

UNTERSUCHUNGEN AN FRAKTIONIERTEN PLÄTTCHENHOMOGENATEN—I

ZUR CHARAKTERISIERUNG DREIER LYSOSOMALER ENZYME UND ÜBER DIE DIFFERENZIERUNG DES ALPHA-GRANULOMER*

E. WEBER, E. WALTER, E. MORGENSTERN, H. MONDT, U. ROSE, H. TOWLIATI
und E. KNAUDT

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg,
Abteilung für Klinische Pharmakologie

dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg

und dem Institut für Zytologie und Elektronenmikroskopie,
der Universität des Saarlandes, Homburg

(Received 1 September 1969; accepted 12 November 1969)

Abstract—Homogenates from platelets in pig blood were separated into three particulate fractions (P_1 , P_2 , P_3) and a “soluble” fraction (P_3U). Approximately 50 per cent of the protein content was found among P_1 – P_3 and the remainder in P_3U . Over 80 per cent of the structure-bound ATP and serotonin was in fraction P_1 , which contained, in addition to vesicular elements, vesicles containing serotonin and electron-dense alpha-granulomeres. Acid phosphates occurred mainly in fraction P_3 , which contained chiefly vesicles and glycogen. Cathepsine and beta-glucuronidase were primarily in P_2 , where we found alpha-granulomeres with matrices which were less electron-dense and of fibrillar appearance. The difference in distribution of the three hydrolases also occurred on further separation using saccharose-dense gradients. From the results we conclude that two types of alpha-granules occur in the platelets. Those which are specifically lighter and less electron-dense are assumed to be typical lysosomes. The activity of the acid phosphatase was inhibited by Cu^{2+} , EDTA, alloxan and oxalic acid. SH-group active substances (cysteine, mersalyl and NEM), thioglycolic acid and ammonium molybdenate had the same effect, as did several surface-active substances (digitonin, prednisolon, Triton X 100). Albumin-activated phosphatase was inhibited by Triton. Either no effect or only an insignificant effect on the enzymes was produced by Mg^{2+} , Ca^{2+} , tartrate, pyruvate, NaF, thrombin and hirudin. The heat inactivation curve and the pH optima (maxima at pH 5.4 and 6.0, minimum at pH 5.8) would indicate that at least two different phosphatases are present. The pH curve of cathepsine showed a maximum at pH 4.6 and a minimum at 4.2. The optima of beta-glucuronidase lay between 4.0 and 4.2 and between 5.0 and 5.4.

UNSERE Kenntnisse über die chemische Zusammensetzung der Blutplättchen beziehen sich weitgehend auf Ergebnisse, die an Plättchennextrakten, -lysaten oder -homogenaten gewonnen wurden. Wenig zahlreich sind die Arbeiten, in welchen den Analysen eine Auftrennung der Zellen in ihre strukturellen Bestandteile vorausging.^{1–11}

Die hier beschriebenen Experimente wurden an Plättchenhomogenaten durchge-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

führt in denen sich nach Differentialzentrifugation und weiterer Auftrennung im Saccharosedichtegradienten 11 partikelhaltige Fraktionen und ein "löslicher" Überstand unterscheiden ließen. Elektronenoptische Bilder zeigen eine charakteristische Differenzierung der Plättchenultrastrukturen durch das angewandte Verfahren. Auch die im folgenden wiedergegebene Verteilung von 4 Substraten (Protein, ATP, Serotonin und Glykogen) über die durch die Differentialzentrifugation erhaltenen Fraktionen P_1 , P_2 , P_3 und $P_3\ddot{U}$ läßt ein charakteristisches reproduzierbares Muster erkennen. Weitere Untersuchungen dienten der Lokalisation dreier lysosomaler Enzyme in den Fraktionen und der Charakterisierung durch Bestimmung der Abhängigkeit ihrer Aktivität vom pH-Wert. Weiterhin wurde der Einfluß einer Reihe von Substanzen auf das Verhalten der sauren Phosphatase geprüft.

METHODEN

1. Isolierung der Blutplättchen und Herstellung des Homogenates

In je 150 ml 3·8% Natriumzitat- oder 1·0% EDTA-Lösung (mit 0·7% NaCl) wurden 850 ml Blut eines Schlachttchweines beim Abstechen des Tieres aufgefangen. Die Isolierung der Plättchen durch Differentialzentrifugation (7–8 Minuten bei 2200 g zur Gewinnung des plättchenhaltigen Plasma; 20 Minuten bei 4600 g zum Absetzen der Zellen) erfolgte ebenso wie alle weiteren Arbeitsgänge in der Kälte. Die Plättchenmassen wurden jeweils in einem großen Überschuß eisgekühlter Elektrolytlösung (1 Teil Trismaleatpuffer pH 7·4 0·05 M + 4 Teile 0·9% NaCl-Lösung und NaCl in Substanz zur Einstellung eines osmotischen Druckes von 300 mOsmol* 3mal gewaschen. Die isolierten Plättchen von 3–6 Tieren wurden zusammengegeben, gewogen und in der TrisNaCl-Lösung suspendiert (1 Gewichtsteil Plättchen + 5 Volumenteile Lösung). Zur Aufschließung der Zellen benützten wir einen motorgetriebenen (3000 U/min) Glas-Teflon-Homogenisator (A. H. Thomas and Co., Philadelphia, USA), dessen Inhalt durch einen Kühlmantel auf 2–4° gehalten wurde. Die Gesamtdauer des Homogenisierens wurde jeweils anhand phasenoptischer Kontrollen festgelegt und lag zwischen 15–20 Minuten. Als Kriterium diente die Zahl von maximal 3–5 intakten Blutplättchen pro Gesichtsfeld bei 630-facher Vergrößerung. Diese Zellen wurden in Kauf genommen, weil die zu ihrer Zertrümmerung notwendige Ausdehnung der Homogenisierzeiten zu einem unerwünschten Aufschluß submikroskopischer Partikel führte.

2. Fraktionierung des Plättchenhomogenates (Gewinnung der Fraktionen $P_1, P_2, P_3, P_3\ddot{U}$ und $P_1\ddot{U}$)

Das durch Zentrifugieren von je 10–12 ml des Homogenates (30 Min bei 4600 g) erhaltene Sediment, in TrisNaCl-Lösung von gleichem Volumen wie der Überstand aufgenommen, und durch kurzes, hochtouriges Quirlen gleichmäßig suspendiert, wurde als Fraktion P_1 bezeichnet. Aus dem Überstand ($P_1\ddot{U}$) setzten sich bei 16,000 g (30 Min) wiederum Partikel ab, die, wie oben aufgenommen und suspendiert, Fraktion P_2 ergaben. Der Überstand diente in entsprechender Weise der Gewinnung von Fraktion P_3 (130,000 g; 30 Min). Die lösliche Fraktion $P_3\ddot{U}$ zeigte stets eine opaleszente Trübung.

3. Auftrennung der Fraktionen P_1, P_2 und P_3 in Saccharosedichtegradienten

Die Schichtung der diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten erfolgte in 5 ml

* Dieses gepufferte NaCl-Medium wird im folgenden mit Tris NaCl-Lösung bezeichnet.

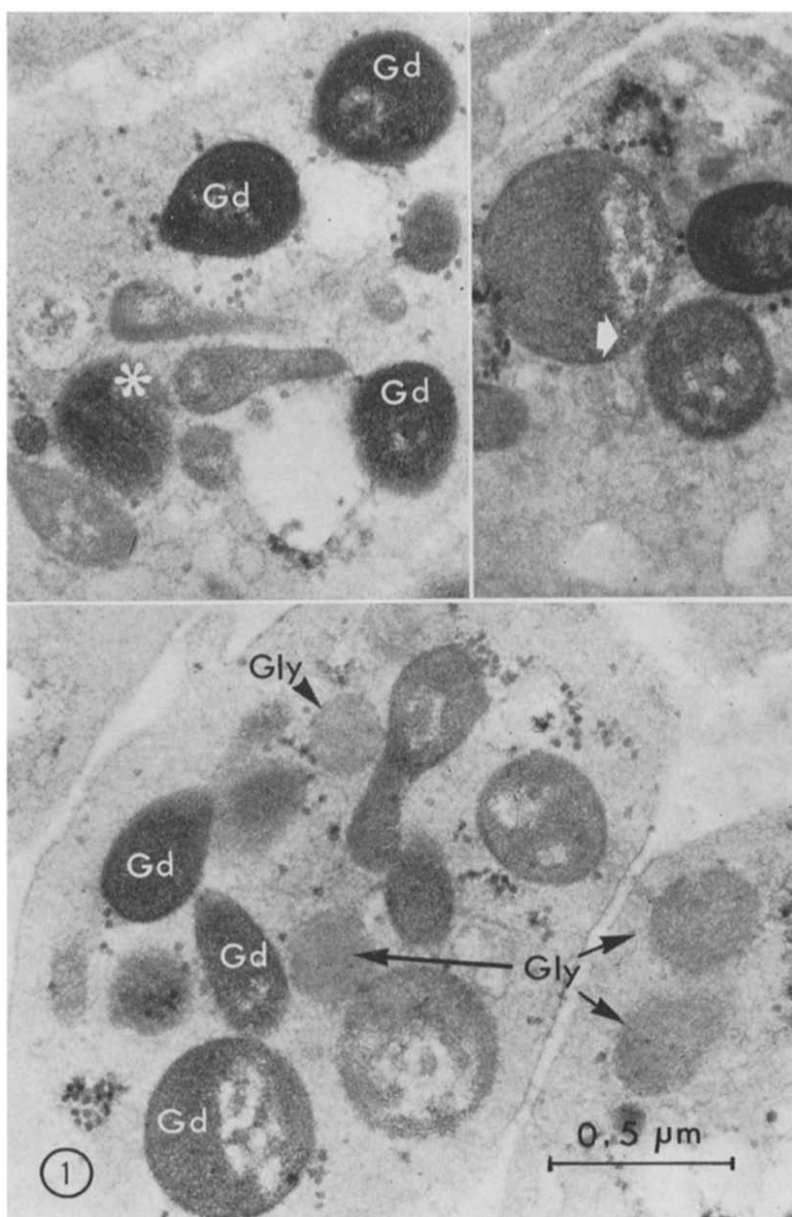


ABB. 1. Plättchen aus Zitratblut vom Schwein enthalten dunkle, elektronendichte alpha-Granula (Gd), die sich deutlich von wenig dichten (Gly) unterscheiden. Neben diesen definierten Typen sind auch Granula mit mehr oder weniger dichter Matrix zu erkennen. Im Bildteil oben links ein dichtes alpha-Granulum (*) mit gestreifter Matrix (längsgeschnittene tubuläre Strukturen), umgeben von vier hellen Granula. Der Pfeil oben rechts kennzeichnet zwei quergeschnittene Tubuli (Kontrastierung: Uranylazetat-Bleizitrat).

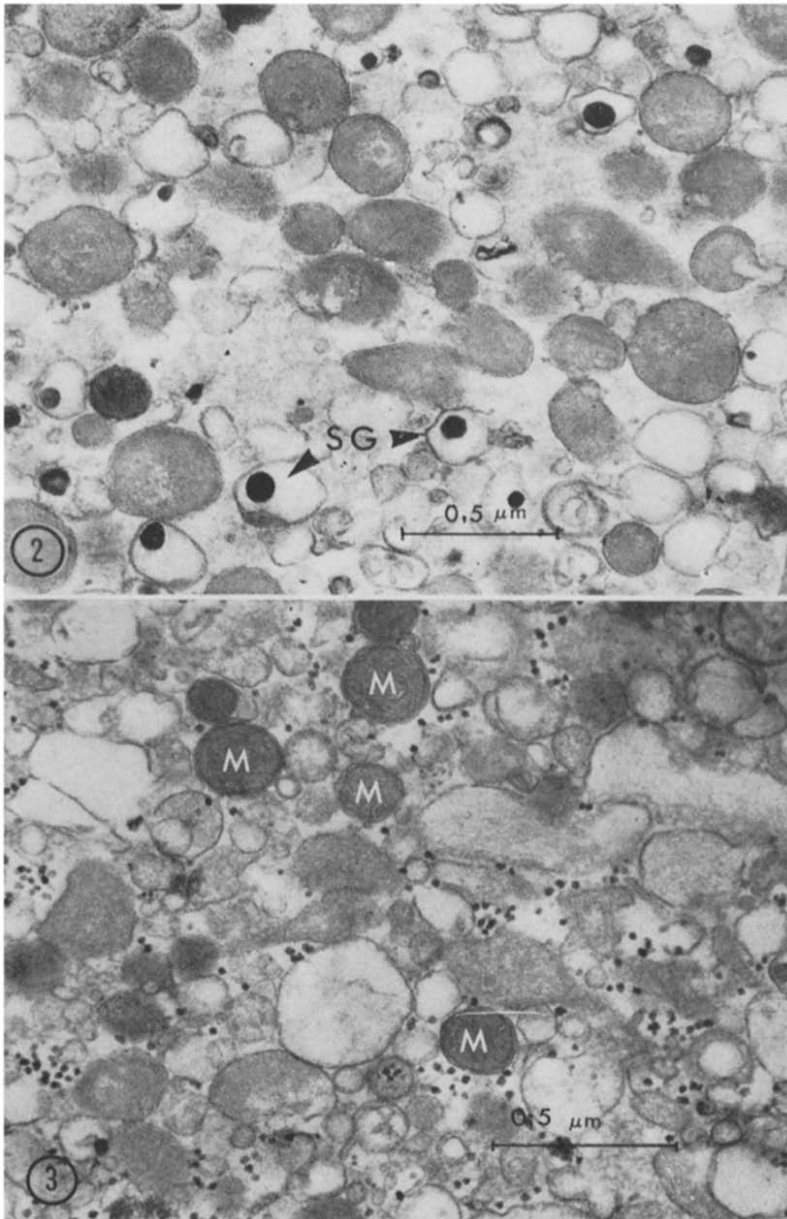


ABB. 2. Fraktion P_1 aus Blutplättchen enthält neben elektronendichten alpha-Granula (vergl. Abb. 1) Serotonin-Granula (SG). Bleizitratkontrast.

ABB. 3. Fraktion P_2 enthält alpha-Granula mit wenig elektronendichter Matrix und fibrillärer Zeichnung (vergl. Abb. 1), Mitochondrien (M), unterschiedlich große Vesikel und Glykogen. Bleizitratkontrast.

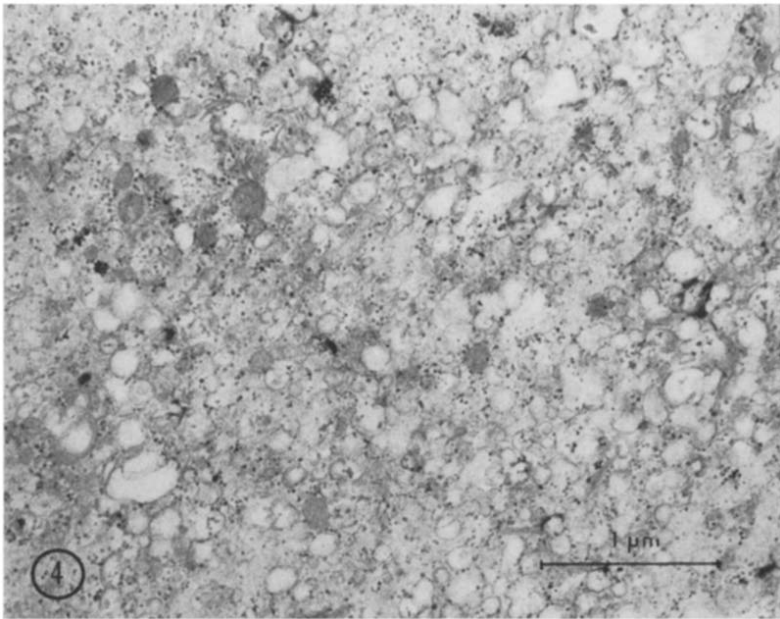


ABB. 4. Fraktion P_3 enthält vor allem vesikuläre Strukturen und Glykogen, sehr selten aber Granula und wenige Mitochondrien. Bleizitratkontrast.

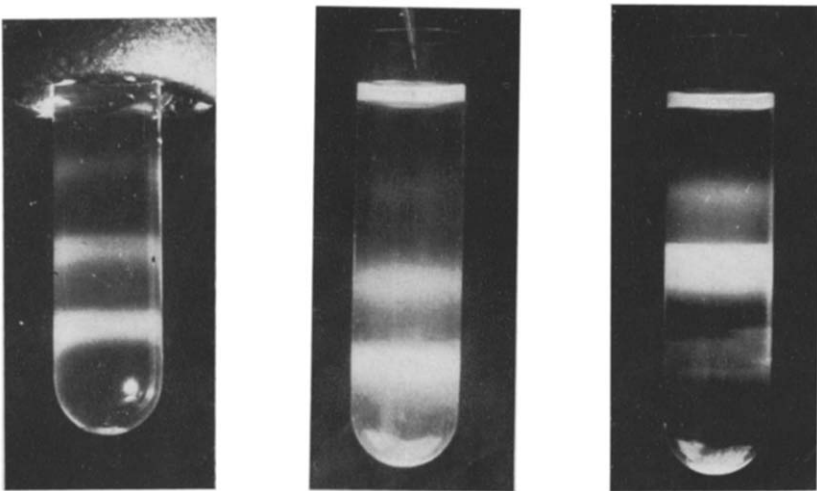


ABB. 5. Die im Saccharosedichtegradienten aufgetrennten Fraktionen P_1 , P_2 und P_3 . Die Lichtreflexe an den Röhrchenboden und die Stufung in P_3 III sind durch das photographische Verfahren bedingt.

Kunststoffbechern passend zum SWL 39-Schwingkopf (Ultrazentrifuge Spinco L, Beckman Instruments GmbH, München) von oben nach unten mit Rohrzuckerlösungen folgender Molaritäten: Zur Auftrennung von Fraktion P_1 0.5–1.0–1.5–2.0 (je 1.25 ml), von P_2 und P_3 0.25–0.5–1.0–1.5 (je 1.25 ml). Die oberste Schicht (je 1.25 ml) wurde jeweils von der aufzutrennenden Fraktion gebildet, die in diesem Fall bei ihrer Herstellung in 0.5 M (P_1) bzw. 0.25 M Saccharoselösung aufgenommen worden war (P_2 und P_3). Nach Anwendung von 100,000 g über 60 Min konnten die partikelhaltigen Zonen in der Kühlkammer (+ 3°) mit Hilfe einer mit stumpfer Kanüle versehenen Insulinspritze, die an einem auf- und abwärts bewegbaren, drehbaren sowie seitwärts schwenkbaren Stativarm fixiert war, durch Absaugen von oben her voneinander abgetrennt werden (Siehe Abbildungen 5 und 6).

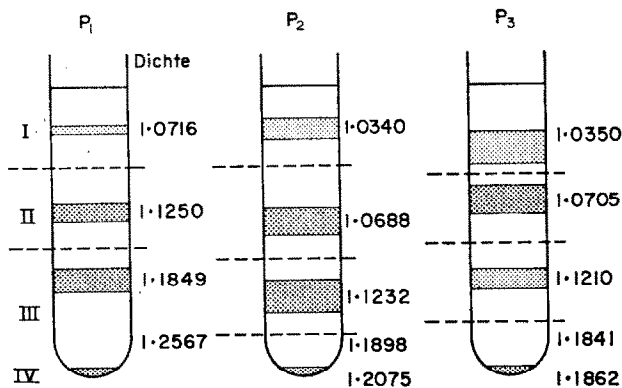


ABB. 6. Schematische Darstellung der partikelhaltigen Gradienten und Sedimente (Römische Zahlen) unter Angabe der refraktometrisch bestimmten Brechungsindizes der Saccharoselösungen (Arabische Zahlen).

4. Chemische Analysenverfahren

Protein. Es wurde die Methode von Lowry et al.¹² nach Angaben von Pendl¹³ in geringfügig modifizierter Form angewendet.

ATP. Die Bestimmung erfolgte nach Enteiweißen mit HClO_4 (50%) und Neutralisieren durch 40% K_2CO_3 mit Hilfe der "Biochemica-Test-Kombination" (Boehringer, Mannheim) unter Einführung von Modifikationen (Erhöhung der Kapazität des Triäthanolamin-HCl-Puffers und Zugabe von Hydrazinsulfatlösung).

Serotonin. Nach Extraktion des Serotonin mit Butanol und Heptan in alkalischem, NaCl-gesättigtem Milieu nach Angaben von Brodie et al.¹⁴ erfolgte die Messung in salzsaurer Lösung mit einem Spektralfluorometer (Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.). Anregende Wellenlänge: 302,4 m μ , Fluoreszenzstrahlung: 550 m μ .

Glykogen. Je 0.2 ml der zu analysierenden Proben wurden mit der 5-fachen Menge 30% KOH versetzt und 30 Min im siedenden Wasserbad gehalten. Die weitere Aufarbeitung lehnt sich an Angaben von Fong et al.¹⁵ an. Die Bestimmung des isolierten Glykogens erfolgte nach Anfärbung mit einem schwefelsauren Anthronreagenz auf kolorimetrischem Wege (615 m μ).

Saure Phosphatase (*o*-Phosphorsäuremonoesterphosphorylase EC.3.1.3.2.). Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe der "Biochemica-Test-Kombination" (Boehringer, Mannheim) mit *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat bestimmt. Die Inkubations-

periode bei 37° betrug, sofern nicht anders angegeben, 30 Minuten. Unter diesen Umständen kann damit gerechnet werden, daß die Gesamtaktivität erfaßt wird. Dies bestätigte sich in Versuchen, in denen die Fraktionen P₁, P₂, P₃, P₃Ü und P₁Ü 10- oder 30 mal eingefroren und wieder aufgetaut wurden. In keinem Fall war ein Anstieg der Enzymaktivität zu verzeichnen. Sie nahm im Gegenteil mit der Anzahl der Wiederholungen der Prozedur ab: mit 66·5% verbleibender Aktivität in P₃Ü am meisten, mit 86% Restaktivität in P₂ am wenigsten. Die angegebenen Konzentrationen an Wirkstoffen beziehen sich stets auf die im Bestimmungsansatz herrschenden Bedingungen.

Cathepsin (EC 3.4.4.9/23). Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die von Gianetto u. De Duve¹⁶ benutzte Methode, die eine Modifikation des von Anson¹⁷ beschriebenen Nachweises darstellt (0·15 M Laktatpuffer; pH 3·6). Als Inkubationsdauer wurden auf Grund von Vorversuchen 90 Min bei 37° unter Schütteln gewählt. Das den Proben zugefügte Triton—X—100 (0·25%) bewirkt, daß stets die Gesamtaktivität des Cathepsins gemessen wird.

β-Glukuronidase (β-D-Glukuronid-Glukuronohydrolase EC 3.2.1.31). Es wurde die Methode von Fishman *et al.*¹⁸ unter Einführung einiger Modifikationen benutzt (Verdopplung der Molarität des Acetatpuffers pH 4·5 auf 0·2 M und Halbierung der Substratmenge). Die Substratkonzentration von 5×10^{-4} M reicht nach Fishman *et al.*¹⁹ aus, sofern keine sehr hohen Enzymaktivitäten nachzuweisen sind. Dies ist in unseren Experimenten der Fall. Die Inkubation mußte auf 19–21 Stunden bei 37° unter ständigem Schütteln ausgedehnt werden, um Werte in einem günstigen Meßbereich zu erhalten. Es ist davon auszugehen, daß wir auf diese Weise stets die totale Aktivität erfaßt haben. Die Überprüfung der Abhängigkeit zwischen eingesetztem Volumen der Plättchenfraktion P₁Ü und den Extinktionswerten ergab eine durch den Nullpunkt gehende Gerade.

Dichtebestimmung der Gradientenzonen. Die Dichte der einzelnen Gradientenbanden wurde mit Hilfe eines Abbé-Refraktometers (Modell A; Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.) ermittelt und für die beim Zentrifugieren herrschenden Bedingungen (4°) umgerechnet.

5. Präparation für die Elektronenmikroskopie

Sedimente der in der Kälte zentrifugierten Fraktionen wurden in eiskalte Fixierlösung I (Glutaraldehyd 4% in Natrium-Kakodylatpuffer pH 7·3) überführt und in Blöckchen von etwa 1 mm Kantenlänge zerkleinert. Nach 2 Stunden wurde in Puffer mit Saccharosezusatz (0·22 M) ebenso lang gewaschen und anschließend 1 Stunde in Fixierlösung II (OsO₄-Lösung nach Caulfield) nachfixiert. Anschließend betteten wir die Blöckchen nach Entwässerung mit Aceton in Araldit ein. Die Kontrastierung erfolgte mit Uranylzitrat und Bleizitrat oder ausschließlich mit Bleizitrat nach Reynold.

Verwendete Substanzen

Adenosin-5-monophosphoric acid, cryst. M = 347·2, Boehringer, Mannheim.

Adenosin-5-triphosphat \times Na₂H₂ \times 3H₂O, krist., Boehringer, Mannheim.

Albumin, Fraction V, Porcine, Pentex Incorporated, Kankakee, Ill.

Serum-Albumin, vom Rind, trocken, reinst, Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

L-Cystein \times HCl \times H₂O, p.A. M = 175·6, Serva, Heidelberg.

Hämoglobin, vom Rind, 2 \times krist., reinst, Serva, Heidelberg.

Hirudin, from leeches, grade II, 1 mg inhib. 200 units Thrombin, Sigma, St. Louis, U.S.A.

Imidazol (Glyoxalin) M = 68·08, Schuchardt, München.

Mersalynatrium [(Salizyl-(3-hydroxymercuri-2-methoxypropyl)-amid-*O*-essigsäure)] reinst, Theophyllinfrei M = 505·9, Serva, Heidelberg.
 Natrium(+)-Tartrat, Testkombination Boehringer, Mannheim.
 NEM = *N*-Ethylmaleimide, Sigma, St. Louis, U.S.A.
 Phenolphthalein Glucuronic Acid, Cinchonidine Salt M = 788, Sigma, St. Louis, U.S.A.
 Phenolphthaleinglucuronid Na-Salz, p.A. M = 516·4, Substratlös.: 0·01 M pH 7·0.
 Phosphatase acid, from potatoes, analytical reagent grade, Boehringer, Mannheim.
 Thioglykolsäure, redest., purum, M = 92·12, Fluka AG, Buchs, Schweiz.
 Thrombinum purum, Rind, Behringwerke AG, Marburg, Lahn.
 Triton-X-100 (Octylphenyl-decaäthylenglykoläther), pract., Serva, Heidelberg.
 Alle folgenden von E. Merck AG, Darmstadt:
 Ammoniummolybdat $\times 4\text{H}_2\text{O}$, p.A. M = 1235·86, Anthron, p.A. M = 194·23.
 Brenztraubensäure, Natriumsalz, LAB M = 110·05.
 Calciumchlorid-2-hydrat, krist., p.A. M = 147·02.
 Digitonin, krist. M = 1229·35.
 EDTA = Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure, Titriplex III.
 Kupfer(II)-sulfat $+ 5\text{H}_2\text{O}$, p.A. M = 249·69.
 Maleinsäure, M = 116·07.
 Magnesiumchlorid $\times 6\text{H}_2\text{O}$, p.A. M = 203·31.
 Magnesiumsulfat $\times 7\text{H}_2\text{O}$, p.A. M = 246·48.
 Milchsäure, reinst, farblos, etwa 90% M = 90·08.
 tri-Natriumzitat-2-hydrat, reinst $\times 2\text{H}_2\text{O}$ M = 294·10.
 Natriumfluorid, p.A. M = 42·0.
 Oxalsäure $\times 2\text{H}_2\text{O}$, p.A. M = 126·07.
 Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu 1 L = 1·22 K.
 Prednisolonhemisuccinat Natriumsalz M = 480·50.
 D(+)-Saccharose, reinst, Ampullenqualität M = 342·31.
 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Puffersubstanz, M = 121·14.
 L(-)-Tyrosin (LAB) M = 181·19.

ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

1. *Verteilung verschiedener Substrate über die Fraktionen P₁, P₂, P₃ und P₃Ü*
 Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Verteilung von Protein, ATP, Serotonin und Glykogen über die vier durch Differentialzentrifugation gewonnenen Fraktionen. Die

TABELLE 1. DIE VERTEILUNG VON SUBSTRATEN ÜBER DIE FRAKTIONEN P₁, P₂, P₃ UND P₃Ü

	P ₁	P ₂	P ₃	P ₃ Ü = "lösl. Frakt."
Protein	9·8	8·1	15·6	66·5
ATP	81·4	14·8	3·0	0·8
Serotonin	85·0	2·5	3·1	9·4
Glykogen	6·9	26·4	60·1	6·6

Protein ist jeweils in Prozenten der Summe des Eiweissgehaltes in den vier Fraktionen angegeben. ATP, Serotonin und Glykogen sind ebenfalls in Prozenten, aber bezogen auf den Eiweissgehalt in jeder Fraktion angegeben. Mittelwerte aus 6 bzw. 8 (Protein) Versuchen.

wiedergegebenen Daten, die auf den Eiweissgehalt der Fraktion bezogen sind, wurden im Verlauf der im folgenden beschriebenen Experimente gewonnen. Sie decken sich unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Bezugspunktes weitgehend mit den Angaben, die wir nach den ersten Versuchen in einer kurzen Mitteilung publiziert haben.²⁰

Addiert man die in den Fraktionen gemessenen absoluten Substratmengen und berechnet den prozentualen Anteil der Fraktion, so ergeben sich in Fraktion P₁, P₂, P₃ und P₃Ü für ATP folgende Zahlen: 78 %, 12 %, 5 % und 5 %. Für Serotonin lauten die entsprechenden Werte: 49 %, 11 %, 3 % und 37 %. Damit sind die Absolutmengen an ATP und Serotonin in Fraktion P₁ gegenüber unseren früheren Angaben geringfügig vermindert. Dies hängt, wie eine experimentelle Überprüfung ergab, mit den in den jetzigen Experimenten verwendeten größeren Ausgangsmengen an Homogenat bei unveränderter Zentrifugiertechnik zusammen.

Strukturgebundenes ATP und Serotonin finden sich fast ausschließlich in Fraktion P₁. Daß dem freien, nicht sedimentierbaren Serotoninanteil kein entsprechender ATP-Gehalt gegenübersteht, ist der außerordentlich hohen ATPase-Aktivität im Homogenat zuzuschreiben, die ohne EDTA-Zusatz auch in der Kälte wirksam wird und den zytoplasmatischen ATP-Pool abbaut. Rund die Hälfte des in den Plättchen vorliegenden ATP-Bestandes wird in unseren Versuchen strukturgebunden erfaßt.

Glykogen findet sich hauptsächlich in Fraktion P₃, die auf Grund der angewandten Zentrifugalkräfte der "mikrosomalen" Fraktion entspricht.

2. Elektronenmikroskopische Befunde

Blutplättchen vom Schwein unterscheiden sich im Elektronenmikroskop nicht wesentlich von denen anderer Säugetiere oder des Menschen. Neben anderen Zellorganellen enthalten sie charakteristische, runde bis ovale oder hantelförmige, membranumgebene Innenstrukturen mit elektronendichter Matrix, die alpha-Granula (Abb. 1). Am ultradünnen Schnitt fällt die unterschiedliche Dichte der Matrix einzelner Granula auf. Wie Abb. 1 zeigt, lassen sich sehr elektronendichte Granula von heller erscheinenden, oft fibrillär gezeichneten unterscheiden. Außerdem findet man Granula mit mehr oder weniger dichtem Inhalt, die sich nicht ohne weiteres einem der beiden Typen zurechnen lassen. Die elektronendichten Granula besitzen oft tubuläre Strukturen und fleckige Aufhellungen ihrer Matrix. In sehr hellen Granula fehlen diese Details. Nach der Fraktionierung findet man die elektronendichteren alpha-Granula in Fraktion P₁ zusammen mit den Serotonin enthaltenden Vesikeln (Abb. 2). Der wenig dichte fibrillär gezeichnete Teil der alpha-Granula ist dagegen, zusammen mit dem Hauptteil der Mitochondrien und vesikulären Strukturen, in Fraktion P₂ enthalten (Abb. 3), und lokalisiert sich im Dichtegradienten in der untersten Bande (P₂III) sowie im Sediment. Fraktion P₃ (Abb. 4) setzt sich aus vorwiegend vesikulären Strukturen, Glykogen, einigen Mitochondrien und sehr wenig granulären Elementen zusammen. Über die Verteilung der Plättchenstrukturen in den einzelnen Fraktionen der Dichtegradienten berichteten wir bereits früher ausführlich.⁸

3. Verteilung dreier lysosomaler Enzyme über die Fraktionen- und Gradientenzonen

Aus Tab. 2 geht hervor, daß über 85 % der Enzymaktivitäten sich sedimentieren lassen und damit der Anteil in der löslichen Fraktion gering bleibt. Weiterhin zeigt die Tabelle, daß über die Hälfte der Phosphatase in der mikrosomalen Fraktion P₃ enthalten ist, während die maximale Aktivität von Cathepsin und Glukuronidase in P₂ gefunden wird.

Die Gleichsinnigkeit in der Verteilung von Cathepsin und Glukuronidase und die davon abweichende Lokalisation von saurer Phosphatase wird auch bei der weiteren Differenzierung im Saccharosedichtegradienten deutlich. In Fraktion P₂ liegen die

Maxima für Glukuronidase und Cathepsin in Schicht III, für saure Phosphatase in Schicht II. In Fraktion P_3 dagegen findet sich die saure Phosphatase vorwiegend in der obersten Bande, Cathepsin und Glukuronidase wieder vorwiegend in Zone III. Lediglich in Fraktion P_1 kamen die höchsten Aktivitäten aller drei Enzyme übereinstimmend in der mittleren Zone vor, bei gegenüber den anderen Fraktionen erheblich geringeren Absolutwerten. Die das alpha-Granulomer aufweisende Zone III (vergl. ref. 8) stellte sich als eine der am wenigsten lysosomale Enzyme enthaltende Bande heraus.

Betrachtet man die Lokalisation der drei untersuchten Hydrolasen in Verbindung mit den in den einzelnen Gradientenzonen gemessenen Saccharosedichten, so ergibt sich, daß Cathepsin und Glukuronidase in allen drei Gradienten vorwiegend in einem Dichtebereich zwischen 1.121 und 1.190 angetroffen werden. Die saure Phosphatase dagegen liegt in P_2 und P_3 in einer spezifisch leichteren (1.035–1.071) Zone als die beiden anderen Enzyme (s. hierzu Abb. 5 u. 6).

4. Zur Charakterisierung der drei untersuchten Hydrolasen in Fraktion $P_1\ddot{U}$

(a) Saure Phosphatase EC 3.1.3.2.

Allgemeine Eigenschaften. Die Überprüfung des Zusammenhanges zwischen steigenden $P_1\ddot{U}$ -Mengen und beobachteter Extinktion zeigte keine Linearität (Abb. 7). Offenbar unterliegt die Plättchenphosphatase ebenso wie die Prostatamonoesterase

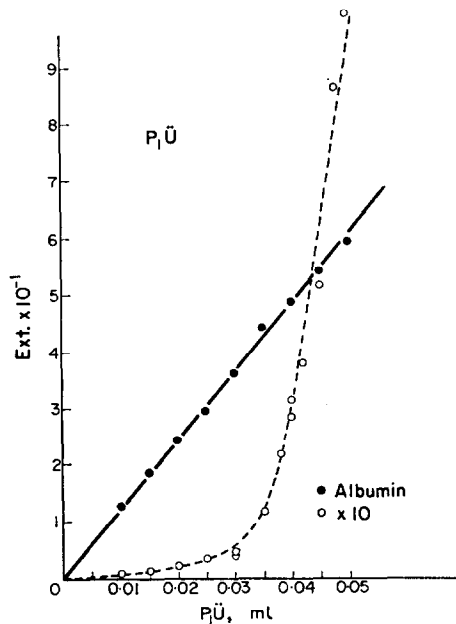


ABB. 7. Beziehung zwischen eingesetzter Menge an Fraktion $P_1\ddot{U}$ und der nachweisbaren Aktivität der sauren Phosphatase in Fraktion $P_1\ddot{U}$ ohne (—○—○—) und mit (—●—●—) Albuminzusatz (0.81 %). Mittelwerte aus 3 Versuchen. Für die ohne Albuminzugabe gewonnene Kurve muß der Abszissenmaßstab mit 10 multipliziert werden.

einer erheblichen Oberflächeninaktivierung, da Zusatz von Albumin (0.81 %) nach Angaben von Tsuboi und Hudson²¹ die dargestellte Gerade ergab. Der Zuwachs an nachweisbarer Enzymaktivität betrug in Ansätzen, die 1 % Rinderalbumin enthielten, gegenüber Proben mit 0.17 % Albumin 55.8 % bei etwa linearem Anstieg. Bei Verwendung von gleichen Konzentrationen an Schweine-Albumin ergab sich ein praktisch identischer Kurvenverlauf. Auch bei einem kommerziellen Präparat von saurer Phosphatase aus Kartoffeln bewirkte Zusatz von Rinder- oder Schweinealbumin (0.41 %) einen Anstieg der Extinktionswerte um das 52- bis 47-fache. Bei Anheben der Albuminkonzentrationen resultierte allerdings eine geringere Zunahme der meßbaren Enzymaktivität als bei den Plättchenfraktionen. Die Oberflächeninaktivierung der sauren Phosphatase ließ sich dagegen im Saccharosemilieu (0.02–0.18 M) durch Albumin nicht aufhalten.

TABELLE 2. DAS VERTEILUNGSMUSTER DREIER LYSOSOMALER ENZYME IN DEN FRAKTIONEN P₁ BIS P₃Û SOWIE IN DEN AUS IHNEN GEWONNENEN SACCHAROSEDICHTEGRADIENTEN

	P ₁			P ₂				P ₃			P ₃ Û	
	8.3 ± 1.2			24.3 ± 0.7				55.0 ± 1.1			12.4 ± 0.9	
saure Phospha- tase	I	II	III	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
	37.4 ± 3.5	46.4 ± 3.6	16.2 ± 3.9	6.2 ± 2.7	42.7 ± 6.8	36.7 ± 10.1	14.4 ± 6.1	42.2 ± 3.2	34.6 ± 1.8	16.3 ± 2.9	6.9 ± 1.7	
Cathepsin	24.7 ± 2.4			44.7 ± 1.8				25.7 ± 1.0			4.9 ± 0.9	
	I	II	III	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
	33.4 ± 3.0	46.7 ± 1.9	19.9 ± 3.6	7.9 ± 1.6	24.4 ± 3.0	35.1 ± 2.9	32.6 ± 6.6	5.4 ± 1.7	23.5 ± 1.2	52.7 ± 2.9	18.4 ± 2.2	
Glukuroni- dase	22.0 ± 5.0			55.2 ± 5.8				20.9 ± 3.4			1.9 ± 0.4	
	I	II	III	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
	23.6 ± 6.3	57.2 ± 4.7	19.2 ± 5.5	4.1 ± 2.0	12.0 ± 2.0	47.1 ± 7.6	36.8 ± 6.2	7.4 ± 1.1	30.9 ± 5.1	39.7 ± 7.6	22.0 ± 3.7	

Alle Angaben in Prozenten der Hauptfraktion bzw. des jeweiligen Dichtegradienten. Die Absolutwerte waren auf den Proteingehalt der betreffenden Fraktion bzw. Gradientenzone bezogen. Mittelwerte aus 12 Versuchen bei den Hauptfraktionen bzw. 4–5 Versuchen für die Dichtegradienten.

Der Einfluß verschiedener Puffersysteme, die bei der Waschung, Homogenisierung der Zellen und bei der Herstellung der Fraktion P₁Û verwendet wurden, auf die Enzymaktivität ist in Tabelle 3 dargestellt. In Anbetracht der unbedeutenden Unterschiede zwischen Tris-Maleat und Tris-NCI-Puffer und weil in parallel laufenden Versuchen sich die Benutzung des Tris-Maleat-Systems als vorteilhafter erwiesen hatte,^{22, 23} führten wir die Mehrzahl der Experimente mit diesem aus.

Denen²⁴ beschrieb, daß bei Verwendung von Acetatpuffer höhere Aktivitäten der sauren Phosphatase im Serum gemessen werden können, weil Citrat zu einer Hemmung des Enzymes führe. Eigene Versuche mit Acetatpuffer (0.1 M; n = 2) ergaben gegenüber Citratpuffer einen Anstieg der Enzymaktivitäten um 21 % (pH 4.8) bzw. 7 % (pH 5.0) und 11 % (pH 5.2).

TABELLE 3. VERGLEICH DER AKTIVITÄT DER SAUREN PHOSPHATASE IN FRAKTION $P_1\dot{U}$ MIT UND OHNE ALBUMINZUSATZ IN DREI VERSCHIEDENEN PUFFERSYSTEMEN, DIE IM PLÄTTCHENHOMOGENAT UND ZUR HERSTELLUNG DER FRAKTION $P_1\dot{U}$ VERWENDET WURDEN

Puffersystem	ohne Albumin a	mit Albumin Steigerung gegen a) b	c
Tris-Maleat	100·0%	23·4 fach	100·0%
Tris-HCl	44·5%	48·5 fach	92·0%
Imidazol-HCl	87·5%	30·0 fach	112·5%

Zur Aktivitätsmessung Standardansatz mit Citratpuffer. Mittelwerte aus 3 Versuchen.

Zur Ermittlung der Inaktivierung bei 37° wurde die nach 30 Min und 120 Min Inkubation bei 37° in $P_1\dot{U}$ noch vorhandene Aktivität bestimmt. Nach 30 Minuten lagen 87·9, nach 120 Minuten 79·4% der Ausgangswerte vor. In den ersten 30 Minuten ist die Summe des Aktivitätsverlustes in den einzelnen Fraktionen (P_2 , P_3 und $P_3\dot{U}$), welche in $P_1\dot{U}$ enthalten sind, mit 10·4% praktisch identisch mit demjenigen von 12·1% in $P_1\dot{U}$. Der Vergleich der 30- und 120 Minutenwerte in $P_1\dot{U}$ läßt die Verlangsamung des Aktivitätsabfalles nach der 30. Minuts deutlich erkennen. Wurde $P_1\dot{U}$ im Kühlschrank bei + 2° 24–72 Stunden gelagert, so bedeutete dies einen Aktivitätsverlust zwischen 9 und 17%.

Beeinflussung durch verschieden Substanzen

ATP und AMP. Bei Webb²⁵ finden sich Angaben über die kompetitive Hemmung von Phosphatasen durch ATP. Es mußte deshalb geprüft werden, ob das gegensätzliche Verteilungsmuster von ATP und saurer Phosphatase in den Fraktionen P_1 bis P_3 im Zusammenhang mit dem ATP-Gehalt der Fraktion steht. Die im Bereich der an ATP reichsten Fraktion liegenden ATP-Konzentration von $2·3 \times 10^{-5}$ M ergab eine Enzymaktivität von 98% der Kontrollen. Ein entsprechender Versuch mit 10^{-3} M AMP führte ebenfalls zu keiner Abweichung von den Kontrollwerten.

Kationen

Magnesiumionen aktivieren die saure Erythrocytenphosphatase²⁶ und sind für die Umsetzungen der Plättchen und Erythrocytenpyrophosphatase obligat. Dagegen sind sie ohne Bedeutung für die lysosomale saure Leberphosphatase. In $P_1\dot{U}$ war nur ein schwacher, aber konzentrationsabhängiger Effekt durch Magnesium zu erreichen, dem allerdings osmotische Einflüsse zugrunde liegen können (Tabelle 4).

Calcium. Im Bereich von $3·3 \times 10^{-6}$ M bis $3·3 \times 10^{-3}$ M Calcium lagen die Aktivitäten der sauren Phosphatase in $P_1\dot{U}$ von 97·8 bis 98·8% bezogen auf die gleich 100% gesetzten Kontrollen (Tabelle 4).

Kupferionen (2×10^{-4} M) inhibieren die Erythrocytenphosphatase, dagegen nur wenig die Prostataphosphatase. Nach Befunden von Abul Fadl u. King²⁷ soll diese Hemmung der Prostataphosphatase bei Benutzung eines Acetatpuffers auftreten, während in Citratpuffer-haltigem Milieu 3×10^{-3} M Kupferionen die Phosphatase geringgradig aktivieren. In unseren Versuchen verhielt sich das Enzym in $P_1\dot{U}$ ähnlich wie die Erythrocytenphosphatase (Tabelle 4).

EDTA bleibt auf die Prostataphosphatase sowie auf die Stabilität von Lysosomen ohne Einfluß. Weber *et al.*²⁸ wiesen dagegen an saurer Phosphatase aus Leberextrakten eine Aktivierung in Abhängigkeit vom Enzymsubstrat nach. In $P_1\dot{U}$ verursachte EDTA eine nahezu 50%-Hemmung (Tabelle 4).

TABELLE 4. DIE AKTIVITÄT DER SAUREN PHOSPHATASE IN FRAKTION $P_1\dot{U}$ NACH EINWIRKUNG VON KATIONEN UND VON EDTA

n		M	% der Kontrollen
3	MgCl ₂	10 ⁻²	84.4
7	MgCl ₂	10 ⁻³	96.3 ± 1.6
4	MgCl ₂	10 ⁻⁴	98.4 ± 2.1
5	CaCl ₂	3.3 × 10 ⁻³	97.8 ± 2.0
4	CaCl ₂	3.3 × 10 ⁻⁴	98.5
2	CaCl ₂	3.3 × 10 ⁻⁶	98.8
5	CuSO ₄	10 ⁻³	9.4 ± 1.5
5	CuSO ₄	10 ⁻⁴	63.8 ± 2.8
2	EDTA	1.67 × 10 ⁻⁴	54.7

Angaben in Prozenten der unbehandelten Kontrollen. In den Versuchen mit Calcium erfolgte eine Vorinkubation von $P_1\dot{U}$ über 10 Min. bei 37° unter Zusatz der Calciumionen.

Inhibitoren der Prostataphosphatase

Die Natriumsalze von *Tartrat*, *Pyruvat* und *Fluorid* sind bekannte Hemmstoffe der sauren Prostataphosphatase (Lt. s. bei Schmidt²⁹). Darüber hinaus hemmt Tartrat die lysosomale Rattenleber phosphatase vollständig, die im Überstand jedoch nur zu 20–28%.³⁰ Yu *et al.*³¹ fanden eine durch 10⁻² M Tartrat bedingte Hemmung des Enzyms um 90% in allen aus Rattenleukocyten gewonnenen Fraktionen und Iype u. Heidelberger³² eine teilweise Inhibierung in verschiedenen Geweben der Maus. Im Lysat, das aus menschlichen Blutplättchen hergestellt worden war, wurde unter Tartratzusatz (10⁻² M) die saure Phosphatase bei Verwendung von *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat zu 65% gehemmt.³³

Der Effekt von NaF auf die saure Prostataphosphatase ist maximal bei 10⁻² M. Er nimmt bei niedrigeren und höheren Konzentrationen ab und hängt vom Verhältnis der Fluorid- und Substratkonzentration ab (Lit. s.b. Schmidt²⁹). Auch in fraktionierten Leukocytenhomogenaten wurde die saure Phosphatase der granulären Fraktion zu 33% gehemmt, während die Inaktivierung in der Kern- und löslichen Fraktion nur 7 bzw. 15% betrug.³¹ In unseren Versuchen blieben die drei genannten Substanzen, trotz Anwendung hoher Konzentrationen, ohne nennenswerten Effekt (Tabelle 5).

Alloxan und Oxalsäure

5 × 10⁻² M Alloxan unterdrückt in allen Fraktionen aus polymorphkernigen Rattenleukocyten über 90% der Aktivität der sauren Phosphatase. Eine 40%-Hemmung wird nach 10⁻² M Oxalsäure beobachtet.³¹ In der Rattenleber ist besonders die Phosphatase der löslichen Fraktion alloxanempfindlich.³⁴ Beide Substanzen bewirkten auch in der Plättchenfraktion $P_1\dot{U}$ einen deutlichen Aktivitätsabfall der Phosphatase (Tabelle 6).

TABLE 5. DER EINFLUß DREIER TYPISCHER HEMMER DER SAUREN PHOSPHATASE AUS PROSTATAGEWEBE AUF DAS ENTSPRECHENDE FERMENT IN FRAKTION P₁Ü

n	M	M	% der Kontrollen
5	Na-Tartrat	1.53×10^{-2}	99.3 ± 1.5
3	Na-Tartrat	7.2×10^{-2}	102.0
1	Na-Pyruvat	10^{-4}	93.1
1	Na-Pyruvat	10^{-3}	94.5
4	NaF	10^{-3}	101.5
3	NaF	10^{-2}	96.6

TABELLE 6. DER HEMMENDE EFFEKT VON ALLOXAN UND OXALSÄURE AUF DIE SAURE PHOSPHATASE IN FRAKTION P₁Ü

n	M	% der Kontrollen
2	Alloxan	10^{-4} 71.0
2	Alloxan	10^{-3} 33.2
4	Oxalsäure	10^{-3} 95.3
3	Oxalsäure	10^{-2} 2.7

TABELLE 7. DIE BEEINFLUSSUNG DER SAUREN PHOSPHATASE IN FRAKTION P₁Ü DURCH THIOGLYKOLSÄURE UND AMMONIUMMOLYBDAT

n	M	% der Kontrollen
3	Thioglykolsäure	10^{-3} 84.9
3	Thioglykolsäure	10^{-2} 29.2
5	Ammoniummolybdat	10^{-3} 58.4 ± 1.4
5	Ammoniummolybdat	10^{-2} 4.4 ± 0.3

Thioglykolsäure und Ammoniummolybdat

Thioglykolsäure aktiviert die Phosphoproteinphosphatase, die ebenso wie Phosphatasen p-nitrophenylphosphat spaltet (Lit. bei Schmidt²⁹). Ein entsprechendes Ferment in der löslichen Fraktion aus Leberhomogenaten ist gegen die Einwirkung von Molybdatationen unempfindlich.³⁵

Im untersuchten Konzentrationsbereich erwiesen sich beide Substanzen als Inhibitoren der sauren Phosphatasen P₁Ü (Tabelle 7). Dieses Ergebnis macht die Erfassung einer Phosphoproteinphosphataseaktivität in P₁Ü unwahrscheinlich.

SH-gruppenaktive Substanzen

Cystein beeinflusst weder die Aktivität der Prostata-monophosphoesterase noch die der sauren Phosphatase aus Erythrocyten (Lit.s. bei Schmidt²⁹). In einer Konzentration über 10^{-3} M wird die saure Phosphatase in P₁Ü gehemmt. (Tabelle 8). Auch die beiden SH-Gruppeninhibitoren Mersalyl und NEM blockieren ihr Aktivität (Tabelle 8 und Abb. 8). Dabei ergab sich, daß das Ausmaß der Hemmung nicht vom gewählten Puffersystem abhängig ist. Zusätzliche Cysteingabe zu Mersalyl vermindert diese Hemmwirkung nur geringfügig (Tabelle 8). Anhand des Verlaufes der Dosiswirkungskurven für NEM und Mersalyl läßt sich zeigen, daß die Konzentrationsbereiche, in

TABELLE 8. DER EFFEKT VON SH-GRUPPEN-AKTIVEN STOFFEN AUF DIE SAURE PHOSPHATASE IN FRAKTION $P_1\ddot{U}$

n		M	% der Kontrollen
5	Cystein	10^{-3}	96.8 ± 2.4
5	Cystein	10^{-2}	6.0 ± 0.2
1	Mersalyl (Tris-Maleat-Puffer)	5×10^{-4}	1.5
1	Mersalyl (Tris-HCl-Puffer)	5×10^{-4}	0.5
1	Mersalyl (Imidazol-Puffer)	5×10^{-4}	0.7
6	Mersalyl	10^{-3}	0.7 ± 0.2
3	Mersalyl + Cystein 10^{-2} M	10^{-3}	6.2
4	Mersalyl	10^{-2}	0.4
3	Mersalyl + Cystein 10^{-2} M	10^{-2}	3.4
1	NEM (Tris-Maleat-Puffer)	10^{-3}	12.7
1	NEM (Tris-HCl-Puffer)	10^{-3}	11.7
1	NEM (Imidazol-Puffer)	10^{-3}	11.1

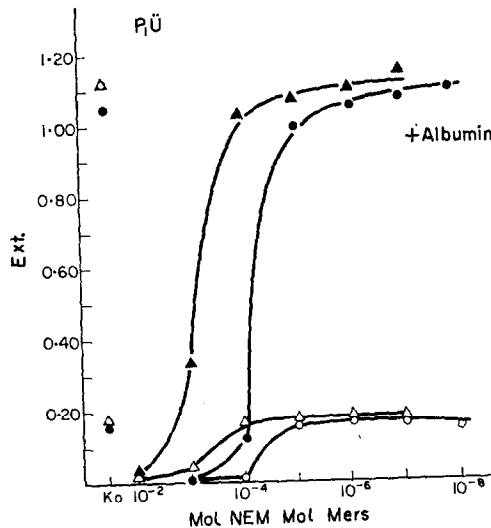


ABB. 8. Die Beeinflussung der sauren Phosphatase in Fraktion $P_1\ddot{U}$ durch NEM ohne ($-\triangle-\triangle-$) und mit ($-\blacktriangle-\blacktriangle-$) Albumin sowie durch Mersalyl ohne ($-\circ-\circ-$) und mit ($-\bullet-\bullet-$) Albuminzusatz (0.81%). In den albuminfreien Proben wurde die dreifache Menge $P_1\ddot{U}$ eingesetzt, um meßbare Werte zu erreichen. Die Kontrollen sind folgendermaßen bezeichnet: \triangle ohne NEM, ohne Albumin, \blacktriangle ohne NEM, mit Albumin, \circ ohne Mersalyl, ohne Albumin, \bullet ohne Mersalyl, mit Albumin.

denen der inhibitorische Effekt beider Substanzen einsetzt, unabhängig vom Albumingehalt des Milieus ist (Abb. 8). Schon 10^{-4} M Mersalyl führen einerseits zu einer elektronenoptisch nachweisbaren Lyse von Lysosomen und hemmen andererseits zu 13.7% (mit 10^{-3} M zu 16.5%) die saure Phosphatase aus Rindergranulocyten.³⁶ Da wir unter den gewählten Bedingungen die totale Aktivität erfassen, muß die Mersalylwirkung in unseren Versuchen allein auf einen direkten Effekt auf das Enzym bezogen werden.

TABLE 9. DIE WIRKUNG MEMBRANAKTIVER STOFFE AUF DIE SAURE PHOSPHATASE IN FRAKTION $P_1\dot{U}$

n		Konzentration	% der Kontrollen
3	Digitonin	2×10^{-5} M	13.0
3	Digitonin	2×10^{-4} M	0
4	Triton — $\times -100$ (+ Albumin)	0.2%	85.0
8	Triton — $\times -100$ (ohne Albumin)	0.2%	310.0 ± 4
6	Triton — $\times -100$ (ohne Albumin)	2.0%	1140.0
4	Prednisolon-21-hemisuccinat Na	10^{-2} M	58.1

Triton wurde in der angegebenen Konzentration 10 Min bei 25° zusammen mit $P_1\dot{U}$ vorinkubiert. Im Bestimmungsansatz, der 5 Min. bei 37° gehalten wurde, betrug die Tritonkonzentration 1/6 der aufgeführten Werte.

Oberflächenaktive Substanzen

Lysosomen sind gegenüber *Digitonin* sehr empfindlich; bereits 0.8×10^{-4} M setzen die sauren Hydrolasen zu 100% frei.^{37, 38} Erythrocyten werden durch 4×10^{-6} M *Digitonin* zerstört. In $P_1\dot{U}$ wurde jedoch die saure Phosphatase durch *Digitonin* maximal gehemmt (Tabelle 9).

Triton-X-100. Die Anwendung der oberflächenaktiven Substanz *Triton-X-100* ermöglicht es, neben der freien Enzymaktivität auch die totale zu messen. Die verwendeten Konzentrationen schwanken zwischen 0.1 und 1% und darüber in der Literatur. Teilweise wird die Substanz bereits vor dem Homogenisieren zugegeben. Fraktion $P_1\dot{U}$ wurde zunächst 10 Min bei 25° unter Zugabe der angegebenen Tritonkonzentration gehalten; zur Phosphatasebestimmung wurde 5 Min bei 37° inkubiert. Wir fanden gemessen an Kontrollen einen Abfall der Phosphataseaktivität, wenn dem Ansatz Albumin zugefügt worden war, dagegen eine dreifache Steigerung in Albumin-freiem Milieu (Tabelle 9). Einen optimalen Effekt erreichten wir jedoch erst durch

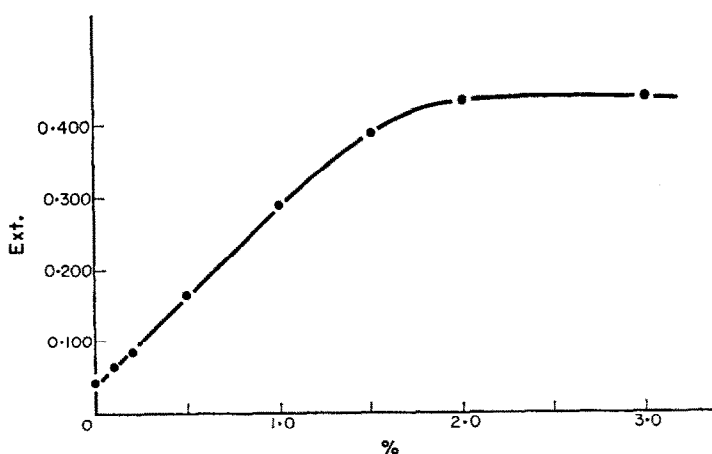


ABB. 9. Effekt steigender Triton-X-100-Konzentrationen in $P_1\dot{U}$ auf die meßbare Aktivität der sauren Phosphatase (Ordinate). Vor Durchführung der Bestimmungen wurden die $P_1\dot{U}$ -haltigen Proben unter Zusatz der angegebenen Tritonmenge 10 Minuten bei 25° gehalten. Mittelwerte aus 2-6 Versuchen.

einen Tritongehalt von 2% (Abb. 9), aber auch dann reichte das Ergebnis nicht an das mit Albumin allein erzielte heran, sondern lag um etwa 1/5 darunter. Triton übt eine starke membranlabilisierende Wirkung aus. Daneben vermag es die Oberflächeninaktivierung von Enzymen zu verhindern (Lit s. bei Schmidt²⁹), kann andererseits aber auch Enzyme hemmen.³⁹ Eine Deutung unserer Befunde ist nur unter Berücksichtigung dieser verschiedenen Eigenschaften von Triton möglich.

Prednisolon. Die durch Hydrocortison hervorgerufene Stabilisierung von Lysosomen, die mit u.v.-Licht behandelt wurden,⁴⁰ interpretiert Dingle⁴¹ mit einer direkten Reaktion zwischen Hydrocortison und der Lysosomen-Membran. Kowalski *et al.*⁴² wiesen eine verringerte Abgabe von saurer Phosphatase aus Schweineblutplättchen durch freisetzende Substanzen nach Prednisolongabe nach. Es ist fraglich, ob es sich bei der unter dem Einfluß von Prednisolon in $P_1\dot{U}$ gemessenen verringerten Aktivität um einen membranstabilisierenden Effekt handelt. Vielmehr ist eine direkte negative Wirkung des Corticoids auf die saure Phosphatase anzunehmen (Tabelle 9).

Thrombin und Hirudin

Thrombin (5 E/ml) allein oder in Kombination mit $CaCl_2$ (1.7×10^{-3} M) oder Hirudin (6.7 E/ml) waren (in 6fach höherer Konzentration) bereits in einer Vorinkubationsperiode von 2–30 Minuten Dauer bei 25° oder 37° der Plättchenfraktion $P_1\dot{U}$ zugegeben worden. Für die Bestimmung der Phosphatase wurden die Ansätze 5 Minuten bei 37° gehalten. In keinem Fall traten nennenswerte Abweichungen zu den Kontrollen auf (Tabelle 10).

TABELLE 10. DER EINFLUß VON THROMBIN UND HIRUDIN AUF DIE SAURE PHOSPHATASE IN FRAKTION P_1

n		Konzentration	% der Kontrollen
7	Thrombin	5 E/ml	97.1 ± 2.5
3	Thrombin + 1.7×10^{-3} M $CaCl_2$	5 E/ml	89.9
1	Thrombin + 6.7 E/ml Hirudin	5 E/ml	97.8

(b) Verlauf der pH-Kurven für saure Phosphatase, Cathepsin und beta-Glukuronidase

Saure Phosphatase. Die mit zwei verschiedenen Puffersystemen im Standardansatz gewonnene Kurve der Beeinflussung der Enzymaktivität durch Variation des pH-Wertes ist aus Abb. 10 ersichtlich. Übereinstimmend liegen in beiden Systemen deutliche Maxima bei pH 5.4 und 6.0 sowie ein Minimum bei pH 5.8. Dagegen tritt das angedeutete Optimum bei 4.8 nur im Citratpuffermilieu auf. Unsere Ergebnisse stimmen weitgehend mit Befunden von Yu *et al.*³¹ überein, nach denen in fraktionierten polymorphkernigen Rattenleukocyten pH-Optima von 5.3 für die lysosomale Granulafraktion, von 5.7 für die kernhaltige Fraktion und von 6.0 für die im Überstand befindliche Phosphatase gefunden wurden. Für das aus Plättchen vom Pferd gewonnene Enzym wiesen Wagner und Yourke⁴³ mit Acetatpuffer und beta-Glyzerophosphat als Substrat ein pH-Optimum von 5 nach. Unter identischen Bedingungen erzielten Mizuno *et al.*⁴⁴ das gleiche Ergebnis an Plättchen vom Kalb.

In 6 Versuchen wurde mit Hilfe eines 0.4 M Glyzinpuffers ein pH-Wert von 10.4 eingestellt. Eine unter diesen Bedingungen nachweisbare alkalische Phosphatase

konnte in Übereinstimmung mit Resultaten von Mizuno *et al.*⁴⁴ auch bei Erhöhung der eingesetzten $P_1\dot{U}$ -Menge nicht aufgefunden werden. Auch in Leberlysosomen kommt sie nicht vor.⁴⁵ Eine hohe Aktivität enthalten jedoch Granula von polymorphkernigen Leukocyten.⁴³

Cathepsin. Zur Einstellung der pH-Werte wurde Citratphosphatpuffer nach McIlvaine verwendet. Aus Abb. 11 geht hervor, daß Cathepsin in $P_1\dot{U}$ ein deutliches

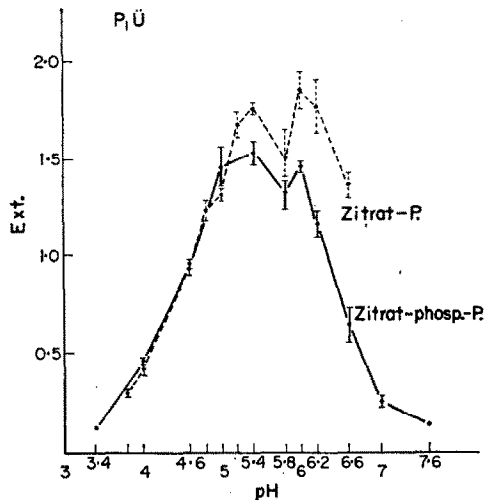


ABB. 10. Abhängigkeit der Enzymaktivität der sauren Phosphatase in Fraktion $P_1\dot{U}$ vom pH-Wert. Citratpuffer 0.05 M ($n = 3-8$). Das Substrat *p*-Nitrophenylphosphat wurde in Citratpuffer verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen gelöst. Der osmotische Druck der Puffer-Substrat-Lösung lag zwischen 305 (pH 3.8) und 357 mosmol (pH 6.0). Citrat-Phosphat-Puffer ($n = 3$). Die Osmolarität wuchs mit steigenden pH-Wert (3.4–7.6) von 314 auf 535 mosmol an.

Optimum bei pH 4.6 und ein Minimum bei pH 4.2 aufweist. Der Kurvenverlauf spricht dafür, daß ein(oder mehrere) pH-Optima jenseits des niedrigsten von uns erfaßten pH-Wertes im Bereich der Optima von Cathepsin D (pH 2.8–4), vielleicht auch von Cathepsin E (pH < 2.5) liegen. Das Optimum von pH 4.6 könnte bedingt sein durch eine Überlagerung der Effekte zweier Proteasen wie Jodice *et al.*⁴⁶ dies für das Cathepsin A und D des Skelettmuskels nachgewiesen haben. Zwar greift Cathepsin A Hämoglobin nicht an, könnte aber die durch Wirkung von D entstandenen Bruchstücke hydrolysieren. Die begrenzte untersuchte pH-Spanne erschwert den Vergleich mit Angaben aus der Literatur. Unter Berücksichtigung der verwendeten Bestimmungsmethode sowie den aufgefundenen pH-Optima ist anzunehmen, daß vorwiegend die Aktivität von Cathepsin D erfaßt wurde.

Bei Benutzung des 0.15 M-Lactatpuffer-Systems der Standardmethode (pH 3.6) liegen die Werte im Mittel um 80.4% über dem entsprechenden Wert der abgebildeten Kurve.

beta-Glukuronidase. Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Aktivität der beta-Glukuronidase. Die Art der Spezies, das Alter der Tiere, genetische Besonderheiten, das Vorhandensein von Inhibitoren in biologischen und synthetischen Medien bestimmen

die nachweisbare Fermentmenge.^{16, 19, 47-50} Shibko *et al.*⁵¹ fanden keine beta-Glukuronidase im Milzgewebe von *Sus scrofa*. Nach Conchie *et al.*⁵² ist die Glukuronidaseaktivität in Schweinegewebe allgemein sehr niedrig oder überhaupt nicht vorhanden. Auch wir hatten Mühe, sie in Schweineplättchen nachzuweisen, wie z.B. aus der langen Inkubationszeit bei der Bestimmung hervorgeht.

Aus dem in Abb. 11 festgehaltenen Kurvenverlauf kann geschlossen werden, daß

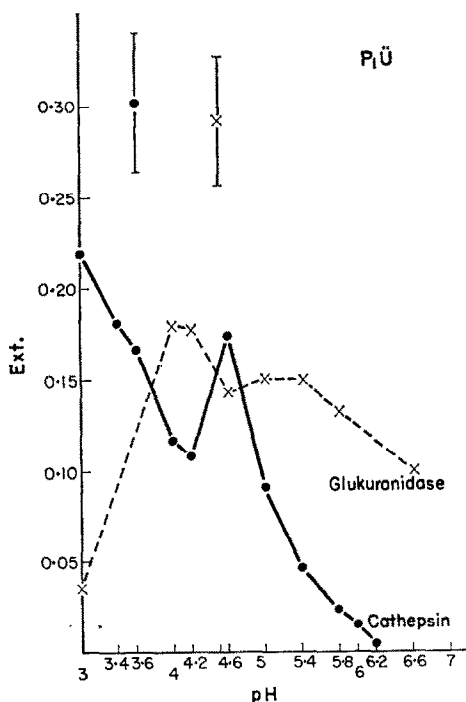


ABB. 11. pH-Abhängigkeit der Aktivität von Cathepsin —●—●— (n = 2-3) und beta-Glukuronidase —×—×— (n = 2-4). Einstellung der pH-Werte durch Citratphosphatpuffer. Die in 8 Versuchen für Cathepsin gemessene mittlere Aktivität (\pm mittlerer Fehler des Mittelwertes) bei pH 3·6 im Laktatpuffermilieu des Standardansatzes ist angegeben (●). Der in 6 Versuchen für Glukuronidase ermittelte entsprechende Wert (pH 4·5; Acetatpuffer des Standardansatzes) wurde mit × bezeichnet.

die Plättchenglukuronidaseien pH-Optimum zwischen 4·0 und 4·2, ein weiteres zwischen pH 5·0 und 5·4 besitzt. Buddecke u. Hoefele⁴⁹ bezeichnen dieses doppelte pH-Optimum in Abhängigkeit der Meßbedingungen auch reiner Präparate als charakteristisch für beta-Glukuronidase aus Rinderaorta. Die Anzahl der Optima der Glukuronidase in Rattenleber hängt dagegen nach Fishman *et al.*⁵³ vom angewandten Substrat ab. Die Doppelgipfligkeit der pH-Kurve für Glukuronidase könnte nach Angaben von Paigen⁴⁸ durch methodisch bedingte pH-Verschiebungen im Versuchsablauf verursacht sein. Schließlich muß auch eine Verunreinigung durch beta-Acetyl-Glukosaminidase, wie im Fall der Rinderaorta, diskutiert werden.⁴⁹

ZUSAMMENFASSENDE BESPRECHUNG

Das von uns nach mehrfacher Veränderung der Bedingungen schließlich gewählte Vorgehen zur Gewinnung der Fraktionen P₁, P₂, P₃ und P₃Ü hat zu einer Verteilung

von Substraten und Enzymaktivitäten geführt, die sich reproduzieren ließ. Es lehnt sich eng an die für die Fraktionierung von Zellbestandteilen üblichen Methoden an (vergl. Eichberg *et al.*,⁵⁴). Im Gegensatz zu anderen, die Blutplättchen untersuchen, fraktionieren wir das Homogenat durch Differentialzentrifugation, bevor es in Dichtegradienten aufgetrennt wird und verwerfen kein durch niedertouriges Zentrifugieren gewonnenes Sediment. Auf diese Weise erreicht man weit voneinander liegende, gut isolierbare Banden, auch bei Aufarbeitung von mehreren Gramm Plättchenmasse (vergl. Abb. 5). Strukturgebundes Serotonin und ATP werden von einer zweiten, die Mitochondrien enthaltenden Fraktion abgetrennt. Die unterscheidbaren Formen des alpha-Granulomers erfassen wir gesondert in P_1 und P_2 . P_3 entspricht in seiner Zusammensetzung den als "Mikrosomen" einzustufenden Zellbestandteilen. Die beobachtete Verteilung im Dichtegradienten beweist die fehlende Identität von den ATP- und Serotonin-haltigen Strukturen mit dem alpha-Granulomer (vergl. auch Weber *et al.*⁸). Eine nennenswerte Verunreinigung durch zytoplasmatisches Material liegt nicht vor.

Obwohl sich unser Vorgehen von dem anderer Autoren unterscheidet, die Plättchen von Mensch oder Kaninchen untersuchten, besteht doch eine Übereinstimmung in einer Reihe von Daten. Es seien das gemeinsame Vorkommen von strukturgebundenem Serotonin und ATP, sowie die Abgrenzbarkeit dieser Organellen von alpha-Granulomer und Mitochondrien genannt.^{11, 55-60}

Der lösliche Anteil der drei Hydrolasen lag in unseren Ansätzen mit 36.1% für saure Phosphatase 17% für Cathepsin und 7.8% für beta-Glukuronidase (jeweils in Prozenten der Gesamtaktivität und nicht auf den Eiweißgehalt bezogen) deutlich unter den von Marcus *et al.*² sowie von Holmsen *et al.*¹⁰ mitgeteilten Daten. Lediglich für Phosphatase stimmen die Werte von Marcus *et al.*² mit den unsrigen überein. Für die beobachteten Differenzen sind wahrscheinlich vor allem methodische Unterschiede verantwortlich zu machen, aber auch speziesbedingte Besonderheiten sind nicht auszuschließen.

Von den vier Hauptfraktionen wiesen P_2 und P_3 mit 70 und mehr Prozent der relativen Gesamtaktivität den größten Anteil an Hydrolasen auf und müssen demnach die eigentlichen lysosomalen Strukturen enthalten.* In Fraktion P_1 , worin ein Teil des alpha-Granulomers vorwiegend in Bande III ($d = 1.1849$)-erscheint, ist der Gehalt an Cathepsin oder beta-Glukuronidase jedoch niedrig. Diese Ergebnisse zeigen, daß das alpha-Granulomer der Plättchen in toto nicht ohne weiteres als Lysosomen angesprochen werden darf. So läßt sich auch im elektronenoptischen Bild der Fraktion P_3 äußerst wenig alpha-Granulomer nachweisen, während sich dort die Hauptmenge der sauren Phosphatase befindet. Aus der Beurteilung der in Bande III ($d = 1.1232$) und im Sediment des P_2 -Gradienten lokalisierten granulären Strukturen ergeben sich einige neue Gesichtspunkte zur Charakterisierung der alpha-Granula. Im Vergleich mit dem morphologischen Aspekt der in P_1 enthaltenen fällt ihre weniger dichte, oft fibrillär gezeichnete Matrix auf. In intakten Plättchen lassen sich ebenfalls zwei Granulatypen unterscheiden. Allerdings sind hier auch solche vorhanden, deren Zuordnung zu einer der Gruppen schwierig ist. Die voneinander abweichende Dichte und Ausstattung an Enzymen sowie die morphologischen Differenzen beweisen hinreichend, daß tatsächlich zwei gut definierte Typen von alpha-Granula in den

* Aus diesem Grund wurde in unseren Versuchen zur Charakterisierung der lysosomalen Enzyme weitgehend Fraktion $P_1\bar{U}$ (= Homogenat - P_1) verwendet.

Plättchen vorliegen. Es fragt sich nun, ob es sich um unterschiedliche Reifestufen dieser Strukturen handelt, oder ob man das Vorhandensein separater Typen von Zellorganellen in den Plättchen annehmen muß, analog zu Befunden an anderen Blutzellen.⁶¹ Die hier diskutierten Befunde aber lassen den Schluß zu, daß die in P_2 aufgefundenen granulären Strukturen die "echte" Lysosomenfraktion darstellen, die vom klassischen alpha-Granulomer, dem Träger gerinnungsaktiver Phospholipide, abgegrenzt werden müssen.

In den von Holmsen u. Mitarb.¹⁰ im Dichtegradienten ohne vorherige Differentialzentrifugation in neun Schichten aufgetrennten Homogenaten menschlicher Blutplättchen trat alpha-Granulomer ebenfalls in verschiedenen Zonen mit Dichten, die unseren Angaben entsprechen, auf. Die Verteilung der sauren Phosphatase, beta-Glukuronidase und anderen Hydrolasen ging dieser Aufteilung etwa parallel. Dagegen beobachteten Siegel u. Lüscher⁵ ebenso wie wir eine Dissoziation in der Verteilung der sauren Phosphatase einerseits und von beta-Glukuronidase und Cathepsin andererseits. Es kann allerdings die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die getrennte Erfassung Folge der Aufspaltung mikrosomaler Strukturen in bevorzugten Bruchrichtungen während der Aufarbeitung ist. Solche Vorgänge können zu hoher Anreicherung von Enzymen und Substraten bei der Auftrennung führen⁶. Beta-Glukuronidase und Cathepsin erscheinen in allen Gradienten in Zonen identischer Dichte (1.1210–1.1250), während das Maximum der sauren Phosphatase sich zumindest in P_2 und P_3 in spezifisch leichteren Schichten findet (etwa 1.035–1.070). Dies entspricht den von Siegel und Lüscher⁵ mitgeteilten Resultaten. Nach Holmsen u. Day⁹ werden beta-Glukuronidase und Cathepsin neben einer Reihe anderer, granulär gebundener saurer Hydrolasen während der "release reaction" im Gegensatz zu saurer Phosphatase freigesetzt. Diese Befunde machen es sehr wahrscheinlich, daß die beobachtete Dissoziation in der Lokalisation der Hydrolasen keinen Artefakt darstellt.

Auf Grund des Verteilungsmusters taucht die Frage auf, ob es sich bei der sauren Phosphatase um ein ursprünglich einheitliches, uni- oder multilokuläres Enzym bzw. um verschiedene Formen handelt, die unilokulär oder multilokulär in Blutplättchen vorkommen. Die Wärmeinaktivierungskurve, die doppelgipflige pH-Kurve und die mit den Literaturangaben kaum vergleichbaren Ergebnisse bei den Hemm- bzw. Aktivierungsversuchen sprechen dafür, daß zumindest zwei Enzyme erfaßt wurden. Das eine könnte in den Lysosomen zusammen mit Cathepsin und beta-Glukuronidase vorkommen, das andere an mikrosomalen Strukturen verankert sein.

Zusammenfassung—Aus Homogenaten von Schweineblutplättchen wurden durch Differentialzentrifugation 3 Fraktionen (P_1 , P_2 , P_3) und eine "lösliche" Fraktion (P_3U) gewonnen. Rund 50% des Eiweißgehaltes verteilten sich auf P_1 – P_3 , der restliche Anteil fand sich in P_3U . Strukturgebundenes ATP und Serotonin kamen zu über 80% in Fraktion P_1 vor, welche neben vesikulären Elementen serotoninhaltige Grana und elektronendichtes alpha-Granulomer aufwies. Saure Phosphatase lag überwiegend in Fraktion P_3 vor, die elektronenoptisch vor allem Vesikel und Glykogen zeigte. Cathepsin und beta-Glukuronidase waren dagegen hauptsächlich in P_2 enthalten, wo sich alpha-Granulomer mit wenig elektronendichter Matrix und fibrillärer Zeichnung fand. Die beobachtete Dissoziation in der Verteilung der 3 Hydrolasen trat auch bei weiterer Auftrennung im Saccharosedichtegradienten auf. Aus den Ergebnissen wurde

geschlossen, daß in den Plättchen 2 Typen von alpha-Granula vorkommen. Die spezifisch leichteren und weniger elektronendichten werden als die eigentlichen Lysosomen der Plättchen angesehen.—Die Aktivität der sauren Phosphatase wurde durch Cu^{2+} , EDTA, Alloxan und Oxalsäure gehemmt. Die gleiche Wirkung hatten SH-Gruppen aktive Stoffe (Cystein, Mersalyl und NEM), Thioglykolsäure und Ammoniummolybdat sowie einige oberflächenaktive Substanzen (Digitonin, Prednisolon, Triton-X-100). Durch Albumin aktivierte saure Phosphatase wurde durch Triton gehemmt. Keinen oder nur unwesentliche Effekte auf das Ferment zeigten Mg^{2+} , Ca^{2+} , Tartrat, Pyruvat, NaF, Thrombin und Hirudin. Die Wärmeinaktivierungskurve und die pH-Optima (Maxima bei pH 5·4 und 6·0; Minimum bei pH 5·8) deuten auf das Vorhandensein von mindestens 2 verschiedenen Phosphatasen hin. Die pH-Kurve von Cathepsin zeigte ein Maximum bei pH 4·6 und ein Minimum bei 4·2. Die Optima von beta-Glukuronidase lagen zwischen 4·0 und 4·2 und zwischen 5·0 und 5·4.

LITERATUR

1. A. J. MARCUS und D. ZUCKER-FRANKLIN, *Blood* **23**, 389 (1964).
2. A. J. MARCUS, D. ZUCKER-FRANKLIN, L. B. SAFIER und H. L. ULLMAN, *J. Clin. Invest.* **45**, 14 (1966).
3. M. BETTEX-GALLAND und E. F. LÜSCHER, *Der Thrombozyt Verhandlg.* 12. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie in Berlin v. 17.–19.10.1966, S. 131–139 (Herausgeber, R. MARX). J. F. Lehmanns Verlag, München (1969).
4. H. MONDT und E. WEBER, 12. *Tagung der Deutschen Gesellschaft für Haematologie in Berlin* vom 17.–19. Oktober 1966.
5. A. SIEGEL und E. F. LÜSCHER, *Nature, Lond.* **215**, 745 (1967).
6. H. J. DAY, *Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten*, 1. Internation. Symposion Wien 17.–20.6.1968, S. 234–235 (Herausgeber: E. DEUTSCH, E. GERLACH und K. MOSER). Georg Thieme, Stuttgart (1968).
7. R. L. NACHMAN und A. J. MARCUS, *Br. J. Haematol.* **15**, 181 (1968).
8. E. WEBER, E. MORGENSTERN und E. WALTER, *Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten und Thrombozyten*. I. Intern. Symp. Wien, 17.–20.6.1968, S. 259–266 (Herausgeber: E. DEUTSCH, E. GERLACH und K. MOSER). G. Thieme, Verlag, Stuttgart (1966).
9. H. HOLMSEN und H. J. DAY, European Atherosclerosis Group Symposium on *Platelets and the Vessel Wall-Fibrin Deposition*, 15.–16. Juni 1969, Neu Isenburg/Frankfurt (M.).
10. H. HOLMSEN, H. J. DAY und M. A. PIMENTEL, *Biochim. biophys. Acta* **186**, 244 (1969a).
11. H. HOLMSEN, H. J. DAY und E. STORM, *Biochim. biophys. Acta* **186**, 254 (1969b).
12. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
13. I. PENDL, *Hoppe-Seyler/Thierfelder Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Auflage (Herausgeber: (K. LANG und E. LEHNARTZ), Bd. IV/1, S. 252. Springer-Verlag, Heidelberg (1960).
14. B. B. BRODIE, E. G. TOMICH, R. KUNTZMAN und P. A. SHORE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **119**, 461 (1957).
15. J. FONG, F. L. SCHAEFFER und P. L. KIRK, *Archs Biochem. Biophys.* **45**, 319 (1953).
16. R. GIANETTO und C. DE DUVE, *Biochem. J.* **59**, 433 (1955).
17. M. L. ANSON, *J. gen. Physiol.* **20**, 565 (1936).
18. W. H. FISHMAN, B. SPRINGER und R. BRUNETTI, *J. biol. Chem.* **173**, 449 (1948).
19. W. H. FISHMAN, K. KATO, G. L. AUSTISS und S. GREEN, *Clin. Chim. Acta.* **15**, 435 (1967).
20. E. WEBER und H. MONDT, *Klin. Wschr.* **45**, 165 (1967).
21. K. K. TSUBOI und P. B. HUDSON, *Archs Biochem. Biophys.* **55**, 191 (1955).
22. E. WEBER, H. E. BRAUN, H. MONDT und H. TOWLIATI, *Biochem. Pharmacol.* **19**, 1913 (1970).
23. E. WEBER, B. SCHMIDT, E. MORGENSTERN und H. MONDT, *Biochem. Pharmacol.* **19**, 1929 (1970).
24. W. DEHNEN, *Naturwiss.* **53** 332 (1966).
25. J. L. WEBB, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. II, Academic Press, New York (1966).
26. K. MYRBÄCK, *Enzymatische Katalyse*, Walter de Gruyter und Co., Berlin, S. 63 (1953).
27. M. A. M. ABUL FADL und E. J. KING, *J. Clin. Path.* **1**, 80 (1948).

28. R. WEBER, J. WEBER und B. NIEHUS, *Helv. Physiol. Act.* **19**, 97 (1961).
29. G. SCHMIDT, *The Enzymes*, 2. Auflage (Herausgeber: P. D. BOYER, H. LARDY und K. MYRBÄCK), Bd. 5, S. 37–47. Academic Press, New York and London (1961).
30. B. D. NELSON, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **121**, 998 (1966).
31. B. P. YU, F. A. KUMMEROW und T. NISHIDA, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **122**, 1045 (1966).
32. P. T. IYPE und CH. HEIDELBERGER, *Archs Biochem. Biophys.* **128**, 434 (1968).
33. H. D. BRUHN und H. KELLER, *Dtsch. med. Wschr.* **91**, 2335 (1966).
34. M. W. NEIL und M. W. HORNER, *Biochem. J.* **84**, 32 (1962).
35. K. PAIGEN und S. K. GRIFFITHS, *J. biol. Chem.* **234**, 299 (1959).
36. D. HEGNER, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **261**, 239 (1968a).
37. H. BEAUFAY, *Lysosomes*, Ciba Foundation Symposium, p. 399 (Eds. A. V. S. DE REUCK and M. P. CAMERON). J. und A. Churchill, London (1963).
38. G. DE DUVE, *Harvey Lectures*, New York **59**, 49–87 (1965).
39. P. B. GAHAN, *Int. Rev. Cytol.* **21**, 1 (1967).
40. G. WEISSMAN und J. DINGLE, *Expl cell. Res.* **25**, 207 (1962).
41. J. T. DINGLE, *Lysosomes*, Ciba Foundation Symposium, p. 384 (Herausgeber: A. V. S. DE REUCK und M. P. CAMERON). J. und A. Churchill, London (1963).
42. E. KOWALSKI, M. KOPEC, Z. WĘGRZYNOWICZ, M. HURWIC und A. Z. BUDZYNSKI, *Thromb. Diath. Haemorrh.* **26**, 134 (1966).
43. R. WAGNER und A. YOURKE, *Archs Biochem. Biophys.* **54**, 174 (1955).
44. N. S. MIZUNO, J. H. SAUTTER und M. O. SCHULTZE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **98**, 42 (1958).
45. D. HEGNER, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349** 544 (1968b).
46. A. A. JODICE, V. LEONG und J. M. WEINSTOCK, *Archs Biochem. Biophys.* **117**, 477 (1966).
47. C. A. MARSH, *Biochem. J.* **79**, 21P (1961).
48. K. PAIGEN, *Expl Cell Res.* **25**, 286 (1961).
49. E. BUDDECKE und O. HOEFLE, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **347**, 173 (1966).
50. S. KUSHINSKY, V. L. CHEN und I. OTTERNESS, *Nature, Lond.* **214**, 142 (1967).
51. S. SHIBKO, K. A. CALDWELL, P. L. SAWANT und A. L. TAPPEL, *J. cell. comp. Physiol.* **61**, 85 (1963).
52. J. CONCHIE, J. FINDLÄY und G. A. LEVY, *Nature, Lond.* **183**, 615 (1959).
53. W. H. FISHMAN, St. S. GOLDMAN und S. GREEN, *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 239 (1964).
54. J. EICHBERG, JR., V. P. WHITTAKER und R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.* **92**, 91 (1964).
55. R. V. BAKER, H. BLASCHKO und G. V. R. BORN, *J. Physiol., Lond.* **149**, 55 (1959).
56. G. V. R. BORN, *Hämostase-Thrombogenese-Pharmakologisch wirksame Gerinnungsprodukte*. Verhandlg. 6. Symp. Deutsche Arbeitsgemeinschaft f. Blutgerinnungsforschung Erlangen vom 19.–20.2.1962 (Herausgeber: S. WITTE), S. 107. F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart (1963).
57. J. P. TRANZER, M. DA PRADA und A. PLETSCHER, *Nature, Lond.* **212**, 1574 (1966).
58. J. P. TRANZER, M. DA PRADA und A. PLETSCHER, *Adv. Pharmac.* **6**, 125 (1968).
59. I. J. BAK, R. HASSLER, B. MAY und E. WESTERMANN, *Life Sci.* **6**, 1133 (1967).
60. M. DA PRADA und A. PLETSCHER, *Br. J. Pharmac.* **34**, 591 (1968).
61. D. F. BAINTON und M. G. FARQUHAR, *J. cell. Biol.* **28**, 277 (1966).
62. G. DALLNER, *Interaction of Drugs with Constituents of the Endoplasmic Membranes*, Fourth International Congress on Pharmacology, July 14–18, in Basel, Switzerland (1969).