

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie

Band 354 -- 1. Jahreshälfte

Fortgeführt von A. Kossel, F. Knoop und K. Thomas · Herausgegeben von

A. Butenandt, F. Lynen, G. Weitzel

unter Mitwirkung von K. Bernhard, H. Dannenberg, K. Decker, J. Engel,

H. Hanson, E. Helmreich, H. Herken, B. Hess, N. Hilschmann, H. Hiltz, P. Karlson,
H. L. Kornberg, F. Leuthardt, R. Schlögl, J. Seelig, G. Siebert, H. Simon, Hj. Staudinger,

W. Stoffel, H. Tuppy, H. G. Zachau

Redaktion A. Dillmann, G. Peters



1973

WALTER DE GRUYTER · BERLIN · NEW YORK

Autoren-Verzeichnis der ersten Jahreshälfte

- Aboderin, A. 211
 Acker, H. 220
 Ackermann, R. H. 48
 Aldridge, W. N. 4
 Aleksiev, B. 650
 Ali, I. 596
 Alizade, M. A. 163
 Althaus, H. H. 596
 Al-Therib, M. J. 589
 Askar, A. 467
 Augustinsson, K.-B. 1
 Averkamp, K. H. 453

 Back, P. 83
 Backmannson, A. 267, 286
 Bässler, K. H. 48
 Barath, Z. 596
 Barrington-Leigh, J. 235
 Bender, N. 235
 Benecke, B. J. 595
 Benzing, H. 384
 Berghäuser, J. 60
 Berlet, H. H. 231
 Bernhard, F.-H. 217
 Bernhard, K. 255
 Bernhard, S. A. 210
 Bernhard, W. 603
 Betz, H. 567
 Betzing, H. 437
 Beutler, E. 213
 Birnstiel, M. L. 606
 Bishop, J. O. 606
 Bister, K. 169
 Blachnitzky, E.-O. 131
 Blecher, H. 267, 286
 Blossy, H. C. 596
 Blume, K. G. 213
 Böhm, M. 453
 Bohnenkamp, W. 220
 Bonner, F. 211
 Bornhamm, G. W. 604
 Borovanský, J. 203
 Bosch, J. van der 227
 Brade, V. 37
 Brammer, S. 682
 Brandenburg, D. 613
 Braunitzer, G. 687
 Brdiczka, D. 221
 Brehme, H. 234
 Bremser, W. 341
 Bretzel, G. 312, 543
 Bryce, C. F. A. 344
 Buddecke, E. 445
 Burgis, H. 337
 Buscher, H.-P. 217
 Busse, W.-D. 147

 Chambon, P. 595
 Champagne, M. 611
 Chatterjee, S. K. 471, 481
 Claassen, H. 229
 Crichton, R. R. 344
 Cullmann, W. 212

 Daille, J. 600
 Degkwitz, E. 238, 555
 Deselnicu, M. 105
 Dierich, C. 635
 Dietrich, L. S. 608
 Dietz, G. 211
 Dietzel, B. 337
 Dimitrov, G. D. 121
 Dingler-Nünemann, H. 222
 Diringer, H. 577
 Duchoň, J. 203
 Durchschlag, H. 205
 Dutler, H. 209

 Eckstein, F. 221, 233
 Egger, E. 101
 Ehrig, H. 219
 Eisele, K. 321
 Enderle, H. 347
 Eppenberger, H. M. 228
 Erdmann, E. 227

 Farb, D. 2
 Fasold, H. 235
 Feldmann, H. 189
 Ferencz, A. 595
 Figura, K. v. 445
 Filipovic, I. 445
 Flügel, M. 337
 Fournier, A. 600
 Franke, W. W. 605
 Freeman, K. B. 606
 Freimüller, B. 208
 Fritz, H. 550
 Frommer, U. 514
 Fülgraff, G. 222

 Gallenkamp, H. 218, 391
 Gallwitz, D. 592, 612
 Garel, J. P. 600
 Gattner, H.-G. 147
 Gauper, F. 207
 Geiger, R. 156
 Geldmacher-v. Mallinck-
 rodt, M. 337
 Ghraf, R. 214, 299, 306,
 501

 Giebel, W. 673
 Gillmann, U. 206
 Gilmour, R. S. 591
 Gissinger, F. 595
 Gnauck, G. 267
 Goebel, R. 347
 Goedde, H. W. 8
 Goldsmith, L. 2
 Goodwin, G. H. M. 611
 Goody, R. S. 221, 233,
 234
 Gratzl, M. 567
 Greenzaid, P. 2
 Gröschel-Stewart, U. 233
 Gross-Bellard, M. 595
 Gruber, D. 223
 Gründig, C. A. 487
 Grujic-Injac, B. 687
 Grunberg-Manago, M. 597
 Gugenhan-Speiser, E. 222
 Gundermann, K. 238
 Gundlach, G. 7

 Haaß, D. 225
 Haddock, B. A. 223
 Hadorn, M. 209
 Hameister, H. 595
 Hanfland, P. 21
 Hanson, H. 487
 Hartmann, H.-J. 220, 341
 Hartmann, U. 215
 Hartter, P. 365
 Hedenström, M. v. 224
 Heidemann, E. 105
 Heilmeyer, L. M. G., Jr.
 236
 Heimann, G. 562
 Heimbürger, N. 587
 Heinz, F. 208
 Heldt, H. W. 223, 224
 Hellenbroich, B. 562
 Heller, K. 225
 Hemmerich, P. 215
 Hempel, K. 117
 Hess, B. 407, 453
 Hess, E. 233
 Heymann, E. 11
 Hilz, H. 521
 Hochstraßer, K. 587
 Hodara, M. A. 445
 Hörl, W. H. 236
 Höfer, M. 224, 225
 Höpner, T. 216
 Hofer, H. W. 237
 Hoff, H.-G. 214, 306, 501,
 507

 Hopfer, U. 226
 Hoppeler, H. 229
 Horčičko, J. 203
 Hossenlopp, P. 595
 Howald, H. 229
 Hucho, F. 207
 Huth, W. 635

 Imaizumi, T. 607
 Jagow, G. v. 219
 Jeck, R. 60, 212
 Jeckel, D. 209
 Jencks, W. P. 2
 Jennissen, H. P. 236
 Jörnvall, H. 206
 Johns, E. W. 609, 611
 Johnson, M. K. 6
 Jung, G. 341
 Jung, K. 101
 Junger, E. 205

 Kadenbach, B. 218
 Katzendobler, H. 210
 Kazemie, M. 471, 481
 Kedinger, C. 595
 Kenmoku, A. 235
 Kersten, W. 453
 Kim, K. S. 555
 Kind, J. 596
 Kleinschmidt, T. 687
 Klemer, A. 13, 462
 Klinčák, J. 211
 Kling, H. 657
 Knödgen, B. 467, 589
 Kofrányi, E. 527
 Kolb, H. 331
 Kolb, H. J. 331
 Kominz, D. R. 233
 Komor, B. 225
 Heldt, H. W. 223, 224
 Komor, E. 225
 Korschewski, H. 208
 Krahl, B. 267, 286
 Kraska, B. 462
 Kraska, U. 13
 Krause, H. P. 628
 Krebs, W. 221
 Krisch, K. 3
 Kröger, A. 222
 Kubicki, J. 212
 Küntzel, H. 596
 Kuhn, Ch. 521
 Kuhn, H. J. 231
 Kuhnle, E. 267, 286
 Kulbe, K. D. 208
 Kurz, G. 131
 Kuss, E. 347

Autoren-Verzeichnis der ersten Jahreshälfte

- Ladenstein, M. 384
Lampert, F. 603
Lange, H. W. 117
Lange, M. 105
Legler, G. 243
LeKim, D. 437
Lindberg, U. 594
Lindigkeit, R. 607
Linzen, B. 182
Lipp, K. 262
Liss, E. 682
Löffler, G. 230
Loewe, R. 182
Löwer, R. 117
Lotz, W. 243
Lübbbers, D. W. 220
Lüthi, P. 229
Luisi, P. L. 210, 211
Lumper, L. 219
Lynen, R. 37
- MacGillivray, A. J. 591, 610
Mach, B. 601
Mandel, J.-L. 595
Mandelkow, E. 236
Mandelkow, E.-M. 236
Mannherz, H. G. 233, 234, 235
Marcker, K. 597
Markau, K. 207
Markstein, R. 255
Matthaei, H. 471, 481
Mayer, H. 371, 380
Metzner, H. 337
Middelhoff, G. 235
Molitoris, H. P. 219
More, I. A. R. 591
Mrwa, U. 232
Müller, F. 215
Müller, U. 216
Müller-Wecker, H. 527
Murer, H. 226
- Naithani, V. K. 67, 141, 659
Neumann, R. 209
Niessing, J. 608
Nirschl, H. 337
Noll, H. 598
Nordwig, A. 371, 380
- Oehr, P. 223
Oeser, A. 213
- Oeynhaus, V. v. 635
Ohlenbusch, H. D. 212
Oltersdorf, U. 32
Ord, M. G. 612
Ott, M. 341
- Palm, D. 210
Pardon, J. F. 604, 611
Paul, J. 591
Paulsen, G. 232
Pelling, C. 604
Persson, T. 594
Pétényi, M. 337
Pfaender, P. 267, 286, 421
Philipson, L. 594
Pitz, W. 10
Porcellati, G. 90
Procházková, B. 203
- Raible, M. 214, 299, 306
Ranki, M. 597
Rapp, P. 32, 136
Rasched, I. 206, 207
Reichert, R. 587
Reiermann, H.-J. 232
Reimer, F. 230
Reinauer, H. 205
Reinert, H. 255
Reinhammar, B. 219
Remmer, H. 567
Renner, O. 337
Richards, B. M. 604, 611
Riches, P. G. 610
Rickwood, D. 591, 610
Rieker, A. 421
Rosenbaum, G. 235
Ross, K. 83
Rüegg, J. C. 231
Ruf, P. 226
Ruschig, U. 216
- Saechtling, H. 673
Sahm, H. 216
Sander, J. 384
Schättle, E. 211
Schairer, H. U. 223
Schaub, M. C. 235
Schauer, R. 217
Schenck, H. 234
Scherr, D. 53
Scherrer, K. 593, 607
Schlessler, H. 550
Schleuning, W.-D. 550
Schlimme, E. 221
Schmidt, D. 609
- Schmidt, H. 682
Schnarrenberger, C. 213
Schneider, Fr. 628
Schönerstedt, B. 48
Schönharting, M. 421
Schoner, W. 227
Schriefers, H. 214, 299, 306, 501, 507
Schröder, H.-G. 156
Schudt, C. 227
Schult, R. 212
Schulz, V. 321
Schulze, H.-U. 218, 391
Schweiger, A. 609
Schweinsberg, F. 384
Seifart, K. H. 595
Seiler, N. 467, 589
Sekeris, C. E. 608
Seubert, W. 635
Siebert, G. 421, 605, 608
Simon, H. 163
Skoog, K. L. 607
Smith, A. E. 597
Sokolowski, A. 101
Sonnenbichler, J. 604, 610
Spohr, G. 607
Srivastava, S. K. 213
Stachelin, M. 599
Stachelin, Th. 600
Staib, W. 230
Staudinger, Hj. 217, 218, 238, 391
Steiger, G. J. 231
Stein, H. 595
Stock, W. 321
Stocken, L. A. 612
Stoer, S. 650
Stoffel, W. 21, 169, 437, 562
Strohfeldt, P. 230
Strycharz, W. A. 597
Stucki, J. W. 221
Sund, H. 206, 207
Sures, I. 612
- Tanner, W. 225
Tharandt, L. 230
Thienhaus, R. 230
Thomas, C. A., Jr. 591
Tiedemann, H. 592
Tolbert, N. E. 213
Trentham, D. R. 233
Turner, D. C. 228
- Ulbrich, M. 232
- Ullrich, J. 206
Ullrich, V. 514
- Valkova, A. 650
Venker, P. 607
Vennström, B. 594
Vogt, W. 37
Volk, K. 235
- Wagner, F. 216
Wagner, K. 48
Wahl, S. H. 384
Wais, U. 206
Walker, I. O. 611
Wallimann, T. 228
Wassermann, O. 5
Watterson, J. G. 235
Weber, P. 514
Weber, U. 365
Weibel, E. R. 229
Weitzel, G. 321
Wengenmayer, F. 131
Werdan, K. 223, 224
Werner, G. 9
Weser, U. 220, 341
Wiegandt, H. 262
Wieland, O. 230
Wigle, D. 597
Wilczok, T. 606
Willecke, K. 223
Willnow, P. 216
Winkelhahn, J. M. 231
Wintersberger, E. 596
Wittmann, H. G. 597
Wöber, G. 75
Woelk, H. 90
Woenckhaus, C. 53, 60., 211, 212
Wolf, A. 37
Wollmer, A. 613
Wurster, B. 407
- Yoshida, A. 213
Yu, R. S. T. 125
- Zais, U. 230
Zautke, V. 209
Zech, R. 583
Ziegler, A. 5
Zoltobrocki, M. 60
Zürcher, K. 583
Zumpe, P. 212
Zwoycyk, J. 231

Inaktivierung mikrosomaler Proteine durch Lysosomen*

Heinrich Betz,** Manfred Gratzl** und Herbert Remmer**

(Der Schriftleitung zugegangen am 9. November 1972/26. März 1973)

Zusammenfassung: Der Verlust der NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase-Aktivität (EC 1.6.2.3) und der NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase-Aktivität (EC 1.6.99.3) sowie die Abnahme des Gehalts an Cytochrom P-450 und Cytochrom *b*₅ wurden während der Inkubation von Mikrosomen mit Lysosomen bei pH 5 und pH 7 verfolgt. Nur bei pH 5 bewirkten Lysosomen eine beschleunigte Inaktivierung der NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase und des Cytochroms *b*₅. Lysosomen aus Phenobarbital-induzierten Ratten zeigten bei pH 5 eine höhere proteolytische Aktivität

als Lysosomen aus unbehandelten Tieren, wobei jedoch das Inaktivierungsmuster der Oxidoreduktasen und der Cytochrome unverändert blieb. Inkubationen von glatten endoplasmatischen Membranen mit 100000 × *g*-Überstand bei pH 7 ergaben keinen Hinweis für die Beteiligung neutraler cytoplasmatischer Proteasen an der Inaktivierung mikrosomaler Proteine. Die Inaktivierung der beiden Oxidoreduktasen und des Cytochroms *b*₅ durch Lysosomen bei pH 5,0 beruht hauptsächlich auf der Solubilisierung dieser Proteine von der mikrosomalen Membran.

Inactivation of microsomal proteins by lysosomes

Summary: The loss of NADPH-cytochrome *c*-oxidoreductase (EC 1.6.2.3) and NADH-cytochrome *c*-oxidoreductase (EC 1.6.99.3) activities and the decrease in the cytochrome P-450 and cytochrome *b*₅ content were measured during the incubation of microsomes with lysosomes at pH 5 and pH 7. Lysosomes caused an accelerated inactivation of NADH-cytochrome *c*-oxidoreductase and cytochrome *b*₅ at pH 5 only. At this pH lysosomes from phenobarbital-induced rats showed a higher proteolytic activity than lysosomes from

untreated rats, whereas the inactivation pattern of the oxidoreductases and cytochromes was not altered. Incubations of smooth endoplasmic reticulum membranes with 100000 × *g*-supernatant at pH 7 gave no indication for a participation of neutral cytoplasmic proteases in the inactivation of microsomal proteins. Inactivation of the two oxidoreductases and cytochrome *b*₅ by lysosomes at pH 5.0 is mainly due to solubilisation from the microsomal membranes.

* Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen.

** *Anschriften:* Dr. H. Betz, D-78 Freiburg, Biochemisches Institut der Universität, Hermann-Herder-Straße 7. Dr. M. Gratzl, D-665 Homburg/Saar, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität des Saarlandes, Prof. Dr. H. Remmer, D-74 Tübingen, Toxikologisches Institut der Universität.

Enzyme:

Glucose-6-phosphatase, D-Glucose-6-phosphat-Phosphohydrolase (EC 3.1.3.9)

Katalase, Wasserstoffperoxid:Wasserstoffperoxid-Oxidoreduktase (EC 1.11.1.6)

NADH-Dehydrogenase, NADH:(Akzeptor)-Oxidoreduktase (EC 1.6.99.3), in dieser Arbeit NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase genannt

NADPH-Cytochrom-*c*-Reduktase, NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (EC 1.6.2.3, Numerierung nach dem Enzym-Report 1961)

Phosphatase, saure; Orthophosphat-monoester-Phosphohydrolase (EC 3.1.31)

Succinat-Dehydrogenase, Succinat:(Akzeptor)-Oxidoreduktase (EC 1.3.99.1).

Aus Einbauversuchen mit radioaktiven Vorstufen ist bekannt, daß mikrosomale Enzyme unterschiedliche Umsatzgeschwindigkeiten aufweisen. Die vorhandenen Ergebnisse zeigen, daß der Proteinanteil des Cytochroms b_5 eine erheblich längere Halbwertszeit besitzt als das gesamte mikrosomale Protein^[1-3]. Die NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase unterscheidet sich in ihrer Halbwertszeit nicht vom mikrosomalen Protein, das Cytochrom P-450 scheint nach Markierungsversuchen mit δ -Aminolaevulinsäure eine kürzere Halbwertszeit zu besitzen^[4,5].

Ungeklärt ist bisher, wie die spezifische Umsatzregulation einzelner Enzyme innerhalb der Membran des endoplasmatischen Retikulums möglich ist. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir daher, ob die unterschiedlichen Umsatzraten der einzelnen mikrosomalen Proteine durch verschiedene Abbaugeschwindigkeiten im Lysosom, dem Kompartiment, das die wesentliche hydrolytische Kapazität der Leberzelle enthält, erklärbar ist. Hierzu verfolgten wir die Inaktivierung der mikrosomalen Proteine Cytochrom b_5 , Cytochrom P-450, NADH- und NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase durch Lysosomenpräparationen. Dabei gingen wir von der Annahme aus, daß keine weitergehende Proteolyse ohne vorhergehenden Verlust der nativen Enzymstruktur stattfindet (vgl. I. c.^[6]), und daß daher die Verminderung der enzymatischen Aktivität und die Abnahme der spektroskopischen Eigenschaften als Parameter für den Beginn des Enzymabbaus verwendet werden können.

Methoden

Wir verwendeten folgende *Chemikalien*: Triton WR-1339, Phenazinmethosulfat, Leucin, Streptomycinsulfat, Rinderserumalbumin und Penicillin-G-Kalium von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg; Cytochrom *c* aus Pferdeherz, Glucose-6-phosphat, NADH und

NADPH von Boehringer Mannheim GmbH; Labtrol der DADE Division, Miami/USA; Phenobarbital-Natrium, Natrium- β -glycerophosphat und alle anderen Chemikalien waren Produkte der Merck AG., Darmstadt.

Unsere *Versuchstiere* waren 160–180 g schwere weibliche, mit Altromin-M-6-Mischfutter ernährte Wistar-Ratten, die jeweils 12 h vor dem Tode kein Futter mehr erhielten.

Als *Ultrazentrifuge* diente eine Beckman Spinco L 50 Zentrifuge. *Enzymatische Bestimmungen* und *Differenzspektren* wurden im Leitz Unicam SP 800 Differenzspektrophotometer mit Zusatzschreiber Servogor durchgeführt.

Mikrosomen isolierten wir nach Schenkman et al.^[7] durch Differentialzentrifugation. Die jeweils 10minütige Zentrifugation des Leberhomogenates mit $500 \times g$ und $12500 \times g$ lieferte uns einen postmitochondrialen Überstand, aus welchem wir durch 1stdg. Zentrifugation mit $100000 \times g$ unsere Mikrosomenfraktion erhielten. Diese wurde einmal gewaschen und innerhalb von 6 h verwendet.

Die *Trennung glatter und rauher Mikrosomenfraktionen* erfolgte nach Fouts^[8] aus dem postmitochondrialen Überstand. Davon wurden drei Teile mit einem Teil 1,13M Saccharoselösung unterschichtet und 8 h bei $105000 \times g$ zentrifugiert. Danach bildeten die rauhen Mikrosomen einen Bodensatz, während sich die glatte Mikrosomenfraktion in der darüberstehenden Saccharoselösung ansammelte. Die Schichten im Zentrifugenrohr wurden getrennt abgepumpt. Die obere Phase war unsere Quelle an neutralen Proteasen, die untere Phase mit den glatten Mikrosomen wurde mit 0,25M Tris/HCl-Puffer, pH 7,0, auf das 4fache verdünnt und 1 h bei $150000 \times g$ zentrifugiert.

Lysosomen isolierten wir aus Tieren, die mit Triton WR-1339 vorbehandelt waren (85 mg pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal 3,5 Tage vor dem Tode, vgl. I. c.^[9]). Aus dem Leberhomogenat stellten wir eine M+L-Fraktion her – sie enthält neben Mitochondrien, Mikrosomen und Peroxisomen den Großteil der Lysosomenfraktion – und florierten diese nach der Methode von Trouet^[10], wie bei Leighton et al.^[9] beschrieben. Dazu wurde die M+L-Fraktion in 45proz. Saccharoselösung unter einen diskontinuierlichen Gradienten aus 34,5proz. Saccharoselösung und 14,3proz. Saccharoselösung geschichtet. Nach 2stdg. Zentrifugation bei 35000 U./min im SW-25-Rotor hatten sich die Lyso-

¹ Omura T., Siekevitz, P. & Palade, G. E. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 2389–2396.

² Schimke, R. T., Ganschow, R., Doyle, D. & Arias, I. M. (1968) *Fed. Proc.* **27**, 1223–1230.

³ Betz, H. (1969) Biochem. Diplomarbeit Univ. Tübingen.

⁴ Greim, H., Schenkman, J. B., Klotzbücher, M. & Remmer, H. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 20–25.

⁵ Gratzl, M. (1969) Biochem. Diplomarbeit Univ. Tübingen.

⁶ Coffey, J. W., Duve, C. de (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 3255–3263.

⁷ Schenkman, J. B., Remmer, H. & Estabrook, R. W. (1967) *Mol. Pharmacol.* **3**, 113–123.

⁸ Fouts, J. R. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**, 373–378.

⁹ Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, S. & Duve, C. de (1968) *J. Cell. Biol.* **37**, 482–512.

¹⁰ Trouet, A. (1964) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **72**, 698–699.

somen an der Grenze zwischen den beiden oberen Schichten angesammelt, während Mitochondrien und Peroxisomen in der unteren Phase verblieben. Die isolierten Lysosomenfraktionen wurden vereinigt, mit 0,25M Saccharose auf die Hälfte verdünnt und 20 min bei 100000 × g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,1M Citratpuffer, pH 6,0, resuspendiert und tiefgefroren aufbewahrt. Vor der Inkubation schlossen wir die Lysosomen durch 5maliges Einfrieren und Auftauen auf.

„Phenobarbital-Lysosomen“ erhielten wir, indem wir den Tieren zusätzlich 48 h vor dem Tode 80 mg Phenobarbital pro kg Körpergewicht intraperitoneal injizierten. Die Tiere bekamen ab diesem Zeitpunkt keine Nahrung mehr, jedoch im Trinkwasser 1% Phenobarbital ad libitum¹¹.

Folgende Enzymaktivitäten wurden bestimmt:

Succinat-Dehydrogenase: Dieses mitochondriale Leitenzym bestimmten wir mit Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor in Anwesenheit von Phenazinmethosulfat nach Arrigoni et al.^{11,21}.

Glucose-6-phosphatase: Zur Abschätzung des mikrosomalen Anteils in unseren Fraktionen maßen wir die Phosphatfreisetzung aus Glucose-6-phosphat nach Leighton et al.¹⁹. Die so gemessenen Glucose-6-phosphatase-Aktivitäten setzen sich aus der spezifischen Wirkung der Glucose-6-phosphatase und der unspezifischen der sauren Phosphatase auf die Hydrolyse des Glucose-6-phosphates zusammen. Dadurch erhält man in lysosomenreichen, d. h. an saurer Phosphatase reichen Präparationen zu hohe Werte für die Glucose-6-phosphatase-Aktivität¹⁹.

Saure Phosphatase: Das aus Natrium-β-glycerophosphat freigesetzte anorganische Phosphat ergab die Aktivität dieses lysosomalen Leitenzyms nach Leighton et al.¹⁹.

Katalase: Die Verteilung der Peroxisomen zeigte uns die H₂O₂-Zersetzung durch dieses Enzym, gemessen nach Bergmeyer¹³.

Cytochrom b₅ bestimmten wir spektroskopisch durch die Differenzspektren zwischen NADH-reduzierten und luftoxidierten Proben¹⁴, **Cytochrom P-450** spektroskopisch durch das Differenzspektrum zwischen CO-gesättigter, Dithionit-reduzierter Probe und nur Dithionit-reduzierter Probe¹⁵.

Die Aktivität der **NADPH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase** maßen wir kinetisch durch Reduktion von Cytochrom *c*

bei 550 nm im Testansatz nach Williams et al.¹⁶, **NADH-Cytochrom-c-Reduktase** ebenfalls im Testansatz nach Strittmatter et al.¹⁷. Die millimolare Extinctionsdifferenz [cm⁻¹ × mm⁻¹] zwischen reduziertem und oxidiertem Cytochrom *c* bei 550 nm beträgt 21,1 vgl. l. c.¹⁸. Die spezifischen Enzymeinheiten wurden in U (μMol umgesetzt Substrat/min) pro mg Protein angegeben.

Anorganisches **Phosphat** maßen wir nach Fiske und Subbarow in der Modifikation von Leloir und Cardini¹⁹. **Protein** wurde nach Lowry et al.²⁰ mit Labtrol als Standard bestimmt, freigesetzte **Aminosäuren** mit Ninhydrin im Trichloressigsäure-Überstand (5proz. an Trichloressigsäure) anhand einer Eichkurve mit Leucin²¹.

Inaktivierungsansätze¹⁶

Unsere Inaktivierungsansätze enthielten in einem Volumen von 3 ml 15 mg mikrosomales Protein und 1,5 mg lysosomales Protein („lysosomale Inaktivierung“), die Kontrollansätze nur 15 mg mikrosomales Protein („Autinaktivierung“ der mikrosomalen Proteine durch die in der Fraktion vorhandenen lysosomalen Enzyme). Bei Inkubation von gereinigten mikrosomalen Proteinen wurde in allen Ansätzen eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml durch Zugabe von Rinderserumalbumin hergestellt. Alle Inkubationen erfolgten bei 37°C unter Stickstoff zur Verhinderung der Lipidperoxidation bei fortwährendem leichtem Schütteln. Nach jeder Entnahme wurde die Stickstoffphase erneuert. Bakterienwachstum hemmten wir durch Zugabe von Streptomycin und Penicillin in einer Konzentration von jeweils 100 μg pro ml Ansatz. Als Inkubationspuffer verwendeten wir bei pH 5,0 0,15M Citratpuffer, bei pH 7,0 0,25M Tris/HCl-Puffer. Zu gegebenen Zeiten wurden Proben von 0,5 ml entnommen und durch Zugabe von 2 ml eiskaltem 0,25M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, gestoppt. Bei Bedarf wurden weitere Verdünnungen in demselben Puffer angefertigt. Die Messung der Proben erfolgte sofort anschließend.

Solubilisierungsversuche¹⁸

Inkubationsansätze wie oben wurden nach 40minütiger Inkubation bei pH 5,0 durch dreifache Verdünnung in eiskaltem 0,25M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, gestoppt und nach vorsichtiger Stickstoffsättigung der Suspensionen

¹⁶ Williams, C. H. & Kamin, H. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 587–595.

¹⁷ Strittmatter, P. & Velick, S. F. (1956) *J. Biol. Chem.* **221**, 277–294.

¹⁸ Takesue, S. & Omura, T. (1970) *J. Biochem.* **67**, 259–266.

¹⁹ Leloir, L. F. & Cardini, C. E. (1957) *Methods Enzymol.* **3**, 840–850.

²⁰ Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.

²¹ Spies, J. R. (1957) *Methods Enzymol.* **3**, 467–477.

¹¹ Hornef, W. (1970) *Arch. Pharmakol.* **266**, 361–362.

¹² Arrigoni, V. & Singer, T. P. (1962) *Nature (London)* **193**, 1256–1258.

¹³ Bergmeyer, H. U. (1955) *Biochem. Z.* **327**, 255–258.

¹⁴ Mayer, G., Ullrich, V. & Staudinger, H. (1968) *diese Z.* **349**, 459–464.

¹⁵ Omura, T. & Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 2370–2385.

1 h bei 150000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für die Bestimmung der Enzymaktivitäten und Differenzspektren verwendet, das Sediment in einem definierten Volumen 0,25M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, resuspendiert.

Cytochrom b₅ und *NADPH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase* reinigten wir nach Omura et al.^[22]. Dabei wurden diese beiden Proteine mit Trypsin von den Mikrosomen abgelöst. Wir führten die Reinigung bis zur Chromatographie an Sephadex G-100 durch (Stufe 3) und erreichten dabei bei *Cytochrom b₅* eine 15,5fache Anreicherung und bei der *NADPH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase* eine 20,1fache Anreicherung gegenüber den Mikrosomen.

NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase erhielten wir nach Takesue et al.^[18]. Hierbei wurden Mikrosomen mit Lysosomen desselben Gewebes inkubiert und so von den Mikrosomen solubilisiert. Nach einer Fraktionierung des rohen Enzymextraktes mit Ammoniumsulfat folgte eine Chromatographie an Sephadex G-100 (Stufe 4). Die Anreicherung gegenüber den Lebermikrosomen war 142fach.

Ergebnisse

1. Eigenschaften der verwendeten Zellfraktionen

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, konnten wir bei der Isolierung der Lysosomen die relative spezifische Aktivität des lysosomalen Leitenzyms saure Phos-

Tab. 1. Verteilung der Leitenzyme und des Proteins in der aus Leberhomogenat isolierten Lysosomenfraktion. Angabe der in der Lysosomenfraktion enthaltenen enzymatischen Aktivität und des Proteins in % des Gehaltes im Leberhomogenat (= 100%) sowie die daraus errechnete relative spezifische Aktivität (RSA). Ausgangswerte im Homogenat (≅ 100%): 0,034 U saure Phosphatase, 0,10 U Glucose-6-Phosphatase, 300 U Katalase, 0,77 U Succinat-Dehydrogenase bei einem Proteingehalt von 20,3 mg/ml.

$$RSA = \frac{\% \text{ enzymatische Aktivität in der Fraktion}}{\% \text{ Protein in der Fraktion}}$$

	Ausbeute in % des Leberhomogenates	RSA
Protein	0,2	1,0
Saure Phosphatase	11,0	55,0
Glucose-6-phosphatase	0,6	3,0
Katalase	0,07	0,35
Succinat-Dehydrogenase	0,02	0,10

²² Omura, T. & Takesue, S. (1970) *J. Biochem.* 67, 249–257.

phatase auf das 55fache anreichern. Die relativen spezifischen Aktivitäten der mikrosomalen Glucose-6-phosphatase, der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase und der peroxisomalen Katalase zeigen, daß unsere Präparation zwar relativ frei von Mitochondrien und Peroxisomen ist, jedoch noch einen hohen Anteil mikrosomaler Verunreinigung aufweist. Dabei ist, wie bereits erwähnt, zu berücksichtigen, daß der Mikrosomengehalt unserer Lysosomenfraktion in Wirklichkeit niedriger zu veranschlagen ist, da die Hydrolyse des Glucose-6-phosphats zu einem erheblichen Teil von saurer Phosphatase katalysiert wird (vgl. I.c.^[6, 9]). Unsere Werte sind mit den in der Literatur angegebenen vergleichbar, wenn auch die Werte von Leighton et al.^[9] nicht ganz erreicht werden konnten. Elektronenmikroskopisch zeigten Schnitte durch die Triton-gefüllten Lysosomen geschwollene Vesikeln, an deren Innenwand Überbleibsel der Matrix hafteten. Außerdem waren viele kleine Vesikeln und Membranbruchstücke erkennbar.* Das Bild entsprach damit dem von Leighton et al.^[9] veröffentlichten.

Der Cytochrom-Gehalt und die Oxidoreduktaseaktivität der eingesetzten Mikrosomenfraktion entsprachen mit 0,63 nMol Cytochrom P-450/mg Protein, 0,56 nMol Cytochrom *b₅* /mg Protein, 0,57 U NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase /mg Protein und 0,02 U NADPH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase /mg Protein den Literaturwerten^[18,23].

2. Inaktivierungsversuche

Die Inaktivierung membrangebundener mikrosomaler Proteine durch Lysosomenfraktionen aus Triton-WR-1339-vorbehandelten Ratten bei pH 5,0 und pH 7,0 ist in Abb. 1a–e dargestellt. In den Mikrosomen sank die Aktivität der NADH-Cytochrom-c-Oxidoreduktase nach 2stdg. Inkubation bei pH 5,0 auf 22% der ursprünglich vorhandenen ab. Der Zusatz von Lysosomen führte unter diesen Bedingungen zu einer starken Beschleunigung der Inaktivierung: bereits nach 70 min war die Ausgangsaktivität auf etwa 1/2% abgefallen. Die „Autinaktivierung“ dieses Enzyms in Mikrosomen war bei pH 7,0 bei weitem nicht so stark wie bei pH 5,0. Nach 2 h waren noch 75% der

* Wir danken Herrn Prof. Schlote (Pathologisches Institut der Universität Tübingen) für die Anfertigung und Beurteilung der elektronenoptischen Bilder.

²³ Schenkman, J. B., Greim, H., Zange, M. & Remmer, H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 171, 23–31.

Ausgangsaktivität vorhanden. Bei pH 7,0 steigerten Lysosomen die Inaktivierungsgeschwindigkeit auf über das Doppelte.

Die „Autinaktivierung“ der NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase bei pH 7,0 erfolgte erheblich rascher als die des NADH-Enzyms; nach 2 h waren nur noch 26% der Ausgangsaktivität vorhanden. Bei Lysosomenzusatz konnten wir nach 2 h nur noch 11% nachweisen. pH 5,0 beschleunigte die Inaktivierung auch ohne Lysosomen so beträchtlich, daß innerhalb von 2 h die Ausgangsaktivität auf 1,4% absank. Das Differenzspektrum des Cytochroms *b*₅ änderte sich bei pH 7,0 über 2 h nicht, und zwar weder im Kontrollansatz noch im Ansatz mit Lysosomen. Bei pH 5,0 fanden wir mit Cytochrom *b*₅ ähnliche Verhältnisse wie bei der NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase; auch in diesem Falle war die „Autinaktivierung“ bereits erheblich (40% der Ausgangsaktivität nach 2 h). Lysosomen beschleunigten die Inaktivierung in hohem Maße, so daß nach 90 min nur noch 5% der Ausgangsaktivität nachweisbar waren.

Cytochrom P-450 zeigte eine hohe Stabilität auch bei pH 5,0 (75% der Ausgangsaktivität nach 2 h). Ein Zusatz von Lysosomen brachte hier keine weitere Abnahme im Differenzspektrum. Bei pH 7,0 konnten wir während 2stdg. Inkubation mit und ohne Lysosomen keinerlei Verluste feststellen.

Die Inkubation von Mikrosomen mit Lysosomen, isoliert aus der Leber Phenobarbital-vorbehandelter Tiere, lieferte bei pH 5,0 innerhalb der experimentellen Fehlerbreite dieselben Inaktivierungskurven für die vier untersuchten mikrosomalen Membranproteine wie die vorstehend beschriebenen Versuche mit Lysosomen von unbehandelten Tieren. Die Induktion der lysosomalen Proteaseaktivität durch Phenobarbital (vgl. l.c.^[11]) bewirkte also keine Änderung im Inaktivierungsmuster der Mikrosomenproteine.

Um festzustellen, ob lösliche neutrale Proteasen an der Inaktivierung membrangebundener mikrosomaler Proteine beteiligt sind, führten wir Inaktivierungsversuche mit 100000xg-Überstand als Enzymquelle bei pH 7,0 durch. Zum weiteren Ausschluß lysosomaler Verunreinigungen unserer Mikrosomenfraktionen isolierten wir für diese Versuche glatte mikrosomale Membranen. Der 100000xg-Überstand wurde im gleichen Verhältnis wie im Homogenat den Membranen zugesetzt (die Kontrollansätze enthielten in einem Volumen von 3 ml/4,2 mg Protein glatter Mikrosomen und die Versuchsansätze zusätzlich 5,4 mg lösliches Pro-

tein des 100000xg-Überstandes). Dabei konnten wir weder bei Inkubation glatter mikrosomaler Membranen allein (Kontrollansätze) noch bei Inkubation der glatten Membranen mit 100000xg-Überstand (Versuchsansätze) signifikante Veränderungen gegenüber dem Inaktivierungsmuster der gesamten mikrosomalen Fraktion bei pH 7,0 feststellen. Somit erscheint eine Beteiligung cytoplasmatischer Enzyme an der Inaktivierung mikrosomaler Membranproteine unwahrscheinlich.

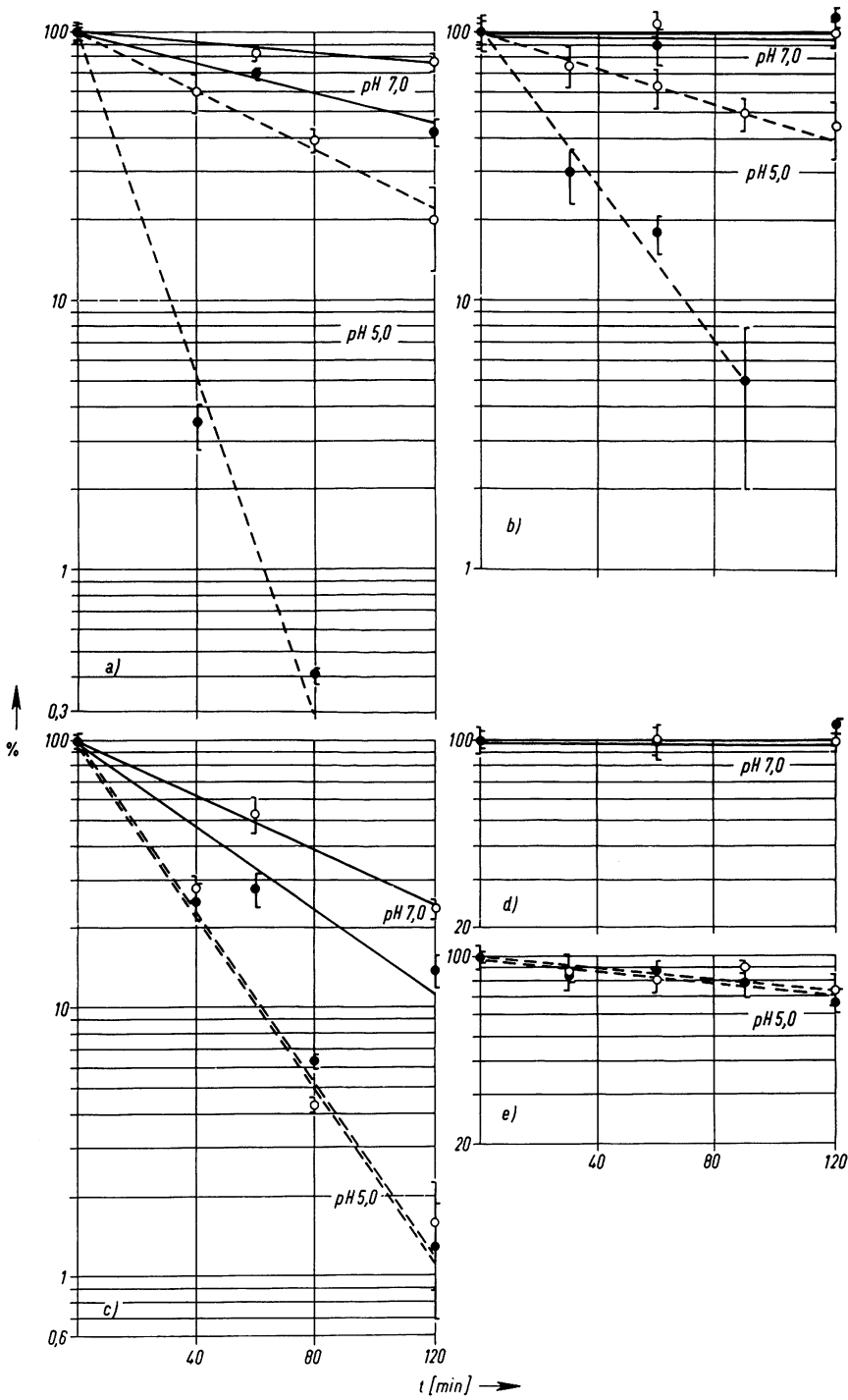
3. Aminosäurefreisetzung in den Inkubationsansätzen

Zur Verfolgung der Proteolyse wurden die freigesetzten Aminosäuren mit Ninhydrin bestimmt. Bei pH 7,0 wurde die Aminosäurefreisetzung aus Mikrosomen durch Lysosomenzusatz nur wenig gesteigert. Die Autolyse der Mikrosomenfraktion war gering (Abb. 2b).

Bei pH 5,0 war die mikrosomale Autolyse kaum stärker (Abb. 2a), der Zusatz von Lysosomen bewirkte unter diesen Bedingungen jedoch eine erhebliche Proteolyse. Diese wurde mit Lysosomen aus Tieren, die mit Phenobarbital vorbehandelt wurden und kein Futter erhalten hatten, um weitere 50% gesteigert. 100000xg-Überstand erhöhte die geringe Autolyse glatter mikrosomaler Membranen bei pH 7,0 nicht (Abb. 2c); der hohe Ausgangswert ist durch den endogenen Aminosäuregehalt des 100000xg-Überstandes bedingt.

4. Solubilisierung membrangebundener mikrosomaler Proteine durch Lysosomen bei pH 5,0

Nach 40minütiger Inkubation von Mikrosomen bei pH 5,0 konnten wir keines der untersuchten Membranproteine im Überstand finden. Bei Zusatz von Lysosomen war von allen Proteinen außer Cytochrom P-450 ein gewisser Teil im Überstand gelöst, nämlich 40% der noch vorhandenen NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktaseaktivität, 1,5% der NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktaseaktivität und 10% des Cytochroms *b*₅. Nach Takesue und Omura^[18] wird bei pH 5,7 die NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase bei einer allerdings weit höheren Lysosomenkonzentration nahezu vollständig solubilisiert, doch fällt unterhalb pH 5,7 die Aktivität dieses Enzyms infolge Inaktivierung sehr rasch ab. Es ist anzunehmen, daß auch unter unseren Versuchsbedingungen eine hohe Solubilisierung dieser Oxidoreduktase stattfand. Das gelöste Enzym wurde jedoch sehr schnell inaktiviert (siehe unten). Trotz veränderter Ver-



suchsbedingungen lagen die Solubilisierungsgeschwindigkeiten des Cytochroms *b*₅ und der NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase in l.c.^[18] in derselben Größenordnung wie die von uns bestimmten.

5. Inaktivierung der von der Mikrosomenmembran abgelösten Proteine bei pH 7,0 und pH 5,0 (Tab. 2)

Bei pH 7,0 sind das Cytochrom *b*₅ und die NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase in gelöster Form instabiler als in membrangebundener Form. Die gereinigte NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase zeigt bei pH 7,0 den gleichen Aktivitätsverlust wie in membrangebundener Form. Bei pH 5,0 werden die freie NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase und das Cytochrom *b*₅ ebenso schnell inaktiviert wie die membrangebundenen Proteine bei Zusatz von Lysosomen. Gereinigte NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase verliert bei pH 5,0 wesentlich rascher ihre Aktivität wie bei pH 7,0.

Diskussion

Die sehr unterschiedliche Halbwertszeit mikrosomaler Proteine spricht eindeutig dafür, daß mikrosomale Membranen nicht in toto von Lysosomen abgebaut werden, sondern daß sich die endoplasmatischen Membranen in einem dynamischen Zustand befinden, in dem die verschiedenen Proteine

offensichtlich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden. Die Inaktivierungsraten mikrosomaler Proteine durch Lysosomenpräpara-

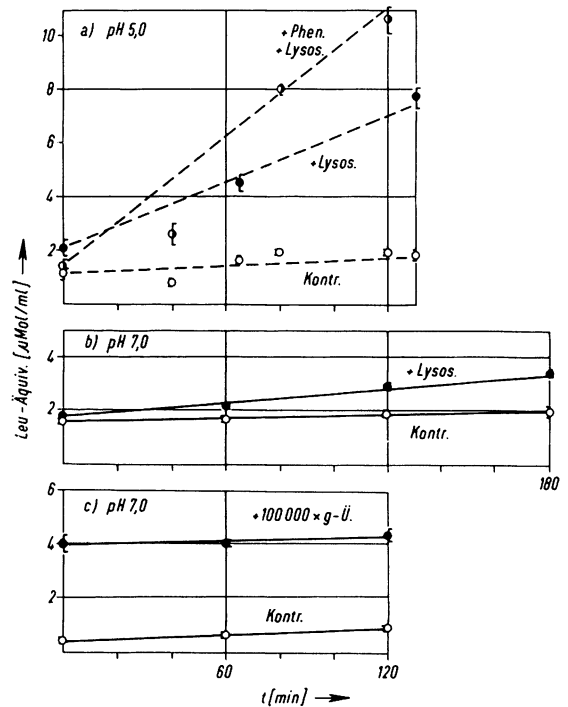


Abb. 2. Freisetzung von Aminosäuren (gemessen als Leucin-Äquivalente).

Abszissen: Zeit in Minuten; Ordinaten: µMol Leucin-äquivalente/ml (d. h. die Ninhydrinwerte wurden mittels einer Leucin-Eichkurve ausgewertet, vgl. Methoden); dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus vier Inaktivierungsansätzen und deren Standardabweichungen (senkrechte Balken).

a) Inkubation bei pH 5,0. ●---●: Ansätze mit 5 mg mikrosomalem und 0,5 mg lysosomalem Protein (jeweils /ml); ○---○: Ansätze mit 5 mg mikrosomalem und 0,5 mg lysosomalem Protein (jeweils /ml) aus Phenobarbital-vorbehandelten Tieren; ○---○: Kontrollansätze mit 5 mg mikrosomalem Protein/ml.

b) Inkubation bei pH 7,0. ●—●: Ansätze mit 5 mg mikrosomalem und 0,5 mg lysosomalem Protein (jeweils /ml); ○—○: Kontrollansätze mit 5 mg mikrosomalem Protein/ml.

c) Inkubation bei pH 7,0. ●—●: Ansätze mit glatten Mikrosomen (1,4 mg Protein/ml) und 100000x-g-Überstand (1,8 mg Protein/ml); ○—○: Kontrollansätze mit glatten Mikrosomen (1,4 mg Protein/ml).

Abb. 1. Inaktivierung mikrosomaler Enzyme NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (a), Cytochrom *b*₅ (b), NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (c) und Cytochrom P-450 (d und e) bei pH 5,0 und pH 7,0.

Abszissen: Zeit in min; Ordinaten: % der noch vorhandenen Aktivität; ●---●: Ansätze mit 5 mg mikrosomalem und 0,5 mg lysosomalem Protein (jeweils/ml) bei pH 5,0; ○---○: Kontrollansätze mit 5 mg mikrosomalem Protein/ml bei pH 5,0; ●—●: Ansätze mit 5 mg mikrosomalem und 0,5 mg lysosomalem Protein (jeweils /ml) bei pH 7,0; ○—○: Kontrollansätze mit 5 mg mikrosomalem Protein/ml bei pH 7,0. Die Punkte entsprechen Mittelwerten aus fünf Inaktivierungsansätzen. Die Standardabweichung ist durch die senkrechten Balken dargestellt.

Tab. 2. Aktivitätsverlust gereinigter mikrosomaler Proteine bei pH 5,0 und pH 7,0 (Temperatur = 37°C).

Bei der Inkubation gereinigter mikrosomaler Proteine wurde in allen Ansätzen eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml durch Zugabe von Rinderserumalbumin hergestellt. Die Bedingungen entsprachen denen bei der Inkubation ganzer mikrosomaler Membranen (siehe Methoden und Abb. 1). Angegeben sind die zum jeweiligen Zeitpunkt noch nachweisbaren enzymatischen bzw. spektroskopischen Aktivitäten in Prozent.

Zeit [min]	Aktivität [%]							
	0		20		40		80	
pH	5,0	7,0	5,0	7,0	5,0	7,0	5,0	7,0
NADH-Cytochrom- <i>c</i> -Oxidoreduktase	100	100	10	42	4	21	0,0	10
NADPH-Cytochrom- <i>c</i> -Oxidoreduktase	100	100	10	80	2	61	0,1	33
Cytochrom <i>b</i> ₅	100	100	46	92	33	87	14	76

tionen bei pH 5,0 und die zugehörigen Halbwertszeiten dieser Proteine zeigten keine Korrelation: Cytochrom P-450 war unter allen Inkubationsbedingungen das stabilste der untersuchten Proteine. Als Parameter für die Erhaltung der nativen Struktur dieses Proteins benutzten wir die Fähigkeit dieses Cytochroms, im reduzierten Zustand mit CO eine Soret-Bande bei 450 nm zu bilden. Änderungen der Membranstruktur wie Detergentienbehandlung usw.^[15] verschieben diese Soret-Bande nach 420 nm, was auch in unseren Inkubationsansätzen durch einen Abfall des 450-nm-Gipfels zu beobachten war. Lysosomale Enzyme konnten das native Membranprotein auch bei pH 5,0 nicht weitergehend angreifen, obwohl Einbauversuche und Induktionsexperimente für eine kurze Halbwertszeit von 1 bis 2 Tagen sprechen^[4,24]. Im Gegensatz hierzu wurde mikrosomales Cytochrom *b*₅, welches nach Einbauversuchen mit radioaktiven Aminosäuren^[1-3] eine lange Halbwertszeit von etwa 5 Tagen besitzt, ebenso wie die funktionell zugehörige NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase sehr rasch durch Lysosomen bei pH 5,0 inaktiviert. NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase zeigt in Einbauversuchen mit radioaktiven Aminosäuren eine durchschnittliche Halbwertszeit von nicht ganz 3 Tagen^[1-3]. Dieses Enzym wurde bei pH 5,0 auch ohne Lysosomenzusatz ausgesprochen rasch inaktiviert, so daß möglicherweise vorhandene spezifische Inaktivierungsmechanismen nicht erfaßt werden konnten. Wahrscheinlich sitzt die NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase so oberflächlich an der Membran des endoplasmatischen

Retikulums – wofür auch die besonders leichte Ablösbarkeit dieses Enzyms durch Detergentien und Proteasen spricht^[5,15], daß sie selbst in membrangebundener Form in saurem Medium sehr rasch ihre native Konformation verliert. Bei pH 7,0 konnten wir nur eine geringe Beschleunigung der Inaktivierung der beiden Cytochrom-*c*-Reduktasen und eine relativ schwache Proteolyse der mikrosomalen Membranen durch Lysosomenenzyme erreichen. Bei saurer, vollständiger Hydrolyse werden nach Fowler und De Duve^[25] 11,8 Leucinäquivalente pro mg mikrosomales Protein freigesetzt. Unter unseren Versuchsbedingungen setzten Lysosomen bei pH 5,0 etwa 1 Äquiv. Leucin, bei pH 7,0 0,2 mÄquiv. aus 1 mg mikrosomalem Protein innerhalb von 2 h frei. Daraus läßt sich abschätzen, daß Lysosomen bei pH 5,0 zur Totalhydrolyse etwa 1 Tag, bei pH 7,0 rund 5 Tage benötigen würden. Dabei ist nicht berücksichtigt, daß die Lysosomenkonzentration im Verhältnis zum mikrosomalen Protein in unseren Inkubationsansätzen 6- bis 10 mal höher liegt als in vivo, und daß die Geschwindigkeit der Aminosäurefreisetzung bereits nach wenigen Stunden stark absinkt, da die Zahl der schwer- bzw. nicht-hydrolysierbaren Peptidbindungen zunimmt^[25]. Bei einer mittleren Halbwertszeit des mikrosomalen Proteins von etwa 3 Tagen erscheint daher ein effizienter Proteinabbau nur in saurem intralysosomalem Milieu gewährleistet, wie auch von anderen Arbeitsgruppen angenommen wird^[6,26]. Mög-

²⁵ Fowler, S. & Duve, C. de (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 471–481.

²⁶ Duve, C. de & Wattiaux, R. (1966) *Annu. Rev. Physiol.* **28**, 435–492.

²⁴ Ernster, L. & Orrenius, S. (1965) *Fed. Proc.* **24**, 1190–1199.

licherweise erklärt die notwendige Aufrechterhaltung eines pH-Gefälles zwischen Lysosomen und Cytosol auch die wiederholt beobachtete Energieabhängigkeit des Proteinabbaus in Leberhomogenaten^[25]. Unsere Versuche mit Lysosomen aus Phenobarbital-behandelten Tieren zeigen, daß sich der lysosomale Proteinabbau veränderten metabolischen Bedingungen anpassen kann. Daß eine erhöhte Proteinabbaukapazität dieser Lysosomen *in vivo* vorliegt, geht auch aus Resultaten hervor^[11], die zeigten, daß unter Phenobarbitaleinwirkung die Aktivität des Kathepsins D im Leberhomogenat erhöht ist.

Lysosomen haben jedoch nicht nur die Fähigkeit, Proteine abzubauen, sie können in saurem Milieu aus den Lipoproteinmembranen der Mikrosomen in fünf Tagen 70% der gebundenen Fettsäuren und eine äquivalente Menge an gebundenem Phosphat frei machen^[25]. Beim Abbau der Mikrosomen durch Lysosomen bei pH 5,0 spielen demnach außer den Proteasen auch die Lipasen eine beträchtliche Rolle. Trotzdem wurde unter unseren Bedingungen das lipidhaltige Cytochrom P-450 nicht von der Membran abgelöst.

Sieht man von der NADPH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase wegen der hohen Empfindlichkeit gegenüber saurem Medium ab, so gehen Solubilisierung und Inaktivierungsbeschleunigung durch Lysosomen bei pH 5,0 in etwa parallel: NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase wird besonders gut durch lysosomale Enzyme solubilisiert und zeigt daher eine sehr hohe Inaktivierungsrate; diejenige des in weit geringerem Ausmaß solubilisierten Cytochroms *b*₅ liegt erheblich niedriger, während das nicht ablösbare Cytochrom P-450 auch keine spezifische Inaktivierung erfährt.

Unsere Versuche mit gereinigten, von der Membran abgelösten Proteinen zeigen, daß die Inaktivierung der NADPH- und der NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase sowie des Cytochroms *b*₅ bei pH 5,0

in gelöster Form rascher vor sich geht als in membrangebundener. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit von gelöstem Cytochrom *b*₅ und gelöster NADH-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase bei pH 5,0 war gleich groß wie in Inkubationsansätzen von Mikrosomenmembranen und zugesetzten Lysosomen.

Somit ist für die Geschwindigkeit des *intralysosomal*en Abbaus die Ablösbarkeit eines strukturgebundenen Proteins von der Membran von entscheidender Bedeutung, wobei die beschleunigte Denaturierung des abgelösten Proteins im sauren Medium die anschließende vollständige Proteolyse erleichtern dürfte (vgl. l.c.^[6]). Offensichtlich wird der Abbau der mikrosomalen Proteine *in vivo* jedoch nicht durch die Angreifbarkeit derselben von lysosomalen Enzymen reguliert. Dem *intralysosomal*en Abbau scheint ein vermutlich im Cytosol lokalisierter Regulationsmechanismus vorgeschaltet zu sein.

Bei unseren Untersuchungen konnten wir allerdings keinerlei Anhaltspunkte für die Beteiligung löslicher cytoplasmatischer Proteasen am Enzymabbau gewinnen. Die bisher nachgewiesenen Proteaseaktivitäten im Cytosol der Leberzelle scheinen nur zum Abbau denaturierter Substrate bzw. kleinerer Peptidbruchstücke geeignet zu sein^[6]. Inwieweit auch in der Leberzelle spezifische inaktivierende Enzyme wie in Mikroorganismen (vgl. l.c.^[27]) an der Regulation des Proteinumsatzes beteiligt sind, bleibt zu untersuchen. Möglicherweise geht der *intralysosomal*en Verdauung ein Prozess voraus, der die zum Abbau bestimmten Moleküle kenntlich macht. Experimentelle Beweise für die Existenz solcher Regulationsmechanismen in der Leberzelle liegen bisher noch nicht vor.

²⁷ Schimke, R. T. & Doyle, D. (1970) *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 929—976.