

VÖRÖSVÉRSEJT GHOSTOK PREPARÁLÁSA ÉS SAJÁTSÁGAI

SZÁSZ ILMA

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest

A membránkutatásban két típusú vörösvérsejt ghost* készítményt alkalmaznak: 1. a biokémiai vizsgálatokra alkalmas, hemoglobin mentesített ún. fehér ghostokat és 2. a transzportvizsgálatokra is alkalmas, hemoglobintartalmú, ún. „visszazárt” ghostokat.

1. Fehér ghostok

A *fehér ghostok* előállítása céljából a vörösvérsejteket *hipotóniás* vagy *izotóniás* hemolízisnek vetik alá. Elterjedtebb a hipotóniás hemolízissel történő ghostpreparálás. Ennek ismét két változata van. Kezdetben a *fokozatos hemolízis* módszerét követték (lásd SCHWOCH és PASSOW referátuma, 1973) fokozatosan csökkenő ionerejű (70, 60, 30, 0 mosM) foszfát, trisz, EDTA közegekben. DODGE és mtsai (1963) bebizonyították, hogy az *egylépéses hemolízissel* ugyanolyan jó eredményeket lehet elérni. DODGE és mtsai hipotóniás foszfát puffert (20 mosM, pH 7,4) alkalmaztak hemolizáló és mosófolyadékként. Ezen kívül legjobban elterjedtek a NaCl-trisz-EDTA (PARKER, HOFFMAN 1964), a trisz-EDTA (MARCHESI, STEERS 1968), a trisz-HCl (HANAHAN, EKHOLM 1972, HANAHAN és mtsai 1973) és a NaHCO₃ (BRAMLEY és mtsai 1971) tartalmú közegek.

Példaként ismertetjük a klasszikus Dodge-féle eljárást:

1. Savanyú citrát-dextrózos (ACD) konzervvérről centrifugálás után a plazmát és a fehérvérsejt lepedéket eltávolítják és a sejteket háromszor mossák pH 7,4-es izotóniás (310 mosM) foszfát pufferrel. 50%-os sejtszuspenziót készítenek ebben a pufferben.
2. Az 50%-os sejtszuspenziót 1 : 10 arányban tovább hígítják izotóniás foszfát pufferrel és 30 percig állni hagyják.
3. 4000 g-n 20 percig centrifugálják és a felülúszót eldobják.

* A vörösvérsejt-membránt a nemzetközi szakirodalomban STEWART (1899) óta „ghost”-nak nevezik.

4. Az üledéket 15-szörös térfogatú 20 mosM pH 7,4-es foszfát pufferben hemolizálják.
5. 30 perces állás után 20 000 g-vel 40 percig centrifugálják, majd 3—4-szer mossák a ghostokat ugyanazzal a 20 mosM-os pufferrel.
Minden műveletet 0—4 °C között végeznek.

Saját magunk igen jó tapasztalatokkal rendelkezünk PARKER és HOFFMAN fehér ghostjaival. Ez az eljárás a hemolízishez hígabb oldatot használ, mint a mosásokhoz, mert figyelembeveszi a sejtelső ozmolaritását is. A fentiekől az eljárás abban különbözik, hogy a mosott vörösvérsejteket 10-szeres térfogatú 0,1 M EDTA-val hemolizálják, majd a ghostokat 4—5-ször mossák 16 mM NaCl, 2 mM trisz-HCl (pH 7,4) és 0,1 mM EDTA tartalmú mosófolyadékkal. Az ozmolaritás magasabb, mint a DODGE eljárásnál, de a kis koncentrációban alkalmazott EDTA elősegíti a hemoglobin gyors leválását.

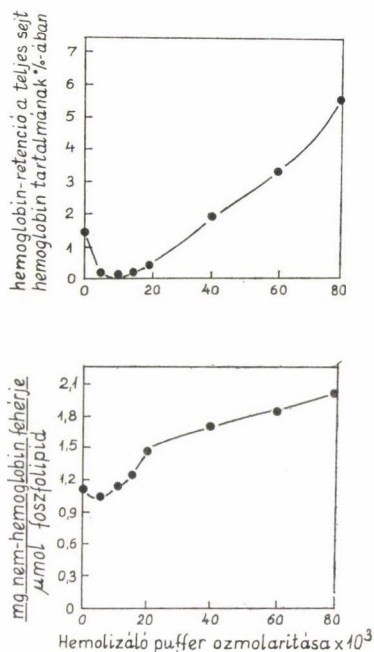
A hemoglobin mentesre mosott ghostokat fagyasztás-felolvasztással, vagy enyhe ultrahang kezeléssel is szokták „aktiválni”. Előbbire legelfogadottabb GARRAHAN és GLYNN (1967) eljárása, a szénsavhó-aceton keverékben történő háromszori (3—5 perces) lefagyasztás és 37 °C-os vízfürdőben történő felolvasztás.

Az izotóniás hemolízis módszerét HANAHAN és EKHOLM dolgozták ki 1972-ben. Izotóniás, 0,172 M triszben vagy 0,3 M glukózban 2—3 órán át 37—44 °C-on inkubálva a vörösvérsejteket, azok hemolizálnak és izotóniás trisz-pufferrel (ill. glukózzal) 2-szer mosva a ghostok felső frakciója hemoglobinmentes lesz. Az izotóniás trisz-pufferrel preparált ghostok fagyasztás-felolvasztás nélkül is ATPáz aktivitást mutatnak. Az izotóniás glukózzal preparált ghostok enzimaktivitása nem volt megfelelő.

Különböző preparálási eljárásokkal nem azonos sajátságú (összetételű, alakú, permeabilitású, enzimaktivitású, stb.) fehér ghostokat lehet nyerni. Ezért a körülmények hatására röviden ki kell térnünk. Ezek közül a legjelentősebb az ionerő, pH és az alkáli földfémek hatása.

Ionerő és pH hatás

pH 7,6-os pufferekben a hemoglobin legteljesebb eltávolítása 10 mosM körüli értékeknél történik. 1. ábránk a bikarbonát közegben észlelt eredményeket mutatja be. A hemoglobinnal párhuzamos a nem-hemoglobin fehérjék (pl. p-nitrofenilfoszfátáz) leválása is. 30—80 mosM között a ghostok intaktak maradnak (alakjuk fáziskontraszt mikroszkóppal ill. elektronmikroszkóppal bikonkáv korong), de különböző mértékű hemoglobint tartanak vissza. 20 mosM alatt a ghostokon fragmentáció és sztrómalízis jelenségei lépnek fel. 10 mosM alatt már kevés intakt ghost marad. A hemoglobin leválása (és vele a



1. ábra. Hemoglobin és nem-hemoglobin fehérje retenciója vörösvérsejt ghostban a hemolizáló puffer ozmolaritása függvényében (BRAMLEY és mtsai 1971. után)

membrán-anyagvesztés) fokozódott, ha a pH-t 8-ra emelték, de erősen csökkent, — az ATPáz feltárásának csökkenésével együtt, — ha 7,4 alá vitték (BRAMLEY és mtsai 1971, DUCHON, COLLIER 1971).

Alkáli földfémek hatása

Alacsony ionerősségen nyomnyi alkáli földfém megóvjja a ghostokat a spontán fragmentációtól. Mind Ca^{2+} , mind Mg^{2+} jelenlétében a reziduális hemoglobin tartalom (és a nem-hemoglobin fehérjeretenció) magasabb, mintha e kationok nincsenek jelen, vagy EDTA-val le vannak kötve (BRAMLEY és mtsai 1971, DUCHON, COLLIER 1971).

Membrán-alkotóelem veszteség

Mint a fentiekből kitűnik, elsősorban alacsony ionerőn, kétértékű kationok hiányában és magasabb pH-n anyagvesztéssel kell számolnunk. Hemoglobinton kívül elsősorban a spektrin szolubilizálódása következik be. A fragmentációval együtt acetilkolinészteráz, p-nitrofenilfoszfátáz veszteség-

ről számoltak be. Újabban, elsősorban a nem-savanyú lipidek vesztését mutatták ki hipotóniás foszfát-pufferes preparáláskor, de főként 1 mM-nál magasabb EDTA koncentrációk mellett. Ez a veszteség 0,5% albuminnak vagy Ca^{2+} -nak a preparáló közeghez adásával csökkenthető (TURNER 1974). Az újabb eredmények alapján feltételezik, hogy az eredetileg megállapított 1,04 lipid : fehérje arány a vörösvérsejtmembránban közelebb áll az 1,4-hez. Tulajdonképpen égetően szükséges lenne a kísérletekhez felhasznált membránok standardizálása, vagy legalábbis alapos jellemzése (fehérje-, lipid-, Ca^{2+} , esetleg szílsav-tartalom, acetilkolinészteráz-, ATPáz-aktivitás megadása, elektronmikroszkópos kép).

A fehér ghostok permeabilitása

Az ozmolaritást 80-tól 30 mosM-ig csökkentve az impermeabilis molekulák: ATP, szaharóz eloszlási aránya a ghost:medium között fokozatosan nő, 30 mosM-nál a hemoglobin, ATP, szaharóz eloszlása gyakorlatilag egyenletes. Ugyanekkor a ghostok belső fehérjei tripszin, kimotripszin számára hozzáférhetőkké, emészthetőkké válnak, illetve a sejt számára impermeabilis aminosav-reaktív reagensekkel jelölődnek (BRETSCHER 1971).

A fehér ghostok enzimaktivitása

A ghostoknak vannak *saját* és különböző erősséggel a membránhoz *kötött* enzimeik. pH 7,6-nál a lazán kötött enzimek csak 60–80 mosM körül maradnak a membránhoz kötve, kisebb ionerősségnél leválnak (ilyenek pl. a tej-savdehidrogenáz, triózfoszfátizomeráz, glutationreduktáz). A hemoglobinhoz hasonlóan az enzimvesztesség élesen csökken pH 7,4 alatt. A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz, aldoláz, piruvátkináz, foszfoglicerátkináz leválását a pH változtatása csak kis mértékben befolyásolja, és fragmentációt előidéző alacsony ionerősségnél membránhoz kötve maradnak (DUCHON, COLLIER 1971).

A membrán saját enzimeik is aktivitásváltozáson eshetnek át a preparálás során. 20 mosM és e fölötti ozmolaritásnál általában acetilkolinészteráz leválással nem kell számolni. Az ATP permeabilitásának változása révén az ozmolaritás csökkenésekor az ATPázok hozzáférhetővé válnak. A különböző ATPázok érzékenysége azonban különböző. Csökkenő ozmolarításra a $\text{K}^+ - \text{Na}^+$ -szenzitív- és inszenzitív ATPáz aktivitása nő, a CaATPázé általában csökken. A CaATPáz aktivitás enyhe ultrahang kezelésre is tönkremegy.

Tárolhatóság

A membránok tárolhatósága — az elsősorban fehérvérsejt-eredetű proteínázok Ca^{2+} -aktiválhatósága miatt — EDTA jelenlétében jobb. Az EDTA (0,1 mM nagyságrendben) a membránok aggregációját is gátolja. PHILIPPOT és AUTHIER (1973) adatai szerint az EDTA jelenlétében —20 °C-on tárolt fehér membrán K^{+} — Na^{+} -transzport-ATPáz aktivitása 2 hét múltán is a kiindulási érték 90—95%-a, 4 hét után 60%. +4 °C-on azonban néhány nap alatt jelentős aktivitás csökkenés következik be. A CaATPáz sokkal labilisabb, mint a K^{+} — Na^{+} -ATPáz. Ezzel kapcsolatban említjük meg WOLF (1972) összehasonlító preparatív vizsgálatait, miszerint a szokásos eljárásokkal preparált fehér ghost specifikus CaATPáz aktivitása sokkal alacsonyabb, mint a szubsztrát (0,2 mM MgATP) és Ca^{2+} (0,025 mM CaCl_2) jelenlétében többlépéses hemolízissel preparált, de egyébként alacsony kitermelésű készítményé. A fent vázolt általános preparálási séma nyilván nem minden vizsgálat számára optimális.

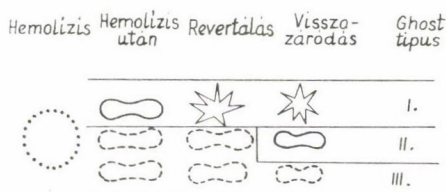
Vezikulum preparálások

A fehér ghostokból a továbbiakban még vezikulum készítmények is előállíthatók. Vörösvérsejtmembrán vezikulumok két folyamat: az endocitózis és exocitózis eredményeképpen jönnek létre. Vörösvérsejt ghostok endocitózist számos laboratóriumban észlelték (PENNISTON, GREEN 1968, BEN-BASSAT és mtsai 1972). Izotóniás körülmények között ATP-t és Mg^{2+} -ot igényel (PENNISTON 1972), alacsony ionerőnél azonban spontán bekövetkezik. Ezt a sajátságot használták fel STECK és mtsai (1970) a vezikulum preparálásra. 5 mM pH 8-as foszfát-pufferrel hemolizálták és mosták 2-szer a vörösvérsejteket. A ghostokat 40-szeres térfogatú 0,5 mM pH 8-as foszfát-pufferben 30 percig 0 °C-on állni hagyták. Ez idő alatt endocitózis jött létre. A keletkezett „kifordított” („inside-out”) vezikulumokat a ghostokat homogenizálva, vagy kis átmérőjű tűn keresztülyomva szabadították fel. 0,1 mM Mg^{2+} hozzáadása a spontán vezikulációt megszünteti. Az így „stabilizált” ghostok homogenizálásakor exocitózis, fragmentáció és normális orientációjú („right-side-out”) vezikulumok képződése idézhető elő. A „right-side-out” vezikulumok permeabilisak maradnak, nem „záródnak vissza” (kivéve, ha a Mg^{2+} -ot csak közvetlenül a ghostok homogenizálása előtt adják a rendszerhez). Az „inside-out” vezikulumok visszazáródnak, s ennek alapján Dextrán T 110-es sűrűség gradiens centrifugálással elválaszthatók a permeabilis ghostoktól. Utóbbiak ugyanis az alsó zónába kerülnek, míg az „inside-out” vezikulumok, saját fajsúlyuknak megfelelően a felső (1,01 körüli) zónában maradnak. A „right-side-out” vezikulumok felszínén levő szialsav negatív töltése révén a kétféle vezikulum elektroforetikusan is elválasztható. „Inside-out” vezikulu-

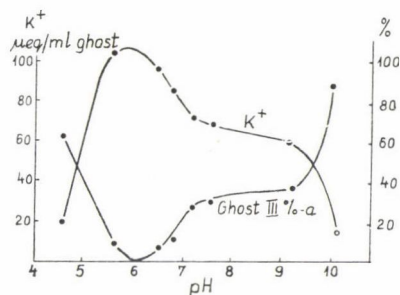
mokon ATP-dependens Ca^{2+} -felvételt vizsgáltak (WEINER, LEE 1972), „right-side-out” vezikulumokon lokalizálták a ouabain-kötődés helyét (PER-RONE, BLOSTEIN 1973).

2. Visszazárt ghostok

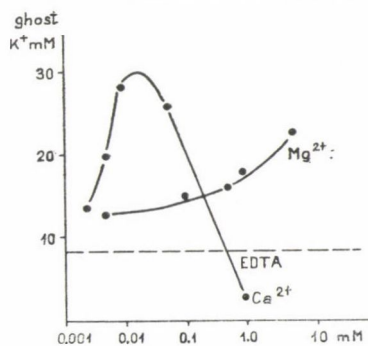
A hipotóniás hemolízis reverzibilitása régen megfigyelt tény. Azonban csak 1952-ben bizonyították SZÉKELY és mtsai, valamint TEORELL, hogy a „visszazáródott” vörösvérsejt ghostok alkáli kationokra nézve is gyakorlatilag impermeabilisak lesznek. Az ozmotikus hemolízist követően (hipotóniás közegben is) a ghostok spontán „durva visszazáródási” („rough sealing”) folyamaton mennek keresztül, melynek során a nagy molekulákkal (pl. ferritin: 120 Å, kolloidális arany: 150 Å) szemben „bezáródnak”, majd egy hosszabban elhúzódó (37 °C-on mintegy 1 órás) „szoros visszazáródási” („tight sealing”) folyamaton, melynek során kationokkal szemben is „bezáródnak”. A nagyobb molekulákkal szemben a ghostok átmeneti permeabilitás növekedését először STRAUB (1953) és GÁRDOS (1954) használta fel arra, hogy glikolitikus intermedierek vegyületeket és ATP-t juttasson a ghost belsejébe (0 °C-on, 1 : 2 sejt: hemolizáló medium arány mellett). HOFFMAN (1962), GARRAHAN és GLYNN (1967), LEPKE és PASSOW (1968) tökéletesebb hemolízis és homogénebb ghost populáció nyerése céljából változtatták a kísérleti körülményeket (sejt : medium arányt 1 : 6—1 : 10-re növelték, stb.) HOFFMAN azt a következtetést vont le, hogy ha teljes hemolízist idézünk elő, egyes ghostok alkáli ionokra nézve mindenképpen permeabilisak, „leaky”-k maradnak, akkor is, ha az izotóniát helyreállítják s ezt követően 37 °C-on huzamosan inkubálják azokat. A ghostok e heterogenitásának részletes vizsgálata azután BODEMANN és PASSOW (1972) érdeme volt. A ghostokat három csoportra osztották (2. ábra). A Ghost I frakció a hemolízis után nem vált alkáli kationok számára permeabilissá, a Ghost II frakció a hemolízis után permeabilissá vált, de a későbbiekben eredeti impermeabilitását visszanyerte, szemben a Ghost III frakcióval, amely a továbbiakban is permeabilis, „leaky” maradt. Nyilvánvaló, hogy transzport kísérletekhez csak a Ghost II frakció alkalmas. Megállapították a Ghost II



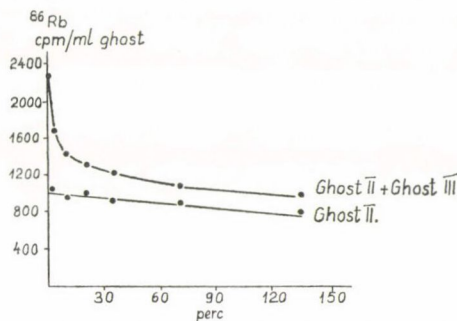
2. ábra. Ghost típusok. Pontozott vonal: alkáli ionokra és fehérjékre átjárható, szaggatott vonalak: alkáli ionokra átjárható, fehérjékre nem, kihúzott vonalak: fehérjékre nem átjárható, alkáli ionokra alig átjárható (SCHWOCH és PASSOW 1973. után)



3. ábra. A K^+ -retenció és a permeabilis („leaky”) ghostok aránya a hemolizáló közeg pH-ja függvényében (LEPKE és PASSOW 1972. után)



4. ábra. A hemolizáló közeg Ca^{2+} és Mg^{2+} tartalmának hatása a ghostok visszazáródására (BODEMANN és PASSOW 1972. után)



5. ábra. Vegyes (Ghost II + Ghost III) és szeparált Ghost II populációk ^{86}Rb kiáramlási görbéi (BODEMANN és PASSOW, 1972. után)

frakció képződésére optimális körülményeket. $0^\circ C$ -on végezve a hemolízist a Ghost I képződés mértéke elhanyagolható; a Ghost III frakció aránya pedig akkor kicsi, ha a hemolízis folyamán az ozmolaritást nem csökkentjük 30–40 mosM alá. Igen fontos a ghostok visszazárhatósága szempontjából, hogy a hemolízis pillanatában a pH 6 körüli érték legyen (3. ábra), valamint az, hogy alkáli földfémek (0,01 – 0,1 mM Ca^{2+} , vagy 1–10 mM Mg^{2+}) legyenek jelen a közegben (4. ábra). Komplexképzők jelenléte a visszazáródást megakadályozza. Mindezen szempontok betartásakor is vegyesen keletkeznek II és III

típusú ghostok, ezek azonban egy szaharóz-párnán keresztül történő centrifugálással szétválaszthatók. Az impermeabilis II ghostok a 43%-os szaharóz-párna felszínén maradnak. A vegyes ghost-populáció és az elválasztott II ghostok Rb^+ permeabilitását az 5. ábra mutatja be. Látható, hogy az ilyen módon nyert homogén II ghost populáció transzport kísérletekhez kiválóan alkalmas. BODEMANN és PASSOW (1972), valamint LEPKE és PASSOW (1972) munkái alapján transzport kísérletekhez a következő ghost preparálási eljárás ajánlható:

1. Emberi vörösvérsejteket mossunk 166 mM nem pufferolt kolinkloridban és készítsünk belőlük 50%-os szuszpenziót.
2. Készítsünk 1,2 mM ecetsav (pH 3,2) és 4,0 mM MgSO_4 , vagy 0,01 mM CaCl_2 tartalmú hemolizáló oldatot.
3. A sejtsuszpenziót és a hemolizáló oldatot hűtsük 0 °C-ra.
4. 1 tf sejtsuszpenzióhoz adjunk 10 tf hemolizáló oldatot.
5. Az elegyet 5 percig 0 °C-on állni hagyjuk.
6. 1 N trisz-szel a pH-t 7,2-re állítjuk. A ghostokba bevinni kívánt sók, vagy nagymolekulájú anyagok koncentrált oldatát adjuk a hemolizátumhoz olyan mennyiségben, hogy az izotónia helyreálljon (a számítások alapját fagyáspontcsökkenés, vagy ozmóméteres mérések képezik).
7. Az elegyet 37 °C-on 45—60 percig állni hagyjuk.
8. Elkészítjük a „szaharóz-párnát”: 43%-os szaharózban 25 mM trisz-HCl (pH 7,4)-t és 50 mM NaCl-ot oldunk.
9. 30 ml szaharóz-párnára 4,0 ml hemolizátumot pipettázunk.
10. 3400 g-vel 90 percig centrifugálunk (szögfej is megfelelő).
11. A felülúszó Ghost II szuszpenziót szaharóz-mentesen leszívjuk és a kísérlet kívánalmainak megfelelően tovább mossuk.

A fentieket még azzal egészíthetnénk ki, hogy STAROS és mtsai (1974) vizsgálatai alapján a hemolizáló térfogatot nem helyes a sejttérfogat hatszorosánál nagyobbra venni, mert úgy a ghostokban felszínre kerülnek az ép sejtekben nem hozzáférhető membrán fehérje frakciók. Érdekes még megemlíteni PARKER (1975) módosítását, ami azon alapszik, hogy 0 °C-on az izotónia helyreállítása után a ghostok nem záródnak azonnal. Ezért a preparálás ezen szakaszában egy gyors, hideg centrifugálást iktat be és a felülúszót eltávolítja abban az esetben, ha drága anyagokat (pl. cAMP) akar a ghostokba juttatni. A bevinni kívánt anyag megfelelő koncentrációját ui. ebben az esetben nem a teljes hemolizátum térfogatára kell beállítani, hanem csak a kistérfogatú ghost-suszpenzióéra. A 37 °C-on történő visszazáródás előtt hozzáadott anyag még jó hatásfokkal permeált a ghostokba.

A ghostok térfogatára nézve történtek vizsgálatok, de változó körülmények között és így változó eredményekkel (PONDER és BARRETO 1957,

PALEK és mtsai 1971). A transzport kísérletekhez használt ghostok térfogata általában a kiinduló sejteknél kisebb. A ghostok alakja nagymértékben függ a ghost belsejébe vitt anyagoktól: általában többé-kevésbé bikonkáv, részben szabálytalan lapos korongok, MgATP bevitelekor szabályos bikonkáv korongok, Ca^{2+} bevitelekor echinocyták, Ca-MgATP bevitelekor microspherocyták képződnek (Szász és mtsai 1968, Szász 1970, PALEK és mtsai 1974).

IRODALOM

1. BEN-BASSAT, I., BENSCH, K. G., SCHRIER, S. L.: J. Clin. Invest. **51**, 1833 (1972).
2. BODEMANN, H., PASSOW, H.: J. Membrane Biol. **8**, 1 (1972).
3. BRAMLEY, T. A., COLEMAN, R., FINEAN, J. B.: Biochim. Biophys. Acta **255**, 413 (1971).
4. BRETSCHER, M. S.: J. Mol. Biol. **59**, 351 (1971).
5. DODGE, J. T., MITCHELL, C., HANAHAN, D. J.: Arch. Biochem. Biophys. **100**, 119 (1963).
6. DUCHON, G., COLLIER, H. D.: J. Membrane Biol. **6**, 138 (1971).
7. GÁRDOS, G.: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **6**, 191 (1954).
8. GARRAHAN, P. J., GLYNN, I. M.: J. Physiol. **192**, 237 (1967).
9. HANAHAN, D. J., EKHOLM, J.: Biochim. Biophys. Acta **255**, 413 (1972).
10. HANAHAN, D. J., EKHOLM, J., HILDENBRANDT, G.: Biochemistry **12**, 1374 (1973).
11. HOFFMAN, J. F.: Circulation **26**, 1201 (1962).
12. LEPKE, S., PASSOW, H.: J. Gen. Physiol. **51**, 3655 (1968).
13. LEPKE, S., PASSOW, H.: Biochim. Biophys. Acta **255**, 696 (1972).
14. MARCHESI, V. T., STEERS, E., JR.: Science **159**, 203 (1968).
15. PALEK, J., CURBY, W. A., LIONETTI, F. J.: Am. J. Physiol. **220**, 19 (1971).
16. PALEK, J., STEWART, G., LIONETTI, F. J.: Blood **44**, 583 (1974).
17. PARKER, J. C.: (1975) (Szóbeli közlés)
18. PARKER, J. C., HOFFMAN, J. F.: Nature **201**, 823 (1964).
19. PENNISTON, J. T.: Arch. Biochem. Biophys. **153**, 410 (1972).
20. PENNISTON, J. T., GREEN, D. E.: Arch. Biochem. Biophys. **128**, 339 (1968).
21. PERRONE, J. R., BLOSTEIN, R.: Biochim. Biophys. Acta **291**, 680 (1973).
22. PHILIPPOT, J., AUTHIER, M. H.: Biochim. Biophys. Acta **298**, 887 (1973).
23. PONDER, E., BARRETO, D.: Blood **12**, 1016 (1957).
24. SCHWOCH, G., PASSOW, H.: Mol. Cell. Biochemistry **2**, 197 (1973).
25. STAROS, J. V., HALEY, B. E., RICHARDS, F. M.: J. Biol. Chem. **249**, 5004 (1974).
26. STECK, T. L., WEINSTEIN, R. S., STRAUSS, J. H., WALLACH, D. F. H.: Science **168**, 255 (1970).
27. STEWART, G. N.: J. Physiol. (London) **24**, 211 (1899).
28. STRAUB, F. B.: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **4**, 235 (1953).
29. SZÁSZ, I., ÁRKY, I., GÁRDOS, G.: Folia haemat. **89**, 501 (1968).
30. SZÁSZ, I.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **5**, 399 (1970).
31. SZÉKELY, M., MÁNYAI, S., STRAUB, F. B.: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **3**, 571 (1952).
32. TEORELL, T.: J. Gen. Physiol. **35**, 669 (1952).
33. TURNER, J. D.: Lipids **9**, 49 (1974).
34. WEINER, M. L., LEE, K. S.: J. Gen. Physiol. **59**, 462 (1972).
35. WOLF, H. U.: Biochem. J. **130**, 311 (1972).