

ANGEWANDTE CHEMIE

84. Jahrgang 1972

Heft 13

Seite 597–648

Strukturprinzipien in Bio-Membranen^[**]

Von Werner Kreutz^[*]

Herrn Professor O. Kratky zum 70. Geburtstag gewidmet

Die röntgenographische Ermittlung der Elektronendichte-Verteilung der Membranquerschnitte des Nervenmyelins und der Vesikeln der Außensegmente der Retina-Sehstäbchen mit einer neuen Auswertungsmethode führt ebenso wie im Falle der Photosynthese-Membran auf eine „asymmetrische“ transversale Masse-Verteilung. In Verbindung mit dem Nachweis planarer Proteingitter in den Membranen photosynthetischer Bakterien, den Chloroplasten höherer Pflanzen und den Retina-Vesikeln sowie dem Auffinden einer neuen Kategorie von Lipideigenschaften, die isotherme Konformations- und Phasenänderungen durch spezifische Ligandenbindung umfaßt, ist eine Basis gegeben, um eine allgemeine Vorstellung über die Struktur von Bio-Membranen zu entwickeln.

1. Einleitung

Die phänomenologischen Fähigkeiten von Bio-Membranen umfassen eine eindrucksvolle Skala von Funktionen, z. B. die Nervenleitung, sensorische Erregungsbildung, Drüseneffekte, Energietransformationen (Photosynthese, Atmung) und osmotische Regulationen – ganz davon abgesehen, daß sie als rein morphologische Funktionselemente die Abgrenzung und Kompartimentierung „innerer Milieus“ überhaupt erlauben und damit eine wesentliche Voraussetzung für die Realisierung von Leben per se schaffen. Für Membranologen ist diese faszinierende Komplexi-

tät der Bio-Membranen eine große Herausforderung, nämlich die Herausforderung des Verstehen-Könnens dieser funktionellen Variabilität auf der molekularen Ebene. Mit diesem Aspekt der Membranen, der sich letzten Endes in der molekularen Architektur sowie den molekularen Eigenschaften und Wechselwirkungen manifestiert, beschäftigt sich im wesentlichen dieser Fortschrittsbericht.

Das Thema läßt sich durch die vier folgenden Fragestellungen konkretisieren:

1. Wie ist der sterische Zustand (Konformation) der Proteinmoleküle und deren planare Verteilung in der Membran? Gibt es variierbare Proteinzustände?
2. In welchem sterischen Zustand befinden sich die Lipide? Besitzen sie eine planare Überstruktur? Gibt es variierbare Lipidzustände?
3. Welche Wechselwirkungen bestehen zwischen Proteinen und Lipiden? Wie ist ihre sterische Relation (Kopplung)?
4. Welche Variationsmöglichkeiten bestehen in der Membranstruktur, um verschiedenen Aufgaben gerecht werden zu können, z. B. Einhaltung einer bestimmten Permeabilität?

[*] Prof. Dr. W. Kreutz
Institut für Biophysik und Strahlenbiologie der Universität
78 Freiburg, Albertstraße 23

[**] An Abkürzungen werden verwendet:

DGD = Digalaktosyldiglycerid
MGD = Mönogalaktosyldiglycerid
PA = Phosphatidylsäure
PC = Phosphatidylcholin
PE = Phosphatidyläthanolamin
PG = Phosphatidylglycerin
PI = Phosphatidylinosit
PS = Phosphatidylserin

tät, Steuerung von Permeabilitätsänderungen, passiver erleichterter und aktiver Transport und deren Steuerung, Aufbau und Einstellung bestimmter Membranpotentiale, Steuerung von Potentialänderungen (z. B. lichtinduzierte oder potentialinduzierte Änderungen), definierte Erregungsleitung, potentialgekoppelte chemische Synthesen (z. B. ATP), Redoxreaktionen und wahrscheinlich auch Informationsspeicher-Leistungen?

Unsere bisherigen Kenntnisse weisen darauf hin, daß die große Variabilität der Membranfunktionen auf einer flexiblen Basis-Membran beruht, deren weitreichende strukturelle Anpassungsfähigkeit die Assoziation verschiedener spezieller Funktionsproteine sowohl an der Protein- als auch an der Lipidseite erlaubt und die damit den vielfältigsten funktionellen Aufgaben gerecht werden kann. Es scheint daher sinnvoll, zunächst zwischen einer Basis-Membran und einer Funktions-Membran zu unterscheiden. Diesem Konzept Rechnung tragend, wird deshalb zunächst eine Vorstellung der Basis-Membran entwickelt. Dieses Vorgehen schließt ein, daß zuerst die Eigenschaften der Basismembran-Proteine und der Lipide diskutiert werden. Die Darlegung der Charakteristika dieser beiden Stoffgruppen wird die Voraussetzung schaffen, um anschließend die Möglichkeiten der Kopplung, d. h. der Vereinigung dieser beiden Stoffgruppen zu einer Membran zu untersuchen. Im zweiten Teil der Arbeit wird die Komplettierung zur Funktions-Membran vollzogen und versucht, prinzipielle Funktionskriterien aus der Membranstruktur abzuleiten.

2. Die Basis-Membran

2.1. Die Eigendynamik der Lipide

Bei der bisherigen Beurteilung der Membranphänomenologie wurde den Proteinen funktionelle Dominanz eingeräumt. Der Grund hierfür ist darin zu suchen, daß die bisher bekannten Lipideigenschaften keine große Variationsbreite der Funktionen zuließen. In dieser Hinsicht wird in Zukunft eine grundlegende Korrektur vorzunehmen sein.

Die physikalisch-chemischen Daten, die bisher von Membranlipiden vorliegen, resultieren im wesentlichen aus Messungen p,T-abhängiger Phasenübergänge zwischen laminaren, kubischen und hexagonalen Gittern^[1-3], aus Messungen des Oberflächenpotentials, des Oberflächendruckes oder der Oberflächenspannung^[4,5] und des Flächenanspruchs monomolekularer Schichten auf wäßrigen Phasen (Zusammenfassung: ^[6]). Anzuführen sind ferner Permeabilitätsmessungen von bimolekularen Lipidschichten und die Erfassung deren elektrischer Eigenschaften^[7-10] sowie ESR-^[11] und NMR-Messungen an Lipiden^[12]. Außerdem wurde bisher angenommen, daß die Phospho- und Galaktolipide lediglich eine einzige prinzipielle Konformation einnehmen können, nämlich die in Abbildung 1a gezeigte. (Es existiert nur eine Ausnahme in der Literatur: die Lipidkonformation im Modell der Nervenmyelin-Membran von Finean^[13].)

Zu Funktions-Molekülen im eigentlichen Sinn werden die Lipide erst durch die folgenden Eigenschaften:

1. Lipide können grundsätzlich in zwei Konformationen existieren^[14] (Abb. 1a und 1b).
2. Diese Konformationen können durch Ligandenbindung reversibel ineinander übergeführt werden, oder anders ausgedrückt: Lipide können chemisch induzierbare Konformationsänderungen eingehen^[15].
3. Lipide können durch Ligandenbindung induzierte Phasenübergänge vollziehen^[15].
4. Lipide zeichnen sich durch eine hohe Selektivität bezüglich der Mischbarkeit oder Nichtmischbarkeit aus^[14,15].

Aufgrund dieser Eigenschaften kann von einer Eigendynamik der Lipide gesprochen werden. In diese Lipid-Eigendynamik können auch die transversalen Molekül-Rotationen, die lateralen Thermodiffusions-Prozesse^[16] und die durch Kationen induzierten Organisationsänderungen in Lipidschichten einbezogen werden^[17].

2.1.1. Konformationen und Micelltypen

Die sterischen Eigenschaften und das Mischungsverhalten der Lipide können mit der Röntgen-Kleinwinkelmethode untersucht werden. Verschiedene Konformationen und Micelltypen liefern sehr unterschiedliche Röntgen-Beugungsdiagramme. Ergänzende Informationen können erhalten werden durch quantitative Titration der polaren Gruppen^[18] in verschiedenen Konformationen, ESR-Spinlabeling^[11], NMR-Messungen^[12], Lipidase-Abbau-Experimente und durch Messungen der kalorischen und kinetischen Daten^[2] bei Konformationsänderungen.

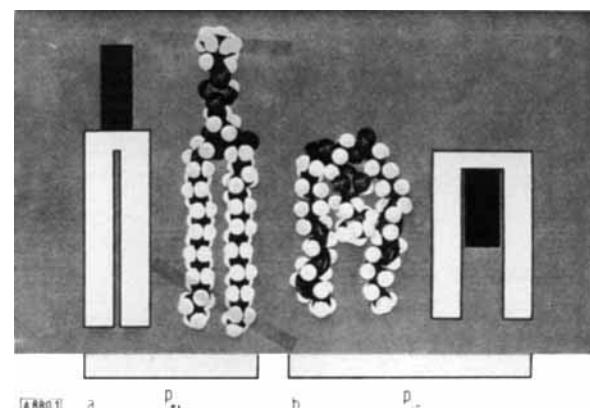


Abb. 1. a) Stuart-Briegleb-Modell der p_{ex} -Konformation von Lipiden und das Symbol, das weiterhin in dieser Arbeit verwendet wird, b) entsprechende Darstellung der p_{in} -Konformation.

Ganz allgemein kann festgestellt werden, daß sehr wahrscheinlich der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Konformationen der Lipide darin besteht, daß in einem Fall die polaren Gruppen außerhalb, im andern Fall innerhalb des Fettsäurebereiches angeordnet sind (Abb. 1a und 1b). Die Konformation von Abbildung 1a wird fortan als p_{ex} -Konformation (Abkürzung für „polar-group extern“ conformation), die von Abbildung 1b als p_{in} -Konformation (Abkürzung für „polar-group intern“ conformation) bezeichnet. Diese beiden Konformationen erlauben grundsätzlich die in Abbildung 2 aufgeführten laminaren und röhrenförmigen Micellbildungen. Bisher gefunden wurden die Micellbildungen a, b, c, f (Abb. 2), nicht jedoch e; d ist

fraglich. Es scheint so zu sein, daß laminare Micellen sowohl von Lipiden in der p_{ex} - als auch der p_{in} -Konformation gebildet werden können, daß jedoch die tubulären Strukturen, die immer mit hexagonaler Gitterstruktur gekoppelt sind, nur von Lipiden in der p_{in} -Konformation aufgebaut werden.

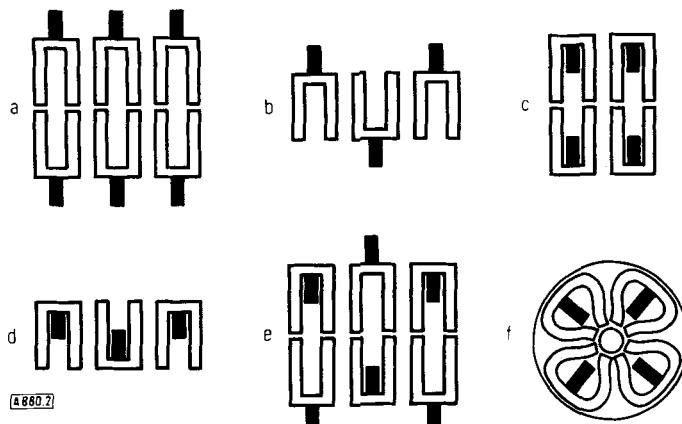


Abb. 2. a), b), c), d), e) Laminare Strukturen der Lipide in der p_{in} - und der p_{ex} -Konformation, f) Querschnitt einer tubulären Lipidüberstruktur, der aus vier Lipidmolekülen in der p_{in} -Konformation gebildet wird.

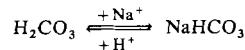
Alle gesättigten Lipide, d. h. Lipide mit gesättigten Fettsäuren (s-Lipide), liegen ausschließlich in der p_{ex} -Konformation vor. Dies kann sehr einfach durch Hydrierung von natürlich vorkommenden partiell oder vollkommen ungesättigten Lipiden (n-Lipiden), d. h. durch Überführung in gesättigte Lipide, gezeigt werden. Alle bisher untersuchten Lipide dieser Art bilden bei Raumtemperatur laminare Micellen und geben dementsprechend im Röntgen-Experiment eine Periode, die der doppelten Länge eines völlig gestreckten Lipidmoleküls, d. h. der doppelten Länge einer Fettsäure plus zweier polarer Gruppen entspricht (Abb. 2a)^[14].

Die natürlichen Lipide verhalten sich sehr viel differenzierter. Hier gibt es Moleküle, die statischen Charakter besitzen, d. h. bei Raumtemperatur entweder invariant in der p_{ex} - oder p_{in} -Konformation vorkommen, sowie dynamische Moleküle, deren Konformation im wesentlichen durch Ligandenbindung bestimmt wird. Typische statische Moleküle sind z. B. DGD (Digalaktozyldiglycerid) und PC (Phosphatidylcholin, Lecithin), während sich PE (Phosphatidyläthanolamin), PA (Phosphatidylsäure), PS (Phosphatidylserin) und PI (Phosphatidylinosit) dynamisch verhalten.

2.1.2. Phasenübergang durch Ligandenbindung

Mit „Phasenübergang“ ist hier die kooperative Transformation eines Micelltyps in einen anderen und die damit gekoppelte Gittertypänderung gemeint. Temperaturabhängige Phasenübergänge von Lipiden sind seit langem bekannt^[1, 31] und dürften, da sie sich bei Phospholipidmischungen um 40°C ereignen^[1], keine Bedeutung für physiologische Vorgänge in vivo haben^[*]. Von großer physio-

logischer Bedeutung könnten jedoch die temperaturunabhängigen reversiblen Phasenübergänge sein, wie sie von PE vollzogen werden können. PE besitzt die einzigartige Eigenschaft, einen temperaturunabhängigen Phasenübergang durch Bindung von Hydrogencarbonat und Kohlensäure durchführen zu können^[15]. Da ausschließlich Hydrogencarbonat und Kohlensäure im Verhältnis 1:1 gebunden werden, handelt es sich zugleich um einen pH-abhängigen Phasenübergang, oder anders ausgedrückt, einen Phasenübergang, der indirekt über das Hilfssystem



steuerbar ist. Der Regelbereich liegt, entsprechend dem pK -Wert des Kohlensäuresystems, bei $pH = 6.3$. Bei pH -Werten < 5.5 liegen ausschließlich Röhrenmicellen in hexagonaler Anordnung vor (Abb. 3). Im Regelbereich zwischen $pH = 5.5$ und 7.0 werden, in dem Maße wie $NaHCO_3$ und H_2CO_3 gebunden werden (maximal bei $pH = 6.3$), die Röhrenmicellen in laminare Micellen umgewandelt. Unsere Untersuchungen weisen außerdem darauf hin, daß bei $pH > 8$ das Kohlensäuresystem keine Ligandenfunktion mehr für PE besitzt, da PE in diesem pH-Bereich wieder tubuläre Micellen bildet. Interessant ist nun, daß gerade in diesem pH-Bereich PE bevorzugt Ca^{2+} bindet und daß dabei ebenfalls die tubulären Micellen

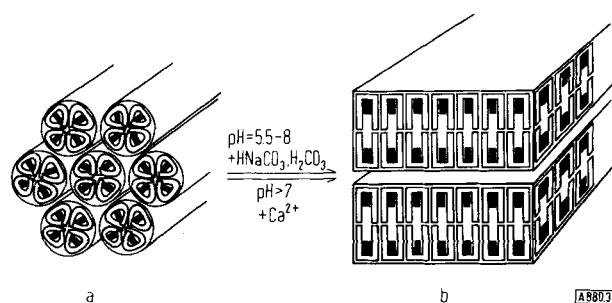


Abb. 3. Darstellung des Hydrogencarbonat- und Ca^{2+} -abhängigen Phasenüberganges von PE zwischen tubulären hexagonalen und laminaren Gittern.

des PE in laminare überführt werden (Abb. 3). Ca^{2+} und das Kohlensäuresystem besitzen also im Effekt gleiche konkurrierende Ligandenfunktionen, deren Dominanz durch je einen bestimmten pH-Bereich eingegrenzt ist. Sowohl bei der Hydrogencarbonatbindung ($pH = 5.5$ bis 8) als auch der Ca^{2+} -Bindung ($pH > 7$) liegt PE in der p_{in} -Konformation vor und bildet symmetrische bimolekulare Micellen der Dicke 44 bzw. 45 Å.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt ist ferner, daß Ca^{2+} teilweise auch im sauren Bereich von PE gebunden wird. Da-

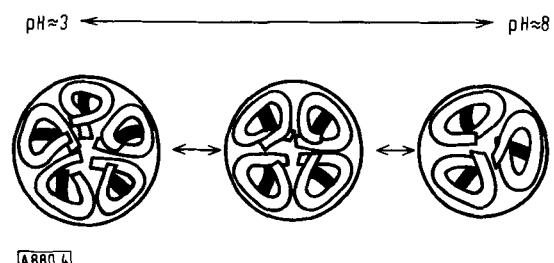


Abb. 4. pH-abhängige Strukturen tubulärer PE-Micellen mit Querschnitten aus fünf, vier oder drei PE-Molekülen.

[*] Die biologische Bedeutung der sehr gut regulierten Körpertemperatur von 36–37°C bei idiothermen Tieren mag darin liegen, daß unkontrollierbare thermische Phasenübergänge vermieden werden sollen.

bei wird PE aber von der p_{in} - in die p_{ex} -Konformation überführt und bildet dann laminare, bimolekulare Micellen mit einer Dicke von 54 Å.

Es ist außerdem erwähnenswert, daß bei Abwesenheit von CO_2 und Ca^{2+} der Durchmesser der tubulären Strukturen mit steigendem pH-Wert abnimmt. Der Röhrendurchmesser wird von 48 ± 1 Å bei $\text{pH} \approx 3$ stufenweise über 43 ± 1 Å auf 37 ± 1 Å bei $\text{pH} = 7$ verringert. Da sich die Röhrendurchmesser wie $\sqrt{5} : \sqrt{4} : \sqrt{3}$ verhalten, werden die Röhrenquerschnitte offensichtlich zunächst aus fünf, dann aus vier und schließlich aus drei PE-Molekülen aufgebaut (Abb. 4).

2.1.3. pH-abhängige und durch Ligandenbindung gesteuerte Konformationsänderungen

Im Gegensatz zu PE, dessen wesentliches Charakteristikum die Fähigkeit ist, chemisch induzierbare Phasenübergänge durchzuführen, wobei seine Konformation im wesentlichen unverändert bleibt, besitzt PA die einzigartige Fähigkeit, pH-, CO_2 - und Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderungen einzugehen, wobei in diesem Falle der Micelltyp beibehalten wird^[15]. Der bestimmende Parameter für die Konformationsänderung von PA ist der pK -Wert der zweiten Dissoziationsstufe der Phosphogruppe bei $\text{pH} \approx 7$. Im Sauren liegt PA in der p_{in} -, im Basischen in der p_{ex} -Konformation vor (Abb. 5).

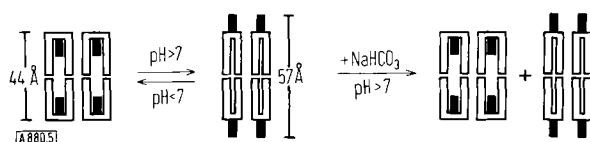


Abb. 5. pH-abhängige Konformations- und Micellenänderung von PA: Im Alkalischen werden die p_{in} -Micellen in p_{ex} -Micellen transformiert. Bei Zugabe von NaHCO_3 bei $\text{pH} > 7$ werden die p_{ex} -Micellen teilweise zurücktransformiert in p_{in} -Micellen.

Bei Anwesenheit von CO_2 werden im Basischen beide Konformationstypen in etwa gleichen Anteilen gefunden. Bei Einwirkung von Ca^{2+} wird PA im ganzen pH-Bereich quantitativ von der p_{in} - in die p_{ex} -Konformation transformiert (Abb. 6). Im Sauren werden zwei laminare Micelltypen von PA gefunden – allerdings in sehr unterschiedlichen Anteilen (Abb. 6a) –, im Basischen nur ein laminarer Micelltyp (Abb. 6b). Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Protonierung der sekundären PO^- -Gruppe von PA die p_{in} -Konformation begünstigt, die Bindung von Na^+ und Ca^{2+} jedoch die p_{ex} -Konformation stabilisiert.

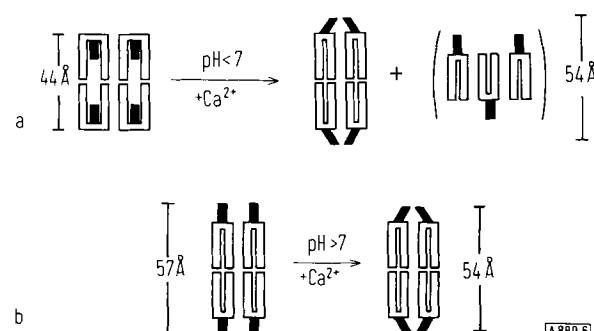


Abb. 6. Ca^{2+} -abhängige Konformations- und Micellenänderungen von PA: Im Sauren werden die p_{in} -Micellen in zwei Typen von p_{ex} -Micellen überführt, während im Alkalischen nur ein Typ von p_{ex} -Micellen gebildet wird.

PS zeigt weder die Eigenschaften von PE noch die von PA. PS liegt über die ganze pH-Skala in der p_{ex} -Konformation vor. Diese Konformation wird auch nicht wesentlich durch Ca^{2+} -Ionen verändert. PS ist aber mit einer anderen bemerkenswerten Eigenschaft ausgestattet: Die p_{ex} -Konformation kann durch Zugabe der Aminosäure Alanin quantitativ in die p_{in} -Konformation übergeführt werden (Abb. 7a). Manche Aminosäuren, z. B. Methionin und Cystein,

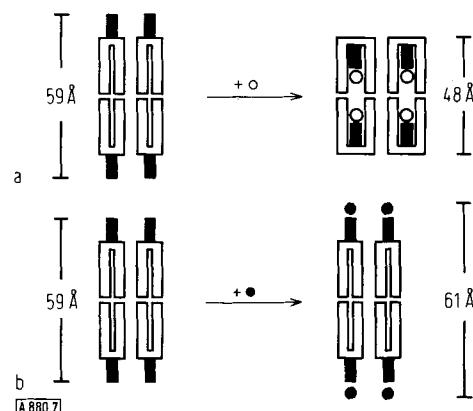


Abb. 7. Aminosäure-induzierte Konformationsänderung von PS. a) Alanin (o) wandelt die p_{ex} -Konformation quantitativ in die p_{in} -Konformation um, b) andere Aminosäuren (●) werden in der p_{ex} -Konformation assoziiert.

können diese Transformation partiell vollziehen; die meisten Aminosäuren werden aber einfach an die Seringruppe des PS in der p_{ex} -Konformation assoziiert (Abb. 7b)^[15].

Vergleichbar spezielle Eigenschaften sind auch von PI und PG zu erwarten. Abschließende Untersuchungsergebnisse liegen aber noch nicht vor.

2.1.4. Das Mischungsverhalten von Lipiden

Werden Phospholipide in organischen Lösungsmitteln gemischt und zur Trockne eingedampft und nimmt man anschließend von diesen Präparaten bei Raumtemperatur Röntgen-Diagramme auf, so ergibt sich folgende Gesamtbilanz der Verhaltensweisen: n-PC, n-PG und n-Sphingomyelin bilden laminare, n-PA, n-PE und n-PS tubuläre Micellen. Alle binären Mischungen, die PC oder Sphingomyelin enthalten, liefern laminare, binäre Mischungen aus PE mit PA oder PS dagegen tubuläre Micellen. Tubuläre Überstrukturen ergibt auch die Kombination PS/PA. Eine generelle Eigenschaft bei der Mischmicellbildung ist, daß sich die Mischungspartner in ihrer Konformation aneinander angleichen, so daß Mischmicellen homogener Konformation entstehen^[14, 15].

In wäßrigem Milieu zeigen die Lipide ein wesentlich komplizierteres Verhalten. Dies geht schon aus den vorstehenden Ausführungen über das Verhalten der Einzellipide hervor. Die Untersuchungen von Lipidmischungen in wäßriger Suspension werden wesentlich dadurch erschwert, daß solche Suspensionen teilweise sehr verwaschene Röntgen-Diagramme liefern, die sich nur begrenzt auswerten lassen. Die bisherigen Informationen weisen jedoch darauf hin, daß die Lipide in wäßrigem Milieu je nach Ligandenbindung mischbar oder nicht mischbar sind, also ein sehr selektives Mischungsverhalten zeigen. Ein entscheidendes Kri-

terium für die Mischbarkeit bzw. Nichtmischbarkeit scheint zu sein, ob die Konformation der Mischungspartner übereinstimmt oder nicht. Eine selektive Nichtmischbarkeit impliziert, daß Lipide innerhalb der Lipidschicht der Bio-Membranen separate Domänen bilden können. Eine solche „Mosaikstruktur“ der Lipidschicht kann als wesentliche Voraussetzung für die Möglichkeit kooperativer Konformations- und Micellübergänge in Lipidbereichen gleicher Population angesehen werden.

Besondere Bedeutung dürften diese Gesichtspunkte für die Permeabilitätssteuerung in Bio-Membranen haben. Diese Fragen dürfen jedoch nicht isoliert im Rahmen der Lipide gesehen werden, denn die laterale Verteilung von Lipiden wird entscheidend durch die Struktur der Proteinschicht beeinflußt werden. Für eine weitergehende Diskussion ist daher die Kenntnis dieser Struktur unumgänglich.

2.2. Die Membran-Proteine

Jede Membran ist, je nach Funktion oder Aufgabe, mit einem speziellen Satz von Proteinen ausgestattet. Einige dieser Proteine sind nur lose an die Membran assoziiert, der weitaus größere Teil jedoch ist fest an die Membran gebunden, oder anders ausgedrückt, bildet einen integrierten Teil der Membran selbst. An dieser Stelle sollen die lose assoziierten Proteine nicht behandelt werden – sie werden im Zusammenhang mit der „Funktions-Membran“ diskutiert (Abschnitt 3) –, sondern wir wollen uns nur mit den fest gebundenen Proteinen befassen. Diese Proteine sind unter dem Sammelbegriff „Strukturprotein“ bekannt. Für die folgende Diskussion ist diese Bezeichnung jedoch zu vieldeutig. Unser Interesse soll zunächst nur jenem Anteil des Strukturproteins gelten, der aufgrund rein morphologischer, physikalischer Kriterien definierbar ist und der sich durch drei Hauptmerkmale auszeichnet:

1. seine Fähigkeit, zweidimensionale Gitter bilden zu können,
2. sein besonderes Lösungsverhalten,
3. seine hohe Raumerfüllung.

Am bemerkenswertesten ist die erste Eigenschaft. Daher soll diese Proteinkategorie als „2d-Gitter-Protein“ bezeichnet werden. Der Zusammenhang zwischen dem 2d-Gitter-Protein und dem Strukturprotein wird in Abschnitt 2.2.2 aufgezeigt werden.

2.2.1. Die Tertiärstruktur des 2d-Gitter-Proteins

Am besten bekannt ist das 2d-Gitter-Protein der Photosynthese-Membran. Nur von diesem Proteintyp konnte bisher eine Gauß-Synthese der Elektronendichte-Verteilung der Untereinheit (Protomer) auf der Basis röntgenographischer Daten gerechnet werden^[14, 19]. Diese Gauß-Synthese ist (aus Gründen, die hier nicht näher erläutert werden können) zwar noch fehlerhaft, trotzdem aber ausreichend, um bereits gewisse grundsätzliche Strukturmerkmale erkennen zu können.

Die Aussagen der Diagramme sind, dem Informationsgehalt entsprechend, schematisch in Abbildung 8 dargestellt^[14, 19]: Zwei cyclische Proteinmoleküle, deren Masse

zwischen oberem und unterem horizontalem Strang ungleichmäßig verteilt ist, sind rechtwinklig zueinander angeordnet. Obwohl die Abmessungen der „Ringe“ nur 27 bzw. 36 Å betragen, überspannen sie eine Fläche von 42 · 93 Å².

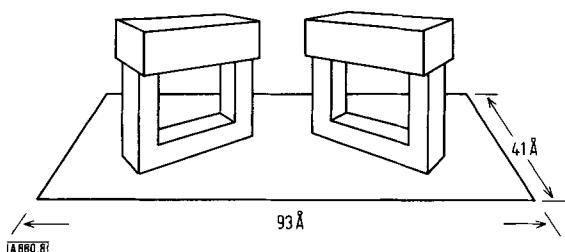


Abb. 8. Schematische Darstellung der Masse-Verteilung in der Tertiärstruktur der 2d-Gitterprotein-Untereinheit.

Es ist daher gar nicht anders vorstellbar, als daß zwischen den Ringen und zwischen den Partikeln als Ganzes Kontaktstränge in Form von Seitenketten vorhanden sind.

Ein etwas realistischeres Bild wird erhalten, wenn die Aminosäurezusammensetzung mit herangezogen wird. Wenn die Aminosäurebestimmungen von *Weber*^[20], *Menke*^[21], *Criddle*^[22] und *Bailey*^[23] der Rechnung zugrunde gelegt werden, sollte die Partikel aus 94 ± 2 Aminosäuren bestehen (Tabelle 1). Die Summe dieser Aminosäuren ergibt ein

Tabelle 1. Aminosäurezusammensetzung einer Gitterprotein-Untereinheit. Die Untereinheit besteht aus 94 ± 2 Aminosäuren.

Aminosäure	mol Aminosäure pro Subpartikel
Asp-NH ₂	7.45
Thr	4.07
Ser	4.80
Pro	5.08
Glu-NH ₂	8.31
Gly	9.35
Ala	8.17
Val	7.0
Cys-SH	1.0
Met	1.46
Ile	3.76
Leu	9.25
Tyr	1.51
Phe	5.19
Lys	3.2
His	0.92
Arg	3.16
Trp	1.22
Amid	8.83

Molekulargewicht von ca. 10000 für die gesamte Untereinheit von Abbildung 8 oder 5000 pro Ring. Zum gleichen Ergebnis kommt man bei einer Abschätzung des Molekulargewichts aus der Masse-Verteilung von Abbildung 8.

Es sind prinzipiell drei Konformationsvarianten mit den Röntgen-Daten in Einklang zu bringen. Eine Polypeptidkette aus 94 Aminosäuren reicht aus, um zwei getrennte Ringe (Abb. 9 a), eine geknickte, geschlossene „8“ (Abb. 9 b) oder eine geknickte offene „8“ zu bilden (Abb. 9 c). Die beiden ersten Strukturen besitzen keine endständigen Aminosäuren. Das kleinste auffindbare Molekulargewicht würde im Falle von Abbildung 9 a ca. 5000 und im Falle von Abbildung 9 b ca. 10000 betragen. Die Konformation von Ab-

bildung 9c dagegen besitzt zwei endständige Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 10000.

Eine Unterscheidung zwischen den drei Möglichkeiten könnte durch eine kombinierte Endgruppen- und Molekulargewichtsbestimmung erfolgen. Nach Menke^[21] beträgt die Zahl der C-endständigen Aminosäuren 13; andere Autoren^[22-24] konnten jedoch keine endständigen Amino-

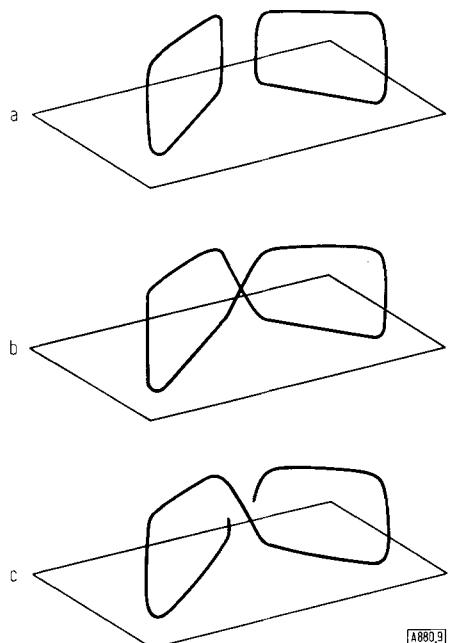


Abb. 9. Drei mögliche Konformationen einer Peptidkette aus 94 Aminosäuren, die mit den Röntgen-Daten in Einklang sind.

säuren nachweisen, so daß im Augenblick keine Entscheidung möglich ist. Für unsere Intention der Diskussion der Membranstruktur sind solche Details der Proteinstruktur auch zunächst nicht von Belang.

2.2.2. Das Aggregationsverhalten des 2d-Gitter-Proteins

Von besonderer Bedeutung ist das Aggregationsverhalten der 2d-Gitterprotein-Untereinheit von Abbildung 8, d.h. die Quartärstruktur oder die planare Überstruktur des 2d-Gitter-Proteins. Grundsätzlich ist die Variation der Aggregationsmöglichkeiten dadurch eingeschränkt, daß nur bestimmte Symmetrieeoperationen in einem planaren Proteingitter möglich sind. Außerdem sollten wie in anderen Proteinen nur L-Aminosäuren an der Proteinstruktur beteiligt sein.

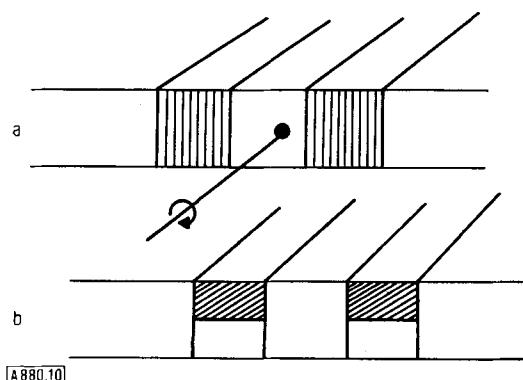


Abb. 10. a) Membran mit einer zweizähligen coplanaren Drehachse, b) Membran ohne coplanare Drehachse.

Diese Tatsache schließt von vornherein Symmetriezentren und Spiegelsymmetrien aus. Möglich sind Translationen, transversale Drehachsen, d.h. Drehachsen, die senkrecht zur Flächenebene stehen, sowie coplanare Dreh- und Schraubenachsen, die jedoch nur Zweizähligkeit besitzen können (Abb. 10a). Die Kombination dieser Symmetrieeoperationen erlaubt 17 planare Raumgruppen^[25].

Bei biologischen Membranen sind zwei wesentliche Restriktionen bezüglich möglicher Symmetrieeoperationen vorgegeben: Von Bio-Membranen wird angenommen, daß sie transversale und coplanare Polarität besitzen. Wenn wir diese Bedingungen in bezug auf die Proteinschicht allein prüfen, so ist festzustellen, daß auch das Strukturprotein selbst eine asymmetrische Struktur des Querschnitts, d.h. transversale Polarität besitzt. Was die coplanare Polarität betrifft, so scheint eine solche nur dann grundsätzlich möglich zu sein, wenn sie von einem zweidimensionalen Gitter vorgegeben wird. Ein zweidimensionales Gitter ist aber nur vorstellbar, wenn es innerhalb der Proteinschicht existiert. Es darf also auch tangentiale Polarität in der Proteinschicht erwartet werden. Die transversale Asymmetrie (Abb. 10b) reduziert die Zahl der möglichen Raumgruppen bereits von 17 auf 5, da dadurch alle Raumgruppen mit zweizähligen coplanaren Dreh- und Schraubenachsen ausgeschlossen werden (Abb. 10b).

Wird schließlich zusätzlich die tangentiale Polarität berücksichtigt, so entfallen auch die transversalen Drehachsen, und es bleibt von den 17 Raumgruppen lediglich noch eine Möglichkeit übrig, nämlich das schiefwinkelige planare Gitter des Typs von Abbildung 11. Nun, dieser

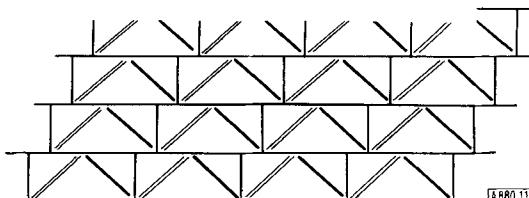


Abb. 11. Zweidimensionales Gitter primitiver Polarität: Ein asymmetrischer Protomer-Typ bildet ein unendliches zweidimensionales Gitter. Die beiden dünnen Linien und die rechtwinklig dazu angeordnete dicke Linie in jedem Protomer zeigen die Lage der Peptidringe an.

Gittertyp würde die vollständigste, aber auch die primitivste Polarität, die möglich ist, repräsentieren: Ein asymmetrischer Bausteintyp (Protomer) würde periodisch-homogen die gesamte Membranfläche füllen. Diese Art von Polarität scheint jedoch in biologischen Membranen nicht erwünscht und auch nicht realisiert zu sein, da sie keinerlei Variabilität bezüglich der Polarität mehr zuläßt. Die bisher zur Verfügung stehenden röntgenographischen und auch elektronenmikroskopischen Daten weisen vielmehr darauf hin, daß biologische Membranen als planare Assoziationen linearer Überstrukturen aufzufassen sind. Die linearen Überstrukturen können ihrerseits dabei eine homogene Verteilung von Bauelementen besitzen.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, daß zwei oder mehrere verschiedene oligomere Überstrukturelemente alternativ linear angeordnet werden. Natürlich erfordert ein solches planares Membranbauprinzip eine größere Auswahl an Protomeren. Die Variation kann sich dabei

aber durchaus auf minimale Unterschiede in der Primärstruktur eines einzigen Grundbausteins beschränken. Das postulierte Prinzip soll am Beispiel photosynthetischer Membranen erläutert werden.

Zunächst darf vorausgeschickt werden, daß in der Photosynthese-Membran höherer Pflanzen zwei Typen von Lichtreaktionen oder zwei Photosynthese-Systeme (Elektronenflußsysteme), genannt System I und System II, kooperieren. In photosynthetisch aktiven Bakterien (z. B. *rhodopseudomonas viridis*) dagegen ist nur System I realisiert. Durch den Strukturvergleich dieser beiden Objekte läßt sich besonders gut zeigen, wie auf der molekularen

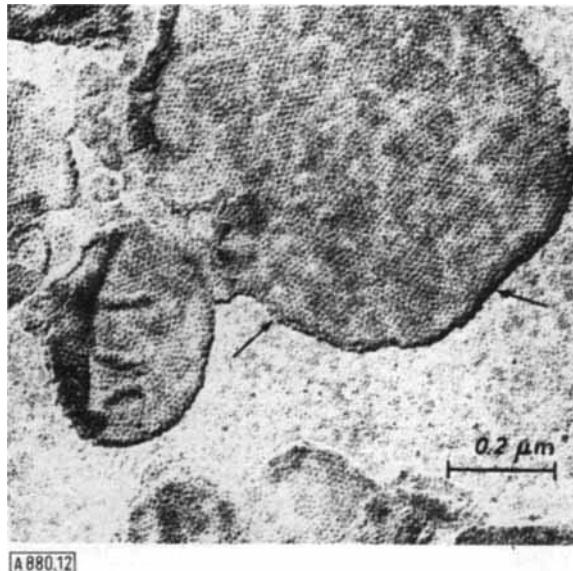


Abb. 12. Elektronenmikroskopische Flächenansicht von Thylakoiden von *rhodopseudomonas viridis*. Die Oberflächen zeichnen sich durch eine regelmäßige Anordnung der Proteine in zwei Vorzugsrichtungen aus (Pfeile). Unter „Thylakoiden“ versteht man die Membran-Vesikel des Photosynthese-Systems. (Nach P. Giesbrecht [26].)

Ebene eine relativ einfache Struktur, nämlich die der Bakterien, zu einer komplexen Struktur mit der Aufgabe der Kopplung zweier Systeme entwickelt werden kann. Eine elektronenmikroskopische Aufsichtsaufnahme einer photosynthetischen Bakterien-Membran von Giesbrecht^[26] zeigt eine homogene Proteinstruktur mit zwei Vorzugsrichtungen (Abb. 12). Diese beiden Vorzugsrichtungen schließen einen Winkel von etwa 56° ein. Die Ursache dieser Vorzugsrichtungen sind Aggregationen von ca. 90 Å breiten Doppelsträngen (lineare Überstrukturen) innerhalb der Membranfläche.

Dieser Sachverhalt wird durch Röntgen-Aufnahmen vom gleichen Objekt erhärtet^[27]. Es werden zwei Hauptinterferenzen gefunden, die Netzebenenabständen von 77 und 51 Å entsprechen. Diese Interferenzen sind durch eine lineare Struktur interpretierbar, wie sie Abbildung 13 zeigt. Aus den Braggschen Abständen von 77 und 51 Å und dem Winkel $\alpha = 56^\circ$ (Abb. 13a) folgen Kantenlängen des Proteinbausteins von 41 und 93 Å. Das Vorliegen einer planaren Struktur, d. h. einer Struktur, die sowohl in der x_1 - als auch in der x_2 -Richtung mehrere Netzebenen besitzt, kann aufgrund des Fehlens einer 41-Å-Interferenz ausgeschlossen werden.

Eine lineare Struktur der Art von Abbildung 13 b ist aber nur dann zu verstehen, wenn sie zwei zweizählige transversale Drehachsen besitzt. Mit andern Worten: Es muß eine Vorzugskopplung zwischen zwei Partikelreihen ge-

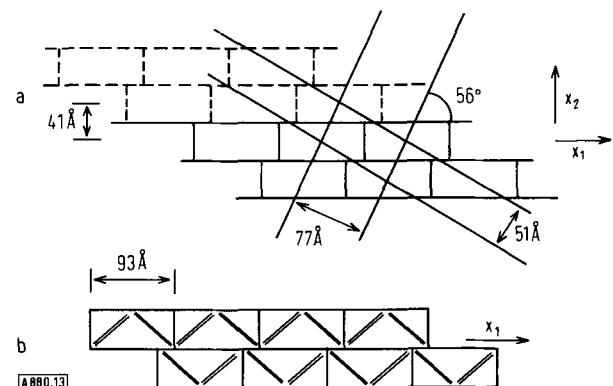


Abb. 13. Gitteranordnung, die das Auftreten eines 77-Å- und eines 51-Å-Reflexes erklärt. Gitter b unterscheidet sich von a durch das Fehlen der 41-Å-Periode. b entspricht dem tatsächlichen Beugungsbild.

fordert werden. Wenn die eingangs beschriebene Masseverteilung des Gitterprotein-Bausteins andeutungsweise miteingeführt wird, so ergibt sich eine lineare Überstruktur der Proteinschicht von Bakterien-Membranen wie in Abbildung 13 b gezeigt.

Erweitern wir jetzt die Betrachtung auf das Bauprinzip des Gitterproteins der Photosynthese-Membran höherer Pflanzen. Elektronenmikroskopische Bilder^[28-30] führen auch hier auf lineare Überstrukturen (siehe z. B. Abb. 14). Diese Überstrukturen besitzen jedoch ganz andere Dimensionen als bei Bakterien. Der seitliche Schwerpunktsabstand der Ketten beträgt hier etwa 190 Å, die Periode längs der Ketten ca. 170 Å. Das Röntgen-Diagramm von solchen Objekten besteht aus einer sehr starken Interferenz entsprechend



Abb. 14. Elektronenmikroskopische Flächenansicht eines Thylakoidbereiches höherer Pflanzen, die lineare Überstrukturen zeigt. (Nach R. B. Park und N. G. Pon [28].)

41 Å, einer starken Interferenz entsprechend 31 Å und einer sehr schwachen Interferenz entsprechend 62 Å, die außerdem wesentlich breiter ist als die beiden andern.

Wenn man für die Interpretation zunächst von der Annahme ausgeht, daß sowohl in Bakterien als auch in höheren

Pflanzen System I die gleiche Grundstruktur besitzt, so sollte durch eine Modifizierung der Struktur von Abbildung 13 zumindest ein Teil der Reflexe interpretierbar werden. Das Auftreten eines 41-Å-Reflexes und das Fehlen eines 93-Å-Reflexes weist darauf hin, daß eine Aggregation in x_2 -Richtung und nicht in x_1 -Richtung vorliegt. Weiterhin ist der 62-Å-Reflex ein Indiz dafür, daß durch Aggregation in x_2 -Richtung ein orthogonales Gitter zustande kommt (Abb. 15). Während einerseits der scharfe 41-Å-Reflex auf eine hohe Assoziationsfähigkeit in Richtung x_2 schließen läßt, weist andererseits der breite 62-Å-Reflex darauf hin, daß die Gitterordnung bereits nach vier bis fünf Perioden abbricht. Diese beiden Aussagen scheinen sich zunächst zu widersprechen; weiter unten wird aber eine plausible Erklärung gegeben werden können.

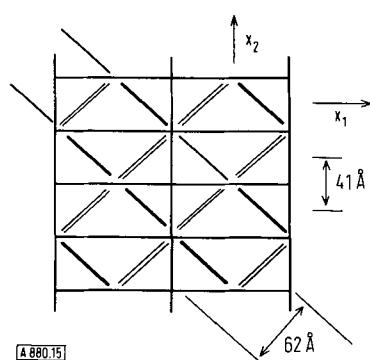


Abb. 15. Planare Anordnung von Protomeren des Photosynthese-Systems I, die den 62-Å-Reflex erklärt.

Zunächst ist noch eine Diskussion des 31-Å-Reflexes erforderlich. Da von System I ein 31-Å-Reflex nicht zu erwarten ist (Abb. 15), sollte System II für diese Interferenz verantwortlich sein. Es gibt zwei mögliche Aggregationsformen der Protein-Untereinheit in x_2 -Richtung, die diese Interferenz geben können: eine polare und eine unpolare Aggregation (Abb. 16a und 16b). Im Falle der polaren Struktur von Abbildung 16a ist nicht einzusehen, warum sie eine lineare Assoziation in x_2 -Richtung bilden sollte. Es wäre vielmehr eine beliebig große zweidimensionale Assoziation zu erwarten, wie sie Abbildung 11 zeigt. Die Assoziation von Abbildung 16b genügt dagegen wieder den Kriterien einer linearen Struktur und ist daher als die wahrscheinlichste anzusehen. Das Gitter von Abbildung 16b muß außerdem einen 41-Å-Reflex liefern, dessen Breite von der Größe der linearen Assoziation in Richtung x_2 abhängt.

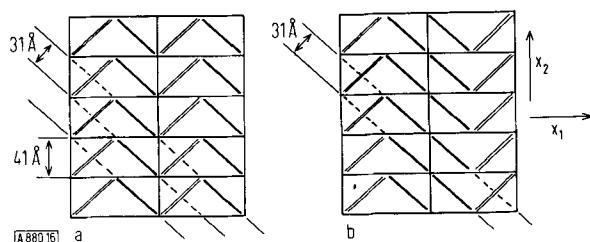


Abb. 16. Zwei Möglichkeiten einer planaren Verteilung von Photosystem-II-Protomeren, die einen 31-Å-Reflex liefern. Struktur b ist als die richtige anzusehen.

Als nächstes haben wir uns mit der Frage der Kopplung von System I mit System II und der mengenmäßigen Relation der beiden Systeme auseinanderzusetzen. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Kopplung nur unter bestimmten Symmetrieverhältnissen erfolgen sollte. Die Mengenanteile der beiden Systeme können entweder durch eine definierte Zahl von verschiedenen Protomeren, d. h. durch Bildung endlicher Assoziationen (Oligomere), oder durch ein bestimmtes Mengenverhältnis der Produktion der Protomere beider Systeme bewerkstelligt werden. Im vorliegenden Fall werden offensichtlich beide Möglichkeiten genutzt. Bei System I wird durch einen erhöhten Aufwand in der Zahl der Protomere eine endliche Struktur erzwungen; die entsprechende Menge des Systems II wird jedoch durch das Produktionsverhältnis festgelegt.

Neben den Röntgen-Kriterien für eine endliche Struktur von System I (breiter 62-Å-Reflex) und eine im Prinzip beliebig große Struktur von System II (scharfer 41-Å-Reflex) kann auch aus den Ergebnissen chemischer Experimente auf eine solche kombinierte Überstruktur geschlossen werden. Die System-I-Oligomere können nämlich aus dem Membranverband isoliert und strukturell charakterisiert werden, während die zurückbleibenden System-II-Protomere sich zu Vesikeln zusammenschließen, d. h. im formalen Sinn unendlich große Strukturen bilden^[31-33]. Röntgenographische Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die System-I-Oligomere Abmessungen von 186 und 164 Å in der x_1 - und x_2 -Dimension besitzen. Außerdem konnte chemisch gezeigt werden, daß das Mengenverhältnis von System-I-Proteinen zu System-II-Proteinen ca. 1:2 beträgt^[31]. Damit sind in Verbindung mit den vorstehend postulierten Symmetrieverhältnissen die Grenzen für die Überstruktur abgesteckt.

Aus den Abmessungen der System-I-Oligomere folgt, daß sie aus insgesamt acht Protomeren bestehen. Damit diese Überstruktur-Oligomere mit den linearen Anordnungen II gekoppelt werden können, sollten sie mit einer zweizähligen transversalen Drehachse ausgestattet sein. Andererseits sind, um System-I-Oligomere dieser Größe bindungsseitig garantieren zu können, mindestens vier Arten Protomere erforderlich. Die Symmetri- und Bindungsbedingungen sind daher miteinander in Einklang. Die Konsequenz dieser Überlegung ist die Überstruktur von Abbildung 17a, die mindestens fünf Arten Protomere enthält, vier in System I und eine in System II (Abb. 17b). Von dieser Überstruktur ist im Röntgen-Experiment ein breiter 62-Å-, ein scharfer 31-Å- und ein sehr scharfer 41-Å-Reflex zu erwarten. Der Pseudowiderspruch in bezug auf die Schärfe der 62- und 41-Å-Reflexe in Richtung x_2 (s. o.) findet damit seine Klärung.

Im Fall einer offenen Tertiärstruktur von Abbildung 9c wären demnach maximal zehn verschiedene Endgruppen für das Gitterprotein zu erwarten. Die Ringstruktur und die „8“-Struktur von Abbildung 9a und 9b würden überhaupt keine Endgruppen erwarten lassen. Wegen der Diskrepanzen in den Aminosäureendgruppen-Bestimmungen ist eine Entscheidung zwischen diesen Alternativen im Augenblick nicht herbeizuführen.

Die prinzipielle Allgemeingültigkeit dieser Überlegungen auch für andere Bio-Membranen wird durch röntgenogra-

phische Untersuchungen der Membran der Retinastäbchen, der Erythrozyten und des Nervenmyelins nahegelegt. Das Gitterprotein der Retinavesikel liefert die gleichen Interferenzen wie sie bei Bakterien (*rhodopseudomonas viridis*) gefunden werden, nämlich 77- und 51-Å-Reflexe^[34]. Erythrozyten geben einen entsprechenden 41-Å-Reflex, der auf eine lineare Struktur in x_2 -Richtung hinweist; vom Nervenmyelin werden Überstrukturreflexe mit Bragg-Abständen von 210 und 130 Å erhalten.

odisch verteilte Bipolarität geschaffen. Das soll heißen: Energieflüsse, Impulse oder Wirkungen, die von den Zentren der Polarität ausgehen, werden in zwei entgegengesetzte Richtungen, also bipolar, propagiert. Auf diese Weise wird eine radiale Energieverteilung, die in diesem Fall Energieverschwendungen bedeuten würde, verhindert. Eine primitive Polarität, wie sie Abbildung 11 repräsentiert, würde einen Energiefluß nur in einer Richtung erlauben, wäre also nachteiliger. Im Fall der komplizierteren linearen Struktu-

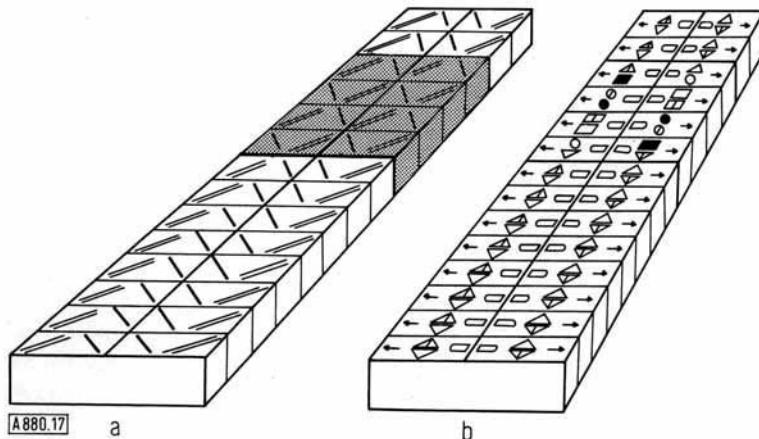


Abb. 17. a) Kombinierte lineare Anordnung von System-I- und System-II-Protomeren, die mit den Röntgen-Beugungsdaten übereinstimmt (41-Å-, 31-Å- und ein 62-Å-Reflex), b) dieselbe Anordnung, wobei die erforderlichen verschiedenen Bindungsorte durch Symbole angezeigt sind.

Die vorstehend beschriebenen Beispiele der Gitterprotein-Anordnungen zeigen die Variationsbreite möglicher Strukturmodifikationen. Sie grenzen aber auch gleichzeitig die prinzipiellen Realisierungsmöglichkeiten ein: Es besteht die Möglichkeit, primitiv-polare Gitter des Typs von Abbildung 11 aufzubauen, es können primitiv-lineare Gittertypen mit zweizähligen Drehachsen des Typs von Abbildung 13b realisiert werden (Retinastäbchen, photosynthetische Bakterien), und es sind komplizierte Gittertypen mit mehreren Protomeren und Oligomer-Assoziationen möglich, die höchst spezialisierten funktionellen Ansprüchen gerecht werden können (Abb. 17) (Photosynthese-Membran höherer Pflanzen). Eine Tatsache scheint jedoch von fundamentaler Bedeutung: Für all diese Gittertypen scheint lediglich ein einziger Typ von Basisprotomer, d. h. ein Typ mit gleicher oder im wesentlichen gleicher Tertiärstruktur, zu genügen. In diesem Zusammenhang gewinnen die bereits angeführten vergleichenden chemischen Untersuchungen des Gitterproteins große Bedeutung, die zeigen, daß die Gitterproteine von Membranen verschiedener Objekte lediglich minimale Abweichungen in der Primärstruktur aufweisen und durch Einwirkung von Proteasen oder Detergentien auf gleiche Basispeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 5000 bzw. auf Basisprotomere ($M \approx 10000$) mit verschiedenem Assoziationsgrad abgebaut werden können^[20-24, 35-37].

Wie steht es nun mit der geforderten tangentialen Polarität? Die Einführung der Polarität in die anisotropen (linearen) homogenen Strukturelemente geschieht offenbar durch Assoziation funktioneller Proteine. Dadurch wird peri-

ren aus verschiedenen Oligomeren sind auch die Phasenübergänge zwischen den Oligomeren Orte starker Polarität, die Flußrichtungen festlegen können.

Eine weitere Eigenschaft von großer Bedeutung für den Aufbau von Membranen ist die Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren innerhalb der 2d-Gitterprotein-Partikel. Aus der Gauß-Synthese der Struktur des Querschnitts des Gitterproteins geht hervor, daß die Ringzentren hydrophobe Bereiche repräsentieren^[19]. Ferner sollte der masseärmere Strang des Ringes zumindest überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehen. Diese letzte Aussage ergibt sich aus dem Sandwich-Verhalten des Strukturproteins in wässriger Lösung. Diese spezielle Verteilung der Aminosäuren gibt eine Erklärung für die in Abschnitt 3.3.2 zu diskutierende Eigenschaft, daß Lipide nur auf einer Seite der Gitterproteinschicht angekoppelt sind. Schließlich muß noch einmal auf die erstaunliche Masse-Verteilung des Proteins in der Gitterprotein-Untereinheit hingewiesen werden. Der Eindruck ist, daß die Untereinheit – und damit auch die Proteinschicht – möglichst von Proteinmasse freigehalten werden soll. Eine solche Struktur eröffnet interessante Möglichkeiten der Protein-Lipid-Kopplung und damit auch für die Lipidverteilung oder Lipidüberstruktur.

2.3. Die Protein-Lipid-Kopplung

Die Frage der Protein-Lipid-Kopplung in biologischen Membranen führt letzten Endes zur Frage nach der Struktur des Querschnitts biologischer Membranen. Wesent-

liche experimentelle Fortschritte auf diesem Gebiet wurden erst in den letzten zehn Jahren verzeichnet. Die erste spekulativen Vorstellung war die einer symmetrischen Struktur des Membranquerschnitts^[38]. Von dieser Membrankonzeption kann jedoch biophysikalisch gesehen keinerlei Aktivität ausgehen, d. h. sie repräsentiert die biologisch ungünstigste Membran. In der Tat weisen unsere röntgenographischen Untersuchungen an drei verschiedenen Membranen auf asymmetrische Membranquerschnitte hin; allerdings ist der Grad der Asymmetrie von Membran zu Membran verschieden. Die stärkste Asymmetrie scheint in der Photosynthese-Membran höherer Pflanzen und in der Nervenmyelinstruktur verwirklicht zu sein. Dagegen weisen die Ergebnisse, die von den Stäbchenaußensegmenten der Retina erhalten wurden, auf eine alternativ-asymmetrische Membranquerschnittskonstruktion hin. Bei Erythrocyten ist der gleiche Membrantyp zu erwarten.

Eine grundsätzliche Asymmetrie kann bei allen bisher untersuchten Membranen durch ein im Prinzip einfaches Experiment nachgewiesen werden, genauer gesagt, durch den Vergleich von röntgenographischen Ergebnissen mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Membransystemen zeigen, daß Membranen immer in geschlossener Form vorliegen, d. h. Vesikel bilden. In abgeflachten Vesikeln (z. B. Photosynthese-Membran, Membran der Retinastäbchen, Myelin-Membran) sind demnach zwei Membranen spiegelsymmetrisch angeordnet und bilden in dieser Form die Identitätsperiode im Membransystem (Abb. 18a).

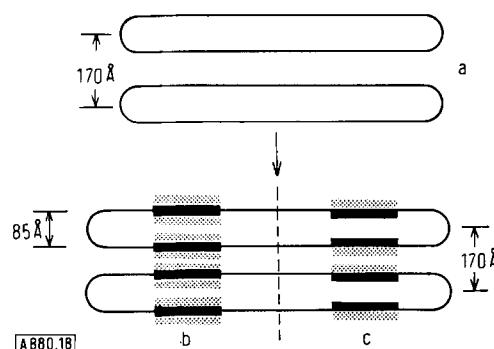


Abb. 18. Zusammenhang zwischen elektronenmikroskopischer Periode und Röntgen-Periode in laminaren Systemen. a) Elektronenmikroskopisch ermittelter Querschnitt einer abgeflachten Vesikel, b) Röntgen-Periode im Fall einer symmetrischen Membran, c) Röntgen-Periode im Fall einer asymmetrischen Membran.

Der Röntgen-Strahl „sieht“ Elektronendichteprojektionen dieser Vesikeln, z. B. die hier interessierende Elektronendichteprojektion auf die Stapelachse (Achse senkrecht zur Flächenebene). Dies bedeutet: Wird die elektronenmikroskopische mit der röntgenographischen Identitätsperiode verglichen, so würde für den Fall, daß die Einzelmembran symmetrisch gebaut wäre, die röntgenographische Identitätsperiode die Hälfte der elektronenmikroskopisch sichtbaren Periode betragen (Abb. 18 b). Im Falle asymmetrischer Membranen jedoch wären röntgenographische und elektronenmikroskopische Perioden gleich groß (Abb. 18 c).

Dieser Vergleich kann am besten mit teilweise dehydratisierten Membransystemen (bis zu 30% H₂O) abgeflachter

Vesikeln durchgeführt werden, da hier die Identitätsperiode etwa der einfachen oder der doppelten Membran entspricht. Solche Experimente sind bei Chloroplasten höherer Pflanzen, den Membranen der Sehstäbchen und den Nervenmyelin-Membranen möglich. Bei diesen drei Membranen sind die röntgenographisch ermittelten Perioden den elektronenmikroskopisch gefundenen vergleichbar oder anders gesagt, gleich oder größer als der doppelte Durchmesser einer Einzelmembran. (Bei Membranen, die Kugelvesikel bilden, z. B. bei Erythrocyten und photosynthetischen Bakterien, ist der Sachverhalt komplizierter. Darauf wird in Abschnitt 2.3.1 näher eingegangen.)

Allein diese Ergebnisse genügen bereits für die Aussage, daß der Querschnitt zumindest dieser Membranen asymmetrisch aufgebaut ist. Abgesehen von dieser generellen Aussage über die Asymmetrie bestehen jedoch große Unterschiede in den Abmessungen der Periode oder der Membrandicke. Bei Chloroplasten beträgt die Periode im dehydratisierten Zustand 150–170 Å, bei den Sehstäbchen 210–230 Å und bei Nervenmyelin 130–150 Å. Auf die Bedeutung dieser Unterschiede kommen wir zurück bei der quantitativen Diskussion der Membranquerschnitte. Diese drei Membranen sind für die Variationsmöglichkeiten bei der Konstruktion von Membranquerschnitten charakteristisch. Wir werden zunächst die Struktur des Querschnitts der Photosynthese-Membran, der am stärksten asymmetrischen Membran, diskutieren.

2.3.1. Die Struktur des Querschnitts der Photosynthese-Membran

Über die Struktur der Photosynthese-Membran wurde bereits ausführlich berichtet^[14]. Wir können uns hier auf einige wesentliche Gesichtspunkte beschränken. Die Photosynthese-Membran höherer Pflanzen besteht aus drei Schichten, die sich im röntgenographisch ermittelten Elektronendichtediagramm durch drei verschiedene Elektronendichten auszeichnen (Abb. 19 a). Die Schicht höchster Dichte konnte als Proteinschicht, die Schicht mittlerer Dichte als monomolekulare Lipidschicht und die Schicht niedrigster Dichte als Porphyrinringschicht des Chlorophylls identifiziert werden (Abb. 19 b). Die SpiegelEbene zwischen den beiden Membranen ist so angeordnet, daß die Proteinschichten die äußeren Schichten der Vesikel (Thylakoide) bilden.

Für die Diskussion über die Protein-Lipid-Kopplung (Abschnitt 2.3.2) sind folgende Gesichtspunkte entscheidend:

1. Sowohl Chlorophyll a als auch b ist mit der Hauptkomponente der Chloroplastenlipide, nämlich MGD, das etwa zwei Drittel der Gesamtlipide ausmacht, nicht mischbar.
2. Dasselbe Verhalten zeigt Phytol.
3. Beim Aufbrechen der Membran mit Detergentien bleibt der größte Teil des Chlorophylls mit dem Protein assoziiert^[31].
4. In den Chlorophyll-Protein-Komplexen sind die Lamellen um ca. 12 Å dicker als reine Proteinschichten^[31].

Aus diesen und hier nicht näher auszuführenden Ergebnissen folgt, daß die Chlorophyllmoleküle sehr wahrscheinlich über die Phytolkette im Gitterprotein verankert sind,

wobei die Porphyrinringe einseitig aus der Proteinschicht herausragen. Der Kontakt zwischen Protein und Lipid erfolgt daher über die Porphyrinringe des Chlorophylls, die

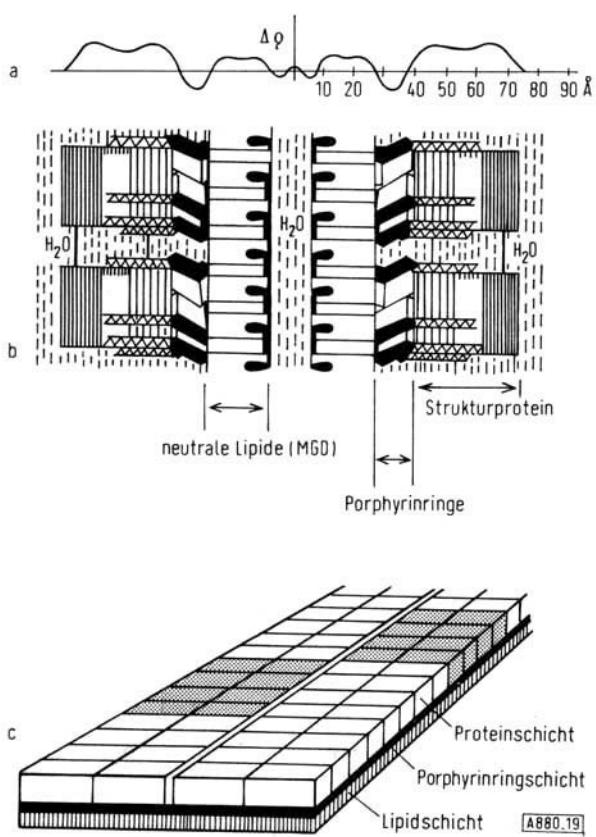


Abb. 19. Struktur der photosynthetischen Membran höherer Pflanzen.
 a) Elektronendichte-(p-)Verteilung des Querschnittes eines Vesikels (Thylakoids) in vivo, b) Interpretation, c) Flächenansicht einer einzelnen asymmetrischen Membran.

offenbar partiell in die Bereiche der stark ungesättigten Fettsäuren der Lipidschicht eintauchen^[14]. Einen Überblick über die Gesamtstruktur der Photosynthese-Membran gibt Abbildung 19c.

2.3.2. Allgemeines zur Protein-Lipid-Kopplung

Eine Protein-Lipid-Kopplung mit Hilfe von Chlorophyll, wie sie vorstehend beschrieben wurde, ist bei anderen Membranen nicht möglich. Es erhebt sich aber die Frage, ob diese Kopplung einzigartig ist oder ob es sich hier um einen Spezialfall eines allgemeinen Protein-Lipid-Kopplungsprinzips handelt. Auffallend ist, daß die meisten bisher bekannten Membranen einen konstanten Anteil von $30 \pm 5\%$ PC enthalten^[6]. Bei der Photosynthese-Membran sind lediglich 1–2% PC nachweisbar. Die übrigen Phospholipide variieren, je nach Funktion, von Membran zu Membran stark. Die Photosynthese-Membran macht auch hier wieder eine Ausnahme: Die Phospholipide sind weitgehend durch Galaktolipide (MGD und DGD) ersetzt. Berücksichtigt man ferner, daß PC unter den Phospholipiden die geringste Konformationsvariabilität besitzt, so rückt es als Anwärter für eine spezielle Strukturaufgabe an erste Stelle.

Aufgrund dieser Gesichtspunkte und der experimentellen Erfahrungen an der Photosynthese-Membran wurde ein

allgemeines Kopplungsprinzip in biologischen Membranen postuliert^[14]: PC übernimmt danach im allgemeinen in Bio-Membranen die Funktion des Chlorophylls, d. h. PC koppelt zwischen Proteinen und den übrigen Lipiden. Die Kopplung sollte in der Weise erfolgen, daß die Fettsäuren des PC in hydrophobe Wechselwirkung mit den Peptidketten der Proteinschicht treten und daß die Cholingeruppe in den Fettsäurebereich der Lipide eindringt (Abb. 20a). Die Stabilität dieser Kopplungsart wird dadurch gewährleistet, daß einerseits eine rein hydrophobe Kopplung zwischen Fettsäuren und Proteinen besteht, andererseits eine polare Wechselwirkung zwischen der Cholingeruppe des koppelnden PC und den polaren Gruppen der gekoppelten Lipide hergestellt wird. Optimal wird diese polare Bindung dadurch, daß die beiden wechselwirkenden polaren Gruppen in die hydrophobe Fettsäurephase der monomolekularen Lipidschicht eingebettet sind (Abb. 20b). Dieses Kopplungsprinzip soll hier in dieser Arbeit insoweit ergänzt werden, als in manchen Membranen wahrscheinlich Sterine partiell die Rolle von PC übernehmen können.

2.3.3. Die Struktur des Querschnitts der Nervenmyelin-Membran

Für die Berechnung der Elektronendichte-Verteilung des Nervenmyelin-Membranquerschnittes wurden in der Vergangenheit von verschiedenen Autoren verschiedene Phasenkombinationen gewählt; dementsprechend erhielten

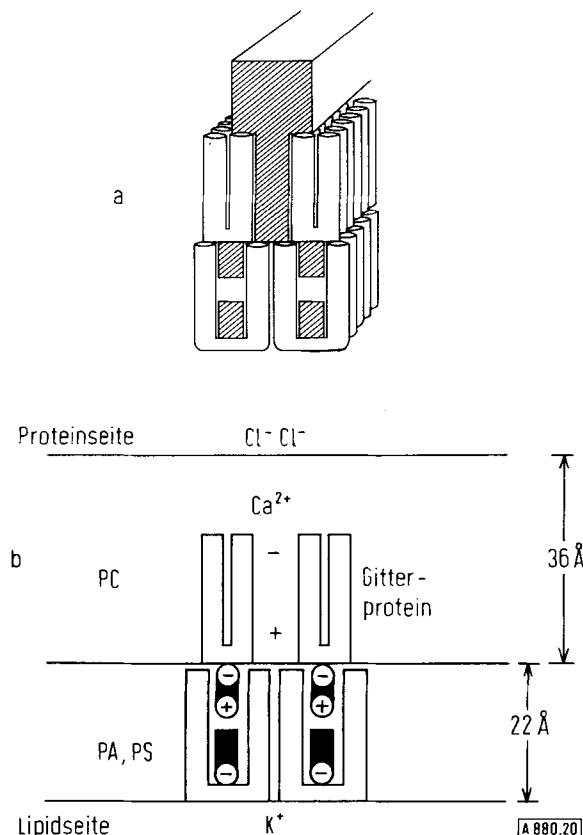


Abb. 20. Generelles Konzept der Kopplung von Gitterproteinen und Lipiden durch PC. a) Räumliche Situation an einem Ring der Unter-
einheit (vgl. Abb. 8), b) Ladungsverteilung innerhalb solch einer Kopp-
lungseinheit.

sie auch verschiedene Elektronendichte-Verteilungen (Zusammenfassung: ^[39]). Im letzten Jahr führten wir ebenfalls eine Elektronendichteberechnung des Nervenmyelin-Membranquerschnittes durch ^[40]. Die von uns angewendete Auswertungsmethode (Q_0 -Methode) unterscheidet sich jedoch grundlegend von der Methode der anderen Autoren. Unsere Q_0 -Methode, die für die Strukturuntersuchung der Photosynthese-Membran entwickelt wurde ^[14], liefert in direkter Vorwärtsrechnung aus der Streuintensität (nicht wie üblich aus der Streuamplitude) eindeutige Elektronen-

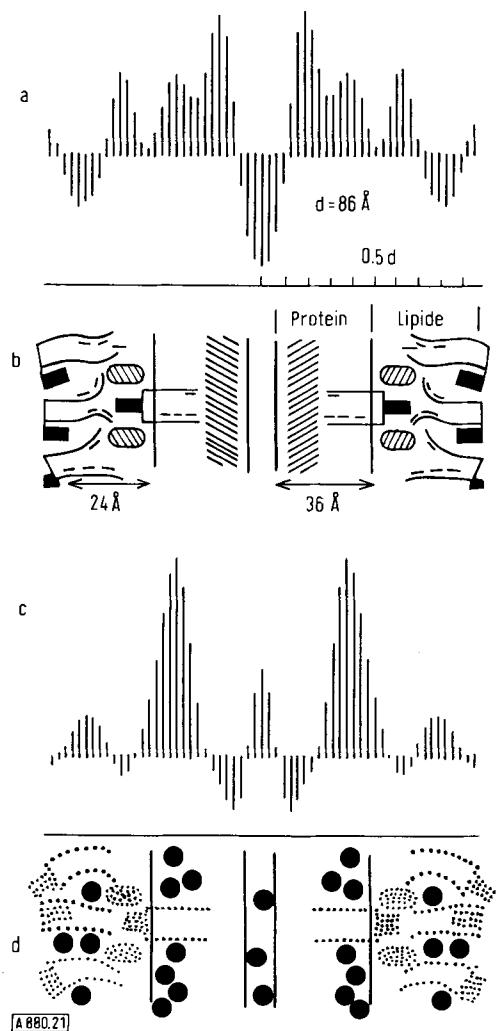


Abb. 21. Struktur der Myelin-Membran. a) Computer-Diagramm der Elektronendichte-(p)-Verteilung des Querschnitts eines Myelin-Membran-Paars, b) Interpretation: Jede Membran besteht aus einer inneren Proteinschicht und einer äußeren Lipidschicht. Die Kopplung erfolgt durch PC und Sterine (⊖). Zwischen den Proteinschichten sowie zwischen den Lipidschichten eines Membran-Paars muß ein Wasser-Zwischenraum angenommen werden, c) Computer-Diagramm der Os-Verteilung in einem Myelin-Membran-Paar, das mit OsO_4 behandelt wurde, d) Interpretation der Os-Verteilung von c). Die eingelagerten Os-Atome markieren die beiden $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindungsebenen in jeder Membran.

dichte-Verteilungen. Die Elektronendichte-Verteilung des Nervenmyelin-Membranquerschnittes *in vivo* ist in Abbildung 21 a wiedergegeben.

Unsere Interpretation dieser Elektronendichte-Verteilung ist in Abbildung 21 b dargestellt. Gemäß dieser Vorstellung ist das Symmetriezentrum der Elektronendichteprojektion unmittelbar flankiert von den Profilen zweier spiegelsymmetrisch angeordneter Gitterproteinschichten. Im masse-

ärmeren äußeren Teil der Proteinschicht sind die Fettsäuren von PC durch hydrophobe Wechselwirkung verankert. Die Choleringruppen ragen aus der Proteinschicht heraus und stehen in polarer Wechselwirkung mit Sterinen, die an der Außenseite der Proteinschichten deponiert sind. Darauf folgt eine monomolekulare Lipidschicht, in deren Fettäurebereich die Choleringruppen und die Sterine partiell eintauchen. Diese Struktur entspricht im Prinzip der Struktur der Chloroplasten-Thylakoide, wenn die verschiedenen Chlorophyll-Typen durch PC und Sterine ersetzt werden. Ein grundlegender Unterschied besteht jedoch: Während in der Myelin-Membran die Spiegelebene zwischen den beiden Proteinschichten angeordnet ist, wird sie im Falle der Chloroplasten-Thylakoide zwischen den beiden Lipidschichten gefunden. Wir werden auf diesen Sachverhalt in Abschnitt 3.1 zurückkommen.

Gemäß unserem Membrankonzept des Nervenmyelins besitzt jede Membran zwei $\text{C}=\text{C}$ -Bindungsebenen. Die erste befindet sich innerhalb des Gitterproteins; sie besteht aus den $\text{C}=\text{C}$ -Bindungen der ungesättigten Fettsäuren des PC. Die zweite ist die Ebene der $\text{C}=\text{C}$ -Fettsäurebindungen in der eigentlichen Lipidschicht. Eine experimentelle Überprüfung unseres Membrankonzepts wäre denkbar, wenn es gelingen würde, diese Doppelbindungsebenen chemisch zu markieren, etwa mit OsO_4 . Eine Differenz-Fourier- oder Differenz- Q_0 -Auswertung würde dann direkt die Os-Verteilung in der Membran ergeben. Solche systematische Einlagerungsversuche wurden erstmals von Parsons und Akers ^[39] unternommen. Die Fourier-Auswertung dieser Experimente von Harker ^[41] ergibt die gleiche Os-Verteilung wie die von uns durchgeführte ^[40] Auswertung mit der Q_0 -Methode (Abb. 21 c). Jede Membran besitzt danach zwei Ebenen verschieden hoher Os-Konzentration und eine Os-Anreicherung zwischen den Membranen. Am besten zugänglich für OsO_4 -Moleküle ist die $\text{C}=\text{C}$ -Bindungsschicht innerhalb der Proteinschicht, da das Gitterprotein bis zu 70% hydratisiert ist. Die Anlagerung der OsO_4 -Moleküle an diese Doppelbindungen kann in wäßrigem Milieu erfolgen. Das entsprechende Os-Signal im Diagramm von Abbildung 21 c ist daher weitaus dominant.

Anders ist die Situation bei der zweiten Doppelbindungs- schicht. Diese Doppelbindungen sind in eine hydrophobe Umgebung inkorporiert, so daß ein Eindringen und Reagieren, d. h. eine Markierung mit OsO_4 -Molekülen, viel schwieriger ist. Das entsprechende Os-Maximum in Abbildung 21 c ist daher wesentlich kleiner. Die gefundene Os-Verteilung im Membranquerschnitt ist demnach mit unserem Membrankonzept des Nervenmyelins und folglich auch mit unserer Vorstellung über die Protein-Lipid-Kopplung in Bio-Membranen in Einklang.

Eine Fourier-Transformation der Elektronendichte-Verteilungen von Abbildung 21 a und 21 c liefert die entsprechenden Amplitudenfunktionen. Daraus folgt ein Phasensatz von $+ - - -$ für die fünf Reflexamplituden des Nervenmyelins *in vivo* und ein Phasensatz von $+ - + +$ für die fünf Reflexamplituden der Os-Verteilung. Der spiegelsymmetrische Phasensatz zu dem vorstehend gegebenen Phasensatz für Nervenmyelin *in vivo*, nämlich $- + + +$, wurde bereits 1963 von Moody ^[42] als einer von zwei möglichen Phasensätzen angegeben. Für die Os-Verteilung fin-

det *Harker*^[4,1] den gleichen Phasensatz wie wir. Für die Phasenverteilung *in vivo* gibt *Harker* denselben Phasensatz an wie für die Os-Verteilung. Es darf angemerkt werden, daß diese Phasensätze, die unseren eindeutig bestimmten Phasensätzen am nächsten kommen oder mit ihnen übereinstimmen, auf der Basis systematisch-experimenteller Phasen-Bestimmungsmethoden ermittelt wurden.

2.3.4. Die Definition der Basis-Membran

Die Berechnung der Elektronendichte-Verteilung der Querschnitte der Photosynthese-Membran und der Myelin-Membran führte auf total asymmetrische Strukturen. Aufgrund der speziellen Struktur des Querschnitts der Photosynthese-Membran konnte ein allgemeines Kopplungsprinzip in Bio-Membranen postuliert werden, und schließlich konnte dieses Prinzip durch Röntgen-Untersuchungen der Myelin-Membran gestützt werden. Beziehen wir in diese Strukturvorstellung unsere Kenntnisse über die Proteine und Lipide sowie die Ergebnisse vergleichender chemischer Untersuchungen mit ein, so können wir eine Basis-Struktur der Bio-Membranen definieren.

Als Basis-Membran soll diejenige Struktur einer Bio-Membran bezeichnet werden, die lediglich aus 2d-Gitter-Prote-

Fläche von $42 \cdot 93 \text{ \AA}^2$ bleiben dann je 40–50 ungekoppelte Lipidmoleküle übrig. Für sie sollte eine der in Abbildung 2 aufgeführten Micellstrukturen gefordert werden. Es ergeben sich demnach je nach Lipidzusammensetzung folgende Möglichkeiten für die Struktur des Querschnitts der Basis-Membran (Abb. 22):

- Basis-Membran mit Lipidzwischenbereichen symmetrischer monomolekularer Struktur und homogener p_{ex} -Konformation. Hierfür kommen PA, PG und PE in Frage (Abb. 22a).
- Basis-Membran mit Lipidzwischenbereichen symmetrischer bimolekularer Struktur und homogener p_{ex} -Konformation. Diese Micellstruktur kann von PA, PS und PI gebildet werden (Abb. 22 b).
- Basis-Membran mit Lipidzwischenbereichen symmetrischer bimolekularer Struktur und homogener p_{in} -Konformation. Dieser Micelltyp kann von PE allein und von Mischungen aus PA, PS und PE gebildet werden (Abb. 22c).
- Basis-Membran mit Lipidzwischenbereichen hexagonaler Struktur. Diese Konfiguration kann von PE allein oder von Mischungen aus PE mit PA und PS realisiert werden (Abb. 22 d).

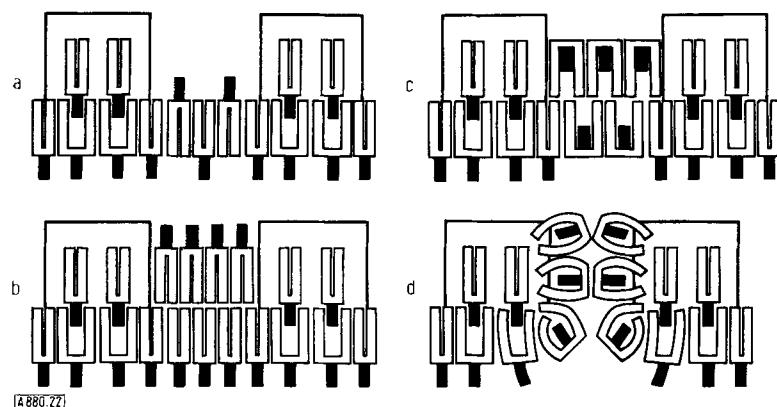


Abb. 22. Mögliche Querschnitte der Basis-Membran mit unterschiedlichen Lipidzwischenbereichen (s. Text).

inen und den Membranlipiden besteht. Die Struktur ihres Querschnitts ist im Bereich der Protein-Lipid-Kopplung total asymmetrisch, in Lipidbereichen symmetrisch. Ihre Flächenstruktur wird durch die zweidimensionale Gitterstruktur des Strukturproteins festgelegt, die Kopplung zwischen Strukturprotein und Lipiden erfolgt über PC.

Auf einer Fläche von $42 \cdot 93 \text{ \AA}^2$, die von einer Strukturprotein-Einheit überspannt wird, haben je nach Konformation 70–80 Lipidmoleküle Platz. Für die Kopplung dieser Moleküle mit Protein stehen ca. 30 PC-Moleküle zur Verfügung, pro Ring des Strukturproteins also ca. 15, pro Ringseite ca. 7. Nebeneinander angeordnet können diese sieben Lipidmoleküle entweder eine Strecke von ca. 35 oder 70 Å populieren, je nachdem, ob die Fettsäuren eine einfache oder doppelte Kette bilden. Da ein Strukturproteinring einen Durchmesser von ca. 30 Å besitzt, ist die Doppelreihenanordnung wahrscheinlicher. Es ergibt sich dann eine strukturelle Situation, wie sie Abbildung 20a zeigt. Ein PC-Molekül koppelt je ein anderes Lipidmolekül. Auf einer

Welcher Micelltyp sich bildet, hängt davon ab, welcher pH-Wert in den wässrigen Phasen der Membranaußenseiten vorliegt, ob CO_2 oder Hydrogencarbonat vorhanden ist und schließlich auch davon, welche Kationen zur Verfügung stehen (z. B. Ca^{2+}). Damit haben wir aber bereits die Frage der Beeinflußbarkeit der Membranstruktur durch die Außenphasen tangiert. In Abschnitt 3 sollen diese funktionellen Gesichtspunkte von Bio-Membranen eingehender diskutiert werden.

3. Die Funktions-Membran

Bevor wir eigentliche Funktionen von Bio-Membranen diskutieren können, muß die Basis-Membran strukturell zur Funktions-Membran erweitert werden. Für diese Erweiterung bestehen drei Möglichkeiten: die Assoziation von funktionellen Proteinen, die Ankopplung anderer, nicht proteinartiger Substanzen und schließlich die direkte

Bindung von prosthetischen Gruppen (z. B. Hämgruppen) an das Gitterprotein, wobei modifiziertes oder konvertiertes Gitterprotein entsteht.

3.1. Die Struktur der Funktions-Membran

Die Kategorie von Substanzen, die lose an die Basis-Membran assoziiert sind, umfaßt in erster Linie spezielle Funktionsproteine, z. B. die ATPasen, die für den aktiven Transport von Na^+ und Ca^{2+} unabdingbar sind, oder das Rhodopsin der Retinastäbchen-Membran. Einige Beispiele nicht proteinartiger Substanzen dieser Kategorie sind NADP, ADP, ATP und Acetylcholin. Wir vermuten, daß zur Gruppe der membrangebundenen funktionellen Proteine konvertierte Gitterproteine gehören (Abb. 23 a). Es ist sehr wahrscheinlich, daß hierzu ein großer Teil der Redox-Enzyme zu zählen ist, z. B. Cytochrom f und b der Photosynthese-Membran.

Es soll an dieser Stelle angemerkt werden, daß die Mischung aus reinem Gitterprotein, konvertiertem Gitterprotein und teilweise festgekoppelten anderen Proteinen bisher als „Strukturprotein“ bezeichnet wurde. Die konvertierten Gitterproteine sollten sich nicht wesentlich vom normalen Gitterprotein unterscheiden, lediglich in der Primärstruktur sind Abweichungen zu erwarten. Es ist daher nicht überraschend, daß die „Strukturproteine“ verschiedener Membranen ähnliche Aminosäurezusammensetzungen aufweisen, daß sie in der gleichen Weise chemisch fragmentiert und teilweise auf die gleiche Peptidgröße abgebaut werden können. Bis jetzt wurden die Strukturproteine der Photosynthese-Membran^[20-23], der Mitochondrien^[24], des Nervenmyelins^[36, 37] und der Erythrocyten^[24, 35] mit diesen Methoden analysiert.

Die assoziierten Funktions-Proteine der ersten Gruppe können an die Basis-Membran auf zweierlei Weise angekoppelt werden: an der Proteinseite (Abb. 23 b) und an der Lipidseite (Abb. 23 c). Die Ankopplung an der Proteinseite kann entweder proteinspezifisch oder lipidspezifisch erfolgen, dagegen besteht auf der Lipidseite lediglich die Möglichkeit einer lipidspezifischen Kopplung von Membranaddenden. Die Lipidspezifität wird durch die Lipidzusammensetzung der Membran bestimmt und dadurch, daß nur eine Ankopplung an symmetrische Lipidmicellen in den Basismembran-Zwischenbereichen vorstellbar ist. Diese Lipidbereiche werden durch die Ankopplung ebenfalls in asymmetrische Membran-Bereiche umgewandelt. Das Resultat dieser Ankopplung zusätzlicher Addenden (z. B. Proteine) an die Basis-Membran ist eine total asymmetrische Funktions-Membran (Abb. 23 a und 23 b), eine alternierend asymmetrische Membran (Abb. 23 c) oder eine Mischung beider Membrantypen.

Bei der Ankopplung eines Proteins auf der Lipidseite wird man ein Kopplungsmolekül, vergleichbar dem PC oder den Sterinen im Falle der Strukturprotein-Kopplung, erwarten dürfen. Vermutlich sind diese Kopplungsmoleküle aber bifunktionell (z. B. Chlorophyll), d. h. außer der Kopplungsfunktion übernehmen sie eine Teilfunktion des Membranprozesses selbst, der durch das angekoppelte Protein charakterisiert ist. Ein typisches Beispiel dieser Art könnte das ATPase-System sein, das eine entscheidende Rolle beim aktiven Transport spielt. Es ist denkbar, daß ATP das koppelnde Molekül zwischen Lipiden und ATPase ist und gleichzeitig als Energiedonor fungiert. Mischungsexperimente von ATP und ADP mit Lipiden geben jedenfalls hierfür einen Hinweis^[15].

Ein Beispiel für die Ankopplung auf der Proteinseite finden wir in den Redox-Enzymen der Elektronen-Transportkette der Photosynthese und der Atmung. Die Photosynthese-Membran ist eine typische, total asymmetrische Funktions-Membran (Abb. 19, 23 a, 23 b), ebenso die Myelin-Membran, jedoch nicht die eigentliche Axon-Membran. Diese beiden Membranen wurden bereits besprochen, sie sind lediglich im Sinne der Abbildungen 23 a und 23 b zu erweitern. Zu ergänzen wäre die Diskussion einer typisch alternierend asymmetrischen Funktions-Membran. Unsere Untersuchungen an der Membran der Retinastäbchen haben gezeigt, daß sie als repräsentativ für diesen Membrantyp anzusehen ist.

Die direkte Vorwärtsrechnung der Elektronendichte-Verteilung des Querschnittes der Retinastäbchen-Membran über die Q_0 -Funktion^[24] ergibt die Verteilungsfunktion von Abbildung 24 a. (Kürzlich wurde ebenfalls eine Fourier-Synthese der Elektronendichte-Verteilung der Membran der äußeren Segmente der Retinastäbchen von Blaurock und Wilkins^[43] gerechnet. Dabei wurde eine solche Phasenkombination gewählt, daß eine möglichst symmetrische Struktur des Querschnitts (Unit-Membran) erhalten wurde. Weitere Diskussion: ^[34]) Das Symmetriezentrum des Elektronendichtediagramms von Abbildung 24 a ist unmittelbar flankiert von zwei Elektronendichtemaxima, darauf folgen Elektronendichteminima, und schließlich nimmt die Elek-

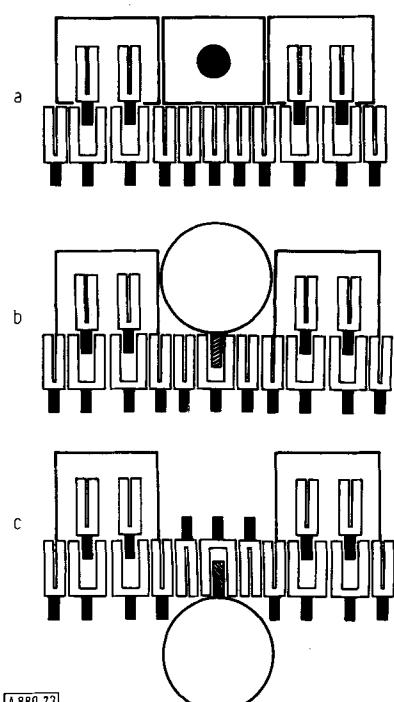


Abb. 23. Drei Möglichkeiten für die Anlagerung von Funktionsproteinen an die Basis-Membran. a) Umwandlung einer Gitterprotein-Untereinheit durch Bindung einer prosthetischen Gruppe (●), b) Kopplung eines „anderen“ Proteinkomplexes an die Proteinseite der Membran durch ein Kopplungsmolekül (■) oder durch reine Protein-Wechselwirkung, c) Kopplung eines „anderen“ Proteins an die Lipidseite der Membran durch ein Kopplungsmolekül.

tronendichte einen mittleren Wert an und bleibt konstant bis zum Rande der Gitterzelle. Diese Elektronendichte-Verteilung ist nach unserer Meinung so zu verstehen, wie es in Abbildung 24b illustriert ist. Im Gegensatz zum Chlo-

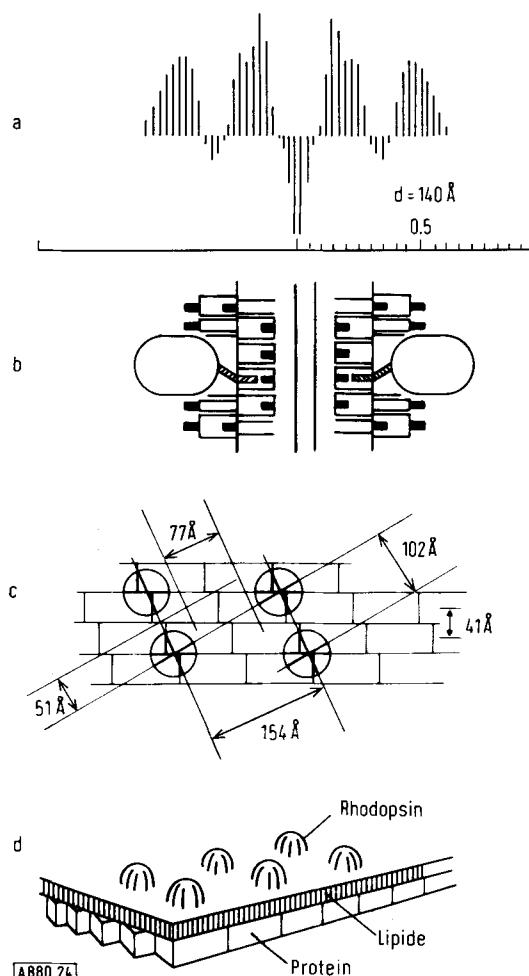


Abb. 24. Struktur eines Membran-Paares eines Retinastäbchen-Außensegments. a) Computer-Diagramm der Elektronendichte- (ρ) -Verteilung des Querschnitts, b) Interpretation: Auf zwei innere Gitterproteinschichten folgen zwei Lipidschichten nach außen hin. Die Rhodopsin-Moleküle sind auf der Außenseite der Lipidschicht angeordnet (Kopplung möglicherweise über Retin), c) Flächenverteilung des Gitterproteins kombiniert mit einer Gitterüberstruktur des Rhodopsins, d) Gesamtansicht der Membran.

roplasten-Thylakoid (aber in Analogie zur Myelin-Struktur) bilden die Gitterproteinschichten die innersten beiden Schichten der Retinastäbchen-Membran, nach außen flankiert von einer monomolekularen Lipidschicht. Außen auf die Lipidschicht aufgesetzt vermuten wir die Rhodopsin-Moleküle, die zusammen mit der wäßrigen Phase den Bereich konstanter mittlerer Elektronendichte bilden.

Die Konzeption, daß die Rhodopsin-Moleküle außen auf der Lipidschicht angeordnet sind, wird durch folgenden Sachverhalt gestützt: Die Membran der Retinastäbchen besitzt zwei verschiedene Gitter innerhalb der Membranfläche^[34]. Ein Gitter hat Netzebenenabstände von 51 und 77 Å, das andere solche von 77, 102 und 154 Å. Das zweite Gitter repräsentiert ein Überstrukturgitter des ersten (Abb. 24c). Das erste Gitter war bereits bei photosynthetischen Bakterien gefunden worden und wurde in Abschnitt 2.2 als „2d-Gitter-Protein“ charakterisiert. Es tritt in den Retina-Präparaten immer dann auf, wenn das Überstruk-

turgitter abgekoppelt wird. Die Abkopplung des Rhodopsin-Überstruktur-Gitters kann entweder durch Lichtinduktion oder durch Maßnahmen erfolgen, die die Lipidschichtstruktur beeinflussen. Das Rhodopsin-Gitter wird offenbar indirekt durch das Gitterprotein auf der gegenüberliegenden Lipidseite festgelegt (Abb. 24d). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den Resultaten von Blasie et al., die immunologisch nachweisen konnten, daß die Rhodopsin-Moleküle auf der Außenfläche der Membran der Retinastäbchen angeordnet sind^[44]. Diese Membran kann daher als alternierend asymmetrische Membran klassifiziert werden (Abb. 23c). Der Vollständigkeit halber soll angemerkt werden, daß die Elektronendichte-Verteilung von Abbildung 24a einem Phasensatz von + - - - - für die ersten sieben Reflexamplituden entspricht.

3.2. Der Kollaps von Funktions-Membranen

Eine Erscheinung, die wichtige Hinweise auf die thermodynamische Stabilität und damit letzten Endes auf die Struktur von Funktions-Membranen gibt, ist der Kollaps der Funktions-Membran. Dieses Phänomen ist im Grunde genommen schon vor etwa zehn Jahren experimentell nachgewiesen worden, wurde als solches aber nicht erkannt. Durch die Untersuchung der Retina-Membran wurden die Zusammenhänge erkennbar. Es handelt sich hier um das Phänomen, daß insbesondere Membranen von kugelförmigen Vesikeln (z. B. Erythrocyten^[45], photosynthetischen Bakterien^[46], z. T. auch Mitochondrien^[47]), aber auch von abgeflachten Vesikeln wie Retinastäbchen^[34] im partiell hydratisierten Zustand (20–30% H₂O) im Röntgen-Experiment einen (58 ± 2 Å)-Reflex geben, der häufig mit einem sehr schwachen (116 ± 4 Å)-Reflex gekoppelt ist. Es muß sich also um ein Strukturmerkmal handeln, das diesen sehr verschiedenen Membranen gemeinsam ist.

Diese Reflexe treten bei den drei erstgenannten Membranen – wenn sie durch Antrocknen auf einem Objekträger orientiert werden – am Meridian auf, d. h. sie sind Streuphänomene im Sinne einer Membranstapelung. Die quantitative Analyse der Streudiagramme der photosynthetischen Bakterien *rhodopseudomonas sphaeroides* durch Pape^[48] ergab, daß die lamellare Basiseinheit aus einer 116 Å dicken Doppelschicht besteht, deren beide asymmetrische Subschichten spiegelsymmetrisch angeordnet sind.

Unsere Untersuchungen mit angetrockneten orientierten Sehstäbchen der Retina^[34] führten zu einem zunächst merkwürdig erscheinenden Ergebnis: Es wurde auch hier wieder der 58-Å-Reflex gefunden, bemerkenswert dabei war aber, daß dieser 58-Å-Reflex von der Flächenstruktur der Sehstäbchen herrühren mußte, d. h. die Streueffekte waren gegenüber den entsprechenden Reflexen anderer Membranen um 90° gedreht, wurden also am Äquator registriert.

Um diese Ergebnisse interpretieren zu können, müssen wir zunächst ein wenig vom eigentlichen Problem abschweifen. Die erste Vorstellung einer Membran auf der molekularen Ebene war die einer symmetrischen Membran. Es wurde intuitiv die stabilste Membranform postuliert^[38]. Dieses Stabilitätsprinzip wird z. B. bei der Photosynthese- und Myelin-Membran realisiert, allerdings nicht mit einer einzi-

gen Membran, sondern durch spiegelsymmetrische Anordnung zweier asymmetrischer Membranen, dem Thylakoid. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß sich diese beiden Membransysteme beim Dehydratisieren nicht grundsätzlich ändern.

Anders ist die Situation bei Membransystemen, die Kugel-vesikel bilden, oder allgemeiner formuliert bei Membranen, in denen die Lipidschichten beim Dehydratisieren keine spiegelsymmetrische Anordnung einnehmen können, die sich so nicht stabilisieren können. Diese Formulierung trifft auch auf die Retina-Vesikel zu. Bei Kugelvesikeln wird der Lipidkontakt zweier Membranen durch die „Vesikel-Füllung“ verhindert, bei den Retina-Vesikeln durch die assoziierten Rhodopsin-Moleküle. Das Resultat ist, daß, wenn beim Dehydratisieren die Wasserphase eliminiert wird, d. h. die thermodynamische Basis der hydrophoben Bindung^[49] entfällt, und wenn sich monomolekulare Lipidschichten nicht gegenseitig stabilisieren können, eine Protein-Lipid-Entmischung und eine Umstrukturierung der Proteine und Lipide stattfindet (Abb. 25). Es ist jedoch zu erwarten, daß bei einem Hydratationsstadium von 20 bis 30% H₂O die PC-Moleküle noch mit dem Gitterprotein assoziiert bleiben und daß nur die Lipide entmischt werden, die die eigentliche monomolekulare Lipidschicht der Membran bilden. Dabei wird die ursprüngliche Membrandicke um 25–30 Å vermindert, d. h. von 70–75 Å auf 45 Å (45 Å = 37 Å Gitterprotein + 8 Å herausragende Cholingroupen).

In einer Suspension dichtgepackter, abgeflachter kollabierter Membranvesikel, die 20–30% Hydratationswasser enthalten, sollten daher etwa 90 Å dicke spiegelsymmetrisch angeordnete „Membranpaare“ gefunden werden, die durch 20–30 Å dicke Wasserschichten voneinander getrennt sind. Beim völligen Trocknen wird demnach die

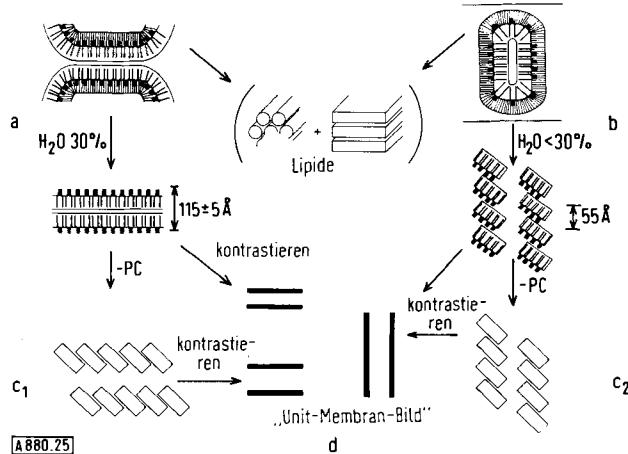


Abb. 25. Darstellung des Membran-Kollapses und des Ursprungs des unit-membran-ähnlichen Aussehens von Bio-Membranen. a) Kollaps von Membran-Vesikeln, die durch Wasserentzug orientiert werden, b) Kollaps von Retina-Vesikeln durch Dehydratation, c) Verdickung der Proteinschichten durch Umstrukturierung nach totalem Lipid-Entzug, d) kontrastierte („gefärbte“) kollabierende Membranen: „Unit-Membranen“.

Stapelperiode von 110 auf 90 Å schrumpfen (Abb. 25). Ein solches Verhalten wurde von Finean et al. bei Mitochondrien und Erythrocyten röntgenographisch nachgewiesen^[45, 47].

Die Lipidextraktion wird auf einen weitergehenden Kollabierungszustand oder, adäquater ausgedrückt, Denaturie-

rungszustand führen: Die Eliminierung der PC-Moleküle vom Gitterprotein wird einen Stabilisierungsprozeß des reinen Gitterproteins einleiten. Diese Stabilisierung wird durch eine Verkippung der Protein-Untereinheiten aus der ursprünglichen Gitterebene erreicht. Trotz des Verlustes der PC-Moleküle führt dieser Prozeß zu einer Verdickung der Proteinschicht von 45 oder 37 Å auf ca. 55 Å. Ein solches Membranverhalten konnte sowohl elektronenmikroskopisch von Fleischer und Stoeckenius^[50] beobachtet als auch röntgenographisch nachgewiesen werden^[51] (Abb. 25 c₁ und 25 c₂).

Bei elektronenmikroskopischen Verfahren, bei denen sowohl Anfärbungs- und Kontrastierungsmethoden als auch Alkohol-Dehydratation angewendet werden, erfaßt man daher ausschließlich kollabierte Membranen, d. h. die Abbildungen repräsentieren Proteinschichten, die an ihren Oberflächen kontrastiert sind (Abb. 25 d). *Es existiert daher keine „Unit-Membran“, sondern eine allgemeine Erscheinungsform denaturierter Membranen.* Zum gleichen Ergebnis kommt Sjöstrand in einer eingehenden elektronenmikroskopischen Studie^[52].

Bei den Retinastäbchen ist bei Dehydratisierungs-Experimenten ein anderer Umstrukturierungsprozeß zu erwarten als bei Kugelvesikeln. Während bei den anderen diskutierten Membranen ein transversaler Orientierungsdruck ausgeübt wird, ist bei den Retinastäbchen ein lateraler Druck zu berücksichtigen (Abb. 25 b). Bei röntgenographischen Untersuchungen erscheint immer ein 56-Å-Reflex, wenn beim Dehydratisieren die 77-Å- und 51-Å-Reflexe des ursprünglichen 2d-Gitters verschwinden. Wir vermuten, daß bei der Dehydratation die Proteinpartikel aus der Ebene verkippen und eine „Huckepack-Struktur“ bilden (Abb. 25 b). (Blasie und Worthington haben diesen 56-Å-Reflex einer planaren Flüssigkeits-Verteilung der Rhodopsin-Moleküle zugeordnet^[53].)

3.3. Perspektiven für molekulare Membranprozesse

Auf der Basis der entwickelten Membranstruktur eröffnen sich neue Möglichkeiten für das Verständnis der Membran-Funktionen auf der molekularen Ebene. Drei Postulate sollen den folgenden Überlegungen vorausgeschickt werden:

1. Die Eigenschaft der Lipide, in zwei grundsätzlich verschiedenen Konformationen existieren zu können, und die Steuerbarkeit der Konformationsübergänge durch Ligandenbindung befähigen die Lipide, als eigentliche „Carrier“ beim „erleichterten“ und „aktiven“ Ionen-Transport zu fungieren.
2. Auf der Steuerbarkeit von Phasenübergängen der Phospholipide durch Assoziation oder Bindung von Liganden und auf der unterschiedlichen Bindungsfähigkeit der einzelnen Lipide gegenüber einwertigen und zweiwertigen Ionen beruht die Permeabilitätskontrolle in Bio-Membranen.
3. Die Proteine haben die Aufgabe, stereospezifische Strukturprobleme zu lösen, die enzymatische Steuerung der Membranprozesse zu übernehmen und schließlich die energetische Kopplung zwischen Membranen und Außenphasen zu sichern.

Im folgenden sollen kurz die Konsequenzen der drei vorstehend postulierten Gesichtspunkte umrissen werden.

3.3.1. Allgemeine Bemerkungen über molekulare Carrier-Transport-Mechanismen

Die neu gefundenen Lipideigenschaften weisen auf die Möglichkeit hin, daß die Konformationsänderungen der Phospholipide den Carrier-Transport ermöglichen. Unter Carrier wird hier ein Molekül verstanden, das in der Lage ist, eine mechanische Substratverschiebung über die Permeationsbarriere bewerkstelligen zu können. Eine Variation der Mechanismen ist dadurch gewährleistet, daß verschiedene Carrier-Moleküle zur Verfügung stehen und daß verschiedene Induktions-Systeme und Energie-Ankoppelungs-Systeme für die individuellen Carrier existieren. In jedem Fall jedoch wird die Konformationsänderung durch einen im Prinzip gleichen physikalisch-chemischen Prozeß eingeleitet, nämlich durch Ligandenbindung oder Ligandenau austausch.

Trotz der prinzipiellen Ähnlichkeit der Carrier-Mechanismen können vom energetischen Gesichtspunkt zwei Kategorien unterschieden werden. Im einen Fall sind die Liganden nur schwach assoziiert, im andern Fall bilden sie eine echte chemische Bindung mit dem Carrier. Entsprechend den verschiedenen Energieanforderungen stehen auch zwei Energielieferungssysteme zur Verfügung. Die Energie wird entweder durch einen Efflux (Quell-Fluß) bereitgestellt, d. h. durch Aufrechterhaltung eines Konzentrations-Gradienten, oder in Form gespeicherter chemischer Energie (z. B. in Form der energiereichen Phosphat-Bindung).

Die Einspeisung der chemisch gespeicherten Energie in den Transportprozeß, d. h. ihre Transformation in eine vektorielle mechanische Bewegung sollte, soweit das im Augenblick beurteilt werden kann, über die Dissoziationsgleichgewichte der Säuregruppen der Carrier erfolgen. So ist z. B. diskutierbar, daß die durch die Phosphoesterbindung des ATP zur Verfügung gestellte Energie dazu dient, Protonen der Phosphorsäuregruppe des Carriers (z. B. PA) gegen Na^+ oder Ca^{2+} auszutauschen. Die dadurch eingeführte Änderung der intra- und intermolekularen Wechselwirkungsenergie wird eine sterische Verschiebung der polaren Carrier-Gruppe zur Folge haben (Konformationsänderung). Diese Konformationsänderung repräsentiert den eigentlichen mechanischen Transportprozeß.

Ein solcher Mechanismus erfordert natürlich einen beträchtlich höheren Aufwand in bezug auf die Substrat-Ankopplung und Energiebereitstellung direkt an der Membran als ein efflux-getriebener Transport. Diese beiden molekularen Mechanismen liegen wahrscheinlich dem „erleichterten“ und dem „aktiven“ Transport zugrunde, die in der Literatur eingehend phänomenologisch beschrieben sind.

3.3.2. Die Permeabilitätssteuerung

Die eigentlichen Permeationsbarrieren werden in Bio-Membranen von Lipiden gebildet. Infolgedessen werden die Permeabilitätsparameter letzten Endes durch die Lipideigenschaften bestimmt. Aus diesen Lipideigenschaften lassen sich drei grundsätzliche Aspekte ableiten, die für die Permeabilität von Bedeutung sein können.

Der erste betrifft die Dicke der Permeationsbarriere in Bio-Membranen. Es ist sicherlich von entscheidender Bedeutung, ob die Permeationsbarriere aus einer monomolekularen Lipidschicht gebildet wird, d. h. ca. 22 Å dick ist, oder einer bimolekularen Lipidschicht, die eine Dicke von mindestens 44 Å besitzen würde. Die Tatsache, daß die äußeren und inneren wäßrigen Phasen, die in vivo an Bio-Membranen angrenzen, verschiedene pH-Werte und verschiedene Ionen-Konzentrationen aufweisen, spricht sehr dagegen, daß in Bio-Membranen bimolekulare Lipidschichtbereiche existieren. Strukturen, wie sie in Abbildung 22 dargestellt sind, werden nur stabil sein, wenn die beiden Außenphasen gleich sind, also in gradientenfreien Membranen. Solche Membranen befinden sich im thermodynamischen Gleichgewicht, sie sind „tot“. Die „Basis-Membran“ kann daher auch als die funktionslose Grundform der Bio-Membran im thermodynamischen Gleichgewicht definiert werden, deren fiktive Idealformen in Abbildung 22 dargestellt sind. Eine an verschiedene Außenphasen adaptierte Membran, also eine Membran im Fließgleichgewicht, kann dagegen nur existieren, wenn sie monomolekulare Lipidschichtbereiche bildet, die zudem durch einseitige Proteinanlagerung total asymmetrische Konstruktion besitzt. Die asymmetrischen Strukturen von Abbildung 23a, 23b und 23c sind daher als die stabilsten Membranstrukturen im biologischen Fließgleichgewicht anzusehen. In Analogie zur Definition der Basis-Membran kann die „Funktions-Membran“ demnach als die voll funktionsfähige Bio-Membran im Fließgleichgewicht definiert werden.

Diese Aussagen sind unmittelbar durch die Lipideigenschaften begründbar. Nehmen wir an, der pH-Wert des Zellinnenraumes sei 6.5, der des Zellaußenraumes 7.5. Bei einer bimolekularen Lipidmicelle aus PA zum Beispiel müßte die innere Lipidschicht in der p_{in} -, die äußere in der p_{ex} -Konformation vorliegen – ein Zustand, der nach unseren Erfahrungen nicht stabil sein kann und zur Entmischung der Lipidmicellen führt. Die Micellen der entmischten Lipide einheitlicher Konformation würden jedoch wieder demselben Vorgang unterliegen. Dieser Prozeß würde sich so lange wiederholen, bis einseitig an die Lipidschicht ein Protein assoziiert werden könnte, d. h. der Umstrukturierungsprozeß würde wieder auf eine stabile, total asymmetrische Struktur im Sinne der Abbildung 23 führen. (Umgekehrt folgt daraus, daß Membranen, die aus ihrem in vivo-Milieu entfernt werden (z. B. Isolierung in vitro), eine Symmetrisierungstendenz übernehmen und Symmetrisierungsoperationen einleiten, also der Basis-Membran zu streben.)

Der zweite wichtige Gesichtspunkt betrifft sprunghafte Permeabilitätsänderungen, die durch pH-Verschiebungen in der Zelle induziert und gesteuert werden können. Zur Durchführung solcher unstetigen Permeabilitätsänderungen scheint uns der CO_2 - und pH-abhängige Phasenübergang von PE geeignet zu sein. Mit diesem System ist die Permeabilität im physiologisch relevanten Bereich von $\text{pH} = 5.5$ bis 7.5 steuerbar. Die steilste Steuerflanke liegt entsprechend dem pK -Wert des Kohlensäuresystems bei $\text{pH} = 6.3$. Je saurer das Milieu des Zellinnenraumes wird, desto weniger Hydrogencarbonat wird gebunden und desto mehr laminaire Micellen gehen in hexagonale

Micellen über, d.h. um so permeabler wird die Lipidschicht. Ein weiteres System, das noch prägnanter als PE/Hydrogencarbonat/Kohlensäure auf pH-Änderungen anspricht, bildet der Komplex aus PS, Ca^{2+} und anorganischem Phosphat. Die normale Bindungskapazität von PS gegenüber Ca^{2+} wird zwischen pH=6.2 und pH=6.3 sprunghaft vervierfacht, wenn gleichzeitig anorganisches Phosphat zur Verfügung steht^[54].

Als ebenso wesentlich wie die unstetigen Permeations-eigenschaften, die eine große Rolle bei der sensorischen Erregungsbildung spielen dürften, ist die Einstellung und Kontrolle eines stetigen Permeationsflusses (Leckflusses) anzusehen. Dies ist der dritte Gesichtspunkt, der abschließend erwähnt werden soll. Ein konstanter Permeationsfluß sollte durch weitgehend pH-unabhängige Ca^{2+} -Bindung an die Phospholipide PA, PC, PE und PS aufrechterhalten werden. Der entscheidende Parameter wird hierbei die Ca^{2+} -Konzentration im Zellinnern sein, die ihrerseits durch den aktiven Ca^{2+} -Transport determiniert wird.

4. Schlußbemerkung

Der vorangegangene Aufriß über Membranen ist eine Darstellung von experimentellen Ergebnissen und darauf basierenden Postulaten, im Ganzen gesehen eine weitgefaßte Membran-Hypothese. Das Anliegen dieser Arbeit ist es nicht, ein perfektes Bild der Bio-Membran zu liefern, sondern unseren Standpunkt darzulegen und neue Gesichtspunkte für die Bewältigung molekular-biologischer und molekular-medizinischer Probleme beizutragen.

Für die wertvolle Unterstützung bei der Vorbereitung des Manuskriptes und für zahlreiche Diskussionen, die wesentliche Beiträge zu dieser Arbeit geliefert haben, danke ich ganz besonders Herrn Dr. H. Emrich. Ebenso herzlich danke ich den Herren Dipl.-Phys. S. Stange und Dipl.-Chem. D. Walter, die viele experimentelle Daten bereitgestellt haben. Herrn H. Pape bin ich für die Ausführung der Computer-Rechnungen zu Dank verpflichtet. Schließlich darf ich Fräulein G. Zippan für die technische Unterstützung und für die Ausführung der Zeichnungen danken.

Eingegangen am 2. Juni 1971, ergänzt am 27. April 1972 [A 880]

-
- [1] V. Luzzati u. F. Husson, *J. Cell Biol.* 12, 207 (1962).
 - [2] H. Träuble, *Naturwissenschaften* 58, 277 (1971).
 - [3] D. Chapman, R. M. Williams u. B. D. Ladbrooke, *Chem. Phys. Lipids* 1, 445 (1967); B. D. Ladbrooke u. D. Chapman, *ibid.* 3, 304 (1969).
 - [4] E. Rojas u. J. M. Tobias, *Biochim. Biophys. Acta* 94, 398 (1965).
 - [5] D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta* 163, 240 (1968).
 - [6] A. D. Bangham, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 18, 29 (1968).
 - [7] T. Hainai, D. A. Hayndon u. J. Taylor, *J. Theor. Biol.* 9, 278 (1965).
 - [8] S. Ohki, *Biophys. J.* 9, 1195 (1969); *J. Colloid Interface Sci.* 30, 413 (1969).

- [9] P. Läuger, *Proc. Coral Gables Conf. on Physical Principles of Biol. Membranes*, 1970, S. 227.
- [10] K. S. Cole, *Proc. Coral Gables Conf. on Physical Principles of Biol. Membranes*, 1970, S. 1.
- [11] J. C. P. Smith, *Chimia* 25, 349 (1971); O. H. Griffith, L. J. Libertin u. G. B. Birrell, *J. Phys. Chem.* 75, 3417 (1971).
- [12] D. Chapman u. A. Morrison, *J. Biol. Chem.* 241, 5044 (1966); E. G. Finer, A. G. Flook u. H. Hauser, *FEBS Lett.* 18, 331 (1971).
- [13] J. B. Finean, *Experientia* 9, 17 (1953).
- [14] W. Kreutz, *Advan. Bot. Res.* 3, 54 (1970).
- [15] W. Kreutz u. D. F. Walter, noch unveröffentlicht.
- [16] M. Blank u. J. S. Britten, *Proc. Coral Gables Conf. on Physical Principles of Biol. Membranes*, 1970, S. 143.
- [17] K. W. Butler, H. Dugas, J. C. P. Smith u. H. Schneider, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 770 (1970).
- [18] U. Keller, Diplomarbeit, Technische Universität Berlin 1971.
- [19] R. Hosemann u. W. Kreutz, *Naturwissenschaften* 53, 298 (1966).
- [20] P. Weber, *Z. Naturforsch.* 17b, 683 (1962); 18b, 1105 (1963).
- [21] W. Menke u. E. Jordan, *Z. Naturforsch.* 14b, 234, 393 (1959).
- [22] R. S. Criddle u. L. Park, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1, 74 (1964); R. S. Criddle, R. M. Bock, D. E. Green u. H. Tisdale, *Biochemistry* 1, 827 (1962).
- [23] J. L. Bailey, persönliche Mitteilung.
- [24] M. T. Laico, E. I. Ruoslahti, D. S. Papermaster u. W. J. Dreyer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 120 (1970).
- [25] International Tables for X-Ray Crystallography. Kynock Press, Birmingham 1952.
- [26] P. Giesbrecht u. G. Drews, *Arch. Mikrobiol.* 54, 297 (1966).
- [27] W. Kreutz, P. Giesbrecht u. A. Paulick, unveröffentlicht.
- [28] R. B. Park u. N. G. Pon, *J. Mol. Biol.* 6, 105 (1963).
- [29] K. Mühlthaler, H. Moor u. J. W. Szarkowski, *Planta* 67, 305 (1965).
- [30] St. H. Howell u. E. N. Moudrianakis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1267 (1967).
- [31] J. L. Bailey u. W. Kreutz, *Int. Congr. Photosynthesis*, Freudenstadt 1968.
- [32] J. S. C. Wessels, *Int. Congr. Photosynthesis*, Freudenstadt 1968.
- [33] L. P. Vernon, B. Ke, H. H. Mollenhauer u. E. R. Shaw, *Int. Congr. Photosynthesis*, Freudenstadt 1968.
- [34] S. G. Stange, H. M. Emrich u. W. Kreutz, noch unveröffentlicht.
- [35] L. J. Schneiderman u. I. G. Janga, *Biochemistry* 7, 2281 (1968).
- [36] E. H. Eylar, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1425 (1970); E. H. Eylar, J. Salk, G. Beveridge u. L. Brown, *Arch. Biochem. Biophys.* 132, 34 (1969).
- [37] J. London, *Biochim. Biophys. Acta* 249, 188 (1971).
- [38] J. F. Danielli u. A. Dawson, *J. Cell. Comp. Physiol.* 5, 495 (1935).
- [39] C. K. Akers u. D. F. Parsons, *Biophys. J.* 10, 101, 116 (1970).
- [40] W. Kreutz u. S. G. Stange, noch unveröffentlicht.
- [41] D. Harker, *Science*, im Druck.
- [42] M. F. Moody, *Science* 142, 1173 (1963).
- [43] A. E. Blaurock u. M. H. F. Wilkins, *Nature* 223, 906 (1969).
- [44] J. K. Blasie u. C. R. Worthington, *J. Mol. Biol.* 39, 407 (1969).
- [45] J. B. Finean, R. Coleman, W. A. Green u. A. R. Linbrick, *J. Cell. Sci.* 1, 287 (1966).
- [46] W. Menke, *Brockhaven Symp. in Biol.* 19, 328 (1966).
- [47] J. E. Thompson, R. Coleman u. J. B. Finean, *Biochim. Biophys. Acta* 150, 405 (1968).
- [48] H. Pape, *Dissertation*, Technische Universität Berlin 1971.
- [49] G. Némethy u. H. A. Scheraga, *J. Chem. Phys.* 36, 3382, 3401 (1962).
- [50] S. Fleischer, B. Fleischer u. W. Stoeckenius, *J. Cell Biol.* 32, 193 (1967).
- [51] W. Kreutz u. W. Menke, *Z. Naturforsch.* 15b, 402 (1960).
- [52] F. S. Sjöstrand u. L. Barajas, *J. Ultrastruct. Res.* 25, 121 (1968).
- [53] J. K. Blasie u. L. R. Worthington, *J. Mol. Biol.* 39, 417 (1969).
- [54] J. M. Cotmore, G. Nichols u. R. E. Wuthier, *Science* 172, 1339 (1971).