

D37

B, 5899 S,

Untersuchungen zum Abbau von Kohlehydraten, Amino-  
säuren und Fettsäuren in der Mitteldarmdrüse von  
Eriocheir sinensis H. MILNE-EDWARDS.

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Philosophischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



Vorgelegt von  
Irene Mahlo  
Dessau  
1958

Erster Berichterstatter:.....  
zweiter Berichterstatter:.....  
Tag der mündlichen Prüfung:.....  
Von Dr. ck genehmigt: Kiel, den.....

.....  
(Nokan)



b) Benutzte Verfahren, Lösungsmittel und Papiersorten	17
c) Färbung	18
6. Papierchromatographie zum Nachweis von Phosphaten	
a) Herstellung und Auftragen der Ex- trakte	19
b) Benutzte Verfahren, Lösungsmittel und Papiersorten	19
c) Färbung	21
<b>C. Ergebnisse</b>	
1. Ergebnisse der Messungen mit Hilfe der Warburg-Apparatur	
a) Messungen unter aeroben Bedingungen	22
b) Messungen unter anaeroben Bedingun- gen	36
2. Ergebnisse der Stickstoffbestimmungen	36
3. Ergebnisse der Glykogenbestimmungen	36
4. Ergebnisse der ATP-, ADP- und AMP-Be- stimmungen	37
5. Ergebnisse der Zuckerchromatographie	38
6. Ergebnisse der Phosphatchromatographie	40
<b>D. Diskussion der Ergebnisse</b>	41
<b>E. Zusammenfassung</b>	45
<b>F. Literatur</b>	46

## A b k ü r z u n g e n

ADP	= Adenosindiphosphorsäure
AMP	= Adenosinmonophosphorsäure
ATP	= Adenosintriposphorsäure
Cyt. c	= Cytochrom c
DPN	= Diphosphopyridinnucleotid
FDP	= Fruktose-1,6-diphosphat
Gl-6-p	= Glukose-6-phosphat
JES	= Monojodessigsäure
PGAD	= Phosphoglyzerinaldehyddehydrase (= Triosephosphatdehydrase)
Ph.P.	= Phosphatpuffer nach Sörensen
Ri-5-p	= Ribose-5-phosphat
Trilon	= Dinatriumsalz der Aethylendiamin- tetraessigsäure
Tris	= Trisoxymethylaminomethan

## A. Einleitung

### Die Mitteldarmdrüse der Crustaceen.

Der Verdauungstraktus der Crustaceen setzt sich aus Vorder-, Mittel- und Enddarm zusammen. Vorder- und Enddarm entstehen als Einstülpungen des Ektoderms, die dem entodermalen Mitteldarmrohr entgegenwachsen. Der Vorderdarm erweitert sich zum Kaumagen, welcher bei den Malacostracen stark chitiniert ist und Kau- und Filtervorrichtungen, aber keine Drüsen enthält. Er ist mit einem braunen Magensaft gefüllt, der aus der Mitteldarmdrüse, einer stark verzweigten Ausstülpung des Mitteldarms, stammt. Bei den Decapoden, die am genauesten untersucht sind, beträgt die Länge des Mitteldarms nur wenige Millimeter, während die Drüse gewaltig entwickelt ist. Der anschliessende Enddarm ist chitiniert und dient ausschliesslich der Kotbereitung (32, 7).

In der älteren Literatur hat man lediglich vom morphologischen Gesichtspunkt aus die Mitteldarmdrüse der Crustaceen und anderer Invertebraten mit der Leber der Wirbeltiere verglichen. So sprachen CARUS, WAGNER, CUVIER von einer "Leber" und nannten dementsprechend ihr Sekret "Galle", "wenngleich die Beschaffenheit des Sekrets seiner Deutung als Galle zu widerstreben schien" (31).

Durch CLAUDE BERNARD, der 1853 Glykogen in der Mitteldarmdrüse von Crustaceen nachwies, erhielt der Name "Leber" eine physiologische Begründung (4). Diese Auffassung wurde jedoch durch HOPPE-SEYLER 1877 in Frage gestellt, nach dessen Untersuchungen die Mitteldarmdrüse als eine Verdauungsdrüse anzusehen ist. "Den Krebsen fehlt eine eigentliche Magenverdauung wie sie

den Wirbeltieren eigen ist. Sie besitzen dafür grosse Drüsen von den Eigenschaften der Bauchspeicheldrüse" (30).

Spätere Untersuchungen bestätigten, dass die Mitteldarmdrüse sowohl Leber- wie Pankreas-Funktionen erfüllt. Diesem Sachverhalt trägt die Bezeichnung "Hepatopancreas" Rechnung, die erstmalig 1880 von WEBER (70) vorgeschlagen wurde. Die folgenden Abschnitte sollen eine kurze Darstellung der Leber- und Pankreas-Funktionen bei Vertebraten geben und zeigen, inwieweit diesen die Mitteldarmdrüsen-Funktionen entsprechen.

### 1. Pankreasfunktionen.

Das Pankreas der Wirbeltiere übt gleichzeitig e n d o k r i n e und e x o k r i n e Funktionen aus. Ins Blut wird Insulin und Glucagon aus den Langerhansschen Inseln sezerniert, in den Darm der Pankreassaft geliefert, der Lipase,  $\alpha$ -Amylase und die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypolypeptidase enthält (39).

Von der Mitteldarmdrüse der Crustaceen ist über innere Sekretion nichts bekannt; dagegen sind e x o k r i n e pankreasanaloge Funktionen seit den grundlegenden Arbeiten von HOPPE-SEYLER 1877 erwiesen (30). Die von ihm gefundenen proteolytischen Fermente wurden von JORDAN 1904 (31), KRUEGLER und GRAETZ 1928 (36), SHINODA 1928 (63) und MANSOUR-BEK 1932 (42) näher untersucht. Letztere konnte im Magensaft von *Maja squinado* vier Proteasen identifizieren: Carboxypolypeptidase, Aminopolypeptidase, Dipeptidase und eine Proteinase, welche durch ihre Aktivierbarkeit mit Säugetierenterokinase und ihr pH-Optimum bei 8 als Trypsin erkannt wurde. Auch ein Kathepsin scheint vorzuliegen, da der

ungereinigte Magensaft ein zweites Maximum bei pH 6 zeigt. DEGWITZ kam 1955 bei Untersuchungen an Mitteldarmdrüsenextrakten von *Carcinus maenas* zu dem Ergebnis, dass sowohl tryptische als auch katheptische Endopeptidasen vorliegen (14).

Das von HOPPE-SEYLER gezeigte Vorkommen von  $\alpha$ -Amylase und Lipase im Magensaft von Decapoden wurde 1928 von KRUEGER und GRAETZ (36) und von WIERSMA und VAN DER VEEN (71) bestätigt. Letztere fanden bei *Astacus fluviatilis* neben Amylase auch Maltase und geringe Mengen an Invertase.

## 2. Leberfunktionen.

Die Leber der Wirbeltiere steht unter allen Organen an erster Stelle bezüglich der Vielfalt der Funktionen. Zu diesen gehören

- a) die Ausschüttung von Nährstoffen ins Blut,
- b) die Speicherung von Reservestoffen, z.B. Glykogen,
- c) die gegenseitige Umwandlung und Synthese von Nährstoffen, z.B. Kohlehydrat in Fett,
- d) die Entgiftungsreaktionen,
- e) die Bildung der Endprodukte des Intermediärstoffwechsels Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak, Hippursäure, Trimethylamin,
- f) die äussere Sekretion von Gallensäuren, Cholesterin und Bilirubin (40).

Für die Mitteldarmdrüse der Crustaceen sind die Vorgänge a), c) und d) nicht belegbar. Ueber Reservestoffspeicherung, Exkretstoff- und Gallebildung liegen etliche einander zum Teil widersprechende Arbeiten vor.

Zur Frage der G l y k o g e n-Speicherung schrieb BERNARD 1853, dass er vor der Häutungsperiode grosse Mengen, zwischen zwei Häutungen kein Glykogen fände (4). Im Gegensatz zu BERNARD fand KIRCH 1886 stets Glykogen in der Mitteldarmdrüse der untersuchten Crustaceen. Der Glykogengehalt schwankt nach seinen Angaben zwischen 0,27 und 0,48 % der frischen Drüsensubstanz. Auch bei Tieren, welche 23 Tage gehungert hatten, war noch Glykogen nachzuweisen (33). VON SCHOENBORN bestätigte KIRCHs Angaben (60). Er führte 1911 mit *Carcinus maenas* Hungerversuche durch und zeigte, dass der Glykogengehalt in den ersten Tagen schnell abnimmt, jedoch auch bei einer lange andauernden Hungerperiode nicht ganz verschwindet. Ferner beobachtete er ein Absinken des Glykogengehalts bei frisch gehäuteten Tieren in Uebereinstimmung mit BERNARD. Während aber BERNARD den Glykogenabbau auf die Verwendung zur Chitinneubildung zurückführte, dient das Glykogen nach VON SCHOENBORN (vgl. auch DRILHON (16)) als Energielieferant während der Zeit, in der die noch weichen Tiere nicht auf Nahrungssuche gehen können.

Eine endgültige Klärung dieser Frage könnte durch Versuche mit markierter Glukose erreicht werden.

Nach BALSS (2) wird neben Glykogen F e t t als Reservestoff in der Mitteldarmdrüse von Decapoden gespeichert.

Die Crustaceen haben ammoniotelischen Stoffwechsel (25). Sowohl die E n d p r o d u k t e des Eiweißstoffwechsels wie auch die des Nucleinsäureabbaus werden als Ammoniak ausgeschieden. Im Intermediärstoffwechsel und im Blut von *Eriocheir sinensis* (MOLLITOR (45) ), *Cancer* und *Astacus* (DELAUNAY (13)) wurden Harnsäure, Purinbasen und Harn-

stoff nachgewiesen; dementsprechend geben FLORKIN und DUCHATEAU 1942 (19) bei *Astacus* und *Homarus* das Vorkommen von Uricase, Allantoinase, Allantoicase und Urease an.

Das Vorkommen von Gallensäuren bei Crustaceen, welches auf Grund vollkommen fehlerhafter Experimente etwa 1850 behauptet worden war, wurde von allen späteren Autoren hartnäckig verneint (HOPPE-SEYLER (30), FRENZEL (20), JORDAN (31)). Erst 1942 gelang es VONK (68), eine Gallensäure, die Taurocholsäure, bei *Astacus* nachzuweisen. Er vermutet daneben noch Taurodesoxycholsäure und schätzt die Gesamtmenge an gepaarten Gallensäuren im Verdauungssaft auf 0,5 %.

In der Wirbeltierleber werden die energieverbrauchenden biochemischen Synthesen durch energieliefernde Abbaureaktionen ermöglicht, zu denen in erster Linie Glycolyse und Oxydation der Kohlehydrate zu zählen sind. Die Ausnutzung und Übertragung der freien Energie besorgen organische Phosphorsäureverbindungen. Die Frage, ob bezüglich der Energiegewinnung eine Analogie zwischen Wirbeltierleber und Crustaceenmitteldarmdrüse besteht, ist anhand der bekannten Literatur nicht zu beantworten.

Einen Hinweis in dieser Richtung geben Arbeiten über die Mitteldarmdrüse einer anderen Invertebratenklasse, der Gastropoden, von BALDWIN und REES. BALDWIN fand 1938 (1), dass die Kohlehydratverbrennung in der Mitteldarmdrüse von *Helix pomatia* - abgesehen von der Sonderstellung des Galaktogens und der Galaktose - wie im Lebergewebe von Vertebraten verläuft. In Fortsetzung dieser Untersuchungen konnte REES 1953 (57) den Ablauf des Zitronensäurezyklus nachweisen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Energiegewinnung durch Kohlehydratverbrennung in der Crustaceenmitteldarmdrüse. Als Versuchstier diente der Decapode *Eriocheir sinensis*.

## B. Material und Methoden

### I. Material.

Die Wollhandkrabben finden sich als Beifang in Stintkörben vor Hamburg-St. Pauli in der Elbe. Als Versuchstiere dienten die jeweils ältesten Exemplare, bei welchen Häutungen und die damit verbundenen Stoffwechselveränderungen seltener auftreten (48, 52, 61). Im Frühjahr und Frühsommer wurden etwa dreijährige Tiere von 30 - 40 mm Carapaxdurchmesser, im Spätsommer und Herbst abwandernde Exemplare im 4. oder 5. Lebensjahr bis zu 60 mm Durchmesser verwendet.

In grossen Becken mit Leitungswasser, das jeden 2. bis 3. Tag erneuert wurde, konnten die Tiere bis zu sechs Wochen gehältert werden. Die Wasserhöhe von 2 - 3 cm erwies sich als vorteilhaft, da die Tiere bei dieser Höhe durch Aufrichten des Carapaxes "Luftatmung" durchführen können (24,49).

Während der Zeit der Hälterung hungerten die Krabben. Sie verweigerten als Futter angebotenen Aal, obwohl sie in Freiheit die in Stellkörben gefangenen Fische anfressen (50). Im übrigen ist *Eriocheir sinensis* ein Allesfresser, dessen Hauptnahrung nach THIEL pflanzlicher Natur ist (65).

### II. Methoden.

#### 1. Messung des Gewebestoffwechsels mit Hilfe der Warburgapparatur.

Unter Verwendung des "Blutgasmanometers" von Barcroft entwickelte OTTO WARBURG eine Technik zur Messung des Gaswechsels von Geweben. Anfangs brachte man Gewebsschnitte in die Reaktionsgefässe. Da die nicht zu ver-

meidende unterschiedliche Schnittdicke eine beachtliche Fehlerquelle darstellt (1), wendet man heute meistens zerkleinerte Gewebe, sogenannte "Homogenate" an.

a) Herstellung der Homogenate.

Die etwa fünf Minuten mit Chloroform betäubten Tiere wurden seitlich aufgeschnitten und ihre Mitteldarmdrüsen herauspräpariert. Dass das Chloroform keine enzymhemmende Wirkung ausübt, zeigte der Kontrollversuch.

Die Mitteldarmdrüsen wurden sofort in einem eisgekühlten Gefäss 1:1 (v/v) mit 0,5 %iger KCl-Lösung versetzt (57), welche als Suspensionsflüssigkeit diente. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgte im Homogenisator nach Potter und Elvehjem. Hierbei ist es zweckmässig, die Tourenzahl von 500 - 800 Umdrehungen pro Minute nicht zu überschreiten, um eine Trennung des Homogenats in wässrige und Fettphase zu vermeiden.

b) Versuchsansätze.

Die in den Suspensionen auftretende starke Verdünnung vieler Aktivatoren kann dazu führen, dass Fermente unwirksam werden. Wie jedoch Arbeiten mit Rattenleberhomogenaten zeigten, lassen sich durch Zusatz von Cofaktoren optimale Verhältnisse herbeiführen. Unter Berücksichtigung dieser Erfahrungen erfolgte auch bei den verwendeten Homogenaten der Mitteldarmdrüse ein "Auffrischen" mit Cofaktoren.

<u>Aerober Versuchsansatz:</u>	<u>Endkonzentration pro Ansatz:</u>
1,8 ml Homogenat	30 % Mitteldarmdrüsengewebe
+ 0,4 ml Phosphatpuffer n.Sörensen pH 6,8	0,01 M
+ 0,5 ml Substrat 0,1 M	0,0167 M
+ 0,1 ml ATP "Henning" 1%	$6,6 \times 10^{-4}$ M
+ 0,1 ml "DPN-75 Boehringer" 1%	$5 \times 10^{-4}$ M
+ 0,1 ml Cytochrom c "Boehringer" $1 \times 10^{-4}$ M	$3 \times 10^{-6}$ M
<hr/> 3,0 ml	

Im Zentralgefäss: 0,2 ml NaOH 10 %  
Gasphase: Luft  
Temperatur: 25° C

Anaerober Versuchsansatz:

Hier wurde statt Phosphatpuffer Bikarbonatpuffer 0,0045 M vom pH 6,8 verwendet (67), im übrigen setzte sich der Ansatz wie bei den aeroben Versuchen zusammen.

Zentralgefäss: -  
Gasphase: N<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub> = 95 : 5  
Temperatur: 25° C

c) Berechnung des Substratumsatzes.

Als Mass für den Substratumsatz unter aeroben Bedingungen dient der Sauerstoffverbrauch, unter anaeroben Bedingungen die Menge an CO<sub>2</sub>, die durch Milchsäurebildung aus dem Bikarbonatpuffer freigesetzt wird.

Die am Manometer abgelesene Druckänderung in mm Brodie-  
lösung wurde durch Multiplikation mit der nach UMBREIT  
(66) berechneten Gefässkonstanten in  $\gamma$  l O<sub>2</sub> bzw.  $\gamma$  l CO<sub>2</sub>

und anschliessend in die aerob bzw. anaerob umgesetzte Substratmenge in Mikromol umgerechnet.

Die Gefässkonstante ist gegeben durch

$$k = (V_G)(c) + (\Delta ml)(ml_{F1})$$

Hierbei sind  $V_G$  = Volumen des Gasraumes in Gefäss und Manometer bis zum Meniskus der Brodielösung bei 240 bzw. 150 mm

$$c = \frac{\frac{273}{T}}{P_0} = 0,0916 \text{ für } 25^\circ \text{ C}$$

$$\Delta ml = \frac{-1000 \frac{273}{T} + 1000 \alpha}{P_0} = 0,039 \text{ für } 25^\circ \text{ C}$$

$ml_{F1}$  = Volumen der eingefüllten Flüssigkeiten in Zentral- und Hauptgefäss

Nach Bezugnahme auf den Gesamtstickstoffgehalt (s. S.10) lassen sich auch die an verschiedenen Homogenaten durchgeführten Messungen miteinander vergleichen.

Der Substratumsatz wurde folgendermassen auf einen Ansatz mit 10 mg Stickstoffgehalt umgerechnet:

$$(SU)_2 = \frac{(N)_2}{(N)_1} (SU)_1$$

Hierbei sind  $(SU)_1$  = der aus der Druckänderung berechnete Substratumsatz in Mikromol

$(N)_1$  = der Gesamtstickstoff des Homogenats pro Ansatz in mg

$(N)_2$  = 10 mg Stickstoff

d) Statistik (21, 59).

Der Mittelwert ist gegeben durch  $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$ ,

wenn  $x$  = Variante und  $n$  = Gesamtzahl der Varianten.

Die Standardabweichung  $s$  (= mittlere Abweichung) wird als Mass der Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert unter Benutzung der Methode der kleinsten Quadrate berechnet.

Es gilt also:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Der Fehler des Mittelwertes  $m$  ist abhängig von der Standardabweichung:

$$m = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n - 1)}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Zur Sicherung der Differenz der Mittelwerte verschiedener Versuchsgruppen ist der mittlere Fehler der Differenz der Mittelwerte  $\bar{x}_1$  und  $\bar{x}_2$  zu berechnen. Er beträgt:

$$m_{\text{Diff.}} = \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden Mittelwerte sich nur zufällig unterscheiden, ist sehr gering, wenn die Differenz  $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$  dreimal so gross ist wie ihr Fehler.

$$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 > 3 \sqrt{m_1^2 + m_2^2} \quad \text{d.h.} \quad \frac{\text{Diff.}}{m_{\text{Diff.}}} > 3$$

## 2. Bestimmung des Stickstoffgehalts.

Der Stickstoffgehalt der Homogenate wurde nach dem KJELDAHL'schen Prinzip mit der Mikromethode nach ABINGJELLER (34) bestimmt.

Durchführung: Das Homogenat 1:50 mit Aqua dest. verdünnen, davon 1 ml mit 2 ml  $H_2SO_4$  vom spez. Gew. 1,84 und 5 Tropfen 10%iger  $CuSO_4$ -Lösung im Kjeldahlkolben abrauchen, abkühlen, mit einigen Tropfen Wasser versetzen, abkühlen; den Kolbeninhalt in die Destillationsapparatur geben, 2 x mit Aqua dest. nachspülen, mit Kjeldahlauge alkalisieren, das freiwerdende Ammoniak mit dem Wasserdampf in die Vorlage destillieren, welche 5 ml 2%ige Borsäure und 2 Tropfen Mischindikator enthält. Mit n/100 auf "farblos" titrieren. 1 ml n/100  $H_2SO_4$  entspricht 0,140 mg Stickstoff. Der Mischindikator besteht aus

2 ml 0,1 %ig. alkohol. Methylrot  
+ 10 ml 0,1 %ig. alkohol. Bromkresolgrün.

### 3. Glykogenbestimmungen.

#### a) Isolierung des Glykogens aus der Mitteldarndrüse.

Die Abscheidung des Polysaccharids Glykogen erfolgte nach der PFLUEGERSchen Methode (53): Man zerstört das Gewebe mit heisser Kalilauge und fällt das Polysaccharid mit Äthanol. Bei diesem Verfahren wird eventuell im Ausgangsmaterial vorhandenes Galaktogen miterfasst (43).

Durchführung(62): 100 mg Mitteldarndrüse + 1 ml 30%ige Kalilauge im Wasserbad 15 Minuten kochen, mit 1,25 ml 96 %ig. Äthanol das Glykogen fällen, kurz aufkochen, 15 Minuten zentrifugieren, dekantieren, mit 1 ml Aqua dest. waschen, mit 1,25 ml 96 %ig. Alkohol ausfällen. Das Auswaschen muss eventuell wiederholt werden.

b) Qualitativer Nachweis.

Als tierisches Polysaccharid kommt ausser Glykogen noch Galaktogen in Betracht, seitdem MAY 1931 (43) das von HAIMARSTEN 1885 (22) in der Eiweißdrüse von *Helix pomatia* entdeckte "tierische Sinistrin" als aus Galaktosemolekülen aufgebautes Polysaccharid erkannte. Dieser als Galaktogen bezeichnete Körper wurde von MAY später (44) auch in Muscheln, Fischen und Säugetieren gefunden.

Durchführung: Das aus 100 mg Mitteldaradrüse isolierte Glykogen in 2 ml Aqua dest. lösen, + 2 ml 2n HCl zwei Stunden auf dem Wasserbad hydrolysieren, neutralisieren, mit 0,5 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 0,5 g Natriumazetat eine Stunde auf dem Wasserbad kochen, langsam abkühlen lassen, die abgeschiedenen Kristalle unter dem Mikroskop identifizieren.

Glukosazon und Galaktosazon sind durch ihre verschiedene Kristallform mikroskopisch unterscheidbar.

c) Quantitativer Nachweis.

Zur quantitativen Bestimmung des Glykogens wurde eine von MORRIS (46) entwickelte Methode verwendet, die auf ein qualitatives Nachweisverfahren von DREYWOOD (15) zurückgeht. Sie beruht darauf, dass das Glykogen in schwefelsaurem Medium in ein Furfurolderivat überführt wird, welches mit Anthron (9,10-Dihydro-9-oxo-anthracen) ein grünes Kondensationsprodukt liefert (58), dessen Konzentrationsbestimmung photometrisch erfolgt.

Die hier verwendete Arbeitsvorschrift stammt von SEIFTER und Mitarbeitern (62).

Durchführung: Das aus 100 mg Mitteldarmdrüse isolierte Glykogen in 5 ml Aqua dest. lösen, davon 1 ml + 10 ml Anthronlösung 10 Minuten (nach Stoppuhr) im Wasserbad kochen, im Eisbad abkühlen, mit Filter 578  $\mu$  bei 0,5 cm Schichtdicke photometrieren.

Es gilt

Glykogengehalt in  $\gamma$ /100 mg Mitteldarmdrüse =  
 $5 \times F \times \text{Extinktion}$ .

F wurde durch Aufnahme einer Eichkurve zu  
 $F = 873$  bestimmt.

Anthronlösung: 0,2 % Anthron in  $\text{H}_2\text{O} : \text{H}_2\text{SO}_4$   
(Spez.Gew. 1,84) wie 1 : 2 1/2

#### 4. Quantitative Bestimmung von ATP, ADP und AMP mit Hilfe des optischen Testes.

Der optische Test wurde von WARBURG und Mitarbeitern entwickelt (47, 69). Er beruht darauf, dass die reduzierte Codehydrogenase I (DPNH) gegenüber der oxydierten Form ( $\text{DPN}^+$ ) eine zusätzliche Absorptionsbande im Ultravioletten bei 340  $\mu$  aufweist. Mit ATP, ADP und AMP lassen sich Reaktionen durchführen, an denen die Codehydrogenase beteiligt ist. Da diese Reaktionen quantitativ verlaufen, kann der Verbrauch an DPNH als Mass für die vorhandene Menge an der betreffenden Adenosinphosphorsäure dienen (8).

##### a) Enzymatische Bestimmung von ADP und AMP mit der "Test-Combination Boehringer" (6).

Der ADP-Bestimmung liegen folgende Reaktionen zugrunde:

ADP + Phosphoenolbrenztraubensäure Pyruvatkinase (PK) →

ATP + Brenztraubensäure

Brenztraubensäure + DPNH + H<sup>+</sup> Milchsäuredehydrogenase →  
(MDH)

Milchsäure + DPN<sup>+</sup>

Nach vollständigem Umsatz bestimmt man im gleichen  
Ansatz AMP:

AMP + ATP Myokinase (MK), 2 ADP

Anschliessend erfolgt der Reaktionsablauf wie bei der  
ADP-Bestimmung.

Durchführung: Etwa 10 g Mitteldarmdrüse (genau wägen)  
mit Aqua bidest. 1 : 1 homogenisieren, davon  
5 ml + 5 ml 6% eiskalte Perchlorsäure 5 Minuten  
bei 3000 U/Min. zentrifugieren,  
4 ml des Ueberstandes + 1 ml Triäthanolaminpuf-  
fer ( 1 M Triäthanolaminhydrochlorid, 1,3 M  
K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, letzteres gleichzeitig zur Perchlorat-  
fällung),  
15 Minuten in Eis stehenlassen, vom Niederschlag  
dekantieren (pH = etwa 7,5), temperieren auf  
20 - 25° C,  
2 ml dieses Ueberstandes zum Test einsetzen.

Bestimmungsansatz:

2,0 ml Ueberstand  
+ 0,15 ml Phosphoenolbrenztraubensäure 10<sup>-2</sup> M/  
Mg<sup>++</sup> 0,4 M/KCL 1,3 M  
+ 0,10 ml DPNH 5 × 10<sup>-3</sup> M  
+ 0,02 ml MDH 0,01 mg%  
Extinktion E<sub>1</sub> ablesen (Filter 365 mμ)  
+ 0,02 ml PK 0,01 mg%  
Extinktion E<sub>2</sub> ablesen  
+ 0,02 ml MK 0,02 mg%  
Extinktion E<sub>3</sub> ablesen (in 1-Minuten-  
abständen bis  
Reaktion "steht")

---

2,31 ml

Berechnung:

$$E_1 - E_2 = \Delta E_{\text{ADP}}, \quad E_2 - E_3 = \Delta E_{\text{AMP}}$$

Für das Licht der Wellenlänge 366  $\mu\text{m}$  ist der Extinktionskoeffizient für DPNH  $3,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{M}$ , d.h.

1 M = 663  $\gamma$  DPNH gelöst in 1 ml ergibt nach Reduktion bei 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von  $\log I/I_0 = 3,3$ . Eine Extinktionsdifferenz von 1 entspricht 0,303  $\mu\text{M}$  DPNH, somit ebensovielen  $\mu\text{M}$  ADP und einhalb so vielen  $\mu\text{M}$  AMP, denn die Reaktion verläuft unter den angegebenen Bedingungen stöchiometrisch.

Für den Küvetteninhalt von 2,31 ml entspricht eine Extinktionsdifferenz von 1,0 einem Gehalt an 0,7  $\mu\text{M}$  ADP = 299  $\gamma$  bzw. 0,35  $\mu\text{M}$  AMP = 121,5  $\gamma$ .

Unter Berücksichtigung der Verdünnung (Multiplikation mit 1,25) ergibt sich:

$$\Delta E_{\text{ADP}} \cdot 374 = \gamma \text{ ADP/ml Homogenat}$$

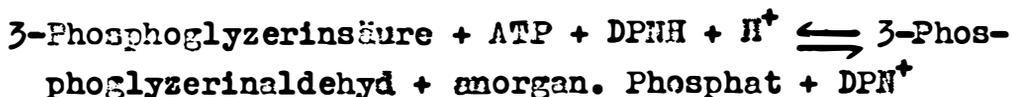
$$\Delta E_{\text{AMP}} \cdot 152 = \gamma \text{ AMP/ml Homogenat}$$

Hieraus werden die  $\gamma$  ADP bzw. AMP pro g Mitteldarmdrüse berechnet.

b) Enzymatische Bestimmung von ATP mit der "Test-Combination Boehringer" (5).

Die zur Bestimmung dienenden Reaktionen





verlaufen im Gegensatz zu denen des ADP-Testes nicht quantitativ. Durch Zusatz von Cystein zum Abfangen des Phosphoglyzerinaldehyds werden jedoch die Gleichgewichte der gekoppelten Reaktionen ganz nach rechts verschoben, so dass stöchiometrischer Umsatz erfolgt.

Durchführung: 10 g Mitteldarmdrüse mit Aqua bidest.

- 1 : 1 homogenisieren,
- davon 2 ml Homogenat + 2 ml 6% Perchlorsäure
- 5 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugieren,
- 2 ml des Ueberstandes abpipettieren + 0,2 ml gesättigte  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung auf pH 7 bringen,
- 15 Minuten in Eis stehenlassen, vom Niederschlag dekantieren, temperieren auf ca. 25° C,
- 0,2 ml des Ueberstandes zum Test einsetzen.

Bestimmungsansatz:

- 2,4 ml Reaktionsgemisch (0,1 M Triäthanolaminpuffer pH 7,  $4 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{MgSO}_4$ ,  $3 \cdot 10^{-3}$  M Cystein,  $6 \cdot 10^{-3}$  M 3-Phosphoglyzerinsäure)
- + 0,04 ml DPN-H  $1,2 \cdot 10^{-2}$  M
- + 0,20 ml Ueberstand
- Extinktion  $E_1$  ablesen (Filter 366 m $\mu$ )
- + 0,04 ml PGAD 0,04 mg% / PGK 0,01 mg%
- Extinktion  $E_2$  ablesen (nach etwa 5 Min.)

---

- 2,68 ml

Berechnung:

$$E_1 - E_2 = \Delta E_{\text{ATP}}$$

Entsprechend dem molaren Extinktionskoeffizienten von DPN-H bei 366 m $\mu$  bewirken 0,303  $\mu\text{M}$  DPN-H in 1 ml einer Küvette von 1 cm Schichtdicke eine

Extinktionsdifferenz von 1,0. Für den Küvetteninhalt von 2,68 ml entspricht eine Extinktionsdifferenz von 1,0 einem Gehalt an 0,81  $\mu\text{M}$  DPN-H und somit ebensovielen  $\mu\text{M}$  ATP = 411,8  $\gamma$  ATP. Unter Berücksichtigung der Verdünnung (Multiplikation mit 11) ergibt sich

$$\Delta E_{\text{ATP}} \cdot 4529,8 = \gamma \text{ ATP/ml Homogenat}$$

Hieraus werden die  $\gamma$  ATP pro g Mitteldarmdrüse berechnet.

## 5. Papierchromatographie zum Nachweis von Zuckern.

### a) Herstellung und Auftragen der Extrakte.

Das Homogenat der Mitteldarmdrüse wurde zur Enteiweissung mit Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 2,5 % versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert und der saure Ueberstand so oft mit Aether im Scheidetrichter ausgeschüttelt, bis er neutrale Reaktion zeigte. Die Einengung erfolgte unter vermindertem Druck bei 28 - 35° C entsprechend 12 - 18 mm Quecksilbersäule. Das Auftragen von 50  $\mu\text{l}$  der Extrakte geschah tropfenweise mit einer Blutzuckerpipette, das Trocknen mit einem Föhn. Als Vergleichsubstanzen liefen "Monosaccharide Merck für Chromatographie" je 10  $\mu\text{l}$  von m/10 Lösungen, d.h. 180  $\gamma$  Substanz.

### b) Benutzte Verfahren, Lösungsmittel und Papiersorten.

Für die Vorversuche wurden sogenannte "Kurzchromatogramme" nach E. RANKE angewendet (55). Es sind dies Rundfilterchromatogramme mit acht Zungen, die durch

ihre kurze Laufzeit von 2 - 4 Stunden für eine erste Uebersicht gut geeignet sind.

Zur genauen Identifizierung dienten ein- und zwei-dimensionale Chromatogramme von der Grösse 28 x 28 cm (12).

Die verwendeten Lösungsmittelgemische I und II liefen je 9 - 12 Stunden.

Die Gemische setzten sich wie folgt zusammen:

I. Butanol 8 Teile,	II. Pyridin 7 Teile,
Eisessig 2 Teile,	Amylalkohol 6 Teile,
Aqua dest. 2 Teile.	Aqua dest. 6 Teile.

Die Chromatogramme wurden sämtlich auf dem Papier von Schleicher + Schüll Sorte 2043 b Mgl entwickelt.

### c) Färbung.

Nach Besprühen der trockenen Chromatogramme mit Anilinphthalat-Lösung (51) und 10 Minuten Trocknung bei 105° zeigen die Hexosen unter dem UV-Licht betrachtet eine gelbliche Fluoreszenz um olivbraune Flecken, die Aldopentosen eine rote Fluoreszenz um rotbraune Flecken und Fruktose gelbliche Fluoreszenz um schwach braune Flecken.

Die Anilinphthalatlösung besteht aus 1,66 g Phthalsäure und 0,93 g Anilin aufgefüllt zu 100 ml mit wassergesättigtem Butanol.

6. Papierchromatographie zum Nachweis von Phosphaten und Phosphorsäureestern.

a) Herstellung der Extrakte und Auftragen der Extrakte und Vergleichssubstanzen.

Die Herstellung der Extrakte erfolgte in der bei der Zuckerchromatographie unter 5a) beschriebenen Weise. Da die Temperatur von 35° C nicht überschritten wurde, war eine Hydrolyse eventuell vorliegender Zuckerphosphorsäureester nicht zu befürchten.

Vom Extrakt wurden 20 - 80  $\mu$ l aufgetragen, von den Vergleichssubstanzen folgende Mengen:

Orthophosphat	3 $\mu$ l	M/10-Lösung	entsprechend	9 y	Phosphor
Pyrophosphat	2-3 $\mu$ l	"	"	12-18 y	"
G1-6-p "Boehringer"	10 $\mu$ l	"	"	31 y	"
R1-5-p "Boehringer"	10 $\mu$ l	"	"	31 y	"
FDP "Boehringer"	5 $\mu$ l	"	"	31 y	"

Der Nachweis von ATP ist wesentlich weniger empfindlich, es sind dazu etwa 300 y der Verbindung entsprechend 56 y Phosphor erforderlich (35).

b) Benutzte Verfahren, Lösungsmittel und Papiersorten.

In nahezu jeder Arbeit über Phosphatchromatographie werden andere Verfahren und Lösungsmittel empfohlen. Für den vorliegenden Zweck bewährten sich Glastürme von 90 cm Höhe und 22 cm Durchmesser, in welche Papierstreifen von 57 x 17 cm Grösse gehängt wurden (11). Wir wandten eine der zweidimensionalen Methode vergleichbare Arbeitsweise nach FLECKENSTEIN und JANKE (18) an. Das Papier wurde nach dem Durchlaufen der ersten

Phase, welches in aufsteigender Richtung erfolgte, getrocknet, um 180° gedreht und mit einer zweiten Phase absteigend chromatographiert.

Die Phosphorsäureester laufen auf Grund ihrer hohen Wasserlöslichkeit bei Anwendung der für Aminosäuren und Zucker üblichen Lösungsmittel sehr langsam, so dass man nur mittels der Durchlaufchromatographie eine Trennung erreichen kann (11), wenn man nicht zu geeigneteren Lösungsmitteln übergeht. HANES und ISHERWOOD (23) und später BANDURSKI und AXELROD (3) erprobten die verschiedensten Gemische. Dabei erwiesen sich besonders Methanol, Aethanol und n-Propanol als gut bewegende neutrale Komponenten (3). Die  $R_F$ -Werte können durch Zusatz von Wasser erhöht werden. Da jedoch der Trenneffekt in Gegenwart von Wasser im pH-Bereich 4-9 sehr gering ist, setzt man zweckmässig Basen oder Säuren hinzu.

Mit folgenden zwei Paaren von Lösungsmittelgemischen wurden Trennungen durchgeführt (3, 17, 18):

A. I. Phase:	II.Phase:
90 Teile Isopropyläther	240 Teile n-Propanol
60 Teile 90% Ameisensäure	120 Teile 25% Ammoniak (spez.Gew. 0,9015)
	40 Teile wässrige 0,02 M Trilonlösung
B. I. Phase:	II.Phase:
80 Teile Methanol	60 Teile Methanol
+ 0,1% Laurylamin	10 Teile 25% Ammoniak (spez.Gew. 0,9015)
15 Teile 88% Ameisensäure	30 Teile Aqua dest.
5 Teile Aqua dest.	

Dabei hat der Trilonzusatz die Aufgabe störende Schwermetallionen zu binden (18). Der Gehalt an Laurylamin dient zur Vermeidung der Schwanzbildung und zur Erzie-

lung schärfer umrissener Flecke (64).

Als Papier für die Phosphatchromatographie wurden die Sorten Schleicher + Schüll 2043 a M sowie 2043 b Mgl verwendet (vgl. 56). Zur Entfernung etwa vorhandener Schwermetallionen wurde es mit Trilon vorbehandelt (18):

Einlegen des Papiers für 30 Minuten in 0,5 % wässrige Trilonlösung, die durch Natronlauge auf pH 8,5 gebracht wurde, 6 x hintereinander je 10 Minuten mit Aqua dest. waschen, trocknen.

c) Färbung.

Zur Färbung wurde das Reagenz von HANES und ISHERWOOD angewandt (23), das sich aus 5 ml 60%iger Perchlorsäure, 10 ml n/1 Salzsäure, 25 ml 4%iger Ammoniummolybdatlösung und 60 ml Aqua dest. zusammensetzt. Nach dem Besprühen der trockenen Chromatogramme aus 50 cm Entfernung mit ganz feinem Strahl des Reagenzes und Trocknen für 7 Minuten bei 85° erfolgte die Reduktion in der von BANDURSKI und AXELROD angegebenen Weise (3) mit UV-Licht aus 10 cm Entfernung für 5-10 Minuten. Ortho- und Pyrophosphat erscheinen sofort nach dem Besprühen als gelbe Flecke und werden nach der Reduktion gelblich-grün, alle organischen Phosphatkomponenten zeigen nach der Reduktion kräftige Blaufärbung, FDP bleibt im Zentrum gelblich.

## C. E r g e b n i s s e

### 1. Ergebnisse der Messungen mit Hilfe der Warburg-Apparatur.

#### a) Messungen unter aeroben Bedingungen.

##### α) Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen.

Einen wesentlichen Einfluss auf die Atmung kann die Wasserstoffionenkonzentration ausüben. Der an zehn verschiedenen Homogenaten gemessene pH-Eigenwert schwankte zwischen 6,35 und 6,73. Dementsprechend erfolgten bei pH-Werten im Bereich von 6,20 - 7,08, die durch Zusatz von Phosphatpufferlösungen nach Sørensen eingestellt waren, Untersuchungen der Atmungsaktivität des Homogenats. Nach diesen Messungen ist innerhalb des untersuchten pH-Bereiches die Höhe des Umsatzes unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration. Die pH-Bestimmungen wurden mit dem pH-Meter "Metrohm AG. Herisau" durchgeführt, dessen Ablesegenauigkeit 0,02 pH beträgt.

Durch Versuche bei Wasserbadtemperaturen zwischen 12° und 36° C wurden die optimalen Temperaturbedingungen ermittelt. Der grösste Sauerstoffverbrauch des Homogenats erfolgte bei 25° bzw. 26° C. Dieses Ergebnis gilt sowohl für Tiere, die im Hochsommer bei einer Wassertemperatur von 21,5° C gefangen wurden (Abb. 1), wie auch für solche, die im Spätherbst aus einem Milieu von 11,5° C kamen (Abb. 2). Allerdings verbrachten die Tiere stets mehrere Stunden bei Lufttemperatur ehe sie zum Versuch verarbeitet werden konnten.

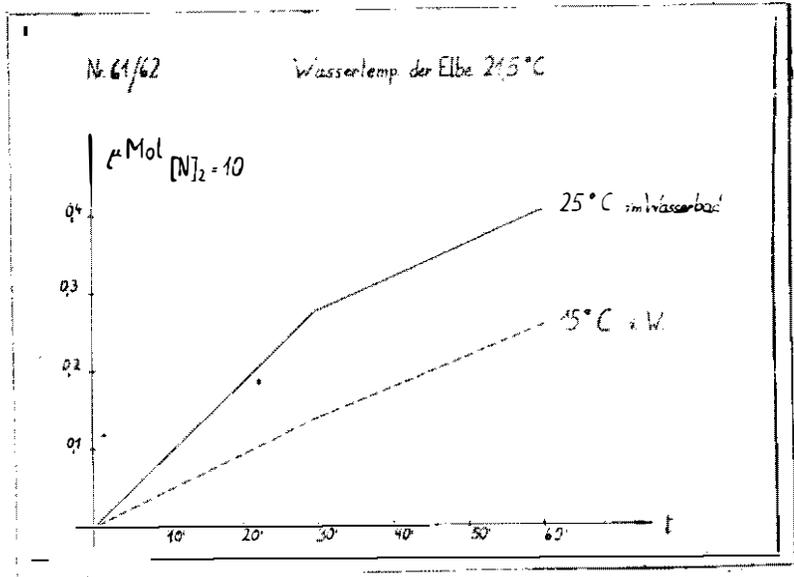


Abb. 1: Darstellung des aeroben Glukoseumsatzes bei verschiedenen Temperaturen mit Homogenaten der Mitteldarndrüse von Tieren, die aus 21,5° C Wassertemperatur kamen.

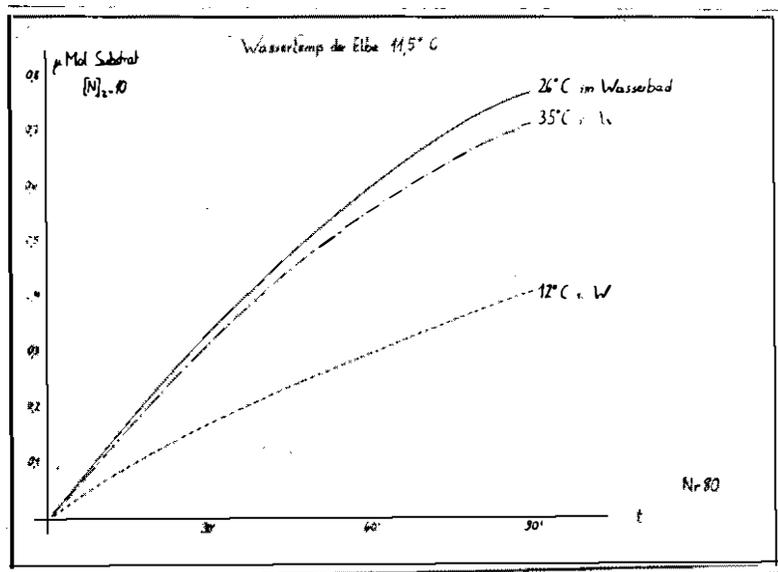


Abb. 2: Darstellung des aeroben Glukoseumsatzes bei verschiedenen Temperaturen mit Homogenaten der Mitteldarndrüse von Tieren, die aus 11,5° C Wassertemperatur kamen.

Zur Untersuchung der Möglichkeit einer "Auffrischung" des Homogenats wurden dem Versuchsansatz die Cofaktoren ATP, DPN und Cytochrom c sowie Cocarboxylase, Magnesium-Ionen und Pyrophosphat in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Für ATP ergab sich die optimale Endkonzentration zu  $7 \times 10^{-4}$  M, höhere Konzentrationen können zur Hemmung führen. Tabelle 1 zeigt die Erhöhung des Umsatzes durch ATP-Zusatz bei verschiedenen Substraten:

Tab. 1:

Substrat	Umsatzerhöhung durch ATP-Zusatz in %
Glukose	7
Glykogen	10
Fruktose	4
FDP	0

Für DPN erwies sich die Endkonzentration von  $5 \times 10^{-4}$  M als optimal mit einer Umsatzerhöhung von 17 %, für Cytochrom c die Endkonzentration von  $3 \times 10^{-6}$  M mit der Umsatzerhöhung von ebenfalls 17 %.

Wenn sowohl ATP wie DPN und Cytochrom c ( in den folgenden Ausführungen kurz als "Cofaktoren" bezeichnet in den genannten optimalen Konzentrationen zugesetzt wurden, erfolgte die signifikante Umsatzerhöhung 30 % (Abb. 4 - 8). Dagegen übten weder Zusätze Cocarboxylase (Aneurinpyrophosphat Merck) noch Magnesium-Ionen in den Endkonzentrationen  $10^{-5}$   $10^{-4}$  M oder  $10^{-3}$  M eine Wirkung auf den Umsatz Glukose, FDP oder Natriumpyruvat aus. Auch pyrophosphat in der Endkonzentration von  $7 \times 10^{-4}$  M ohne Einfluss auf die Atmung des Homogenats.

Beispiel eines Versuchsprotokolls:

Eriocheir sinensis gefangen am 14. 9., gehältert bis 22. 9., betäubt mit Chloroform, Mitteldarmdrüse 1 : 1 homogenisiert mit 0,5 % KCl-Lösung.

Gasphase: Luft

Temperatur: 25° C

Zentralgefäß: 0,2 ml 10 % NaOH

Anlaufzeit: 15 Minuten

KJELDAHLbestimmung: 7,04 mg N/ml Homogenat entsprechend 12,68 mg N/1,8 ml Homogenat.

Mano- meter	Inhalt Hauptgefäß	Druckänderung mm/h	Gefäßkon- stante k <sub>O<sub>2</sub></sub>	O <sub>2</sub> -Verbrauch µl/h	Substratumsatz µM/h/12,68 mg N	Substratumsatz µM/h/10 mg N
1	3 ml H <sub>2</sub> O (Thermobaromet.)	1				
2	1,8 ml Homogenat 0,4 ml Ph.P. pH 6,74 0,8 ml H <sub>2</sub> O	43	1,376	59,3	0,442	0,348
3	desgl.	45	1,304	58,7	0,437	0,345
4	desgl.	48	1,217	58,4	0,434	0,342
5	desgl.	46	1,260	58,0	0,432	0,340
6	1,8 ml Homogenat 0,4 ml Ph.P. pH 6,74 0,5 ml Glukose M/10 0,3 ml H <sub>2</sub> O	51	1,377	70,1	0,522	0,412
7	desgl.	51	1,335	68,2	0,507	0,400
8	desgl.	52	1,322	68,7	0,512	0,404
9	desgl.	54	1,295	69,8	0,519	0,410
10	desgl.	50	1,335	66,7	0,497	0,393

β) Homogenatmung mit und ohne Glukosezusatz.

Die Messergebnisse des auf S. 24 wiedergegebenen Versuchsprotokolls sollen dazu dienen, den statistisch gesicherten Unterschied zwischen den Versuchsreihen mit und ohne Glukosezusatz zu zeigen.

Es folgt die Berechnung der Standardabweichung  $s$ , des Fehlers des Mittelwertes  $m$  und die Sicherung der Differenz der Mittelwerte der beiden Versuchsgruppen (vgl. hierzu S. 9/10).

I. Reihe  
(mit Glukose)

	x	(x- $\bar{x}$ )	(x- $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>
1.	412	8	64
2.	400	-4	16
3.	404	0	0
4.	410	6	36
5.	393	-11	121
$\sum x = 2019$		$\sum (x-\bar{x}) = -1$	$\sum (x-\bar{x})^2 = 237$

$$\bar{x}_1 = 404$$

$$s_1 = \sqrt{\frac{237}{4}} = 7,71; \quad m_1 = \frac{7,71}{\sqrt{5}} = 3,44$$

II. Reihe  
(ohne Glukose)

	x	(x- $\bar{x}$ )	(x- $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>
1.	348	4	16
2.	345	1	1
3.	342	-2	4
4.	340	-4	16
$\sum x = 1375$		$\sum (x-\bar{x}) = -1$	$\sum (x-\bar{x})^2 = 37$

$$\bar{x}_2 = 344$$

$$s_2 = \sqrt{\frac{37}{3}} = 3,51; \quad m_2 = \frac{3,51}{\sqrt{4}} = 1,76$$

Daraus folgt für die Differenz der Mittelwerte

$$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 60$$

und für deren mittleren Fehler

$$M_{\text{Diff.}} = 3,87.$$

Also ist

$$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{M_{\text{Diff.}}} = \frac{60}{3,87} > 3$$

und damit ist der Unterschied der Mittelwerte der beiden Versuchsreihen als gesichert zu betrachten.

Der Unterschied der Versuchsreihen mit und ohne Glukosezusatz lässt sich über mehrere Stunden verfolgen (Abb. 3):

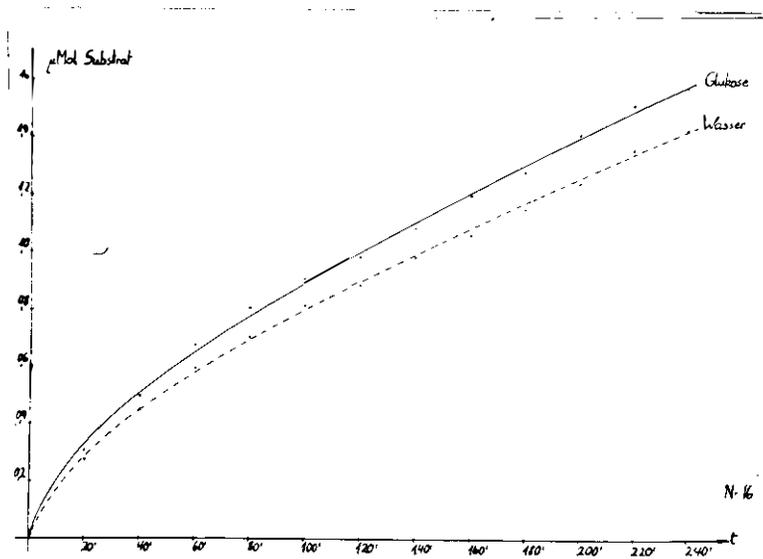


Abb. 3: Darstellung der Atmung des Homogenats während der ersten vier Stunden mit und ohne Glukosezugabe ( $10^{-2}$  M pro Ansatz).

γ) Zusatz von Substraten.

Die folgenden Abbildungen 4 - 8 und die Tabelle 2 zeigen die Erhöhung der Atmung des Homogenats der Mitteldarmdrüse bei Zugabe der verschiedenen Substrate in 0,0167 M Endkonzentration. Diese Versuche wurden sowohl ohne wie mit Zusatz der Cofaktoren (ATP, DPN, Cyt. c in den auf S. 24 angegebenen Konzentrationen) durchgeführt. In den Abbildungen erfolgte die Darstellung des Substratumsatzes in Prozenten bezogen auf den Glukoseumsatz = 100. Zum Vergleich ist auch die Homogenatatmung ohne jeden Substratumsatz eingezeichnet.

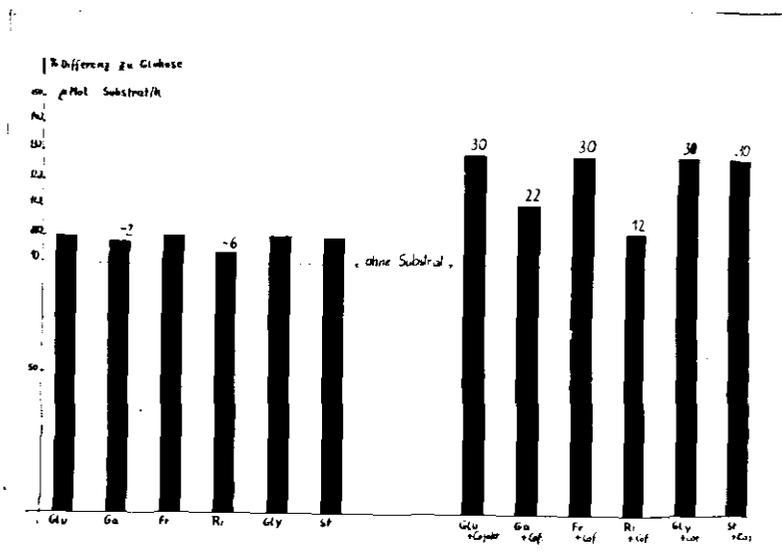


Abb. 4: Verbrennung der Mono- und Polysaccharide Glukose (Glu), Galaktose (Ga), Fruktose (Fr), Ribose (Ri), Glykogen (Gly) und Stärke (St) ohne und mit Zusatz der Cofaktoren.

Die Zucker Galaktose und Ribose wurden vom Homogenat nicht ganz so gut umgesetzt wie Fruktose, Glykogen und Stärke (Abb. 4).

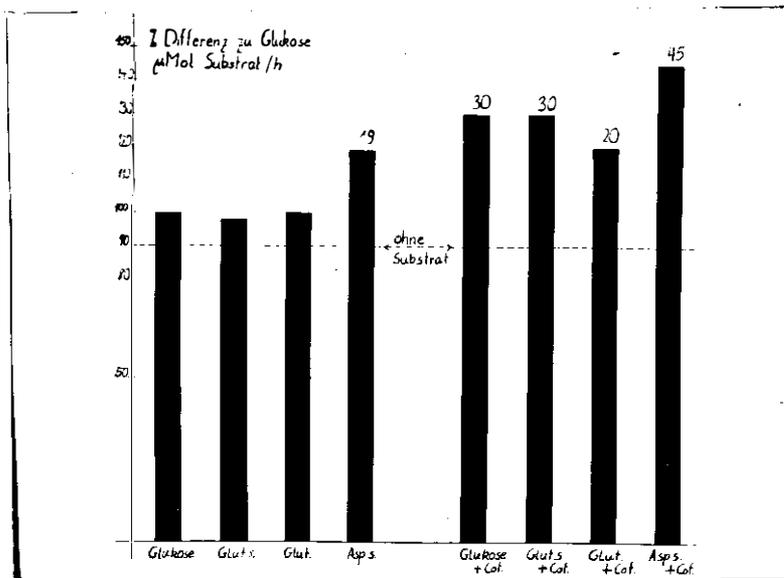


Abb. 6: Verbrennung der Aminosäuren l(+)-Glutaminsäure (Glut.s.) und l(+)-Asparaginsäure (Asp.s.) und des l(+)-Glutamins (Glut.) im Vergleich zu Glukose ohne und mit Zusatz der Cofaktoren.

Die Darstellung der Umsatzerhöhung durch l(+)-Asparaginsäure um nahezu 20 % in Abb. 6 bezieht sich auf Versuche, die im Herbst mit laichreifen Tieren durchgeführt wurden. Dieses Ergebnis konnte im Frühjahr mit jungen Tieren nicht reproduziert werden: hier ergab sich die gleiche Höhe des Umsatzes nach Zugabe von Glukose, l(+)-Asparaginsäure oder l(+)-Alanin.



Abb. 7: Verbrennung der Fettsäuren Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure im Vergleich zu Glukose (Glu) ohne und mit Zusatz der Cofaktoren.

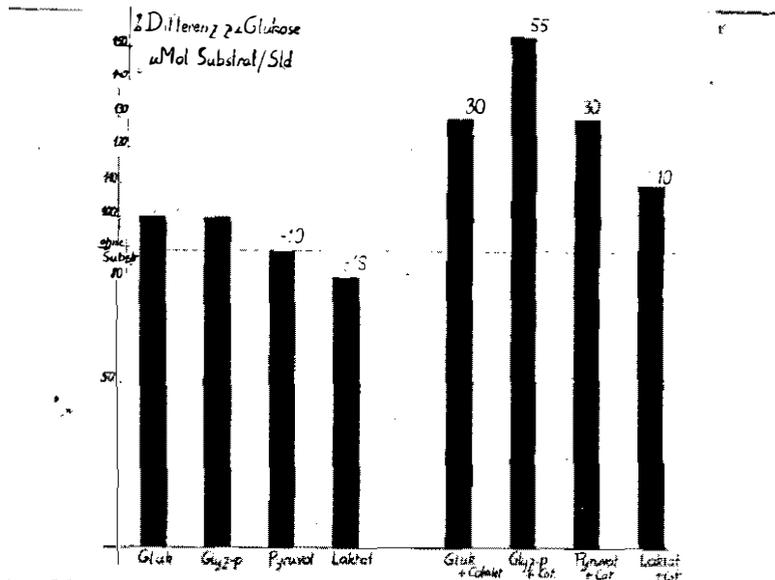


Abb. 8: Darstellung der Verbrennung von  $\beta$ -Glyzerinphosphorsäure (Glyz-p), Natriumpyruvat und Natriumlaktat in Vergleich zu Glukose ohne und mit Zusatz der Cofaktoren.

In den Abbildungen 7 und 8 ist der Umsatz nach Zugabe von niederen Fettsäuren und einigen anderen Substraten dargestellt. Die Fettsäuren zeigten keine signifikante Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs des Homogenats. Bemerkenswert ist, dass nach Zugabe von  $\beta$ -Glyzerinphosphorsäure (in Form ihres Natriumsalzes) + Cofaktoren eine 25%ige Erhöhung der Atmung eintrat.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung der mit den verschiedenen Substraten erhaltenen Ergebnisse. Die mit (F) gekennzeichneten Angaben beziehen sich auf Messungen an Mitteldarndrüsenhomogenaten von im Frühjahr gefangenen jungen Tieren.

Tabelle 2:

Substrat	% Differenz zu Glukose in $\mu\text{M}$ Substrat/Std	
	ohne Cofaktoren	mit Cofaktoren
Glukose	100	130
Galaktose	98	122
Fruktose	100	130
Ribose	94	112
Glykogen	100	130
Stärke	100	130
Glukose-6-phosphat	133	161
Ribose-5-phosphat	135	158
Fruktose-1,6-diphosphat	148	178
1(+)-Glutaminsäure	98	130
1(+)-Glutamin	100	120
1(+)-Asparaginsäure	119	145
" (F)	100	130
1(+)-Alanin (F)	100	130
Essigsäure	100	130
Propionsäure	91	120
Buttersäure	90	120
$\beta$ -Glyzerinphosphorsäure	100	155
Pyruvat	90	130
Laktat	82	110
Oxallessigsäure (F)	100	130

d) Hemmung der PGAD durch Alkylierung der SH-Gruppe mit JES.

Monojodessigsäure (JES) wirkt bekanntlich als Hemmstoff bei Reaktionen, an denen Fermente mit Sulfhydrylgruppen beteiligt sind. Die Phosphoglyzerinaldehyddehydrase

scheint nach RACKER und KRIMSKI (54) als prosthetische Gruppe Glutathion gebunden zu haben. Dadurch lässt sich die bekannte Hemmung der PGAD durch JES erklären. HOLZER (27, 28, 29) fand an Mäuseasciteszellen, dass  $4 \times 10^{-4}$  M JES die Glykolyse zum Erliegen bringt und die Atmung zu 55 % hemmt.

Die Atmung des Mitteldaradrüsenhomogenats von Wollhandkrabben wurde durch  $4 \times 10^{-4}$  M JES nur um 10 % verringert, durch  $4 \times 10^{-3}$  M JES um 20 % und erst durch  $10^{-2}$  M JES um 70 - 80 % (Abb. 9).

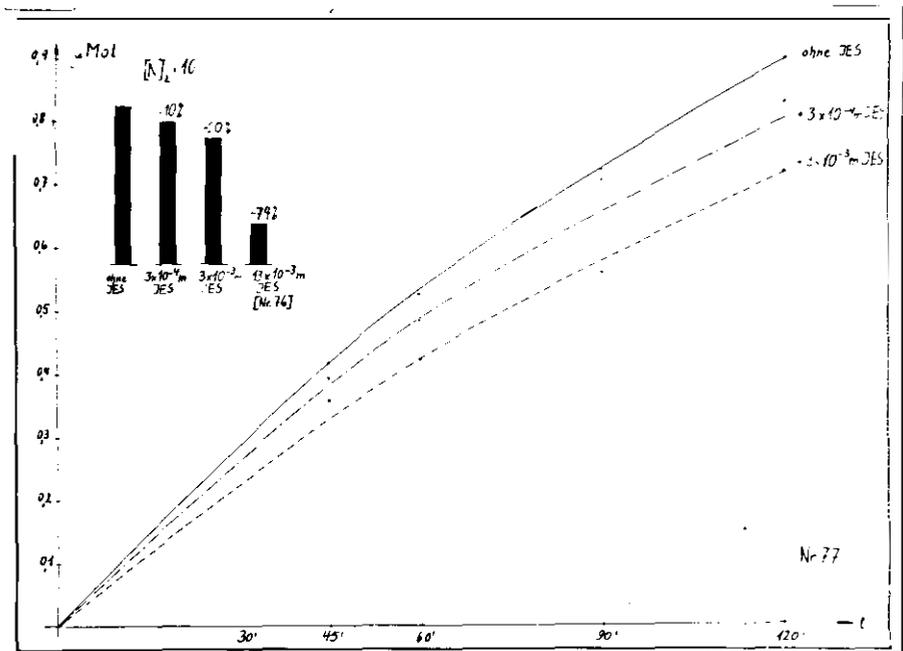


Abb. 9: Darstellung der Atmung des Mitteldaradrüsenhomogenats ohne und mit JES-Einwirkung in verschiedenen Konzentrationen.

8) Versuche zur Hexokinase-Aktivität.

Die Versuchsansätze wurden nach COLONICK und KAPLAN (10) zusammengestellt. Als Puffer dienten TRIS-Puffermischungen, die auf pH 7,2 gebracht waren. Pro Ansatz wurden wie üblich 0,4 ml Pufferlösung verwendet. Die Puffergemische setzten sich wie folgt zusammen:

<u>Puffergemisch TRIS I</u>		<u>Puffergemisch TRIS II</u>	
	<u>pro Ans.</u>		<u>pro Ans.</u>
Histidin 0,1 M	0,0167 M	0,2 M	0,033 M
Tris (MG 121,04)			
0,1 M	0,0167 M	0,1 M	0,0167 M
MgCl <sub>2</sub> 0,01 M	0,00167 M	0,01 M	0,00167 M
Trilon (MG 392)			
0,01 M	0,00167 M	0,1 M	0,00167 M

(= Dinatriumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure, Fa. Kali-Chemie AG. Hannover.)

Die Endkonzentration an zugesetzter Hexokinase betrug  $1,7 \times 10^{-6}$  M bzw.  $1,7 \times 10^{-5}$  M. Es wurde Hexokinase "Crude Type II from Yeast SIGMA Chemical Company, 48 000 KI Units/gm (25° C)" verwendet.

Folgende Versuchsansätze kamen zur Durchführung:

Homogenat	+ TRIS I	+ Glukose	+ Cofaktoren				
"	+ TRIS II	+	"	+	"		
"	+ Ph.P. pH 6,8	+	"	+	"	+ Hexokinase	$10^{-6}$ M
"	+ "	+	"	+	"	+	$10^{-5}$ M
"	+ TRIS I	+	"	+	"	+	$10^{-6}$ M
"	+ "	+	"	+	"	+	$10^{-5}$ M
"	+ TRIS II	+	"	+	"	+	$10^{-6}$ M
"	+ "	+	"	+	"	+	$10^{-5}$ M

Es zeigte sich, dass der Glukoseumsatz sämtlicher Versuchsansätze bei 0,95 µl/Std. lag. Weder die komplexbildenden Pufferbestandteile Trilon und Histidin noch die zugesetzte Hexokinase übten einen Einfluss auf die Atmung aus.

### 5) Die Fettphase.

Das Homogenat der Mitteldarmdrüse lässt sich mit der Runne-Zentrifuge bei 15 000 U/Min. in wässrige und Fettphase trennen. Dabei verteilt sich der Stickstoffgehalt etwa zu 16 % auf die Fettphase und 84 % auf die fettfreie Phase. Mit den getrennten Phasen wurden verschiedene Versuche durchgeführt, die der Feststellung dienen sollten, ob das Fett als Substrat verbrannt wird. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

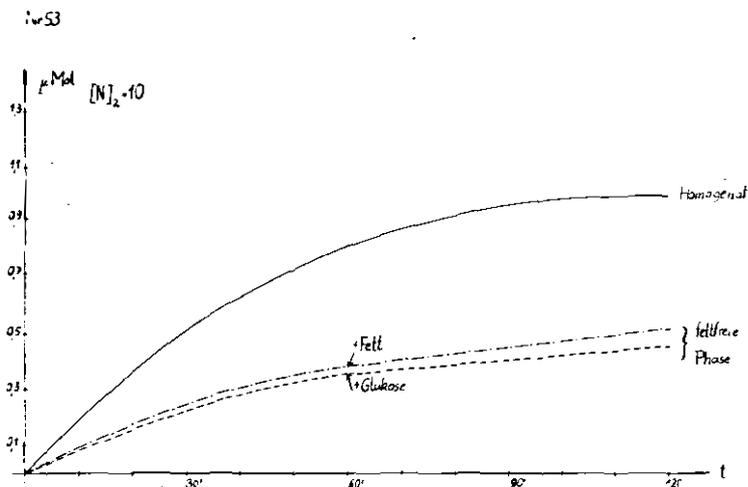


Abb. 10: Zur fettfreien Phase wurden nach einer Stunde sowohl Glukose wie unverdünnte Fettphase aus dem Seitenarm zugesetzt. Der Verlauf der Kurven zeigt, dass die Zusätze keine Erhöhung des Umsatzes bewirkten. Zum Vergleich wurde der Umsatz des Homogenats gemessen.

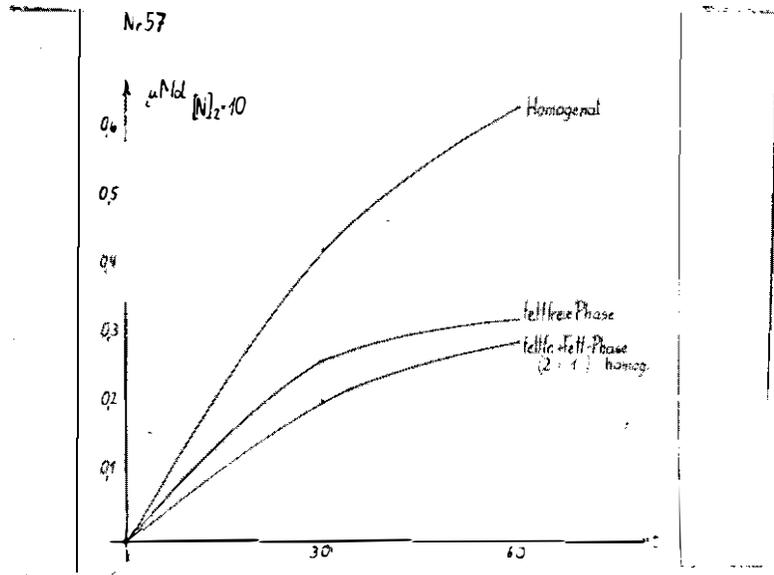


Abb. 11: Die durch Zentrifugieren getrennten Phasen wurden durch anschliessendes Homogenisieren wieder gemischt. Wie die Darstellung zeigt, führt die Aufbereitung des Homogenats zu einer weitgehenden Inaktivierung der Fermente, obwohl sämtliche Prozesse unter Eiskühlung vorgenommen waren.

7) Einfluss des Geschlechts auf die Atmungsaktivität der Mitteldarmdrüse.

Kontrollversuche, bei denen jeweils nur männliche oder weibliche Tiere verarbeitet wurden, dienten dazu, einen etwaigen Einfluss des Geschlechts auf die Atmungsaktivität des Homogenats festzustellen.

Die Durchschnittswerte von je sechs Messungen sind in Tabelle 3 angegeben. Aus ihnen geht hervor, dass der Sauerstoffverbrauch des Mitteldarmdrüsenhomogenats keinen geschlechtsspezifischen Unterschied aufweist.

Tabelle 3:

Homogenat der Mitteldaradrü- sen	Sauerstoffverbrauch $\gamma\text{l/h}/10 \text{ mg H}$	Glukoseumsatz $\mu\text{l/h}/10 \text{ mg H}$
♀ Tiere	72,5	0,540
♂ Tiere	72,0	0,535

b) Messungen unter anaeroben Bedingungen.

In einer Reihe von Messungen wurde untersucht, ob das Homogenat auch unter anaeroben Bedingungen Glukose abbaut (vgl. S. 8). Dabei konnte jedoch - selbst nach Zusatz der Cofaktoren ATP und DPN - eine Glykolyse nicht beobachtet werden.

2. Ergebnisse der Stickstoffbestimmungen.

Pro ml Homogenat der Mitteldaradrüse wurden 5 bis 9 mg Stickstoff nachgewiesen, d.h. pro Warburgansatz 9 bis 16 mg.

3. Ergebnisse der Glykogenbestimmungen.

Das Hydrolysat des aus der Mitteldaradrüse ausgefällten Glykogens bildete mikroskopisch gut erkennbare Glukosazonkristalle.

Die quantitativen Bestimmungen des Glykogens an 10 Tieren ergaben einen Gehalt zwischen 130 und 300 mg% bezogen auf Frischgewicht der Mitteldarndrüse, das entspricht 870 bis 2000 mg% bezogen auf Trockengewicht.

Eine Beziehung zwischen dem Glykogengehalt und der Hälterungsdauer, in der die Tiere keine Nahrung aufnahmen, konnte nicht festgestellt werden.

#### 4. Ergebnisse der ATP-, ADP- und AMP-Bestimmungen.

Bezogen auf das Frischgewicht der Mitteldarndrüse wurden bestimmt:

18 - 59 mg% ATP,  
20 - 37 mg% ADP,  
1 - 3 mg% AMP.

So fanden sich zum Beispiel in der Mitteldarndrüse eines Tieres, das in Dezember eine Woche gehältert worden war, folgende Mengen an Adenosinphosphorsäuren:

	<u>ATP</u>	<u>ADP</u>	<u>AMP</u>
y/ml Homogenat	91	130	9
y/g Mitteldarndrüse	182	260	18
y/mg Stickstoff	12,3	17,6	1,2

## 5. Ergebnisse der Zuckerchromatographie.

Die Ergebnisse der ein- und zweidimensionalen Zuckerchromatographie sind den Abb. 12 - 15 zu entnehmen. Aus ihnen geht hervor, dass im Homogenat der Mitteldarmdrüse zwar Glukose aber weder Galaktose noch Fruktose enthalten ist.

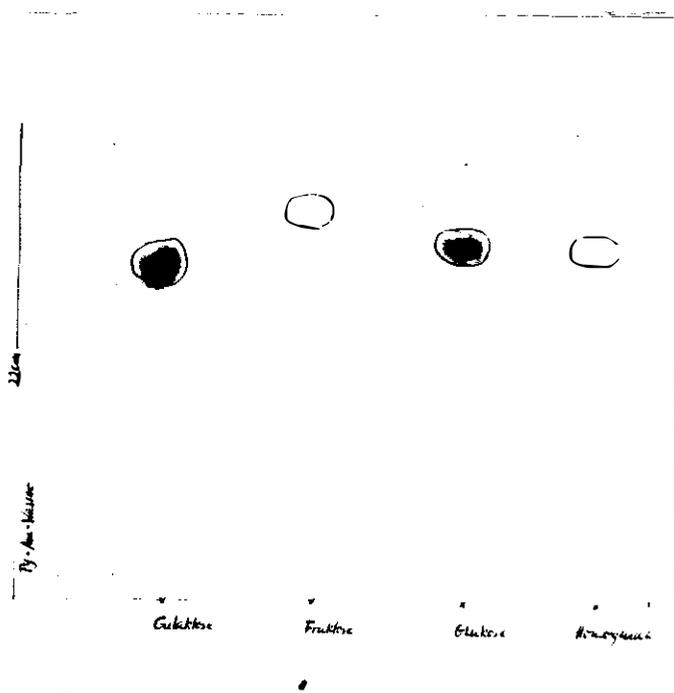


Abb. 12: Eindimensionales Chromatogramm nach Auftragen von 50  $\mu$ l Homogenatextrakt und je 10  $\mu$ l M/10 Vergleichslösung.

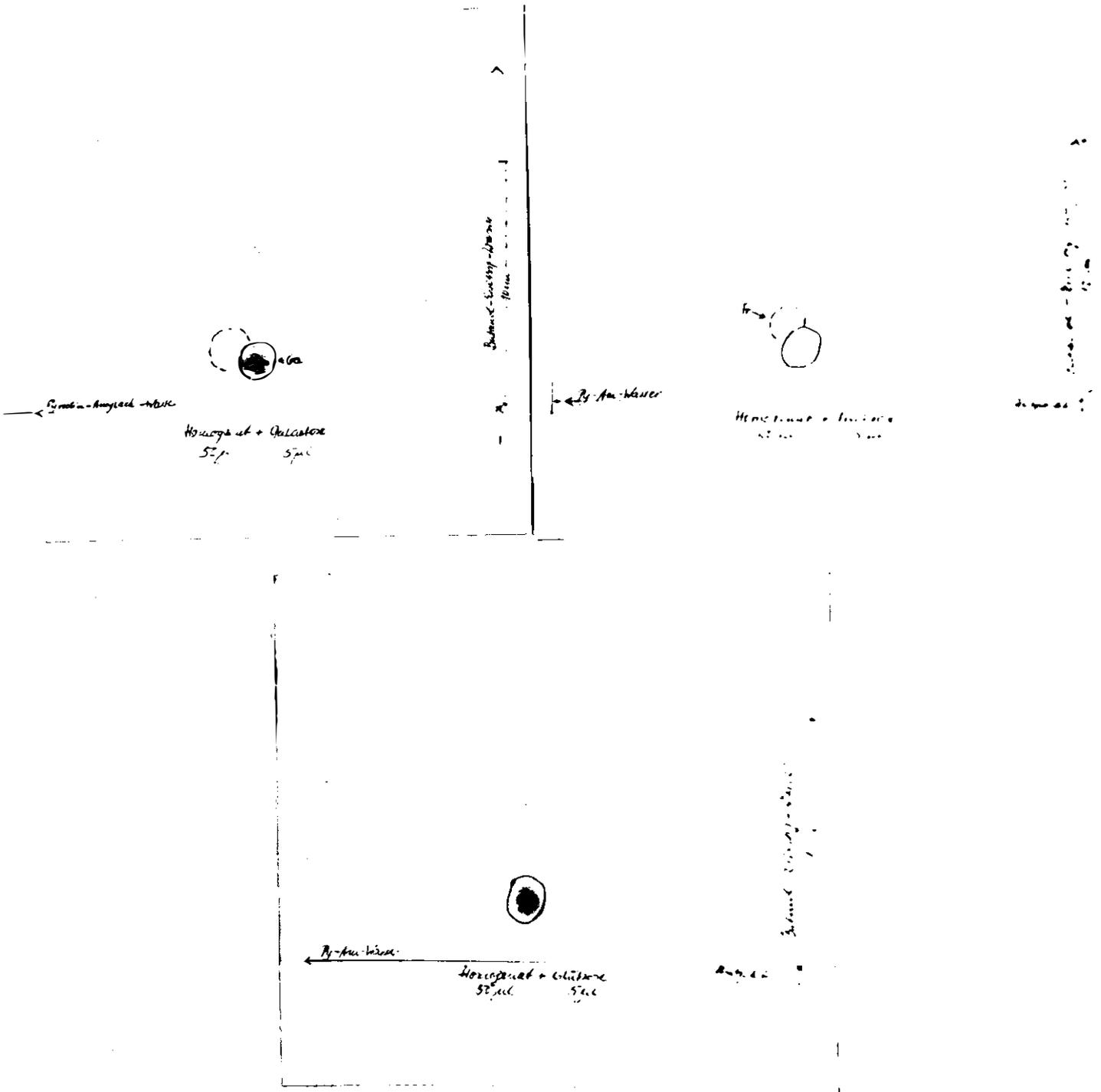


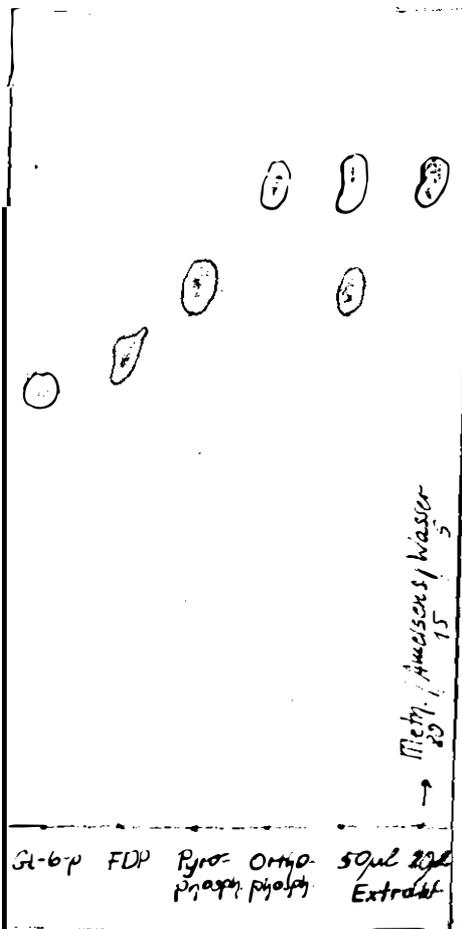
Abb. 13 - 15: Zweidimensionale Chromatogramme nach Aufbringen von je 50 µl Homogenatextrakt und je 5 µl M/10 Vergleichslösung.

6. Ergebnisse der Phosphatchromatographie.

Lösungsmittelgemische und Papiersorten wurden in erster Linie unter dem Gesichtspunkt einer möglichst schnellen Trennung der langsam laufenden Phosphorsäureester und Phosphate gewählt. Dieser Anforderung entsprachen die methanolhaltigen Phasen des Laufmittelpaares B (s. S. 20) sowie das Papier Schleicher + Schüll 2043 a II am besten. Für diese Papiersorte erwies sich die Vorbehandlung mit Trilon als überflüssig.

Die Chromatogramme zeigten nach Auftragen von 50-80 µl Homogenatextrakt die Anwesenheit von Ortho- und Pyrophosphat. In besonders grosser Menge liegt Orthophosphat vor, dieses erschien bereits beim Auftragen von 20 µl Extrakt.

ATP, ADP und AMP wurden nicht gefunden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit denen der enzymatischen Be-



stimmungen, die maximal 300 γ ATP, 200 γ ADP und 15 γ AMP pro ml Homogenat ergaben. Beim Auftragen von 0,08 ml Extrakt kamen in günstigsten Falle 50 γ ATP, 40 γ ADP und 1 γ AMP auf einen Fleck. Diese Mengen liegen unterhalb der Grenze der chromatographischen Nachweisbarkeit (s. S. 19). Mehr Extrakt konnte jedoch nicht aufgetragen werden, da sonst das in reichlicher Menge vorhandene Orthophosphat - auch in Gegenwart von Laurylamin - Schwanzbildung verursacht.

Ortho- und Pyrophosphat liessen sich bereits mit der eindimensionalen Chromatographie unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches Methanol/Ameisensäure/Wasser (80:15:5) hinreichend trennen (vgl. Abb. 16). Zuckerphosphorsäureester wurden nicht gefunden.

Abb. 16: Eindimensionale aufsteigende Chromatographie.

## D i s k u s s i o n d e r E r g e b n i s s e

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war u.a. den Nachweis zu führen, dass in der Mitteldarmdrüse - dem "Hepatopancreas" - Stoffwechselprozesse ablaufen, die denen der Leber der höheren Tiere vergleichbar sind. Da der Leber als einer der wichtigsten Prozesse die Energiegewinnung durch Verbrennung von Kohlehydraten und die Bildung von Reservekohlehydraten in Form des Glykogens neben anderen Stoffwechselprozessen zufällt, beschäftigten wir uns mit der Untersuchung des Abbaus von Kohlehydraten im "Hepatopancreas" der Wollhandkrabbe.

Auffällig war, dass eine anaerobe Glykolyse nicht beobachtet wurde. Das steht im Einklang mit den Beobachtungen von BALDWIN (1) an der Mitteldarmdrüse von *Helix pomatia* und von CHAPHEAU, THESIS und BORDEAUX an der Mitteldarmdrüse der Auster, wo nur ein sehr geringer anaerober Umsatz gefunden wurde.

Anders dagegen verhält es sich mit dem aeroben Kohlehydratabbau. Glukose, Fruktose, Glykogen und Stärke werden gleichgut verbrannt, Galaktose und Ribose fast in gleicher Höhe (vgl. Abb. 4). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den bei *Helix* gefundenen, wo BALDWIN (1) und auch MAY (43, 44) eine Bevorzugung der Galaktoseverwertung beobachteten.

Entsprechend den Erfahrungen bei Leberhomogenaten konnte der Umsatz durch Zugabe der Cofaktoren DPN, Cytochrom c und ATP gesteigert werden (vgl. Abb. 4 - 8). Hieraus dürfte zu schliessen sein, dass bei der Aufbereitung des Homogenats diese Cofaktoren in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt werden. Dagegen lässt sich den mit Cocarboxylase und Magnesiumionen in optimalen Konzentrationen durchgeführten Versuchen entnehmen, dass

beides in genügender Menge vorhanden sein dürfte, da der Zusatz keine Umsatzsteigerung bewirkte.

Der bessere Umsatz der phosphorylierten Zwischenstufen wie Glukose-6-phosphat, FDP etc. lassen die Vermutung aufkommen, dass entweder ein Mangel an ATP oder ein Mangel an den entsprechenden Fermenten bzw. an ihrer optimalen Aktivität vorliegen könnte. Der Zusatz von ATP zum Ansatz ergab zwar eine leichte Erhöhung des Umsatzes von Glukose, Fruktose und Glykogen, doch lag er auch dann noch mehr als 20 % unter dem der phosphorylierten Zwischenstufen (vgl. Abb. 5). Der Zusatz von ATP kann also den Unterschied nicht ausgleichen. Die ATP-, ADP- und AMP-Bestimmungen im Homogenat zeigten ferner, dass nicht unbeträchtliche Mengen an ATP sowie ADP vorhanden sind, so dass ein Mangel an ATP und ADP kaum die Ursache des geringeren Durchsatzes nichtphosphorylierter Zucker sein dürfte. Nun hängt der Umsatz nicht allein von den gefundenen ATP : ADP-Konzentrationen ab, sondern wird mitbestimmt von der Geschwindigkeit, mit der der ATP-Zyklus abläuft. Eine Verlangsamung des ATP-Umsatzes infolge einer verringerten ATP-asewirkung würde zwangsläufig eine verminderte Verbrennung zur Folge haben (LARDY und WELMAN (38), LARDY und COPPENHAVER (37), BUECHER (8)). Dabei spielt naturgemäss auch der Vorrat der Zellen an anorganischem Phosphat eine Rolle. Wie die Phosphatchromatographie ergeben hat, sind aber in den Zellen der Mitteldarndrüse grosse Mengen von Ortho- und Pyrophosphat vorhanden, so dass ein Mangel an anorganischem Phosphat nicht der begrenzende Faktor des Glukoseumsatzes sein kann.

Als weitere Ursachen hierfür sind ein Mangel an Hexokinase oder eine Hemmung beispielsweise durch Schwermetallionen in Betracht zu ziehen. Bekanntlich enthalten Meerestiere grössere Mengen von Kupfer. Bei den Crustaceen findet sich dieses vor allem in der

Mitteldarmdrüse, ganz analog zu den Verhältnissen in der Leber bei höheren Tieren. Während in vivo die feste Bindung des Kupfers an Eiweiss eine Umsatzhemmung verhindern dürfte, könnten durch die Aufbereitung des Homogenats Kupferionen in eine andere Bindungsform überführt werden und so eine Hemmung bewirken. Nach HELMANN (26) ist auch ein Uebergang des Kupfers aus der festen komplexen Bindung an Eiweiss in eine lockerere an andere Substanzen zu erwägen. Störende Schwermetallionen kann man durch Zusatz von Komplexbildnern beseitigen. Diesbezügliche Versuche mit Zusatz von Trilon und Histidin in geeigneten Konzentrationen zeigten jedoch keine Steigerung des Umsatzes nichtphosphorylierter Stufen. Auch der Zusatz von Hexokinase führte zu keiner Erhöhung des Umsatzes; demgemäss dürfte Hexokinase im Homogenat von vornherein in optimalen Konzentrationen vorhanden sein.

Es ist weiterhin möglich, dass ein grosser Teil der Glukose auf dem Wege des Horecker-Zyklus abgebaut wird. Die relativ gute Verwertung von Ribose-5-phosphat könnte in diesem Sinne gedeutet werden (vgl. Abb. 5). Auch die Hemmversuche mit Monojodessigsäure könnten dafür sprechen. Während HOLZER (29) an Asciteszellen von Mäusen bei einer Konzentration von  $4 \times 10^{-4}$  M JES schon eine 55 %ige Hemmung der Atmung feststellte, fanden wir bei Eriocheir bei einer Konzentration von  $3 \times 10^{-4}$  M nur eine 10 %ige Hemmung.

In manchen Fällen erfolgt die Deckung des Energiebedarfes weniger aus Kohlehydraten als aus Fettsäuren, wie zum Beispiel bei den Azetatflagellaten (LWOFF (41)). Deshalb wurden Versuche durchgeführt, bei denen dem Homogenat Fettsäuren zugesetzt wurden. Es ergab sich keine Erhöhung des Umsatzes. Dieses Ergebnis lässt allerdings keinen eindeutigen Schluss zu, da in dem fettreichen Homogenat freie Fettsäuren in genügender Menge vorhanden sein könnten. Als geschwindigkeitsbe-

grenzender Faktor könnte auch das Coenzym A fungieren, welches beim Fettsäureabbau eine Schlüsselstellung innehat. Ausserdem kann als umsatzbegrenzend eine zu geringe Konzentration an dem "sparking factor" des Zitronensäure-Zyklus, der Oxalessigsäure, in Betracht zu ziehen sein. Diese Auffassung wird besonders nahe gelegt durch Versuche, bei denen Asparaginsäure zugesetzt wurde. Bei diesen zeigte sich nämlich eine nahezu 20 %ige Umsatzerhöhung, die darauf zurückgeführt werden könnte, dass die Asparaginsäure durch Transaminasen in Oxalessigsäure umgewandelt wird. Dieses Ergebnis erhielten wir an Tieren, die im November gefangen und verarbeitet wurden. An Frühjahrstieren liess es sich jedoch nicht reproduzieren: Der Umsatz wurde weder durch Asparaginsäure noch durch Oxalessigsäure selbst beeinflusst. Hiernach scheinen Unterschiede im Intermediärstoffwechsel von jungen, im Frühjahr flussaufwärts wandernden und vier- bis fünfjährigen, im Herbst zum Laichen meerwärts ziehenden Tieren zu bestehen. Weitere Experimente müssten hier eine Klärung bringen.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass in Bezug auf den Kohlehydratstoffwechsel zweifellos Parallelen zu Funktionen der Leber der Wirbeltiere bestehen. Von diesem Sektor aus dürfte also die Bezeichnung der Mitteldarmdrüse als "Hepatopancreas" gerechtfertigt erscheinen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Eine anaerobe Glykolyse konnte nicht beobachtet werden.
2. Galaktose und Ribose werden fast in gleicher Masse wie Glukose, Fruktose, Glykogen und Stärke verbrannt.
3. Die Phosphorsäureester Glukose-6-phosphat und Ribose-5-phosphat werden zu 30 %, FDP zu 50 % besser umgesetzt als Glukose.  
ATP-Zusatz kann den Unterschied nur zum Teil ausgleichen.
4. Hexokinase scheint in optimaler Konzentration vorzuliegen.
5. Freie Fettsäuren und Aminosäuren zeigen keine Beeinflussung des Sauerstoffverbrauches des Homogenats.
6. Enzymatische Bestimmungen von ATP, ADP und AMP ergaben, bezogen auf das Frischgewicht der Mitteldarmdrüse:  
20 - 60 mg% ATP, 20 - 40 mg% ADP und 3 mg% AMP.
7. Ortho- und Pyrophosphat konnten in grossen Mengen papierchromatographisch nachgewiesen werden.
8. An freien Zuckern wurde in der Mitteldarmdrüse ausschliesslich Glukose papierchromatographisch nachgewiesen.
9. Die Mitteldarmdrüse von Hungertieren enthält 130 - 300 mg% Glykogen.
10. Die Untersuchungsergebnisse lassen für den Kohlehydratsektor die Bezeichnung "Hepatopancreas" als berechtigt erscheinen.

L i t e r a t u r

- 1) Baldwin, E. (1938): "On the Respiratory Metabolism of *Helix pomatia*"  
Biochem. J. 32, 1225.
- 2) Balls, H. (1926): "Tierwelt der Nord- und Ostsee" von  
Grimpe, G. und Wagler, E., X, S. X h 65/67.
- 3) Bandurski, R., Axelrod, B. (1951): "The Chromatographic  
Identification of Some Biological Im-  
portant Phosphate Esters"  
J. Biol. Chem. 193, 405/10.
- 4) Bernard, Claude (1853): "Recherches sur une nouvelle  
fonction du foie"  
Ann. Soc. Nat. Zool. 19, p. 335.
- 5) Boehringer : Biochemica "Boehringer", Bio 74.
- 6) " " " " , Bio 75.
- 7) Buddenbrock, W. v. (1956): "Vergleichende Physiologie"  
Bd. III, S. 159/176.
- 8) Bücher, Th. (1947): " A Phosphate-carrying Enzyme"  
Biochim. et Biophys. Acta 1, 292-314  
(1947). - Ref. C.A. 42, 4627 g (1948).
- 9) " (1953): "Probleme des Energietransports inner-  
halb lebender Zellen"  
Advances in Enzymology XIV, 1.
- 10) Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (1955): "Animal Tissue Hexo-  
kinases"  
Methods in Enzymology, New York, Vol. I,  
p. 277/78.
- 11) Cramer, F. (1954): "Papierchromatographie", Verlag Chemie,  
Weinheim a. d. B., S. 31, S. 81.
- 12) Datta, S. P., Dent, C. E., Harris, H. (1950): "Apparatus  
for Mass-Production Two-Way-Paper-  
Chromatography"  
Biochem. J. 46, xlii.

- 13) Delaunay, H. (1927): "Sur l'excrétion azotée des invertébrés", Thèse. Faculté Bordeaux.
- 14) Degkwitz, E. (1955): "Ein Beitrag zur Proteolyse gesunder und sacculinisierter Strandkrabben (*Carcinus maenas*)". Dissertation Hamburg.
- 15) Dreywood, R. (1946): "Qualitative Test for Carbohydrate Material"  
Ind. Eng. Chem., (Anal. Ed.) 18, 499.
- 16) Drilhon, A. (1935): "Etude biochimique de la Mue chez les Crustacés Brachyours (*Maia Squinado*)"  
Ann. Phys. 11, 301.
- 17) Eggleston, V.L., Hems, R. (1952): "Separation of Adenosine Phosphates by Paper Chromatography"  
Biochem. J. 52, 156.
- 18) Fleckenstein, A., Janke, J. (1953): "Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP u. a. Phosphorverbindungen"  
Arch. ges. Phys. 258, 177-199.
- 19) Florkin, M., Duchateau, G. (1953): "Les formes du système enzymatique de l'uricolylase et l'évolution du catabolisme purique chez les animaux"  
Arch. Intern. Physiol. 53, 267.
- 20) Frenzel, I. (1885): "Über die Mitteldarmdrüse (Leber) der Mollusken"  
Arch. Mikr. Anat. 25, 48-84.
- 21) Goulden, C.H. (1952): Methods of Statistical Analysis, Second Edition, New York, J. Wiley + Sons, S. 9.
- 22) Hammarsten, O. (1885): "Studien über Mucin und mucinähnliche Substanzen"  
Pflügers Archiv 36, 373.
- 23) Hanes, C.S., Isherwood, F.A. (1949): "Separation of the Phosphoric Esters on the Filter Paper Chromatogram". Nature 164, 1107.

- 24) Heerdt, P.F.v., Krijgsman, B.J. (1940): "Die Regulierung der Atmung bei *Eriocheir sinensis* Milne Edwards"  
Z. vgl. Phys. 27, 29-41.
- 25) Heidermanns, C. (1938): "Der Exkretstoffwechsel der wirbellosen Tiere"  
Naturwissenschaften 26, 263-67, 279-82.
- 26) Heimann, W. (1958) Diskussionstagung d. Forschungskreises d. Ernährungsbeirates, Bad Godesberg, 1958.
- 27) Holzer, H., Holzer, E., Schultz, G. (1955): "Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung I"  
Biochem. Z. 326, 385-404.
- 28) " , Haan, I., Schneider, S. (1955): "Zum Mechanismus des anaeroben Glukose- und Fruktose-Abbaues im Mäuse-Ascites-Carcinom"  
Biochem. Z. 326, 451 - 463.
- 29) " , Haan, I., Pette D. (1955): "Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung II"  
Biochem. Z. 327, 195-201.
- 30) Hoppe-Seyler, F. (1877): "Ueber Unterschiede im chem. Bau und in der Verdauung höherer und niederer Tiere"  
Pflügers Archiv 14, 395.
- 31) Jordan, H. (1904): "Die Verdauung u. der Verdauungsapparat des Flusskrebsses"  
Arch. ges. Phys. 101, 263.
- 32) " (1913): "Vergleichende Physiologie wirbelloser Tiere"  
Fischer Jena, Bd. 1, S.23, S. 396.
- 33) Kirch, J.B. (1886): "Das Glykogen in den Geweben des Flusskrebsses". Dissertation Bonn.
- 34) Klingmüller, V., Erdmann-Müller, J., Rausch-Stroomann, J.-G., Brune, G. (1955): "Schnellbestimmung wasserdampf-flüchtiger Stoffe"  
Arzneim.-Forsch. 5, 105-109.

- 35) Kröncke, A. (1956) - Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Universität Hamburg: "Phosphorsäureesterchromatographie", private Mitteilung.
- 36) Krüger, P. Graetz, E. (1928): "Die Fermente des Flusskrebs-Magensaftes"  
Jahrb. Zool., Allg. Zool., 45, 462.
- 37) Lardy u. Coppenhaver: "Oxydative Phosphorylations: Pathways and Yield in Mitochondrial Preparations". J. Biol. Chem. 195, 225-238.  
(1952)
- 38) Lardy u. Welam: "Oxydative Phosphorylations: Role of Inorganic Phosphate and Acceptor Systems in Control of Metabolic Rates". J. Biol. Chem. 195, 215 - 224.  
(1952)
- 39) Leuthardt, F. (1957): "Lehrbuch der Physiol. Chemie", Berlin, S. 528, S. 662-667.
- 40) " " " , S. 662-667
- 41) Lwoff, A. (1951): "Biochemistry and Physiology of Protozoa", Vol. I., New York, S. 54-79.
- 42) Mansour-Bek, J.J. (1932): "Die proteolyt. Enzyme von Maja squinado"  
Z. vgl. Phys. 17, 153-205.
- 43) May, F. (1931): "Beitrag zur Kenntnis des tierischen Sinistrins"  
Z. Biol. 91, 215.
- 44) " (1934): "Chemische und biologische Untersuchungen über Galaktogen- und Glykogengehalt bei hungernden Weinbergschnecken"  
Z. Biol. 95, 401.
- 45) Mollitor, A. (1937): "Exkretstoffwechsel u. Exkretion von Eriochair sinensis"  
Jahrb. Zool., Allg. Zool. 57, 323.

- 46) Morris, D.L. (1948): "Quantitative Determination of Carbohydrates with Dreywood's Anthrone Reagent"  
Science 107, 254.
- 47) Negelein, E., Haas, E. (1935): "Ueber die Wirkungsweise des Zwischenfermentes"  
Biochem. Z. 282, 206.
- 48) Numanoi, H. (1939): "The Hepatopancreas in Relation of the Molting of *Ligia exotica*"  
Japan. J. Zoöl. 8, 365-369. Ref. C.A. 34, 4467 (1940).
- 49) Olthoff, H.I. (1936): "Ueber die Luftatmung von *Eriocheir sinensis* M.-E."  
Z. vgl. Phys. 23, 293-300.
- 50) Panning, A. (1952): "Die Chines. Wollhandkrabbe"  
Neue Brehmbücherei Leipzig.
- 51) Partridge, S.M. (1949): "Aniline Hydrogen Phthalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars"  
Nature 164, 443.
- 52) Peters, N., Panning, A. (1933): "Die Chines. Wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis* H.M.-E."  
Zool. Anz. Ergänz. Bd. zu 104.
- 53) Pflüger, E.F.W. (1905): "Das Glykogen", Bonn, p. 53.
- 54) Racker, E., Krimsky, I. (1952): "Mechanism of Action of Glycerinaldehyd-3-phosphate-dehydrogenase"  
Nature 169, 1043.
- 55) Ranke, E. (1957): "Der Einfluss der Lagerung a.d. freien Aminosäure u. Peptide bei Lengfisch (*Molva vulgaris*), Seelachs (*Gadus vireus*) u. der Miesmuschel (*Mytilus edulis*)". Dissertation Hamburg.

- 56) Rauen, H.M. (1956): Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag, S. 1129.
- 57) Rees, K.K. (1953): "Aerobic Metabolism of the Hepatopancreas of *Helix pomatia*"  
Biochem. J. 55, 473-84.
- 58) Sattler, L., Zerban, F.W. (1948): "The Dreywood Anthrone Reaction as Affected by Carbohydrate Structure"  
Science 108, 207.
- 59) Schlieper, C. (1955): "Praktikum der Zoophysiologie", Stuttgart, S. 4.
- 60) Schönborn, E., Graf v. (1911): "Beiträge zur Kenntnis des Kohlehydratstoffwechsels bei *Carcinus maenas*"  
Z. Biol. 55, 70.
- 61) Schubert, K. (1938): "Häutung, Wachstum und Alter der Wollhandkrabbe"  
Mitt. Hbg. Zool. Mus. 47, 83-104.
- 62) Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., Muntwyler, E. (1950): "The Estimation of Glykogen with the Anthrone Reagent"  
Arch. Biochem. 25, 191.
- 63) Shinoda, O. (1928): "Ueber die eiweisslösenden Enzyme im Magensaft von *Astacus*"  
Z. vgl. Phys. 2, 323-64.
- 64) Snellman, O., Gelotte, B. (1951): "Paper Chromatography of Adenosine Phosphates"  
Nature 168, 461, Ref. C.A. 46, 3589f (1952).
- 65) Thiel, H. (1938): "Die allgemeinen Ernährungsgrundlagen der Wollhandkrabbe"  
Mitt. Hbg. Zool. Mus. 47, S. 50-64.

- 66) Umbreit, W.W., Burris, K.H., Stauffer, I.F. (1949):  
"Manometric Techniques and Tissue Metabolism", Minneapolis, S. 59.
- 67) " " " " , S. 26/27.
- 68) Vonk, H.J. (1942): "Das Vorkommen einer Gallensäure  
(Taurocholsäure) im Verdauungssaft des  
Flusskrebsees (*Potamobius leptodactylus*)  
und ihre Bedeutung für die Fettresorption"  
Proc. Nederl. Akad. Wetensch. Amsterdam  
45, S. 752-57.
- 69) Warburg, O., Christian, W., Griese, A. (1935): "Wasser-  
stoffübertragendes Co-Ferment, seine Zu-  
sammensetzung und Wirkungsweise"  
Biochem.Z. 282, 157.
- 70) Weber, M. (1880): "Ueber den Bau und die Tätigkeit der  
sog. Leber der Crustaceen"  
Arch. f. mikr. Anat. 17, 385.
- 71) Wiersma, C.A.G., van der Veen, R. (1928): "Die Kohle-  
hydratverdauung bei *Astacus fluviatilis*"  
Z. vgl. Phys. 7, 269-78.

Die Anregung zu der Arbeit verdanke ich Herrn Privatdozenten Dr. BRAMSTEDT, Hamburg. Die Ausführung der Untersuchungen im Rahmen einer Doktorarbeit wurde von Herrn Professor Dr. SCHLIEPHER, Kiel, sehr befürwortet, da auch er seit langen Jahren der Ansicht ist, dass der Stoffwechselphysiologie mariner Invertebraten grössere Beachtung geschenkt werden müsste.

Die Durchführung der Arbeit erfolgte mit der freundlichen Erlaubnis von Herrn Professor Dr. KUFENAU im Institut für Physiologische Chemie der Universität Hamburg unter der ständigen Beratung von Herrn Privatdozenten Dr. BRAMSTEDT. Ich möchte an dieser Stelle beiden Herren meinen herzlichen Dank sagen.

Ausserdem habe ich zu danken für eine fördernde Diskussion der Untersuchungen in gemeinsamen Gesprächen, die zwischen Herrn Professor Dr. SCHLIEPHER, Herrn Privatdozenten Dr. BRAMSTEDT und mir im Institut für Meereskunde der Universität Kiel stattfanden.

Auch Herrn Fischermeister WENZEL, Hamburg-Altona, möchte ich meinen wärmsten Dank aussprechen für die nimmermüde Beschaffung des Tiermaterials.

Lebenslauf

Am 4. 6. 1930 wurde ich als erstes Kind des Mittelschullehrers Otto Maehl und seiner Ehefrau Charlotte geborene König in Dessau geboren. Von Ostern 1937 bis zum Juli 1949 besuchte ich in Dessau die Grund- und Oberschule mit dem Abschluss der Reifeprüfung. Meine anschließende Bewerbung zum Studium an der Universität Halle wurde aus politischen Gründen abgelehnt. Bis zum Herbst 1950 war ich als medizinische Praktikantin in den Dessauer Krankenanstalten tätig. Zum Wintersemester 1950 genehmigte man meine zweite Studienbewerbung, allerdings nicht wie gewünscht zur Naturwissenschaftlichen, sondern zur Pädagogischen Fakultät: Sechs Semester lang war ich in Halle Studentin der Pädagogik mit den Fächern Biologie und Chemie. Im August 1953 siedelten wir nach Bremerhaven über. Ab Wintersemester 1953 studierte ich erst in Hamburg, dann in Kiel Naturwissenschaften mit dem Hauptfach Zoologie.