Beisein von Gramicidin A war das Gegenteil der Fall. Aufgrund der überschließenden Erhöhung der Kationenleitfähigkeit verschwand der Gradient der monovalenten Kationen bei höheren Kanaldichten (Abb. 36). Diese Beobachtung lässt darauf schliessen, dass Desformylgramicidin besser Wasser leitet als Gramicidin A. Wird die kanalvermittelte hydraulische Leitfähigkeit, $P_{f,c}$, als Funktion der korrespondierenden elektrischen Leitfähigkeit aufgetragen (Abb. 45), ergibt

Abbildung 45 Wasserleitfähigkeit eines Einzelkanals. Grundlage der Berechnungen von $P_{f,c}$ bildeten die in Abb. 44 gezeigten Kalziumkonzentrationsprofile, drei Wiederholungen desselben Experiments sowie analoge Versuche nach Substitution von Natrium (●) durch Kalium (□). Basierend auf der gemessenen Membranleitfähigkeit G und der zuvor bestimmten Einzelkanalleitfähigkeit (Abb. 43), ergab sich ein Wert von $1,0 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ (●) bzw. $1,3 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ (□).



sich die hydraulische Einzelkanalleitfähigkeit, p_f , aus dem Anstieg der Regressionsgeraden (Gleichung 29). In 1 mM NaCl bzw. KCl nahm p_f einen Wert von 1,0 bzw. $1,3 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ an. Für die Berechnungen gemäß Gleichung 29 machte sich die Korrektur der Einzelkanalleitfähigkeit auf die, in den Experimenten verwendete, geringere Elektrolytkonzentration erforderlich. In Anlehnung an Neher et al. [1978c] ergab die Korrektur 0,07 pS für 1 mM NaCl und 0,13 pS für KCl. Da c_{osm} nicht direkt gemessen werden kann, wurde es mit Hilfe von Gleichung 32 berechnet.

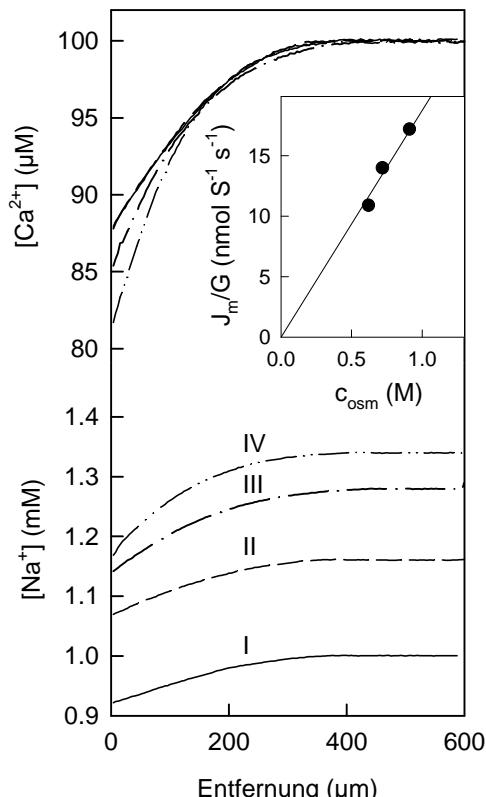
Abbildung 46 Anzahl der Wassermoleküle, N, die sich zusammen mit einem Kaliumion im Desformylgramicidinkanal befinden. Unter Kurzschlussbedingungen (Experiment I) erfolgt der Kaliumtransport durch Diffusion und Solvent drag. Die selektive Erhöhung der trans-K⁺-Konzentration von 1 auf 1,1 mM minimierte ihren Konzentrationsgradienten und damit den diffusiven Anteil (Experiment II). Nach Erhöhung der Harnstoffkonzentration von 0,8 M auf 1 M stellte sich der Solvent drag bei einer K⁺-Konzentration von 1,4 mM erneut ein (Experiment III). Simultan durchgeführte Leitfähigkeitsmessungen ($0,2 \text{ mS cm}^{-2}$) ergaben ein N von 4,5 für die Experimente II und III.



5.5.4 Die Länge des Desfomylkanals

Zwischen dem hypertonischen und dem hypotonischen Kompartiment war eine K^+ - oder Na^+ -Konzentrationsdifferenz derart zu etablieren, dass sie sowohl die den Wasserfluss begleitende Akkumulation der Kationen auf der einen Seite der Membran als auch ihre Verarmung auf der anderen Seite ausglich (Abb. 10). Gelöst wurde die Aufgabe durch eine schrittweise Erhöhung der Kationenkonzentration im hyperosmotischen Kompartiment. Die Titration war beendet, wenn die K^+ - bzw. Na^+ -Konzentrationen an den cis- und trans-Phasengrenzen gleich waren (Experiment II in Abb. 46 und 47). Die Prozedur wurde dann für verschiedene Harnstoffkonzentrationen wiederholt (Experiment III in Abb. 46 und Experimente III und IV in Abb. 47). Der in Abwesenheit eines transmembranen Konzentrationsgradienten gemessene Ionenfluss, J_t , ist ausschließlich auf den Mitreißeffekt des Wassers, d. h. auf Solvent drag

Abbildung 47 Anzahl der Wassermoleküle, N , die sich zusammen mit einem Natriumion im Kanal befinden. Das Experiment aus Abb. 46 wurde nach Substitution von Natrium durch Kalium wiederholt. Der diffusive Anteil des Natriumflusses (Experiment I) ging nach Erhöhung der trans-NaCl-Konzentration auf 1,16, 1,28 bzw. 1,34 mM bei den jeweiligen Harnstoffkonzentrationen von 0,8 (Experiment II), 1 (Experiment III) und 1,2 (Experiment IV) M gegen null. Der auf die Membranleitfähigkeit G bezogene konvektive Anteil von J ist dem effektiven osmotischen Gradienten, c_{osm} , proportional. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden ergab sich ein N von 4,8.



zurückzuführen. Die Anzahl der Wassermoleküle, die benötigt werden, um ein Ion durch den Kanal zu führen, kann aus dem transmembranen Ionenfluss und der parallel erfassten Membranleitfähigkeit abgeleitet werden:

$$J_{m,t} = R T c c_{osm} V_w N G / z^2 F^2 . \quad (38)$$

Die unter diesen Bedingungen registrierten Kalium- (Abb. 46) bzw. Natriumflüsse (Abb. 47) ergaben, dass 4,5 bzw. 4,8 Wassermoleküle zusammen mit einem Ion durch den Kanal transportiert werden. Je drei Wiederholungen jedes dieser Experimente ergab eine Standardabweichung von $\pm 0,3$. Damit besitzt der Desfomylkanal die gleiche Länge wie der Gramicidinkanal. Der enge, im Single file-Transportmodus zu passierende Abschnitt ist lt. Gleichung 2 etwa 13 A° lang.

5.6 Wasserfluss durch rekonstruierte Aquaporine

Um eine hohe Wahrscheinlichkeit der Rekonstruktion des Wasserkanals zu sichern, wurden Vesikel mit einem beträchtlichen Proteinanteil hergestellt. Das molare Protein-Lipid-Verhältnis belief sich auf 1:500. Ihre Zugabe erfolgte auf der cis-Seite einer ebenen Membran des Muller-Rudin-Typs. Die Erhöhung der Salzkonzentration in einem der Kompartimente (von 100 auf 450 bis 650 mM) garantierte eine nichtselektive Fusion der Vesikel mit der ebenen Bilipidmembran. Jedes einzelne dieser Fusionereignisse konnte registriert werden, da die Proteoliposomen zusätzlich Ergosterol und Nystatin enthielten. Die Verschmelzung der Vesikelmembran mit der ebenen Membran führte unter diesen

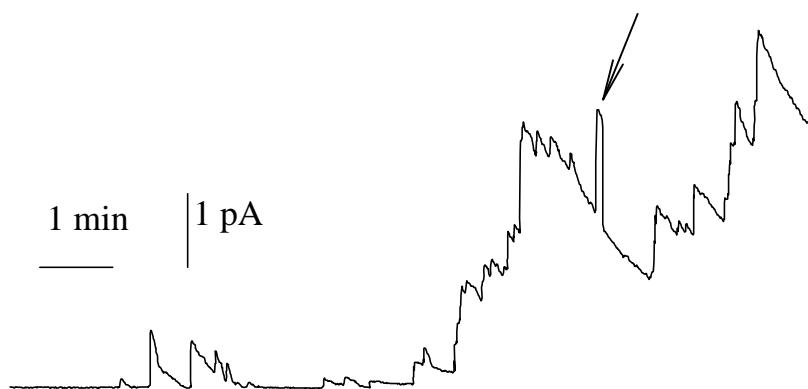


Abbildung 48 Fusion ergosterol- und nystatinhaltiger Proteoliposomen mit ergosterolfreien ebenen Bilipidmembranen. Jede Erhöhung des Stromes repräsentiert die Fusion eines einzelnen Liposoms, dass eine ganze Packung vorgefertigter Nystatinkanäle enthielt. Nachdem mehr als 20 Vesikel mit der Membran fusionierten, konnte eine Fluktuation des Stromes von etwa 50 pS durch die ebene Membran registriert werden (Pfeil), die weder auf Nystatin noch AQP1 zurückzuführen war. Vielmehr ist diese kanalähnliche Aktivität auf einen der Membrandefekte zurückzuführen, die an ebenen Membranen häufig nach Zugabe einer höheren Konzentration reiner Lipidvesikel beobachtet werden. Die Insertion von AQP1-Wasserkanälen war elektrisch nicht zu registrieren. Die NaCl-Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran betrugen 0,1 und 0,5 M. Die Membranspannung war auf einen Wert von 30 mV fixiert.

Bedingungen unweigerlich auch zum Einbau vieler aktiver Ionenkanäle, die einen Sprung der Membranleitfähigkeit verursachten. Unmittelbar nach der Fusion diffundierte das zur Integrität der Pore unbedingt erforderliche Ergosterol vom Nystatin weg und die Membranleitfähigkeit kehrte zum Ausgangsniveau zurück [Woodbury und Miller, 1990]. Durch Änderungen der Rührgeschwindigkeit konnte die Fusionsrate gesteuert werden [Pohl et. al, 1998c]. Sprunghafte Erhöhungen der Membranleitfähigkeit, die nicht auf Nystatin zurückzuführen waren, konnten zwar registriert (Abb. 48), eine aquaporinvermittelte Genese jedoch ausgeschlossen werden. Vielmehr handelte es sich hier um Membrandefekte, die üblicherweise nach Zugabe größerer Liposomenmengen zu beobachten sind [Woodbury, 1989]. Eine Erhöhung der hydraulischen Membranleitfähigkeit wurde aufgrund des zu geringen Protein-Lipid-Verhältnisses nicht registriert. Dieses Ergebnis war vorherzusehen, da die Oberfläche der ebenen Membran ca. 10^7 mal größer als die eines Vesikels ist. Selbst nach der Fusion von etwa 1000 Liposomen ist das molare Protein-

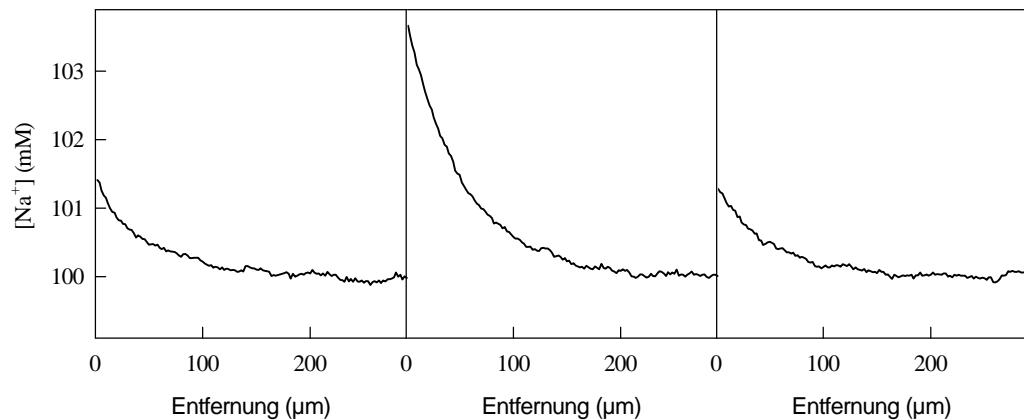


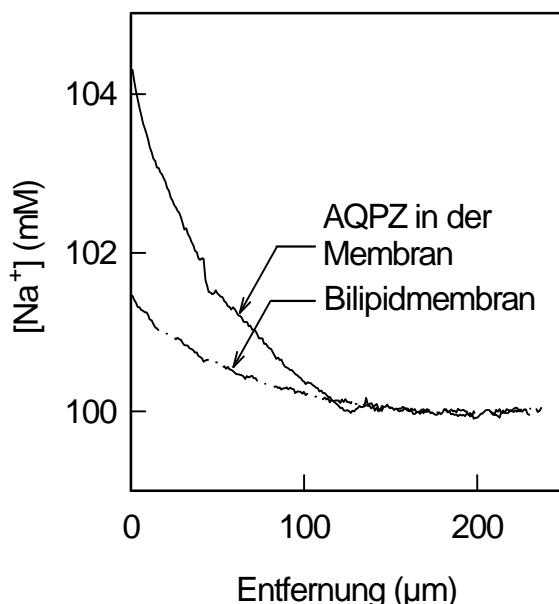
Abbildung 49 Die Rekonstruktion von AQP1 erhöhte die Wasserleitfähigkeit einer ebenen Bilipidmembran von 23 $\mu\text{m/s}$ (links) auf 50 $\mu\text{m/s}$ (Mitte). Nach Zugabe von 1 mM des Proteininhibitors pCMBS (rechts) sank die hydraulische Leitfähigkeit auf das Ausgangsniveau. Das Protein-Lipid-Verhältnis betrug 1 : 70. Der Volumenfluss wurde von 1 M Harnstoff getrieben. Der pH-Wert lag bei 7,5.

Lipid-Verhältnis kleiner als $1 : 10^6$. Es ist offensichtlich, dass eine derart kleine Proteinkonzentration die Wasserpermeabilität nicht signifikant erhöhen kann.

Ebene Membranen, die funktionell aktive Aquaporin-Wasserkanalproteine enthielten, wurden aus Proteoliposomen geformt. Letztere bildeten spontan Monoschichten aus, die dann zu Bischichten vereinigt werden konnten. Sowohl für AQP1- als auch für AQPZ-haltige Bilipidmembranen unterschied sich die elektrische Leitfähigkeit nicht von der proteinfreier Membranen (etwa $2 \mu\text{S}/\text{cm}^2$). Die für eine Kanalaktivität typischen Stromfluktuationen waren nicht zu beobachten. Gleichzeitig aber erhöhte sich die Wasserleitfähigkeit wesentlich (Abb. 49).

Die nach der Schindler Methode aus proteinfreien und aquaporinhaltigen Liposomen hergestellten ebenen Membranen waren über mehrere Stunden stabil. Messungen der stationären osmotischen Wasserpermeabilität waren somit möglich. Natriumkonzentrationsprofile spiegelten eine Diffusionspolarisation wider, die in der Umgebung einer AQPZ-haltigen Bilipidschicht weit

Abbildung 50 Repräsentative Natriumkonzentrationsprofile auf der hypertonischen Seite einer ebenen Membran. Bei einer Temperatur von 23°C erhöhte sich die Wasserpermeabilität der reinen Bilipidmembran durch Rekonstruktion des wasserleitenden AQPZ-Proteins von $25 \mu\text{m}/\text{s}$ auf $70 \mu\text{m}/\text{s}$ (Lipid/Protein Verhältnis = $50 : 1$). Der osmotische Fluss wurde von 1 M Harnstoff getrieben ($\text{pH} = 7,5$).



ausgeprägter als in einer proteinfreien Membran war. Abb. 50 zeigt ein Beispiel, in dem die Anwesenheit des Proteins die hydraulische Wasserpermeabilität P_f von 25 auf 70 $\mu\text{m/s}$ (23°C) steigert.

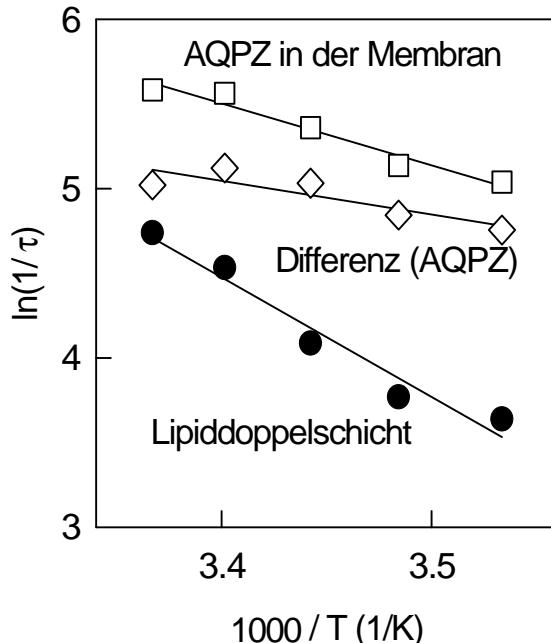
Die hydraulische Permeabilität eines Einzelkanals, p_f , berechnet sich aus der Gesamtleitfähigkeit aller Kanäle und der Anzahl der Kanäle, n [Finkelstein, 1987]. Nimmt man an, dass n gleich dem Quotienten aus der Anzahl der Lipidmoleküle, N_L und dem molaren Lipid/Proteinverhältnis, r , ist, ergibt sich p_f als:

$$p_f = P_f A / n = P_f Ar / 2N_L = P_f br / 2 \quad (39)$$

N_L lässt sich aus der doppelten Membranfläche (zwei Monoschichten), A , geteilt durch die Fläche, b , eines Lipidmoleküls ableiten. Für $b = 78 \text{ \AA}^2$ [Hsieh et. al, 1997] und $r = 1400$, ergibt sich je Proteinmonomer ein p_f von etwa $4 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{s}$.

Da AQPZ durch Quecksilberverbindungen nicht inhibiert wird [Calamita et. al, 1995], kann zwischen der Wasserdiffusion durch die Lipiddoppelschicht und einem Transfer durch transmembrane Kanäle nur auf Grundlage der

Abbildung 51 Arrheniusdiagramm des Wasserflusses durch proteinfreie und AQPZ-haltige Bilipidmembranen. Für erstere ergab der Anstieg der Regressionsgeraden eine Aktivierungsenergie von 14 kcal pro mol (●). Nach Abzug des Beitrages der Lipidmatrix konnte die Aktivierungsenergie für den Wassertransport durch das Protein mit 4 kcal/mol bestimmt werden (◆).

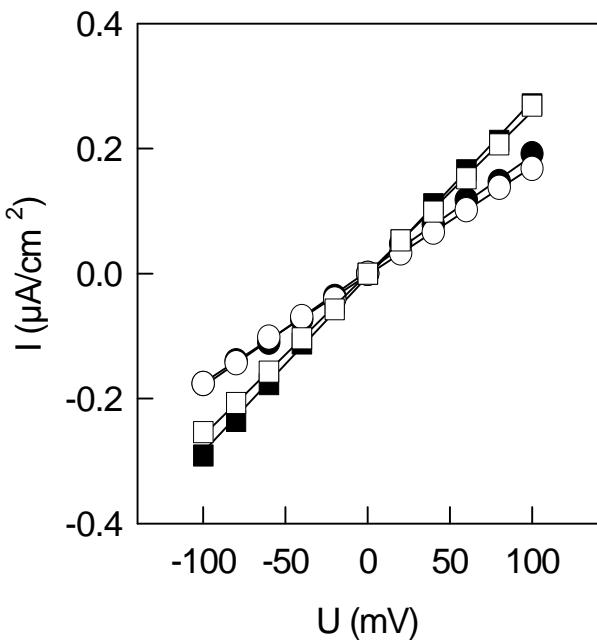


Aktivierungsenergie unterschieden werden. Zu diesem Zweck wurde die Temperaturabhängigkeit des stationären Wasserflusses durch proteinfreie Bilipidmembranen und Schindlermembranen, die rekonstruiertes AQPZ enthielten, gemessen (Abb. 51). Die für die graphische Darstellung genutzte Transportrate $1/t$, ergibt sich aus der Geschwindigkeit des Massenflusses und der Membrandicke, d ($d = 5 \text{ nm}$):

$$1/t = v/d \quad (40)$$

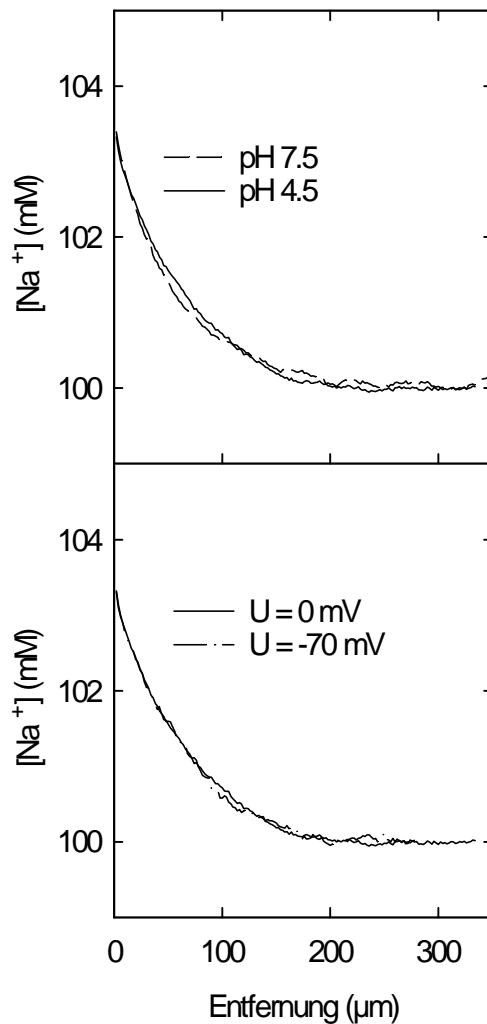
$1/t$ weist eine lineare Abhängigkeit vom Reziprokwert der Temperatur auf. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden lässt sich eine Aktivierungsenergie von 14 kcal/mol für die proteinfreien Membranen ableiten (Abb. 51). Die gleiche Darstellung für Membranen mit rekonstruiertem AQPZ spiegelt sowohl den Wassertransport durch die Kanäle als auch durch die Lipidschicht wider (Abb. 51). Eine Arrheniusgrafik für den Wassertransport durch die Proteinkanäle erfordert, dass die gemessene Geschwindigkeit um die des Wasserflusses durch die reine Lipiddoppelschicht vermindert wird. Damit erhält man für die proteinvermittelte Erhöhung der Flussgeschwindigkeit eine Aktivierungsenergie von 4 kcal/mol (Abb. 51).

Abbildung 52 Volt-Ampere-Charakteristik einer Aquaporin enthaltenden Membran (●, ■). Ihre Leitfähigkeit unterschied sich nicht von der einer proteinfreien Membran (○, □) unabhängig davon, ob die Experimente bei pH-Werten von 7,5 (●, ○, $1,8 \mu\text{S}/\text{cm}^2$) oder 4,5 (■, □, $2,8 \mu\text{S}/\text{cm}^2$) durchgeführt wurden.



Die Ionenleitfähigkeit von AQPZ wurde unter den Bedingungen der Spannungsklemme erfasst. Im physiologischen und sauren pH-Bereich unterschied sich die Strom-Spannungs-Charakteristik einer aquaporinhaltigen Membran nicht von der einer proteinfreien Membran (Abb. 51). Die Leitfähigkeit erhöhte sich parallel zur Protonenkonzentration. Die Rekonstruktion von AQPZ war allerdings ohne Einfluss auf dieses Phänomen (Abb. 51). Nimmt man dessen ungeachtet an, dass die gesamte Leitfähigkeit von AQPZ induziert wurde, lässt sich die Dichte des Ionenfluxes, J , aus der Gleichung 35 berechnen. Während J einen Wert von $1 \cdot 10^{-12} \text{ mol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ annahm (Abb. 4, pH 7,5), belief sich die simultan gemessene Wasserfluxdichte (Abb. 53) auf 4,3

Abbildung 53 pH- und Spannungsabhängigkeit des osmotischen Wasserfluxes. Die Natriumkonzentrationsprofile spiegeln eine Senkung von P_f von $50 \pm 2 \mu\text{m/s}$ bei pH 7,5 auf $44 \pm 2 \mu\text{m/s}$ bei pH 4,5 wider. Eine Abhängigkeit vom transmembranen Potential konnte nicht beobachtet werden.



$\mu\text{M s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (vgl. Gleichung 20). Daraus lässt sich ableiten, dass sich unter 10^7 transportierten Molekülen etwa ein Ion befindet.

Der gemäß Gleichungen 17 und 20 aus den Natriumkonzentrationsprofilen abgeleitete Wasserfluss war unabhängig vom angelegten transmembranen Potential (Abb. 53). Diese Beobachtung konnte sowohl im physiologischen als auch im sauren pH-Bereich gemacht werden. Einzig die hydraulische Leitfähigkeit der Bilipidmembran zeigte eine leichte Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 53). P_f verringerte sich von $50 \pm 2 \mu\text{m/s}$ bei pH 7,5 auf $44 \pm 2 \mu\text{m/s}$ bei pH 4,5. Obwohl reproduzierbar besitzt diese Veränderung von etwa 10 % kaum physiologische Relevanz.

6 Diskussion

6.1 Konzentrationspolarisation in der ungerührten Schicht

Eine angemessene Berücksichtigung der Konzentrationspolarisation ist sowohl für die Korrektur osmotischer Membranpermeabilitäten [Fischbarg et. al, 1993] als auch für die Bestimmung der Reflexionskoeffizienten [Hamada und Imai, 1995] und der hydraulischen Leitfähigkeit von Kanälen und Poren [Wang et. al, 1995] von Belang. Die Elektrolytverarmung bzw. -anreicherung, die jede osmotische Volumenströmung begleitet, ist erstmals in der Nähe einer Bilipidmembran erfasst worden. Theoretisch vorhergesagte [Dainty, 1963; Pedley und Fischbarg, 1978] sowie aus Fluss- [Barry und Diamond, 1984] und Strömungspotentialmessungen [Levitt et. al, 1978b; Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Tu et. al, 1994] gefolgte Konzentrationsänderungen in den USL auf beiden Seiten der Membran wurden systematisch untersucht. Mit der Mikroelektrodentechnik registrierte Konzentrationsprofile stimmen qualitativ mit Ergebnissen interferometrischer Messungen, die an synthetischen Membranen durchgeführt wurden, überein [Lerche, 1976; Kargol, 1994].

Im folgenden wird die osmotische Wasserpermeabilität einer ebenen Lipiddoppelschicht aus experimentellen Konzentrationsprofilen ermittelt. Die Berechnungen werden zweimal ausgeführt, zum einen basierend auf dem klassischen Modell zum anderen auf dem hydrodynamischen (vgl. Tabelle 2, Kapitel 3.10). Der Vergleich erlaubt nicht nur die Güte des hydrodynamischen Ansatzes zu zeigen, sondern auch die für die Herleitung postulierten Vereinfachungen auf ihre Gültigkeit zu prüfen.

6.1.1 Berechnung von P_f aus der Nernstschen Filmtheorie

Das klassische Modell der ungerührten Schicht (Gleichungen 5 - 8) geht davon aus, dass die einzige Bewegung in der Schicht der osmotische Fluss selbst ist. Diffusionslimitierungen sind Ursache sich ausbildender Konzentrationsgradienten, die auf die USL beschränkt bleiben. Die Ionenkonzentration in Membrannähe sinkt auf der hypertonischen Seite ab, wohingegen sie auf der gegenüberliegenden Seite zunimmt. c_s kann direkt dem experimentell aufgezeichneten Konzentrationsprofil entnommen werden, während die Dicke der USL, d , als Regressionsparameter (Gleichung 34) aus dem experimentellen Datensatz zu ermitteln ist. Stehen beide Parameter zur Verfügung, ergibt sich für kleine Konzentrationsunterschiede ($c_b - c_s$) die hydraulische Membranpermeabilität aus einer Kombination der Gleichungen 7 bzw. 8 und 9:

$$P_f = \frac{D}{dc_{osm}V_w} \left| \ln \frac{c_s}{c_b} \right| \approx \frac{D|c_b - c_s|}{dc_{osm}c_b V_w}. \quad (41)$$

In erster Näherung ist c_{osm} gleich der Harnstoffkonzentration auf der hypertonischen Seite, die um die durch den osmotischen Fluss verursachte Verdünnung vermindert wurde. Da die Diffusionskoeffizienten von Harnstoff, D_{urea} , und Natrium, D_{Na} , nahezu identisch sind ($D_{urea} = 1,38 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, $D_{Na} = 1,33 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$), kann Gleichung 8 verwendet werden, um die membrannahe Harnstoffkonzentration, $c_{s,urea}$, aus der Natriumkonzentration an der Phasengrenze, c_s und den Konzentrationen von Harnstoff, $c_{b,urea}$ und Natrium, c_b , im Volumen der wässrigen Phase zu berechnen:

$$\frac{c_{s,urea}}{c_{b,urea}} = \frac{c_s}{c_b} \quad (42)$$

Der von der Volumenströmung induzierte NaCl-Konzentrationsgradient verringert den effektiv wirksamen, transmembranen osmotischen Gradienten zusätzlich:

$$c_{osm} = c_{s,urea} - 4\Delta c_{Na}^{\max} \quad (43)$$

Für hohe Strömungsgeschwindigkeiten wird eine asymmetrische Konzentrationsverteilung vom klassischen Modell der USL vorhergesagt (vgl. Abb. 7). Unter unseren experimentellen Bedingungen übersteigt die vorhergesagte Differenz zwischen den Konzentrationsänderungen den experimentellen Fehler nicht. Es überrascht daher nicht, dass für eine gegebene Geschwindigkeit der Volumenströmung der gleiche absolute Wert für Dc_{Na}^{\max} auf beiden Seiten der Membran gemessen wurde.

Gleichung 41 zufolge erhöht sich bei einem Anstieg der transmembranen Harnstoffkonzentrationsdifferenz von 300 auf 700 mM die Membranpermeabilität, P_f , von 30 auf 45 $\mu\text{m}/\text{s}$ (Abb. 14). Angesichts der vergleichsweise kleinen Fehler, mit denen d ($< 7\%$) und c_{osm} ($< 0.5\%$) behaftet sind, ist diese Änderung signifikant. Eine mit Mitteln der irreversiblen Thermodynamik durchgeführte Analyse zeigt jedoch, dass in einem isothermalen System P_f eine von der Wahl oder der Konzentration des impermeablen, osmotisch aktiven Stoffes unabhängige Konstante ist [House, 1974]. Überdies ist der bei 700 mM ermittelte Wert doppelt so groß wie der von Hanai und Haydon [1966] bzw. Finkelstein [1976] gemessene.

Bei geringer Rührgeschwindigkeit wird die Diskrepanz zwischen Experiment und klassischer Theorie noch größer. Zum einen variiert die berechnete Permeabilität (Gleichung 41) zwischen 18 und 33 $\mu\text{m}/\text{s}$ und zum anderen hängt auch die Konzentrationsänderung Dc_{Na}^{\max} nichtlinear von c_{osm} ab (Abb. 16). Im Widerspruch dazu sagt Gleichung 41 eine lineare Abhängigkeit voraus. Letztere ist experimentell allerdings nur bei hoher Rührgeschwindigkeit zu beobachten (Abb. 16). Wahrscheinlich wird die Nichtlinearität durch ein abnehmendes d verursacht (Abb. 17). Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen verdoppelte sich letzteres bei Erhöhung des osmotischen Gradienten. Trotz Korrektur der Harnstoffverdünnung wächst P_f mit der Rührgeschwindigkeit von

38 auf 43 $\mu\text{m}/\text{s}$, wenn Gleichung 41 zur Berechnung herangezogen wird. Auch dieses Ergebnis widerspricht den Erwartungen, da P_f als Membranparameter unabhängig von der Rührgeschwindigkeit sein müßte.

Seit Einführung des konventionellen Nernstschen Filmmodells sind sich Wissenschaftler seiner Unzulänglichkeiten bewusst. Schon vor mehr als 30 Jahren unterstrich Dainty [1963], dass es sich bei der Korrektur für USL-Effekte (vgl. Gleichungen 7 - 8) nur um eine Approximation handelt, die wahrscheinlich eine Überkorrektur darstellt. Hydrodynamische Studien haben gezeigt, dass eine Beziehung zwischen der ungerührten und viskosen Grenzschicht besteht [Dainty und House, 1966]. Eine vollständige Beschreibung des transmembranen Volumenflusses erfordert folglich, das konvektive Flüssigkeitsbewegungen berücksichtigt werden. Eine vollständige Lösung des die kombinierten Prozesse von Konvektion und Diffusion beschreibenden Gleichungssystems ist allerdings nur für einige geometrische Sonderfälle möglich.

6.1.2 Berechnung von P_f aus dem hydrodynamischen Modell

Levichs Theorie zufolge [1962] ist d eine Funktion des Diffusionskoeffizienten, der Konvektionsbedingungen und der Viskosität der Lösung. Pedley [1980b] fasste die vom Rührer verursachte Flüssigkeitsbewegung in der wässrigen Phase als Staupunktströmung auf, die der osmotisch induzierten Konzentrationspolarisation entgegenwirkt. Seiner mathematisch-physikalisch exakten Entwicklung der hydrodynamischen Theorie einer zweidimensionalen Strömung zufolge ist die Elektrolytkonzentration unabhängig von der zur Membran parallelen Ortskoordinate (vgl. Kapitel 3.3). Diese Überlegungen lassen sich auf die beschriebenen experimentellen Bedingungen übertragen, da die Durchmesser von Mikroelektrode und Membran sich um zwei Größenordnungen unterscheiden. Bezogen auf den Mikrosensor kann letztere deshalb als unendliche Ebene aufgefasst werden. Weiterhin wird eine homogene Orientierung der Konvektion angenommen, so dass Konzentrationsänderungen entlang der Membranoberfläche vernachlässigt werden können, ein Postulat welches zu-

mindest in der Nähe der Elektrode sehr wahrscheinlich erfüllt ist. Weil die Ausdehnung der ungerührten Schicht sehr viel geringer als die der viskosen Grenzschicht ist, kann davon ausgegangen werden, dass nur die Geschwindigkeit in unmittelbarer Membrannähe zu berücksichtigen ist [Pedley, 1983]. Folglich kann Gleichung 17 in einem Intervall von $-d < x < d$ verwendet werden. Angesichts der genannten Beschränkungen scheint es unmöglich, eine einfache theoretische Basis für die empirische Gleichung 34 zu geben.

Ausgehend von Gleichung 17 erscheint es plausible, dass d eine Funktion des osmotischen Gradienten ist, vorausgesetzt die vom Rührer induzierte Strömungsgeschwindigkeit, ax^2 , ist klein gegenüber v . Diese Vorhersage wurde durch experimentelle Beobachtungen (Abb. 17) bestätigt. In diesem Sinn ist die aktuelle Analyse eine Verbesserung der von Pedley [1980b; 1983] veröffentlichten theoretischen Betrachtungen, da er die Dicke der USL als nur vom Diffusionskoeffizienten, dem Konvektionsparameter und der kinematischen Viskosität abhängenden Parameter angenommen hat. In Anbetracht der Tatsache, dass die Geschwindigkeit der transmembranen Volumenströmung, v , die einzige von null verschiedene Geschwindigkeit an der Membranoberfläche ist, erscheint es zwingend, dass sie die Konzentrationsverteilung in unmittelbarer Membrannähe beeinflusst.

Modifikationen der USL, die von einer Zunahme des osmotischen Druckgradienten induziert wurden, sind auch im Tierversuch beobachtet worden [Berry und Verkman, 1988]. Der zugrundeliegende Mechanismus unterscheidet sich aber von dem hier beschriebenen. Die physiologische Drosselung der hydraulischen Wasserpermeabilität wurde mit einer Abnahme des Diffusionskoeffizienten innerhalb einer komplexen zytoplasmatischen USL erklärt [Berry und Verkman, 1988].

Gleichung 17 war Grundlage für die Bestimmung von v . Im Intervall $-d < x < d$ der experimentellen Konzentrationsprofile war die Abhängigkeit des Regressionsparameters v stets besser als 96 %. Das aus v berechnete P_f (Gleichung 9) lag bei $25 \pm 2 \mu\text{m/s}$ für Asolektinmembranen und bei 20 ± 2

$\mu\text{m}/\text{s}$ für DPhPC-Membranen. Das Ergebnis der Berechnungen hing weder von der Rührgeschwindigkeit (Abb. 16) noch von dem transmembranen osmotischen Gradienten (Abb. 14 und 15) ab. Auch die Übereinstimmung mit Daten, die für ebene Lipiddoppelschichten der Literatur entnommen wurden, ist zufriedenstellend [Hanai und Haydon, 1966; Finkelstein, 1976].

6.1.3 Polarisation als Funktion des Diffusionskoeffizienten

Die Experimente haben gezeigt, dass unterschiedliche Moleküle ungerührte Schichten verschiedener Dicken zu überwinden hatten, obwohl sie sich unter identischen experimentellen Bedingungen befanden. Die Abhängigkeit der Dicke der USL vom Diffusionskoeffizienten wird vom konventionellen Modell der USL nicht berücksichtigt. Es definiert im Gegenteil eine ruhende Wasserschicht, in der die Bewegung aller Substanzen einzig und allein durch Diffusion erfolgt.

Die USL fungiert als zusätzlicher, in Reihe mit dem Membranwiderstand befindlicher Widerstand für den Stofftransport. Um die tatsächliche Membranpermeabilität zu bestimmen, muss der Beitrag der USL zur gemessenen Permeabilität berücksichtigt werden (vgl. Gleichung 12). Dafür ist die Kenntnis der individuellen Schichtdicke der jeweils permeierenden Spezies erforderlich. Basierend auf dem Nernstschen Modell wird die USL-Dicke aber für nur eine Substanz bestimmt, die dann als Referenz dient. Zum Beispiel wurde die Permeabilität ebener Membranen, die für Wasser und andere Nichtelektrolyte gemessen wurde, mit der für das Butanol charakteristischen Schichtdicke korrigiert [Holz und Finkelstein, 1970; Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Orbach und Finkelstein, 1980; Walter et. al, 1982]. Die Diffusionskoeffizienten der meisten Moleküle unterschieden sich kaum. Infolgedessen differierten die gemäß Gleichung 14 berechneten Schichtdicken nur geringfügig (< 20%) und der durch die Gleichbehandlung entstehende Fehler war vernachlässigbar.

Potentielle Anwendungen für das hydrodynamische Modell bieten insbesondere Absorptionsuntersuchungen in der Physiologie. Zum Beispiel ergaben Messungen intestinaler Absorptionsraten von Substanzen, deren Diffusionskoeffizienten sich unterschieden, dass eine einheitliche USL-Dicke für diese Stoffe nicht existiert [Levitt et. al, 1988]. Das kleine Molekül CO ($D = 2,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), hat eine größere USL zu überwinden als das größere Molekül Warfarin ($D = 7,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Gemäß Gleichung 14 ist d_{CO} 1,34 mal größer als d_{warfarin} . In Übereinstimmung damit bewegt sich der gemessene Quotient $d_{\text{CO}}/d_{\text{warfarin}}$ zwischen 1,25 und 1,46 für Darmschlingen verschiedener Radii [Levitt et. al, 1988].

Die der Mucosa des Gallenblasenepithels vom Necturus aufliegende USL hat ebenfalls keine klar definierbare Grenze. Aus dem Zeitverlauf der Verarmung oder der Akkumulation von Tetramethylammonium und Tetrabutylammonium an der Membranoberfläche wurde unter Zugrundelegung einer momentanen Änderung der Konzentration in der wässrigen Phase nach Substanzzugabe eine USL-Dicke von 50 bzw. 42 μm berechnet [Cotton und Reuss, 1989]. Wiederum entspricht das Verhältnis von 1,2 der USL-Dicken beider Substanzen genau dem aus den Diffusionskoeffizienten vorhersagbaren ($1,39 \cdot 10^{-5}$ und $7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

Berechnungen der diffusionslimitierten Kinetik für Rezeptorbindungsreaktionen haben gezeigt, dass Diffusion kein effektiver Mechanismus der Durchmischung ist. Zonen, in denen sich die Konzentration einzelner Moleküle (z.B. Enzyme, Rezeptoren) erhöht oder verringert, bilden sich heraus [Shea et. al, 1997]. Wiederum wurde für Moleküle mit kleinerem D eine homogener Verteilung gefunden. Weil die Diffusion von Proteinen viel langsamer als die von Elektrolyten ist, differieren die Dicke ihrer USL stark voneinander. Gleichung 14 zufolge ist die USL von K^+ zwei- bzw. dreimal größer als die von Insulin ($D = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) oder menschlichem Hämoglobin ($D = 6,8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

Aufbauend auf den Messungen der Dicke der USL für eine Teilchenart erscheint es mit Hilfe von Gleichung 14 möglich, dass korrespondierende d einer anderen Teilchenart zu berechnen. Aufgrund der Heterogenität und komplexen Geometrie biologischer Systeme ist dabei jedoch äußerste Vorsicht geboten. Es ist sowohl möglich, dass (a) Substanzen mit verschiedenen Diffusionskoeffizienten gleiche Polarisationserscheinungen zeigen und dass (b) unterschiedliche d für Substanzen gemessen werden, die ähnliche Diffusionskoeffizienten haben. Studien der Traubenzuckerabsorption im Dünndarm vom Hund stellen ein Beispiel für Fall (a) dar. Für niedrige Perfusionsraten wurde eine USL-Dicke von 57 μm berechnet [Levitt et. al, 1990]. Ein größeres d ist nicht realisierbar, da der Raum zwischen den Villi nur $\sim 50 \mu\text{m}$ breit ist. Invaginationen neuronaler Membranen weisen gleichfalls ungerührte Regionen von relativ großer Oberfläche und kleinem Volumen auf [Barry, 1984]. Fall (b) bezieht sich auf Zeitmessungen, mit deren Hilfe die USL-Dicke bestimmt wird [Dainty und House, 1966; Dietschy et. al, 1971]. Die Halbwertszeit für Konzentrations- oder Potentialänderungen hängt von der Membranpermeabilität, der Volumenabsorption und der (endlichen) Geschwindigkeit des Konzentrationsanstiegs in der Volumenphase nach Substanzzugabe ab. Änderungen dieser Parameter, die unabhängig von der USL sind, können als Änderung von d missdeutet werden [Lucas et. al, 1992].

6.1.4 Vergleich des Nernstschen und hydrodynamischen Modells

Das Nernstsche Modell geht von einer fixierten Dicke der USL aus, die für alle Substanzen gleich ist. Es erlaubt a priori keine Berechnung der Ausdehnung dieser Schicht. Im Widerspruch dazu hängt die experimentell bestimmte Dicke der USL davon ab, welche Substanz diffundiert. In Übereinstimmung mit Gesetzen der physiko-chemischen Hydrodynamik kann festgestellt werden, dass die Größe der USL nicht nur eine Funktion der Konvektionsbedingungen, sondern auch des Diffusionskoeffizienten ist.

Das hydrodynamische Modell (Gleichung 17) erlaubt nicht, die membrannahe Konzentration des Elektrolyten aus seiner Konzentration in der wässrigen Volumenphase und der hydraulischen Membranpermeabilität vorherzusagen. Mit Blick auf die Abhängigkeit der Diffusionslimitierungen von der Geometrie des zu untersuchenden Systems (in Gleichung 17 erfasst im Konvektionsparameter, a , ist dieser Umstand leicht zu verstehen. Tatsächlich korreliert die Größe der USL mit den Dimensionen des Untersuchungsobjektes [Mierle, 1985]. Aus einer Kombination von Gleichung 4 und 17 wäre es denkbar, einen Ausdruck herzuleiten, der hilfreich für eine Schätzung der Elektrolytkonzentration in unmittelbarer Membrannähe sein könnte, vorausgesetzt d und P_f (und folglich auch v) sind bekannt. Es ist allerdings offen, ob das aus Zeitmessungen abzuleitende d [vgl. Cotton und Reuss, 1989] identisch zu dem in Gleichung 4 und 17 verwendeten ist. Der dabei entstehende Fehler dürfte bei einer Interaktion von Osmose und Konvektion größer sein als in Abwesenheit von Rührbewegungen ($a = 0$ in Gleichung 17). Analoge Schlussfolgerungen wurden bereits früher für das konventionelle Modell der USL gezogen [Barry und Diamond, 1984; Pedley, 1983].

Bei bekannter Konzentrationsverteilung innerhalb der USL wird vom konventionellen Modell eine zu hohe Strömungsgeschwindigkeit abgeleitet. Die Diskrepanz wächst mit zunehmender Volumenströmung oder Rührgeschwindigkeit. Im Experiment war ein Fehler von 100 % das schlechteste Ergebnis. Bei niedriger Rührgeschwindigkeit ist d eine Funktion der Geschwindigkeit der Volumenströmung. Infolgedessen sind Schätzungen der membrannahen Konzentration, die auf einem invarianten d beruhen, mit einem zusätzlichen Fehler behaftet. Bei hohen Rührgeschwindigkeiten ist d konstant, d. h. es hängt nicht vom osmotischen Gradienten ab. In dieser Hinsicht sind die Gleichungen 7 und 8 korrekt. Die hydrodynamische Theorie liefert das gleiche Ergebnis (Gleichung 13), weil ein großer Geschwindigkeitsgradient an der Phasengrenze nur geringfügig von der vergleichsweise kleinen Geschwindigkeit des transmembranen Wasserflusses modifiziert wird. Da der Konzentrationsgradient an der

Membranoberfläche als Funktion des Geschwindigkeitsgradienten aufgefasst wird, ist er ebenfalls invariant.

Obwohl die hydrodynamische Beschreibung des transmembranen Volumenflusses (Gleichung 17) das tatsächliche experimentelle System erheblich vereinfacht, widerspiegelt sie die Konzentrationsverteilung innerhalb der USL mit hinreichender Genauigkeit. Mikroelektrodenmessungen der Konzentrationsprofile von Elektrolyten in unmittelbarer Membrannähe sind damit ein sehr nützliches Verfahren zur Bestimmung der hydraulischen Membranleitfähigkeit und der durch verschiedene Pharmaka, Peptide oder Proteine induzierten Veränderung derselben.

6.2 Membrandehydratation infolge von Lectin-Lipid-Wechselwirkungen

Die Wechselwirkungen zwischen wasserlöslichen Ribosomen inaktivierenden Proteinen (RIP) und Bilipidmembranen wurden anhand induzierter Änderungen von hydraulischer Membranpermeabilität und Hydrophobizität der Membranoberfläche charakterisiert. Die vierkettigen (RCA120 und MLI) und die zweikettigen (RCA60 und MLIII) RIPs [Cidores et. al, 1993] sowie die isolierten Untereinheiten RTA und RTB beeinflussen die genannten Parameter in einer lipidabhängigen Art und Weise.

Die Adsorption aller Lectine an der Membranoberfläche verringerte die hydraulische Leitfähigkeit der Bilipidschicht. Die Annahme, dass der Einbau der RIP's zu Packungsdefekten in der Bilipidschicht führt, hatte das Gegenteil erwarten lassen [Needham et. al, 1988]. Zumindest für kleine Peptide, die an die Bilipidschicht binden, wurde beschrieben, dass ihre Verteilung in der Membran von der des Wasser widergespiegelt wird [Jacobs und White, 1989]. Gemäß dem Lösungs-Diffusionsmodell ist eine erhöhte Wasserkonzentration in der Bilipidschicht Ausdruck einer gestiegenen Wasserpermeabilität [Paula et.

al, 1996; Paula et. al, 1998]. Die plausibelste Erklärung für die divergierenden Effekte von Modellpeptiden und Lectinen ist, dass mit der rezeptorvermittelten Lectinadsorption an der Membranoberfläche die Anzahl der zur Verfügung stehenden Diffusionspfade dezimiert wird, d. h. dass die RIP's an der Grenzfläche Orte des Wassereintritts in die Bilipidschicht okkupieren. Unlängst wurde eine analoge Situation für Ethanol diskutiert, das obwohl es P_f verringert, ebenfalls den Wassergehalt der Bilipidschicht erhöht [Huster et. al, 1997].

Größere von Lectinen besetzte Areale koexistieren mit solchen, die von Glykolipidrezeptoren frei zu sein scheinen [Peters et. al, 1984a]. Bedingt durch die hohe Affinität [Grant und Peters, 1984] von RCA60 zu GM1 (die Assoziationskonstante beträgt $2.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) kann angenommen werden, dass alle verfügbaren Rezeptormoleküle besetzt werden. Die sich herausbildenden

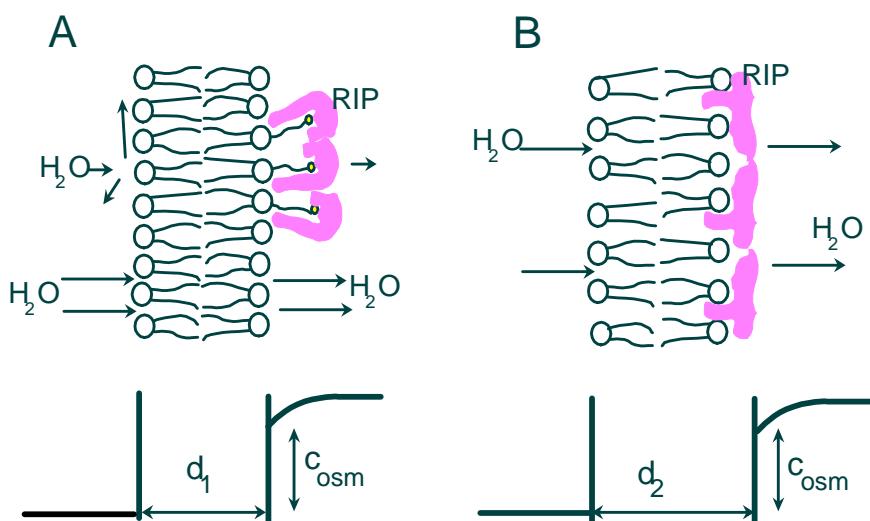


Abbildung 54 Mechanismus der Verringerung des Wasserflusses: (A) An den GM1-Rezeptor gebundene RIP-Cluster verringern die Wasserpermeabilität des von ihnen bedeckten Fragmentes einer DPhPC/GM1 Membran erheblich (pH 7,5). Wahrscheinlich okkupieren die Lectine die Diffusionswege des Wassers. (B) Eine komplette Proteinschicht adsorbiert an der Oberfläche einer EPC/PE- oder EPC/Ergosterol-Membran (pH 7,5) bzw. DPhPC/GM1-Membran (pH 4,5) und erhöht so die Dicke, d, der osmotischen Barriere. Obwohl die Differenz der Harnstoffkonzentrationen keine Änderungen erfährt, verringert sich der osmotische Gradient, c_{osm}/d .

Cluster [Peters et. al, 1984b] sind wahrscheinlich merklich weniger wasser-durchlässig als der Rest der Membran (Abb. 54). Da aber der Fluoreszenzfarbstoff (DPE) höchstwahrscheinlich von den Clustern ausgeschlossen ist, lässt sich eine moderate Abnahme von e unter diesen Bedingungen finden. Aufgrund der GM1-Konzentration (10 mol %) ist anzunehmen, dass die Cluster wenigstens 10 % der Membranfläche einnehmen. Dementsprechend müsste auch P_f um 10% fallen. Diese Annahme wurde experimentell bestätigt (Abb. 19). Die von MLI und MLIII verursachten Effekte sind jedoch größer (vgl. Abb. 21). Von den voluminösen Lectinen war allerdings auch zu erwarten, dass sie in einem Areal als zusätzliches Hindernis für die Wasserdiffusion fungieren, das zwei oder dreimal größer ist als die vom Rezeptor eingenommene Fläche.

Wenn die RCA60-Lipid-Komplexe sauren pH-Werten ausgesetzt werden, assoziiert das an die GM1-Rezeptoren gebundene Protein mit der Phosphatidyl-cholin-Doppelschicht [Utsumi et. al, 1987]. Es dringt tief in die Modellmembran ein [Ramalingam et. al, 1994]. In diesem Fall verursacht das Protein wahrscheinlich eine Verringerung der Beweglichkeit der aliphatischen Ketten [Hincha et. al, 1993], die ebenfalls zur Verminderung der hydraulischen Membranleitfähigkeit beitragen könnte. Der geschwindigkeitslimitierende Schritt des Wassertransportes ist allerdings die Diffusion durch den dicht gepackten Teil der Lipidketten (vgl. Abb. 2 und 3), die den Ort des höchsten Widerstands repräsentieren [Marrink und Berendsen, 1994]. Deshalb ist anzunehmen, dass die Lectine eine Zunahme der Lipidpackungsdichte in diesem Bereich induzieren, die ihrerseits die Wasserpermeabilität reduziert [Huster et. al, 1997]. Durch die Beobachtung, dass sich die Dielektrizitätskonstante an der Membranoberfläche verringert, erfährt die Hypothese eine indirekte Bestätigung. Die korrespondierende Zunahme der Oberflächenhydrophobizität korreliert mit einer Vergrößerung der mechanischen Membranspannung [Ohki und Arnold, 1990; Ohki und Zschornig, 1993]. Letztere wird gewöhnlich von einer Abnahme der Wasserpermeabilität begleitet [Evans und Needham, 1986], die im Experiment auch tatsächlich beobachtet wurde.

Aus den Experimenten den Beitrag von Mikroviskositäts- oder Spannungsänderungen ableiten zu wollen, erscheint schwierig. Ausschlaggebend für die Änderungen der hydraulischen Leitfähigkeit könnte auch ein ganz anderer Mechanismus sein. Die auf der Membranoberfläche beobachtete rapide Abnahme der Dielektrizitätskonstanten legt nahe, dass die ebene Membran vollkommen vom Lectin bedeckt ist. Damit wird die osmotische Barriere breiter (Abb. 54). An der Phasengrenze ändert sich die Löslichkeit der osmotisch aktiven Substanz. Infolgedessen verringert sich der osmotische Gradient, auch wenn die Harnstoffkonzentration unverändert bleibt. Im Ergebnis wird der transmembrane Wasserfluss sowohl im Fall einer aus DPhPC/GM1 bestehenden Bilipidschicht (saures Milieu) als auch im Fall einer aus natürlichen Lipiden hergestellten Membran reduziert.

Elektrostatische Effekte scheinen eine untergeordnete Rolle für die Protein-Lipid-Wechselwirkungen zu spielen, da die Inkorporation von 20 mol % PS die vom Lectin induzierten Effekte nicht modifiziert (Abb. 27). Bis jetzt wurde angenommen, dass die Lectin-Membran-Wechselwirkungen einen RCA60-Rezeptor erfordern [Hincha et. al, 1993; Utsumi et. al, 1987; Ramalingam et. al, 1994]. Diese Schlussfolgerung basiert auf Experimenten, die nur mit PC-Membranen ausgeführt wurden. Der Austausch von DPhPC durch eine EPC/PE-Mischung zeigte, dass nicht nur RCA60 sondern auch andere Lectine der Proteinfamilie sehr effizient mit rezeptorfreien Bilipidschichten in Wechselwirkung treten (Abb. 19, 21, 22, 24 - 28). Die in Anwesenheit von Ergosterol und von PE gemessenen hydrophoben Wechselwirkungen waren gleich stark ausgeprägt (Abb. 21 und 27). Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass der Proteineinbau ein spezielles Lipid voraussetzt. Wahrscheinlicher ist, dass Unterschiede in den mechanischen Membraneigenschaften für die Lipidabhängigkeit verantwortlich sind.

Die Membranspannung bestimmt auch die hydraulische Leitfähigkeit: je größer die Spannung, desto niedriger ist P_f [Bloom et. al, 1991; Needham, 1995]. Im Gegensatz dazu ist eine Zunahme der Spannung der Bilipidschicht mit einer erhöhten Membranlöslichkeit von Lysolecithin verbunden [Zhelev,

1996]. Die Insertion von Lysolecithin erfolgt in zwei Schritten. Zunächst akkumuliert es in einer der Monoschichten, die sich daraufhin ausdehnt. Die resultierende Zunahme der Spannung fördert die Bildung von Monoschichtdefekten. Ein nachfolgender kollektiver Lipidtransport durch kurzlebige Defekte bestimmt die gemessene Lipidtransferrate [Needham und Zhelev, 1995]. Diese Experimente lassen jedoch nicht erkennen, wie der Lysolecithineinbau von der Oberflächenspannung der ersten Monoschicht abhängt. Es ist möglich, dass selbiger von einer Zunahme der Spannung inhibiert wird, ähnlich der Membranpartition von Wasser. Dieses experimentelle Ergebnis [Needham und Zhelev, 1995] widerspricht deshalb nicht unserer Beobachtung, dass die Proteinadsorption an der Membranoberfläche von Lipiden erleichtert wird, die den Eintritt von Wasser in die Bilipidschicht fördern. Vollständig gesättigte DPhPC-Bilipidschichten treten nur dann mit den Lectinen in Wechselwirkung, wenn ein spezifischer Rezeptor anwesend ist. Aus natürlichen Lipiden bestehende Membranen, z. B. Mischungen aus PE/EPC und PE/Ergosterol, haben eine höhere Wasserpermeabilität als DPhPC-Bilipidschichten und ihre Wechselwirkung mit den RIP's erfordert weder GM1 noch einen sauren pH-Wert. Eine lockerere Packung der Lipidmoleküle an der Wasser-Lipid-Grenzfläche und die damit verbundene tiefere Penetration von Wasser in ungesättigte Bilipidschichten [Huster et. al, 1997] kann für die unterschiedliche Wasserpermeabilität von Bilipidschichten verschiedener Zusammensetzung, etwa DPhPC und EPC/PE oder EPC/Ergosterol, verantwortlich gemacht werden. Wie der Membraneintritt von Wasser wird auch die Proteinadsorption von der Membranspannung gelenkt. Unsere experimentellen Ergebnisse bestätigen damit die Vorhersage [Gawrisch et. al, 1995], dass eine Änderung der Lipid-Lipid-Wechselwirkungen im Kohlenwasserstoffkern der Membran, zum Beispiel im Ergebnis der Einführung mehrfach ungesättigter Fettsäuren, auch die Lipid-Lösungsmittel und Lipid-Peptid-Wechselwirkungen an der Phasengrenze ändern wird.

6.3 Solvent drag

Ganz im Gegensatz zu der im vorstehenden Kapitel erörterten Proteinadsoption führt die Insertion von Peptidporen, die die Membran überspannen, zu einer Erhöhung der hydraulischen Membranleitfähigkeit. Auch in Gegenwart eines Massenstromes durch Kanäle erlaubt die Mikroelektrodentechnik, die konkurrierenden Wasser- und Ionenflüsse zu messen. Überdies kann zwischen beiden Bestandteilen des Massenfluxes, Solvent drag und pseudo-Solvent drag unterschieden werden. Ersterer ist auch dann nachzuweisen, wenn die Ionenkonzentrationen an beiden Phasengrenzen der Membran gleich sind (Abb. 38 und 39). Aufgrund der Reibungskräfte zwischen Ionen und Wasser war das Phänomen vorhergesagt worden [Barry und Diamond, 1984 und dort zitierte Quellen]. Der begleitende pseudo-Solvent drag erschwert den experimentellen Nachweis des echten Solvent drag [Finkelstein, 1987]. Das Phänomen des pseudo-Solvent drag ist auf die Permeabilität des Kanals für den gelösten Stoff zurückzuführen. Sein Beitrag ist genau dann vernachlässigbar klein, wenn der transmembrane Konzentrationsgradient vernachlässigbar klein ist (vgl. Abb. 10). Eine derartige Situation ist realisierbar, wenn die membrannahe Konzentration mit Mikroelektroden kontrolliert wird. In den hier geschilderten Experimenten waren die Anteile des echten und des pseudo-Solvent drag etwa gleich groß, d. h. nur etwa die Hälfte des Kationenfluxes war auf den Mitnahmeeffekt des Wasserstromes zurückzuführen. Die andere Hälfte ging auf das Konto der einfachen Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten, der innerhalb der ungerührten Schichten vom osmotischen Massenstrom induziert wurde (Abb. 38 und 39).

Die hydraulische Wasserpermeabilität eines Gramicidinkanals beläuft sich in Abwesenheit von Kationen auf $1,6 \pm 0,3 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ (Abb. 37). Dieser Wert ist signifikant kleiner als die Werte von $6 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ [Dani und Levitt, 1981a] oder $9 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ [Wang et. al, 1995], die für Gramicidin in Glycerolmonoolein-Membranen berichtet wurden. Er differiert kaum von der Permeabilität von $9,6 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$, die an Phosphatidylethanolamin-Mem-

branen gemessen wurde [Rosenberg und Finkelstein, 1978a]. Der letztgenannte Wert beruht auf einer zu klein ausgefallenen Schätzung der elektrischen Einzelleitfähigkeit des Gramicidinkanals, g , und auf einem zu großen Wert für die Wasserpermeabilität der Membran. Die Autoren haben g in 10 mM NaCl durch einfache Division des für 100 mM veröffentlichten Wertes ermittelt. Da aber die Einzelkanalleitfähigkeit nicht linear von der Kationenkonzentration abhängt [Hladky und Haydon, 1984], dürfte die Approximation wenigstens 40 % zu klein ausgefallen sein [Dani und Levitt, 1981a]. Ferner haben sie die Konzentration der osmotisch aktiven Substanz als c_{osm} angesehen, ohne die vom Wasserfluss induzierte Verdünnung zu berücksichtigen. Das berechnete P_f war demzufolge zu groß. Nach entsprechender Korrektur von g und P_f ist eine gute Übereinstimmung des in der vorliegenden Arbeit ermittelten Wertes für die hydraulische Leitfähigkeit mit dem von Rosenberg und Finkelstein ermittelten festzustellen. Beide Beträge sind jedoch wesentlich kleiner als der für Glycerolmonooleinmembranen gemessene. Eine Computersimulation des Gramicidin-Lipid-Modellsystems legt den Schluss nahe, dass die große Diskrepanz zwischen p_f in Glycerolmonooleat- und Phospholipiddoppelschichten auf Unterschiede in der Wasserhydratation am Kanaleingang zurückzuführen ist [Chiu et. al., 1999].

Aus dem in Abwesenheit eines transmembranen Kationenkonzentrationsgradienten gemessenen Ionenfluss folgt, dass ein Natrium- bzw. ein Kaliumion von $4,8 \pm 0,8$ bzw. $4,6 \pm 0,6$ Wassermolekülen auf seinem Weg durch den Kanal begleitet wird (Abb. 6 und 7). Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von der bereits publizierten Zahl 5,3, die auf Flussmessungen basiert [Rosenberg und Finkelstein, 1978a]. Die Autoren hatten N als den Quotienten aus osmotischer und diffusiver Permeabilität (P_f und P_d) ermittelt. Die oben bereits diskutierte Unterschätzung von P_f wurde teilweise mit einer Unterschätzung von P_d kompensiert. Rosenberg und Finkelstein nutzten ein fehlerhaftes Verfahren zur Korrektur der Effekte der ungerührten Schicht. Die Berechnungen der Membranpermeabilität, P_d , des radioaktiven Wasserisotops THO beruhten auf der beobachteten Permeabilität, $P_{observed}$, ($1/P_{observed} = d_{water}/D$

$+ 1/P_d$) und der für radioaktiv markiertes Butanol gemessenen Dicke der USL. Hierbei negierten die Autoren, dass d ($d_{\text{THO}} = 0,75 d_{\text{butanol}}$) vom Diffusionskoeffizienten abhängt, da das Phänomen zur damaligen Zeit nur in einer theoretischen Studie [Levich, 1962] beschrieben war.

In einem unabhängigen Ansatz erfolgte die Bestimmung von N im offenen Stromkreis. Strömungspotentialmessungen gaben für K^+ einen Wert von 6,6 [Tripathi und Hladky, 1998], 6,5 [Rosenberg und Finkelstein, 1978a] und 7,1 [Levitt et. al, 1978b]. Die für Na^+ ermittelten Beträge beliefen sich auf 7,1 [Tripathi und Hladky, 1998], 6,5 [Rosenberg und Finkelstein, 1978a] und 9 [Levitt, 1984]. Auch dieser Ansatz erfordert die Korrektur von Effekten der USL. Die derzeit dafür am besten geeignete Methode ist die mikroelektrodenstützte Konzentrationsmessung in unmittelbarer Membrannähe. Ungeachtet dessen liefern auch mit Mikroelektroden durchgeführte Strömungspotentialmessungen Werte für N , die aufgrund des nichtidealen Elektrodenpotentials um 1,0 zu groß sein können [Tripathi und Hladky, 1998]. Damit befindet sich die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Anzahl von 5 Wassermolekülen, die sich zusammen mit einem Kation im Kanal befinden, in angemessener Übereinstimmung mit publizierten Daten.

Schlussfolgernd ist festzustellen, dass die Mikroelektrodentechnik eine geeignete Methode für die Demonstration des Solvent drag und die Registrierung kompetitiver Ionen- und Wasserflüsse durch Membranen ist. In einem einzigen Experiment können die hydraulische Membranpermeabilität, die Wasserleitfähigkeit eines Einzelkanals und die Anzahl der Wassermoleküle, die sich im Kanal befinden, bestimmt werden. Der Hauptvorteil der Methode liegt darin, dass die auf die Diffusion durch Grenzschichten zurückzuführenden Phänomene zu Messzwecken genutzt werden, anstatt die USL-Effekte einer aufwendigen Korrektur zu unterziehen. Flussdichte und Permeabilität werden aus den grenzflächennahen Konzentrationsgradienten, die nur aufgrund von Diffusionslimitierungen entstehen, abgeleitet. Selbstverständlich ist der Ansatz nicht auf Modellkanäle begrenzt. Er eignet sich gleichwohl für die Untersuchung rekonstruierter Membranproteine. Mehr noch, anstelle der mikroelek-

trodengestützen Erfassung der Ionengradienten kann auch die Messung der Konzentrationsverteilung eines Fluoreszenzfarbstoffs in Zellnähe treten, aus dem dann Flussdichte [Phillips et. al, 1999] oder Permeabilität [Kovbasnjuk et. al, 1998] abzuleiten sind.

6.5 Wasserselektivität der Peptidkanäle

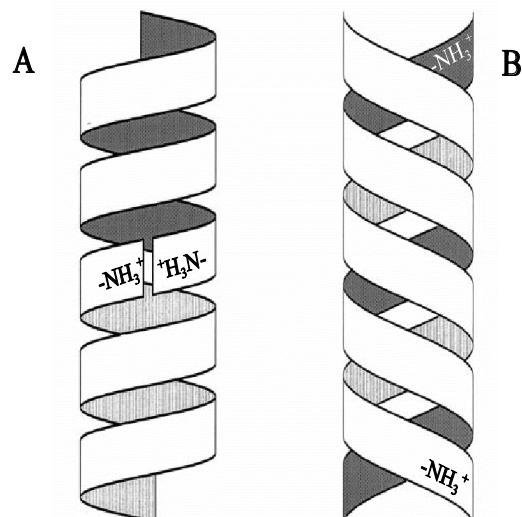
Desformylgramicidin besitzt eine höhere Wasserselektivität als Gramicidin A, d. h. die jeweiligen Quotienten aus Wasser- und Ionenleitfähigkeit differieren um zwei Größenordnungen. Der Unterschied basiert nicht auf einer geringeren Ionenleitfähigkeit, sondern auf der hohen Wasserleitfähigkeit des Desformylgramicidinkanals. P_f ist fünfmal größer als der theoretische Wert von $2 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ (Gleichung 1). Die Ursache für die Diskrepanz ist unklar. Sie ist weder mit der experimentellen Unsicherheit des Wertes für N zu erklären, noch scheint eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten von Wasser im Kanallumen wahrscheinlich zu sein. Das Peptid hat diese große Wasserpermeabilität mit dem humanen Wasserkanalprotein AQP4 und dem E. coli entstammenden AQPZ [Yang und Verkman, 1997; Borgnia et. al, 1999b] gemein. Die Tatsache, dass nun auch ein Modellkanal Single file-Wassertransportgeschwindigkeiten von $1,1 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ erlaubt, lässt Zweifel an der Hypothese aufkommen, dass die Anordnung von AQP4 im orthogonalen Proteinensemble für seine hohe Wasserpermeabilität verantwortlich ist [Yang et. al, 1997].

Die Unfähigkeit des Desformylgramicidinpeptids, Kationen am Durchtritt durch den Kanal zu hindern, legt die Vermutung nahe, dass die positive Ladung des N-terminalen Endes nicht im Inneren der engen Pore lokalisiert ist (Abb. 55). Folglich erscheint ein Faltungsmotiv, in dem der aktive Kanal durch die Assoziation von zwei Einzelstranghelices über ihre N-Termini entsteht, als wenig wahrscheinlich. Zur gleichen Schlussfolgerung kommt man nach Abschätzung der Energiebeträge, die aufgewendet werden müssten, um die positiven N-Termini in die hydrophobe Membranumgebung zu verbringen und sie im membranüberspannenden Kanal in unmittelbarer Nachbarschaft anzu-

ordnen. Die beobachtete hohe Protonen- und Kationenleitfähigkeit des Desformylkanals lässt vielmehr die Doppelhelixkonfiguration als die in der Membran aktive Konformation erscheinen (Abb. 55). Zur gleichen Schlussfolgerung kamen Rottenberg und Koeppe [1989] aufgrund der von Desformylgramicidin induzierten Entkopplung der mitochondrialen Atmung. Für die Doppelhelixkonfiguration spricht ferner die lange Lebenszeit des Einzelkanals (Abb. 41 und 43). Sie entspricht der von Gramicidinheterodimeren, die aufgrund von Unterschieden in der Chiralität ebenfalls Doppelstränge ausbilden [Durkin et. al, 1992]. Letztlich weisen auch die schnellen Fluktuationen des Einzelkanalstromes auf die Doppelhelixkonformation hin. Dieses Phänomen kennzeichnet die Leitfähigkeit von Gramicidin A-Doppelsträngen, die in sehr dicken Membranen ausgebildet werden [Mobashery et. al, 1997].

Unterschiede in der Struktur der aus Einzel- und Doppelstrangdimeren bestehenden Pore könnten für die höhere Wasserpermeabilität des Desformylgramicidin verantwortlich sein. Allerdings wird in der Literatur generell davon ausgegangen, dass der aus Einzelstrangmolekülen bestehende Gramicidin A-Kanal dem Wassertransport einen vernachlässigbar kleinen Widerstand entgegensetzt. Eine molekulardynamische Simulation zeigt, dass der Wassertransport viel schneller ablaufen könnte, wenn er außerhalb des Kanallumens nicht auf einen signifikanten Widerstand treffen würde [Chiu et. al, 1999]. Folgt man der

Abbildung 55 Mögliche Konformationen des Desformylgramicidinkanals. **A** Der aktive Kanal entsteht durch die Assoziation zweier Einzelstranghelices über ihre N-Termini. **B** Energetisch günstiger ist die Dimerbildung in Doppelhelixkonfiguration.



Annahme, dass die Wasserhydratation an der Oberfläche einer Phospholipidmembran sich von der einer Glycerolmonooleat-Doppelschicht unterscheidet und dass die digerierende Umgebung für die verschiedenen Wasserpermeabilitäten des Gramicidinkanals [Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Dani und Levitt, 1981a] verantwortlich ist [Chiu et. al, 1999], muss auch die positive Ladung der N-Termini als Ursache für die hohe hydraulische Permeabilität in Betracht gezogen werden. Wenn dem so wäre, würde die positive Ladung am Kanaleingang die Geschwindigkeit beeinflussen, mit der Wasser die Hydratationsumgebung des Kanalinneren gegen die außerhalb des Kanals zu tauschen imstande ist, und sie würde somit den Eintrittswiderstand für Wasser senken.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Desformylgramicidin mit seiner hohen hydraulischen Leitfähigkeit als Modell für die extreme Leitfähigkeit natürlicher Wasserkanalproteine aufgefasst werden kann (AQP4 und AQPZ). Der Nachweis, dass geladene Aminosäurereste am Kanaleingang tatsächlich den Eintrittswiderstand für Wasser senken, bleibt weiterführenden Experimenten mit eng verwandten Gramicidinanalogen vorbehalten.

6.6 Wasser- und Ionenleitfähigkeit der Aquaporine

Unter Beibehaltung ihrer funktionellen Aktivität ist es gelungen, Wasserkanalproteine der Aquaporinfamilie in ebene Bilipidmembranen zu rekonstruieren. Sowohl das menschliche AQP1 als auch das aus *E. coli* stammende AQPZ verfügen über eine extrem hohe Wasserselektivität, wie simultan durchgeführte Messungen der Wasser- und Ionenpermeabilität zeigten. Weniger als eins aus 10^7 Transportereignissen besaß elektrogenen Charakter. Dieses Ergebnis bestätigt an Oozytenmembranen durchgeführte Untersuchungen, die weder für AQPZ [Calamita et. al, 1995] noch AQP1 [Preston et. al, 1992] eine Erhöhung der Leitfähigkeit ergaben. Auch andere Mitglieder der Proteinfamilie lassen in der Regel keine Kanalaktivität erkennen [Fushimi et. al, 1994; Mulders et. al, 1995]. Eine Vielzahl davon abweichender Ergebnisse unterstreicht allerdings

die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen. AQP6 unterscheidet sich von den übrigen Mitgliedern der Proteinfamilie nicht nur durch seine intrazelluläre Lokalisation, sondern auch dadurch, dass der Wassertransport durch den Kanal von einer Leitfähigkeit für Anionen begleitet wird [Yasui et. al, 1999]. Dessen ungeachtet konnte die gefundene forskolinstimulierte Ionenleitfähigkeit von AQP1 produzierenden Oozyten [Yool et. al, 1996] von anderen Forschergruppen nicht bestätigt werden [Agre et. al, 1997; Sasaki et. al, 1997; Verkman und Yang, 1997; Deen et. al, 1997]. Mit $1,5 \mu\text{A/V}$ ist die Leitfähigkeit der Membran von *X. laevis*-Oozyten vergleichsweise groß. Deshalb können einzelne Kanäle unter diesen Bedingungen nicht registriert werden. Beispielsweise ist die Ausbildung ionenleitender Kanäle durch AQP0 (früher als MIP, "Major intrinsic protein of lens fiber membranes", bezeichnet) nach Rekonstruktion in ebene Bilipidmembranen nachgewiesen worden [Ehring et. al, 1990] nicht aber nach Exprimierung in *X. laevis*-Oozyten [Mulders et. al, 1995]. Dank der kleineren Leitfähigkeit ebener Membranen (0.5nA/V in den beschriebenen Experimenten) ist die Sensitivität der Strommessungen im rekonstruierten System hinreichend für den Nachweis einzelner Kanäle.

Sowohl AQP1 als auch AQPZ bilden allerdings Kanäle aus, die über keinerlei elektrische Aktivität verfügen. Im scharfen Kontrast dazu steht ihre hohe hydraulische Leitfähigkeit. Die Wasserpermeabilität der Aquaporine ist vergleichbar mit der von Gramicidinkanälen [Rosenberg und Finkelstein, 1978a; Dani und Levitt, 1981a]. Der Wasserfluss durch die sehr gut erforschten Modellkanäle erfolgt, gleich dem durch Aquaporine, in einer Single file-Anordnung [Levitt, 1974]. Der für ein AQPZ-Monomer in der ebenen Membran berechnete Einzelkanalleitfähigkeitswert von $4 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{s}$ ist zwei oder dreimal kleiner als der Koeffizient der nach Rekonstruktion von AQPZ in Proteoliposomen [Borgnia et. al, 1999b] gemessen wurde. Ursache könnten Differenzen zwischen dem Protein-Lipid-Verhältnis der Proteoliposomen und dem der Monolayer an der Luft-Wasser-Phasengrenze sein. Dessen ungeachtet befinden sich die für die ebene Membran berechneten Werte in akzeptabler Übereinstimmung mit dem für Proteoliposomen ermittelten.

Temperaturabhängige Messungen von P_f ergaben eine Arrhenius-Aktivierungsenergie von 4 kcal/mol für den Wassertransport durch Membranen, die AQPZ enthielten. Energien dieser Größenordnung werden gewöhnlich als Beweis für die Passage durch transmembrane wassergefüllte Poren aufgefasst [Illsley und Verkman, 1986]. Identische Werte wurden für AQP1 [Zeidel et. al, 1992], AQP4 [Yang et. al, 1997] und AQPZ [Borgnia et. al, 1999b] in Proteoliposomen gemessen. Aktivierungsenergien von 10 bis 15 kcal/mol sind hingegen typisch für die Wasserdiffusion durch unmodifizierte ebene Phospholipidmembranen [vgl. Übersichtsartikel von Fettiplace und Haydon, 1980] und stimmen gut mit den hier ermittelten Werten überein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Versuche zur Rekonstruktion funktionell aktiver Aquaporine in ebene Bilipidmembranen erfolgreich waren. Der Wassertransport durch AQP1- und AQPZ-haltige Membranen ist elektrisch inaktiv und spannungsunabhängig.

7 Schlußfolgerungen und Ausblick

Die Arbeit erbrachte den Nachweis, dass ortsaufgelöste mikroelektroden-gestützte Messungen der Elektrolytkonzentration in Membrannähe für die Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit einer Membran eingesetzt werden können. Vage Abschätzungen der Effekte der ungerührten Schicht, die bisher eine erhebliche Fehlerquelle für Volumenflussmessungen durch ebene Bilipidmembranen, Epithelien und größere Zellen darstellten, gehören damit der Vergangenheit an. Der Vergleich experimentell gemessener und theoretischer Konzentrationsprofile zeigte, dass eine befriedigende Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment nur dann zu erreichen ist, wenn der abrupte Übergang zwischen ideal gerührter Zone einer wässrigen Phase und konvektionsfreier ungerührter Schicht durch einen allmählichen Anstieg der Rührgeschwindigkeit von der Membranoberfläche hin zum Flüssigkeitsvolumen ersetzt wird.

Ergänzt um gebräuchliche elektrische Methoden, insbesondere um Strommessungen unter den Bedingungen der Spannungsklemme, kann die hier vorgestellte Mikroelektrodentechnik zwischen konvektiven und diffusiven Anteilen des osmotisch induzierten Elektrolyttransports durch Membrankanäle unterscheiden. Weiterführende Forschungen erschöpfen sich nicht in der geplanten Quantifizierung des via Solvent drag realisierten Kationentransports durch rekonstruierte Natrium- oder Kaliumkanäle. Vielmehr ergeben sich auch im Rahmen der kontrovers geführten Diskussion über die Mechanismen des epithelialen Transports potentielle Anwendungen für Messungen der Konzentrationspolarisation und ihre Auswertung nach dem hydrodynamischen Modell grenzflächennaher Wasserschichten. Hervorzuheben ist ferner, dass die Diskrepanzen bezüglich der Ionenleitfähigkeit der Aquaporine mit der Rekonstruktion von Wasserkanalproteinen in ebene Bilipidmembranen und der simultanen Messung ihrer hydraulischen und elektrischen Leitfähigkeiten eindeutig zu klären sind. In Kombination mit der Entwicklung eines Expressionssystems für

die Säuberung größerer Mengen modifizierten Aquaporins, wird dieses definierte System die molekulare Basis für die Erforschung der extrem hohen Wasserselektivität der Aquaporine bilden. Gestützt werden diese Bemühungen von Untersuchungen an synthetischen Gramicidinderivaten, deren Struktur auf eine Optimierung der Wasserselektivität ausgerichtet ist.

Die Methode der mikroelektrodengestützten Volumenflussmessungen eröffnet nicht nur neue Perspektiven für die Untersuchung der Kopplung von Wasser- und Ionenfluss durch rekonstruierte Carrier und integrale Proteine, sondern auch von Protein-Lipid-Wechselwirkungen. In der vorliegenden Arbeit wird mit der Betrachtung von Lectin-Lipid-Wechselwirkungen, die eine parallele Abhängigkeit der Wasserpermeation und Proteinadsorption von der Lipidpackungsdichte zeigten, ein erstes Beispiel geliefert.

8 Zusammenfassung

Aufgrund des Elektrolytrückhalts führt der osmotische Wasserfluss zur Änderung der Elektrolytkonzentration an der Membrangrenzfläche. Mit ionensensitiven Mikroelektroden wurde die Elektrolytanreicherung bzw. -verarmung auf der hypotonischen bzw. hypertonischen Seite einer ebenen Bilipidmembran registriert. Die experimentellen Konzentrationsprofile ließen sich nicht mit einer einfachen Superposition des osmotisch initiierten Substratflusses und der Rückdiffusion des Elektrolyten erklären. Das Konzept der Nernstschen Grenzschicht, dem zufolge sich zwischen perfekt durchmischter Lösung und Membran eine ruhende Flüssigkeitsschicht befindet, beinhaltet zu weitreichende Vereinfachungen. An die Stelle der totalen Negierung konvektiver Flüssigkeitsbewegungen innerhalb der Grenzschicht tritt in dem neuen hydrodynamischen Modell eine mit zunehmender Entfernung von der Membranoberfläche allmählich und kontinuierlich ansteigende Konvektionsgeschwindigkeit. Mit diesem Modell lassen sich sowohl der osmotische Volumenfluss als auch die hydraulische Permeabilität der Lipiddoppelschicht aus der Konzentrationsverteilung berechnen. Im Gegensatz zu bisherigen Volumenflussmessungen verlangt der mikroelektrodengestützte Ansatz keine Korrektur der Konzentrationspolarisation, diese wird vielmehr selbst zur Messgröße. In Übereinstimmung mit der hydrodynamischen Theorie lieferten die Experimente den Beweis für die teilchenspezifische Ausdehnung der als Diffusionsbarriere wirkenden ungerührten Schicht. Da letztere mit der dritten Wurzel des Diffusionskoeffizienten wächst, ist die Konzentrationspolarisation kleiner Moleküle generell ausgeprägter als die größer.

Neben einer quantitativ exakten Untersuchung des Wasserflusses durch die Bilipidmembran selbst erlaubten die mikroelektrodengestützten Messungen, eine lectininduzierte Reduktion der Membranpermeabilität für Wasser zu demonstrieren. Die Lipidabhängigkeit dieses Effekts, der von einer Zunahme der Hydrophobizität der Membranoberfläche begleitet war, ließ die

Schlussfolgerung zu, dass nicht nur die Membranpermeation von Wasser, sondern auch die Proteinadsorption mit der Lipidpackungsdichte korreliert.

In Kombination mit Messungen der elektrischen Leitfähigkeit ermöglicht die mikroelektrodengestützte Erfassung des Wasserflusses die Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit membranüberspannender Poren. Gramicidin- bzw. Desformylgramicidinkanäle, die in Diphyanoyl-Phosphatidylcholin-Membranen eingebettet waren, besaßen eine Wasserpermeabilität von $1.6 \cdot 10^{-14}$ bzw. $1.1 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$. Die Einzelkanalleitfähigkeit des Desformylgramicidin für Protonen, Kalium und Natrium betrug 17 pS (pH 2.5), 7 und 3 pS. Auffällig war die lange Öffnungsduer des Kanals, die die von Gramicidin A um mindestens eine Größenordnung überstieg. Sowohl die lange Verweildauer im geöffneten Zustand als auch die diesen charakterisierenden schnellen Fluktuationen der elektrischen Leitfähigkeit favorisieren die aus zwei Peptidmolekülen gebildete Doppelhelix als die wahrscheinlich aktive Kanalkonformation.

Die Kopplung von Wasser- und Ionenflüssen ließ sich anhand simultan aufgezeichneter Konzentrationsprofile kanalpermeabler und -impermeabler Ionen nachweisen. Aufgrund der volumenflussinduzierten Elektrolytakkumulation auf der einen und der -verdünnung auf der anderen Seite der Membran wurden die permeablen Kationen vom Konzentrationsgradienten durch die Peptidkanäle getrieben (pseudo-Solvent drag). Gleichzeitig wurden sie auch infolge ihrer Trägheit mit dem Wasserfluss mitgeführt (Solvent drag). Nach Angleichung der membrannahen Natrium- oder Kaliumkonzentration auf der hypertonischen Seite an die der hypotonischen war die pseudo-Solvent drag-Komponente des Kationenflusses gleich null. Unter diesen Bedingungen begleiteten ungefähr fünf Wassermoleküle ein Ion auf seinem Weg durch den Gramicidin- bzw. Desformylgramicidinkanal.

Die über den Erwartungen der single-file-Transporttheorie liegende Wasserleitfähigkeit des Desformylgramicidin lässt das Peptid als Modell für natürliche Wasserkanäle erscheinen, die eine ähnlich hohe Wasserleitfähigkeit (Aquaporin 4 und Aquaporin Z) aufweisen. Im Unterschied zum Modellpeptid

wird den Mitgliedern der Aquaporinfamilie eine sehr hohe Wasserselektivität zugeschrieben. Anders lautende Literaturberichte konnten nach Rekonstruktion von Aquaporin 1 und Aquaporin Z in ebene Bilipidmembranen nicht bestätigt werden. Einer deutlichen proteinvermittelten Erhöhung der hydraulischen Permeabilität stand eine unveränderte elektrische Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht gegenüber. Dennoch erfolgte der Wassertransport durch membranüberspannende Poren, wie der Abfall der Aktivierungsenergie von 14 auf 4 kcal/mol nach Rekonstruktion von Aquaporin Z in die Lipiddoppelschicht zeigte. Die durch Aquaporin 1 induzierte Erhöhung der hydraulischen Membranleitfähigkeit wurde von organischen Quecksilberverbindungen inhibiert. Dabei blieb die Ionenpermeabilität unverändert. Wie auch die Wasserleitfähigkeit, zeigte sie keine Spannungsabhängigkeit. Mit der Rekonstruktion in ebene Bilipidmembranen ist der Beweis erbracht worden, dass Aquaporin Z und Aquaporin 1 ausschließlich für Wassermoleküle nicht aber für Ionen permeable sind. Da gleichzeitig mikroelektrodengestützte Wasserflussmessungen und elektrische Leitfähigkeitsmessungen möglich sind, ist ein hinreichend definiertes experimentelles System geschaffen worden, dass den Nachweis bzw. Ausschluss der hypothetischen Ionenleitfähigkeit anderer Wasserkanalproteine sowie deren Steuerbarkeit durch zyklisches Guanosin-monophosphat erlaubt.

9 Literatur

- Agapov, I. I. ; Tonevitsky, A. G. ; Shamshiev, A. T. ; Pohl, E. E. ; Pohl, P. ; Palmer, R. A. ; Kirpichnikov, M. P.: The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding. In: FEBS Lett. 402 (1997), S. 91-93.
- Agre, P. ; Brown, D. ; Nielsen, S.: Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. In: Curr.Opin.Cell Biol. 7 (1995), S. 472-483.
- Agre, P. ; Lee, M. D. ; Devidas, S. ; Guggino, W. B.: Aquaporins and ion conductance. In: Science 275 (1997), S. 1490-1490.
- Akeson, M. ; Deamer, D. W.: Proton conductance by the gramicidin water wire: model for proton conductance in the F-1F-0 ATPases? In: Biophys.J. 60 (1991), S. 101-109.
- Amman, D.: Ion-selective microelectrodes. Principles, design and application. Berlin : Springer, 1986.
- Andersen, O. S.: Ion movement through gramicidin A channels. Single-channel measurements at very high potentials. In: Biophys.J. 41 (1983), S. 119-133.
- Andersen, O. S. ; Greathouse, D. V. ; Providence, L. L. ; Becker, M. D. ; Koeppe, R. E.: Importance of tryptophan dipoles for protein function: 5-fluorination of tryptophans in gramicidin A channels. In: J.Am.Chem.Soc. 120 (1998), S. 5142-5146.
- Andersen, O. S. ; Nielsen, C. ; Maer, A. M. ; Lundbaek, J. A. ; Goulian, M. ; Koeppe, R. E.: Ion channels as tools to monitor lipid bilayer-membrane protein interactions: gramicidin channels as molecular force transducers. In: Methods Enzymol. 294 (1999), S. 208-224.
- Andreoli, T. E. ; Schafer, J. A. ; Troutman, S. L.: Coupling of solute and solvent flows in porous lipid bilayer membranes. In: J.Gen.Physiol. 57 (1971), S. 479-493.

- Antonenko, Y. N. ; Bulychev, A. A.: Measurements of local pH changes near bilayer lipid membrane by means of a pH microelectrode and a protonophore-dependent membrane potential - comparison of the methods. In: *Biochim.Biophys.Acta* 1070 (1991), S. 279-282.
- Antonenko, Y. N. ; Denisov, G. A. ; Pohl, P.: Weak acid transport across bilayer lipid membrane in the presence of buffers - theoretical and experimental pH profiles in the unstirred layers. In: *Biophys.J.* 64 (1993), S. 1701-1710.
- Antonenko, Y. N. ; Pohl, P. ; Denisov, G. A.: Permeation of ammonia across bilayer lipid membranes studied by ammonium ion selective microelectrodes. In: *Biophys.J.* 72 (1997), S. 2187-2195.
- Antonenko, Y. N. ; Yaguzhinsky, L. S.: The ion selectivity of nonelectrogenic ionophores measured on a bilayer lipid membrane: Nigericin, monensin, A23187 and lasalocid A. In: *Biochim.Biophys.Acta* 939 (1988), S. 125-130.
- Barbieri, L. ; Battelli, M. G. ; Stirpe, F.: Ribosome-inactivating proteins from plants. In: *Biochim.Biophys.Acta* 1154 (1993), S. 237-282.
- Barry, P. H.: Slow potential changes due to transport number effects in cells with unstirred membrane invaginations or dendrites. In: *J.Membrane Biol.* 82 (1984), S. 221-240.
- Barry, P. H. ; Diamond, J. M.: Effects of unstirred layers on membrane phenomena. In: *Physiol.Rev.* 64 (1984), S. 763-872.
- Bassolino-Klimas, D. ; Alper, H. E. ; Stouch, T. R.: Solute diffusion in lipid bilayer membranes - an atomic level study by molecular dynamics simulation. In: *Biochemistry* 32 (1993), S. 12624-12637.
- Bassolino-Klimas, D. ; Alper, H. E. ; Stouch, T. R.: Mechanism of solute diffusion through lipid bilayer membranes by molecular dynamics simulation. In: *J.Am.Chem.Soc.* 117 (1995), S. 4118-4129.
- Berry, C. A. ; Verkman, A. S.: Osmotic gradient dependence of osmotic water permeability in rabbit proximal convoluted tubule. In: *J.Membrane Biol.* 105 (1988), S. 33-43.

- Bezrukov, S. M. ; Irkhin, A. I. ; Melnik, E.: Desformylgramicidin a proton selective channel. In: Biol.Membrany 1 (1984), S. 659-665.
- Bloom, M. ; Evans, E. ; Mouritsen, O. G.: Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes - a perspective. In: Q.Rev.Biophys. 24 (1991), S. 293-397.
- Borgnia, M. J. ; Kozono, D. ; Calamita, G. ; Maloney, P. C. ; Agre, P.: Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the *E. coli* water channel protein. In: J.Mol.Biol. 291 (1999b), S. 1169-1179.
- Borgnia, M. J. ; Nielsen, S. ; Engel, A. ; Agre, P.: Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. In: Annual Rev.Biochem. 68 (1999a), S. 425-458.
- Brahm, J.: Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts. In: J.Gen.Physiol. 79 (1982), S. 791-819.
- Brewster, J. L. ; de Valoir, T. ; Dwyer, N. D. ; Winter, E. ; Gustin, M. C.: An osmosensing signal transduction pathway in yeast. In: Science. 259 (1993), S. 1760-1763.
- Brinkmann, U. ; Pastan, I.: Immunotoxins against cancer. In: Biochim.Biophys.Acta 1198 (1994), S. 27-45.
- Burczynski, F. J. ; Cai, Z. S. ; Moran, J. B. ; Forker, E. L.: Palmitate uptake by cultured hepatocytes: albumin binding and stagnant layer phenomena. In: Am.J.Physiol. 257 (1989), S. G584-93.
- Burczynski, F. J. ; Cai, Z. S. ; Moran, J. B. ; Geisbuhler, T. ; Rovetto, M.: Palmitate uptake by cardiac myocytes and endothelial cells. In: Am.J.Physiol. 268 (1995), S. H1659-H1666
- Busath, D. D. ; Thulin, C. D. ; Hendershot, R. W. ; Phillips, L. R. ; Maughan, P. ; Cole, C. D. ; Bingham, N. C. ; Morrison, S. ; Baird, L. C. ; Hendershot, R. J. ; Cotten, M. ; Cross, T. A.: Noncontact dipole effects on channel permeation. I. Experiments with (5F-Indole)Trp(13) gramicidin A channels. In: Biophys.J. 75 (1998), S. 2830-2844.

- Calamita, G. ; Bishai, W. R. ; Preston, G. M. ; Guggino, W. B. ; Agre, P.: Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from escherichia coli. In: *J.Biol.Chem.* 270 (1995), S. 29063-29066.
- Chiou, W. L.: New perspectives on the theory of permeability and resistance in the study of drug transport and absorption. In: *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 24 (1996), S. 433-442.
- Chiu, S. W. ; Subramaniam, S. ; Jakobsson, E.: Simulation study of a gramicidin/lipid bilayer system in excess water and lipid. II. Rates and mechanisms of water transport. In: *Biophys.J.* 76 (1999), S. 1939-1950.
- Citores, L. ; Ferreras, J. M. ; Iglesias, R. ; Carabajales, M. L. ; Arias, F. J. ; Jimenez, P. ; Rojo, M. A. ; Girbes, T.: Molecular mechanism of inhibition of mammalian protein synthesis by some four-chain agglutininins. Proposal of an extended classification of plant ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases). In: *FEBS Lett.* 329 (1993), S. 59-62.
- Cotton, C. U. ; Reuss, L.: Measurement of the effective thickness of the mucosal unstirred layer in necturus gallbladder epithelium. In: *J.Gen.Physiol.* 93 (1989), S. 631-647.
- Dainty, J.: Water relations in plant cells. In: *Adv.Botan.Res.* 1 (1963), S. 279-326.
- Dainty, J. ; House, C. R.: Unstirred layers in frog skin. In: *J.Physiol.* 182 (1966), S. 66-78.
- Dani, J. A. ; Levitt, D. G.: Binding constants of Li^+ , K^+ , and Tl^+ in the gramicidin channel determined from water permeability measurements. In: *Biophys.J.* 35 (1981a), S. 485-499.
- Dani, J. A. ; Levitt, D. G.: Water transport and ion-water interaction in the gramicidin channel. In: *Biophys.J.* 35 (1981b), S. 501-508.
- Deamer, D. W. ; Bramhall, J.: Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. In: *Chem.Phys.Lipids* 40 (1986), S. 167-88.

- Deen, P. M. ; Mulders, S. M. ; Kansen, S. M. ; van Os, C. H.: Aquaporins and ion conductance. In: *Science*. 275 (1997), S. 1491
- Dietschy, J. M. ; Sallee, V. L. ; Wilson, F. A.: Unstirred water layers and absorption across the intestinal mucosa. In: *Gastroenterology* 61 (1971), S. 932-934.
- Droillard, M. J. ; Thibivilliers, S. ; Cazale, A. C. ; Barbier-Brygoo, H. ; Lauriere, C.: Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. In: *FEBS Lett.* 474 (2000), S. 217-222.
- Dulfer, W. J. ; Groten, J. P. ; Govers, H.-A. J.: Effect of fatty acids and the aqueous diffusion barrier on the uptake and transport of polychlorinated biphenyls in Caco-2 cells. In: *J.Lipid Res.* 37 (1996), S. 950-961.
- Durkin, J. T. ; Providence, L. L. ; Koeppe, R. E. ; Andersen, O. S.: Formation of non- $\beta^{6,3}$ -helical gramicidin channels between sequence-substituted gramicidin analogues. In: *Biophys.J.* 62 (1992), S. 145-157.
- Eckert, E. R. ; Drake, R. M.: Heat and mass transfer. New York : McGraw-Hill, 1959.
- Ehring, G. R. ; Zampighi, G. ; Horwitz, J. ; Bok, D. ; Hall, J. E.: Properties of channels reconstituted from the major intrinsic protein of lens fiber membranes. In: *J.Gen.Physiol.* 96 (1990), S. 631-664.
- Eifler, R. ; Pfueler, K. ; Gockeritz, W. ; Pfueler, U.: Improved procedures for the isolation of mistletoe lectins and their subunits: lectin patterns of the European mistletoe. In: Basu, J. ; Kundu, M. ; Chakrabati, P. (Hrsg.): *Lectins 9: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. New-Dehli : Wiley, 1994.
- Endo, Y. ; Tsurugi, K.: RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. In: *J.Biol.Chem.* 262 (1987), S. 8128-8130.

- Evans, E. ; Needham, D.: Giant vesicle bilayers composed of mixtures of lipids, cholesterol and polypeptides. Thermomechanical and (mutual) adherence properties. In: Faraday.Discuss.Chem.Soc. (1986), S. 267-280.
- Fettiplace, R. ; Haydon, D. A.: Water permeability of lipid membranes. In: Physiol.Rev. 60 (1980), S. 510-550.
- Finkelstein, A.: Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes. In: J.Gen.Physiol. 68 (1976), S. 127-135.
- Finkelstein, A.: Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes. New York : Wiley & Sons, 1987.
- Finkelstein, A. ; Andersen, O. S.: The gramicidin A channel: a review of its permeability characteristics with special reference to the single-file aspect of transport. In: J.Membrane Biol. 59 (1981), S. 155-171.
- Finkelstein, A. ; Cass, A.: Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes. In: Nature 216 (1967), S. 717-718.
- Fischbarg, J. ; Li, J. ; Kuang, K. ; Echevarria, M. ; Iserovich, P.: Determination of volume and water permeability of plated cells from measurements of light scattering. In: Am.J.Physiol. 265 (1993), S. C1412-C1423
- Folkesson, H. G. ; Matthay, M. A. ; Frigeri, A. ; Verkman, A. S.: Transepithelial water permeability in microperfused distal airways - evidence for channel-mediated water transport. In: J.Clin.Invest. 97 (1996), S. 664-671.
- Fushimi, K. ; Sasaki, S. ; Yamamoto, T. ; Hayashi, M. ; Furukawa, T. ; Uchida, S. ; Kuwahara, M. ; Ishibashi, K. ; Kawasaki, M. ; Kihara, I.: Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct. In: Am.J.Physiol. 267 (1994), S. F573-F582
- Gawrisch, K. ; Barry, J. A. ; Holte, L. L. ; Sinnwell, T. ; Bergelson, L. D. ; Ferretti, J. A.: Role of interactions at the lipid water interface for domain formation. In: Mol.Membrane Biol. 12 (1995), S. 83-88.

- Ge, M. ; Freed, J. H.: Electron-spin resonance study of aggregation of gramicidin in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers and hydrophobic mismatch. In: *Biophys.J.* 76 (1999), S. 264-280.
- Goodall, M. C.: Thickness dependence in the action of gramicidin A on lipid bilayers. In: *Arch.Biochem Biophys* 147 (1971), S. 129-135.
- Goulian, M. ; Mesquita, O. N. ; Fygenson, D. K. ; Nielsen, C. ; Andersen, O. S. ; Libchaber, A.: Gramicidin channel kinetics under tension. In: *Biophys.J.* 74 (1998), S. 328-337.
- Grant, C. W. ; Peters, M. W.: Lectin-membrane interactions. Information from model systems. In: *Biochim.Biophys.Acta* 779 (1984), S. 403-422.
- Greathouse, D. V. ; Koeppe, R. E. ; Providence, L. L. ; Shobana, S. ; Andersen, O. S.: Design and characterization of gramicidin channels. In: *Methods.Enzymol.* 294 (1999), S. 525-550.
- Gutknecht, J. ; Tosteson, D. C.: Diffusion of weak acids across lipid bilayer membranes: effects of chemical reactions in the unstirred layers. In: *Science* 182 (1973), S. 1258-1261.
- Haines, T. H.: Water transport across biological membranes. In: *FEBS Lett.* 346 (1994), S. 115-122.
- Haines, T. H. ; Liebovitch, L. S.: A molecular mechanism for the transport of water across phospholipid bilayers. In: Disalvo, E. A. ; Simon, S. A. (Hrsg.): *Permeability and stability of lipid bilayers*. Boca Raton : CRC Press, 1995.
- Hamada, Y. ; Imai, M.: Effect of intracellular unstirred layer on apparent reflection coefficient for urea in inner medullary collecting duct: A computer simulation. In: *Experimental Nephrology* 3 (1995), S. 202-210.
- Hanai, T. ; Haydon, D. A.: The permeability to water of bimolecular lipid membranes. In: *J.Theor.Biol.* 11 (1966), S. 370-382.
- Hill, A. E.: Osmotic flow in membrane pores. In: *International Review of Cytology* 163 (1995), S. 1-42.

- Hincha, D. K. ; Bakaltcheva, I. ; Schmitt, J. M.: Galactose-specific lectins protect isolated thylakoids against freeze-thaw damage. In: Plant Physiol. 103 (1993), S. 59-65.
- Hladky, S. B. ; Haydon, D. A.: Ion movements in gramicidin channels. In: Curr.top.membr.transp. 21 (1984), S. 327-372.
- Hoekstra, D. ; Düzgünes, N.: Ricinus communis agglutinin-mediated agglutination and fusion of glycolipid-containing phospholipide vesicles: effect of carbohydrate head group size, calcium ions, and spermine. In: Biochemistry 25 (1986), S. 1321-1330.
- Hoekstra, D. ; Wilschut, J.: Membrane fusion of artificial and biological membranes: Role of local membrane dehydration. In: Benga, G. (Hrsg.): Water transport in biological membranes. Boca Raton : CRC Press, 1989.
- Holland, R.-A. B. ; Shibata, H. ; Scheid, P. ; Piiper, J.: Kinetics of oxygen uptake and release by red cells in stopped-flow apparatus: Effects of unstirred layer. In: Respir.Physiol. 59 (1985), S. 71-92.
- Holz, R. ; Finkelstein, A.: The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin b. In: J.Gen.Physiol. 56 (1970), S. 125-145.
- House, C. R.: Water transport in cells and tissues. London : E. Arnold, 1974.
- Hsieh, C. H. ; Sue, S. C. ; Lyu, P. C. ; Wu, W. G.: Membrane packing geometry of diphyanoylphosphatidylcholine is highly sensitive to hydration: phospholipid polymorphism induced by molecular rearrangement in the headgroup region. In: Biophys.J. 73 (1997), S. 870-877.
- Huster, D. ; Jin, A. J. ; Arnold, K. ; Gawrisch, K.: Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by O¹⁷ NMR. In: Biophys.J. 73 (1997), S. 855-864.
- Ichikawa, M. ; Tsao, S. C. ; Lin, T. H. ; Miyauchi, S. ; Sawada, Y. ; Iga, T. ; Hanano, M. ; Sugiyama, Y.: "Albumin-mediated transport

- "phenomenon" observed for ligands with high membrane permeability: Effect of the unstirred water layer in the Disse's space of rat liver. In: J.Hepatol. 16 (1992), S. 38-49.
- Illsley, N. P. ; Verkman, A. S.: Serial permeability barriers to water transport in human placental vesicles. In: J.Membrane Biol. 94 (1986), S. 267-278.
- Ismailov, I. I. ; Shlyonsky, V. G. ; Benos, D. J.: Streaming potential measurements in $\alpha\beta\gamma$ -rat epithelial Na^+ -channel in planar lipid bilayers. In: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94 (1997), S. 7651-7654.
- Jacobs, R. E. ; White, S. H.: The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices. In: Biochemistry 28 (1989), S. 3421-3437.
- Jansen, M. ; Blume, A.: A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains. In: Biophys.J. 68 (1995), S. 997-1008.
- Jensen, L. J. ; Sorensen, J. N. ; Larsen, E. H. ; Willumsen, N. J.: Proton pump activity of mitochondria rich cells: the interpretation of external proton concentration gradients. In: J.Gen.Physiol. 109 (1997), S. 73-91.
- Kamsteeg, E. J. ; Wormhoudt, T. A. ; Rijss, J. P. ; van Os, C. H. ; Deen, P. M.: An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. In: EMBO.J. 18 (1999), S. 2394-2400.
- Kargol, M.: Full analytical description of graviosmotic volume flows. In: Gen Physiol Biophys 13 (1994), S. 109-126.
- Kayser, G. ; Goormaghtigh, E. ; Vandenbranden, M. ; Ruysschaert, J. M.: Ricinus communis toxin interacts specifically with GM 1 ganglioside incorporated into planar lipid bilayers. In: FEBS Lett. 127 (1981), S. 207-210.

- Ketchem, R. R. ; Roux, B. ; Cross, T. A.: High resolution polypeptide structure in a lamellar phase lipid environment from solid state NMR derived orientational constraints. In: Structure 5 (1997), S. 1655-1669.
- Kimura, Y. ; Ikegami, A.: Local dielectric properties around polar region of lipid bilayer membranes. In: J.Membrane Biol. 85 (1985), S. 225-231.
- King, L. S. ; Agre, P.: Pathophysiology of the aquaporin water channels. In: Annual Review Of Physiology 58 (1996), S. 619-648.
- Koeppe, R. E. ; Paczkowski, J. A. ; Whaley, W. L.: Gramicidin K, a new linear channel-forming gramicidin from *Bacillus brevis*. In: Biochemistry. 24 (1985), S. 2822-2826.
- Kovbasnjuk, O. N. ; Leader, J. P. ; Weinstein, A. M. ; Spring, K. R.: Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium. In: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 (1998), S. 6526-6530.
- Köhler, G. ; Hering, U. ; Zschornig, O. ; Arnold, K.: Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. In: Biochemistry 36 (1997), S. 8189-8194.
- Labotka, R. J. ; Lundberg, P. ; Kuchel, P. W.: Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by ^{14}N and ^{15}N saturation transfer NMR spectroscopy. In: Am.J.Physiol. 268 (1995), S. C686-C699
- Ladokhin, A. S. ; Selsted, M. E. ; White, S. H.: Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids. In: Biophys.J. 72 (1997), S. 794-805.
- Lande, M. B. ; Donovan, J. M. ; Zeidel, M. L.: The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. In: J.Gen.Physiol. 106 (1995), S. 67-84.
- Lee, J. W. ; Zhang, Y. ; Weaver, C. D. ; Shomer, N. H. ; Louis, C. F. ; Roberts, D. M.: Phosphorylation of nodulin 26 on serine 262 affects its voltage- sensitive channel activity in planar lipid bilayers. In: J.Biol.Chem. 270 (1995), S. 27051-27057.

- Lee, R. T. ; Gabius, H. J. ; Lee, Y. C.: The sugar-combining area of the galactose-specific toxic lectin of mistletoe extends beyond the terminal sugar residue - comparison with a homologous toxic lectin, ricin. In: Carbohydr.Res. 254 (1994), S. 269-276.
- Lerche, D.: Temporal and local concentration changes in diffusion layers at cellulose membranes due to concentration differences between the solutiones on both sides of the membrane. In: J.Membrane Biol. 27 (1976), S. 193-205.
- Levich, V. G.: Physicochemical hydrodynamics. Prentice-Hall : Englewood Cliffs, 1962.
- Levitt, D. G.: A new theory of transport for cell membrane pores. I. General theory and application to red cell. In: Biochim.Biophys.Acta. 373 (1974), S. 115-131.
- Levitt, D. G.: Kinetics of movements in gramicidin channels. In: Curr.top.membr.transp. 21 (1984), S. 181-197.
- Levitt, D. G. ; Elias, S. R. ; Hautman, J. M.: Number of water molecules coupled to the transport of sodium, potassium and hydrogen ions via gramicidin, nonactin or valinomycin. In: Biochim.Biophys.Acta 512 (1978b), S. 436-451.
- Levitt, M. D. ; Aufderheide, T. ; Fetzer, C. A. ; Bond, J. H. ; Levitt, D. G.: Use of carbon monoxide to measure luminal stirring in the rat gut. In: J.Clin.Invest. 74 (1984), S. 2056-2064.
- Levitt, M. D. ; Fine, C. ; Furne, J. K. ; Levitt, D. G.: Use of maltose hydrolysis measurements to characterize the interaction between the aqueous diffusion barrier and the epithelium in the rat jejunum. In: J.Clin.Invest. 97 (1996), S. 2308-2315.
- Levitt, M. D. ; Furne, J. K. ; Strocchi, A. ; Anderson, B. W. ; Levitt, D. G.: Physiological measurements of luminal stirring in the dog and human small bowel. In: J.Clin.Invest. 86 (1990), S. 1540-1547.

- Levitt, M. D. ; Kneip, J. M. ; Levitt, D. G.: Use of laminar flow and unstirred layer models to predict intestinal absorption in the rat. In: *J.Clin.Invest.* 81 (1988), S. 1365-1369.
- Loo, D. D. ; Hirayama, B. A. ; Meinild, A. K. ; Chandy, G. ; Zeuthen, T. ; Wright, E. M.: Passive water and ion transport by cotransporters. In: *J.Physiol.(Lond.)* 518 (Pt 1) (1999), S. 195-202.
- Lord, J. M. ; Roberts, L. M. ; Robertus, J. D.: Ricin: structure, mode of action, and some current applications. In: *Faseb J.* 8 (1994), S. 201-208.
- Lucas, M. L. ; Sood, L. ; Mcgregor, M. ; Sattar, N. ; Watt, A. ; Taylor, J. C.: The effect of auxiliary conditions on intestinal unstirred layer diffusion modelled by numerical simulation. In: *J.Theor.Biol.* 159 (1992), S. 271-286.
- MacDonald, R. C. ; MacDonald, R. I. ; Menco, B. Ph. M. ; Takeshita, K. ; Subbarao, N. K. ; Hu, L. R.: Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. In: *Biochim.Biophys.Acta* 1061 (1991), S. 297-303.
- Manley, G. T. ; Fujimura, M. ; Ma, T. ; Noshita, N. ; Filiz, F. ; Bollen, A. W. ; Chan, P. ; Verkman, A. S.: Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. In: *Nat.Med.* 6 (2000), S. 159-163.
- Marrink, S. J. ; Berendsen, H. J. C.: Simulation of water transport through a lipid membrane. In: *J.Phys.Chem.* 98 (1994), S. 4155-4168.
- Marrink, S. J. ; Berendsen, H. J. C.: Permeation Process of Small Molecules Across Lipid-Membranes Studied by Molecular-Dynamics Simulations. In: *J.Phys.Chem.* 100 (1996a), S. 16729-16738.
- Marrink, S. J. ; Jahnig, F. ; Berendsen, H. J.: Proton transport across transient single-file water pores in a lipid membrane studied by molecular dynamics simulations. In: *Biophys.J.* 71 (1996b), S. 632-647.

- Marsh, D.: Peptide models for membrane channels. In: Biochem.J. 315 Part 2 (1996), S. 345-361.
- Mathai, J. C. ; Mori, S. ; Smith, B. L. ; Preston, G. M. ; Mohandas, N. ; Collins, M. ; van-Zijl, P. C. ; Zeidel, M. L. ; Agre, P.: Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells. the colton-null phenotype. In: J.Biol.Chem. 271 (1996), S. 1309-1313.
- McIntosh, T. J. ; Simon, S. A.: Long and shorrange interactions between phospholipid/ganglioside GM1 bilayers. In: Biochemistry 33 (1994), S. 10477-10486.
- McLaughlin, S. ; Dilger, J. P.: Transport of protons across membranes by weak acids. In: Physiol.Rev. 60 (1980), S. 825-863.
- Mierle, G.: The effect of cell size and shape on the resistance of unstirred layers to solute diffusion. In: Biochim.Biophys.Acta 812 (1985), S. 835-840.
- Miller, C.: Coupling of water and ion fluxes in a K⁺ -selective channel of sarcoplasmic reticulum. In: Biophys.J. 38 (1982), S. 227-230.
- Miyauchi, S. ; Sawada, Y. ; Iga, T. ; Hanano, M. ; Sugiyama, Y.: Comparison of the hepatic uptake clearances of fifteen drugs with a wide range of membrane permeabilities in isolated rat hepatocytes and perfused rat livers. In: Pharm.Res. 10 (1993), S. 434-440.
- Mobashery, N. ; Nielsen, C. ; Andersen, O. S.: The conformational preference of gramicidin channels in a function of lipid bilayer thickness. In: FEBS Lett. 412 (1997), S. 15-20.
- Montal, M. ; Mueller, P.: Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. In: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69 (1972), S. 3561-3566.
- Montich, G. G. ; Montecucco, C. ; Papini, E. ; Marsh, D.: Insertion of diphtheria toxin in lipid bilayers studied by spin label. In: Biochemistry 34 (1995), S. 11561-11567.

- Mueller, P. ; Rudin, D. O. ; Tien, H. T. ; Wescott, W. C.: Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. In: *J.Phys.Chem.* 67 (1963), S. 534-535.
- Mulders, S. M. ; Preston, G. M. ; Deen, P. M. T. ; Guggino, W. B. ; van Os, C. H. ; Agre, P.: Water channel properties of major intrinsic protein of lens. In: *J.Biol.Chem.* (1995), S. 9010-9016.
- Nakahari, T. ; Yoshida, H. ; Imai, Y.: Transepithelial fluid shift generated by osmolarity gradients in unstimulated perfused rat submandibular glands. In: *Exp.Physiol.* 81 (1996), S. 767-779.
- Needham, D.: Cohesion and permeability of lipid bilayer vesicles. In: Disalvo, E. A. ; Simon, S. A. (Hrsg.): *Permeability and stability of lipid bilayers*. Boca Raton : CRC Press, 1995.
- Needham, D. ; McIntosh, T. J. ; Evans, E.: Thermomechanical and transition properties of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 4668-4673.
- Needham, D. ; Zhelev, D. V.: Lysolipid exchange with lipid vesicle membranes. In: *Ann.Biomed.Eng.* 23 (1995), S. 287-298.
- Negrete, H. O. ; Rivers, R. L. ; Gough, A. H. ; Colombini, M. ; Zeidel, M. L.: Individual leaflets of a membrane bilayer can independently regulate permeability. In: *J.Biol.Chem.* 271 (1996), S. 11627-11630.
- Neher, E. ; Sandblom, J. ; Eisenman, G.: Ionic selectivity, saturation, and block in gramicidin A channels. II. Saturation behavior of single channel conductances and evidence for the existence of multiple binding sites in the channel. In: *J.Membrane Biol.* 40 (1978c), S. 97-116.
- Nernst, W.: Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. In: *Z.Phys.Chem.* 47 (1904), S. 52-55.
- Neumcke, B. ; Bamberg, E.: The action of uncouplers on lipid bilayer membranes. In: Eisenman, G. (Hrsg.): *Lipid Bilayers and Biological membranes*. New York : Marcel Dekker, 1975.

- Nielsen, R.: Correlation between transepithelial Na⁺ transport and transepithelial water movement across isolated frog skin (*Rana esculenta*). In: *J. Membr. Biol.* 159 (1997), S. 61-69.
- Ohki, S. ; Arnold, K.: Surface dielectric constant, surface hydrophobicity and membrane fusion. In: *J. Membrane Biol.* 114 (1990), S. 195-203.
- Ohki, S. ; Zschornig, O.: Ion-induced fusion of phosphatidic acid vesicles and correlation between surface hydrophobicity and membrane fusion. In: *Chem. Phys. Lipids* 65 (1993), S. 193-204.
- Oliet, S. H. ; Bourque, C. W.: Mechanosensitive channels transduce osmossensitivity in supraoptic neurons. In: *Nature*. 364 (1993), S. 341-343.
- Olsnes, S. ; Stirpe, F. ; Sandvig, K. ; Pihl, A.: Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). In: *J. Biol. Chem.* 257 (1982), S. 13263-13270.
- Orbach, E. ; Finkelstein, A.: The nonelectrolyte permeability of planar lipid bilayer membranes. In: *J. Gen. Physiol.* 75 (1980), S. 427-436.
- Pallone, T. L. ; Edwards, A. ; Ma, T. H. ; Silldorff, E. P. ; Verkman, A. S.: Requirement of aquaporin-1 for NaCl-driven water transport across descending vasa recta. In: *J. Clin. Invest.* 105 (2000), S. 215-222.
- Pappenheimer, J. R. ; Dahl, C. E. ; Karnovsky, M. L. ; Maggio, J. E.: Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994), S. 1942-1945.
- Pattus, F. ; Desnuelle, P. ; Verger, R.: Spreading of liposomes at the air/water interface. In: *Biochim. Biophys. Acta*. 507 (1978), S. 62-70.
- Paula, S. ; Volkov, A. G. ; Deamer, D. W.: Permeation of halide anions through phospholipid bilayers occurs by the solubility-diffusion mechanism. In: *Biophys. J.* 74 (1998), S. 319-327.
- Paula, S. ; Volkov, A. G. ; Vanhoek, A. N. ; Haines, T. H. ; Deamer, D. W.: Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules

- through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness.
In: Biophys.J. 70 (1996), S. 339-348.
- Pedley, T. J.: The interaction between stirring and osmosis. part i. In:
J.Fluid.Mech. 101 (1980b), S. 843-861.
- Pedley, T. J.: The interaction between stirring and osmosis. part 2. In:
J.Fluid.Mech. 107 (1981), S. 281-296.
- Pedley, T. J.: Calculation of unstirred layer thickness in membrane transport experiments: a survey. In: Q.Rev.Biophys. 16 (1983), S. 115-150.
- Pedley, T. J. ; Fischbarg, J.: The development of osmotic flow through an unstirred layer. In: J.Theor.Biol. 70 (1978), S. 427-447.
- Peters, M. W. ; Barber, K. R. ; Grant, C. W.: Lateral distribution of gangliosides in bilayer membranes: lipid and ionic effects. In: J Neurosci.Res. 12 (1984b), S. 343-353.
- Peters, M. W. ; Mehlhorn, I. E. ; Barber, K. R. ; Grant, C. W.: Evidence of a distribution difference between two gangliosides in bilayer membranes. In: Biochim.Biophys.Acta 778 (1984a), S. 419-428.
- Phillips, J. E. ; Wong, L. B. ; Yeates, D. B.: Bidirectional transepithelial water transport: measurement and governing mechanisms. In:
Biophys.J. 76 (1999), S. 869-877.
- Pohl, P. ; Antonenko, Y. N. ; Evtodienko, V. Y. ; Pohl, E. E. ; Saparov, S. M. ; Agapov, I. I. ; Tonevitsky, A. G.: Membrane fusion mediated by ricin and viscumin. In: Biochim.Biophys.Acta 1371 (1998c), S. 11-16.
- Pohl, P. ; Antonenko, Y. N. ; Yaguzhinsky, L. S.: Kinetic properties of cation-proton exchange: Calcimycin (A23187)-mediated $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ proton exchange on the bilayer lipid membrane. In:
Biochim.Biophys.Acta 1027 (1990), S. 295-300.
- Pohl, P. ; Saparov, S. M.: Solvent drag across gramicidin channels demonstrated by microelectrodes. In: Biophys.J. 78 (2000), S. 2426-2434.

- Pohl, P. ; Saparov, S. M. ; Antonenko, Y. N.: The effect of a transmembrane osmotic flux on the ion concentration distribution in the immediate membrane vicinity measured by microelectrodes. In: *Biophys.J.* 72 (1997), S. 1711-1718.
- Pohl, P. ; Saparov, S. M. ; Antonenko, Y. N.: The size of the unstirred layer as a function of the solute diffusion coefficient. In: *Biophys.J.* 75 (1998b), S. 1403-1409.
- Pohl, P. ; Saparov, S. M. ; Pohl, E. E. ; Evtodienko, V. Y. ; Agapov, I. I. ; Tonevitsky, A. G.: Dehydration of model membranes induced by lectins from Ricinus communis and Viscum album. In: *Biophys.J.* 75 (1998a), S. 2868-2876.
- Preisig, P. A.: Luminal flow rate regulates proximal tubule proton, bicarbonate transporters. In: *Am.J.Physiol.* 262 (1992), S. F47-F54
- Preston, G. M. ; Carroll, T. P. ; Guggino, W. B. ; Agre, P.: Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. In: *Science.* 256 (1992), S. 385-387.
- Ramalingam, T. S. ; Das, P. K. ; Podder, S. K.: Ricin-membrane interaction: membrane penetration depth by fluorescence quenching and resonance energy transfer. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 12247-12254.
- Raso, V.: Review: immunotargeting intracellular compartments. In: *Anal.Biochem.* 222 (1994), S. 297-304.
- Rippe, B. ; Haraldsson, B.: Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. In: *Physiol.Rev.* 74 (1994), S. 163-219.
- Rivers, R. L. ; Dean, R. M. ; Chandy, G. ; Hall, J. E. ; Roberts, D. M. ; Zeidel, M. L.: Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. In: *J.Biol.Chem.* 272 (1997), S. 16256-16261.

- Rosenberg, P. A. ; Finkelstein, A.: Interactions of ions and water in gramicidin A channels. streaming potentials across lipid bilayer membrane. In: J.Gen.Physiol. 72 (1978a), S. 327-340.
- Rosenberg, P. A. ; Finkelstein, A.: Water permeability of gramicidin A-treated lipid bilayer membranes. In: J.Gen.Physiol. 72 (1978a), S. 341-350.
- Rothblat, G. H. ; Hahlberg, F. H. ; Johnson, W. J. ; Phillips, M. C.: Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. In: J.Lipid Res. 33 (1992), S. 1091-1097.
- Rottenberg, H. ; Koeppel, R. E.: Mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation by gramicidin. In: Biochemistry. 28 (1989), S. 4355-4360.
- Rutledge, J. C. ; Curry, F. E. ; Blanche, P. ; Krauss, R. M.: Solvent drag of LDL across mammalian endothelial barriers with increased permeability. In: Am.J.Physiol. 268 (1995), S. H1982-H1991
- Saltvedt, E.: Structure and toxicity of pure ricinus agglutinin. In: Biochim.Biophys.Acta 451 (1976), S. 536
- Sandvig, K. ; van Deurs, B.: Endocytosis and intracellular sorting of ricin and shiga toxin. In: FEBS Lett. 346 (1994), S. 99-102.
- Sandvig, K. ; van Deurs, B.: Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of shiga toxin and ricin. In: Physiol. Rev. 76 (1996), S. 949-966.
- Sansom, M. S.: Models and simulations of ion channels and related membrane proteins. In: Curr.Opin.Struct.Biol. 8 (1998), S. 237-244.
- Sansom, M. P. ; Kerr, I. D. ; Breed, J. ; Sankararamakrishnan, R.: Water in channel-like cavities: Structure and dynamics. In: Biophys.J. 70 (1996), S. 693-702.
- Saparov, S. M. ; Rothe, U. ; Borgnia, M. ; Agre, P. ; Pohl, P.: Volume flux across red cell AQP1 and E.coli AqpZ water channel proteins reconstituted into planar lipid bilayers. In: Hohmann, S. ; Nielsen, S.

- (Hrsg.): Molecular biology and physiology of water and solute transport. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.
- Sasaki, S. ; Uchida, S. ; Kuwahara, M. ; Fushimi, K. ; Marumo, F.: Aquaporins and ion conductance. In: Science. 275 (1997), S. 1490-1491.
- Schafer, J. A. ; Andreoli, T. E.: Principles of water and nonelectrolyte transport across membranes. In: Andreoli, T. E. ; Hoffmann, J. F. (Hrsg.): Membrane physiology. London : Plenum Medical Book, 1987.
- Schafer, J. A. ; Patlak, C. S. ; Andreoli, T. E.: Osmosis in cortical collecting tubules: A theoretical and experimental analysis of the osmotic transient phenomenon. In: J.Gen.Physiol. 64 (1974), S. 201-227.
- Schindler, H.: Exchange and interactions between lipid layers at the surface of a liposome solution. In: Biochim.Biophys.Acta. 555 (1979), S. 316-336.
- Schindler, H.: Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles. In: FEBS Lett. 122 (1980a), S. 77-79.
- Schindler, H.: Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and of detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions. In: Methods.Enzymol. 171 (1989), S. 225-253.
- Schluchting, H. ; Gersten, K.: Grenzschicht-Theorie. Berlin : Springer, 1997.
- Schnermann, J. ; Chou, C. L. ; Ma, T. H. ; Traynor, T. ; Knepper, M. A. ; Verkman, A. S.: Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. In: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 (1998), S. 9660-9664.
- Schwab, A. J. ; Goresky, C. A.: Hepatic uptake of protein-bound ligands: Effect of an unstirred Disse space. In: Am.J.Physiol. 270 (1996), S. G869-G880

- Shea, L. D. ; Omann, G. M. ; Linderman, J. J.: Calculation of diffusion-limited kinetics for the reactions in collision coupling and receptor cross-linking. In: *Biophys.J.* 73 (1997), S. 2949-2959.
- Shen, J. ; Gimbrone, M. A. J. ; Luscinskas, F. W. ; Dewey, C. F. J.: Regulation of adenine nucleotide concentration at endothelium- fluid interface by viscous shear flow. In: *Biophys.J.* 64 (1993), S. 1323-1330.
- Spring, K. R.: Routes and mechanism of fluid transport by epithelia. In: *Annu.Rev.Physiol.* 60 (1998), S. 105-119.
- Spring, K. R.: Epithelial fluid transport - A century of investigation. In: *News in Physiological Sciences* 14 (1999), S. 92-98.
- Strocchi, A. ; Corazza, G. ; Furne, J. ; Fine, C. ; Disario, A. ; Gasbarrini, G. ; Levitt, M. D.: Measurements of the jejunal unstirred layer in normal subjects and patients with celiac disease. In: *Am.J.Physiol.* 33 (1996), S. G487-G491
- Subczynski, W. K. ; Wisniewska, A. ; Yin, J. J. ; Hyde, J. S. ; Kusumi, A.: Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 7670-7681.
- Terwilliger, T. C. ; Solomon, A. K.: Osmotic water permeability of human red cells. In: *J.Gen.Physiol.* 77 (1981), S. 549-570.
- Thomson, A.-B. R. ; Keelan, M. ; Wild, G. E.: Nutrients and intestinal adaptation. In: *Clin.Invest.Med.* 19 (1996), S. 331-345.
- Tonevitsky, A. G. ; Zhukova, O. S. ; Mirimanova, N. V. ; Omylyanenko, V. G. ; Timofeeva, NV. ; Bergelson, L. D.: Effect of gangliosides on binding, internalization and cytotoxic activity of ricin. In: *FEBS Lett.* 264 (1990), S. 249-252.
- Tripathi, S. ; Hladky, S. B.: Streaming potentials in gramicidin channels measured with ion-selective microelectrodes. In: *Biophys.J.* 74 (1998), S. 2912-2917.

- Tu, Q. ; Velez, P. ; Brodwick, M. ; Fill, M.: Streaming potentials reveal a short ryanodine-sensitive selectivity filter in cardiac Ca^{2+} release channel. In: *Biophys.J.* 67 (1994), S. 2280-2285.
- Utsumi, T. ; Aizono, Y. ; Funatsu, G.: Interaction of ricin and its constituent polypeptides with dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. In: *Biochim.Biophys.Acta* 772 (1984), S. 202-208.
- Utsumi, T. ; Aizono, Y. ; Funatsu, G.: Receptor-mediated interaction of ricin with the lipid bilayer of ganglioside gm1-liposomes. In: *FEBS Lett.* 216 (1987), S. 99-103.
- Utsumi, T. ; Ide, A. ; Funatsu, G.: Ricin A-chain induces fusion of small unilamellar vesicles at neutral pH. In: *FEBS Lett.* 242 (1989), S. 255-258.
- van Os, C. H. ; Deen, P. M. T. ; Dempster, J. A.: Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. In: *Biochim.Biophys.Acta* 1197 (1994), S. 291-309.
- Verkman, A. S.: Water permeability measurement in living cells and complex tissues. In: *J.Membr.Biol.* 173 (2000), S. 73-87.
- Verkman, A. S. ; Vanhoek, A. N. ; Ma, T. H. ; Frigeri, A. ; Skach, W. R. ; Mitra, A. ; Tamarappoo, B. K. ; Farinas, J.: Water transport across mammalian cell membranes. In: *Am.J.Physiol.* 39 (1996), S. C12-C30
- Verkman, A. S. ; Yang, B.: Aquaporins and ion conductance. In: *Science*. 275 (1997), S. 1491
- Waggoner, A. S. ; Stryer, L.: Fluorescent probes of biological membranes. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 67 (1970), S. 579-589.
- Walter, A. ; Hastings, D. ; Gutknecht, J.: Weak acid permeability through lipid bilayer membranes. In: *J.Gen.Physiol.* 79 (1982), S. 917-933.
- Walz, T. ; Smith, B. L. ; Zeidel, M. L. ; Engel, A. ; Agre, P.: Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin chip. In: *J.Biol.Chem.* 269 (1994), S. 1583-1586.

- Wang, K. W. ; Tripathi, S. ; Hladky, S. B.: Ion binding constants for gramicidin a obtained from water permeability measurements. In: J.Membrane Biol. 143 (1995), S. 247-257.
- Wang, L. Y. ; Gan, L. ; Perney, T. M. ; Schwartz, I. ; Kaczmarek, L. K.: Activation of Kv3.1 channels in neuronal spine-like structures may induce local potassium ion depletion. In: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 95 (1998), S. 1882-1887.
- Weaver, C. D. ; Shomer, N. H. ; Louis, C. F. ; Roberts, D. M.: Nodulin 26, a nodule-specific symbosome membrane protein from soybean, is an ion channel. In: J.Biol.Chem. 269 (1994), S. 17858-17862.
- Weiss, L. B. ; Koeppe, R. E.: Semisynthesis of linear gramicidins using diphenyl phosphorazidate (DPPA). In: Int.J.Pept.Protein.Res. 26 (1985), S. 305-310.
- Wellner, R. B. ; Hewetson, J. F. ; Poli, M. A.: Ricin: mechanism of action, detection, and intoxication. In: J.Toxicol. 14 (1995), S. 483-522.
- Wilson, R. W. ; Wareing, M. ; Green, R.: The role of active transport in potassium reabsorption in the proximal convoluted tubule of the anaesthetized rat. In: J.Physiol. 500 (1997), S. 155-164.
- Winne, D.: Unstirred layer, source of biased Michaelis constant in membrane transport. In: Biochim.Biophys.Acta 298 (1973), S. 27-31.
- Woodbury, D. J.: Pure lipid vesicles can induce channel-like conductances in planar bilayers. In: J.Membrane Biol. 109 (1989), S. 145-150.
- Woodbury, D. J. ; Miller, C.: Nystatin-induced liposome fusion. a versatile approach to ion channel reconstitution into planar bilayers. In: Biophys.J. 58 (1990), S. 833-839.
- Xiang, T. X. ; Anderson, B. D.: Diffusion of ionizable solutes across planar lipid bilayer membranes - boundary-layer pH gradients and the effect of buffers. In: Pharm.Res. 10 (1993), S. 1654-1661.
- Xiang, T. X. ; Anderson, B. D.: The relationship between permeant size and permeability in lipid bilayer membranes. In: J.Membrane Biol. 140 (1994), S. 111-122.

- Yang, B. ; Verkman, A. S.: Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. In: *J.Biol.Chem.* 272 (1997), S. 16140-16146.
- Yang, B. X. ; Vanhoek, A. N. ; Verkman, A. S.: Very high single channel water permeability of aquaporin-4 in baculovirus-infected insect cells and liposomes reconstituted with purified aquaporin-4. In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 7625-7632.
- Yasui, M. ; Hazama, A. ; Kwon, T. H. ; Nielsen, S. ; Guggino, W. B. ; Agre, P.: Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. In: *Nature* 402 (1999), S. 184-187.
- Yool, A. J. ; Stamer, W. D. ; Regan, J. W.: Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin1 water channels. In: *Science* 273 (1996), S. 1216-1218.
- Zeidel, M. L. ; Ambudkar, S. V. ; Smith, B. L. ; Agre, P.: Reconstituion of functional water channels in liposomes containing purified red cell chip28 protein. In: *Biochemistry* 31 (1992), S. 7436-7440.
- Zeidel, M. L. ; Nielsen, S. ; Smith, B. L. ; Ambudkar, S. V. ; Maunsbach, A. B. ; Agre, P.: Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 1606-15.
- Zeuthen, T.: Molecular mechanisms for passive and active transport of water. In: *Int. Rev. Cytol.* 160 (1995), S. 99-161.
- Zhelev, D. V.: Exchange of monooleoylphosphatidylcholine with single egg phosphatidylcholine vesicle membranes. In: *Biophys.J.* 71 (1996), S. 257-273.

9 Thesen

1. Aufgrund des Elektrolytrückhalts führt der osmotische Wasserfluss zu einer Konzentrationspolarisation an der Membrangrenzfläche. Wie ein Vergleich experimentell gemessener und theoretischer Konzentrationsprofile zeigt, ist eine befriedigende Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment nur dann zu erreichen, wenn der allmählichen Anstieg der Rührgeschwindigkeit von der Membranoberfläche hin zum Flüssigkeitsvolumen berücksichtigt wird. Das Nernstsche Filmmmodell, dass einen abrupten Übergang zwischen ideal gerührter wässriger Hauptphase und konvektionsfreier ungerührter Schicht in Membrannähe vorsieht, spiegelt die experimentell registrierte Konzentrationsverteilung nur ungenügend wider.
2. Ortsaufgelöste mikroelektrodengestützte Messungen der Elektrolytkonzentration in Membrannähe können für die Bestimmung des transmembranen Volumenflusses und der hydraulischen Leitfähigkeit einer Membran eingesetzt werden.
3. In Übereinstimmung mit einer hydrodynamischen Beschreibung des Gleichgewichts zwischen Osmose, Konvektion und Diffusion lieferten die Experimente den Beweis für die teilchenspezifische Ausdehnung der als Diffusionsbarriere wirkenden ungerührten Schicht. Da letztere mit der dritten Wurzel des Diffusionskoeffizienten wächst, ist die Konzentrationspolarisation kleiner Moleküle generell ausgeprägter als die großer.
4. In Kombination mit Messungen der elektrischen Leitfähigkeit ermöglicht die mikroelektrodengestützte Erfassung des Wasserflusses die Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit einzelner membranüberspannender porenbildender Moleküle. Die für Gramicidin- bzw. Desformylgramicidinkanäle gemessene Leitfähigkeit beläuft sich auf $1.6 \cdot 10^{-14}$ bzw. $1.1 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$.

5. Anhand simultan aufgezeichneter Konzentrationsprofile kanalpermeabler und -impermeabler Ionen lassen sich die Beiträge von Solvent drag und pseudo-Solvent drag zur Kopplung von Wasser- und Ionenflüssen quantitativ voneinander trennen. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen war der Fluss entlang des Konzentrationsgradienten (pseudo-Solvent drag), der aufgrund der volumenflussinduzierten Elektrolytakkumulation auf der einen und der -verdünnung auf der anderen Seite der Membran entsteht, etwa gleich dem Fluss der permeablen Kationen, der allein auf den trägheitsvermittelten Mitnahmeeffekt des Wassers zurückzuführen ist (Solvent drag).
6. Solvent drag-Experimente erlauben die Anzahl der Wassermoleküle zu ermitteln, die sich auf einmal im Kanal befinden. Sowohl für den Gramicidin- als auch den Desformylgramicidinkanal ist sie gleich fünf.
7. Die über den Erwartungen der single-file-Transporttheorie liegende Wasserleitfähigkeit des Desformylgramicidin lässt das Peptid als Modell für natürliche Wasserkanalproteine erscheinen.
8. Die Membranproteine Aquaporin 1 und Aquaporin Z gewährleisten eine hohe Geschwindigkeit des transmembranen Wasserflusses, der nicht von einem Cotransport der Ionen begleitet wird. Dennoch erfolgte der Wassertransport durch membranüberspannende Poren, wie der Abfall der Aktivierungsenergie von 14 auf 4 kcal/mol nach Rekonstruktion von Aquaporin Z in die Lipiddoppelschicht zeigte.
9. Da gleichzeitig mikroelektrodengestützte Wasserflussmessungen und elektrische Leitfähigkeitsmessungen möglich sind, ist mit der gelungenen Rekonstruktion von Wasserkanalproteinen ein definiertes experimentelles System geschaffen worden, dass den Nachweis bzw. Ausschluss ihrer hypothetischen Ionenleitfähigkeit sowie deren Steuerbarkeit durch Botenstoffe, pH-Wert oder Membranpotentiale erlaubt.

10. Nicht nur die Membranpermeation von Wasser, sondern auch die Membranadsorption von Lectinen korreliert mit der Lipidpackungsdichte. Die Schlussfolgerung beruht auf der experimentell gesicherten Lipidabhängigkeit der Wasserpermeabilität und ihrer lectininduzierten Reduktion sowie der die Lectin-Lipid-Wechselwirkung begleitenden Zunahme der Membranoberflächenhydrophobizität.

10 Danksagung

Die Arbeiten wurden im Labor für Modellmembranen des Institutes für Medizinische Physik und Biophysik durchgeführt. Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Prof. Dr. Ulrich Cobet für die Unterstützung, die er mir beim Aufbau des Labors zukommen ließ, zu danken. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sapar Saparov, dessen unermüdlicher Einsatz bei der experimentellen Ausführung sehr zum Gelingen beigetragen hat. Zu Dank verpflichtet bin ich außerdem allen Kooperationspartnern für vielfältige Anregungen und Diskussionen, insbesondere Herrn Dr. Yuri Antonenko von der Lomonossov-Universität Moskau, der sich während seiner Aufenthalte in Halle auch an Experimenten beteiligte. Herr Prof. Peter Agre und sein Mitarbeiter Dr. Mario Borgnia von der Johns Hopkins University in Baltimore exprimierten und reinigten Aquaporin Z und stellten Antikörpern gegen Aquaporin 1 zur Verfügung. Herr Dr. Ulrich Rothe und Frau Glanz aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Halle reinigten Aquaporin 1. Herr Prof. Roger Koepe von der University of Arkansas synthetisierte Desformylgramicidin. Die Herren Dr. Alexander Tonevitsky und Dr. Igor Agapov aus dem Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms in Moskau reinigten Ricin, Viscumin und deren Untereinheiten. Bei Frau Elke Janik und den Herren Bernd Kopsch, Andreas Altrichter und Rainer Ehrchen aus der elektronischen und der mechanischen Werkstatt des Institutes möchte ich mich für die aktive Unterstützung beim Aufbau der Versuchsanordnungen bedanken. Frau Adelheid Leitloff und Frau Diana Siering gebührt Dank für ihre tatkräftige Hilfe im Labor bzw. Büro. Mein Dank gilt weiterhin allen Kollegen aus dem Institut für Medizinische Physik und Biophysik, die zum Gelingen der Arbeit beitragen haben, insbesondere meiner Frau Dr. Elena Pohl, die mir stets hilfreich zur Seite gestanden und jede Etappe kreativ begleitet hat. Finanzielle Unterstützung erfuhren die Forschungsvorhaben von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Po 533/1-1, 533/1-2, Po 533/2-1, Po 533/2-2, 436RUS113/60).

11 Tabellarischer Lebenslauf

20.08.1965	geboren in Kayna (Krs. Zeitz)
1983	Abitur in Halle (Saale)
1983-1989	Studium der Medizinischen Biophysik am Medizinischen Piragov Institut Moskau
1989	Diplom als Arzt-Biophysiker, "Kinetische Untersuchungen des Calcimycin (A23187) induzierten $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ Austausches an ebenen Bilipidmembranen"
1989	Teilapprobation als Arzt (begrenzt auf ein theoretisches Fachgebiet)
1989-1995	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Angewandte Biophysik der Martin-Luther-Universität
1994	Promotion in der Medizin, "Der Mechanismus von Ultraschallwirkungen auf Transportvorgänge durch Lipidmembranen am Beispiel der Acetatdiffusion"
1991-1995	Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle, Abschluss mit Staatsexamen
Seit 1995	Wissenschaftlicher Assistent (Beamter auf Zeit) am Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle
1997	Gebietsanerkennung "Facharzt für Biophysik"