

Enzymverteilung im Protoplasma

Von

H. HOLTER und K. LINDERSTRØM-LANG

Aus dem Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen

Mit einer Figur im Text

(Eingegangen am 26. 8. 1936. Vorgelegt in der Sitzung am 15. 10. 1936)

Im Jahre 1934 wurden in einer zusammenfassenden Darstellung¹ die allgemeine Problemstellung und die methodischen Grundlagen einer enzymatischen Histochemie behandelt und über einige mit diesen Methoden erzielten Ergebnisse berichtet. In der vorliegenden Abhandlung soll der gegenwärtige Stand eines der dort angeschnittenen Probleme, nämlich der Enzymverteilung in der einzelnen Zelle, dargestellt werden.

Es handelt sich um eine experimentelle Prüfung der Hypothese, daß die Enzyme des Zellinnern nicht gleichmäßig im Cytoplasma verteilt, sondern an granuläre, durch ihr Verhalten gegen gewisse Farbstoffe definierte, Strukturelemente gebunden sind, welche als Enzymträger fungieren. Als solche Enzymträger werden häufig die durch Ianusgrün vitalfärbbaren Mitochondrien oder die davon angeblich verschiedenen, durch Neutralrot färbbaren Granula angesehen; diese und ähnliche Fragen (z. B. die enzymatische Rolle des Zellkerns) wurden namentlich in der cytologischen Literatur viel diskutiert (vgl. z. B. die zusammenfassenden Darstellungen von HORNING², KOEHRING³ und SHAPIRO⁴). Wie aus den folgenden Abschnitten hervorgehen wird, brauchen wir hier auf jene Diskussion nicht näher einzugehen. Auch wollen wir gleich hier betonen, daß wir uns in dieser Abhandlung nicht mit den Enzymen beschäftigen, die in den Zellen gewisser hochspezialisierter Gewebe (Verdauungsdrüsen u. dgl.) zu Sekretionszwecken angehäuft werden. Uns interessieren vorläufig als Untersuchungsobjekte primitivere Zellformen und die typischen, allgemein verbreiteten Endoenzyme.

In der Wahl der Untersuchungsobjekte und Enzyme wurden wir natürlich in erster Linie beeinflußt durch die Beschränkungen

¹ K. LINDERSTRØM-LANG und H. HOLTER, *Erg. d. Enzymforsch.* **3** (1934) 309.

² E. S. HORNING, *Erg. d. Enzymforsch.* **2** (1933) 336.

³ V. KOEHRING, *J. Morph. a. Physiol.* **49** (1930) 45.

⁴ H. SHAPIRO, *J. Cell. a. Comp. Physiol.* **6** (1935) 101.

der chemischen Mikromethodik. Als geeignet erwiesen sich die Eier einiger wirbellosen Seetiere, sowie Amöben. Als Enzyme wurden Peptidase und Katalase gewählt.

I. Chemische Methodik.

Bezüglich der Bestimmung kleiner enzymatischer Spaltungen im allgemeinen sei auf die eingangs erwähnte Zusammenfassung¹, sowie auf die dieser zugrundeliegenden Einzelabhandlungen^{5, 6} verwiesen. Die von uns verarbeiteten Flüssigkeitsvolumina liegen in der Größenordnung von wenigen mm^3 , die Titrationsgenauigkeit erlaubt die Messung von Substratveränderungen in der Größenordnung von 5×10^{-9} Mol für die meisten gangbaren Substrate hydrolytischer Enzyme. Nur die Bestimmung der beiden hier interessierenden Enzyme Dipeptidase und Katalase sei in aller Kürze dargestellt.

A. Dipeptidase.

Als Substrat dient eine 0·2 mol. Lösung von Alanyl-glycin, durch Zusatz von NaOH auf p_H 7·5 gebracht. Die enzymhaltigen Objekte werden in ein abgemessenes Volumen (meist $7 mm^3$) eines passenden Mediums (verdünntes Meerwasser + Glycerin oder dgl.) eingeführt, das sich in einem Mikroreaktionsgefäß befindet, die Substratlösung ($7 mm^3$) dazupipettiert, mit einem elektromagnetischen Rührer gemischt und das Ganze in einen 40^0 warmen Thermostaten gesetzt. Auf Pufferzusatz wird verzichtet, dafür aber die Spaltung so klein gehalten, daß die Eigenpufferung des Substrates genügt, um schädliche p_H -Verschiebungen während der Reaktion zu verhindern. Die Reaktion wird nach 18–24 Stunden durch Zusatz des größten Teiles der Titrationssäure ($n/20$ HCl in 90% Alkohol) sistiert, ca. $140 mm^3$ Aceton zugesetzt, das Naphthylrot als Indikator enthält, und mit $n/20$ alkoholischer Salzsäure fertig titriert. Die Burette ist in $\frac{1}{5} mm^3$ eingeteilt, so daß 0·02 mm^3 geschätzt werden können. Bezüglich der methodischen Einzelheiten vgl. ⁵ und ⁷. Die Genauigkeit der Methode (maximaler vereinigter Pipettierungs- und Titrationsfehler) ist 0·08 mm^3 $n/20$ HCl, entsprechend $5·6 \times 10^{-5} mg$ Amino-N.

⁵ K. LINDERSTRÖM-LANG und H. HOLTER, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 19 (1931) Nr. 4; Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 201 (1931) 9.

⁶ Von Abhandlungen methodischen Inhaltes in der Serie „Beiträge zur enzymatischen Histochemie“ führen wir hier nur die an, die nach dem Erscheinen der Zusammenfassung¹ veröffentlicht worden sind. Diese sind: Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 226 (1934) 173, 227 (1934) 1, 231 (1935) 226, 233 (1935) 174, 237 (1935) 131, 240 (1936) 33; Enzymologia 1 (1936) 92; C. R. Trav. Lab. Carlsberg 20 Nr. 11 (1934) 33, 66; Sér. chim. 21 Nr. 1 (1935), Nr. 2 (1935), Nr. 4 (1936), Nr. 6 (1936), Nr. 7 (1936).

⁷ K. LINDERSTRÖM-LANG, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 19, Nr. 3 (1933); Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 215 (1933) 167.

Die gefundenen Spaltungswerte in mm^3 zur Titration verbrauchter Salzsäure sind unter den Bedingungen unserer Versuche und im gewählten Spaltungsbereich den Enzymmengen direkt proportional.

B. Katalase.

Die von uns verwendete Methode ist einfach eine Verfeinerung der von K. G. STERN⁸ angegebenen jodometrischen Katalasebestimmung. Als Substrat dient eine 0·01 mol. Lösung von H_2O_2 in Phosphatpuffer von p_H 7·0. Der die Enzymproben enthaltende Tropfen ($7 mm^3$) wird auf 0° gekühlt, mit dem ebenfalls vorgekühlten Substrat ($15 mm^3$) vereinigt, vermischt und 60–120 Minuten bei 0° gehalten. Sistiert wird durch Zusatz von $30 mm^3$ 1% Kaliumjodid und $5 mm^3$ molybdän-säurehaltiger 30%iger Schwefelsäure. Titration mit $n/100$ -Thiosulfat aus der in¹ beschriebenen Bürette. Stärke als Indikator. Die Genauigkeit der Methode ist ca. $0·1 mm^3$ $n/100 Na_2S_2O_3$, entsprechend $1·7 \times 10^{-5} mg H_2O_2$.

Wie Kontrollversuche gezeigt haben, folgte die H_2O_2 -Zersetzung durch die Katalase der Untersuchungsobjekte genügend genau der monomolekularen Reaktionsgleichung, um die zu messenden Enzymmengen durch die Geschwindigkeitskonstante dieser Gleichung ausdrücken zu können.

II. Cytologische Methodik.

In der eingangs erwähnten Abhandlung¹ werden einige Voraussetzungen und Möglichkeiten für quantitative Arbeit auf histoenzymatischem Gebiet besprochen. Wir haben darauf hingewiesen, daß die Versuchsergebnisse direkt immer nur über Enzymlokalisierung etwas aussagen und haben die Schwierigkeiten betont, welche die physiologische Auswertung der Ergebnisse oft erfährt. Im vorliegenden Fall ist dieses Problem insofern vereinfacht, als uns primär die Enzymlokalisierung interessiert. Andererseits unterscheidet sich das Cytoplasma als Untersuchungsobjekt von Geweben und Organen sehr wesentlich dadurch, daß es in viel kleineren Dimensionen heterogen und außerdem ungeordnet ist, d. h. daß wir eine Lokalisierung der Formelemente zu Untersuchungszwecken erst selbst herbeizuführen haben. Dies bedingt den Arbeitsgang, dessen entscheidende Operation darin besteht, die Bestandteile der Zelle ohne Eingriff in die enzymatischen Verhältnisse räumlich voneinander zu trennen und sodann getrennt auf ihre Enzymaktivität zu prüfen. Die chemische und mechanische Empfindlichkeit der Untersuchungsobjekte erschwert natürlich die vollständige Trennung der Zellbestandteile und man muß sich meist damit begnügen, die natürliche innige Vermischung des Zellinnern partiell aufzuheben, einzelne Zellbestandteile an bestimmten Punkten anzureichern, das betreffende Zellstück dann mechanisch zu isolieren und zur Enzymbestimmung zu verwenden.

⁸ K. G. STERN, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 204 (1932) 267.

Die Brauchbarkeit einer solchen Arbeitsweise zu quantitativen Untersuchungen steht und fällt mit der Möglichkeit, die Entmischung des Cytoplasmas zahlenmäßig auszudrücken und mit Zahlenwerten für die Enzymverteilung zu vergleichen.

Zur Durchführung eines derartigen Arbeitsganges stehen uns gegenwärtig vor allem zwei Verfahren zur Verfügung, nämlich Zentrifugierung der Zellen und die auf dem Mikromanipulator begründete Technik der Mikrurgie.

1. *Zentrifugieren.* Wir wollen den Verlauf einer Untersuchung, die mit dem ersten der eben genannten Hilfsmittel auskommt, an einem konkreten Beispiel darstellen, nämlich den unbefruchteten Eiern des Seeigels *Psammechinus miliaris*. Das ungemein elegante Zentrifugierverfahren wurde von E. N. HARVEY⁹ angegeben und besteht darin, daß man die Eier an

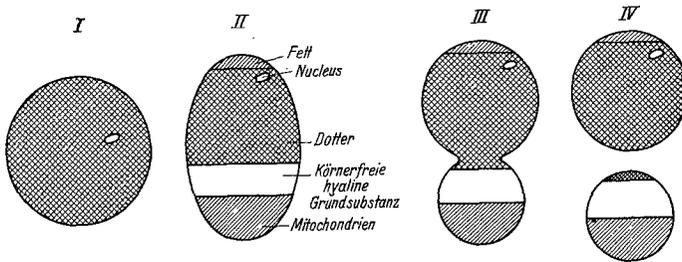


Fig. 1.

der Grenzfläche von Meerwasser und einer damit isotonischen, aber spezifisch schwereren, dem Meerwasser unterschichteten Rohrzuckerlösung anbringt. Die Dichte der Eier liegt zwischen der der beiden Lösungen. Führt man durch vorsichtiges Rollen des Zentrifugenröhrchens partielle Mischung der Lösungen herbei, so erhält man in der Zwischenschicht einen Dichtegradienten. Die Eier sammeln sich in der Zone, die ihrer eigenen Dichte entspricht.

Die angewendete Zentrifugalkraft entspricht ca. 5000 bis 10.000 \times Erdschwere, die Zentrifugierungszeit lag zwischen 5 und 15 Minuten. Unter dem Einfluß des Zentrifugalfeldes entmischt sich das Cytoplasma und ordnet sich in scharf voneinander geschiedene Schichten, die durch ihr Verhalten gegen Farbstoffe charakterisiert werden können. Fig. 1 gibt schematisch das Verhalten von *Psammechinus*-Eiern unter dem Einfluß der Zentrifugalkraft wieder. *I* stellt das unbehandelte Ei dar, *II* dasselbe Ei nach kurzem Zentrifugieren, zum Ellipsoid gedehnt und mit stratifi-

⁹ E. N. HARVEY, Biol. Bull. 61 (1931) 273.

ziertem Inhalt. Bei fortgesetztem Zentrifugieren schnürt sich das Ei sanduhrartig ein (*III*) und teilt sich schließlich in zwei verschieden große Teile (*IV*), die sich, da deren spezifisches Gewicht verschieden ist, in verschiedenen Zonen der Grenzschicht zwischen Meerwasser und Zuckerlösung ansammeln. Sie können dem Zentrifugenröhrchen getrennt entnommen und getrennt auf ihre enzymatische Aktivität geprüft werden.

Die Anordnung der einzelnen Cytoplasmabestandteile und die Lage der Bruchstelle wechseln von Art zu Art und in geringerem Grade von Tier zu Tier. Außer den in der Figur angegebenen Bestandteilen finden sich auch oft (z. B. bei *Arbacia*) die mit Neutralrot färbbaren Granula als eine fünfte Schicht, die jedoch bei dem hier als Beispiel gewählten *Psammechinus*-Ei nicht studiert wurde. Im Einzelnen braucht auf diese qualitativen Verhältnisse hier nicht näher eingegangen zu werden; die quantitativen Verhältnisse werden in Abschnitt IV besprochen werden.

Hier sei nur noch erwähnt, daß sowohl Eier wie Amöben das Zentrifugieren ausgezeichnet vertragen. Der Inhalt unzerteilter Zellen (Stadium II oder III) mischt sich nach dem Zentrifugieren rasch wieder und die Zelle setzt sodann ihre normalen Funktionen fort. Ja, im Falle des bis jetzt am besten studierten Seeigels *Arbacia punctulata* sind nicht nur die ganzen und stratifizierten Eier schon vor dem Wiedermischen des Inhaltes befruchtungs- und entwicklungsfähig; sogar die Eiteile können getrennt befruchtet werden und die ersten Stadien der Embryonalentwicklung durchlaufen, wobei beim kernlosen Teil (entsprechend dem unteren Eiteil in Stadium IV der Fig. 1), die Kernsubstanz vom befruchtenden Spermatozoon geliefert wird (E. B. HARVEY¹⁰).

2. *Mikrurgie*. Auf die Technik der Operationen an einzelnen Zellen mit Hilfe des Mikromanipulators kann hier nicht näher eingegangen werden. Es sei diesbezüglich vor allem auf die Arbeiten von R. CHAMBERS und T. PÉTERFI verwiesen (als zusammenfassende Darstellung vgl. z. B. PÉTERFI¹¹). Von uns hier interessierenden Operationen, die mit Hilfe der Glasnadeln des Mikromanipulators durchgeführt werden können, seien vor allem genannt die Isolierung des Zellkernes von Amöben und Eiern und das Zerschneiden von zentrifugierten, im Stadium II der Fig. 1 befindlichen Zellen, das vor allem wertvoll ist bei Amöben und bei den Eiern gewisser Seeigelarten, bei denen die Zerteilung im Zentrifugalfeld nicht so verlustlos und gleichförmig vor sich geht

¹⁰ E. B. HARVEY, Biol. Bull. 62 (1932) 155.

¹¹ T. PÉTERFI in „Methodik der wiss. Biologie“, Springer, Berlin 1928, Bd. 1. S. 559.

wie in dem durch Fig. 1 dargestellten Beispiel. — Die Operation muß in diesen Fällen rasch nach dem Zentrifugieren und auf gekühlten Objektträgern ausgeführt werden, um das Wiedermischen des Zellinhaltes vor Beendigung der Operation zu verhindern.

III. Allgemeine Bemerkungen und Vorversuche.

Bevor wir zur Besprechung der Ergebnisse übergehen, die mit Hilfe dieser Verfahren gewonnen wurden, müssen noch einige Fragen behandelt werden, die zwar nicht direkt die Enzymverteilung im Cytoplasma betreffen, deren Beantwortung aber die Vorbedingung für die experimentelle Bearbeitung des Hauptproblems bildet.

Die erste betrifft die *Aktivität des Materiales*. Die Objekte haben Durchmesser von etwa 50—100 μ , was bei den annähernd kugeligen Eiern Volumina von $0\cdot5-4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ entspricht. Diese Maße variieren für die verschiedenen Tierarten, sowie, wenn auch in geringerem Grade, für Einzeltiere einer Art, dagegen nur sehr wenig für die Einzeleier desselben Muttertieres. — Die Maße der Amöben sind natürlich viel variabler, doch liegen auch sie in derselben Größenanordnung. Zur Beleuchtung der Aktivität der Objekte sei beispielsweise angeführt, daß 1 Ei von *Dendroaster excentricus* (Vol. etwa $0\cdot5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$; Trockengewicht etwa $1 \times 10^{-4} \text{ mg}$), in 1 Stunde bei 40° etwa $1 \times 10^{-3} \text{ mg}$ Alanylglycin spaltet. Dies entspricht für 1 Ei und eine Reaktionszeit von 18 Stunden bei 40° Titrationswerten von $2-3 \text{ mm}^3 \text{ n}/20 \text{ HCl}$, was durchaus im Arbeitsbereiche der Mikropeptidasebestimmung liegt. — Das etwa ebenso große Ei von *Psammechinus miliaris* spaltet in einer Stunde bei 0° etwa $3\cdot4 \times 10^{-4} \text{ mg H}_2\text{O}_2$, entsprechend einem Titrationswert von $1\cdot5-2 \text{ mm}^3 \text{ n}/100 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und einer Geschwindigkeitskonstanten der monomolekularen Reaktion $k = \text{ca. } 6 \times 10^{-4}$. Weitere Angaben über die Aktivität der Untersuchungsobjekte können den Tabellen 1 und 2 entnommen werden.

Praktisch folgt aus diesen Verhältnissen, daß man für die beiden genannten Enzyme mit Proben von 1—10 Eiern oder Eiteilen, bzw. ebensovielen Amöben pro Versuch auskommt.

Was zweitens die *Probenahme* betrifft, so gestaltet sich diese sehr einfach, indem die einzelnen Zellen oder Zellteile unter dem Mikroskop ausgewählt und mit Hilfe einer Mikropipette in das Reaktionsgefäß überführt werden. Das Flüssigkeitsvolumen, das

Tabelle 1 (7, 12, 13, 16).*

Reproduzierbarkeit der Aktivitätswerte in unbefruchteten Eiern.

Peptidase: Versuchszeit 18 Stunden bei 40°. Zusammensetzung des Mediums vor dem Substratzusatz: 10% Meerwasser, 30% Glycerin.

Tierart	Individuum	Anzahl der Eier	beobachtete Aktivität <i>mm</i> ³ n/20 HCl		Mittel	
Urechis caupo	A	4	5'01	4'97	4'98	
			5'05	5'03		
			4'89	4'93		
			4'91	5'05		
	B	4	5'01	5'01		3'85
			3'82	3'88		
			3'86	3'84		
Dendraster excentricus	A	1	2'26	2'34	2'29	
			2'36	2'26		
			2'22	2'20		
			2'30	2'34		
	B	1	1'68	1'76		1'68
				1'60		
Psammechinus miliaris	IV	3	4'31	4'25	4'24	
			4'25	4'11		
	XII	3	2'46	2'50		2'55
				2'70		
Echinarachnius parma	A	1	3'36	3'16	3'22	
			3'04	3'26		
				3'30		
	B	1	4'44	4'40		4'34
			4'96	3'84		
			4'34	4'08		
<i>Katalase</i> : Versuchszeit 90 Minuten bei 0°. Medium vor dem Substratzusatz: Wasser.						
Tierart	Individuum	Anzahl der Eier	H ₂ O ₂ -Spaltung <i>mm</i> ³ n/100 Na ₂ S ₂ O ₃	k × 10 ⁵ für 1 Ei	Mittel	
Psammechinus miliaris	C	4	6'53	43	40	
			5'96	39		
			5'61	37		
			6'07	40		
	D	4	9'00	66		64
			8'87	65		
			9'15	68		
			8'72	63		
			7'94	56		

* Die den Tabellennummern in Klammern beigefügten Zahlen bezeichnen die Originalarbeiten, auf Grund deren die Tabellen zusammengestellt sind.

dabei mit überführt wird, kann im allgemeinen leicht in der Größenordnung von 0.1 mm^3 gehalten werden. — Prinzipiell wichtig ist die Frage nach der quantitativen Vergleichbarkeit der Proben. Wählen wir nämlich unter dem Mikroskop zwei Zellteile aus, die durch Zerschneiden oder mit Hilfe der Zentrifugalkraft gewonnen wurden und einander zur ganzen Zelle ergänzen sollen, so ist die Berechtigung des Mengenvergleichs der Enzyme natürlich davon abhängig, ob die Summe der Teilaktivitäten gleich der Gesamtaktivität der ungestörten Zelle ist. Dieser Vergleich, der uns darüber Auskunft gibt, ob beim Zentrifugieren oder Mikromanipulieren Enzym verloren gegangen ist, hat nur dann einen Sinn, wenn wir damit rechnen können, daß alle Zellen eines Versuches etwa gleiche Enzymmengen enthalten und nur geringe individuelle Abweichungen zeigen. Die Tabellen 1 und 2 geben über diese Verhältnisse Auskunft.

Aus Tabelle 1 geht hervor, wie sehr bei den Eiern die Aktivitäten von Art zu Art und Tier zu Tier variieren. Für die Einzeler ein- und desselben Muttertieres dagegen sind die Variationen viel kleiner und bewegen sich in für unsere Zwecke ausreichend engen Grenzen.

Tabelle 2 (14).

Peptidase: Versuchszeit 24 Stunden bei 40° . Zusammensetzung des Mediums vor Substratzusatz: 0.015 m Phosphatpuffer $p_H=7.4$.

Tierart	Anzahl der Tiere	beobachtete Aktivität $\text{mm}^3 \text{ n}/20 \text{ HCl}$		Mittel
Amoeba proteus	1	1'33	2'79	2'49
		2'13	2'91	
		2'69	3'09	
" "	1	2'31	2'95	2'40
			2'15	
" "	2	3'69	4'31	4'27
		3'87	5'21	

Tabelle 2 zeigt, daß die Einzelaktivitäten von Amöben in viel weiteren Grenzen schwanken, als die von Eiern. Ebenso

¹² T. PHILIPSON, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 20 Nr. 3 (1934); Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 223 (1933) 119.

¹³ H. HOLTER, J. Cell. a. Comp. Physiol. 8 (1936) 179.

¹⁴ H. HOLTER und M. J. KOPAC, ungedruckt, vorgetragen auf dem IV. Internationalen Cytologenkongreß, Kopenhagen, August 1936.

verhält sich das Volumen der Amöben und qualitativ gehen beide Eigenschaften parallel, d. h. die größten Amöben (so weit sich die Größe so veränderlicher Objekte unter dem Mikroskop beurteilen läßt) zeigten auch die höchsten Peptidaseaktivitäten. Quantitativ werden sich diese Verhältnisse erst nach Messung des Volumens der enzymatisch untersuchten Amöben prüfen lassen, was bis jetzt noch nicht geschehen ist. Der vorläufig beschrittene Ausweg war der, nach Möglichkeit gleichgroß erscheinende Amöben auszuwählen und die Versuchsergebnisse der großen Variationsbreite entsprechend vorsichtig zu behandeln.

Die dritte durch Vorversuche zu klärende Frage betrifft die Sicherung des *Kontaktes zwischen Enzym und Substrat*. Bei Untersuchungsobjekten von der Art der hier bearbeiteten hat die Messung der Enzymwirkung im allgemeinen unter Bedingungen zu geschehen, unter denen die Zelle nicht lebensfähig ist. Dies gilt besonders für die osmotischen Beziehungen zwischen Zelle und umgebendem Medium. Wir haben uns daher dafür entschieden, die Zellen zwar während der einleitenden Operationen so schonend wie möglich zu behandeln, bei der eigentlichen Enzymmessung aber auf das „physiologische Milieu“ keine Rücksicht mehr zu nehmen, sondern vor allem auf die quantitative Erfassung der ganzen in der Zelle vorhandenen Enzymmenge zu achten und diese unter für die Enzymwirkung optimalen Bedingungen zu messen. Zeigte es sich z. B., daß die unzerstörte Zellmembran bei der Enzymbestimmung störte, so wurde versucht, sie durch Cytolyse zu sprengen, und dergleichen mehr. Das heißt also, es wurde für jede Tierart durch Vorversuche geprüft, wie das Medium, in das die Zellen bei der Enzymbestimmung überführt wurden, beschaffen sein mußte (p_H , Salzkonzentration, Gehalt an Enzymstabilisatoren usw.), um maximale und reproduzierbare Aktivitätswerte zu gewährleisten, und wie lange die Zellen in diesem Medium zu verweilen hatten, bevor durch Zusatz des Substrates die eigentliche Enzymreaktion eingeleitet wurde. Diese technischen Einzelheiten, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, sind aus den Originalarbeiten zu ersehen (7, 12, 13).

IV. Bestimmung der Verteilung des Zellinhaltes.

Wie schon erwähnt, verhalten sich die verschiedenen Eiarten beim Zentrifugieren nicht gleich. Sowohl die Zahl der durch Vitalfärbung identifizierbaren Schichten, als auch deren Reihenfolge (z. B. kommen bei *Arbacia* Mitochondrien und hyaline Zone

über dem Dotter zu liegen) und Größenverhältnisse sind für die einzelnen Tierarten verschieden. Innerhalb derselben Art wechselt für die Eier verschiedener Muttertiere das Niveau, in dem sich die Eier im Zentrifugalfeld zerteilen.

In dem auf Fig. 1 dargestellten Falle z. B. könnte die Abschnürung sehr wohl auch tiefer im Innern der Dotterschicht (unter Bildung etwa gleichgroßer Eihälften) oder in der hyalinen Schicht (unter Abschnürung eines ganz kleinen Unterteiles) stattgefunden haben.

Wohl aber ist bei den Eiarten, die sich überhaupt glatt und ohne Substanzverlust durch Zentrifugieren teilen lassen, das Teilungsniveau für ein bestimmtes Tier im allgemeinen konstant. Darauf beruht ja eben die Möglichkeit, mehrere Eier gleichzeitig zu zentrifugieren, wobei dann alle Oberteile zu allen Unterteilen „passen“. Ist dies nicht der Fall, so arbeitet man besser mit dem Mikromanipulator und einzelnen Eiern, die man nach dem Stratifizieren in einander ergänzende Teile zerschneidet. Dieses letztere Verfahren ist auch bei Amöben anzuwenden.

Aus dieser Sachlage geht hervor, daß sich, obwohl die einzelnen Objekte jeweils nur in zwei Teile zerlegt werden, durch Verwendung verschiedener Tierarten und Einzeltiere die Verteilung der Cytoplasmabestandteile auf die beiden Zellteile so variieren läßt, daß man hoffen konnte, die Enzymlokalisierung durch vergleichende qualitative Versuche bestimmen zu können, vorausgesetzt, daß es sich, der in der Einteilung erwähnten Hypothese gemäß, bei allen Zellarten um dieselben, morphologisch definierten Enzymträger (z. B. die Mitochondrien) handle. Diese Hoffnung traf aber nicht zu. Es zeigte sich, daß immer beide Zellteile eine gewisse Enzymaktivität besaßen, unabhängig davon, wie die Schichten der Zellbestandteile kombiniert sein mochten. Das Ergebnis dieser vergleichenden Versuche war also nur das negative, daß die Enzymträger, vollständige Entmischung beim Zentrifugieren vorausgesetzt, nicht mit Partikeln identisch sein konnten, die sich nach dem Zentrifugieren ausschließlich in *einem* der beiden Zellteile vorfanden. Solcherart konnten allmählich mit mehr oder weniger großer Wahrscheinlichkeit der Zellkern und alle Granula ausgeschlossen werden und es blieb ein einziger Zellbestandteil als wahrscheinlicher Enzymträger übrig, nämlich die hyaline Grundsubstanz des Cytoplasmas.

Diese Grundsubstanz oder Matrix, wie wir sie der Kürze halber im folgenden nennen wollen, ist der einzige Zellbestandteil, der unter allen Umständen in beiden Zellteilen vorkommt.

Sie findet sich nämlich nicht nur in der körnerfreien Schicht (vgl. Fig. 1), sondern auch in allen anderen Schichten, da sie die Zwischenräume zwischen den Partikeln ausfüllt. Es handelte sich also nun darum, einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Verteilung der Matrix und der Verteilung der Enzymaktivität aufzufinden.

Zu diesem Zwecke mußten die Volumina der verschiedenen Zellbestandteile bestimmt werden. Dies ist zuerst von E. N. HARVEY¹⁵ an den Eiern von *Arbacia* durchgeführt worden und konnte dann auch auf andere Eiarten übertragen werden. Das schließlich angewendete Verfahren ist folgendes: Die zum Enzymversuch bestimmten Eier werden nach dem Zentrifugieren photographiert, wobei man darauf achtet, Bilder aller Stadien II bis IV (Fig. 1) zu bekommen und eventuell die Zentrifugierung entsprechend leitet. Auf den Photographien mißt man die Durchmesser der Eier und Eiteile, sowie die Höhen der einzelnen Schichten. Man wählt hierzu Eier, die der Idealform eines Rotationsellipsoides so nahe wie möglich kommen und berechnet sodann die Volumina des ganzen Eies (oder Eiteiles) und der einzelnen Schichten. Die letzteren müssen für den Packungseffekt korrigiert werden, der für kugelförmige Partikel und dichtest mögliche Packung 74 % beträgt, d. h. 74 % des durch die Schicht gegebenen Ellipsoidsegmentes stellen unter diesen Voraussetzungen das tatsächliche Volumen der Partikel dar, unabhängig von deren Größe.

Ob die Packung vollständig war, wurde geprüft, indem man die Schichtdimensionen verschieden lange zentrifugierter Eier verglich. Sobald nach einer gewissen Zentrifugierungszeit das Volumen der Schichten konstant geworden war, wurde die Packung als vollständig angesehen. Die zweite Voraussetzung, die kugelförmige Gestalt der Partikel, ist experimentell schwer zu prüfen. Dem mikroskopischen Augenschein nach scheinen bei den hier verarbeiteten Eiern keine größeren Abweichungen hiervon vorzukommen. Auch eine eventuelle Deformation der Partikel beim Zentrifugieren ist nicht von vornherein auszuschließen, doch deutet die Leichtigkeit, mit der sich der Zellinhalt nach dem Zentrifugieren wieder vermischt, darauf hin, daß etwa stattfindende Deformationen jedenfalls nicht stark genug sind, um Adhäsionen oder gar Verschmelzungen der Granula herbeizuführen.

Jedenfalls wurde im vorliegenden Falle, im Anschluß an E. N. HARVEY¹⁵, das Partikelvolumen unter der Annahme vollständiger Packung kugelförmiger Teilchen berechnet und das Volumen der Matrix sodann als Differenz zwischen dem Gesamt-

¹⁵ E. N. HARVEY, Biol. Bull. 62 (1932) 141.

volumen der Zellen oder Zellteile und dem Volumen der darin enthaltenen Partikel erhalten. Die betreffenden Werte sind in den Tabellen 3, 5, 6 und 9 zu finden.

Zum Vergleich der Verteilung der Matrix mit der Verteilung der Enzyme wurde das Verhältnis der Matrixvolumina beider Eiteile und das entsprechende Verhältnis der Enzymmengen gebildet. Diese Zahlen sind ebenfalls in den Tabellen angeführt (vorletzte und letzte Kolonne). Außerdem wurde zu Vergleichszwecken auch das Verhältnis der Gesamtvolumina der Eiteile in die Tabellen aufgenommen (drittletzte Kolonne). Die Volumina der einzelnen Granulaarten in den Vergleich einzubeziehen, hätte schon deshalb keinen Sinn, weil die meisten derselben nur in einem Eiteil auftreten.

V. Versuchsergebnisse.

A. Peptidase.

1. *Arbacia punctulata*.

Die Eier dieses Seeigels sind ausgezeichnete Objekte für die in Abschnitt II dargestellte reine Zentrifugierungsmethodik. Die

Tabelle 3⁽¹³⁾.

Arbacia, Peptidase: 10 Eier, 18 Stunden bei 40°.

Fett 1%, Mitochondrien 5%, Dotter 27%, Pigment 6%, Matrix 61%

(E. N. HARVEY¹⁵⁾.

		Aktivität in mm ³ n/20 HCl		Durchmesser in μ Mittel aus 9 Messungen	Volumina O/U	Matrix O/U	Aktivität O/U
		gefunden	Mittel				
Ganze Eier	unbehandelt	4'83 4'81 4'79	4'77	67 (66'5—67'5)			
	zentri- fugiert	4'65 4'77					
Oberteile (O)		3'39 3'37 3'29	3'35	54 (52'5—55)	1'1	3'2	3'4
Unterteile (U)		0'85 1'03 1'05	0'98	52 (50'5—52'5)			
O + U		4'75 4'49	4'62				

Durchschnürung der stratifizierten Eier vollzieht sich fast immer ganz gleichartig bei allen Eiern eines Tieres und liefert meist etwa gleichgroße, kugelige Eiteile. Die respektiven Volumina dieser Teile sind bemerkenswert konstant. Dies entschädigt für die nicht sehr hohe Peptidaseaktivität der Eier, die es erforderlich machte, mit 10 Eiern oder Eiteilen pro Enzymbestimmung zu arbeiten. Ein typischer Versuch ist zusammengefaßt in der Tabelle 3, die wohl keiner weiteren Erläuterung bedarf.

Die Gleichförmigkeit der Durchschnürung bei dieser Eiart hat den einen Nachteil, daß der Matrixquotient der Eiteile im allgemeinen nur dadurch variiert werden kann, daß man die Eier verschiedener Muttertiere verwendet. Für unsere Zwecke wäre es aber gerade wertvoll, eine solche Quotientenverschiebung an unmittelbar vergleichbaren Eiern vornehmen zu können. Es zeigte sich nun, daß in seltenen Fällen aus unbekanntem Ursachen bei

Tabelle 4⁽¹³⁾.*Arbacia*, Peptidase: 10 Eier, 18 Stunden bei 40°.

		Aktivität in mm ³ n/20 HCl		Durchmesser in μ Mittel aus 9 Messungen	Volumina O/U	Matrix O/U	Aktivität O/U
		ge- funden	Mittel				
Ganze Eier	unbe- handelt	6'18 5'96 6'14	5'86 5'98 6'16	6'02	73 (72'5—74)		
	zentrifugiert	5'84 6'08 5'96					
Durch- schnü- rungs- niveau 1	Große O	4'52 4'62 4'58		5'76	60 (58—62)	1'4	4'1
	Kleine U	1'14 1'14 1'26					
Durch- schnü- rungs- niveau 2	Kleine O	3'26 3'28 3'16		5'72	51 (48'5—52'5)	0'6	1'2
	Große U	2'42 2'46 2'54 2'52					

den Eiern eines Muttertieres zwei (und nur zwei) Durchschnittsebenen auftreten. Hierbei werden also vier verschiedene (untereinander jeweils wieder gleich große) Eiteile gebildet, deren Volumina und Aktivitäten sich paarweise zu den für das unbehandelte Ei geltenden Werten summieren.

Man kann die einander ergänzenden Eiteilpaare unter dem Mikroskop nach ihrer Größe unterscheiden und in normaler Weise verarbeiten. Wie Tabelle 4 zeigt, stimmt auch in diesem Falle die Verteilung der Matrix mit der Enzymverteilung überein.

Für Versuche dieser letzteren Art noch besser geeignet sind die Eier des Echinodermen

2. *Echinarachnius parma*.

Diese Eier stratifizieren sich zwar gut, teilen sich aber in der Zentrifuge schwer und ungleichmäßig. Ihre Peptidaseaktivität ist jedoch so groß, daß ein Ei zur Enzymbestimmung genügt und außerdem sind sie ihrer Konsistenz nach zu mikrurgischen Operationen sehr geeignet. Es wurde daher so vorgegangen, daß die Eier in der Zentrifuge stratifiziert und sodann mit dem Mikromanipulator durch einen parallel mit den Schichtungsebenen geführten Schnitt zerteilt wurden. Das Volumenverhältnis der beiden Eiteile konnte also in diesem Falle ganz willkürlich variiert werden. Tabelle 5 faßt die mit den Eiern zweier Individuen angestellten Versuche zusammen und zeigt, daß in allen Fällen (auch bei Variation des Matrixquotienten um eine ganze Zehnerpotenz, vgl. Versuche 6 und 7) die Verteilung der Matrix der Enzymverteilung parallel geht.

3. *Chaetopterus pergamentaceus*.

Die Eier dieses Tieres verhalten sich sehr ähnlich denen von *Arbacia*. Der in Tabelle 6 wiedergegebene Versuch wird hier nur angeführt, weil das Tier zu den Würmern gehört. Die Gleichartigkeit des Versuchsergebnisses deutet also darauf hin, daß die hier studierte Erscheinung nicht auf Echinodermeneier beschränkt ist.

4. *Psammechinus miliaris*.

An den Eiern dieser Seeigel hat PHILIPSON¹² 1933 im Carlsberg-Laboratorium erstmalig die Verteilung der Peptidase auf zentrifugierte Eiteile untersucht, jedoch keine Messungen über die Verteilung der Zellbestandteile angestellt. Die damals aus PHILIPSONS Versuchen gezogenen Schlüsse werden im Abschnitt VI erwähnt werden.

Tabelle 5⁽¹⁵⁾.*Echinarachnius*, Peptidase: 1 Ei, 18 Stunden bei 40°.

Fett 1 %, Dotter 44 %, andere Granula 14 %, Matrix 41 % (D. P. COSTELLO*).

		Aktivität in mm ⁸ n/20 HCl		Volumina O/U	Matrix O/U	Aktivität O/U
		Eiteile	ganzes Ei			
Ganze Eier	Unbehandelt	—	3'36	—	—	—
		—	3'04			
	Zentrifugiert	—	3'16	—	—	—
	—	3'26				
	—	3'30				
1	O	0'76	3'28	1'3	3'6	3'3
	U	2'52				
2	O	1'54	3'14	0'5	1'2	1'0
	U	1'60				
3	O	1'08	3'52	1'0	2'1	2'3
	U	2'44				
Ganze Eier	Unbehandelt	—	4'44	—	—	—
		—	4'96			
		—	4'34			
		—	4'40			
	Zentrifugiert	—	3'84	—	—	—
	—	4'08				
4	O	1'48	4'40	0'8	1'9	2'0
	U	2'92				
5	O	1'16	3'96	1'1	2'4	2'4
	U	2'80				
6	O	0'76	5'02	2'7	4'9	5'6
	U	4'26				
7	O	3'26	4'90	0'37	0'45	0'50
	U	1'64				

* Privatmitteilung.

Hier sei nur angeführt, daß PHILIPSONS Resultate durchaus reproduziert werden konnten, und daß sich bei Bestimmung der Matrixverteilung zeigte, daß auch in diesen Eiern Peptidase- und Matrixverteilung einander folgen¹⁶. Auf

¹⁶ H. HOLTER, ungedruckt, vorgetragen auf dem IV. Internationalen Cytologenkongreß, Kopenhagen, August 1936.

Tabelle 6⁽¹³⁾.

Chaetopterus, Peptidase: 5 Eier, 18 Stunden bei 40°. Fett 6'5%. Dotter und andere Granula 37'5%, Matrix 56%.

		Aktivität in mm ³ n/20 HCl		Durchmesser in μ Mittel aus 9 Messungen	Volumina O/U	Matrix O/U	Aktivität O/U
		gefunden	Mittel				
Ganze Eier	Unbehandelt	3'88	3'84	94'5 (93—96)			
		3'80					
	Zentrifugiert	3'78					
		3'88					
	3'84						
Oberteile (O)		2'82	2'98	80 (78'5—82'5)	1'6	3'0	3'1
		3'04					
		3'18					
		2'86					
Unterteile (U)		1'00	0'96	69'5 (67'5—71)			
		0'96					
		0'84					
		1'04					
O+U		3'94	3'94				

die tabellarische Anführung eines Versuchsbeispielles (die Tabelle würde etwa ebenso aussehen wie Tabelle 3) wird der Raumersparnis wegen verzichtet. Eine Angabe über die Volumenverhältnisse der Zellbestandteile findet sich in Tabelle 9.

5. Die Rolle des Zellkernes.

In den bis jetzt besprochenen Beispielen ist das Volumen des sichtbaren Zellkernes klein im Verhältnis zu den Volumina der anderen Zellbestandteile. Da der Kern nach dem Zentrifugieren nur in einem Eiteil (und zwar immer im leichteren „Oberteil“) enthalten ist, scheidet er ohne weiteres als einziger Träger der Peptidaseaktivität aus. Ob die Anwesenheit des Kernes im unzentrifugierten Ei einen Einfluß auf die Peptidaseaktivität hat, wurde an den Eiern von *Dendraster excentricus* untersucht⁷. Der Kern dieser Eier liegt exzentrisch und konnte durch Zerschneiden der Eier mit dem Mikromanipulator in einer Eihälfte isoliert werden. Aus einem Vergleich der Enzymaktivitäten der beiden Eihälften ließ sich jedoch kein anderer sicherer Schluß ziehen als der, daß der Einfluß des Kernes auf die Peptidasewirkung, wenn überhaupt vorhanden, gering sein müsse.

Man muß nun aber bedenken, daß es sich in allen bis jetzt erwähnten Fällen um Eier gehandelt hat, die die Reifeteilung schon überstanden hatten. Der größte Teil der Substanz des unreifen Kernes ist hierbei in das Cytoplasma übergegangen und der sichtbare Kern ist nur ein Rest des ursprünglich vorhandenen und nicht als typischer Zellkern zu betrachten. Es war also auf Grund dieser Versuche die Möglichkeit durchaus nicht auszuschließen, daß die Peptidaseaktivität der im Cytoplasma verteilten Kernsubstanz zuzuschreiben sei (Literatur über die eventuelle enzymatische Rolle des Zellkerns vgl. z. B. bei SHAPIRO ⁴). Zur Prüfung dieser Frage an einem Objekt mit normalem Nucleus wurde die Peptidaseaktivität von *Amoeba proteus* untersucht ¹⁴. Der Kern dieser Organismen kann mit Hilfe der Glasnadel des Mikromanipulators aus der Zelle entfernt werden. Dies gelingt, wenn vorsichtig durchgeführt, ohne Verlust von Cytoplasma, und die kernlosen Amöben bleiben nach der Operation noch längere Zeit (bis zu 72 Stunden) beweglich.

Tabelle 7 (¹⁴).

Amoeba proteus, Peptidase: 4 Amöben pro Enzymbestimmung, 24 Stunden bei 40°.

Versuchsobjekt	Aktivität in mm ³ n/20 HCl	Mittel
Normale	1'69, 1'72, 3'10, 1'74, 2'18, 2'52	(2'16)
Normale nach 24stünd. Fasten	1'51, 2'17, 2'67, 2'14, 2'30	(2'19)
Kernlose, sogleich	1'85, 2'23, 2'04	(2'04)
Kernlose nach 24 Stunden . .	1'78, 2'26, 1'90, 2'08, 2'26	(2'06)

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, hat die Entfernung des Kernes keinen Einfluß auf die Peptidaseaktivität. Auch ein allmähliches Verarmen an Enzym nach der Operation tritt nicht ein, zumindest nicht innerhalb der ersten 24 Stunden.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß man bei der Beurteilung dieses Versuches nicht vergessen darf, daß die (in Klammern) angeführten Mittelwerte die Mittel aus Einzelaktivitäten sind, welche mehr voneinander abweichen, als die Einzelaktivitäten der Eier. Gänzlich läßt sich ein Einfluß des Kernes auf die Peptidaseaktivität daher auch auf Grund dieses Versuches nicht ausschließen, wohl aber glauben wir sagen zu können, daß von einer ausschließlichen oder auch nur überwiegenden Bindung dieses Enzymes an die Kernsubstanz wohl nicht die Rede sein kann.

Der großen Einzelvariationen wegen verzichten wir auch darauf, ein Zahlenbeispiel für die Verteilung der Peptidaseaktivitäten auf zentrifugierte und dann zerschnittene Amöben anzuführen. Die Form auch der zentrifugierten Amöben ist zu unregelmäßig, um halbwegs verlässliche Volumenbestimmungen auf Grund von Zeichnungen oder Photographien zuzulassen. Direkte Volumenmessungen sind

zwar möglich¹⁷, wurden in Verbindung mit Enzymbestimmungen bis jetzt aber noch nicht vorgenommen.

Doch können wir auf Grund der vorliegenden Versuche immerhin sagen, daß sich die Amöben qualitativ (und soweit aus Schätzungen geschlossen werden kann, auch grob quantitativ) ebenso verhalten wie die Eizellen. Auch hier ist die Annahme einer Peptidase-lokalisierung in der Matrix die allen Versuchsergebnissen am besten gerecht werdende Arbeitshypothese.

6. Eihülle.

Zuletzt möchten wir noch einige Versuche anführen, die mit den Eiern der Echinodermen *Dendraster excentricus* und *Echinarachnius parma* angestellt wurden. Die alle untersuchten Eier umgebende, durchsichtige Geleehülle ist bei diesen beiden Eiarten besonders gut entwickelt und mit einigen Pigmentkörnern versehen. Beim Zentrifugieren geht sie verloren. Von unzentrifugierten Eiern kann sie mit dem Mikromanipulator ohne Schädigung der eigentlichen Eimembran abgelöst werden. Bei den in Abschnitt IV erwähnten Volumenbestimmungen wurde sie nicht berücksichtigt. Es ist daher vielleicht nicht überflüssig, darauf hinzuweisen, daß sie, wie aus Tabelle 8 hervorgeht, peptidasefrei ist.

Tabelle 8 (7, 13).

Dendraster excentricus, Peptidase: 1 Ei, 4 1/2 Stunden bei 40°.

Versuchsobjekt	gefundene Aktivität in mm ³ n/20 HCl			Mittel
Ei + Gelee	1'26	1'26		1'26
Ei ohne Gelee	1'18	1'12		1'18
	1'26	1'16		
Gelee allein	— 0'04	+ 0'06		0'03
	+ 0'08	0'00		
<i>Echinarachnius parma</i> , Peptidase: 1 Ei, 18 Stunden bei 40°.				
Ei + Gelee	4'44	4'96	3'84	4'41
Ei ohne Gelee	4'34	4'40	4'08	4'27
Gelee allein	0'22	— 0'04	0'06	0'08

B. Katalase.

Die Verteilung dieses Enzymes wurde bis jetzt nur an den Eiern einer einzigen Art, *Psammechinus miliaris*, untersucht¹⁸. Das Enzym verhält sich ganz so wie Peptidase, wie aus dem in Tabelle 9 wiedergegebenen typischen Versuch zu ersehen ist. Die Tabelle bedarf keiner weiteren Erläuterung außer dem Hinweis, daß die Enzymmengen hier durch Geschwindigkeitskonstanten ausgedrückt sind.

¹⁷ H. W. CHALKLEY, *Physiol. Zool.* 2 (1929) 535.

VI. Diskussion der Versuchsergebnisse.

Wir wollen hier nicht näher auf die Behandlung der einzelnen möglichen Fehlerquellen eingehen, sondern diesbezüglich auf die schon veröffentlichten ^{7, 12, 13} oder noch zu veröffentlichenden Originalarbeiten verweisen. Hier sei nur summarisch gesagt, daß unserer Meinung nach alle Versuche die Annahme stützen, daß die Enzyme Peptidase und Katalase in der hyalinen Grundsubstanz (Matrix) des Cytoplasmas lokalisiert seien. Dies bedeutet natürlich nicht, daß die Matrix ohne weiteres als *ausschließlicher* Träger der beiden Enzyme zu betrachten sei. Die Fehlerbreite der Versuche, die auf etwa 10—20% veranschlagt werden kann und vorläufig wohl kaum wesentlich zu verbessern sein dürfte, gestattet es nicht, eine derartige Aussage sicher zu machen. Wohl aber gestattet sie es, mit aller Sicherheit die um-

Tabelle 9⁽¹⁶⁾.

Psammechinus, Katalase: 4 Eier, 60 Minuten bei 0°.

Fett + Dotter + Nucleus 55%, Mitochondrien 4%, Matrix 41%.

	Aktivität $k \times 10^6$		Mittel	Volumina O/U	Matrix O/U	Aktivität O/U
	gefunden					
Intakte Eier	44 47	49 56	49			
Oberteile (O)	21 20 18	26 27 19	22	2·9	0·9	1·0
Unterteile (U)	20 25 17	19 23	21			

gekehrte Annahme, daß die beiden Enzyme ganz oder überwiegend granulär gebunden seien, zu verneinen.

Es erhebt sich nun die Frage, ob dieses Ergebnis mit den eingangs erwähnten cytologischen Befunden über die enzymatische Funktion der Granula vereinbart werden kann. Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Erklärung der Unübereinstimmung:

1. Die meisten cytologischen Befunde wurden an Material gewonnen, das in mehreren Beziehungen von dem von uns verarbeiteten abweicht. Es wird natürlich noch vieler Versuche bedürfen, ehe man darüber urteilen kann, ob die hier mitgeteilten Befunde allgemein oder nur für einzelne Zellarten gelten.

2. Die Angaben der Cytologen, um welche Enzyme es sich eigentlich handelt, sind im allgemeinen sehr vage und können aus methodischen Gründen auch kaum anders sein. Es wird meistens einfach von „Enzymen“ gesprochen und nur in wenigen Fällen waren speziellere Angaben über proteolytische Enzyme³, Amylase², oder Atmungsfermente^{4, 18} möglich. Peptidase oder Katalase als solche wurden unseres Wissens nie als granulär gebunden genannt und es ist natürlich durchaus möglich, daß diese beiden Enzyme eine Sonderstellung einnehmen. Bei der Katalase, als deren einzige physiologische Funktion häufig die möglichst schnelle Wegschaffung des als Zwischenprodukt des Stoffwechsels auftretenden und in höheren Konzentrationen toxischen Wasserstoffperoxydes angesehen wird, wäre die Annahme einer solchen auf möglichst diffuser Verteilung und Allgegenwart beruhenden Sonderstellung sogar recht naheliegend. Schwieriger ist es, auf Grund unserer bisherigen Kenntnisse über die Funktion der Peptidase diesem Enzym eine ähnliche Rolle zuzuschreiben, doch kann dies gewiß nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Wir wollen jedenfalls auf Grund der hier mitgeteilten Versuche auf andere Enzyme ebensowenig wie auf andere Tierarten schließen.

3. Eine dritte Möglichkeit, die cytologischen und die histochemischen Befunde unter einen Hut zu bringen, liegt darin, daß man die als Enzymträger angesprochenen Granula nicht als Träger, sondern als Produzenten von Enzym betrachtet. Besonders die Cytologie der Drüsenzellen bietet viele Anhaltspunkte für eine solche Auffassung. Wir können, wie oben angedeutet, auf Grund der hier mitgeteilten Versuche nicht ausschließen, daß Peptidase oder Katalase von, sagen wir, den Mitochondrien in die umgebende Matrix sezerniert werde, vorausgesetzt, daß der Sekretionsvorgang nicht eine Anhäufung von unter unseren Versuchsbedingungen aktivem Enzym in den betreffenden Partikeln mit sich führt. Nur dieser letztere Fall kann ausgeschlossen werden. — Wie man sieht, öffnet sich hier eine Fülle von Problemen (wir weisen nur beispielsweise auf die Rolle eventueller Zymogene sowie auf die mögliche Verbindung mit den Eigenschaften der sogenannten Lyo- und Desmoenzyme hin), auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, die aber hoffentlich weiterer experimenteller Bearbeitung zugänglich sein werden.

¹⁸ A. E. NAVEZ und E. B. HARVEY, Biol. Bull. 69 (1935) 342.

4. Schließlich läge die Möglichkeit vor, daß Granula, welche in der ungestörten Zelle als Enzymträger fungieren, ihren Enzymgehalt beim Zentrifugieren an das umgebende Medium abgeben. Ein solches Verhalten scheint uns unwahrscheinlich angesichts der Tatsache, daß der Effekt des Zentrifugierens, wie in Abschnitt II angeführt, so schnell und spontan wieder aufgehoben wird. Die Dislokation zweier Endoenzyme würde wohl zweifellos als eine so schwere Störung des chemischen Arbeitssystems der Zelle anzusehen sein, daß man sich eine prompte Wiederaufnahme der normalen Zellaktivität nach dem Zentrifugieren schwer vorstellen könnte, zumal diese Enzyme ja, wie die Versuche zeigen, keineswegs sofort wieder an ihre hypothetischen Träger gebunden würden.

Wir glauben also, das in der Einleitung gestellte Problem bis auf weiteres als in dem Sinne gelöst betrachten zu dürfen, daß für die Enzyme Dipeptidase und Katalase und die untersuchten Zellarten eine zumindest ganz überwiegende Lokalisation in der Matrix anzunehmen ist. Hieraus kann noch nicht der Schluß gezogen werden, daß es sich um eine homogene Enzymverteilung nach Art einer kolloidalen Lösung in wäßriger Phase handelt, da wir zu einer solchen Aussage noch zu wenig über die Natur der Matrix wissen. Es gibt Anzeichen dafür, daß auch dieser Zellbestandteil, obwohl im Mikroskop homogen erscheinend, eine gewisse Struktur besitzt. Die Frage des Zusammenhanges einer solchen eventuellen Struktur mit den enzymatischen Funktionen muß künftiger Bearbeitung überlassen werden.

Schließlich möchten wir noch darauf aufmerksam machen, daß wir in einer früheren Arbeit (¹², vgl. auch ¹) selbst auf die Möglichkeit der granulären Enzymbindung und die anscheinende Stützung dieser Annahme durch T. PHILIPSONS Versuche ¹³ hingewiesen haben.

Wir schrieben damals (nach der Besprechung einiger Vitalfärbungsversuche an zentrifugierten Psammechinuseiern): „Obwohl also dieses Verhalten die oben erwähnte Hypothese über die enzymatische Funktion der Mitochondrien zu stützen scheint, möchten wir doch mit aller Deutlichkeit hervorheben, daß die Peptidaseaktivität natürlich auch an alle anderen, bekannten oder unbekanntenen Formelemente der Eizelle geknüpft sein kann, vorausgesetzt, daß sie beim Zentrifugieren das beschriebene Verhalten zeigen. Eine Entscheidung über die enzymatische Rolle der Mitochondrien kann, wenn überhaupt, nur durch quantitative Angaben herbeigeführt werden. Solche Angaben können wir jedoch vorläufig nicht machen.“

Diese, wenn auch mit größten Vorbehalten ausgesprochene, Hypothese einer Bindung der Peptidase an Mitochondrien ist also angesichts der seither angestellten und hier mitgeteilten quantitativen Versuche fallen gelassen worden.

Zusammenfassung.

Die Lokalisation von Peptidase und Katalase in einigen Zellarten wurde durch direkte enzymatische Analyse einzelner Zellteile studiert. In allen untersuchten Fällen wurde gefunden, daß die genannten Enzyme der hyalinen Grundsubstanz des Cytoplasmas folgen und nicht in nachweisbaren Mengen an granuläre Zellbestandteile oder an den Zellkern gebunden sind.