

Die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran

Von Hiroshi Nikaido^[*]

Ein beliebtes Objekt für das Studium von Struktur/Funktions-Beziehungen bei biologischen Membranen ist die äußere Membran Gram-negativer Bakterien. Diese Membran hat u.a. die Aufgabe, den Einstrom von Nahrungsstoffen und den Ausstrom von Abfallprodukten zu ermöglichen. Untersuchungen unter Verwendung von Mutanten zeigten, daß es mindestens zwei allgemeine Wege für die Diffusion kleiner Moleküle durch die äußere Membran gibt: einen für hydrophobe und einen für hydrophile Verbindungen. Beim „hydrophoben Weg“ löst sich die hydrophobe Verbindung im Inneren der Membran und verläßt es entsprechend dem Verteilungskoeffizienten. Bei Wildtypformen ist dieser Weg nicht gangbar – vermutlich wegen des Fehlens von Bereichen mit Phospholipid-Doppelschichten. Kleine hydrophile Moleküle durchdringen die Membran dagegen beim Wildtyp und bei Mutanten durch wassergefüllte Poren.

1. Einleitung

Bakterienzellen sind gewöhnlich von einer Zellwand umgeben, welche der Cytoplasmamembran nach außen vorgelagert ist. In Dünnschnitten Gram-positiver Bakterien erscheint die Zellwand unter dem Elektronenmikroskop meistens als dicke, diffuse, strukturierte Schicht. Sie besteht hauptsächlich aus Murein (Peptidoglycan). Dagegen zeigen Dünnschnitte Gram-negativer Bakterien, z.B. von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*, daß hier die Zellwand aus mindestens zwei Schichten aufgebaut ist: einer äußeren Schicht (der äußeren Membran), die mit ihrem trilaminaren Aussehen den üblichen biologischen Membranen sehr ähnlich ist, und einer inneren, strukturlosen Schicht aus Murein^[1], dem die Wand im wesentlichen ihre mechanische Stabilität verdankt (Abb. 1).

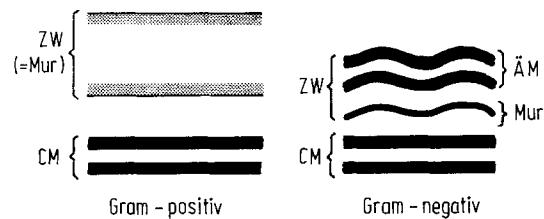


Abb. 1. Schema der Oberflächenschichten von Bakterien in Dünnschnitten. Zw: Zellwand; CM: Cytoplasmamembran; ÄM: äußere Membran; Mur: Murein (=Peptidoglycan). Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Zellen können noch zusätzliche Zellschichten besitzen.

Die äußere Membran kann aus *E. coli* oder aus *S. typhimurium*^[2,3] isoliert werden; sie enthält nur wenige Arten von Proteinen (Abb. 2)^[3–6]. Dazu gehören a) ein bis drei Proteine mit einem Molekulargewicht von 34000 bis 36000, die als „Porine“ bezeichnet werden, da sie Diffusionskanäle durch die Membran bilden (siehe Abschnitt 4), b) normalerweise ein „Hitze-modifizierbares“ Protein (HMP, Molekulargewicht etwa 33000), dessen Beweglichkeit bei der Acrylamidgel-elektrophorese sich beim Erhitzen in unerwarteter Weise ändert, und c) das Murein-Lipoprotein (MLP), das aus 58 Aminosäuren und kovalent gebundenen Lipiden besteht^[7]. Etwa 30% dieses Lipoproteins sind kovalent mit der darunterliegenden Mureinschicht verknüpft. Die äußere Membran enthält außerdem noch zwei Arten von amphipathischen

[*] Prof. Dr. H. Nikaido

Department of Bacteriology and Immunology, University of California, Berkeley, Calif. 94720 (USA)

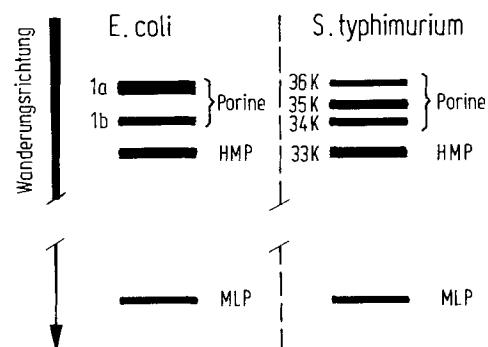


Abb. 2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Hauptproteine der äußeren Membran. HMP: „Hitze-modifizierbares Protein“; MLP: Murein-Lipoprotein. Die Porine von *E. coli* sind in verschiedenen Laboratorien als Protein(e) I, Protein(e) I, „Matrixprotein“, Proteine b und c sowie O-9 und O-8 benannt worden, das HMP als Protein 3a, II*, d und O-10. Die Porine von *Salmonella* hat man nach ihren Molekulargewichten mit 36 K, 35 K und 34 K, das HMP mit 33 K bezeichnet (SDS: Natriumdodecylsulfat).

Molekülen: Phospholipide und Lipopolysaccharide (LPS) (vgl. auch Abb. 15).

Es sind mehrere genetische Mutanten bekannt, die LPS mit unterschiedlich defekten Polysaccharidketten erzeugen; Abbildung 3 zeigt die LPS-Strukturen der *S. typhimurium*-Mutanten Ra bis Re^[8,9]. Kürzlich sind Mutanten entdeckt

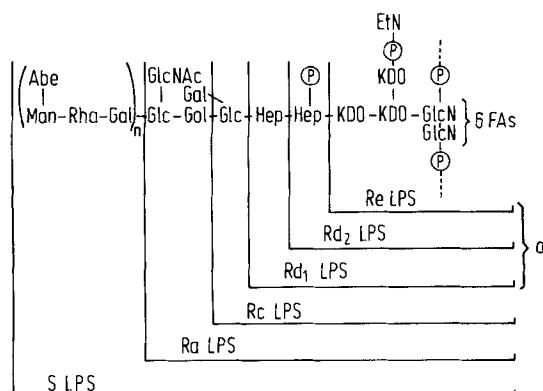


Abb. 3. Struktur von Lipopolysacchariden (LPS) aus *S. typhimurium*. Die Biosynthese verläuft in diesem Schema von rechts nach links. So synthetisieren Wildtypzellen („glatter Wildtyp“) die vollständige Struktur („S-LPS“), während in R-Mutanten, in denen die Biosynthese auf verschiedenen Stufen blockiert ist, nur unvollständige Strukturen entstehen („Ra- bis Re-LPS“; a: „tief rauhe“ Mutanten). Abkürzungen: Abe: Abequose; Man: D-Mannose; Rha: L-Rhamnose; Gal: D-Galactose; GlcNAc: N-Acetyl-D-glucosamin; Glc: D-Glucose; Hep: L-Glycero-D-manno-Heptose; (P): Phosphat; KDO: 3-Desoxy-D-manno-octulosonsäure; EtN: Aminoethanol; FA: Fettsäure.

worden, denen ein oder mehrere Proteine in der äußeren Membran fehlen^[10-14]. Mit diesen Mutanten ist eine gezielte Änderung der Membranzusammensetzung möglich. Und gerade diese Möglichkeit des „genetic engineering“ – zusammen mit der relativ einfachen Protein zusammensetzung – machen die äußere Membran zu einem attraktiven System für das Studium von Struktur/Funktions-Beziehungen in biologischen Membranen.

Das basale Kontinuum der äußeren Membran scheint wie andere biologische Membranen eine Lipid-Doppelschicht-Struktur zu haben, in der die Kohlenwasserstoffketten ungefähr im rechten Winkel zur Membranebene angeordnet sind und deren hydrophobe Innenseite bilden. Diese Annahme wird u. a. durch folgende Daten gestützt:

a) Zumindest einige der Kohlenwasserstoffketten in den Lipiden der äußeren Membran sind einheitlich orientiert, und die hexagonale, quasi-kristalline Packung dieser Ketten verschwindet bei hohen Temperaturen in einem kooperativen „Aufschmelz“-Prozeß, wie sowohl durch Röntgenbeugung^[15,16] als auch durch Elektronenspinresonanz nach Einführung spinmarkierter Reportermoleküle^[17,18] gezeigt werden konnte.

b) Beim Gefrierbrechen von doppelschichtigen Lipiddmembranen erfolgt der Bruch mitten in der Membran^[19]. Einen ähnlichen Bruch hat man wiederholt auch bei der äußeren Membran beobachtet^[20-23].

Die äußere Membran dient offenbar hauptsächlich als Barriere, um die darunterliegende Mureinschicht vor dem Angriff hydrolytischer Enzyme (z. B. Lysozym) zu schützen. Dies wird durch die Beobachtung nahegelegt, daß sich die Struktur des Mureins in Gram-positiven Bakterien vermutlich wegen des Selektionsdrucks für neuartige, gegen Hydrolasen resistente Strukturen während der Evolution enorm verändert hat. Dagegen gibt es bei den Gram-negativen Bakterien kein Anzeichen für eine solche evolutionäre Diversifikation der Mureinstruktur^[23,24]. Die äußere Membran sollte aber auch durchlässig für Nahrungsstoffe und Abfallprodukte sein, d. h. sie sollte eine selektive Permeabilität besitzen, in dieser Hinsicht also vielen anderen biologischen Membranen ähneln. Die Diffusion durch diese Membranen erfolgt allerdings oft durch aktiven Transport; ein solcher Prozeß dürfte aber für die äußere Membran nicht in Frage kommen, da sie sich außerhalb der Cytoplasmamembran befindet.

Vor 1975 sind nur wenige unzusammenhängende Beobachtungen über die selektive Permeabilität der äußeren Membran publiziert worden. So konnte z. B. durch sorgfältige kinetische Studien über den Ausstrom von β -Galactosiden aus *E. coli*-Zellen die Existenz einer teilweise wirksamen Diffusionsbarriere „außerhalb der Cytoplasmamembran“^[25] nachgewiesen werden. Payne und Gilvarg^[26] fanden, daß *E. coli* Peptide ab einer bestimmten Größe nicht mehr verwerten kann, vermutlich weil sie durch eine „außerhalb der Cytoplasmamembran liegende Sperre“ ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse sagen wenig darüber aus, was nun eigentlich die durch die äußere Membran ausgeschlossenen Moleküle von den sie durchdringenden Molekülen unterscheidet und welche Vorgänge sich beim Abweisen oder Durchlassen abspielen. Deshalb beschlossen wir, diese selektive Permeabilität der äußeren Membran systematisch zu untersuchen, und zwar im wesentlichen an *S. typhimurium* und *E. coli*. Aber vorher mußten wir wissen, ob es nur eine Art oder mehrere Arten der Diffusion durch die äußere Membran gibt. Versuche mit LPS-Mutanten^[27,28] haben dabei entscheidend weiterhelfen können.

2. Die Vielfalt der Diffusionswege

Die Verfügbarkeit von Mutanten mit definierten biochemischen Defekten in der LPS-Synthese (Abb. 3)^[8,9] ermöglicht es, die Struktur von Komponenten der äußeren Membran experimentell zu verändern und die Auswirkungen solcher Veränderungen auf die Membranpermeabilität zu untersuchen. Diese sowohl von *Roantree* und *Stocker*^[27] als auch von *Schlecht*, *Schmidt* und *Westphal*^[28] begonnenen Studien führten zu folgenden Ergebnissen: a) Wildtypstämme von *Salmonella*, *E. coli* und verwandten Bakterien sind empfindlich gegen viele Antibiotica einschließlich Neomycin, Cycloserin, Ampicillin und Cephalothin. Die Empfindlichkeit gegen diese Antibiotica ändert sich wenig mit der LPS-Struktur. b) Dagegen sind diese Stämme gegen Antibiotica wie Actinomycin D, Erythromycin, Novobiocin und Rifamycin SV, gegen Farbstoffe wie Kristallviolett und gegen Detergentien wie Salze von Gallensäuren und Natriumdodecylsulfat (SDS) viel resistent als die meisten Gram-positiven Bakterien. Die Empfindlichkeit gegen diese Agentien nimmt jedoch bei den „tief rauen“ Mutanten von *Salmonella*^[27,28] und *E. coli*^[29], die außergewöhnlich defektes LPS vom Rd₁-, Rd₂- und Re-Typ (Abb. 3) erzeugen, drastisch zu und wird schließlich so groß wie bei Gram-positiven Bakterien.

Daneben kann die Struktur der äußeren Membran auch auf andere Art verändert werden: Bis zu 50 % der LPS-Moleküle lassen sich durch kurzzeitige Behandlung von *Salmonella*- und *E. coli*-Zellen mit Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA) entfernen^[30]. Leive^[31] entdeckte, daß nach partieller Entfernung von LPS die Empfindlichkeit dieser Organismen gegen Actinomycin D zunimmt. Spätere Untersuchungen^[32] ergaben, daß die so behandelten Zellen auch empfindlich gegen Polymyxin, Novobiocin, Rifampicin, langkettige Fettsäuren und Detergentien wurden.

Da die äußere Membran die einzige subzelluläre Struktur mit wesentlichem LPS-Gehalt ist^[2,31] und da die Wirkungsorte der genannten Antibiotica und Farbstoffe gewöhnlich in der Cytoplasmamembran oder im Cytoplasma liegen, sprechen die obigen Ergebnisse dafür, daß die äußere Membran normalerweise als Durchtrittssperre für einige Molekülarten wirkt und daß diese Sperrfunktion durch genetische Änderungen des LPS oder durch Entfernung des LPS mit EDTA teilweise aufgehoben werden kann. Darüber hinaus existiert eine andere Gruppe von Agentien, deren Wirksamkeit nicht durch Mutationen des LPS beeinflußt wird. Dies legt nahe, daß es mindestens zwei Diffusionswege gibt: Einer ist von der LPS-Struktur oder dem LPS-Gehalt abhängig und einer nicht.

Wie sind nun die einströmenden Verbindungen einem dieser Wege zugeordnet? Eine Zusammenstellung der untersuchten Substanzen zeigte, daß diejenigen, deren Wirksamkeit in den tief rauen Mutanten und in EDTA-behandelten Zellen zunimmt, gewöhnlich hydrophob sind. Die quantitative Bestimmung der Hydrophobie dieser Substanzen anhand ihres Verteilungskoeffizienten in 1-Octanol/Phosphatpuffer (pH = 7.0) ergab, daß in der Tat die meisten von ihnen Verteilungskoeffizienten über 0.07 besaßen^[33] (Tabelle 1). Dagegen erwies sich die Mehrzahl der Substanzen, deren Wirksamkeit nicht durch die LPS-Struktur beeinflußbar war, als recht hydrophil, d. h. sie hatten Verteilungskoeffizienten unter 0.02^[33] (Tabelle 1). Am einfachsten lassen sich diese Ergebnisse folgendermaßen erklären: a) Es gibt wenigstens zwei *allgemeine* Wege für die Diffusion kleiner Moleküle durch die äußere Membran, einen

Tabelle 1. Hydrophobie, Molekulargewicht und relative Wirksamkeit (bezogen auf den Wildtyp = 1) von Inhibitoren gegenüber tief rauhen Mutanten [a].

Inhibitor	rel. Wirk-samkeit	Hydro-phobie [b]	Mol.-Gew.
Actinomycin D	≥ 10	> 20	1255
Novobiocin		> 20	613
Phenol		> 20	94
Kristallviolett		14.4	408
Rifamycin SV		8.8	698
Malachitgrün		4.2	365
Nafcillin		0.31	414
Oxacillin		0.07	418
Vancomycin		> 0.01 [c]	≈ 3300
Penicillin G	0.5 - 1.0	0.02	334
Ampicillin		> 0.01	349
Cephalothin		> 0.01	395
Carbenicillin		> 0.01	378
Neomycin		> 0.01	615
Cycloserin		> 0.01	102
Chloramphenicol		12.4 [c]	323
Tetracyclin		0.07 [c]	444

[a] Modifiziert nach [33]. [b] Verteilungskoeffizient als Maß der Hydrophobie bestimmt in einem System aus gleichen Volumenteilen 1-Octanol und 0.05 M Natriumphosphatpuffer ($\text{pH} = 7.0$) bei 24°C . [c] Diese Verbindungen folgen unerklärlicherweise nicht der allgemeinen Tendenz.

für hydrophile und einen für hydrophobe Substanzen. b) Der „hydrophile Weg“ wird nicht sehr stark durch anwesendes LPS beeinflußt. c) Der „hydrophobe Weg“ ist in Wildtypstämmen, die vollständiges LPS erzeugen, fast unwirksam; voll aktiv wird er erst in den tief rauhen Mutanten oder in EDTA-behandelten Zellen. Dieser Weg für hydrophobe Moleküle soll im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

3. Die Sperre gegen hydrophobe Moleküle

3.1. Messung der Geschwindigkeit der Diffusion durch die Membran

Die meisten biologischen Membranen lassen bekanntlich die Diffusion kleiner, hydrophober Moleküle zu^[34]; die äußere Membran der tief rauhen Mutanten verhält sich ähnlich. Im Gegensatz dazu (siehe Abschnitt 2) ist die äußere Membran der Wildtypformen von *Salmonella* und *E. coli* für viele hydrophobe Verbindungen nicht passierbar.

Diese Feststellungen basierten allerdings nur auf dem Hemmeffekt, den man an ganzen Zellen gemessen hatte. Wir konnten also nur indirekt schließen, daß die beobachtete unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen unterschiedlichen Durchtrittsgeschwindigkeiten entspricht. Gustafsson et al.^[35] zeigten dagegen direkt, daß die Geschwindigkeit der Aufnahme von Kristallviolett durch intakte Zellen von der Art des vorhandenen LPS abhängt. Diese Ergebnisse wurden jedoch durch die starke Adsorption des Farbstoffs an unbekannte Zellbestandteile kompliziert. Wir konnten diese Schwierigkeiten umgehen, indem wir ein halbsynthetisches Penicillin, Nafcillin, in hohen Konzentrationen als permeierendes Agens verwendeten^[33]. Wenn wir Nafcillin dicken Suspensionen von Zellen tief rauher Mutanten zufügten, war die extrazelluläre Konzentration, nach Zentrifugation im Überstand bestimmt, zur Zeit $t=0$ und $t=\infty$ (in Wirklichkeit nach 5–10 min bei 22°C) gleich den Konzentrationen, die man erwarten würde, wenn Nafcillin zur Zeit $t=0$ nur im extrazellulären Raum vorgelegen und sich nach $t=\infty$ im extra- und im intrazellulären Raum gleichmäßig verteilt hätte. Adsorption, Abbau oder aktiver Transport waren deshalb unter diesen Bedingungen vernachlässigbar. Außerdem folgte die Diffusionskinetik einer theoretischen Gleichung, mit der sich für die Permeation eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung berechnen ließ.

Aus diesen quantitativen Diffusionsmessungen zogen wir folgende Schlüsse^[33]: a) Der Durchtritt durch die Cytoplasmamembran (an Sphäroplasten^[*] gemessen) erfolgte mindestens zehnmal schneller als der Einstrom in intakte Zellen tief rauher Mutanten. Das bedeutet, daß in ganzen Zellen der Durchtritt durch die äußere Membran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. b) Die Diffusionsgeschwindigkeitskonstanten sind sowohl im Wildtyp (S) als auch in den R- und Rc-Mutanten klein (siehe Abb. 3), in den tief rauhen (d. h. in Rd₁-, Rd₂- und Re-)Mutanten aber viel größer (siehe Abb. 4).

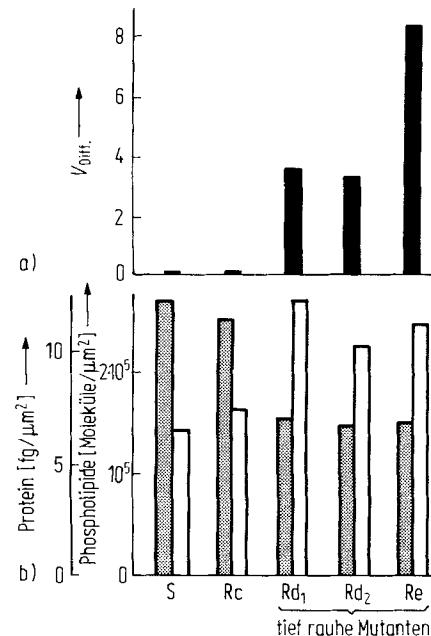


Abb. 4. a) Geschwindigkeit der Diffusion von Nafcillin (hydrophob) durch die äußere Membran von *S.typhimurium*-Stämmen (willkürliche Einheiten); b) Zusammensetzung der äußeren Membran in diesen Stämmen (nach [22]). Gemessen wurde die Geschwindigkeit der Diffusion in die intakten Zellen; geschwindigkeitsbestimmend ist dabei die Diffusion durch die äußere Membran [33]. Die Diffusionsgeschwindigkeit nimmt nicht einmal bei einem Verlust von 90 % der Saccharidgruppen (wie z. B. bei den Re-Mutanten) signifikant zu. Erst bei den tief rauhen Mutanten nimmt sie zu – entsprechend dem ansteigenden Phospholipid- und dem abnehmenden Proteingehalt.

3.2. Der Diffusionsverlauf bei hydrophoben Verbindungen

Seit den bahnbrechenden Arbeiten von Collander und Bärlund^[36] ist der Verlauf der Diffusion hydrophober Moleküle durch Membranen eingehend untersucht worden, und man weiß, daß kleinere Moleküle und stärker hydrophobe Moleküle schneller diffundieren und daß die Diffusionsgeschwindigkeit auch mit der Temperatur zunimmt^[34, 37–39]. Die kritische Analyse dieser Ergebnisse zeigte, daß die permeierenden Moleküle sich zunächst im hydrophoben Innern der Membran lösen, dann durch die Kohlenwasserstoffschicht diffundieren und die Membran in Richtung der wäßrigen Phase auf der gegenüberliegenden Seite in einem Ausmaß, das ihrem Verteilungskoeffizienten entspricht, wieder verlassen^[37]. Um nun zu testen, ob die Diffusion hydrophober Substanzen durch

[*] Sphäroplasten werden durch Behandlung intakter Zellen mit EDTA und Lysozym gebildet, dabei wird die Zellwand weitgehend zerstört.

die äußere Membran von stark rauhen Mutanten ähnlich verläuft, haben wir den Einfluß äußerer Bedingungen auf die Diffusionsgeschwindigkeit untersucht und dabei folgendes gefunden: a) Von zwei Verbindungen ähnlicher Größe diffundiert die stärker hydrophobe Verbindung schneller. b) Die Diffusionsgeschwindigkeiten hängen sehr stark von der Temperatur ab; der Q_{10} -Wert (Verhältnis der Geschwindigkeiten bei $T = 0^\circ\text{C}$ und $(T - 10)^\circ\text{C}$) liegt bei 10. c) Selbst recht große Moleküle diffundieren offenbar wie oben beschrieben; es konnte keine scharfe Grenze hinsichtlich der Größe festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen sehr stark vermuten, daß die hydrophoben Verbindungen die äußere Membran der stark rauhen Mutanten passieren, indem sie sich im Membraninneren lösen.

3.3. Strukturelle Ursachen der fehlenden Permeabilität für hydrophobe Verbindungen

Die äußere Membran des Wildtyps von *Salmonella* ist im wesentlichen undurchlässig für hydrophobe Verbindungen. Dies überrascht, da kleine, hydrophobe Moleküle schnell sowohl durch künstliche Phospholipid-Doppelschichten als auch durch die meisten biologischen Membranen diffundieren^[34, 40]. Unsere erste Erklärung war, daß die hydrophoben Moleküle nicht die hydrophile Oberflächenschicht durchdringen können, die aus den Saccharidketten des Lipopolysaccharids (LPS) besteht. Die äußere Membran von Rc-Mutanten ist aber undurchlässig für hydrophobe Antibiotika, obwohl ihr 80–90 % der Saccharidgruppen des Wildtyps (Abb. 3) fehlen. Dagegen besitzen Rd₁-Mutanten, die im LPS nur einen einzigen Zuckerrest weniger als die Rc-Mutanten enthalten (Abb. 3), außergewöhnlich durchlässige Membranen. Beim Vergleich von Stämmen, die LPS mit Saccharidketten graduell abnehmender Länge produzieren, kann man demnach einen plötzlichen und diskontinuierlichen Anstieg in der Durchlässigkeit für hydrophobe Verbindungen beobachten (Abb. 4); diese Ergebnisse sind natürlich schwer mit der erwähnten Hypothese zu erklären.

Eine wichtige Beobachtung von G. F. Ames (1974)^[5] führte uns später zu einer anderen Hypothese. Ames fand, daß der Proteingehalt der äußeren Membran trotz zunehmend kürzerer Saccharidketten des LPS bis hin zu Rc-Mutanten mehr oder weniger konstant bleibt, beim Übergang zu den tief rauhen (d.h. Rd₁-, Rd₂- und Re-)Mutanten aber plötzlich und drastisch abnimmt. Ähnliche Effekte beobachteten Koplow und Goldfine^[41] bei einer Re-Mutante von *E. coli*. Da einige der Proteine vermutlich in das hydrophobe Innere der Membran eintauchen, erwarteten wir, daß die Abnahme an Proteinen durch eine Zunahme an Phospholipiden oder an LPS kompensiert werden könnte. Eine quantitative Analyse der Komponenten der äußeren Membran von Mutanten, die LPS vom Rc-, Rd₁-, Rd₂- und Re-Typ produzieren, ergab in der Tat für die tief rauen Mutanten einen kompensatorischen Anstieg an Phospholipiden (Abb. 4b), während die Zahl der LPS-Moleküle pro Flächeneinheit in der äußeren Membran unverändert blieb^[22]. Darüber hinaus reichte die absolute Menge an Phospholipiden in der äußeren Membran von S- und Rc-Stämmen gerade noch nicht ganz aus, um eine Seite der Membran mit einer durchgehenden Monoschicht zu bedecken. Es war weiterhin bekannt, daß sich fast alle LPS-Moleküle in der äußeren Hälfte der äußeren Membran befinden^[42, 43]. Diese Ergebnisse führten zu einem Modell, in dem die Phospholipidmoleküle in der äußeren Membran von S-

und Re-Stämmen außergewöhnlich asymmetrisch verteilt sind: Sie befinden sich *nur* in der inneren Schicht, während die äußere Schicht praktisch nur Proteine und LPS-Moleküle enthält (Abb. 5a). Da in dieser Struktur keinerlei Bereiche

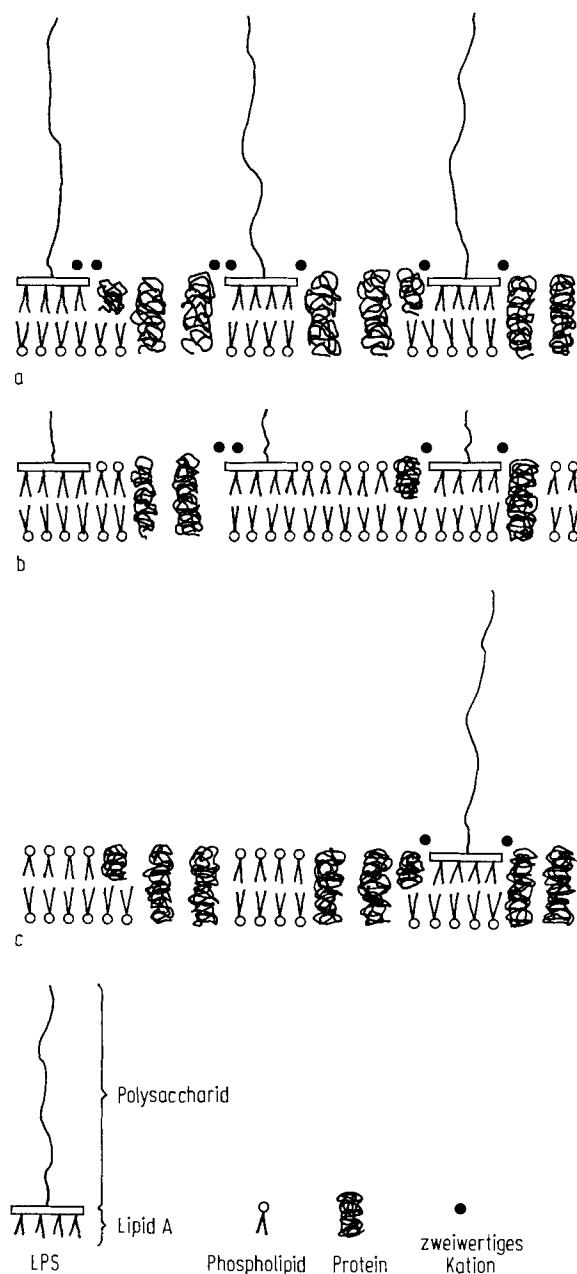


Abb. 5. Struktur der äußeren Membran von *E. coli* und *S. typhimurium*, schematisch. a) Wildtypstämmen, b) tief rauhe Mutanten, die LPS vom Rd- oder Re-Typ produzieren, c) Wildtypstämmen nach EDTA-Behandlung (Einzelheiten siehe Text).

mit Phospholipid-Doppelschicht vorkommen, kann sie die fehlende Permeabilität für hydrophobe Verbindungen unter der Annahme erklären, daß diese Moleküle nicht den hydrophilen Oberflächenbereich der Proteine und den Kohlenwasserstoffbereich des LPS durchdringen können. Die geringe Permeabilität des letztgenannten Bereiches läßt sich folgendermaßen erklären: Die Kohlenwasserstoffketten von LPS liegen vermutlich dicht zusammengedrängt vor, da jeweils mindestens sechs Ketten an eine gemeinsame Skelettstruktur gebunden sind und ungesättigte Fettsäuren fehlen. Diese Auffassung wird durch Spinmarkierungsexperimente gestützt, die zeigten,

daß die Beweglichkeit der Segmente der LPS-Kohlenwasserstoffketten nahe ihrem Carboxyende stark eingeschränkt ist^[18]. Sie ist auch mit den Untersuchungen von Romeo et al.^[44] an Monoschichten vereinbar. Diese Autoren fanden für LPS-Kohlenwasserstoffe eine kleinere Querschnittsfläche als für die Kohlenwasserstoffketten von Phospholipiden. Da ein großer Teil des Widerstands gegen die Diffusion hydrophober Moleküle durch die Membran von der Schwierigkeit herführt, ein Loch zwischen den aneinanderhaftenden Kohlenwasserstoffketten zu erzeugen^[39], ist leicht einzusehen, daß die dicht zusammengedrängten Kohlenwasserstoffketten des LPS den Durchtrittsprozeß drastisch verlangsamen.

In den tief rauen Mutanten verhindert vermutlich die stark verkürzte Struktur des LPS die normale Wechselwirkung zwischen LPS und Proteinen bei der Bildung der äußeren Membran. Dadurch wird weniger Protein in die äußere Membran eingebaut, und dies bewirkt seinerseits den kompensatorischen Zuwachs an Phospholipiden, von denen jetzt einige auch in der äußeren Membranhälfte zu finden sind (Abb. 5b). Hydrophobe Moleküle können nun offenbar durch einzelne Bereiche mit „Phospholipid-Doppelschichten“ in dieser Membran diffundieren.

Wildtypzellen verlieren bei der Behandlung mit EDTA LPS oder LPS-Protein-Komplexe^[30, 45]. Nach einer solchen selektiven Entfernung von Komponenten der äußeren Membranhälfte rücken offenbar sofort Phospholipide nach, entweder durch „flip-over“ aus der inneren Membranhälfte oder durch laterale Diffusion, wie sie Jones und Osborn beschrieben^[46]. Dadurch entstehen auch in diesem Falle Bereiche mit „Phospholipid-Doppelschichten“ (Abb. 5c), so daß auch hier die äußere Membran für hydrophobe Moleküle durchlässig wird.

Um zu untersuchen, ob die Phospholipidmoleküle tatsächlich, wie in unserem Modell angenommen, asymmetrisch verteilt sind, wurden mehrere Experimente durchgeführt^[47]. So versuchten wir, die herausragenden Kopfgruppen von Phosphatidylaminoethanol, dem Hauptphospholipid von *E. coli* mit kovalent gebundenen Reagentien zu markieren. Da zu erwarten war, daß die meisten der „nicht-penetrierenden“ Reagenzien wegen ihrer geringen Größe die wassergefüllten Poren

(siehe Abschnitt 4) passieren würden, verwendeten wir BrCN-aktiviertes Dextran als Reagens (Abb. 6). Nach Inkubation intakter Zellen mit diesem Reagens war im Falle der tief rauen Mutanten ein beträchtlicher Anteil des gesamten zellulären Phospholipids mit dem im Medium vorliegenden aktivierte Dextran verknüpft, während beim S- oder Rc-Stamm keine solche Markierung beobachtet werden konnte. Es sei darauf hingewiesen, daß diese Ergebnisse schwer durch eine mögliche sterische Hinderung durch die Saccharidketten des LPS zu erklären sind, da der Übergang äußerst scharf nach dem Verlust eines einzigen Zuckerrestes eintritt (vgl. Rc mit Rd₁, Abb. 3).

Die Tatsache, daß die äußere Membran außergewöhnlich asymmetrisch aufgebaut ist – LPS an der Außen- und Phospholipide an der Innenseite – wird auch durch weitere Beobachtungen belegt:

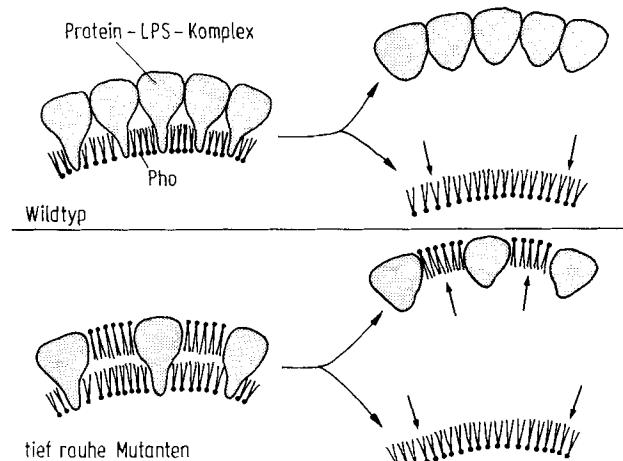


Abb. 7. Äußere Membran nach dem Gefrierbrechen (schematisch). In eingefrorenen Zellsuspensionen brechen die Membranen vorrangig in der Mitte. Das verleiht den Bruchflächen ihr charakteristisches Aussehen. Glatte Bruchflächen (Pfeile) – typisch für die Bruchhälften von Phospholipid-Doppelschichten – sind sowohl an den konvexen als auch an den konkaven Flächen der tief rauen Mutanten, nicht aber an den konkaven Flächen von Wildtypzellen zu sehen.

1. Beim Gefrierbrechen der äußeren Membran von *E. coli* und *S. typhimurium*^[20, 22] entsteht eine konkav Bruchfläche, die dicht mit Partikeln besetzt ist, die überwiegend aus Proteinen bestehen (Abb. 7)^[22]. In *Pseudomonas aeruginosa* scheint es sich bei ähnlichen Teilchen in der konkaven Bruchfläche um Protein-LPS-Komplexe zu handeln, da sie mit EDTA, das solche Komplexe aus ganzen Zellen herauslöst^[45], zum großen Teil verschwinden^[21]. Wahrscheinlich ist daher die äußere Hälfte der äußeren Membran (die der konkaven Bruchfläche entspricht) von *E. coli* und *Salmonella* mit Protein-LPS-Komplexen (oder „Partikeln“) angefüllt. Glatte Bruchflächen, wie sie für Phospholipid-Monoschichten typisch sind, waren ausschließlich an der konvexen Bruchseite zu finden. Vornehmlich solche glatten Flächen waren hingegen an den konkaven Bruchflächen von tief rauen Mutanten sichtbar (Abb. 8)^[25].

2. ESR-Untersuchungen mit spinmarkierten Verbindungen sprechen für eine ziemlich geringe Fluidität der Kohlenwasserstoffketten des LPS. So zeigen künstliche, gemischte Doppelschichten, in denen sich LPS-Moleküle zwischen Phospholipid-Molekülen befinden, eine beträchtlich geringere Fluidität als Doppelschichten aus reinen Phospholipiden^[18]. Die Phospholipid-Kohlenwasserstoffketten in der äußeren Membran

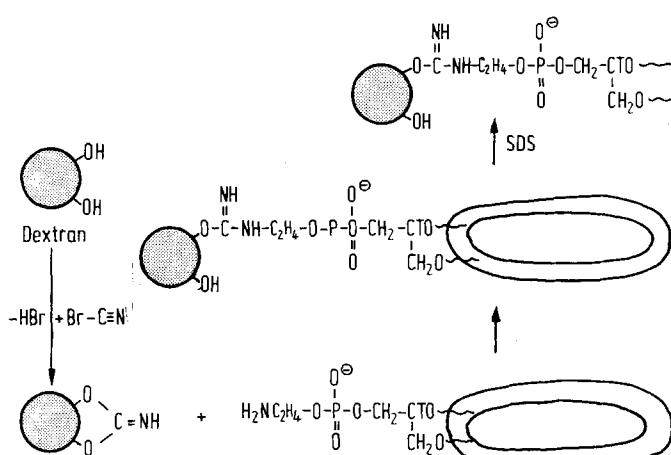


Abb. 6. Kovalente Markierung von Phosphatidylaminoethanol-Kopfgruppen an der Zelloberfläche mit makromolekularen Reagentien [47]: Lösliches Dextran wurde durch BrCN aktiviert und zu einer Suspension aus intakten, in tritiiertem Glycerin kultivierten Zellen gegeben. Falls die Phospholipide, die in *Salmonella* hauptsächlich aus Phosphatidylaminoethanol bestehen, in der äußeren Hälfte der äußeren Membran vorkommen (siehe auch Abb. 5b), wird das Reagens amidinartig mit dem Aminoethanolteil des Phospholipids verbunden werden. Der Dextran-Phospholipid-Komplex kann nach Auflösung der Zellen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) quantitativ bestimmt werden.

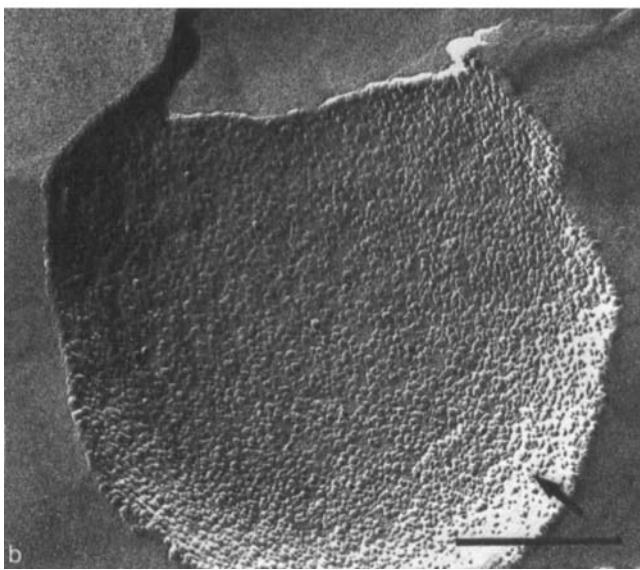
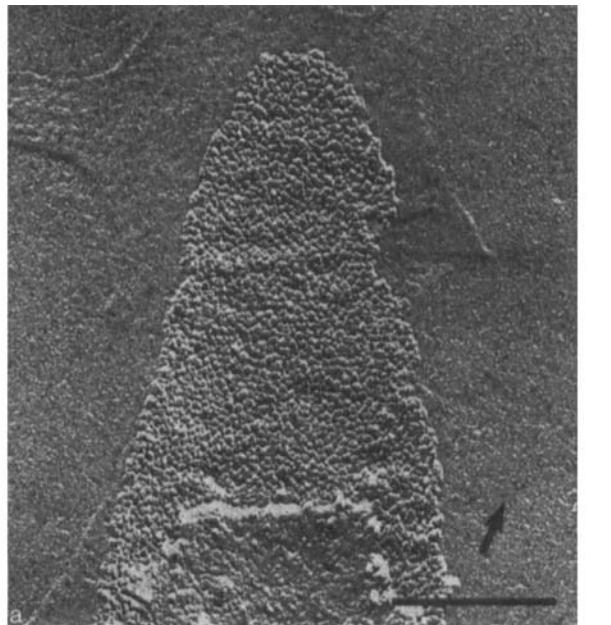


Abb. 8. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von konkaven Bruchflächen der äußeren Membran nach dem Gefrierbrechen [22]. a) Wildtyp von *S. typhimurium*, b) tief rauhe Mutante (TA 2168). Man beachte den „glatten“ Bereich zwischen den „Partikeln“. – Der Strich entspricht 0.2 μ m. Der Pfeil zeigt die Richtung der Metall-Schrägbedämpfung an. (Reproduziert mit Genehmigung der American Society for Microbiology.)

haben dagegen eine ähnlich hohe Fluidität wie diejenigen in der Cytoplasmamembran^[16, 18]. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die Phospholipide der äußeren Membran einen vom LPS vollständig getrennten Bereich einnehmen. Dieser Schluß wird auch durch die Bestimmung der Domänengröße anhand der Austauschverbreiterung der ESR-Signale gestützt^[18].

Die geringe Permeabilität der äußeren Membran des Wildtyps von *E. coli* oder *Salmonella* für hydrophobe Moleküle verschafft diesen Organismen einen enormen Selektionsvorteil dadurch, daß sie widerstandsfähig gegen Salze von Gallensäuren und gegen langketige Fettsäuren sind, die in ihrer natürlichen Umgebung – dem Darmtrakt der Säuger – in großen Mengen vorkommen. Es besteht jedoch kein Grund, daß alle Gram-negativen Bakterien für hydrophobe Stoffe un durchlässige äußere Membranen bilden müssen. Tatsächlich

sind einige nicht im Darm lebende Gram-negative Bakterien, z. B. *Neisseria gonorrhoeae*, außerordentlich empfindlich gegen hydrophobe Agentien wie Erythromycin, Rifampin, Acridin-orange und Ethidiumbromid^[48], und man darf erwarten, daß diese Bakterien eine äußere Membran vom Typ der Phospholipid-Doppelschicht besitzen.

4. Die unspezifische Permeabilität für kleine hydrophile Moleküle

4.1. Gleichgewichtsstudien an intakten Zellen

Gram-negative Bakterien sind empfindlich gegen eine Vielzahl hydrophiler Antibiotika (Tabelle 1), welche die äußere Membran durchdringen müssen, um an ihren Wirkungsort zu gelangen. Eine ähnliche Diffusion ist auch für die Nährstoffe einschließlich der Zucker, Aminosäuren und anorganischen Salze sowie für die Abfallprodukte des Zellstoffwechsels erforderlich. Diese Verbindungen gelangen anders als über den „hydrophoben Weg“ (Abschnitt 2) ins Innere. Wir hatten die Existenz eines unabhängigen „hydrophilen Weges“ postuliert, der gleichermaßen im Wildtyp und in den tief rauen Mutanten beschriften werden sollte. Zum Studium der Eigenschaften dieses postulierten Transportweges haben wir Oligosaccharide als permeierende Agentien benutzt^[49].

Um den Durchtritt durch die äußere Membran untersuchen zu können, mußten wir Oligosaccharide verwenden, welche die Cytoplasmamembran weder durchdringen können noch aktiv durch sie hindurchtransportiert werden; Oligosaccharide der Saccharose-Raffinose-Reihc erfüllen bei *S. typhimurium* diese Bedingungen. Da der Raum zwischen der äußeren Membran und der Cytoplasmamembran (der „periplasmatische Raum“) klein ist, war die Diffusion in diesen Raum schwierig zu messen^[50]. Wir haben ihn deshalb durch „Plasmolyse“ der Zellen in 0.3 bis 0.5 M NaCl- oder in 0.5 M Saccharose-Lösung^[49] vergrößert. Unter diesen Bedingungen nahm der periplasmatische Raum 40 bis 50 % des Zellvolumens ein, so

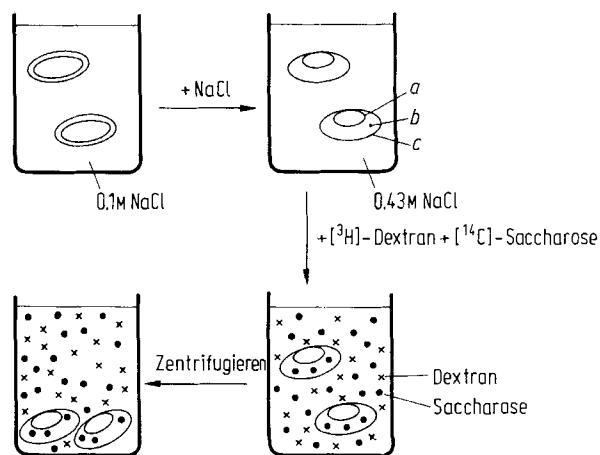


Abb. 9. Bestimmung der Permeabilität für Oligosaccharide unter Verwendung plasmolysierter Zellen. Intakte Bakterienzellen werden in NaCl- oder Saccharose-Lösungen mäßiger Konzentration suspendiert. Die gelösten Stoffe diffundieren durch die äußere Membran, können aber die Cytoplasmamembran (a) nicht durchdringen. Dadurch wird dem Cytoplasma Wasser entzogen; das Cytoplasma schrumpft, nicht aber die mechanisch stabile Zellwand (c), so daß sich in der „plasmolierten“ Zelle der Raum zwischen der Zellwand und der Cytoplasmamembran („periplasmatischer“ Raum (b)) stark vergrößert. Nach Zugabe von [³H]-Dextran und [¹⁴C]-Saccharose dringt zwar die Saccharose, nicht aber das Dextran in den periplasmatischen Raum ein. Durch Zentrifugation der Zellen und Bestimmung des [¹⁴C]- und [³H]-Gehalts im Überstand und im Zentrifugat kann dies quantifiziert werden.

daß das Eindringen der Oligosaccharide in ihn leicht gemessen werden konnte (siehe Abb. 9).

Unsere Untersuchungen ergaben für diesen Transportweg ein deutliches Größenlimit^[49]. Saccharose (Mol.-Gew. 342) und Raffinose (Mol.-Gew. 504) waren nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur vollständig in den periplasmatischen Raum eingedrungen, Stachyose (Mol.-Gew. 666) und größere Oligosaccharide nur zum Teil. Das partielle Eindringen dieser größeren Saccharide war offenbar der Diffusion in beschädigte Zellen zuzuschreiben^[49]. Wir schlossen daraus, daß die Zellwand von *S. typhimurium* für Disaccharide (Saccharose) und Trisaccharide (Raffinose) durchlässig ist, aber nicht für Tetrasaccharide und höhere Oligosaccharide. Offenbar existiert für die Raffinose-Reihe eine scharfe Ausschlußgrenze bei Molekulargewichten von 550–650.

Diese Ergebnisse waren mit denen einer wegweisenden Untersuchung von *Payne* und *Gilvarg*^[26] in Einklang, die fanden, daß Peptide mit Molekulargewichten über 600–650 nicht in *E.-coli*-Zellen eindringen können. Das Problem bestand jedoch darin, daß weder die Befunde von *Payne* und *Gilvarg* noch unsere Ergebnisse die Frage beantworten konnten, welche der beiden Schichten der Zellwand, die äußere Membran oder das Murein, die Sperre für hydrophile Moleküle bilden. Unsere späteren Untersuchungen zeigten jedoch, daß die äußere Membran – und nicht die Mureinschicht – als Molekularsieb und damit als Sperre wirkt^[52]. Bei einer Versuchsreihe war z. B. die Mureinschicht durch Behandlung mit Lysozym oder durch Kultivierung in Gegenwart von Penicillin beschädigt worden. Die aus solchen Bakterien erzeugten plasmolysierten Zellen oder Sphäroplasten besaßen trotz der beschädigten Mureinschicht weiterhin die beobachteten Molekularsiebeigenschaften.

Wie gelangen nun die hydrophilen Moleküle durch die äußere Membran? Ein Weg, der die Auflösung im Membraninneren erfordert, ist nicht gangbar, da hierbei sehr viele Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Oligosacchariden und den Wassermolekülen gebrochen werden müßten – ein thermodynamisch sehr ungünstiger Prozeß. Möglich scheinen nur die Diffusion durch wassergefüllte Poren oder die Träger-(Carrier-)vermittelte Diffusion zu sein. Die Diffusion der Oligosaccharide durch die äußere Membran verläuft sogar bei 0°C außerordentlich schnell^[49]. Diese Beobachtung sowie das übereinstimmende Größenlimit für recht unterschiedliche Arten von Verbindungen schien für die Beteiligung wassergefüllter Poren zu sprechen. Eine definitive Antwort erhalten wir durch Rekonstitutionsexperimente zu erhalten, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

4.2. Untersuchungen zur Rekonstitution

Wenn man die äußere Membran mit Detergentien auflöst und dann die Detergentien langsam in Gegenwart von Mg^{2+} entfernt, kann man die Bildung von Strukturen beobachten, die morphologisch der äußeren Membran gleichen^[53]. Diese Versuche haben gezeigt, daß die supramolekulare Struktur der äußeren Membran letztlich durch Struktur und Eigenschaften ihrer Bestandteile bestimmt wird. Aussagen über die Art der Wechselwirkung zwischen den beteiligten Molekülen oder gar über die Funktionen der Bestandteile waren allerdings kaum möglich.

Wir führten Rekonstitutionsexperimente durch, um die Komponenten zu bestimmen, von denen die charakteristische

Permeabilität der äußeren Membran für hydrophile Moleküle abhängt. Da sowohl die „hydrophile Permeabilität“ als auch das LPS ausschließlich Eigenschaften der äußeren Membran sind, haben wir zuerst geprüft, ob LPS an der Porenbildung beteiligt ist. Wir haben deshalb Liposomen hergestellt, die sowohl LPS als auch Phospholipide in der Doppelschicht enthielten, indem wir nach Kinsky et al.^[54] einen getrockneten Phospholipidfilm in einer wäßrigen LPS-Suspension resuspendiert haben. Diese Liposomen mit ihrer gemischten Doppelschicht aus Phospholipiden und LPS waren jedoch für hydrophile Verbindungen genauso undurchdringlich wie Liposomen, die nur aus Phospholipiden bestanden^[55]. Diese Ergebnisse führten zur alternativen Hypothese, daß die Proteine der äußeren Membran eine wesentliche Rolle bei der Porenbildung spielen könnten. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden in unserem Laboratorium^[56] Liposomen in Gegenwart von Proteinen der äußeren Membran hergestellt; diese Membranproteine wurden durch Extraktion mit Detergentien gewonnen. Die Entfernung der Detergentien durch längere Dialyse führte zur Präzipitation der Proteine, die durch Zentrifugation gesammelt und mit Ultraschall in wäßriger Pufferlösung resuspendiert wurden. Durch Zugabe dieser Proteinsuspension und einer wäßrigen Suspension von LPS zu einem getrockneten Phospholipidfilm konnten Membranvesikeln rekonstruiert werden (Abb. 10). Enthielt das Rekonstitutionsmedium

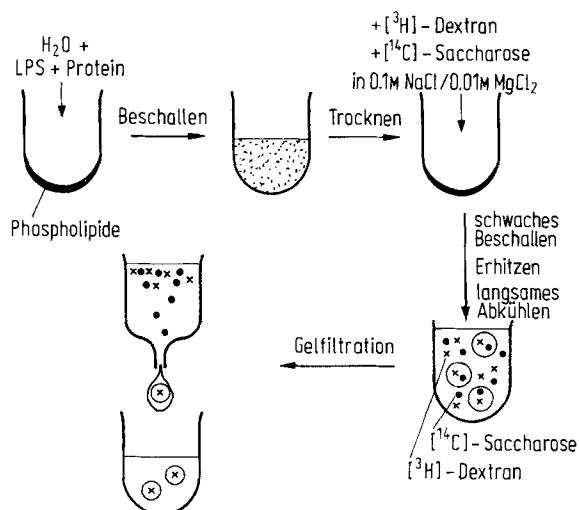


Abb. 10. Rekonstitution von Vesikeln der äußeren Membran. Ein trockener Phospholipidfilm wird in einer wässrigen Suspension von LPS und geeigneten Proteinen resuspendiert. Nach Beschaltung wird die Mischung getrocknet und der entstehende Film in einer Salzlösung, die [^3H]-Dextran und [^{14}C]-Saccharose enthält, resuspendiert. Durch Erhitzen und langsames Abkühlen erreicht man, daß die Vesikeln sich vollständig schließen und die Membrankomponenten sich optimal anordnen. Danach werden die Vesikeln, die im Inneren wahrscheinlich [^3H]-Dextran und [^{14}C]-Saccharose enthalten, auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Beim Eluieren der Säule werden sie sehr schnell von den gelösten Molekülen in der extravesikulären Flüssigkeit abgetrennt. Ist nun die Vesikelmembran für Saccharose, nicht aber für Dextran durchlässig, so wird die [^{14}C]-Saccharose während der Filtration aus den Vesikeln diffundieren, so daß die im Ausschlußvolumen gesammelten Vesikeln ein viel höheres $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis aufweisen als das verwendete Dextran-Saccharose-Gemisch (siehe auch Tabelle 2).

sowohl [^3H]-Dextran als auch [^{14}C]-Saccharose, so lagen beide Verbindungen nach der Rekonstitution wahrscheinlich sowohl im intra- als auch im extravesikulären Raum vor. Während der Abtrennung der Vesikel durch Gelfiltration über Sepharose 4B diffundierte ein großer Teil der intravesikulären [^{14}C]-Saccharose durch die das Protein enthaltende Membran, so daß das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis der zurückgewonne-

nen Liposomenfraktion um vieles höher lag als das Verhältnis im ursprünglichen Rekonstitutionsgemisch. Aus einer Kontrollmischung ohne Proteine entstanden Liposomen, die für Saccharose völlig undurchlässig waren, bei denen also das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis praktisch konstant blieb. In einem weiteren Kontrollexperiment erwiesen sich die Membranproteine aus roten Blutkörperchen von Schafen als völlig ungeeignet für die Herstellung Saccharose-durchlässiger Membranen. Wir schließen aus diesen Ergebnissen, daß die Proteine der äußeren Membran für die Bildung wassergefüllter Poren notwendig sind.

Anschließend haben wir teilweise gereinigte Präparationen der aus der äußeren Membran gewonnenen Proteine für die Rekonstitution verwendet, um die an der Porenbildung beteiligten Proteine zu identifizieren^[57]. Nach Behandlung der Zellhüllen von *S. typhimurium* mit Natriumdodecylsulfat (SDS) bei 37°C bleibt ein unlöslicher Komplex zurück, der sowohl Murein mit kovalent gebundenem Lipoprotein als auch die meisten Proteine mit Molekulargewichten um 34000–36000, d.h. die Porine, enthält^[58]. Wir fanden nun, daß der SDS-unlösliche Komplex die Porenbildung viel stärker fördert als die durch SDS herausgelösten Proteine. Daraufhin haben wir den SDS-unlöslichen Komplex mit Lysozym abgebaut und die Reaktionsprodukte durch Gelfiltration im SDS-Gradienten fraktioniert. Die resultierenden Proteinaggregate enthielten nur die Porine von *S. typhimurium*^[57] oder von *E. coli* K 12^[59] oder ähnliche, nur aus Porinen von *E. coli* B^[60] (Molekulargewichte um 36500) aufgebaute Oligomere. Alle diese Aggregate förderten bei den Rekonstitutionsexperimenten (Tabelle 2) die Porenbildung außerordentlich stark.

Tabelle 2. Ergebnis eines typischen Rekonstitutionsexperiments.

	[^3H]-Dextran [Imp/min]	[^{14}C]-Saccharose [Imp/min]
Aktivität in der Rekonstitutionsmischung	240000	260000
Aktivität in den Vesikeln nach Gelfiltration		
Exp. I (ohne Porin)	2400	2100
Exp. II (mit Porinoligomeren, 10 µg)	3350	<30

[a] Membranvesikel wurden aus 0.8 mg LPS und 0.8 mg Phospholipiden in Gegenwart von [^3H]-Dextran und [^{14}C]-Saccharose, ohne Porin oder mit Porinoligomeren, rekonstituiert [57]. Bei der Rückgewinnung der Vesikel wurden die radioaktiven Saccharide abgetrennt, die durch die Vesikelmembran ausdiffundieren konnten (siehe Abb. 10).

Inouye^[61] hat aufgrund von theoretischen Überlegungen vorgeschlagen, daß Oligomere aus den Lipoproteinen des Mureins in ihrem Inneren wassergefüllte Kanäle enthalten und deshalb Poren bilden, welche die gesamte äußere Membran durchziehen. Unser aktiver Komplex enthielt jedoch nur sehr wenig Lipoprotein. Sogar das Porinoligomer aus einer Mutante^[14] von *E. coli* K 12, die überhaupt kein Lipoprotein enthält, erwies sich als vollständig aktiv^[60]. Außerdem zeigten Aggregate, die hauptsächlich aus Lipoproteinen neben wenig Porin bestanden, nur ein sehr geringes Porenbildungsvermögen; gereinigtes Lipoprotein war inaktiv.

Die Poren, die durch Beimischung der Porine erzeugt werden konnten, hatten die erwartete Größe, d.h. sie ermöglichten die freie Diffusion von Saccharose und Raffinose, aber nicht von Stachyose und größeren Oligosacchariden. Auch die gebildeten Vesikel waren für eine Vielfalt kleiner, hydrophiler Moleküle zugänglich, einschließlich Galactose, Glucosamin, Glucose-1-phosphat, Lysin, Tryptophan, Uridin, UMP, GDP

sowie Polyethylenglycol (Mol.-Gew. 600). Polyethylenglycol mit dem Molekulargewicht 1540 konnte dagegen nicht eindringen^[57]. Da hier Komplexe, die nur aus einer bis drei Proteinspezies bestehen, das Eindringen so unterschiedlicher Verbindungen ermöglichen, kann der Diffusion kein trrägervermittelter Transport zugrunde liegen, bei dem für jede Verbindung ein spezifisches „Carrier“-Protein erforderlich ist. Die fehlende Spezifität ist in der Tat einer der stärksten Hinweise auf die Beteiligung wassergefüllter Poren.

Die Fähigkeit des Porins zur Bildung von Kanälen ist kürzlich auf andere Art bestätigt worden. Benz et al.^[62] gaben eine stark verdünnte Lösung (z.B. 0.5 ng/ml) von Porin aus *E. coli* B zu einer wäßrigen Lösung, in die eine planare Membran aus Lipid-Doppelschichten gehängt worden war. Interessanterweise nahm die Leitfähigkeit stufenweise zu. Das Inkrement von 1.7 Nanosiemens pro Stufe (in 1 M KCl) soll durch den Einbau eines Porinmoleküls oder -oligomers in die Membran bewirkt werden.

Die Rekonstitution hydrophiler Poren ist auch mit den Proteinen der äußeren Membran anderer Bakterien als *E. coli* oder *S. typhimurium* gelungen^[63,64]. Eine teilweise Rekonstitution aus isolierten Phospholipiden, LPS und einem kleinen Anteil an Fragmenten der äußeren Membran konnte kürzlich auch mit Komponenten von *P. aeruginosa* erreicht werden^[65]. Interessanterweise lassen die Ergebnisse vermuten, daß die Ausschlußgrenze der Poren von *P. aeruginosa* bei einem Molekulargewicht von mehreren tausend liegt, also wesentlich höher als bei den Darmbakterien.

4.3. Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit an intakten Zellen

Falls die Poren in der äußeren Membran von Porinmolekülen umgeben sind, sollten Mutationen, die zu porinfreien Bakterien führen, letal sein. Nach Verlust dieser Proteine^[11,13] oder aller „Haupt“-Proteine^[12] konnte man jedoch keine Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit feststellen. 1977 wurde dieses Rätsel durch Anwendung zweier Methoden gelöst. Mit jeder dieser Methoden ließ sich statt der *Gleichgewichtsverteilung* der gelösten Stoffe (Abschnitt 4.1) die *Geschwindigkeit der Diffusion* durch die äußere Membran bestimmen. Zugleich erhielten wir weiteren Einblick in die Funktion der Poren der äußeren Membran.

Die Diffusion durch die äußere Membran verläuft so schnell, daß sie mit den oben beschriebenen Gleichgewichtsmethoden nicht gemessen werden kann. Zimmermann und Rosselet^[66] haben kürzlich eine elegante Methode zur Messung solcher Diffusionsgeschwindigkeiten entwickelt. Sie maßen die Geschwindigkeit der Hydrolyse von β -Lactam-Antibiotika (z.B. Penicilline und Cephalosporine) sowohl durch intakte als auch durch aufgebrochene *E. coli*-Zellen, die im periplasmatischen Raum ein β -Lactam-abbauendes Enzym, β -Lactamase, enthielten. In diesem Fall sollte bei intakten Zellen beim Fließgleichgewicht die Geschwindigkeit der Diffusion durch die äußere Membran gerade gleich der Hydrolysegeschwindigkeit im periplasmatischen Raum sein. Zimmermann und Rosselet^[66] konnten nun zeigen, daß in der Tat bei intakten Zellen die Hydrolysegeschwindigkeit mit der Vorhersage übereinstimmt und sich unter der Annahme berechnen läßt, daß die Diffusion und die Hydrolyse dem Fickschen Gesetz bzw. der Michaelis-Menten-Kinetik folgen (Abb. 11). Ich möchte unterstreichen, daß diese quantitative Behandlung für die Diskussion der

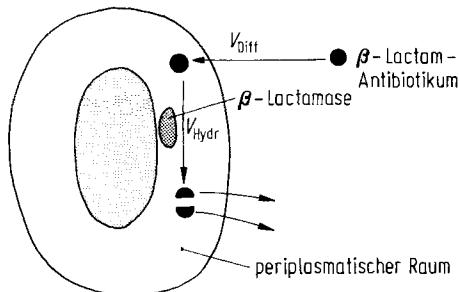


Abb. 11. Methode von *Zimmermann* und *Rosselet* [66] zur Bestimmung der Permeabilität der äußeren Membran. Gibt man Substrate (z. B. β -Lactam-Antibiotika) zu intakten Bakterienzellen, die hydrolytische Enzyme (z. B. β -Lactamase) mit bekannten V_{max} - und K_M -Werten im periplasmatischen Raum enthalten, so kann man die Permeabilität der äußeren Membran aus den beobachteten Hydrolysegeschwindigkeiten berechnen. Der Ausstrom der Hydrolyseprodukte sollte – wegen der geringeren Größe der Produkte – viel schneller als der Einstrom des Substrats sein und deshalb im Fließgleichgewicht keinen merkbaren Einfluß auf die Kinetik haben. Im Fließgleichgewicht gilt $V_{\text{Diffusion}} = V_{\text{Hydrolyse}}$. Damit läßt sich der Permeabilitätskoeffizient P aus V_{hydr} berechnen.

Permeabilität der äußeren Membran unbedingt notwendig ist. So bedeutet z. B. die „Kryptizität“ (Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten in intakten und in aufgebrochenen Zellen) bei willkürlich gewählten Substratkonzentrationen sehr wenig, da sich die Zahlenwerte der „Kryptizität“ beliebig mit der benutzten Substratkonzentration ändern können^[66].

Wir haben deshalb ebenfalls die Methode von *Zimmermann* und *Rosselet* angewendet und die Permeabilitätskoeffizienten P der äußeren Membran in mehreren *S.-typhimurium*-Stämmen bestimmt^[67]. Wir fanden, daß bei Mutanten mit verringertem Gehalt an allen drei Porinen die Permeabilität der äußeren Membran für Cephaloridin, ein hydrophiles β -Lactam mit dem Molekulargewicht 415, auf weniger als 10 % des Wertes für den Wildtyp fiel. Ähnliche Ergebnisse an *E. coli* K 12 wurden unabhängig von anderen Arbeitsgruppen erhalten, die das Problem von der anderen Seite angingen: Sie prüften die Membranveränderungen in „kryptischen“ Mutanten. Intakte Zellen dieser Mutanten, die *Beacham* et al.^[68] untersuchten, zeigten bei der Hydrolyse von Nucleotiden durch periplasmatische Nucleotidasen erhöhte Halbsättigungs-(oder Michaelis-)Konstanten (K_M) neben unveränderter Maximalgeschwindigkeit (V_{max}). Die äußere Membran dieser Mutanten war durch einen drastisch verringerten Poringehalt charakterisiert^[68].

Bei der gerade besprochenen Methode wurde das Problem, die Geschwindigkeit der Diffusion durch die äußere Membran zu bestimmen, durch Verwendung von Enzymen gelöst, welche die Substrate hydrolysierten, sobald sie in den periplasmatischen Raum gelangten. Voraussetzung für diese Versuche zur Bestimmung der Permeabilität der äußeren Membran ist demnach der schnelle Abbau der in den periplasmatischen Raum eindiffundierenden Substratmoleküle. Nur unter diesen Bedingungen hängt die Gesamtgeschwindigkeit des Prozesses praktisch ausschließlich von der Geschwindigkeit der Diffusion durch die äußere Membran ab. Damit wird die zuletzt genannte Geschwindigkeit messbar. Die Substrate lassen sich aber auch durch Systeme für den aktiven Transport entfernen, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Auf dieser Möglichkeit basiert die zweite zu beschreibende Methode: das Studium der Transportkinetik in intakten Zellen. Die Geschwindigkeit der Diffusion (V) durch die äußere Membran ist durch das Ficksche Gesetz gegeben. Bezeichnet man die

Substratkonzentrationen im äußeren Medium und im periplasmatischen Raum mit C_a bzw. C_p , so gilt

$$V = P \cdot A \cdot (C_a - C_p)$$

wobei P und A der Permeabilitätskoeffizient bzw. die Membranfläche sind. Die Geschwindigkeit des aktiven Transports folgt der Michaelis-Menten-Kinetik, d. h. es gilt

$$V = C_p \cdot V_{max} / (K_M + C_p)$$

Im Fließgleichgewicht sind beide Geschwindigkeiten gleich groß, so daß wir C_p eliminieren können. Dies führt zu

$$V = \frac{1}{2} [V_{max} + P \cdot A \cdot K_M + P \cdot A \cdot C_a - \sqrt{(V_{max} + P \cdot A \cdot K_M + P \cdot A \cdot C_a)^2 - 4 \cdot C_a \cdot P \cdot A \cdot V_{max}}]$$

Diese Gleichung sieht ziemlich unhandlich aus. Setzt man jedoch plausible Werte für A , K_M und V_{max} ein, so ergibt sich, daß sich mit abnehmender Permeabilität (P) der äußeren Membran die Gesamttransportgeschwindigkeit (V) ändert. Diese Änderungen sprechen für einen erhöhten „ K_M “-Wert für den Transport (K'_M) in intakten Zellen ohne gleichzeitige Änderungen von V_{max} (Abb. 12). Demnach wird sich vermutlich

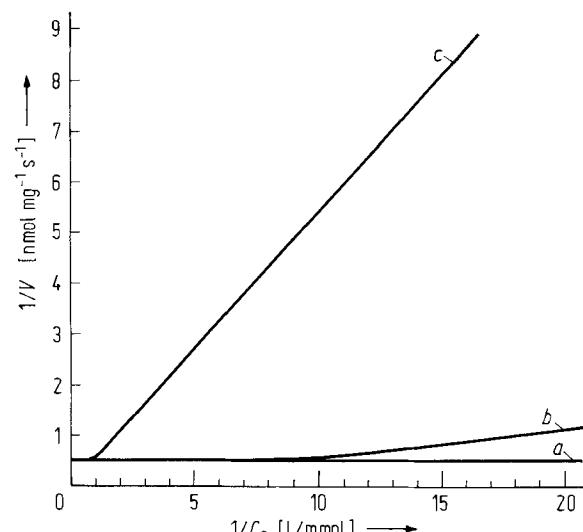


Abb. 12. Vorhergesagtes Verhalten von Transportsystemen in intakten Zellen. Die Gesamttransportgeschwindigkeit wurde für mehrere Werte von C_a (Substratkonzentration im äußeren Medium) unter der Annahme berechnet, daß die Substrate zunächst entsprechend ihrem Permeabilitätskoeffizienten P durch die äußere Membran diffundieren und anschließend aktiv durch die darunterliegende Cytoplasmamembran transportiert werden. Der letzte genannte Prozeß soll durch eine maximale Geschwindigkeit (V_{max}) von $2 \text{ nmol mg}^{-1} \text{s}^{-1}$ (bezogen auf das Trockengewicht) und die Halbsättigungs-(Michaelis-)Konstante (K_M) von $1 \mu\text{mol/l}$ charakterisiert sein. Die Rechnung wurde für $P = 1.4 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$ (Kurve a, „theoretische“ Permeabilität der äußeren Membran von *E. coli* für Glucose; $K'_M = 1.5 \mu\text{mol/l}$ [70]) sowie für 1 % bzw. 0.1 % dieses Wertes durchgeführt. Diese niedrigen P -Werte sollen für Mutanten gelten, die 1 % bzw. 0.1 % der Normalmenge an Porinen produzieren (Kurven b und c, $K'_M = 55$ bzw. $550 \mu\text{mol/l}$). Bei den Mutanten bleibt also der V_{max} -Wert des Gesamttransportprozesses gleich, während der scheinbare K'_M -Wert (d. h. der Wert von C_a bei halbmaximaler Transportgeschwindigkeit in intakten Zellen) zunimmt. Außer bei sehr hohen C_a -Werten verlaufen die Kurven linear.

ein Mangel an Porin nur bei niedrigen Substratkonzentrationen (oder bei hohen $1/C_a$ -Werten) in der Transportgeschwindigkeit bemerkbar machen. Außerdem wird der Effekt bei niedrigen C_a -Werten kaum erkennbar sein, falls der V_{max} -Wert des aktiven Transportsystems (der inneren Membran) niedrig ist.

Tatsächlich konnte von Meyenburg^[69] vor einiger Zeit Mutanten mit der vorhergesagten Änderung isolieren – d. h. erhöhten „ K_M “-Werten für den Transport einer Reihe von Substanzen. Bei diesen Mutanten war kein Defekt der äußeren Membran erwartet worden. Diese Mutanten haben einen Mangel an Porinen, und zwar am 36.5 K-Porin im Fall von *E. coli* B/r und an den beiden Porinen im Fall von *E. coli* K 12^[70]. Da die Porin-Mangelmutanten erhöhte „ K_M “-Werte für den Transport einer Vielfalt von Verbindungen aufweisen (mehrere Zucker, ein Zuckeralkohol, ein Zuckerkohlenstoff, Aminosäuren, ein Pyrimidin und sogar anorganische Anionen wie Phosphat und Sulfat)^[73], wird durch diese Versuche zugleich die wichtige Rolle der Porine für die Diffusion hydrophiler Substanzen durch die Membran deutlich. Nehmen wir weiterhin an, daß die aktiven Transportsysteme in der Cytoplasmamembran sehr große Affinitäten (gleichbedeutend mit niedrigen K_M -Werten) für das Substrat haben, so können wir den Mindestwert für den Permeabilitätskoeffizienten für verschiedene Substrate abschätzen^[74].

Die Transportstudien sowie die Untersuchungen mit β -Lactamase in unserem Laboratorium haben bisher folgende Informationen geliefert:

a) Die Diffusionsgeschwindigkeit hydrophiler Substanzen hängt recht wenig von der Temperatur ab – im Gegensatz zur Diffusionsgeschwindigkeit hydrophober Substanzen (Abschnitt 3). Für das β -Lactam-Antibioticum Cephaloridin ergab sich ein Q_{10} -Wert von etwa 2^[71]; diese geringe Temperaturabhängigkeit ist ein starker Hinweis darauf, daß die Permeation durch wassergefüllte Poren stattfindet.

b) Am bemerkenswertesten sind die sehr unterschiedlichen Permeabilitätskoeffizienten der einschleusbaren Substanzen. So beträgt z. B. bei Wildtypzellen der Permeabilitätskoeffizient für Lactose $\geq 1 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$, während er für 6-Aminopenicillansäure viel geringer ist ($1.4 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$)^[72], obwohl diese nur ein Molekulargewicht von 216 hat (Lactose: 342). Die Faktoren, welche die Eindringgeschwindigkeit in diese Poren beeinflussen, verstehen wir noch nicht ganz; von einigen Parametern ist bekannt, daß sie wichtig sind. Der erste Faktor ist offenbar die Molekulgröße. Bei den Experimenten zur Bestimmung des scheinbaren K_M -Wertes für den Transport ergibt die Rechnung nur minimale, mit großer Unsicherheit behaftete P -Werte für die äußere Membran, wenn man die Werte für Wildtypzellen zugrundelegt. Dagegen ist die Gesamttransportgeschwindigkeit in intakten Zellen von Porin-Mangelmutanten (*omp B*) praktisch durch die Geschwindigkeit der Diffusion durch die äußere Membran begrenzt, vor allem bei kleinen C_a -Werten. Dies ermöglicht eine ziemlich genaue Berechnung der P -Werte^[70]. Da das *omp-B*-Gen sehr wahrscheinlich ein Regulatorgen ist^[73], werden die Mutanten vermutlich eine kleinere Zahl unveränderter Poren erzeugen. Wenn wir demnach annehmen, daß die hydrophilen Substanzen durch die wenigen verbliebenen Porinkanäle die äußere Membran der Mutanten durchqueren, so weisen die Daten in Abbildung 13 deutlich auf den Einfluß der Molekulgröße hin. Außerdem ergibt sich eine recht gute Anpassung an die nach Renkin^[74] berechneten Werte. Die Gleichung von Renkin berücksichtigt sowohl die Stöße zwischen Molekülen endlicher Größe und dem Rand kleiner Poren als auch die Viskosität der Porenwände.

Der zweite Faktor ist die Hydrophobie. Hydrophobe Antibiotika können die äußere Membran der Wildtypen von *E. coli* und *S. typhimurium* nicht schnell passieren, auch wenn

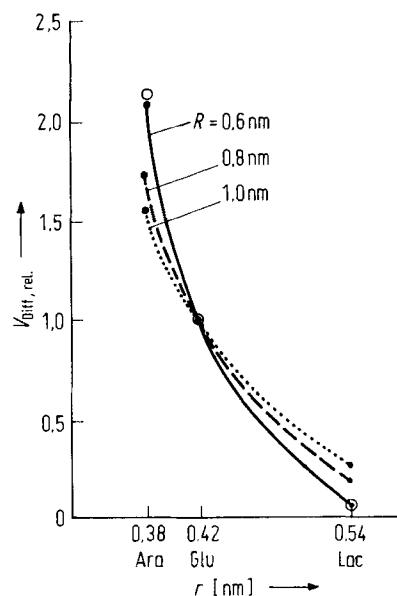


Abb. 13. Berechnete und gemessene Permeabilität gelöster Moleküle unterschiedlicher Größe. Die berechneten Werte (Kurven) wurden erhalten, indem die (freien) Diffusionskoeffizienten von Arabinose (Ara), Glucose (Glu) und Lactose (Lac) mit den Renkin-Faktoren für mehrere Porengrößen R multipliziert wurden (Hydratationsradien r siehe [75]). Die beobachtete Permeabilität (○) wurde aus „Wachstums- K_M “-Werten der auf diesen drei Zuckern kultivierten Porin-Mangelmutanten CM 7 (*omp B*) abgeleitet sowie aus der Wachstums geschwindigkeit und der Ausbeute (Einzelheiten siehe [70]). Als Maß der Permeabilität dient die relative Diffusionsgeschwindigkeit $V_{\text{diff}, \text{rel.}}$.

ihre Größe deutlich unter der Ausschlußgrenze der Poren liegt^[32]. Dies spricht dafür, daß die Poren eine Tendenz zum Ausschluß hydrophober Substanzen haben – eine Idee, die Zimmermann und Rosselet^[66] direkt prüften. Sie verglichen die Permeabilität der äußeren Membran von *E. coli* für eine Reihe halbsynthetischer Cephalosporinderivate; ihre Daten (siehe Abb. 14) bestätigen die umgekehrte Beziehung zwischen

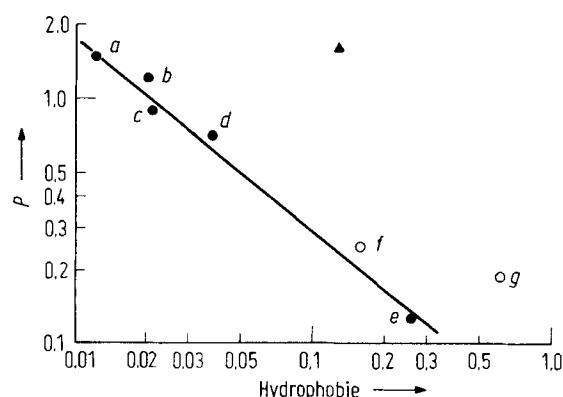


Abb. 14. Permeabilität (P , willkürliche Einheiten) der Poren in Abhängigkeit von Hydrophobie und Ladung. Gemessen wurde die Geschwindigkeit der Diffusion von β -Lactam-Antibiotica durch die äußere Membran von *E. coli* (nach [66]). Die Verteilungskoeffizienten (als Maß der Hydrophobie) wurden in Isobutanol/0.02 M Phosphatküller, pH = 7.4, in Gegenwart von 0.9 % NaCl bei 37°C bestimmt. ● monoanionische Cephalosporine (a: C 49288; b: C 49753, c: Cephacetril, d: Cephazolin, e: Cephalothin), ▲ zwitterionisches Cephalosporin (Cephaloridin), ○ monoanionische Penicilline (f: Ampicillin, g: Benzylpenicillin).

Hydrophobie und Diffusionsgeschwindigkeit (durch die Poren der Membran) zumindest für einige monoanionische Cephalo-

sporine. Es ist noch nicht klar, warum die Poren hydrophobe Moleküle ausschließen. Denkbar wäre, daß diese hydrophoben Antibiotica deshalb nicht in die Poren eindringen können, weil sie Micellen bilden. Nun bilden diese Substanzen tatsächlich bei sehr hohen Konzentrationen Micellen, doch scheinen sie bei den für Permeabilitätsstudien verwendeten Konzentrationen hauptsächlich als Monomere vorzuliegen^[71]. Hier sollte man aber berücksichtigen, daß sich der Poredurchmesser nicht sehr stark vom Durchmesser der gelösten Moleküle unterscheidet. Die Porenwände sind vermutlich hydrophil oder neigen zur Bildung von Wasserstoffbrücken, so daß die Überführung hydrophiler Moleküle aus der wäßrigen Lösung in das Poreninnere in summa ohne das zusätzliche Lösen vieler Wasserstoffbrücken erfolgen kann. Man wird vernünftigerweise erwarten, daß in der „leeren“ Pore ziemlich viele Wasserstoffbrücken zwischen den Porenwänden und Wassermolekülen bestehen, so daß das Wasser in den Kanälen stärker über Wasserstoffbrücken verbunden ist und mehr Struktur aufweist als das umgebende Wasser. In die Poren eindringende hydrophobe Moleküle müßten diese Struktur zerstören, was energetisch ungünstig ist.

Die offenbar größeren Poren bei *P. aeruginosa* könnten der Grund für die leichtere Diffusion hydrophober Moleküle sein^[65]. *P. aeruginosa* kann auf vielen organischen Säuren und Alkoholen^[76] und bei Anwesenheit eines passenden „abbauenden“ Plasmids sogar auf Paraffinen und Campher wachsen^[77]. Möglicherweise könnte eine größere Pore auch hydrophobe Moleküle zusammen mit ihrer „Hülle“ aus strukturierter Wassermolekülen durchlassen, ja sogar ganze Micellen.

Dritter Faktor ist die elektrische Ladung. Bei den Experimenten von *Zimmermann* und *Rosselet*^[66] durchdrang das zwitterionische Cephaloridin die äußere Membran sehr viel schneller als das vergleichbar hydrophobe monoanionische Cephalothin (Abb. 14). Möglicherweise enthalten die Porenwände mehrere anionische Gruppen; in diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß die Porine sowohl bei *E. coli*^[58, 78] als auch bei *S. typhimurium*^[79] die sauersten Proteine in der äußeren Membran sind. Ein beträchtlicher Teil des Widerstands gegen anionische Moleküle mag jedoch auch daher röhren, daß der periplasmatische Raum viele negativ geladene Makromoleküle enthält; das resultierende Donnan-Potential sollte den Ausstrom diffusionsfähiger Anionen aus dem periplasmatischen Raum begünstigen^[51].

c) Diese Betrachtungen lassen uns auch die physiologischen Funktionen der Porine verstehen. In einer einzigen Zelle existieren etwa 10^5 Porine. Bei Zellen, die in einem Labormedium wachsen, das die übliche Menge an Glucose (z. B. 0.2 %) enthält, sind natürlich weit mehr Porine vorhanden, als für den Einstrom von Glucose für ein exponentielles Wachstum mit Verdoppelungszeiten von etwa 45 min notwendig wären (Berechnungen siehe^[70]). Die Erzeugung dieser vielen Porine ist allerdings keine Verschwendug, da sie unter zwei Bedingungen benötigt werden: Erstens werden Porine für die Diffusion von weniger permeablen Verbindungen gebraucht. Nach der Renkin-Gleichung sollte die Diffusionsgeschwindigkeit von Disacchariden ungefähr 5 % der von Glucose betragen. Hydrophobie und elektrische Ladungen werden die Diffusionsgeschwindigkeit noch einmal um einige Größenordnungen verringern; dies gilt z. B. für Peptide, die Hauptnahrungsquelle für Darmbakterien in ihrem natürlichen Lebensraum. Es scheint daher, daß für die Diffusion einiger Verbindungsklassen tatsächlich 10^5 Porinmoleküle notwendig sind. Zwei-

tens ist die Konzentration der Nährstoffe wichtig. Die Geschwindigkeit der passiven Diffusion ist der Konzentrationsdifferenz beiderseits der Membran proportional. Obwohl also 10^5 Porinmoleküle ein unnötiger Aufwand in einem Medium mit 0.2 % (etwa 10^{-2} mol/l) Glucose sein mögen, werden alle diese Porinmoleküle benötigt, sobald *E. coli* versucht, seine maximale Wachstumsgeschwindigkeit auch in Gegenwart von nur 10^{-5} mol/l Glucose aufrecht zu erhalten – derart verdünnten Glucose-Lösungen ist *E. coli* in seiner natürlichen Umgebung vermutlich sehr häufig ausgesetzt^[80].

Zusätzlich zu unseren Ergebnissen^[70] wurde in anderen Laboratorien gefunden, daß Porin-Mangelmutanten weniger permeabel für Nährstoffe und Inhibitoren wie Cu^{2+} , Ag^+ , Tetracyclin und Chloramphenicol sind^[81]. Diese Befunde sind mit der fehlenden Spezifität der Porinkanäle in Einklang, wie sie bei den Rekonstitutionsexperimenten beobachtet wurde, und weisen darauf hin, daß die meisten kleinen, hydrophilen Moleküle die Membran durch diese Kanäle durchqueren (vgl. jedoch Abschnitt 5).

Sowohl *E. coli* K 12 als auch *S. typhimurium* LT 2 synthetisieren mehr als eine Porinspezies. Da die Biosynthese der Spezies durch die Umgebungsbedingungen reguliert wird^[82], erscheint es möglich, daß jede Spezies Kanäle mit etwas unterschiedlichen Eigenschaften bildet. Alle bisherigen Rekonstitutionsuntersuchungen ergaben jedoch für die drei Spezies von *Salmonella*-Porinen die gleichen Ausschußgrenzen^[83].

Inouye^[61] hatte aufgrund der Aminosäuresequenz vorgeschlagen, daß das Lipoprotein des Mureins Oligomere mit einem zentralen Kanal bilden könnte, die als Poren durch die Membranen führen sollten. Bisher sind keine experimentellen Anhaltspunkte für diese Hypothese bekannt geworden. An einer Mutante ohne Lipoprotein^[14] haben wir kürzlich durch Messung der Diffusion von 6-Aminopenicillansäure^[72] zeigen können, daß sich die Permeabilität der äußeren Membran für hydrophile Verbindungen bei Abwesenheit dieses Proteins nicht verringert.

4.4. Strukturelle Grundlagen der Permeabilität für hydrophile Moleküle

Wir haben gesehen, daß spezielle Proteine, die Porine, die äußere Membran für hydrophile Moleküle durchlässig machen. Falls diese Proteine Kanäle bilden, die durch die gesamte Membran führen, müßten sie eine der Membrandicke entsprechende Ausdehnung haben. Tatsächlich ragen Teile der Porine über die äußere Oberfläche der äußeren Membran hinaus, wie man aus der Bindung makromolekularer Markierungsreagentien^[84], porinspezifischer Bakteriophagen^[85] und Antikörper^[86] ersieht. Zugleich haben die Porine eine starke Affinität zur darunterliegenden Mureinschicht^[58, 87]. Man glaubt deshalb, daß sie auch an der inneren Oberfläche aus der äußeren Membran herausragen.

Wie sind nun diese Proteine in der Membranebene angeordnet? Durch Quervernetzung mit bifunktionellen Reagentien^[88] und in Sedimentationsgleichgewichts-Untersuchungen^[89] konnte gezeigt werden, daß die in 0.1–0.2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) bei Raumtemperatur gelösten Porine offenbar Trimere sind. Auch in der intakten äußeren Membran scheinen sie als Trimere vorzuliegen, da durch Quervernetzung an Zellhüllen hauptsächlich Porindimere und -trimere entstanden^[88].

Durch zwei Methoden konnten diese Porinoligomere auch in der äußeren Membran „sichtbar“ gemacht werden. Ueki et al.^[90] haben die Röntgen-Kleinwinkelstreuung orientierter Schichten der intakten äußeren Membran von *S. typhimurium* untersucht. Sie erhielten eine Serie von Reflexen, die regelmäßig angeordneten Proteinaggregaten von etwa 10 nm Durchmesser zu entsprechen schienen. Von besonderem Interesse ist ein zentrales, elektronendurchlässiges Areal oder ein „Loch“ von etwa 5 nm Durchmesser. An der äußeren Membran einer Porin-Mangelmutante konnten keine solchen Reflexe registriert werden, d. h. diese Oligomere können nur aus den Porinen entstehen. Die zweite Methode, die Elektronenmikroskopie nach dem Gefrierbrechen, ergab etwa 10^4 Membran-„Partikel“ auf $1\mu\text{m}^2$ der konkaven Bruchfläche der äußeren Membran (vgl. Abb. 7 und 8)^[20-22]. Aus der Gesamtzahl von Porinmolekülen pro Zelle^[58] und der Oberfläche einer *E.-coli*-Zelle würde man etwa 10^4 Porintrimere auf $1\mu\text{m}^2$ Fläche erwarten. Damit entspricht wahrscheinlich die Mehrzahl dieser Partikel Porintrimeren (oder deren Komplexen mit LPS). Ihre Größe (8–10 nm) stimmt ebenfalls mit der durch Röntgen-Kleinwinkelstreuung bestimmten Größe der Porinoligomere überein.

Enthält nun jedes Monomer einen Kanal, oder bildet sich der Kanal in der Mitte erst nach Assoziation von drei Untereinheiten? Eine eindeutige Antwort steht noch aus. Bis her ist es noch nicht gelungen, für Saccharose durchgängige Membranen aus monomeren Porinen zu rekonstituieren^[89]. Andererseits sind einige publizierte Ergebnisse mit der Ein-Porin-Ein-Kanal-Hypothese zumindest konsistent. Wird die Zellhülle von *E. coli* B bei Raumtemperatur mit SDS extrahiert, so bleiben Mureinblättchen mit hexagonal angeordneten Porinoligomeren zurück^[58]. Diese regelmäßige Anordnung ermöglichte Steven et al.^[191] die Anwendung von Bildverstärkungsmethoden bei der Elektronenmikroskopie. Die nach Negativfärbung erhaltenen Bilder zeigten Proteintrimeren, die in der Mitte drei Löcher mit jeweils 2 nm Durchmesser enthielten. Nach Steven et al. sind diese Löcher mit Lipoproteinen gefüllt, doch klingt dies unwahrscheinlich, da dann die Wände hydrophob sein müßten und die hydrophilen Teilchen des Negativfarbstoffs abstoßen sollten. Falls jedes dieser Löcher einem Kanal entspräche, würde ihre Größe sehr gut mit der aus den Diffusionsmessungen gewonnenen übereinstimmen, die einen Durchmesser von etwa 1.2 nm ergeben hatten (Abschnitt 4.3). Möglicherweise könnte dieses „Kanaltriplett“ bei der Röntgen-Kleinwinkelstreuung – schon wegen der geringeren Auflösung (von etwa 2 nm) bei dieser letzteren Methode^[90] – als ein einziges großes Loch erscheinen.

5. Spezifische Diffusionsprozesse

Bradbeer et al.^[92] beobachteten als erste, daß einige Proteine der äußeren Membran sich am spezifischen Transport von Nahrungsstoffen beteiligen. So ist ein Vitamin-B₁₂-bindendes Protein, das in der äußeren Membran vorkommt, für den Transport dieses Substrats in das Cytoplasma notwendig. Dieser Entdeckung folgten viele weitere Arbeiten, in denen vielerlei Systeme beschrieben und ihre Komponenten definiert wurden (Tabelle 3).

Wir haben im vorigen Abschnitt gesehen, daß die passive Diffusion durch die Porinkanäle wahrscheinlich ausschlaggebend ist, wenn die gelösten Moleküle groß sind, wenn ihre

Tabelle 3. An spezifischen Diffusionsprozessen beteiligte Proteine der äußeren Membran.

erleichtert die Diffusion von:	Mol.-Gew. der Proteine:	Proteine wirken als Rezeptor für:	Lit.
Maltose und Maltodextrine	47000	λ	[93]
Ferrichrom	78000	T5, T1, Ø 80, Colicin M	[94]
Fe ³⁺ -Enterochelin	81000	Colicin B	[95]
Nucleosiden	25000	T6, Colicin K	[96]
Vitamin B ₁₂	60000	BF23, Colicine der E-Gruppe	[92, 97]

Konzentration in der umgebenden Lösung normalerweise niedrig ist, oder wenn die Geschwindigkeit des aktiven Transports sehr hoch ist. In diesen Fällen sollte es spezielle Systeme für den Transport durch die äußere Membran geben, und tatsächlich sind in allen in Tabelle 3 aufgeführten Fällen eine oder mehrere der obigen Bedingungen erfüllt. So sind z. B. sowohl Eisenchelatkomplexe (Ferrichrom, Fe³⁺-Enterochelin; Mol.-Gew. 740 bzw. 746) als auch Vitamin B₁₂ (Mol.-Gew. 1357) sehr große Moleküle und liegen üblicherweise nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Oligosaccharide vom Typ des Maltodextrins sind ebenfalls groß. Obwohl monomere Maltose durch die Porinkanäle diffundieren kann^[93b], wird für Disaccharide die Diffusion der entscheidende Schritt, sobald deren äußere Konzentration unter etwa 10^{-4} mol/l fällt (siehe Abschnitt 4.3). Demnach können die Porinkanäle bei niedrigen Substratkonzentrationen ihre Funktion als Maltosetransportsystem nicht mehr erfüllen. Dabei hat dieses System eine sehr hohe Affinität für Maltose (K_{diss} des periplasmatischen, maltosebindenden Proteins für Maltotriose: 2×10^{-7} mol/l^[93b]). Erstaunlicherweise existiert ein eigenes Protein für den Transport von nicht sehr großen Nucleosiden (Mol.-Gew. < 300). Dieser Befund hängt vermutlich mit der Tatsache zusammen, daß der Nucleosidtransport hinsichtlich Affinität und Geschwindigkeit zu den wirksamsten Transportsystemen in *E. coli* gehört^[80].

Das Maltoosesystem, der „ λ -Rezeptor“, transportiert nicht nur Maltose, sondern auch Maltotriose und möglicherweise auch höhere Oligosaccharide^[93b]. Da dieses Protein viele Eigenschaften des Porins besitzt^[93c], wirkt es möglicherweise auch wie eine große Pore mit Auslesefunktion. In Einklang mit dieser Annahme ist die Beobachtung, daß es auch bei Porin-Mangelmutanten die wenn auch nur sehr langsame Diffusion von Glucose und Lactose (nicht aber von Histidin) ermöglicht^[98]. Kürzlich hat man auch zeigen können, daß der λ -Rezeptor ionenpermeable Kanäle in planaren Lipiddichten bildet^[99]. Auch bei den Transportprozessen, die von anderen spezifischen Transportproteinen abhängen, könnten Poren eine Rolle spielen. Darüber ist aber bisher nur wenig bekannt.

6. Die Durchschleusung von Makromolekülen

Unter bestimmten Bedingungen können offenbar auch Makromoleküle die Barriere der äußeren Membran überwinden^[100]. Dies ist nicht etwa mit dem Fehlen irgendeiner spezifischen Komponente der äußeren Membran korreliert, sondern wird beobachtet, wenn die Stabilität der äußeren Membranstruktur herabgesetzt ist. Höchstwahrscheinlich entsteht hier

die „Undichtigkeit“ durch das vorübergehende Zerreissen und Wiederschließen der Membran.

7. Schlußbetrachtung

Wegen ihrer Lage außerhalb der Cytoplasmamembran war die äußere Membran gezwungen, ungewöhnliche Permeabilitätseigenschaften zu entwickeln. So ist sie für kleine hydrophile Moleküle durchlässig und, zumindest bei *E. coli* und *Salmonella*, im wesentlichen undurchlässig für hydrophobe Moleküle. Außerdem mußte sie für spezifische Diffusionswege für außergewöhnliche Verbindungen sorgen. Heute verstehen wir die strukturellen Grundlagen dieser Permeabilitätseigenschaften

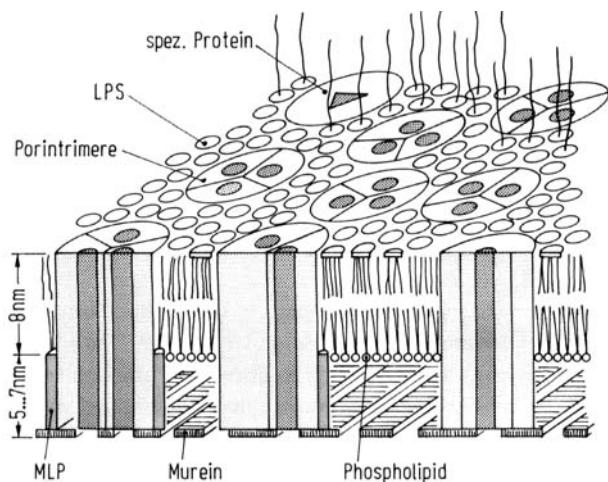


Abb. 15. Spekulatives Modell der Zellwand von *E. coli* und *S. typhimurium*. Es ist noch nicht experimentell bestätigt worden, daß jedes Porinmolekül einen Kanal bildet, daß das Murein-Lipoprotein nur über seine Kohlenwasserstoffketten mit der Membran verbunden ist, daß dieses Lipoprotein sich an das Porin anlagert usw. spez. Protein: Protein, das die Diffusion spezieller Verbindungen erleichtert; LPS: Lipopolysaccharid; MLP: Murein-Lipoprotein (Braunsch'sches Lipoprotein).

auf molekularer Ebene bereits recht gut. Wahrscheinlich ist bei der äußeren Membran der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion besser als bei den anderen biologischen Membranen bekannt. Da diese Membran recht einfach aufgebaut ist (Abb. 15) und da sich bereits eine Vielzahl von Daten über ihre Struktur angesammelt hat, wird sie vermutlich auch in Zukunft ein sehr nützliches Studienobjekt für die allgemeinen Prinzipien der Membranstruktur und Membranfunktion bleiben^[101].

Die Forschungsarbeiten im Laboratorium des Autors wurden vom U.S. Public Health Service (Grant AI-09644) und von der American Cancer Society (Grant BC-20) unterstützt. Ich danke allen meinen früheren und derzeitigen Mitarbeitern, die mit Ideen und harter Arbeit zu diesem Projekt beigetragen haben, vor allem Taiji Nakae, Yoshiyuki Kamio und John K. Smit.

Eingegangen am 12. Juni 1978 [A 269]
Übersetzt von Dr. Wolfram Bode, Martinsried

[1] a) A. M. Glauert, M. J. Thornley, Annu. Rev. Microbiol. 23, 159 (1969); b) J. H. Freer, M. R. J. Salton in G. Weinbaum, S. Kadis, S. J. Ajl: Microbial Toxins. Vol. IV. Academic Press, New York 1971, Kap. 2.

- [2] T. Miura, S. Mizushima, Biochim. Biophys. Acta 150, 159 (1969); 193, 263 (1969).
- [3] M. J. Osborn, J. E. Gander, E. Parisi, J. Carson, J. Biol. Chem. 247, 3962 (1972).
- [4] C. A. Schnaitman, J. Bacteriol. 104, 890 (1970).
- [5] G. F. Ames, E. N. Spudich, H. Nikaido, J. Bacteriol. 117, 406 (1974).
- [6] a) J. Uemura, S. Mizushima, Biochim. Biophys. Acta 413, 163 (1975); b) W. Garten, J. Hindennach, U. Henning, Eur. J. Biochem. 59, 215 (1975); c) B. Lugtenberg, J. Meijers, R. Peters, P. van der Hoek, L. van Alphen, FEBS Lett. 58, 254 (1975); d) C. A. Schnaitman, J. Bacteriol. 118, 442 (1974).
- [7] V. Braun, Biochim. Biophys. Acta 415, 335 (1975).
- [8] H. Nikaido in L. Leive: Bacterial Membranes and Walls. Marcel Dekker, New York 1973, Kap. 3.
- [9] O. Lüderitz, O. Westphal, A. M. Staub, H. Nikaido in G. Weinbaum, S. Kadis, S. J. Ajl: Microbial Toxins. Vol. IV. Academic Press, New York 1971, Kap. 4.
- [10] T. Chai, J. Foulds, J. Mol. Biol. 85, 465 (1975).
- [11] J. K. Davies, P. Reeves, J. Bacteriol. 123, 96 (1975).
- [12] U. Henning, J. Haller, FEBS Lett. 55, 161 (1975).
- [13] M. Nurminen, K. Lounatmaa, M. Sarvas, P. H. Mäkelä, T. Nakae, J. Bacteriol. 127, 941 (1976).
- [14] Y. Hirota, H. Suzuki, Y. Nishimura, S. Yasuda, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 1417 (1977).
- [15] A. Forge, J. W. Costerton, K. A. Kerr, J. Bacteriol. 113, 445 (1973).
- [16] P. Overath, M. Brenner, T. Gulik-Krzywicki, E. Schechter, L. Letellier, Biochim. Biophys. Acta 389, 358 (1975).
- [17] S. Rottem, M. Hasin, S. Razin, Biochim. Biophys. Acta 375, 395 (1975).
- [18] H. Nikaido, Y. Takeuchi, S.-I. Ohnishi, T. Nakae, Biochim. Biophys. Acta 465, 152 (1977).
- [19] D. Branton, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 1048 (1966).
- [20] A. P. van Gool, N. Nanninga, J. Bacteriol. 108, 474 (1971).
- [21] H. E. Gilleland, Jr., J. D. Stinnnett, I. L. Roth, R. G. Eagon, J. Bacteriol. 113, 417 (1973).
- [22] J. Smit, Y. Kamio, H. Nikaido, J. Bacteriol. 124, 942 (1975).
- [23] K. Schleifer, O. Kandler, Bacteriol. Rev. 36, 407 (1972).
- [24] Das Murein von *E. coli*-Stämmen, die seit vielen Jahren im Labor gezogen werden (und deshalb defektes LPS produzieren [8]), kann jedoch durch Behandlung intakter Zellen mit Lysozym in hohen Konzentrationen abgebaut werden (D. S. Feingold, J. N. Goldman, H. M. Kurita, J. Bacteriol. 96, 2118 (1968)).
- [25] J. P. Robbie, T. H. Wilson, Biochim. Biophys. Acta 173, 234 (1969).
- [26] J. W. Payne, C. Gilvarg, J. Biol. Chem. 243, 6291 (1968).
- [27] a) R. J. Roantree, T.-T. Kuo, D. G. MacPhee, B. A. D. Stocker, Clin. Res. 17, 157 (1969); b) R. J. Roantree, T.-T. Kuo, D. G. MacPhee, J. Gen. Microbiol. 103, 223 (1977).
- [28] a) S. Schlecht, G. Schmidt, Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Orig. 212, 505 (1969); b) G. Schmidt, S. Schlecht, O. Westphal, ibid. 212, 88 (1969); c) S. Schlecht, O. Westphal, ibid. 213, 354 (1970).
- [29] S. Tamaki, M. Matsuhashi, J. Bacteriol. 105, 968 (1971).
- [30] L. Leive, Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 13 (1965); 21, 290 (1965).
- [31] L. Leive, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 745 (1965).
- [32] L. Leive, Ann. N. Y. Acad. Sci. 235, 109 (1974).
- [33] H. Nikaido, Biochim. Biophys. Acta 433, 118 (1976).
- [34] J. F. Danielli in H. Davson, J. F. Danielli: The Permeability of Natural Membranes. University Press, Cambridge 1952, Kap. 8.
- [35] P. Gustafsson, K. Nordstrom, S. Normark, J. Bacteriol. 116, 893 (1973).
- [36] R. Collander, H. Bärlund, Acta Bot. Fenn. 11, 1 (1933).
- [37] W. D. Stein: The Movement of Molecules across Cell Membranes. Academic Press, New York 1967.
- [38] R. I. Sha'afi, G. M. Gary-Bobo, A. K. Solomon, J. Gen. Physiol. 58, 238 (1971).
- [39] W. R. Galey, J. D. Owen, A. K. Solomon, J. Gen. Physiol. 61, 727 (1973).
- [40] a) P. Mueller, D. O. Rudin, Curr. Top. Bioenerg. 3, 157 (1969); b) A. D. Bangham, Chem. Phys. Lipids 8, 386 (1972).
- [41] J. Koplow, H. Goldfine, J. Bacteriol. 117, 525 (1974).
- [42] P. F. Mühlradt, J. R. Golecki, Eur. J. Biochem. 51, 343 (1975).
- [43] Y. Funahara, H. Nikaido, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [44] D. Romeo, A. Girard, L. Rothfield, J. Mol. Biol. 53, 475 (1970).
- [45] a) N. A. Roberts, G. W. Gray, S. G. Wilkinson, Microbiol. 2, 189 (1970); b) S. W. Rogers, H. E. Gilleland, Jr., R. G. Eagon, Can. J. Microbiol. 15, 743 (1969).
- [46] N. C. Jones, M. J. Osborn, J. Biol. Chem. 252, 7405 (1977).
- [47] Y. Kamio, H. Nikaido, Biochemistry 15, 2561 (1976).
- [48] M. J. Maness, P. F. Sparling, J. Infect. Dis. 128, 321 (1973).
- [49] G. Decad, H. Nikaido, J. Bacteriol. 128, 325 (1976).
- [50] In einer neueren Arbeit [51] wird festgestellt, daß sogar in nichtplasmatisierten Zellen der periplasmatische Raum einen großen Teil des gesamten Zellvolumens einnimmt. Der Grund für diese Diskrepanz ist unbekannt.
- [51] J. B. Stock, B. Rauch, S. Roseman, J. Biol. Chem. 252, 7850 (1977).
- [52] T. Nakae, H. Nikaido, J. Biol. Chem. 250, 7359 (1975).

- [53] a) *M. L. DePamphilis*, *J. Bacteriol.* **105**, 1184 (1971); b) *P. D. Bragg, C. Hou*, *Biochim. Biophys. Acta* **247**, 478 (1972); c) *K. Nakamura, S. Mizushima*, *ibid.* **413**, 371 (1975).
- [54] *T. Kataoka, K. Inoue, O. Lüderitz, S. C. Kinsky*, *Eur. J. Biochem.* **21**, 80 (1971).
- [55] *H. Nikaido, T. Nakae*, *J. Infect. Dis.* **128**, S 30 (1973).
- [56] *T. Nakae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 1224 (1975).
- [57] *T. Nakae*, *J. Biol. Chem.* **251**, 2176 (1976).
- [58] *J. Rosenbusch*, *J. Biol. Chem.* **249**, 8019 (1974).
- [59] *T. Nakae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 877 (1976).
- [60] *T. Nakae*, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [61] *M. Inouye*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 2396 (1974).
- [62] *R. Benz, K. Jankó, W. Boos, P. Läuger*, *Biochim. Biophys. Acta* **511**, 309 (1978).
- [63] *G. Decad*, PhD Dissertation, University of California, Berkeley.
- [64] *K. Nixdorff, H. Fitzer, J. Gmeiner, H. H. Martin*, *Eur. J. Biochem.* **81**, 63 (1977).
- [65] *R. E. W. Hancock, H. Nikaido*, *J. Bacteriol.*, im Druck.
- [66] *W. Zimmermann, A. Rosselet*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**, 368 (1977).
- [67] *H. Nikaido, S.-A. Song, L. Shaltiel, M. Nurminen*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 324 (1977).
- [68] *I. R. Beacham, D. Haas, E. Yagil*, *J. Bacteriol.* **129**, 1034 (1977).
- [69] *K. von Meyenburg*, *J. Bacteriol.* **107**, 878 (1971).
- [70] *P. Bavoil, H. Nikaido, K. von Meyenburg*, *Mol. Gen. Genet.* **158**, 23 (1977).
- [71] *H. Nikaido, P. Bavoil, E. Y. Rosenberg*, noch unveröffentlicht.
- [72] *H. Nikaido, P. Bavoil, Y. Hirota*, *J. Bacteriol.* **132**, 1045 (1977).
- [73] *S. Ichihara, S. Mizushima*, *J. Biochem. (Tokyo)* **83**, 1095 (1978).
- [74] *E. M. Renkin*, *J. Gen. Physiol.* **38**, 225 (1954).
- [75] *S. G. Schultz, A. K. Solomon*, *J. Gen. Physiol.* **44**, 1189 (1961).
- [76] *R. Y. Stanier, N. J. Palleroni, M. Doudoroff*, *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159 (1966).
- [77] *A. M. Chakrabarty, G. Chou, I. C. Gunsalus*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 1137 (1973).
- [78] *C. J. Schmitges, U. Henning*, *Eur. J. Biochem.* **63**, 47 (1976).
- [79] *G. F.-L. Ames*, persönliche Mitteilung.
- [80] *A. L. Koch*, *Adv. Microb. Physiol.* **6**, 147 (1971).
- [81] a) *J. F. Lutkenhaus*, *J. Bacteriol.* **131**, 631 (1977); b) *E. C. R. Reeve, P. Doherty*, *ibid.* **96**, 1450 (1968); c) *A. P. Pugsley, C. A. Schnaitman*, *ibid.* **133**, 1181 (1978).
- [82] a) *P. J. Bassford, Jr., D. L. Diedrich, C. A. Schnaitman, P. Reeves*, *J. Bacteriol.* **131**, 608 (1977); b) *C. A. Schnaitman*, *ibid.* **118**, 454 (1974); c) *K. Nakamura, S. Mizushima*, *J. Biochem. (Tokyo)* **80**, 1411 (1976).
- [83] *T. Nakae, J. Ishii*, *J. Bacteriol.* **133**, 1412 (1978).
- [84] *Y. Kamio, H. Nikaido*, *Biochim. Biophys. Acta* **464**, 589 (1977).
- [85] *D. B. Datta, B. Arden, U. Henning*, *J. Bacteriol.* **131**, 821 (1977).
- [86] *J. Smit, H. Nikaido*, noch unveröffentlicht.
- [87] *Y. Hasegawa, H. Yamada, S. Mizushima*, *J. Biochem. (Tokyo)* **80**, 1401 (1976).
- [88] *E. T. Paiva, L. L. Randall*, *J. Bacteriol.* **133**, 279 (1978).
- [89] *T. Nakae, J. Ishii, M. Tokunaga*, *J. Biol. Chem.* **254**, 1457 (1979).
- [90] *T. Ueki, T. Mitsui, H. Nikaido*, *J. Biochem. (Tokyo)* **85**, 173 (1979).
- [91] *A. C. Steven, B. ten Heggeler, R. Muller, J. Kistler, J. P. Rosenbusch*, *J. Cell Biol.* **72**, 292 (1977).
- [92] *J. C. White, P. M. DiGirolamo, M. L. Fu, Y. A. Preston, C. Bradbeer*, *J. Biol. Chem.* **248**, 3978 (1973).
- [93] a) *L. Randall-Hazelbauer, M. Schwartz*, *J. Bacteriol.* **116**, 1436 (1973); b) *S. Szmelcman, M. Schwartz, T. J. Silhavy, W. Boos*, *Eur. J. Biochem.* **65**, 13 (1976); c) *V. Braun, H. J. Krieger-Brauer*, *Biochim. Biophys. Acta* **469**, 89 (1977).
- [94] a) *V. Braun, H. Wolff*, *FEBS Lett.* **34**, 77 (1973); b) *R. Wayne, J. B. Neilands*, *J. Bacteriol.* **121**, 497 (1975); c) *K. Hantke, V. Braun*, *FEBS Lett.* **49**, 301 (1975); d) *M. Luckey, R. Wayne, J. B. Neilands*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 687 (1975).
- [95] a) *R. E. W. Hancock, K. Hantke, V. Braun*, *J. Bacteriol.* **127**, 1370 (1976); b) *R. Wayne, K. Frick, J. B. Neilands*, *J. Bacteriol.* **126**, 7 (1976).
- [96] *K. Hantke*, *FEBS Lett.* **70**, 109 (1976).
- [97] a) *D. R. DiMasi, J. C. White, C. A. Schnaitman, C. Bradbeer*, *J. Bacteriol.* **115**, 506 (1973); b) *S. F. Sabet, C. A. Schnaitman*, *J. Biol. Chem.* **248**, 1797 (1973).
- [98] *K. von Meyenburg, H. Nikaido*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 1100 (1977).
- [99] *W. Boos*, persönliche Mitteilung.
- [100] a) *S. Lindsay, B. Wheeler, K. E. Sanderson, J. W. Costerton, K.-J. Cheng*, *Can. J. Microbiol.* **19**, 335 (1973); b) *S. Tamaki, M. Matsuhashi*, *J. Bacteriol.* **114**, 453 (1973); c) *H. Suzuki, Y. Nishimura, S. Yasuda, A. Nishimura, M. Yamada, Y. Hirota*, persönliche Mitteilung; d) *R. A. Weigand, L. I. Rothfield*, *J. Bacteriol.* **125**, 340 (1976).
- [101] Aus Platzmangel konnten viele Details und Literaturzitate hier nicht aufgeführt werden. Für weitere Einzelheiten sei der Leser auf einen ausführlichen Aufsatz verwiesen (*H. Nikaido, T. Nakae, Adv. Microb. Physiol.*, im Druck).