

- [7] J. Poisson, P. R. Ulshafer, L. E. Paszek & W. I. Taylor, Bull. Soc. chim. France 1964, 2683.  
 [8] K. Biemann, P. Bommer, A. L. Burlingame & W. J. McMurray, J. Amer. chem. Soc. 86, 4624 (1964).  
 [9] W. Klyne, R. J. Swan, B. W. Bycroft & H. Schmid, Helv. 49, 833 (1966).  
 [10] W. Klyne, R. J. Swan, A. A. Gorman, A. Guggisberg & H. Schmid, Helv. 51, 1168 (1968).  
 [11] G. W. Kenner & N. R. Williams, J. chem. Soc. 1955, 522; S. W. Pelletier & D. M. Locke, J. org. Chemistry 23, 131 (1958).  
 [12] H. Schmid & P. Karrer, Helv. 29, 1853 (1946); 33, 512 (1950).

## 204. Modelle für Kopplungsmechanismus und Träger-induzierten Alkaliionentransport in Mitochondrienmembranen

von H.-K. Wipf und W. Simon

Organisch-chemisches Laboratorium, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich

(22. VIII. 70)

*Summary.* Energetic coupling of oxidative phosphorylation in mitochondria is discussed in the light of recent findings concerning mediation of alkali cation transport by antibiotics: Decoupling by cation-specific antibiotics of the valinomycin group, as well as by classical decoupling agents (e.g. 2,4-dinitrophenol), can easily be interpreted on the basis of their known molecular properties if Mitchell's chemi-osmotic theory is accepted. «Ion pump» mechanisms, as proposed by several authors, require additional assumptions that do not seem justified.

In grundlegenden Arbeiten von Moore & Pressman [1] einerseits, sowie Lardy *et al.* andererseits [2] [3] [4] ist aufgezeigt worden, dass sich gewisse Antibiotica in ihrer Wirkung auf Mitochondrienmembranen alkaliionenspezifisch verhalten. So bewirken Antibiotica der sogenannten Valinomycin-Gruppe [3] [5] [6] (Tab.1) unter gewissen

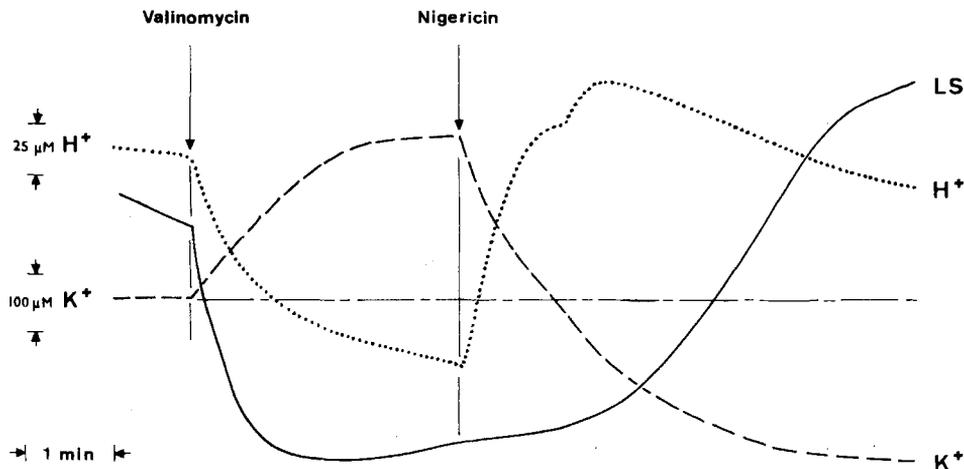


Fig.1. Effekt von Valinomycin und Nigericin auf Mitochondrien [8]

Zugabe von Valinomycin bewirkt: a) Abgabe von Protonen ans Medium («H<sup>+</sup>»); b) Akkumulation von Kalium-Ionen in den Mitochondrien («K<sup>+</sup>»); c) Anschwellen der Mitochondrien, verfolgt anhand der Lichtstreuung («LS»). Für die experimentellen Details siehe [5].

Bedingungen eine Aufnahme von Kalium-Ionen in intakte Mitochondrien, während Antibiotica der Nigericin-Gruppe [3] [5] [6] die durch Vertreter der Valinomycin-Gruppe induzierte Wirkung weitgehend rückgängig machen [3] [4] [7] [8] (Tab. 1, vgl. Fig. 1).

Tabelle 1. *Eigenschaften von Antibiotica der Valinomycin- und Nigericin-Gruppen*

	Antibiotica der Valinomycin-Gruppe	Antibiotica der Nigericin-Gruppe
Typische Vertreter	Valinomycin, Makrotetrolide, Enniatine, Gramacidine A, B, C, S	Nigericin, Monensin, Diane-mycin, X-206, X-537 A
Wirkung in Mitochondrien	Induzierte Kaliumionen-Aufnahme, verbunden mit: Abgabe von Protonen ans äussere Medium Schwellen der Mitochondrien Anregung der Respiration Induzierte ATPase-Aktivität Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung	Entfalten ihre Hauptaktivität nach dem Einsatz von Antibiotica der Valinomycin-Gruppe, indem sie diesen entgegen wirken. Insbesondere: Abgabe von akkumulierten Kalium-Ionen ans äussere Medium unter Austausch gegen Protonen Abschwellen der Mitochondrien
Chemische Eigenschaften	Elektrisch neutral bei physiologischem pH Komplexbildung mit Alkali-metall-Kationen Selektivität $K^+ > Na^+$ Komplexe sind lipidverträgliche, grosse Kationen	Liegen bei physiologischem pH als Anionen vor Komplexbildung des Anions mit Alkalimetall-Kationen Selektivität für Nigericin $K^+ > Na^+$ ; für Monensin $Na^+ > K^+$ Schlecht wasserlösliche und gut lipidlösliche Komplexsalze

Die Ähnlichkeit in der Alkaliionenspezifität in biologischen Systemen und bei EMK.-Messungen an Modellmembranen bestehend aus Antibiotica der Valinomycin-Gruppe auf inertem Trägermaterial [9] [10] führte zur Erkenntnis, dass die Wirkung dieser Antibiotica in hohem Masse auf einer selektiven Komplexbildung mit Alkali-Ionen beruhen muss [9–11] (vgl. auch [12]). Nachdem nun heute feststeht, dass sowohl Antibiotica der Valinomycin- als auch der Nigericin-Gruppe selektiv mit Alkali-Ionen lipidlösliche Komplexe bilden und in Modellsystemen als Träger (Carrier) [8] [13–15] für einen selektiven Transport von Alkali-Ionen verantwortlich sind, stellt sich die Frage nach ihrem unterschiedlichen Verhalten in Mitochondrien und allgemein nach ihrem Wirkungsmechanismus in biologischen Systemen. In der vorliegenden Arbeit wird in Anlehnung an das Verhalten der diskutierten Antibiotica in Modellmembranen [13] [16] [17] gezeigt, in wieweit deren Wirkungsweise in Mitochondrien im Rahmen der chemi-osmotischen Theorie von *Mitchell* [18] auf molekularer Grundlage rationalisiert werden kann (vgl. auch [17] [19] [20]).

Nach der chemi-osmotischen Theorie von *Mitchell* [18] wird die in Mitochondrien freigesetzte Oxydationsenergie intermediär durch den Aufbau einer elektrischen Potentialdifferenz gespeichert. Diese Energie wird in ungestörten Mitochondrien zur

Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat ( $P_{an}$ ) verwendet. Mit der vektoriell in der Mitochondrienmembran ablaufenden Redoxreaktion ist entsprechend Fig. 2 ein aktiver Protonentransport nach aussen (Intracristaeraum) verknüpft. Die Synthese von ATP führt mit einem Rücktransport von Protonen nach innen (Matrixraum, vgl. Fig. 3) zu einem geschlossenen Kreislauf (Fig. 4). Dabei hat die Membran

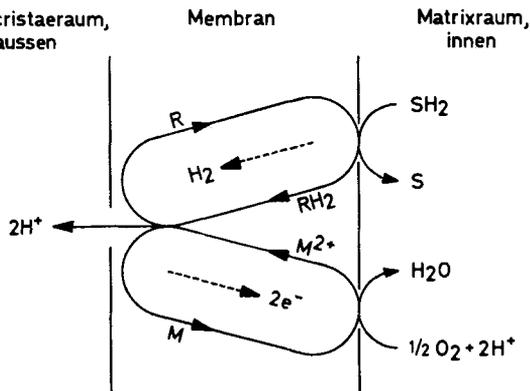


Fig. 2. Schematische Darstellung einer Schleife der Redoxreaktion nach Mitchell [18]  
Kombination von Wasserstofftransfer ( $R/RH_2$ ; z. B.  $FAD/FADH_2$ ) und Elektronentransfer (« $M/M^{2+}$ »; z. B. Cytochrome in reduzierter und oxydierter Form)

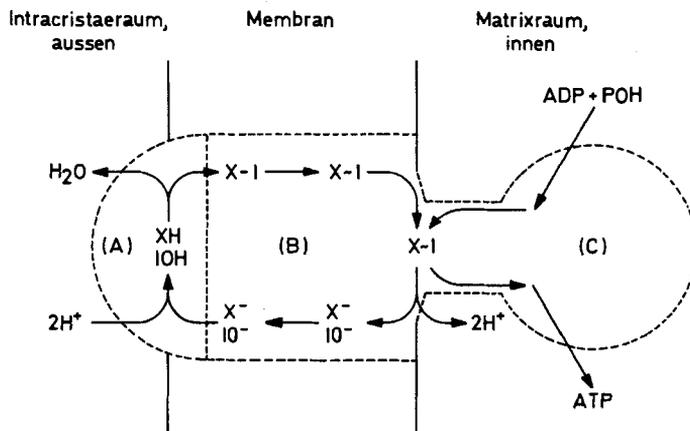


Fig. 3. Schematische Darstellung der ATP-Synthese nach Mitchell [18]

A, B und C bedeuten funktionelle Regionen (Hydrolase, Translocase bzw. Synthetase). Sie gehören möglicherweise zum selben Enzym. XH und IOH sind saure Species, X-I ein Anhydrid.

die Funktion einer Schranke bzw. eines Isolators zwischen Matrix- und Intracristaeraum. Die «Protonmotorische Kraft» von Mitchell [18] setzt sich aus einer elektrischen (Potentialdifferenz) und einer osmotischen (pH-Differenz) Komponente zusammen, wobei die Potentialdifferenz grundsätzlich zum Transport von anderen Kationen oder Anionen verwendet werden kann. Ein derartiger Transport setzt eine adäquate Lipophilie der zu transportierenden Species voraus.

Auf Grund der Ergebnisse von *Röntgen*-Strukturanalysen an Komplexen von Antibiotica mit Alkali- bzw. Silber-Ionen sind für diese Träger-Komplexe die folgenden Aufbaukriterien gültig [6] [15] [20] [21]:

- Das Zentral-Ion ist von 5 bis 8 Sauerstoffatomen des Liganden koordiniert, wodurch die polaren funktionellen Gruppen weitgehend gegen das Zentralatom gerichtet werden.
- Die apolaren (lipophilen) Ligandanteile (Methyl- und Methylengruppen) sind vorzugsweise gegen aussen gerichtet und bilden eine lipophile Oberfläche.
- Das Zentral-Ion als solches ist nicht solvatisiert.

Dementsprechend maskieren die Träger-Antibiotica die Alkali-Ionen derart, dass diese lipidverträglich werden. Die wesentlichsten molekularen Unterschiede von Vertretern der Valinomycin- und Nigericin-Gruppe beruhen nun darauf, dass die Alkalkationenkongplexe der ersteren elektrisch geladen, jene der letzteren elektrisch neutral sind. Obwohl beide Komplexarten lipidverträglich sind, müssen sie sich also in einem elektrischen Potentialgradienten verschieden verhalten. Entsprechend der in Fig. 4

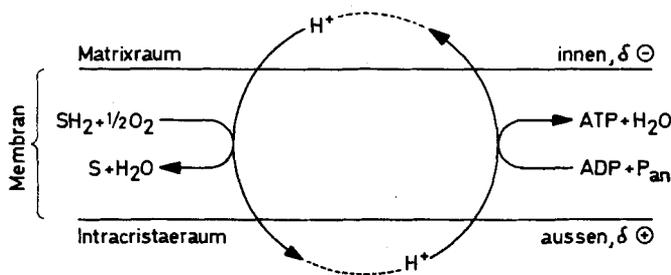


Fig. 4. Kopplung der oxidativen Phosphorylierung in ungestörten Mitochondrien

In ungestörten Mitochondrien wird die Energie der Redox-Reaktion (links in der Figur) durch Aufbau eines elektrischen Potentials intermediär gespeichert. Das Potential wiederum ermöglicht die Synthese von ATP (rechts in der Figur). Die Angaben in dieser und den folgenden Figuren sind nur schematisch und keinesfalls stöchiometrisch richtig.

angegebenen Potentialdifferenz ist bei Gegenwart von Kalium-Ionen im Intracristaeraum durch Zugabe des kaliumspezifischen Antibioticums Valinomycin ein Träger-Transport von  $K^+$  vom Intracristaeraum zu erwarten. Dabei findet die Komplexierung im Bereich der äusseren, die Dekomplexierung im Bereich der inneren Membrangrenzfläche statt und das wieder freigesetzte Valinomycin diffundiert zurück<sup>1)</sup>. Durch diesen im Austausch für Protonen erfolgenden Kaliumtransport wird die ursprüngliche Potentialdifferenz abgebaut und dadurch der Redoxprozess be-

<sup>1)</sup> *Eigen* weist besonders auf die zeitliche Koordination der drei Teilvorgänge Komplexierung, Transport und Dekomplexierung hin [22]. Für einen Träger-Transport kann der Durchtritt durch eine Membran nicht beliebig beschleunigt werden, da mindestens in einer Richtung freie Diffusion auftritt, welche im optimalen Fall geschwindigkeitsbestimmend wird. Die mittleren Durchtrittszeiten für biologische Membranen liegen bei einer Millisekunde [23] [24]. Die Dissoziationskonstante des Komplexes darf also nicht kleiner als  $k_- = 10^9 \text{ s}^{-1}$  werden, sonst wird die Dekomplexierung geschwindigkeitsbestimmend. Andererseits ist die Hinreaktion der Komplexierung praktisch diffusionskontrolliert und läuft demnach mit maximaler Geschwindigkeit [23] [25] ab ( $k_+ = 3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).  $K = k_+/k_-$  darf somit nicht grösser als ca.  $10^6 \text{ M}^{-1}$  werden, sonst wird der Transport verlangsamt.

schleunigt. Parallel dazu führt dieser Potentialabbau zu einer Verlangsamung und schliesslich zu einer Umkehr der ATP-Synthese (Stimulierung der ATPase-Aktivität, Fig. 5). Diese Vorstellungen stehen in bester Übereinstimmung mit Beobachtungen der Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung in Lebermitochondrien [1] [2] [5] [26] [27].

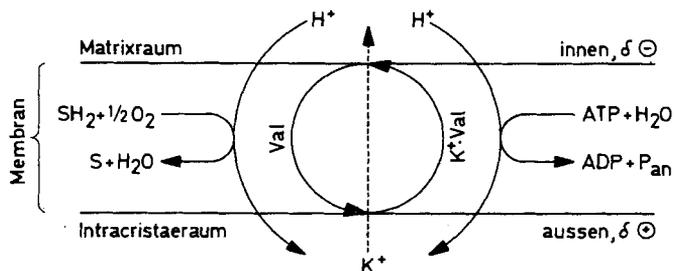


Fig. 5. Kaliumabhängige Entkopplung durch einen Vertreter der Valinomycin-Gruppe (Val)  
Valinomycin (Val) führt zu einem Austausch von  $\text{K}^+$  und  $\text{H}^+$

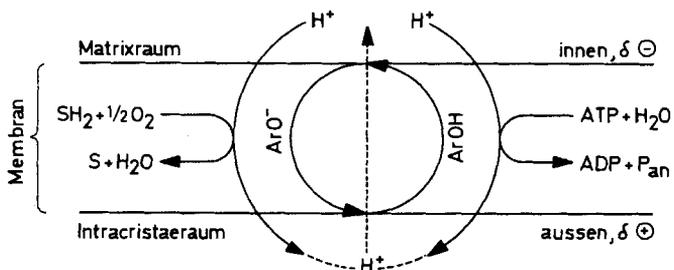


Fig. 6. Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung durch einen klassischen Entkoppler  $\text{ArOH}$   
(z. B. 2,4-Dinitrophenol)

Durch einen cyclischen Prozess erzeugt der Entkoppler einen Kurzschluss. Das Potential wird abgebaut, und Energie von der Oxydation (links in der Figur) oder in Form von ATP (rechts in der Figur) wird verbraucht.

In gleicher Weise ist die Funktion klassischer Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung [17] [19] [28] wie zum Beispiel von 2,4-Dinitrophenol ( $\text{ArOH}$ , Fig. 6) zu deuten. Im Falle dieser klassischen Entkoppler wird das Anion  $\text{ArO}^-$  im Potentialgradienten transportiert und die neutrale Species diffundiert als Protonen-Träger zurück. Die Wirkung derartiger Entkoppler setzt einerseits eine hinreichende Acidität der protonierten Verbindung voraus, andererseits darf das korrespondierende Anion im Hinblick auf seinen Transport im Potentialgradienten nur unbedeutend mit Ladungszentren in der Membran in Wechselwirkung treten. In Übereinstimmung mit diesen Gegebenheiten erlauben die bekannten klassischen Entkoppler eine ausgedehnte Delokalisation der negativen Ladung über mehrere Zentren und führen dadurch zu einer Verminderung der elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Membran. So sind verschiedene Phenole als Entkoppler aktiv, während Benzoesäure mit vergleichbarem  $\text{pK}$ -Wert und struktureller Ähnlichkeit als Folge ungenügender Ladungsdelokalisation unwirksam ist [26] [28].

Die elektrisch neutralen Alkaliionenkomplexe von Monensin und Nigericin werden durch elektrische Potentialgradienten nicht beeinflusst [8] [14] [17], hingegen ermöglichen sie einen Transport von Alkali-Ionen durch erleichterte Diffusion [8] [17]. Ein mit Hilfe von Valinomycin induzierter Kaliumionenkonzentrationsgradient kann somit durch Antibiotica der Nigericin-Gruppe ohne direkte Beeinflussung der Potentialdifferenz abgebaut werden (Fig. 7).

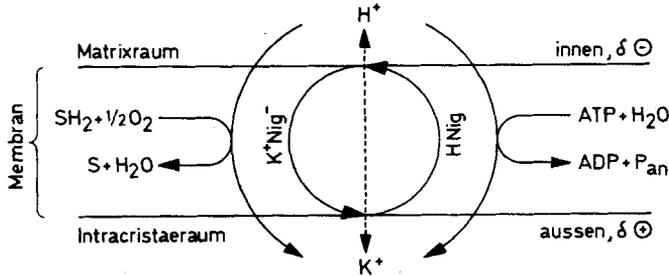


Fig. 7. Austausch von Protonen und Kalium-Ionen durch erleichterte Diffusion mit Hilfe eines Antibiotiums der Nigericin-Gruppe (HNig)

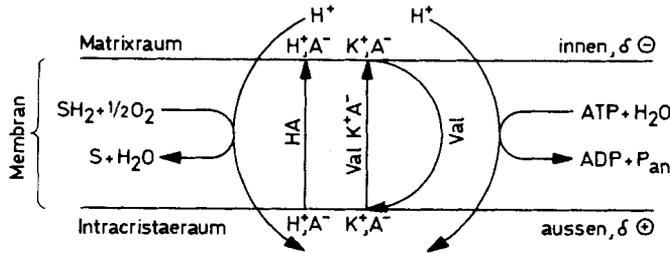


Fig. 8. Erleichterte Diffusion von K<sup>+</sup> und geeigneten Anionen A<sup>-</sup> in Form eines Ionenpaares des Valinomycin-Kaliumkomplexes (Val K<sup>+</sup> A<sup>-</sup>, rechts in der Figur); erleichterte Diffusion von Anionen in der protonierten Form (HA, links im Bild)

Durch erleichterte Diffusion ist grundsätzlich der Transport von Alkali-Ionen im Verband eines Ionenpaares zwischen Träger-Komplexen der Valinomycin-Gruppe und geeigneten Anionen A<sup>-</sup> denkbar [8] [15] (Fig. 8). Sowohl dieser Mechanismus als auch die erleichterte Diffusion von Anionen in Kombination mit dem Transport von Alkali-Ionen dürfte durch sekundären osmotischen Wasserausgleich durch die Membran zu einem Anschwellen der Mitochondrien führen, wie dies auch beobachtet wird [3] [17] [29] [30]. Es ist durchaus möglich, dass zusätzlich zu diesem osmotischen Effekt noch andere Mechanismen zum Wassertransport beitragen [29].

Somit lassen sich die wesentlichen an Mitochondrien beobachteten Effekte (vgl. Tab. 1) zwanglos im Rahmen der chemi-osmotischen Theorie von Mitchell und der hier aufgezeigten molekularen Gegebenheiten rationalisieren (vgl. dazu auch Fig. 1). Die Alkaliionenspezifität der Antibiotica in Mitochondrien ist weitgehend auf ihre selektive Komplexbildung mit Alkali-Ionen und dem daraus folgenden selektiven Transport dieser Ionen zurückzuführen [13] [16] [17]. Da die Komplexbildung auch bei EMK.-Messungen an Modellmembranen der ausschlaggebende Faktor ist [31], liegt eine ausgeprägte Parallelität der Wirkung in biologischen Systemen (ATPase-Aktivität) und EMK.-Messungen vor (Fig. 9) [6] [10].

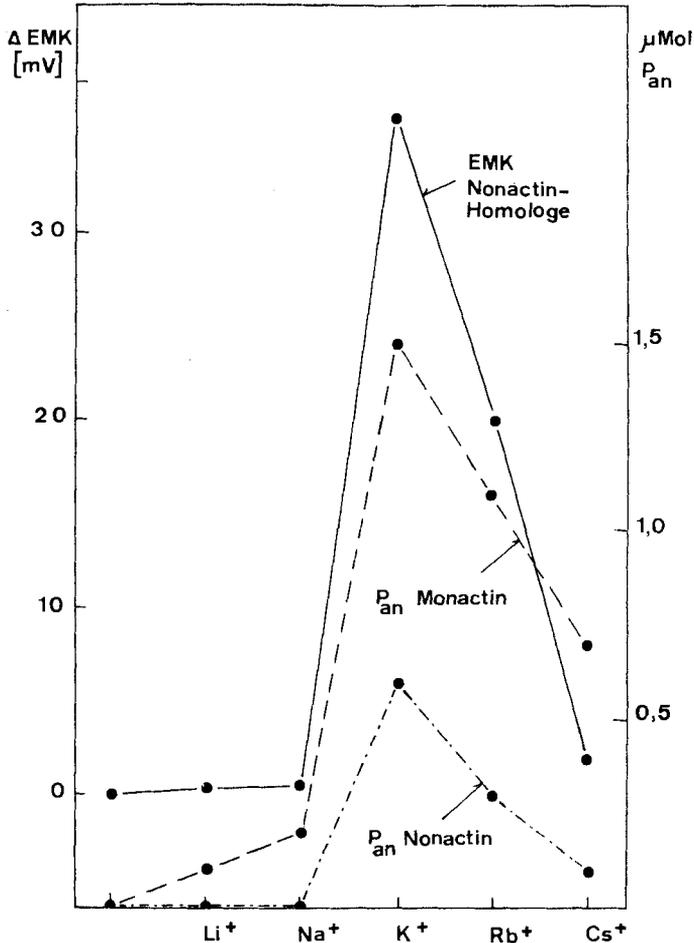


Fig. 9. Vergleich der ionenspezifischen Wirkung von Makrotetroliden in biologischen Systemen (ATPase-Aktivität) und in EMK.-Messungen an Glasfritten [6]

Obschon die chemi-osmotische Betrachtungsweise die beobachteten Tatsachen in Mitochondrien zu rationalisieren vermag<sup>2)</sup>, genügen die Argumente nicht, um das Modell der sogenannten «Ionenpumpe» [1] [3] [8] [33] endgültig zu widerlegen. Im Gegensatz zur chemi-osmotischen Theorie, die einen aktiven Protonentransport und unter dem Einfluss von Antibiotica der Valinomycin-Gruppe einen sekundären Kalium-

<sup>2)</sup> Die kürzlich veröffentlichten Messungen des Potentials an Mitochondrienmembranen [32] würden die chemi-osmotische Theorie widerlegen. Die Messungen sind jedoch sehr zweifelhaft. Ein Einführen von Glaskapillaren von 0,5  $\mu$  Durchmesser in die Mitochondrien (2–4  $\mu$ ) dürfte zumindest die Funktion der Mitochondrien stark stören, wenn nicht gar zum Zusammenbruch des Potentials führen. Die gemessenen Potentialdifferenzen von nur 5 bis 10 mV, deren Polarität entgegengesetzt zu der von der chemi-osmotischen Theorie geforderten liegt, sind so klein, dass sie durchaus reine Oberflächen- bzw. Phasengrenzflächeneffekte sein könnten. Zudem wurde nicht bewiesen, dass die Glaskapillaren überhaupt bis in den Matrixraum gelangt sind.

transport in der Gegenrichtung beinhaltet, verlangt das Modell der «Ionenpumpe» einen aktiven Kaliumtransport unter Mitwirkung der Antibiotica der Valinomycin-Gruppe. Dieser scheinbar kleine Unterschied ist jedoch von tiefgreifender Konsequenz wie aus Tab. 2 hervorgeht.

Eine der Hauptschwächen der Argumentation im Sinne der «Ionenpumpe» besteht jedoch in der Annahme der Existenz eines in ungestörten Mitochondrien in seiner Aktivität nicht nachgewiesenen «Pumpensystems», das nun bei einer offensichtlichen Störung im Membranbereich aktiviert wird.

Tabelle 2. Gegenüberstellung der oxydativen Phosphorylierung in Mitochondrienmembranen nach der chemi-osmotischen Theorie bzw. auf Grund des Modells der «Ionenpumpe»

Phänomen	Erklärung durch	
	chemi-osmotische Theorie	Modell der «Ionenpumpe»
Primärer Transport von Ionen	Protonen; zwanglos aus der vektoriell ablaufenden Redoxreaktion erklärbar	K <sup>+</sup> ; durch zusätzlichen, weder funktionell noch analytisch nachgewiesenen Mechanismus zu rationalisieren
Kopplung der oxydativen Phosphorylierung	Erfolgt über elektrisches Potential; dieses erlaubt den Ablauf chemischer Prozesse wie auch den Transport von Ionen	Verlangt wird ein zusätzliches, noch nie nachgewiesenes, «hochenergetisches» Zwischenprodukt als Verbindungsglied zwischen den Reaktionen
Funktion der Membran	Schranke und Isolator; Membran ist an der Kopplung beteiligt	Schranke; Membran ist als solche unwesentlich für die Kopplung
Wirkung kationenspezifischer Entkoppler der Valinomycin-Gruppe	Transport von lipidverträglichen Ionen in einem elektrischen Potentialgradienten	Wirkung über komplizierten Mechanismus, der immer vorhanden ist, aber erst bei Anwesenheit von Antibiotica der Valinomycin-Gruppe voll aktiviert wird
Wirkung klassischer Entkoppler	In Analogie zur Wirkungsweise der kationenspezifischen Entkoppler der Valinomycin-Gruppe erklärbar	Hydrolyse des «hochenergetischen» Zwischenproduktes unter Mitwirkung der Entkoppler nach unbekanntem Mechanismus; Wirkungsweise von jener der Entkoppler verschieden
Mechanische Defekte der Mitochondrienmembran	Elektrischer Kurzschluss; Kopplung bricht zusammen	Zusammenbruch der chemischen Kopplung infolge mechanischer Defekte kaum erklärbar

Im Gegensatz zur chemi-osmotischen Betrachtungsweise, nach der die heute bekannten Gegebenheiten auf Grund von naheliegenden Annahmen erklärt werden können, sind zur Aufrechterhaltung der Rationalisierung entsprechend dem «Ionenpumpenmodell» eine Reihe von recht hypothetischen Annahmen zu treffen.

Die vorliegende Arbeit wurde durch den *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* unterstützt.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. Moore & B. C. Pressman, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **15**, 562 (1964).
- [2] S. N. Graven, H. A. Lardy, D. Johnson & A. Rutter, *Biochemistry* **5**, 1729 (1966).
- [3] H. A. Lardy, S. N. Graven & S. Estrada-O., *Fed. Proc.* **26**, 1355 (1967).
- [4] S. Estrada-O., S. N. Graven & H. A. Lardy, *J. biol. Chemistry* **242**, 2925 (1967).
- [5] B. C. Pressman, E. J. Harris, W. S. Jagger & J. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58**, 1949 (1967).
- [6] W. Simon, L. A. R. Pioda & H.-K. Wipf, *Cation Specificity of Inhibitors*, 20. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, Mosbach/Baden (Deutschland) 1969.
- [7] S. N. Graven, S. Estrada-O. & H. A. Lardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 654 (1966).
- [8] B. C. Pressman, *Fed. Proc.* **27**, 1283 (1968).
- [9] L. A. R. Pioda, H.-K. Wipf & W. Simon, *Chimia* **22**, 189 (1968); H.-K. Wipf, L. A. R. Pioda, Z. Štefanac & W. Simon, *Helv.* **51**, 377 (1968).
- [10] Z. Štefanac & W. Simon, *Chimia* **20**, 436 (1966); Z. Štefanac & W. Simon, *Microchem. J.* **12**, 125 (1967).
- [11] L. A. R. Pioda, H. A. Wächter, R. E. Dohner & W. Simon, *Helv.* **50**, 1373 (1967); M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, V. K. Antonov, A. M. Shkrob, I. I. Mikhaleva, A. V. Evstratov & G. G. Malenkov, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **29**, 834 (1967).
- [12] P. Mueller & D. O. Rudin, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **26**, 398 (1967).
- [13] H.-K. Wipf, W. Pache, P. Jordan, H. Zähler, W. Keller-Schierlein & W. Simon, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **36**, 387 (1969).
- [14] H.-K. Wipf, A. Olivier & W. Simon, *Helv.* **53**, 1605 (1970).
- [15] M. Pinkerton, L. K. Steinrauf & P. Dawkins, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **35**, 512 (1969); R. Ashton & L. K. Steinrauf, *J. mol. Biol.* **49**, 547 (1970).
- [16] H.-K. Wipf & W. Simon, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **34**, 707 (1969).
- [17] P. J. F. Henderson, J. D. McGivan & J. B. Chappell, *Biochem. J.* **111**, 521 (1969).
- [18] P. Mitchell, «Chemiosmotic Coupling in Oxydative and Photosynthetic Phosphorylation», Glynn Research Ltd., Bodmin 1966; P. Mitchell, *Fed. Proc.* **26**, 1370 (1967).
- [19] E. A. Liberman & V. P. Topaly, *Biochim. biophys. Acta* **163**, 125 (1968).
- [20] H.-K. Wipf, *Diss. ETH Zürich*, Nr. 4492 (1970).
- [21] B. T. Kilbourn, J. D. Dunitz, L. A. R. Pioda & W. Simon, *J. mol. Biol.* **30**, 559 (1967); M. Dobler, J. D. Dunitz & J. Krajewski, *J. mol. Biol.* **42**, 603 (1969); L. K. Steinrauf, M. Pinkerton & J. W. Chamberlin, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **33**, 29 (1968); M. Pinkerton & L. K. Steinrauf, *J. mol. Biol.* **49**, 533 (1970).
- [22] M. Eigen, *Privatmitteilung*.
- [23] R. Winkler, *Diss. Göttingen u. Wien* 1969.
- [24] W. D. Stein, *Nature* **218**, 570 (1968).
- [25] H. Diebler, M. Eigen, G. Ilgenfritz, G. Maass & R. Winkler, 11. I.C.C.C., Haifa (1968); *Pure Appl. Chemistry* **20**, 93 (1969).
- [26] E. J. Harris, M. P. Höfer & B. C. Pressman, *Biochemistry* **6**, 1348 (1967); E. J. Harris, G. Catlin & B. C. Pressman, *ibid.* **6**, 1360 (1967).
- [27] S. N. Graven, H. A. Lardy & S. Estrada-O., *Biochemistry* **6**, 365 (1967); M. Höfer & B. C. Pressman, *ibid.* **5**, 3919 (1966).
- [28] A. Finkelstein, *Biochim. biophys. Acta* **205**, 1 (1970).
- [29] B. C. Pressman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **53**, 1076 (1965).
- [30] A. Azzi & G. F. Azzone, *Biochim. biophys. Acta* **113**, 445 (1966).
- [31] W. Simon, H.-R. Wuhrmann, M. Vašák, L. A. R. Pioda, R. Dohner & Z. Štefanac, *Angew. Chem.* **82**, 433 (1970); J. Sandblom, G. Eisenman & J. L. Walker, Jr., *J. physic. Chemistry* **71**, 3862 (1967); S. Ciani, G. Eisenman & G. Szabo, *J. Membrane Biol.* **1**, 1 (1969).
- [32] J. T. Tupper & H. Tedeschi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **63**, 370 (1969); J. T. Tupper & H. Tedeschi, *Science* **166**, 1539 (1969).
- [33] B. C. Pressman & D. Haynes, *Duke Symposium*, 1969.