ein abschließendes Urteil darüber zu fällen, wodurch im einzelnen der Widerspruch der Schlußfolgerungen von Evans und Pendleton mit denen aus den vorliegenden Untersuchungen bedingt ist.

Ergebnis

Die durchgeführten Messungen beantworten an *Paramecium aurelia* für die gewählten Versuchsbedingungen die Frage nach Statik oder Dynamik der Gesamtheit der durch ihren Phosphorgehalt gekennzeichneten Zellstrukturen im Verhältnis zur Umwelt der Zelle. Nur ein sehr geringer Anteil der phosphorhaltigen Verbindungen, welche nach stattgefundener Verdauung durch die Membran der Nahrungsvakuolen in das Zellplasma gelangt sind, wird wieder aus-

geschieden. Während ihres gesamten individuellen Daseins benutzt die Zelle mehr als 99% dieser Stoffe zum Aufbau ihrer eigenen Strukturen, und lediglich der verschwindend kleine Rest kehrt wieder in das Außenmedium zurück. *Die Paramecienzelle stellt damit ein System dar, das unter den gewählten Versuchsbedingungen zumindest in einem beträchtlichen Anteil seiner stofflichen Bestandteile fast ausschließlich den einsinnig verlaufenden Vorgang der Umwandlung körperfremder in körpereigene Stoffe kennt. Nicht notwendiger dynamischer Austausch im Sinne eines Gleichgewichtes mit der Umwelt, sondern bei weitem vorherrschende Statik in der Bilanz des einmal Aufgebauten als Grundlage des zu Assimilierenden beherrscht den Baustoffwechsel dieser Zelle.*

Einwirkung verschiedener Wasserstoff- und Kohlensäureionenkonzentrationen auf die Erythrocytenmembran

VON G. RUHENSTROTH-BAUER UND G. SCHUMACHER

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Tübingen,
und der Universitätsfrauenklinik Tübingen

(Z. Naturforschg. **8b**, 512—518 [1953]; eingegangen am 31. Juli 1953)

Herrn Professor Butenandt zum 50. Geburtstag gewidmet

1. Erythrocytenstromata, die durch Hämolyse mittels saurer hypotonischer Pufferlösungen gewonnen werden, sind bei 2500 g zentrifugierbar, Stromata, die durch Hämolyse mittels neutraler oder alkalischer hypotonischer Pufferlösungen gewonnen werden, sind erst bei 13 000—15 000 g zentrifugierbar.

2. Die schwer zentrifugierbaren Schatten lassen sich durch mehrfaches „ p_H -Schaukeln“ allmählich irreversibel in den leicht zentrifugierbaren Zustand überführen. Es muß deshalb angenommen werden, daß der schwer zentrifugierbare Zustand der labilere ist, und daher dem nativen näher steht.

3. An einer Reihe von Hämolyseversuchen mit hypotonischen Lösungen verschiedener H -Ionenkonzentrationen und verschiedener Ionenarten wird gezeigt, daß die Anwesenheit von Carbonationen im Augenblick der Hämolyse zu Teilhämolysen eines Teils der Erythrocyten führen. Das hierbei zurückbleibende Resthämoglobin läßt sich durch osmotische Behandlungsmethoden nur zum geringen Teil aus den Schatten entfernen.

4. Hämolyse mit carbonationenarmen Lösungen dagegen führt zu Schatten, die nach mehrfachem osmotischem Schaukeln mit Fleischscher Lösung und $m/100$ -Phosphatpuffer (p_H 8,2) extrem hämoglobinar sind. Der Hämoglobingehalt der Trockensubstanz beträgt höchstens 0,05%.

5. Die Bedeutung dieser Ergebnisse für unsere Kenntnis der Erythrocytenmembran wird besprochen.

Seit langer Zeit stehen sich hinsichtlich des Aufbaus der Erythrocyten zwei Ansichten gegenüber: 1. die Vorstellung von einer Ballonstruktur, derzufolge eine elastische Membran eine hochkonzentrierte Hämoglobininlösung umschließt, und 2. die Vorstellung von einer Schwammstruktur; hiernach wird die Form des Erythrocyten durch ein schwammartiges Faserwerk

bedingt, in welcher das Hämoglobin eingelagert ist. In letzter Zeit wurde von verschiedenen Seiten eine dritte Vorstellung entwickelt¹, die gewissermaßen eine Mittelstellung zwischen den beiden oben genannten einnimmt. Danach nimmt die Strukturfestigkeit des Erythrocyten von seiner äußeren Oberfläche

¹ E. Ponder, J. exp. Biology **28**, 567 [1951].

gegen die Mitte hin ab; zugleich mit dieser Abnahme nimmt der Hämoglobingehalt zu, während die Lipoproteide ebenfalls in ihrer Konzentration fallen. Die geringere Menge Hämoglobin in der Nähe der Erythrocytenoberfläche gehört aber noch notwendig zum festen Strukturaufbau dazu. Eine wesentliche Voraussetzung für diese Annahme ist die Tatsache, daß es bisher nicht gelungen war, auf rein osmotischem Wege hämoglobinfreie Erythrocytenschatten zu gewinnen, so daß nach der Hämolysen in den Schatten immer ein „Überschußhämoglobin“ gefunden wurde, d. h. die Konzentration des Hämoglobins, das sich im Erythrocytenschattenraum befindet, ist bei der osmotischen Hämolysen höher als die Hämoglobinkonzentration in der Außenflüssigkeit. Dieses Überschußhämoglobin kann man auch durch mehrfaches Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung nur zum kleinen Teil aus den Schatten entfernen.

In vorliegender Arbeit soll gezeigt werden, daß es entgegen dieser bisherigen Vorstellung gelingt, auf rein osmotische Weise Erythrocytenschatten zu gewinnen, die praktisch hämoglobinfrei sind, und daß die entsprechenden Versuche bisher deshalb gescheitert sind, weil der große Einfluß des p_H und der Carbonationen auf die Erythrocytenmembran in den ungepufferten Hämolysierlösungen nicht beachtet wurde. Anschließend soll die Bedeutung dieses Ergebnisses für die Vorstellung von der Erythrocytenstruktur besprochen werden.

Methodik

Unsere Befunde wurden an menschlichen Erythrocyten erhoben. In einzelnen Parallelversuchen fanden wir aber, daß sich nahezu gleiche Ergebnisse mit Kaninchenerythrocyten erzielen lassen. Als gerinnungshemmendes Mittel wurde Heparin (Vetren-Promonta) in einer Konzentration von 200 i.E./50 ccm Blut angewandt. Vor der Hämolysen wurden die Erythrocyten dreimal mit der 10–20-fachen Menge Fleischscher Lösung² p_H 7,2 gewaschen. Wenn andere Waschflüssigkeiten zur Anwendung kamen, ist dies besonders vermerkt. Nach dem Ausschleudern aus der Waschflüssigkeit ließ sich die Leukocytschicht an der Oberfläche des Sediments durch Absaugen zum größten Teil entfernen. Die Menge der Hämolysierflüssigkeiten entsprach immer dem 50-fachen Volumen der dicht gepackten Erythrocyten. Sämtliche Versuche wurden bei 0° bis +2° durchgeführt. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration wurde mit der Glaselektrode, die Hämoglobinbestimmung mit dem Beckmanschen Spektrophotometer vorgenommen³.

² B. Romeis, Mikroskopische Technik, Leibniz-Verlag, München 1948.

³ H. Druckrey c. s., Biochem. Z. 322, 535 [1952].

Ergebnisse

1. Bei der osmotischen Hämolysen mit gewöhnlichem dest. Wasser schwankte anfänglich die Ausbeute an Schatten nach dem Zentrifugieren bei 2500 g sehr stark. Als Ursache ergab sich die unterschiedliche Wasserstoffionenkonzentration der Hämolysierlösung infolge wechselnder Mengen gelöster Luftkohlen-säure; frisch destilliertes oder abgekochtes CO₂-freies Wasser hat ein p_H von 6,9–7,0; beim Zutritt von Luft sinkt das p_H bekanntlich schnell auf 4,5–6,0. Tab. 1 zeigt, daß bei osmotischer Hämolysen mit nicht ausgekochtem dest. Wasser (p_H 4,9–5,6) oder verschiedenen hypotonischen Pufferlösungen in einem p_H -Bereich von 4,8–6,0 Schatten entstehen, die bei 2500 g leicht abzentrifugierbar sind. Bei Hämolysen mit ausgekochtem, CO₂-freiem dest. Wasser (p_H 6,6 bis 7,0) oder verschiedenen, annähernd neutralen oder schwach alkalischen Pufferlösungen (p_H 6,4–8,8) bilden sich dagegen Schatten, die erst bei 13 000 bis 15 000 g sedimentieren, während bei den niedrigen Touren von 2500 g nur einige Leukocytenkerne und wenige Schattenfragmente ausschleuderbar sind.

Folgende drei Versuche zeigen, daß bei diesen Ansätzen die Wasserstoffionenkonzentration vor allem im Augenblick der osmotischen Hämolysen für das nachfolgende Verhalten der Erythrocytenmembran verantwortlich ist. 1. Das p_H der hämoglobinhaltigen Lösungen liegt nach der Hämolysen in der Nähe des Neutralpunktes unabhängig vom p_H der Hämolysierlösung, wenn ihre Pufferkapazität nicht größer als die des austretenden Zellinhalts ist (Tab. 1, Spalte I). 2. Die durch gewöhnliches dest. Wasser oder durch saure m/100-Phosphatpufferlösung gewonnenen Schatten bleiben auch nach längerem Aufbewahren im m/100-Phosphatpuffer, p_H 8,2 bis 8,6, bei 2500 g zentrifugierbar. Die leichte Zentrifugierbarkeit ist also durch einen irreversiblen Vorgang verursacht. 3. Hämolysiert man eine Suspension von Erythrocyten in Fleischscher Lösung (p_H 7,2) auf mechanischem Wege durch Zerreiben mit Quarzsand, so sind die entstehenden Schattenfragmente bei 2500 g gut zentrifugierbar. Die p_H -Abhängigkeit läßt sich also nur bei osmotischer Hämolysen beobachten.

Werden Schatten durch neutrale oder schwach alkalische hypotonische Lösungen gewonnen und setzt man dieser Hämolysenlösung (HL) durch vorsichtiges Zutropfen unter kräftigem Rühren m/60-H₃PO₄ bis zu einem p_H von 5,8–5,9 zu, so tritt eine leichte Trübung ein, und man kann jetzt die Schatten bei 2500 g ausschleudern. Schwimmt man dieses Sediment wieder in m/100-Phosphat-Puffer p_H 8,4 auf und läßt 60 min stehen, so werden etwa ²/₃ der Schatten wieder in den vorigen Zustand versetzt und sind nicht mehr bei 2500 g zentrifugierbar. Dieses „Fällen“ und „Wiederauflösen“ kann man öfter wiederholen. Nach 4–5-maligem Umfällen erhält man eine kleine Menge weiß aussehende, sehr hämoglobinarmer

I		Dest. Wasser mit abnehmendem CO ₂ -Gehalt						m/100-Phosphatpuffer						
	p _H vor der Hämolyse	4,9	5,5	5,6	6,4	6,8	6,9	4,9	5,5	6,2	7,6	8,2	8,8	
	p _H nach der Hämolyse	6,9	6,9	6,9	6,9	7,0	7,1	6,3	6,3	6,6	7,4	7,5	7,7	
	Sedimentation bei 2500 g	+++	+++	+++	—	—	—	+++	+++	—	—	—	—	
II		Citronensäure- Phosphatpuffer			Citronensäure- Boraxpuffer			Acetat- puffer	Citronen- säure- Li-Carbonat	m/100- Li ₂ CO ₃	m/100- NaHCO ₃	m/100- KHCO ₃	m/100- (NH ₄) ₂ CO ₃	
	p _H vor der Hämolyse	4,8	7,1	4,8	5,1	8,2	4,9	4,8	9,9	7,5	7,8	7,7		
	p _H nach der Hämolyse	5,4	7,1	5,3	5,6	7,6	5,1	5,8	9,2	7,3	7,4	7,4		
	Sedimentation bei 2500 g	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	—	—	—		

Tab. 1. Abhängigkeit der Sedimentierbarkeit der Erythrocytenschatten vom p_H der Hämolyse.

Schatten. Diese sehen im mikroskopischen Bild nach der Anfärbung mit Brillantkresylblau groß, rund und blasig aus, wenn sie in alkalischer Pufferlösung suspendiert waren; amorphe Konglomerate findet man dagegen, wenn sie in Pufferlösung p_H 5,8—5,9 aufgeschwemmt waren, wie das bei der Säurefällung der Fall ist. Die Hapteneigenschaft der auf diese Weise behandelten Rh-positiven Zellen bleibt erhalten, wie sich im Agglutinations-Hemmversuch nachweisen läßt.

Durch konzentrierte Salzlösungen [NaCl, (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄] lassen sich die Schatten aus der vorher beschriebenen Lösung (HL) ebenfalls ausfällen. Allerdings tritt hierbei *sofort* eine irreversible Veränderung am Erythrocytenstroma ein, denn nach Aufschwemmen und längerem Stehenlassen in alkalischem Phosphatpuffer (p_H 8,4) bleiben die Schatten bei 2500 g zentrifugierbar.

2. Auf der Suche nach einer einfachen Methode, hämoglobinfreie Schatten osmotisch in guter Ausbeute zu gewinnen, wurden folgende weitere Befunde erhoben: Mit Fleischscher Lösung gewaschene Erythrocyten wurden 1. mit der 50-fachen Menge CO₂-haltigen, destillierten Wassers (p_H 4,8) (Tab. 2, Spalte 1), 2. mit CO₂-freiem destilliertem Wasser (p_H 6,9) (Tab. 2/2), 3. mit CO₂-freier m/100-Phosphatpufferlösung (p_H 8,2) (Tab. 2/3) hämolyseiert. Die Schatten wurden 15 min lang bei 15000 g ausgeschleudert und in Fleischscher Lösung aufgenommen. Nach 60 min wurden die 3 Ansätze wieder hochtourig zentrifugiert und die sedimentierten Schatten mit m/100-Phosphatpuffer (p_H 8,2) zum zweitenmal hämolyseiert. Nach 30 min wurde dieser Vorgang des „osmotischen Schaukelns“ wiederholt. Bei dem darauffolgenden Zentrifugieren war das Sediment des 1. Ansatzes geschichtet: die untere dicht gepackte Schicht war tiefrot,

darüber saß eine lockere hellrosa Schicht. Demgegenüber bestand das Sediment der beiden anderen Ansätze nur aus einheitlichen hellrosa Zellen. Nach Dekantieren der oberen Schicht des Ansatzes 1 wurde die untere tiefrote Schicht in ein Meßkölbchen gespült, mit m/100-Phosphatpuffer (p_H 8,2) aufgefüllt und ihre Erythrocytenkonzentration bestimmt. Dann wurden die Zellen wieder ausgeschleudert, mit Digitonin nachhämolyseiert und das Hämoglobin quantitativ bestimmt. Tab. 2/1 zeigt, daß etwa ein Drittel der eingesetzten Erythrocyten nur teilhämolyseiert ist; diese Zellen enthalten im Durchschnitt nach zweimaligem osmotischem Schaukeln 10—20% ihrer normalen Hämoglobinmenge. Die hellrosa Schatten der 3 Ansätze besitzen dagegen nur mehr Spuren von Hämoglobin; ungefärbt sind sie in der Zählkammer nicht mehr erkennbar. Werden die beiden Schattenarten getrennt mehrere Male weiter hämolyseiert, so verlieren die halbhämolyseierten Schatten praktisch kein Hämoglobin mehr, dagegen lassen sich die hämoglobinarmeren Schatten weitgehend hämoglobinfrei gewinnen (s. Abschnitt 3). Eine mehrfache Wiederholung dieses Versuches ergab jedesmal das gleiche.

Die folgenden Versuche sollten sichern, daß dieses Ergebnis nicht durch die Unterschiede der Wasserstoffionenkonzentration, sondern in spezifischer Weise durch den Gehalt der Lösungen an Carbonat- und Bicarbonationen bedingt ist. Zu diesem Zwecke wurde die Wirkung folgender CO₂-freier hypotonischer Elektrolytlösungen in der oben beschriebenen Weise untersucht: 1. m/200-Citronensäure-m/100-sek. Na-Phosphat (p_H 4,8), 2. m/200-Citronensäure-m/100-Borax (p_H 4,8 und 5,1), 3. CO₂-freies Wasser angesäuert mit Citronensäure bis p_H 4,8, 4. m/100-Phosphatpuffer (p_H 4,9 und 5,1), 5. m/100-Acetatpuffer (p_H 4,9),

Ansatz	1	2	3	4
Volumen der gepackten Erythrocyten . .	2 ccm (4 ccm)	2 ccm	4 ccm	2 ccm
Absolute Erythrocytenzahl	$1,58 \cdot 10^{10}$ ($4,2 \cdot 10^{10}$)	$1,48 \cdot 10^{10}$	$4,2 \cdot 10^{10}$	$1,48 \cdot 10^{10}$
Hämolysierlösung	dest. Wasser (CO ₂ -haltig) p_H 4,8	aqua dest. (CO ₂ -frei) p_H 6,9	m/100— Phosphatpuffer p_H 8,2	m/100— Phosphatpuffer p_H 4,9
Hellrosa Schatten (nicht zählb.)	++	++++	++++	++++
Rote Schatten, absolute Zahl	$4,7 \cdot 10^9$ ($1,4 \cdot 10^{10}$)	Spuren	Spuren	Spuren
Proz. d. Ausgangsmenge an Erythrocyten	29 (33)	—	—	—
Gesamt-Hämoglobingehalt der roten Schatten nach Digitonin-Nachhämolysen	22,1 mg (51,5 mg)	—	—	—
Hämoglobingehalt der roten Schatten in Proz. der Norm.	15,6 (11,7)	—	—	—

Tab. 2. Hämolysseansätze bei wechselndem p_H und Carbonationengehalt der Hämolysierlösung. Als Waschflüssigkeit diente Fleischsche Lösung, p_H 7,2. Es wurde 2-mal osmotisch geschaukelt.

Ansatz	1	2	3	4	5
Absolute Erythrocytenzahl	$2 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$
Hämolysierlösung	m/200-Citronensäure- m/100-Li ₂ CO ₃ Puffer p_H 4,8	m/100-Li ₂ CO ₃ Lösung p_H 9,8	m/100-NaHCO ₃ Lösung p_H 7,3	m/100-KHCO ₃ Lösung p_H 7,4	m/100- (NH ₄)HCO ₃ Lösung p_H 7,4
Hellrosa Schatten (nicht zählbar)	++++	++	++	++	++
Rote Schatten (absol. Zahl)	Spuren	$1,9 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$	$3,5 \cdot 10^9$	$3,7 \cdot 10^9$
Rote Schatten (Proz. d. Aus- gangsmenge an Erythro- cyten)	—	9,5	17,5	17,5	18,5
Gesamthämoglobingehalt der roten Schatten nach Digitonin-Nachhämolysen	—	5,6 mg	3,5 mg	8,2 mg	10,9 mg
Hämoglobingehalt d. roten Schatten in Proz. d. Norm	—	9,4	5,3	7,6	9,5

Tab. 3. Hämolysseansätze bei verschiedenem Carbonationengehalt der Hämolysierlösungen. Als Waschflüssigkeit diente Fleischsche Lösung p_H 7,2. Das Volumen der gepackten Erythrocyten betrug 2 ccm. Es wurde 2-mal osmotisch geschaukelt.

6. m/200-Citronensäure-m/100-sek. Na-Phosphat (p_H 7,1),
7. m/200-Citronensäure-m/100-Borax (p_H 8,2). Obwohl sich die Lösungen über den p_H -Bereich von 4,8—8,2 erstrecken, war bei keiner nach 2-maligem osmotischem Schaukeln eine zählbare Menge teilhämolysierter Erythrocyten nachweisbar. Dagegen führte eine Reihe von Carbonat- und Bicarbonatlösungen (Tab. 3) zu einer Teilhämolysen verschiedenen Grades. Die Zahl der teilhämolysierten Zellen war

um so größer, je stärker die Konzentration an Carbonationen war. Daß nur der dissoziierte Anteil der Kohlensäure von Bedeutung ist, ergibt sich aus Spalte 1 der Tab. 3; bei diesem Ansatz ist die Dissoziation der Kohlensäure infolge des niedrigen p_H stark zurückgedrängt; die Zahl der Halbschatten ist nicht meßbar.

Dagegen führt mehrfaches Waschen oder 12 Stdn. langes Suspendieren von intakten Erythrocyten in CO₂-haltiger

0,9-proz. NaCl-Lösung (p_H 4,5) vor der Hämolyse nur zu einem äußerst geringen Auftreten teilhämolyzierter Zellen. Erythrocyten einer 18 Tage alten Blutkonserve der Blutbank verhielten sich bei der vorher beschriebenen Behandlung wie frisch entnommene Erythrocyten.

Abb. 1. Quantitative Bestimmung der Hämoglobinmengen, die beim osmotischen Schaukeln aus den Erythrocytenschatten herausgelöst werden. Ordinate: log der Hämoglobinmenge in mg, die jeweils nach dem Ausschleudern der Schatten in den auf der Abszisse angegebenen Suspensionsflüssigkeiten gemessen wurde. (HL: Hämolyse; FL: Fleischsche Lösung; PP: $m/100$ -Phosphatpuffer, p_H 8,2; Digit.: Digitoninlösung.) In den hypotonischen Phosphatpufferlösungen wird bei den ersten Schritten deutlich mehr, bei den späteren Schritten fast gleich viel Hämoglobin gefunden wie in den jeweils vorher verwandten isotonischen Lösungen.

3. In folgenden 2 Versuchen wurde die kohlensäure-ionen-freie mehrfache Hämolyse quantitativ untersucht: 1. 16 ccm gewaschene, dichtgepackte Erythrocyten wurden in der 50-fachen Menge CO_2 -freiem $m/100$ -Phosphatpuffer (p_H 8,2) hämolysiert und die Schatten 7-mal mit Fleischscher Lösung und $m/100$ -Phosphatpuffer (p_H 8,2) osmotisch geschaukelt. Die einzelnen überstehenden Flüssigkeiten wurden nach jedem Zentrifugieren abpipettiert und ihr Hämoglobingehalt bestimmt. Die absolute Menge des jeweils herausgelösten Hämoglobins ist aus Abb. 1 zu

ersehen. Die so präparierten weißen Schatten mit einem Trockengewicht von 41 mg wurden mit Digitonin nachhämolyisiert, das hierbei noch herausgelöste Hämoglobin betrug 22 γ . Daraus errechnet sich ein Resthämoglobingehalt von 0,05%. 2. Auch nach CO_2 -freier Hämolyse im sauren Bereich mit a) $m/100$ -Phosphatpuffer (p_H 5,1) und b) $m/200$ -Citronensäure- $m/100$ -Borax (p_H 5,1) und nachfolgendem osmotischem Schaukeln mit Fleischscher Lösung und den eben genannten sauren Puffern ließen sich extrem hämoglobinarne Schatten gewinnen. Das Resthämoglobin betrug weniger als 0,05% des Schattentrockengewichts. Weitere Versuche zeigten, daß bei einfachem Waschen der Schatten mit Fleischscher Lösung allein oder $m/100$ -Phosphatpufferlösung (p_H 8,2) allein der Resthämoglobingehalt wesentlich höher ist als nach einem solchen osmotischen Schaukeln.

Besprechung

Bei unseren Befunden scheinen uns folgende Punkte von Bedeutung:

1. Das p_H der Hämolyselösung hat für die physikalischen Eigenschaften der entstehenden Erythrocytenschatten große Bedeutung, und zwar ist das p_H , das im Augenblick des Hämolysevorgangs herrscht, entscheidend. Denn nach der Hämolyse verschieben sich die p_H -Werte der Lösungen infolge der puffernden Wirkung des ausgetretenen Zellinhaltes zum Neutralpunkt. Hat aber die hämolysierende Pufferlösung vorher ein p_H unterhalb von 6,0–6,2, so sind die Schatten durch 15 min dauerndes Zentrifugieren bei 2500 g quantitativ ausschleudbar; hat die Lösung vorher ein p_H über 6,0–6,2, so kann man die Schatten erst bei etwa 15 000 g zentrifugieren. Diese Veränderung bei schwach saurem p_H ist irreversibel: Werden Schatten unterhalb jener Grenze gewonnen und anschließend in eine Lösung mit schwach alkalischem p_H gebracht, so bleibt ihre leichte Zentrifugierbarkeit erhalten. Werden umgekehrt Schatten oberhalb dieser Grenze gewonnen und anschließend in einer schwach sauren Lösung aufgeschwemmt, so lassen sie sich niedertourig zum größten Teil abzentrifugieren; ein nachfolgendes Versetzen in ein schwach alkalisches Milieu stellt die schwere Zentrifugierbarkeit aber nur zum Teil wieder her. Durch mehrfaches „ p_H -Schaukeln“ dieser Art ist zuletzt der größere Teil der Schatten auch in alkalischer Lösung leicht zentrifugierbar. Diese Tatsachen sprechen dafür, daß der labilere Zustand, in dem die Schatten schwer ausschleudbar sind, auch dem nativen Zustand näher steht, und daß durch ein saures p_H im Augenblick der Hämolyse eine irreversible Veränderung eintritt.

Mit dieser Vorstellung steht scheinbar die Beobachtung im Widerspruch, daß Schattenfragmente, die

durch Zerreiben mit Quarzsand gewonnen wurden und sich in einer isotonischen Lösung p_H 7,2 befinden, schon bei 2500 g zentrifugiert werden können. Nun sind aber im Gegensatz zu diesen Schattenfragmenten osmotisch gewonnene Schatten geschlossene Gebilde, so daß die im Schatten enthaltene Flüssigkeit das effektive spezifische Gewicht des Schattens erniedrigt. Darin dürfte der Grund liegen, daß die feinen Unterschiede im spezifischen Gewicht sich nur bei osmotisch gewonnenen Schatten bemerkbar machen, während die Quarzsandschatten ohne das Wasser im Innenraum auch in nativ ähnlichem Zustand schon bei niedrigeren Tourenzahlen ausgeschleudert werden können. Über die Art des Unterschiedes der bei verschiedenem p_H gewonnenen osmotischen Schatten läßt sich vorläufig nichts Sicheres sagen, doch liegt die Vermutung nahe, daß es sich um irreversible Veränderungen im Quellungs Zustand der Membran handelt.

2. Neben der Bedeutung des p_H im Augenblick der Hämolyse ist zusätzlich der Gehalt der Hämolyseflüssigkeit an freien Carbonationen für die Eigenschaften der entstehenden Schatten von großer Bedeutung. Enthält nämlich die Hämolyseflüssigkeit Carbonationen in größerer Menge, läßt sich der Vorgang der ersten Hämolyse nicht wiederholen, so daß das Resthämoglobin, das bei der ersten Hämolyse im Erythrocyten verbleibt, durch einen weiteren Hämolyseansatz (ein „osmotisches Schaukeln“) nicht oder kaum mehr vermindert werden kann. Sind diese Ionen aber nur in geringer Menge vorhanden, so läßt sich der Vorgang der Hämolyse mehrfach wiederholen, so daß man praktisch hämoglobinfreie Erythrocyten gewinnen kann. Dies macht es verständlich, daß es bisher nicht gelungen ist, auf rein osmotische Weise hämoglobinfreie Erythrocyten zu gewinnen, da hierfür fast immer das gewöhnliche dest. Wasser als Hämolyseflüssigkeit verwendet wurde. Dieses enthält Luftkohlenensäure (p_H 4,5—6,0); sein Carbonationengehalt verändert offenbar einen wesentlichen Teil der Erythrocytenmembranen im Augenblick der osmotischen Hämolyse irreversibel, so daß eine Wiederholung der Hämolyse zu keiner Verminderung des restlichen Hämoglobins führt.

3. Der Hämoglobingehalt der mehrfach osmotisch geschaukelten gelblich-weißen Schatten aus CO_2 -armen Lösungen ist außerordentlich gering. Er

wurde durch Zusatz von einer zur völligen Hämolyse sicher ausreichenden Menge von Digitonin⁴ bestimmt und beträgt 0,05% ber. auf das Trockengewicht der Schatten. Dies entspricht etwa 0,0005% des ursprünglichen Hämoglobins. Diese Messung liegt jedoch in der Grenze der Auflösungsfähigkeit des Beckman-Gerätes; es handelt sich demnach um den oberen möglichen Wert des Hämoglobins, der vielleicht noch wesentlich geringer sein kann. Werden die Schatten verascht und der Eisengehalt bestimmt, so ergibt sich nach Abzug des Leerwertes ein Eisengehalt von 0,012—0,016%. Offenbar kann es sich hierbei nicht um Hämoglobineisen handeln, es ist vorläufig aber noch nicht zu entscheiden, ob dieses Eisen ursprünglich in den Schatten vorhanden war, oder durch Absorption von Eisenspuren der Hämolyse- und Salzlösungen an die Schatten nachträglich angelagert wurde. Andererseits ist bekannt, daß man mit verschiedener nicht rein osmotischer Behandlung praktisch hämoglobinfreie Schatten gewinnen kann, z. B. nach Parpat⁵ durch Waschen von osmotisch gewonnenen Schatten (p_H 5,5) mit kaltem CO_2 -gesättigtem Wasser. Diese Behandlung schädigt aber die Schatten irreversibel, da sich eine Reihe von Eigenschaften, z. B. die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit¹, ändern. Demgegenüber wandern rein osmotisch behandelte Schatten genau so schnell wie normale Erythrocyten⁶. Auch die Besetzung osmotisch gewonnener Schatten (p_H 5,5) mit Saponinen¹, z. B. Digitonin, läßt bezeichnenderweise das Überschußhämoglobin aus den Schatten völlig austreten, ein Argument mehr, daß die Digitoninhämolyse durch einen anderen Mechanismus ausgelöst wird wie die osmotische Hämolyse, so wie das jetzt Wilbrandt auch hinsichtlich des Digitonins vertritt⁷.

Bei Hämolyseflüssigkeiten mit einem mittelgroßen Carbonationengehalt befindet sich in den abzentrifugierten Schatten ebenfalls Überschußhämoglobin. Dieses ist jedoch nicht gleichmäßig oder in einer üblichen statistischen Weise auf alle Schatten verteilt, sondern angehäuft in einer bestimmten Anzahl von „Halbschatten“. Beim Zentrifugieren mit 15 000 g lassen sie sich ziemlich scharf von den darübersitzenden hämoglobinarmeren Schatten abtrennen. Durch weiteres Waschen werden sie kaum hämoglobinarmer. Dagegen sind die oberen hämoglobinarmeren

⁴ G. Ruhenstroth-Bauer, Z. Naturforschg. **5b**, 250 [1950].

⁵ A. K. Parpat, J. cellular comparat. Physiol. **19**, 248 [1942].

⁶ H. A. Abramson, L. S. Moyer u. M. G. Gorin, Elektrophoresis of proteins, Reinhold Publ., New York 1942.

⁷ W. Wilbrandt, Persönliche Mitteilung.

Schatten durch 5—6-faches „Schaukeln“ mit fleischscher Lösung und $m/100$ -Phosphatpuffer (p_H 8,2) praktisch hämoglobinfrei zu gewinnen. In dem Übergangsbereich der Carbonationenkonzentration befinden sich also veränderte Schatten neben nativ-ähnlichen.

4. Die Annahme, die Membranstruktur der Erythrocyten sei in abnehmendem Maße gegen das Zellinnere hin geordnet¹, ist für die Lipoproteide mindestens hinsichtlich des Cholesterins sehr unwahrscheinlich. Denn an anderer Stelle⁸ wurde gezeigt, daß das Cholesterin sehr wahrscheinlich gänzlich an der äußeren Oberfläche der Zelle sitzt. Hierfür spricht auch der Befund von Hagerman und Gould⁹, daß das Cholesterin der Erythrocytenoberfläche und das des Plasmas dauernd im Austausch stehen. Es konnte gezeigt werden¹⁰, daß im Durchschnitt etwa alle 9 Min. jedes Cholesterinmolekül der Zelle einmal austauscht und ein spezifischer Stoß eines Plasmacholesterins diesen Austausch bewirken dürfte. Es ist schwer vorzustellen, daß ein solcher häufiger

Austausch mit tiefer sitzenden Molekülen möglich wäre.

Nach der genannten Vorstellung¹ bildet das Hämoglobin einen wesentlichen Bestandteil der Zellmembran. Sie basiert u. a. auf der Annahme, daß man rein osmotisch keine hämoglobinfreien Schatten gewinnen kann. Durch unsere Ergebnisse erweist sich diese Annahme jedoch als irrig. Trotzdem muß betont werden, daß unsere Befunde die Vorstellung einer abnehmend starken Orientierung des Zellinhalts von der Oberfläche gegen das Zellinnere hin nicht völlig widerlegen. Der Nachweis Paulings¹¹, daß ein abnormes Hämoglobin einen Einfluß auf die Erythrocytenform haben kann, zeigt klar, daß auch der Zellinhalt die Zellform beeinflussen kann. Durch unsere Befunde wird deshalb nur sehr unwahrscheinlich, daß diese Orientierung an der Zellmembran selbst so stark sein soll, daß sie bei einer osmotischen Hämolyse noch erhalten bleibt.

Frl. H. Teipel danken wir für ihre wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

⁸ G. Ruhenstroth-Bauer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **287**, 221 [1951].

⁹ J. S. Hagerman u. R. G. Gould, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **78**, 329 [1951].

¹⁰ G. Ruhenstroth-Bauer, Z. ges. exp. Med. (im Druck).

¹¹ L. Pauling c.s., Science [New York] **110**, 543 [1949].

Der Schluß von Reiz-Reaktions-Funktionen auf System-Strukturen

VON BERNHARD HASSENSTEIN* und WERNER REICHARDT**

(Z. Naturforschg. **8b**, 518—524 [1953]; eingegangen am 30. April 1953)

Die experimentelle Analyse der optokinetischen Reaktionen des Rüsselkäfers *Chlorophanus viridis* deckte mehrere, gleichzeitig vorhandene Interaktions-Weisen benachbarter Ommatidien auf (s. Tabelle in Abschnitt V S. 523). Aus ihnen soll auf die zugrunde liegende Systemstruktur geschlossen werden, die im ZNS des Käfers verwirklicht sein muß. Zu diesem Zweck wird ein allgemeiner axiomatischer Ansatz für den Schluß von Reiz-Reaktions-Funktionen auf Systemstrukturen gegeben: I. Theoretisch fehlerfrei ist nur der Schluß auf die hinreichende und notwendige Struktur. II. In den Verrechnungselementen der Systemstruktur müssen die physikalischen Informationsträger nach demjenigen Gesetz aufeinander einwirken, welchem in dem betreffenden Verrechnungsakt die Informationswerte gehorchen. III. Unter bestimmten Bedingungen muß ein System mindestens in einem seiner Querschnitte ebenso viele isolierte Leitungen besitzen als unabhängige und verrechnete Eingangs-Informations-Daten. IV. Bei unvollkommener Isolierung von Informationsleitungen geht die Unabhängigkeit der geleiteten Informationen, welche eine Bedingung für das Zustandekommen von Verrechnungen zwischen Informationswerten ist, schneller als proportional zur Isolationsabnahme verloren.

Der Schluß von Reiz-Reaktions-Funktionen auf zugrunde liegende Systemstrukturen kann dort auftreten, wo die unmittelbare Beobachtung der Vorgänge, die sich im Inneren des Systems abspielen,

nicht oder — aus technischen Gründen — noch nicht möglich ist. In der Biologie ist dieser Schluß daher ein Arbeitsgang innerhalb der „messenden Verhaltensforschung“, die durch experimentelle Feststellung

* Max-Planck-Institut für Meeresbiologie in Wilhelmshaven, Abt. Prof. v. Holst.

** Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem.