

Phasenumwandlungen in Lipiden Mögliche Schaltprozesse in biologischen Membranen

H. TRÄUBLE

Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen

Recent experiments on phase transitions of lipid model membranes in aqueous medium are reviewed: the phase transition has been studied by optical methods using fluorescence or absorption indicators and the kinetics of the transition by means of the temperature jump relaxation technique. Under certain conditions the transition curves show hysteresis phenomena. The ion binding and ion exchange properties of lipid structures are influenced by the phase transition. These phenomena may be important in memory and nerve excitation processes.

Reversible Strukturumwandlungen in biologischen Membranen werden neuerdings lebhaft diskutiert [1—4], vor allem im Zusammenhang mit der *Reizleitung* in Nerven [5—7]. Es wird dabei i. allg. angenommen, daß durch Änderung eines äußeren Parameters — in der Art eines Steuerprozesses — Strukturumwandlungen in der Membran ausgelöst werden, die zu einer Funktionsänderung der Membran führen¹. Erste experimentelle Hinweise für das Auftreten von Strukturumwandlungen in biologischen Membranen wurden in den letzten Jahren beigebracht [8—12]. Die molekularen Grundbausteine biologischer Membranen sind Proteine und Lipide. Die *Lipide* sind in unserem Zusammenhang von besonderem Interesse, weil sie thermische Phasenumwandlungen zeigen. Ein einzelnes Lipid-Molekül enthält als „funktionelle“ Gruppen zwei Kohlenwasserstoffketten mit einer Länge zwischen 14 und 22 C-Atomen und eine polare Gruppe, z. B. Phosphatidylcholin (vgl. Fig. 1) [13, 14]. Lipide bilden in wäßriger Umgebung flächenhafte membranähnliche Strukturen, die aus Lipid-Doppelschichten mit einer Dicke von ca. 50 Å bestehen (vgl. Fig. 2a) [15—17]. Die meisten Modelle für den Aufbau biologischer Membranen setzen das Vorhandensein derartiger Lipid-Doppelschichten voraus² [18—22]. Biologische Membranen verschiedenen Ursprungs zeigen eine große Vielfalt in der Zusammensetzung und im chemischen Aufbau der konstituierenden Lipid-Moleküle; das betrifft sowohl die Länge und den Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten als auch die Struktur der polaren Gruppen [13]. Als besonders häufig vorkommende polare Gruppen sind in Fig. 1

Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin dargestellt. Es besteht kein Zweifel, daß die richtige Lipid-Zusammensetzung eine wesentliche Voraussetzung für das „richtige“ Funktionieren einer biologischen Membran ist. Trotz intensiver Forschungs-

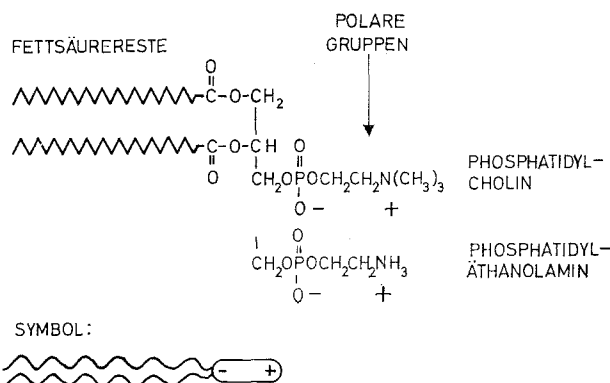


Fig. 1. Phospholipid-Molekül, chemischer Aufbau. Zwei (hydrophobe) Fettsäure-Reste und eine polare Gruppe sind durch einen zentralen Glycerin-Rest verknüpft. Die dargestellten polaren Gruppen bilden elektrische Dipole. Vermutlich liegen die polaren Gruppen in der sog. „gauche“-Form vor, d. h. sie sind an den Phosphat-Gruppen abgewinkelt [23, 52—54]

arbeit ist der Zusammenhang zwischen Lipid-Zusammensetzung und Membranfunktion noch ganz wenig verstanden. Untersuchungen an biologischen Systemen bedürfen hierbei der Ergänzung durch physikalisch-chemische Untersuchungen an *synthetischen Lipiden* mit genau bekanntem chemischem Aufbau. Dieser Weg wurde vor allem von den Forschungsgruppen um van Deenen in Holland und um Chapman in England beschrieben. Die mit einer Vielzahl von Methoden durchgeführten Studien (optische, kalorimetrische, röntgenographische Messungen, Kernresonanzmessungen etc.) haben zu wichtigen Ergebnissen über die physikalisch-chemischen Eigenschaften von reinen Lipiden geführt [14].

¹ Ähnliche Prozesse wurden kürzlich im Zusammenhang mit immunbiologischen Erkennungsvorgängen diskutiert. Siehe hierzu den Bericht „Membranaspekte der Immunbiologie“ von H. Fischer, E. Rüde u. D. Sellin in *Naturwissenschaften* 57, 507 (1970).

² Man vergleiche hierzu den Artikel „Künstliche Lipidfilme als Modelle biologischer Membranen“ von P. Läger in *Naturwissenschaften* 57, 474 (1970).

Kalimetrischer Nachweis und Charakterisierung von Phasenumwandlungen in Lipiden

Chapman u. Mitarb. haben durch kalorimetrische Messungen gezeigt, daß hochmolekulare Lipid-Strukturen bei Temperaturerhöhung eine in erster Näherung reversible, endotherme Strukturumwandlung vom Charakter einer kristallin \rightarrow flüssig-kristallinen Phasenumwandlung durchmachen [14, 23—25]. Es gilt als gesichert, daß die Kohlenwasserstoffketten oberhalb der Umwandlung eine wesentlich höhere Beweglichkeit haben [11, 17, 23]. Die Umwandlungstemperaturen T_u liegen i. allg. weit unterhalb des kapillaren Schmelzpunktes der untersuchten Substanzen. Beispielsweise liegt die Umwandlung von Dipalmitoylphosphatidylcholin (C_{16}) bei $T_u \approx 40^\circ\text{C}$, während der kapillare Schmelzpunkt bei 230°C liegt. In Tabelle 1 sind die Umwandlungstemperaturen (T_u) und die Umwandlungsenthalpien (ΔH_u) von wichtigen 1,2-Diacyl-phosphatidylcholinen zusammengestellt. Als allgemeine Regel gilt, daß die Umwandlungstemperaturen um so tiefer liegen, je kürzer die Kohlenwasserstoffketten sind und je mehr Doppelbindungen sie enthalten. Bei Phosphatidylcholinen bewirkt z. B. eine Änderung der Kettenlänge um zwei C-Atome eine Verschiebung der Umwandlungstemperatur um rund 20°C . Auch die Struktur der polaren Gruppen beeinflusst die Umwandlungstemperatur. Bei gleichen Kohlenwasserstoffketten sind die Umwandlungstemperaturen von Phosphatidyläthanolaminen höher als diejenigen von Phosphatidylcholinen (Dipalmitoylphosphatidylcholin: $T_u \approx 40^\circ\text{C}$, Dipalmitoylphosphatidyläthanolamin: $T_u \approx 83^\circ\text{C}$). Durch Mischen von Lipiden mit verschiedenen langen Kohlenwasserstoffketten und unterschiedlichem Sättigungsgrad lassen sich Modellsubstanzen mit Umwandlungstemperaturen bei beliebigen Zwischenwerten herstellen. Wie schon erwähnt, wirkt sich die Umwandlung vor allem auf die Beweglichkeit der CH_2 -Ketten aus. Es ist denkbar, daß die unterschiedliche Lipid-Zusammensetzung biologischer Membranen u. a. dem Zweck dient, den betreffenden Membranen die für ihre Funktion erforderliche Fluidität der CH_2 -Ketten zu geben. Durch entsprechende Lipid-Zusammensetzung lassen sich „labile“ Membranen mit Phasenumwandlungen aufbauen, deren Funktionen durch äußere Einflüsse leicht gesteuert werden können.

Modellsubstanzen

Um die biologische Relevanz derartiger Umwandlungen diskutieren zu können, müssen u. a. die Umwandlungsgeschwindigkeit und der Einfluß der Umwandlung auf die Permeabilität von Lipid-Modellmembranen und auf die Ionenbindung untersucht werden. Eine weitere Frage betrifft die verschiedenen Parameter, welche in der Lage sind, die Umwandlung auszulösen bzw. zu beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Phasenumwandlungen von hochmolekularen Lipid-Strukturen optisch, mit Hilfe schnell reagierender Indikatoren, nachgewiesen und die Kinetik der Umwandlung untersucht. Es wurde zusätzlich die Ionenbindung an die Lipid-Strukturen für $T < T_u$ und $T > T_u$ studiert. Als Modellsysteme dienen wäßrige, durch Ultraschallbehandlung hergestellte Lipid-Dispersionen sowie wäßrige Lösungen von Monolayer-Lipid-Vesikeln. Für die meisten Messungen wurde synthetisches L-Dipalmitoylphosphatidylcholin (Fluka) verwendet. Die Lipid-Konzentration war i. allg. ca. 10^{-4} molar. Die Herstellungsmethoden und die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen an diesen Systemen wurden an anderer Stelle veröffentlicht [26—28]. In Fig. 2 sind einige elektronenmikroskopische Aufnahmen zu sehen, die einen Eindruck von den Lipid-Strukturen in diesen Lösungen geben. Hinsichtlich der folgenden Untersuchungen ergaben sich praktisch keine Unterschiede zwischen den beiden Systemen.

Optischer Nachweis der Phasenumwandlungen

Der optische Nachweis der Phasenumwandlungen gelingt mit Hilfe geeigneter Fluoreszenz- bzw. Absorptionsindikatoren, welche an die Lipid-Strukturen binden und hierbei Änderungen der Fluoreszenzquantenausbeute Q bzw. der Extinktion E erfahren. Als Fluoreszenzindikator wurde ANS (1-Anilino-8-naphthalinsulfonat, erhältlich bei Pierce Chemicals und bei Serva, Heidelberg) und als Absorptionsindikator Bromthymolblau (BTB) verwendet. Die Quantenausbeute von ANS steigt von $Q = 0,004$ in Wasser [29] auf $Q = 0,08 (\pm 0,3)$ im Membran-gebundenen Zustand; zugleich verschiebt sich das Emissionsmaximum von $\lambda = 520 \text{ m}\mu$ in Wasser nach $\lambda = 485 \text{ m}\mu$ im Membran-

Tabelle 1. Thermodynamische Kenngrößen der kristallin \leftrightarrow flüssig-kristallinen Phasenumwandlung einiger 1,2-Diacyl-L-phosphatidylcholone. Vergleich von kalorimetrischen Daten nach Phillips, Williams u. Chapman [25] und optischen Daten (Fluoreszenzmessungen mit ANS als Indikator). Die Daten gelten für Lipid/Wasser-Systeme mit Wasser im Überschuß. Zur Bezeichnung: C_{22}^0 bedeutet eine C-Kette mit 22 C-Atomen ohne Doppelbindung

	Länge der Fettsäure-Ketten	Behenoyl C_{22}^0	Stearoyl C_{18}^0	Palmitoyl C_{16}^0	Myristoyl C_{14}^0	Oleoyl C_{18}^1
Kalorimetrische Messungen [25]	Umwandlungstemperatur T_u [$^\circ\text{C}$] (Werte in Klammern: Phosphatidyläthanolamin)	75	58 (88)	41 (83)	23 (77)	—22
	Umwandlungsenthalpie ΔH_u [kcal/Mol]	14,88	10,67	8,66	6,64	7,6
Optische Messungen	Umwandlungstemperatur T_u [$^\circ\text{C}$]		58	39	18	
	Umwandlungsenthalpie $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ [kcal/Mol]		265	185	80	
	$\sigma = \left(\frac{\Delta H_u}{\Delta H_{\text{van't Hoff}}} \right)^2$		$1,6 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$	7×10^{-3}	

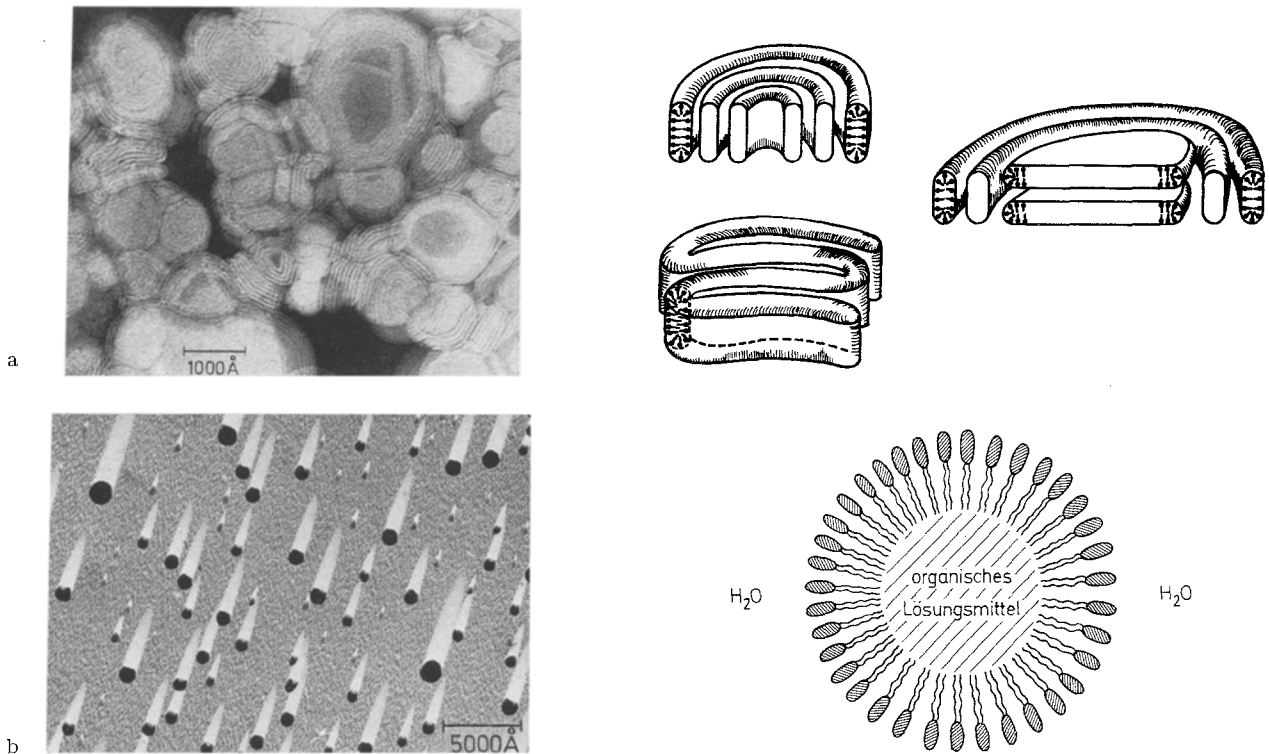


Fig. 2a u. b. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lipid-Strukturen in wässrigen Lösungen. Zeichnungen: Aufbau dieser Strukturen aus Lipid-Molekülen. — a „Myelin-Figuren“, bestehend aus Lipid-Doppelschichten. Präparation aus einer durch kurze Ultraschallbehandlung hergestellten Lipid-Dispersion. In Lösung sind die Lipid-Lamellen durch Wasserschichten getrennt. Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure. — b Sphärische „Monolayer-Vesikel“ mit stark kontrastierender organischer Innenphase. Die polaren Gruppen sind gegen die umgebende Wasserphase orientiert. Schwermetallbeschattung

gebundenen Zustand. Vergleichbare Änderungen der Fluoreszenz-Eigenschaften ergeben sich, wenn ANS in einer Methanol/Wasser-Mischung mit der Dielektrizitätskonstanten $\epsilon \approx 35$ gelöst wird [29]. Die Extinktion von BTB sinkt von $E = 1,4 \times 10^4$ bei $\lambda = 615 \text{ m}\mu$ in Wasser vom pH 7 auf $E = 2,4 \times 10^2$ im Membran-gebundenen Zustand. Auch diese Änderung läßt sich durch Lösen von BTB in einer Dioxan/Wasser-Mischung vom pH 7 und einer Dielektrizitätskonstanten $\epsilon \approx 30$ simulieren. Beide Befunde sprechen dafür, daß die Indikatormoleküle nicht im Kohlenwasserstoffteil der Lipid-Strukturen ($\epsilon \approx 2,5$), sondern an die polaren Phosphatidylcholin-Gruppen gebunden sind und daß die Mikro-Umgebung der gebundenen Farbstoffmoleküle einem Medium mit der Dielektrizitätskonstanten $\epsilon \approx 30-40$ entspricht (vgl. Fig. 4). Diese Auffassung wird gestützt durch neuere Befunde über den Energietransfer zwischen Membran-gebundenem ANS und freien Thallium-Ionen [30]. Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, daß die gelösten Thallium-Ionen sich den gebundenen ANS-Molekülen bis auf ca. 6 \AA nähern können, was nur möglich ist, wenn die ANS-Moleküle an der Membranoberfläche in den polaren Gruppen der Lipid-Struktur sitzen (vgl. Fig. 4).

Wie aus Fig. 3 hervorgeht, gibt sich die Phasenumwandlung der Lipide durch eine starke Fluoreszenz- bzw. Absorptionsänderung in einem engen Temperaturintervall von ca. $6-7^\circ \text{C}$ zu erkennen. Die aus solchen Messungen bestimmten Umwandlungstemperaturen von Dimyristoyl (C_{14})-, Dipalmitoyl (C_{16})- und Distearoyl (C_{18})-phosphatidylcholinen stimmen innerhalb weniger $^\circ \text{C}$ mit den kalorimetrischen Werten

[24, 25] überein (vgl. Tabelle 1). Systematische Unterschiede zwischen den kalorimetrischen und optischen Messungen könnten dadurch zustande kommen, daß die Indikatormoleküle auf die strukturellen Änderungen der polaren Gruppen reagieren, während die kalorimetrischen Messungen die gesamten Strukturumwandlungen erfassen. Die beobachteten optischen Effekte (Fig. 3) lassen sich im wesentlichen auf einen zwei- bis dreifachen Anstieg der Anzahl von Bindungsplätzen für die Indikatormoleküle an der Lipid-Struktur (bei Temperaturerhöhung auf $T \gg T_u$) zurückzuführen. Dies deutet darauf hin, daß im Laufe der Umwandlung (bei Temperaturerhöhung) die Packung der polaren

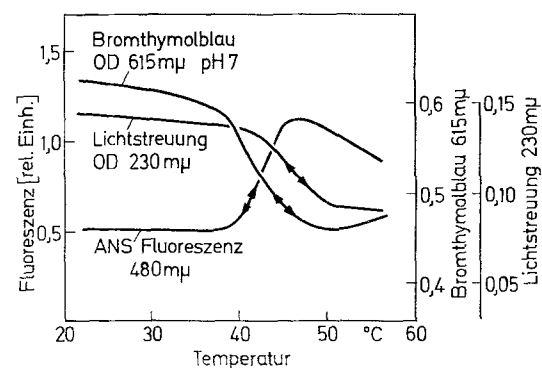


Fig. 3. Zum optischen Nachweis von Phasenumwandlungen in Lipiden. Dipalmitoylphosphatidylcholin, $T_u \approx 40^\circ \text{C}$. Als Indikatoren dienen ANS für die Fluoreszenzmessungen (Anregung bei $\lambda = 370 \text{ m}\mu$) und Bromthymolblau für die Absorptionsmessungen. Die Lichtstreuung wurde im Absorptionsverfahren gemessen. Alle Messungen geschahen kontinuierlich. Temperaturänderung: $1^\circ \text{C}/\text{min}$

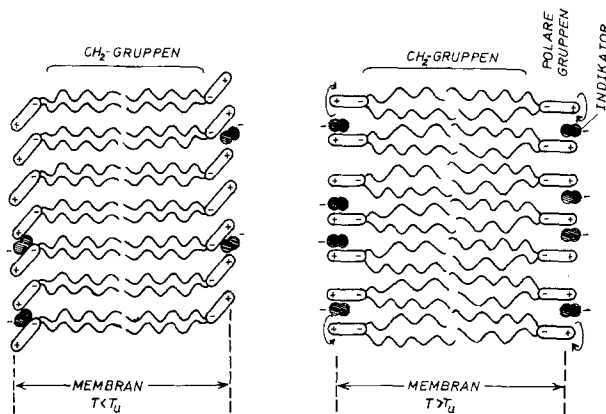


Fig. 4. Lipid-Doppelschichten mit gebundenen Indikatormolekülen für $T \ll T_u$ und $T \gg T_u$, schematisch. Die Umwandlung führt zu einer „Auflockerung“ der polaren Gruppe und zu einer höheren Beweglichkeit der CH_2 -Ketten. Die Anzahl der gebundenen Indikatormoleküle ist stark übertrieben. Tatsächlich war bei den Messungen von Fig. 3 und 5 bei $T = 20^\circ\text{C}$ etwa ein Indikatormolekül pro 150 Lipid-Moleküle gebunden. Oberhalb der Umwandlung sind mehr Indikatormoleküle gebunden

Gruppen aufgelockert wird, wie dies schematisch in Fig. 4 angedeutet ist. In Tabelle 2 sind die Gleichgewichtsbindungskonstanten und die Anzahl von Bindungsplätzen für die Indikatormoleküle an der Membranoberfläche für $T \ll T_u$ und $T \gg T_u$ zusammengestellt. Diese Werte wurden durch Titration von Lipid-Dispersionen mit Indikatormolekülen bestimmt.

Tabelle 2. Kenngrößen zur Bindung von Bromthymolblau und ANS an Dipalmitoylphosphatidylcholin-Strukturen in wässriger Lösung

	Bindungskonstante [Mol^{-1}]		Bindungsplätze pro 100 Lipid-Moleküle	
	25 °C	45 °C	25 °C	45 °C
BTB (pH 7)	3×10^4	$1,78 \times 10^4$	7,7	20
ANS	$0,6 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4$	2,5	6,7

Eine weitere Möglichkeit, die Phasenumwandlung optisch nachzuweisen, bieten Lichtstreuungsmessungen (vgl. Fig. 3). Dieses Verfahren arbeitet indikatorfrei und ist daher wichtig für den Nachweis, daß die Indikatormolekel keine wesentlichen Änderungen der Lipid-Struktur bewirken. Wie Fig. 3 zeigt, beobachtet man im Umwandlungsgebiet eine starke Abnahme der Lichtstreuung mit steigender Temperatur.

Verlauf der Umwandlungskurven

Die beschriebenen optischen Verfahren bieten die Möglichkeit, Umwandlungskurven bequem und genau zu studieren und die Kinetik der Umwandlung zu verfolgen. Umwandlungskurven wurden z. B. in Gegenwart von Chloridsalzen ein-, zwei- und dreiwertiger Kationen gemessen. Der Verlauf der Umwandlungskurven wird durch die Anwesenheit zwei- und dreiwertiger Kationen und durch pH-Erniedrigung wesent-

lich beeinflusst, während einwertige Kationen praktisch ohne Einfluß sind. Bei Anwesenheit zwei- und dreiwertiger Kationen wird als zusätzlicher Effekt eine kleine irreversible Vorumwandlung beobachtet. Außerdem können Hysterese-Erscheinungen auftreten (s. u.). Die Umwandlungstemperatur T_u kann durch Salze und durch die Gegenwart bestimmter Moleküle in der Lösung um einige Grad verschoben werden. Diese Beobachtungen sind im einzelnen noch nicht verstanden. Sie zeigen jedoch, daß es grundsätzlich möglich ist, die Umwandlung außer durch Temperaturänderung auch durch andere Parameter zu beeinflussen bzw. auszulösen.

Auftreten von Hysterese und mögliche Bedeutung von Lipid-Strukturen als Informationsspeicher

Es gibt mehrere Hinweise dafür, daß die Umwandlung ein hochkooperativer Prozeß ist. Dafür spricht z. B. der Befund, daß beim Durchlaufen von Temperaturzyklen unter bestimmten Bedingungen Hysterese auftritt (vgl. Fig. 5). Diese Erscheinungen sind reproduzierbar, d. h. sie werden in aufeinanderfolgenden Temperaturzyklen in gleicher Weise beobachtet, und hängen so gut wie nicht von der Geschwindigkeit der Temperaturänderung ab (Normalbedingungen: $\Delta T/\Delta t = 1^\circ\text{C}/\text{min}$).

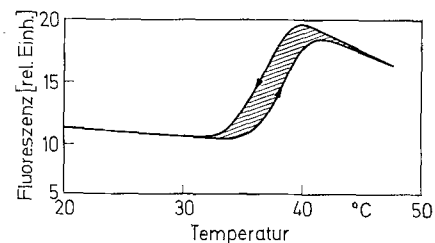


Fig. 5. Umwandlung mit Hysterese. Dipalmitoylphosphatidylcholin/Wasser-System in Anwesenheit von $10^{-4} m$ Acetylcholin. Meßparameter: ANS-Fluoreszenz bei $\lambda = 480 \text{ m}\mu$. Temperaturänderung: $1^\circ\text{C}/\text{min}$

Es werden also echte metastabile Zustände durchlaufen. Das Ausmaß der Hysterese hängt von verschiedenen Parametern ab, z. B. von der Reinheit der verwendeten Substanzen, von der Anwesenheit anderer Moleküle in den Lipid-Strukturen (z. B. Fettsäuren, Cholesterol) und von der Gegenwart bestimmter Ionen und Moleküle in der Wasserphase. Hysterese wird z. B. durch zwei- und dreiwertige Ionen, aber auch durch Acetylcholin hervorgerufen. Der Einbau von Fettsäuren in die Lipid-Struktur erhöht die Hysterese, während Cholesterol den gegenteiligen Effekt hat. Die in Fig. 5 wiedergegebene Hysterese-Kurve wurde in Gegenwart von $10^{-4} m$ Acetylcholin gemessen. Ähnliche Hysterese-Erscheinungen treten bei kooperativen Umwandlungen in der Physik z. B. im Ferromagnetismus und in der Supraleitung auf. Die Erfahrungen auf diesen Gebieten zeigen, daß Hysterese, die durch Verunreinigungen und durch Zusätze hervorgerufen bzw. verstärkt wird, durch Hemmung der Umwandlungsprozesse (Wachstum) zustande kommt [32]. Die Alternative hierzu wären Hemmungen im Keimbildungsmechanismus. Ein wichtiges Charakteristikum von Hysterese-Erscheinungen ist die Ab-

hängigkeit des System-Zustandes von der Vorgeschichte. Solche Systeme sind zur Informationsspeicherung geeignet. Bekanntlich werden die Hysterese-Erscheinungen in ferromagnetischen Materialien großtechnisch bei der Konstruktion von Speicherelementen für Rechenmaschinen ausgenutzt.

Katchalsky [33—35] hat in einer Serie von Arbeiten die Bedeutung von Hysterese-Erscheinungen in biologischen Systemen [36—38] für die *Informationsspeicherung* und für die Entwicklung *schwingungsfähiger Systeme* behandelt. Danach ist die Annahme naheliegend, daß Membranen mit hysteretischen Phasenumwandlungen als Informationsspeicher in biologischen Systemen Verwendung finden. Teile von Nervenmembranen könnten hierbei direkt als Speicherelemente dienen. Wegen der Möglichkeit, die gespeicherte Information durch Fortsetzung des Hysterese-Zyklus wieder zu löschen und damit den Speicher zu regenerieren, erscheinen Membranen besonders als Kurzzeitspeicherelemente geeignet. Hinsichtlich der Langzeitspeicherung müßte man annehmen, daß die (kurzzeitig) in den Membranspeichern enthaltene Information durch einen noch unbekanntem Mechanismus in stabilere Strukturen übertragen wird³.

Zur thermodynamischen Beschreibung der Umwandlung

Der einfachste Versuch, die beobachtete Phasenumwandlung im reversiblen Fall thermodynamisch zu beschreiben, besteht in der Annahme eines Alles-oder-Nichts-Überganges zwischen zwei Zuständen $A (T \ll T_u)$ und $B (T \gg T_u)$ gemäß



wo $K = k_1/k_2$ die Gleichgewichts-, „Konstante“ dieses Prozesses darstellt.

Aus den optisch gemessenen Umwandlungskurven läßt sich ein Umwandlungsgrad θ gemäß

$$\theta = \frac{c_B}{c_G} \quad (2)$$

als Funktion der Temperatur entnehmen ($\theta = 0$ für $T \ll T_u$ und $\theta = 1$ für $T \gg T_u$). Hierbei bedeuten c_B den Bruchteil der Moleküle im Zustand B und $c_G = c_A + c_B$ die Gesamtzahl der an der Umwandlung beteiligten Moleküle.

Die Umwandlungstemperatur T_u ist durch $T_u = T (\theta = 1/2)$ definiert. Die in Tabelle 1 angegebenen Werte wurden auf Grund dieser Definition aus den $\theta(T)$ -Kurven bestimmt.

Die scheinbare Gleichgewichtskonstante K für den Übergang $A \leftrightarrow B$ schreibt sich dann in der Form

$$K = k_1/k_2 = \frac{\theta}{1-\theta}. \quad (3)$$

Der Zusammenhang mit der scheinbaren Reaktionsenthalpie $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ der Umwandlung ergibt sich aus der van't Hoff-Beziehung

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{\text{van't Hoff}}}{RT^2} = \frac{1}{\theta(1-\theta)} \frac{d\theta}{dT}. \quad (4)$$

³ Man vergleiche hierzu den Beitrag von G. F. Domagk und H. P. Zippel: *Biochemie der Gedächtnisspeicherung*, in *Naturwissenschaften* 57, 152 (1970).

Insbesondere gilt in der Mitte der Umwandlung bei $T = T_u (\theta = 1/2)$

$$\left(\frac{d \ln K}{dT} \right)_{T_u} = \frac{\Delta H_{\text{van't Hoff}}}{R T_u^2} = 4 (d\theta/dT)_{T_u} \quad (5)$$

oder

$$\Delta H_{\text{van't Hoff}} = 4 R T_u^2 (d\theta/dT)_{T_u}, \quad (6)$$

wo $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ die scheinbare molare Reaktionsenthalpie bedeutet.

Die gemäß Gl. (6) aus den optischen Umwandlungskurven bestimmten scheinbaren Reaktionsenthalpien liegen rund eine Größenordnung über den kalorimetrisch ermittelten (wahren) Werten (vgl. Tabelle 1). Dies bestätigt die bereits oben aus dem Auftreten von Hysterese gezogene Schlußfolgerung, daß die Wechselwirkung zwischen den Lipid-Molekülen eine entscheidende Rolle bei der Phasenumwandlung spielt und daher nur ein kooperatives Modell der Phasenumwandlung dem wirklichen Sachverhalt gerecht wird. Eine solche Theorie hätte vom zweidimensionalen Ising-Modell [39] auszugehen. Die exakte Lösung dieses Falles stößt auf extreme mathematische Schwierigkeiten.

Handliche Näherungslösungen wurden von Zimm und Bragg [40] für das wesentlich einfachere Problem der kooperativen Umwandlung linearer Biopolymere aus dem Ising-Modell abgeleitet. Diese Theorie wurde in der Zwischenzeit weiterentwickelt und mit Erfolg auf Phasenumwandlungen von linearen Biopolymeren angewendet [41—44]. Aus diesen Arbeiten ergibt sich, daß im Grenzfall langer Ketten die Beziehung (5) durch den Ausdruck

$$\left(\frac{d \ln K}{dT} \right)_{T_u} = \frac{1}{\sqrt{\sigma}} \frac{\Delta H_u}{R T_u^2} \quad (7)$$

zu ersetzen ist, wo ΔH_u die molare Umwandlungsenthalpie für den elementaren Wachstumsprozeß bedeutet und σ ein Maß für die Kooperativität der Umwandlung darstellt. Der Parameter σ wurde in die Theorie eingeführt als Gleichgewichtskonstante für das „Umklappen“ eines Einzelements innerhalb einer Sequenz gleichartiger Elemente durch einen Prozeß, bei dem die Anzahl gleichartiger Bindungen konstant gehalten wird. Für $\sigma < 1$ besteht positive Kooperativität: Die Einzelemente des Systems haben die Tendenz, den Zustand der Nachbarelemente anzunehmen (je kleiner σ , um so größer die Kooperativität). $\sigma = 1$ kennzeichnet den Grenzfall verschwindender Kooperativität. Mit steigender Kooperativität, d. h. mit abnehmendem σ , wird die Umwandlung schärfer, und die aus den $\theta(T)$ -Kurven bestimmte scheinbare Umwandlungsenthalpie $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ wird größer.

Ein Vergleich der Beziehungen (5) und (7) ergibt:

$$\sigma = \left(\frac{\Delta H_u}{\Delta H_{\text{van't Hoff}}} \right)^2. \quad (8)$$

Hiernach läßt sich bei Kenntnis der gemäß Gl. (6) zu bestimmenden scheinbaren Umwandlungsenthalpie $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ und der aus kalorimetrischen Messungen bestimmten (wahren) Umwandlungsenthalpie ΔH_u der Wert von σ berechnen.

Wendet man dieses Verfahren analog auf den vorliegenden Fall an, so ergeben sich σ -Werte zwischen 10^{-2} und 10^{-3} (zum Vergleich wurde für die Umwandlung von Polyglutaminsäure $\sigma = 3 \times 10^{-3}$ bestimmt [45, 46]). Die in Tabelle 1 angegebenen σ -Werte erscheinen insofern vernünftig, als die Kooperativität mit steigender Länge der CH_2 -Ketten zunimmt. Eine besonders starke Zunahme wird beim Übergang von Dimyristoyl(C_{14})- zu Dipalmitoyl(C_{16})-phosphatidylcholin beobachtet, während der weitere Übergang zu Distearoyl(C_{18}) nur noch einen geringen Anstieg der Kooperativität bringt. Die modellmäßige Interpretation des Parameters σ für den hier vorliegenden Fall der Umwandlung einer zweidimensionalen Struktur muß Aufgabe weiterer Untersuchungen sein.

Kinetik der Umwandlung

Die Kinetik der Umwandlung wurde mit Hilfe der von Eigen [47] entwickelten Temperatursprung-Relaxationstechnik untersucht. Im Anschluß an kleine, sehr schnelle Temperatursprünge von $\Delta T \approx 0,5^\circ\text{C}$ wurde die zeitliche Relaxation der ANS-Fluoreszenz oder der BTB-Absorption bei $\lambda = 615\text{ m}\mu$ verfolgt. Der größte Teil der Amplitudenänderung läßt sich durch eine Relaxationszeit τ beschreiben. Wie aus

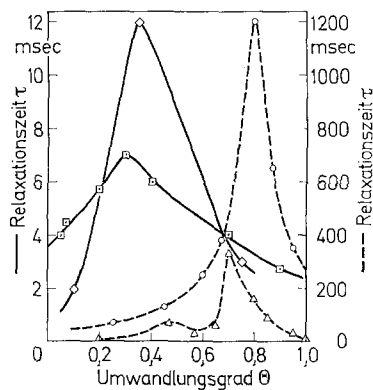


Fig. 6. Relaxationszeit τ der Phasenumwandlung als Funktion des Umwandlungsgrades θ . Der gesamte Umwandlungsbereich ($0 \leq \theta \leq 1$) erstreckt sich über etwa 7°C . Dipalmitoylphosphatidylcholin, $T_u \approx 40^\circ\text{C}$. Größe der Temperatursprünge $\Delta T \approx 0,5^\circ\text{C}$. Cholesterol-Zusatz bewirkt einen starken Anstieg der Umwandlungsgeschwindigkeit. Man beachte die unterschiedlichen Ordinatenmaßstäbe für die gestrichelten und die durchgezogenen Kurven. \circ — \circ Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPC), rein; \triangle — \triangle DPC + 5 Mol-% Cholesterol; \square — \square DPC + 25 Mol-% Cholesterol; \diamond — \diamond DPC + 5 Mol-% Cholesterol + 10^{-2} Mol CaCl_2 . Absorptionsmessungen mit BTB als Indikator, $\lambda = 615\text{ m}\mu$, pH 7.

Fig. 6 hervorgeht, durchläuft τ innerhalb des Umwandlungsbereiches ($0 \leq \theta \leq 1$) ein scharfes Maximum. Ein ähnliches Verhalten wurde von Schwarz [43] für die mittlere Relaxationszeit bei der kooperativen Umwandlung von linearen Biopolymeren theoretisch vorausgesagt. Bei reinem Dipalmitoylphosphatidylcholin liegen die Werte von τ zwischen 100 und 1200 msec. Überraschenderweise wird die Umwandlung rund hundertmal schneller, wenn Cholesterol in die Lipid-Strukturen eingebaut wird (die Umwandlung verschwindet allerdings, wenn der Cholesterol-Gehalt 50 Mol-% übersteigt). Auch die Anwesenheit von Calcium beschleunigt die Umwandlung. Entsprechend Fig. 6 liegen die τ -Werte im System Dipalmitoylphosphatidylcholin + 5 Mol-% Cholesterol in Anwesenheit von 10^{-2} Mol CaCl_2 zwischen 1 und 12 msec. Die Geschwindigkeit der Phasenumwandlung kommt damit in den Bereich der Dauer eines Nervenimpulses. Der Anstieg der Umwandlungsgeschwindigkeit durch den Einbau von Cholesterol deutet auf eine Reduktion der kooperativen Wechselwirkung zwischen den Lipid-Molekülen hin. Eine genauere Analyse dieser Messungen muß einer Einzelveröffentlichung vorbehalten bleiben.

Salzeffekte

Zur weiteren Charakterisierung der Phasenumwandlung wurde der Einfluß von Salzen auf die Bindung von Indikatoren an die Lipid-Strukturen bei $T \ll T_u$ und

$T \gg T_u$ untersucht. Aus diesen Messungen lassen sich Schlüsse auf die Ionenbindung an die Lipid-Strukturen ziehen. Durch die Bindung von Kationen an die Phosphatidylcholin-Gruppen erhält die vorher neutrale Membranoberfläche eine positive Oberflächenladung. Dies führt zu einer verstärkten Adsorption der negativ geladenen Indikatormoleküle an die Lipid-Strukturen. Titriert man Lipid-Dispersionen bei konstanter ANS-Konzentration mit verschiedenen Salzen, so nimmt die Fluoreszenz-Intensität infolge zusätzlicher Bindung von Indikatormolekülen zu. Ähnliche Effekte haben Vanderkooi und Martonosi [48] sowie Gomperts et al. [49] an biologischen Systemen beobachtet. In Fig. 7 sind die Ergebnisse solcher Titrations für das Dipalmitoylphosphatidylcholin-System ($T_u \approx 40^\circ\text{C}$) bei $T = 20^\circ\text{C}$ und $T = 45^\circ\text{C}$ wiedergegeben. Die Fluoreszenz-Änderung ist um so größer, je höher die Wertigkeit der Kationen ist. Bei gleicher Salzkonzentration findet man für die Fluoreszenz-Zunahme die Rangfolge $\text{La}^{+++} > \text{Erdalkalien}^{++} > \text{Alkalien}^+$. In der Reihe der Alkalien und Erdalkalien geben die Ionen mit dem kleinsten Ionenradius bzw. der größten Hydratationsenergie den größten Effekt. Wie aus Fig. 7 hervorgeht, sind die

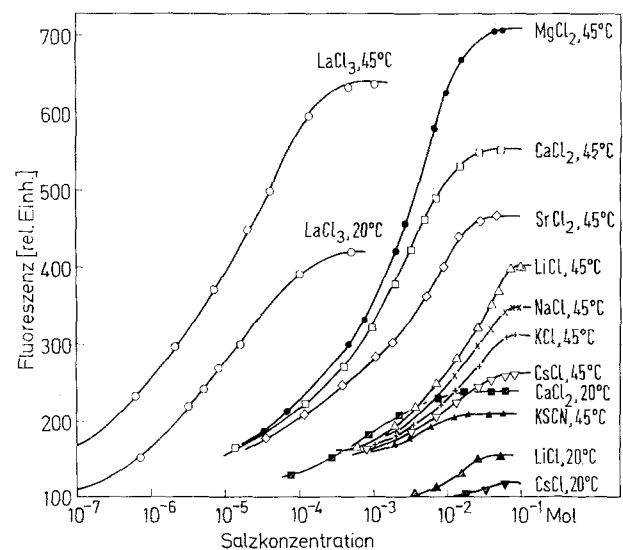


Fig. 7. Zunahme der ANS-Fluoreszenz ($\lambda = 480\text{ nm}$) im System Dipalmitoylphosphatidylcholin/Wasser bei Zugabe von Chloridsalzen ein-, zwei und dreiwertiger Kationen. Messungen bei $T = 20^\circ\text{C}$ und $T = 45^\circ\text{C}$ ($T_u \approx 40^\circ\text{C}$). Lipid-Konzentration: $0,83 \times 10^{-4}\text{ m}$; ANS-Konzentration: $3 \times 10^{-5}\text{ m}$. Die Fluoreszenz-Intensität der salzfreien Lösung bei 20°C wurde gleich 100 gesetzt; dieser Wert entspricht $0,6 \times 10^{-6}$ Mol ANS gebunden

Salzeffekte oberhalb der Phasenumwandlung wesentlich stärker als unterhalb. Eine Auftragung der Messungen in einem $1/\Delta I$ gegen $1/c_{\text{IG}}$ -Diagramm ($\Delta I = \text{Fluoreszenz-Änderung}$, $c_{\text{IG}} = \text{Gesamtkonzentration der Kationen}$) erlaubt es, die scheinbaren Bindungskonstanten⁴ und die relative Anzahl von Bindungsplätzen für die verschiedenen Kationen zu bestimmen.

⁴ Die Bezeichnung „scheinbare Bindungskonstante“ soll zum Ausdruck bringen, daß bei der beobachteten Fluoreszenz-Änderung außer der Ionenbindung auch noch elektrische Doppelschichteffekte eine Rolle spielen können. Wie in einer weiteren Arbeit gezeigt werden soll, kann man diese beiden Anteile auf Grund ihrer unterschiedlichen Abhängigkeit von der Salzkonzentration voneinander trennen.

Die so ermittelten Bindungskonstanten sind für Erdalkalien rund zehnmal größer als für Alkalien. So findet man oberhalb der Umwandlung für Calcium $K_B = 10^3 \text{ Mol}^{-1}$ und für Lithium $K_B = 35 \text{ Mol}^{-1}$. Ähnlich wie bei der Bindung der Indikatormoleküle ist die Zahl der Bindungsplätze oberhalb der Umwandlung etwa zwei- bis dreimal größer als unterhalb. Dies ist die wesentliche Ursache für die stärkeren Salzeffekte oberhalb der Umwandlung. Interessanterweise sind die Unterschiede zwischen Ionen gleicher Ladung oberhalb der Umwandlung wesentlich größer.

Sind verschiedene Kationen gleichzeitig anwesend und ändert man die Konzentration einer Spezies, so kommt es zu einem Ionenaustausch an den Lipid-Strukturen. Diese Ionenaustauschereigenschaften werden durch die Phasenumwandlung gleichfalls beeinflusst. Beispielsweise wird bei $T > T_u$ das zweiwertige Calcium gegenüber einwertigen Kationen stärker bevorzugt als bei $T < T_u$. Dies bedeutet, daß die Phasenumwandlung von einem Ionenaustausch begleitet ist; d.h., man kann eine Lipid-Membran als einen durch die Phasenumwandlung schnell umschaltbaren Ionenaustauscher auffassen. Das System zeigt damit im Prinzip ein Verhalten, wie es von Adam [7] in seiner Theorie der Nervenerregung angenommen wurde (Adam [7]: Theorie der Nervenerregung als kooperativer Kationenaustausch in einem zweidimensionalen Gitter).

Wie erwähnt, wirkt sich die Anwesenheit von Salzen und die Erniedrigung des pH auf den Verlauf der Umwandlungskurve, auf die Hysterese und in geringem Maß auch auf die Umwandlungstemperatur aus. Damit besteht grundsätzlich die Möglichkeit, die Phasenumwandlung außer durch Temperaturänderung auch durch Änderung der Salzkonzentration und des pH auszulösen bzw. zu beeinflussen. Der Einfluß hoher elektrischer Felder auf die Umwandlung wird derzeit untersucht.

Strukturelle Änderungen während der Umwandlung, Folgerungen

Bezüglich der molekularen Vorgänge bei der Phasenumwandlung folgt aus den vorliegenden Untersuchungen, daß nicht nur der Kohlenwasserstoffteil der Lipid-Strukturen betroffen ist⁵ (im Sinne steigender Fluidität mit steigender Temperatur), sondern daß auch die Anordnung der polaren Gruppen geändert wird, und zwar im Sinne einer Auflockerung mit steigender Temperatur⁶ (vgl. die schematische Zeichnung in Fig. 4).

⁵ Die Phasenumwandlung von Lipiden hat in verschiedener Hinsicht Ähnlichkeit mit entsprechenden Umwandlungen in Paraffinen, z.B. bezüglich der Kettenlängenabhängigkeit der Umwandlungstemperaturen und der Umwandlungsenthalpien [24]. Man hat daher Grund zu der Annahme, daß sich die molekularen Veränderungen im Kohlenwasserstoffteil der Lipid-Strukturen während der Umwandlung durch das von Pechhold u. Mitarb. [51] für Paraffine und lineare Hochpolymere entwickelte Konzept der Bewegung und Umlagerung von sog. Kink-Isomeren in den CH_2 -Ketten beschreiben läßt. Als zusätzliches Element muß jedoch die Kopplung zwischen den CH_2 -Ketten und den Phosphatidylcholin-Gruppen berücksichtigt werden.

⁶ Die „Auflockerung“ der Phosphatidylcholin-Gruppen stellt möglicherweise einen Übergang von der an der Phosphatgruppe abgewinkelten, sog. „gauche“-Form in die gestreckte Zick-Zack-Struktur dar (vgl. Fig. 1) [23, 52–54].

Wie in einer vorhergehenden Arbeit [50] gezeigt wurde, ist zu erwarten, daß Strukturänderungen im CH_2 -Teil sich auf die Permeabilität von Lipid-Membranen auswirken. Ändert sich gleichzeitig die Anordnung der polaren Gruppen, so sind erhöhte Effekte in dieser Richtung zu erwarten. Durch die Auflockerung der polaren Gruppen werden auch die Assoziationsprozesse an der Membranoberfläche beeinflusst. Außer der schon besprochenen Ionenbindung wird also vermutlich auch die Wechselwirkung zwischen Lipiden und Proteinen geändert. Auf diese Weise bietet sich die Möglichkeit, die Phasenumwandlung in den Lipid-Strukturen zwanglos an chemische Prozesse in den angrenzenden Medien anzukoppeln.

Bemerkungen zur unterschiedlichen Lipid-Zusammensetzung von Biomembranen

Nach dem Vorhergehenden hängt offenbar eine Reihe von Membran-Eigenschaften, wie z.B. die Permeabilität gegenüber verschiedenen Substanzen, die Wechselwirkung mit Ionen, Proteinen und anderen Makromolekülen, von der Beweglichkeit und Struktur der Kohlenwasserstoffketten und der polaren Gruppen der Lipide ab. Diese strukturellen Parameter werden durch den Zustand der Membranlipide bezüglich der Phasenumwandlung bestimmt, insbesondere ergeben sich erhebliche Unterschiede, je nachdem, ob sich die Lipide oberhalb oder unterhalb der Phasenumwandlung befinden. Umgekehrt wird die Lage des Umwandlungspunktes empfindlich durch die Zusammensetzung und die chemische Struktur der Lipide beeinflusst. Damit gewinnt die Aussage, daß die „richtige“ Lipid-Zusammensetzung eine wesentliche Voraussetzung für das richtige Funktionieren einer biologischen Membran ist, eine konkrete Bedeutung. Besonders wichtig ist die richtige Lipid-Zusammensetzung offenbar bei „labilen“ Membranen, deren Funktion mit einer Strukturänderung verbunden ist.

Auch die Bedeutung von Cholesterol kann unter einem neuen Gesichtspunkt betrachtet werden⁷. Während bislang die Rolle von Cholesterol hauptsächlich in der mechanischen Stabilisierung von Biomembranen gesehen wurde, zeigen die kinetischen Untersuchungen, daß Cholesterol eine wichtige Rolle bei Strukturänderungen spielt, indem es die Geschwindigkeit der Umwandlung erhöht.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Eigen für sein anspornendes Interesse und Fr. B. Voigt für tatkräftige Hilfe bei den Experimenten. Herrn Prof. Dr. M. Delbrück sowie den Herren Dr. D. Haynes und Dr. E. Neumann danke ich für wertvolle Kritik.

[1] Changeux, J. P., et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 335 (1967). — [2] Changeux, J. P., Podleski, T.: *ibid.* 59, 944 (1968). — [3] Blumenthal, R., Changeux, J. P., Lefever, R.: J. Membr. Biol. 2, 351 (1970). — [4] Hill, T. L., Chen, Y.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 65, 1069 (1970); 66, 189, 607 (1970). — [5] Tasaki, I.: Nerve Excitation, A Macromolecular Approach. Springfield, Illinois: C. C. Thomas 1968. — [6] Singer, I., Tasaki, I., in: Biological Membranes, S. 347. (Hrsg.

⁷ Der Cholesterol-Gehalt von Biomembranen verschiedenen Ursprungs ist stark verschieden. Beispielsweise enthalten Mitochondrien-Membranen nur 1–5 Mol-% Cholesterol. Erythrocyten-Membranen haben einen Cholesterol-Gehalt von rund 25 Mol-%; der Cholesterol-Anteil in Nervenmyelin ist noch höher, liegt aber unter 50 Mol-% [13].

- D. Chapman). London-New York: Academic Press 1968. — [7] Adam, G., in: Physical Principles of Biological Membranes, S. 35 (Hrsg. F. Snell, J. Wolken, G. Iverson u. J. Lam). New York-London-Paris: Gordon and Breach 1970. — [8] Cohen, L. B., Keynes, R. D., Hille, B.: Nature **218**, 438 (1968). — [9] Tasaki, I., Barry, W., Carnay, L., in: [7], S. 17. — [10] Steim, J. M., et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **63**, 104 (1969). — [11] Engelman, D. M.: J. Mol. Biol. **47**, 115 (1970). — [12] Melchior, D. L., et al.: Biochim. Biophys. Acta **219**, 114 (1970). — [13] Van Deenen, L. L. M., in: Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids, Vol. 8, I (Hrsg. R. T. Holman). Pergamon Press 1965. — [14] Chapman, D.: The Structure of Lipids. London: Methuen 1965; Introduction to Lipids. London: Mc. Graw-Hill 1969. — [15] Reiss-Husson, F.: J. Mol. Biol. **25**, 363 (1967). — [16] Lecuyer, H., Dervichian, D. G.: *ibid.* **45**, 39 (1969). — [17] Luzatti, V., in: [6], S. 71. — [18] Danielli, J. F., Davson, H.: J. Cell. Comp. Physiol. **5**, 495 (1935); Davson, H., Danielli, J. F.: The Permeability of Natural Membranes. Cambridge: Univ. Press 1950. — [19] Danielli, J. F., in: Formation and Fate of Cell Organelles, S. 239 (Hrsg. K. B. Warren). New York: Academic Press 1967. — [20] Stoeckenius, W., Engelman, D. M.: J. Cell. Biol. **42**, 613 (1969). — [21] Thompson, T. E., Henn, F. A., in: Structure and Function of Membranes of Mitochondria and Chloroplasts (Hrsg. E. Racker). New York: Reinhold Book Corp. 1968. — [22] Luger, P.: Naturwissenschaften **57**, 474 (1970). — [23] Chapman, D., Wallach, D. F. H., in: [6], S. 125. — [24] Ladbrooke, B. D., Chapman, D.: Chem. Phys. Lipids **3**, 304 (1969). — [25] Phillips, M. C., Williams, R. M., Chapman, D.: *ibid.* **3**, 234 (1969). — [26] Truble, H., Grell, E.: The Formation of Asymmetrical Spherical Lecithin Vesicles: Neurosciences Research Program Bulletin on "Carriers and Specificity in Membranes" (Hrsg. M. Eigen u. L. De Maeyer), 1971. — [27] Huang, Ch.: Biochemistry **8**, 344 (1969). — [28] Truble, H.: in Vorbereitung. — [29] Stryer, L.: J. Mol. Biol. **13**, 482 (1965). — [30] Haynes, D.: in Vorbereitung. — [31] Schneider, H., Truble, H.: in Vorbereitung. — [32] Truble, H., in: Moderne Probleme der Metallphysik, S. 157 (Hrsg. A. Seeger). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966. — [33] Katchalsky, A., Oplatka, A.: Israel J. Med. Sci. **2**, 4 (1966). — [34] Katchalsky, A., Spangler, R.: Quart. Rev. Biophys. **1**, 127 (1968). — [35] Katchalsky, A., in: Biology and the Physical Sciences, S. 267 (Hrsg. S. Devons). New York: Columbia University Press 1969. — [36] Cox, R. A., et al.: Biochim. Biophys. Acta **21**, 576 (1956). — [37] Cox, R. A., Littauer, U. Z.: *ibid.* **72**, 188 (1963). — [38] Neumann, E., Katchalsky, A.: Ber. Bunsenges. **74**, 868 (1970). — [39] Ising, E.: Z. Physik **31**, 253 (1925). — [40] Zimm, B. H., Bragg, J. K.: J. Chem. Phys. **28**, 1246 (1958); **31**, 526 (1959). — [41] Applequist, J.: *ibid.* **38**, 934 (1963). — [42] Ptitsyn, O. B., in: Conformation of Biopolymers, **1**, S. 381 (Hrsg. G. N. Ramachandran). London-New York: Academic Press 1967. — [43] Schwarz, G.: Biopolymers **6**, 873 (1968). — [44] Engel, J., Schwarz, G.: Angew. Chem. **82**, 468 (1970). — [45] Snipp, R. L., Miller, W. G., Nylund, E. R.: J. Amer. Chem. Soc. **87**, 3547 (1965). — [46] Orlander, D. S., Holtzer, A.: *ibid.* **90**, 4549 (1968). — [47] Eigen, M., De Maeyer, L., in: Technique of Organic Chemistry, Vol. 8, II, S. 895 (Hrsg. A. Weissberger). New York-London: Interscience. Publ. 1963. — [48] Vanderkooi, J., Martonosi, A.: Arch. Biochem. Biophys. **133**, 153 (1969). — [49] Gomperts, B., Lantelme, F., Stock, R.: J. Membr. Biol. **3**, 241 (1970). — [50] Truble, H.: *ibid.*, im Druck. — [51] Pechold, W.: Molekulbewegung in Polymeren: Kolloid-Z., Z. Polymere **228**, 1 (1968). — [52] Sundaralingam, M., Jensen, L. H.: Science, N. Y. **150**, 1035 (1965). — [53] Abrahamsson, S., Pascher, I.: Acta crystallogr. **21**, 79 (1966). — [54] Hanai, T., Haydon, D. A., Taylor, J.: J. Theor. Biol. **9**, 278 (1965).

Eingegangen am 11. Januar 1971

Virus und DNS-Replikation. Studien am Bakteriophagen ϕ X 174

ROLF KNIPPERS

Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Tubingen

The literature on ϕ X DNA replication is reviewed. The main emphasis is put on double-stranded ϕ X-DNA replication. The theory of ϕ X "replication sites" in the bacterial host cell is discussed in detail. Experimental evidence for the importance of distinct "replication sites" is summarized. More recent experiments on the mechanism of ϕ X double-stranded DNA replication are described; contrary to earlier results, they suggest that the ϕ X double strand is synthesized in a discontinuous manner. The significance of this finding for DNA replication in general is discussed.

Um die Aufklrung der molekularen Mechanismen der DNS-Replikation bemühen sich Forschergruppen in zahlreichen Laboratorien. Trotz dieser Bemühungen ist unser Wissen über die Biochemie der DNS-Replikation gering, geringer jedenfalls als über die Biosynthese der anderen biologisch interessanten Makromoleküle, etwa der RNS oder der Proteine. Einer der Gründe für die Schwierigkeiten bei der Erforschung der DNS-Replikation mag darin liegen, daß die Vermehrung der genetischen Substanz weitgehend von einer funktionellen und morphologischen Intaktheit der Zelle abhängig zu sein scheint, wie im folgenden angedeutet werden soll. Jede klassische biochemische Arbeitsweise setzt jedoch ein Zerreißen von Zellstrukturen voraus.

Semikonservative Replikation

ber einen Aspekt der DNS-Replikation scheinen sich die Molekularbiologen einig zu sein: *Nachkommen-DNS-Moleküle* sind die Produkte eines *semikonservativen Replikationsprozesses* [1]. Während dieses Vorgangs trennen sich die beiden Polynucleotid-Stränge der „parentalen DNS“. Jeder der beiden entstehenden Einzelstränge dient als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Polynucleotid-Stranges. Am Ende des Replikationszyklus liegen zwei „Tochter-DNS-Moleküle“ vor, die aus je einem parentalen Strang und einem neusynthetisierten Polynucleotid-Strang bestehen [2] (Fig. 8). „Semikonservativ“ [3] in diesem Prozeß sind die parentalen DNS-Stränge,