

Resultate. Die isolierte Substanz ist ein weisses, amorphes Pulver, das gut in Wasser, Salzsäure, Natriumhydroxid und physiologischem NaCl löslich, in Äthanol, Äther und Aceton unlöslich ist. Die wässrige Lösung zeigte keine Denaturierungerscheinungen bei 100°C. Sie ergibt eine negative Biuret-, eine positive Tetrabromphenolphtaleinmethylester- und Ninhydrinreaktion. Bei serologischen Reaktionen zeigt die Substanz kein charakteristisches Verhalten, da sie nicht nur mit verschiedenen Kaninchenimmunseren, sondern auch mit normalem Menschenserum eine nichtspezifische Präzipitationsreaktion gibt. In früheren Versuchen wurde nachgewiesen, dass die aus trypsinisierten Erythrocyten gewonnene Flüssigkeit im Kaninchen keine spezifischen Antikörper bildet. Da die Substanz noch beträchtliche Mengen anorganischer Salze als Verunreinigung enthält, konnte keine genaue chemische Analyse durchgeführt werden. Die papierchromatographische Analyse des Hydrolysates ergab die folgende Aminosäurezusammensetzung: Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Alanin, Leucin, Phenylalanin, Histidin und Threonin.

Diskussion. Die von der Erythrocytenoberfläche durch Trypsinbehandlung abgelöste Substanz konnte mit direkter Trichloressigsäurefällung nicht isoliert werden (Verunreinigung durch Hämoglobin). Einengen der Verdauungsflüssigkeit auf 1/100 des Originalvolumens mit einer Proteinkonzentrierungsmethode mittels Polyäthylenglycol und – um sie von anorganischen Salzen zu befreien – Dialyse gegen destilliertes Wasser führte zu keiner brauchbaren Konzentrierung der abgelösten Substanz, da während der Dialyse nicht nur die anorganischen Ionen, sondern auch die durch Trypsinbehandlung freigelegten Aminosäuren und die niederen Polypeptide durch die Dialysiermembran diffundierten. Die beiden erwähnten Methoden erwiesen sich zur Reinigung der Proteinsubstanz als nicht geeignet.

Um nachzuweisen, dass die isolierten Aminosäuren nicht von Trypsin stammen, wurden folgende Versuche durchgeführt: 1:16 000 und 1:54 000 Trypsinverdünnungen (Armour-Trypsin krist.) in 6*n* HCl wurden 8 h bei 100°C hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit den gleichen Lösungsmittelsystemen parallel zu den Proteinhydrolysaten papierchromatographisch untersucht. Die mit Ninhydrin erhaltenen Flecken waren nicht identisch.

Wässrige Lösungen des Trypsins (Armour-Trypsin krist.) wurden in Konzentrationen von 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% und 0,0001% hergestellt. Zu 1 vol dieser Lösungen wurden 3 vol Äthanol-Äther 1:1 gegeben. Ausser in der einprozentigen Trypsinlösung erhielt man damit keinen Niederschlag. Also konnte bei der Äther/Äthanol-Präzipitation der von uns isolierten Substanz Trypsin nicht präzipitiert worden sein.

Die durch Trypsinbehandlung freigelegte Substanz stammt von der sogenannten «Proteinhülle» der Erythro-

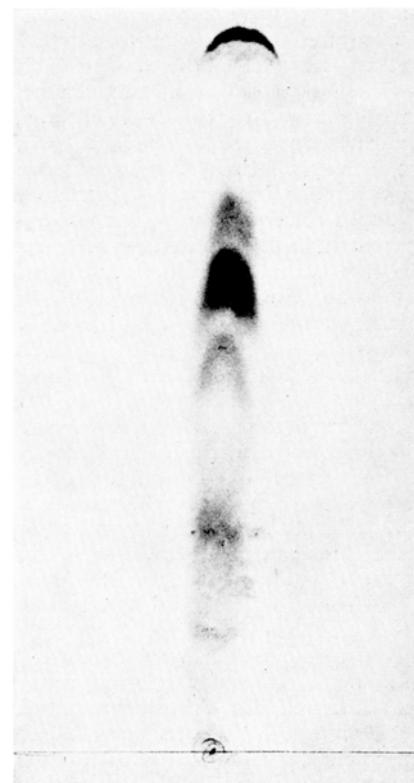


Fig. 3. Eindimensional aufsteigende Chromatographie des Proteinhydrolysates. Lösungsmittelsystem: Methanol-Butanol-Wasser 10:10:2, Indikator: Ninhydrin.

cyten. Sie ist ein Protein oder Polypeptid und kann durch Säurehydrolyse in Aminosäuren zerlegt werden.

Summary. Through a modified trypsin treatment of the surface of beef-erythrocytes, a substance was isolated with precipitation by a mixture of ethanol and ether, which did not contain significant amounts of hemoglobin and trypsin. A 6*n* HCl hydrolysate revealed with paper-chromatography 8 amino-acids in this substance. The surface of beef-erythrocyte membranes is covered with a protein- or peptide-layer.

MARIANN SCHERRER-GERVAI und J. TOMCSIK

Hygiene-Institut der Universität Basel (Schweiz), 3. Mai 1962.

Zur Frage einer antagonistischen Wirkung von Herzglykosiden und Nebennierensteroiden am Kationentransport der Erythrocytenmembran

Im Jahre 1957 wurden von SULSER und WILBRANDT¹ Versuche veröffentlicht, nach denen gewisse Nebennierenrindenhormone, besonders die Mineralocorticoide Aldosteron, 9- α -Fluorohydrocortison und Cortexon, der Hemmwirkung von K-Strophanthosid auf den aktiven Kationentransport menschlicher Erythrocyten entgegenwirkten.

Ähnliche Befunde wurden, offenbar unabhängig, von BERNSTEIN² mitgeteilt. Diese Ergebnisse liessen sich jedoch in verschiedenen Laboratorien nicht bestätigen³, und darauf in unserem Laboratorium durchgeführte Untersuchungen führten ebenfalls zu negativen Resultaten, die

¹ F. SULSER und W. WILBRANDT, Helv. physiol. Acta 15, C37 (1957).

² R. E. BERNSTEIN, X. Int. Congr. cell. Biol., Paris (ed. von L'expansion scient. française, 1960), p. 165.

³ I. M. GLYNN, J. Physiol. 136, 148 (1957).

gelegentlich erwähnt⁴⁻⁶, aber nicht ausführlich publiziert worden sind. Um die Möglichkeit zu prüfen, dass bisher unberücksichtigt gebliebene Faktoren die erwähnte antagonistische Wirkung begünstigten, wurden in den hier vorliegenden Versuchen Änderungen betreffend Methodik, verwendete Herzglykoside und Steroide sowie pH und Zusammensetzung des Inkubationsmilieus vorgenommen. Unter anderem wurde so die Calciumionenkonzentration, durch welche das Ausmass des Kationentransports beeinflusst wird⁷, variiert. Daneben gelangte der Einfluss von Methylenblau, welches den oxydativen Glukoseabbau der Erythrocyten erhöht⁸, zur Untersuchung. Auch wurden einige Phosphorsäureester von Steroiden in die Versuche einbezogen auf Grund der Überlegung, dass möglicherweise die Bildung solcher phosphorylierter Derivate für den Antagonismus zu Herzglykosiden wesentlich sein könnte.

Methodik. Menschenblut wurde nach der Entnahme aus der Cubitalvene mit einem Holzstab defibriniert. Das Blut wurde mit Glukose (2-4 mg/ml) und den zu untersuchenden Substanzen versetzt und bei 37°C während 3-5 h inkubiert. Die Analyse des Na- und K-Gehaltes erfolgte flammenphotometrisch. Für die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen wurden die Erythrocyten entsprechend dem Vorgehen von SULSER¹ zweimal in isotonischer MgCl₂-Lösung gewaschen und dann hämolysiert. Zusätzlich wurde in einigen Versuchen der K-Gehalt der Aussenlösung durch Analyse der überstehenden Flüssigkeit nach Abzentrifugieren der Zellen verfolgt. Die Zellkonzentration betrug in den meisten Versuchen 40-50%. Es wurden sowohl mit Frischblut wie auch mit während mehrerer Tage bei 2-4°C aufbewahrtem Blut Versuche durchgeführt. Als zuverlässigstes Mass für die Angabe der Na- und K-Verschiebungen erwies sich, in Übereinstimmung mit SCHATZMANN⁹, das Verhältnis der beiden Kationenkonzentrationen, Na/K, im Intrazellulärraum.

Ergebnisse.

(a) Variation der Hemmstoffe und Steroide: Die verwendeten Kombinationen von Hemmstoff mit Nebennierenrindenhormon waren folgende: K-Strophanthosid (10⁻⁷ bis 10⁻⁶ g/ml) und 9- α -Fluorohydrocortison (10⁻⁴ g/ml); Ouabain (5 · 10⁻⁷ bis 5 · 10⁻⁸ g/ml) mit Aldosteron (10⁻⁵ g/ml) und Cortison- (10⁻³ g/ml), Hydrocortison-, Prednisolon- und Dexamethason-Na-Phosphat (10⁻⁴ g/ml). Die Steroide Cortexon und 9- α -Fluorohydrocortison wurden mit Hilfe von Alkohol in Lösung gebracht, Cortison-Na-Phosphat wurde in Substanz zugegeben. Die Konzentrationen der Glykoside wurden im allgemeinen so gewählt, dass zwar eine gut messbare, jedoch keine maximale Hemmwirkung zustande kam.

Mit keiner der erwähnten Substanzkombinationen liess sich in insgesamt 30 Versuchen ein Antagonismus zwischen Herzglykosid und Corticosteroid erkennen.

(b) Variation der Versuchsbedingungen: Um der Frage nachzugehen, ob neben Hemmstoff und Steroid möglicherweise noch ein zusätzlicher Faktor für das Manifestwerden eines Antagonismus erforderlich ist, wurden die Inkubationsbedingungen in mehrfacher Weise modifiziert. Folgende Zusätze zum Inkubationsmilieu wurden vorgenommen:

Isotonische CaCl₂-Lösung (0,05 ml/ml Blut); Versen (Dinatrium-äthylendiamintetraacetat) (2 mg/ml Blut); isotonische MgCl₂-Lösung (0,004-0,1 ml/ml Blut); 0,5n NaOH (bis 0,05 ml/ml Blut); 0,5n HCl (bis 0,5 ml/ml Blut); Methylenblau (1 mg/ml Blut). Auch wurde eine Blutprobe im Vakuum von CO₂ befreit und so für Versuche verwendet. Ferner wurde an Stelle von defibriniertem Blut Citratblut (0,45% Zitronensäure und 1,6% Na-Citrat) benutzt. Schliesslich konnte durch Trennung der Zellen vom Serum bei Frischblut, Kältelagerung der Zellen in einer physiologischen Salzlösung und späteres Wiederzusammenbringen der gewaschenen Na-reichen Zellen mit dem K-armen Frischblutserum, die Aussenkonzentration des K für gleiche Zellen in ihrem eigenen Milieu variiert werden. Mit diesen variierten Milieubedingungen wurden insgesamt 19 Versuche durchgeführt. Es zeigte sich jedoch in keinem Falle eine signifikante Verminderung des Glykosideffektes durch Steroide. In einigen speziellen Versuchen wurde geprüft, ob sich die Glycosidwirkung auswaschen lässt. Dies gelang nicht und konnte auch nicht durch Zusatz von Aldosteron (10⁻⁵ g/ml) zur Waschflüssigkeit erreicht werden.

Die Diskrepanz zwischen den Resultaten SULSERS und den unsrigen hat sich danach nicht klären lassen. Die früher mitgeteilten Befunde konnten mit keiner der genannten methodischen Varianten reproduziert werden.

Summary. Previous experiments indicating antagonistic effects of cardiac glycosides and corticosteroids on ion transport in red cells and published independently from our own laboratories¹ and by BERNSTEIN² could not be repeated under a variety of experimental conditions.

H. W. IFF, R. SCHINDLER und W. WILBRANDT

Pharmakologisches Institut der Universität Bern (Schweiz),
3. Mai 1962.

⁴ W. WILBRANDT, Fortschr. Zool. 12, 28 (1960).

⁵ W. WILBRANDT, *Bad Öynhausen Gespräche* (Springer-Verlag 91, 1959), Bd. 3.

⁶ W. WILBRANDT and W. T. ROSENBERG, Pharmacol. Rev. 13, 109 (1961).

⁷ J. B. KAHN, J. Pharmacol. exp. Therap. 123, 263 (1958).

⁸ E. S. G. BARRON und G. A. HARROP, J. biol. Chem. 79, 65 (1928).

⁹ H. J. SCHATZMANN, Helv. physiol. Acta 11, 316 (1953).

Observations on Division of Mitochondria in Dediifferentiating Cells of *Splachnum ampullaceum* (L.) Hedw.

In the course of an investigation of the behaviour of cellular organelles in dedifferentiating leaf cells by means of electron microscopy, it was shown that chloroplasts produce plastid initials by means of 'budding fission'. Similar behaviour has now been observed in mitochondria and this is described in the present communication. Plant

material and methods are the same as those described previously². Leaves were fixed in 2% KMnO₄ in veronal acetate buffer adjusted to a pH of 7.3. They were stained with uranylacetate and embedded in Araldit.

¹ K. VON MALTZAHN and K. MUHLETHALER, Naturwiss., in preparation.

² M. M. MACNUTT and K. VON MALTZAHN, Can. J. Bot. 38, 895 (1960).