

Stoffwechsel während der Embryonal- und Jugendentwicklung der Lungenschnecken

HANS-JOACHIM HORSTMANN

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

ABSTRACT: Metabolism during embryonic and early post-embryonic development. The embryonic development of the snail *Lymnaea stagnalis* may be divided into three main stages: (a) cleavage and gastrulation, (b) larvae and (c) older embryos with beating hearts. During these three stages the following were measured: respiration by means of a Cartesian diver apparatus, embryo dry weight by means of a quartz fiber balance, and activity of β -galactosidase (enzymatically with o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as substrate). During stages b and c a two-phase exponential increase occurs in respiration, in dry weight and in the activity of β -galactosidase. Change of phases coincides with the beginning of heart beats. The increase of enzyme activity is explained by assuming a hormonal regulation of the activity of the genes responsible for enzyme synthesis. During stage a only respiration rises exponentially; activity of β -galactosidase is not demonstrable.

EINLEITUNG

Die Entwicklung der Metazoen vom Ei zum Organismus ist ein Geschehen, das immer wieder das Interesse der Biologen beanspruchen wird, da es eine Fülle ungeklärter Probleme birgt. Neben dem augenfälligen Gestaltwandel und der morphologischen Differenzierung stehen Fragen nach einer „chemischen Entwicklung“ des heranwachsenden Lebewesens. Bevorzugte Objekte für derartige Untersuchungen waren vor allem die Embryonen von Echinodermen, Amphibien und Hühnern.

Dieses Symposium hat sich zur Aufgabe gestellt, die quantifizierenden Bedingungen des Stoffwechsels zu erörtern. Wenn wir nach derartigen Bedingungen bei Entwicklungsvorgängen suchen, so ist von vornherein klar, daß hier der Stoffwechsel gerade durch seine Veränderung imponiert. Es kann sich also nicht nur darum handeln, festzustellen, wie groß der Stoffwechsel während eines Entwicklungsstadiums ist, sondern vielmehr auch darum, ob seine beobachtbare Veränderung Gesetzmäßigkeiten aufweist. Hieraus könnten Rückschlüsse auf ein Wirken endogener Parameter gewonnen werden. Dieser Frage sind wir bei den Lungenschnecken *Lymnaea stagnalis* und *Helix pomatia* nachgegangen.

ERGEBNISSE

Eine dieser veränderlichen Größen ist der Sauerstoff-Verbrauch, der Aussagen über den Energiebedarf während der Entwicklung gestattet. Während der Furchung und Keimblätterbildung beobachtet man bei der Schlammschnecke *Lymnaea stagnalis*

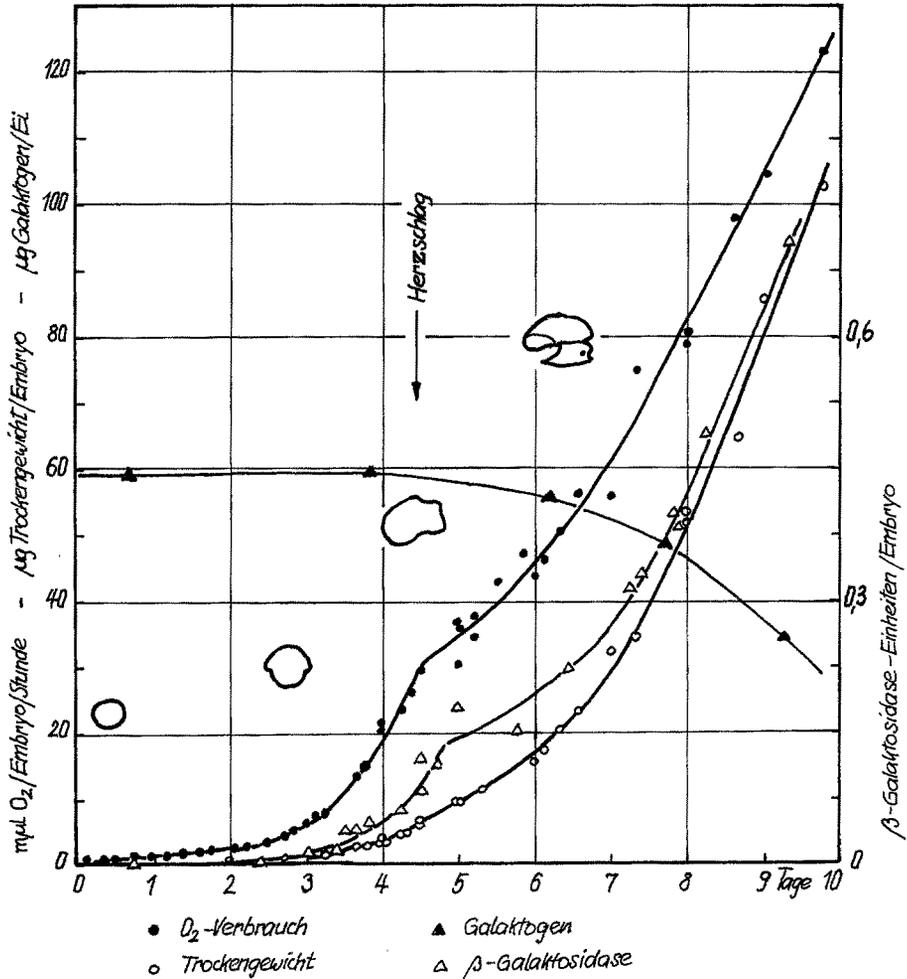


Abb. 1: Sauerstoff-Verbrauch (●), Trockengewicht (○) und β -Galaktosidase-Gehalt (△) der Embryonen von *Lymnaea stagnalis* während der Entwicklung im Ei. Galaktogengehalt des Eies mit Embryo (▲)

einen kontinuierlichen Anstieg der Atmung (HORSTMANN 1958) (Abb. 1). Eine während der Furchungsteilungen gesteigerte Respiration, wie sie von ZEUTHEN (1950a, b) bei *Urechis* und *Psammochinus* gefunden wurde, war bei der Schlammschnecke nicht feststellbar. Desgleichen kommt es bei der Gastrulation nicht zur Ausbildung eines

Plateaus in der Atmungskurve wie bei Amphibien (TUFT 1953). Das Trockengewicht der Embryonen bleibt während der Furchung konstant, steigt nach der Gastrulation geringfügig, dann nach Ausbildung der Trochophora-Larve stark an. Zu dieser Zeit erfolgt auch eine weitere Steigerung der Rate des Sauerstoff-Verbrauches. Es beginnt nun eine neue Phase der Entwicklung, die mit dem Übergang der Veliger-Larve in die sich allmählich ausformende endgültige Schneckengestalt beendet wird. Der Anfang dieser neuen – nunmehr dritten – Entwicklungsphase wird durch das Einsetzen der Herz­tätigkeit gekennzeichnet. Die Zuwachsrate des Sauerstoff-Verbrauches ist jetzt gegenüber dem vorherigen Entwicklungsabschnitt verringert.

Die Biochemie der Lungenschnecken zeigt nun eine Besonderheit: Die Eikapsel­flüssigkeit, welche den Embryo umgibt und die er vom Gastrula-Stadium an fort­schreitend in sich aufnimmt, enthält ein spezifisches Polysaccharid, das Galaktogen genannt wird (MAY 1931, 1932, 1934), da es ausschließlich aus Galaktose-Einheiten aufgebaut ist. Glykogen fehlt dagegen völlig. Dieses Polysaccharid haben wir ein­gehend bei der Weinbergschnecke untersucht. Es hat ein Molekulargewicht von etwa 4 Millionen. Der Abbau erfolgt durch Spaltung mit dem Ferment β -Galaktosidase. Die freigesetzte Galaktose wird in der von LELOIR (1951) bei der Hefe entdeckten Reaktionsfolge durch eine Kinase phosphoryliert, an Uridindiphosphat gebunden und zu Glukose epimerisiert. Bei der Weinbergschnecke erfolgt dieser Abbau erst, nachdem die jungen Schnecken geschlüpft sind. Bei der Schlamm­schnecke beginnt dagegen der Abbau bereits während der Larvenentwicklung (HORSTMANN 1956). Wir haben nun die Aktivität des abbauenden Fermentes, der β -Galaktosidase, bei der *Lymnaea* ver­folgt (HORSTMANN 1964). Zur Zeit der Furchung und Keimblätterbildung ist keine Aktivität meßbar. Erst mit Beginn des Trochophora-Stadiums steigt die Aktivität an und erreicht im Laufe der weiteren Entwicklung erhebliche Werte (Abb. 1).

Die während der Embryonalentwicklung beobachtete Zunahme von Sauerstoff­verbrauch, Trockengewicht und β -Galaktosidase-Aktivität können wir als Auswir­kungen des Wachstums ansehen. Derartige Prozesse verlaufen häufig nach der Ex­ponentialfunktion $x = ae^{kt}$, d. h. der in der Zeiteinheit zu beobachtende Zuwachs ist proportional dem jeweils vorhandenen Bestande (vgl. ATLAS 1938, MOOG 1944, BOELL 1955). Wollen wir prüfen, ob diese Beziehung auch für unsere Werte gilt, so müssen wir die Logarithmen der Meßwerte gegen die Zeit auftragen. Solange der Wert von k in der Gleichung unverändert ist, ordnen sich die Werte in einer Geraden an. Ände­rungen der Konstanten führen zu Knicken in der Geraden.

Man erkennt in der Abbildung 2, daß die Kurve des Sauerstoff-Verbrauches bei dieser semilogarithmischen Darstellung aus 3 geraden Teilstücken zusammengesetzt ist. Die einzelnen Abschnitte entsprechen den Entwicklungsphasen der Furchung und Keimblätterbildung, der Larvenstadien und dem älteren Embryo nach Beginn der Herz­tätigkeit. Ähnliche Beziehungen gelten auch für das Trockengewicht. Ein exponen­tielles Wachstum kann jedoch nur für die beiden letzten Phasen der Entwicklung fest­gestellt werden. Am letzten Tag vor dem Schlüpfen weicht der Wert von der Geraden ab, vermutlich weil die Embryonen nicht mehr genügend Nahrung in dem fast leer­gefressenen Ei finden. Vergleicht man die Kurve der β -Galaktosidase mit diesen Befunden, so findet man überraschenderweise ebenfalls eine Zweigliederung der Kurve, nämlich eine schnelle exponentielle Vermehrung des Enzyms während der Larven-

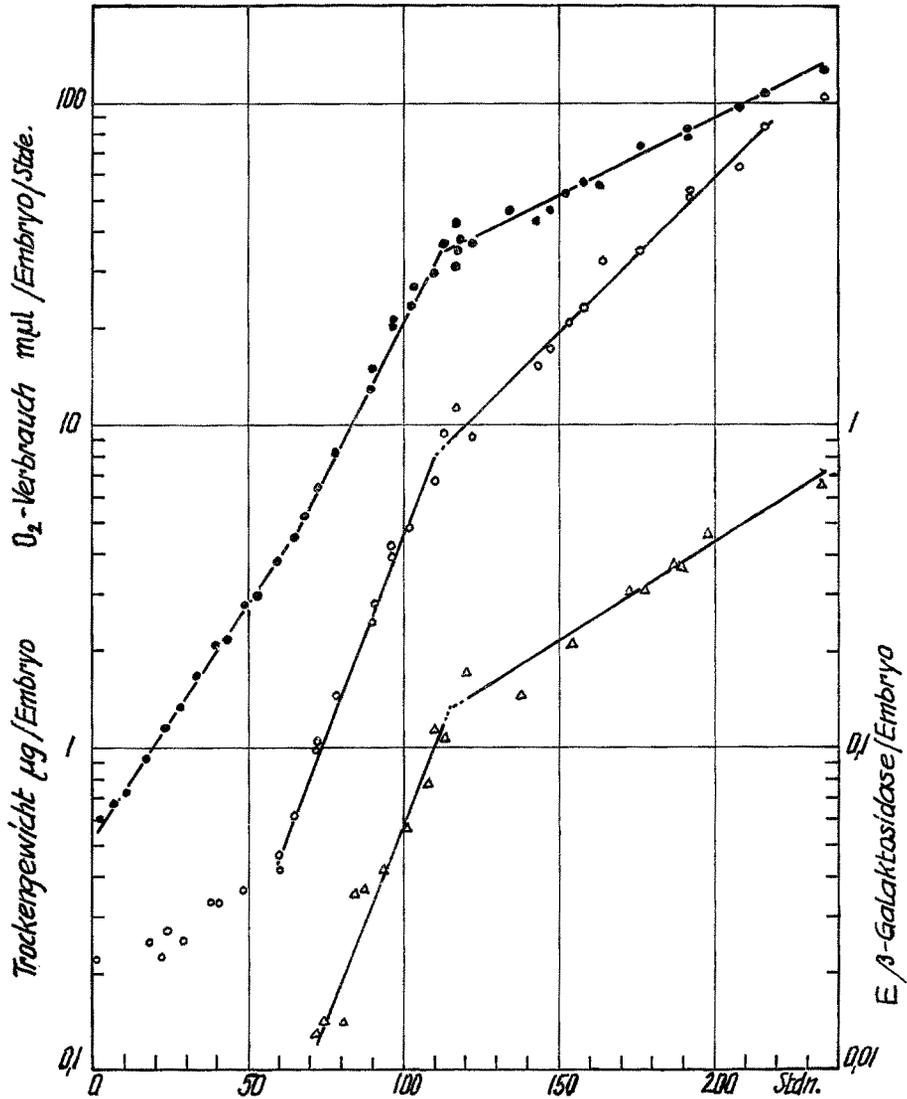


Abb. 2: Semilogarithmische Darstellung des Sauerstoff-Verbrauches (●), des Trockengewichts (○) und des β -Galaktosidasegehalts (Δ) der Embryonen von *Lymnaea stagnalis*. Abszisse: Alter der Embryonen

stadien und ein langsames, aber ebenfalls exponentielles Wachstum nach Beginn der Herztätigkeit.

Vor die Aufgabe gestellt, diese Beobachtungen zu deuten, müssen wir unsere Aufmerksamkeit auf zwei Phänomene richten, nämlich auf das exponentielle Wachstum innerhalb eines Entwicklungsabschnittes und auf die Änderung dieser Zuwachsrates beim Übergang in eine neue Entwicklungsphase.

Betrachten wir zunächst den Sauerstoff-Verbrauch. Die aerobe Glykolyse ist nach unseren Untersuchungen während der Embryonalentwicklung der Schlammschnecke ohne große Bedeutung (HORSTMANN 1960). Wir dürfen daher annehmen, daß der Energiebedarf der Embryonen in den drei Entwicklungsphasen von der oxydativen Phosphorylierung gedeckt werden muß. Der Durchsatz durch die Atmungskette wird von der jeweils anfallenden Konzentration an ADP geregelt werden, denn eine Limitierung der Atmung durch unzureichende Konzentrationen der Atmungsfermente ist wenig wahrscheinlich. Ein exponentieller Anstieg der Atmung würde danach bedeuten, daß der in der Zeiteinheit erfolgende Zuwachs des Energiebedarfs der Embryonen proportional ist der Größe des Energiebedarfs in dem jeweiligen gerade verflossenen Zeitabschnitt.

Dieser Bedarf wird weitgehend von den Syntheseleistungen der Embryonen beansprucht werden. Lokalisieren wir diese Leistungen im stoffwechsel-aktiven Cytoplasma, so bedeutet dies, daß seine Aktivität proportional dem jeweiligen Bestande zunimmt, wobei nicht notwendigerweise an einen entsprechenden Volumen- oder Massenzuwachs dieses Cytoplasmas gedacht werden muß. Es könnte sich auch um eine Differenzierung der Mitochondrien und Mikrosomen handeln, wie sie von STRITTMATTER (1963) bei Hühnerembryonen gefunden wurde.

Eine exponentielle Vermehrung der β -Galaktosidase wäre gegeben, wenn die Syntheserate des Enzyms von der bereits vorhandenen Enzymmenge abhängig ist. Derartige autokatalytische Synthesen wurden bei mehreren Enzymen der Hefe (SPIEGELMAN 1951) und bei der β -Galaktosidase von *Escherichia coli* (COHN & HORIBATA 1959) beobachtet. Zur Deutung wurde von MONOD & JACOB (1962) ein Rückkopplungsmodell vorgeschlagen, nach welchem das Enzym auf den Induktor oder das Substrat so einwirkt, daß das entstehende Produkt die Bildung des Repressors hemmt, womit die Synthese gefördert wird (Abb. 3). Es wäre vorstellbar, daß die beim Abbau

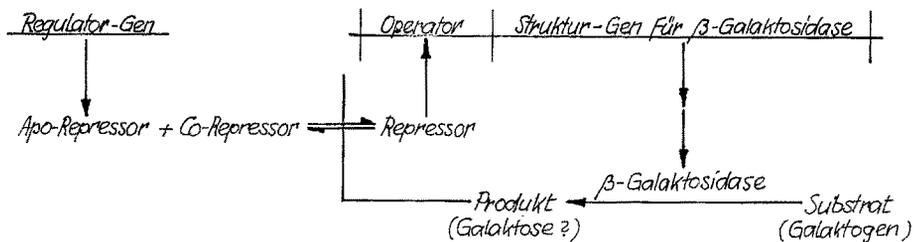


Abb. 3: Schema für eine autokatalytische Synthese der β -Galaktosidase

des Galaktogens entstehende Galaktose oder eines ihrer Folgeprodukte in diesem Sinne wirkt. Das Enzym würde damit mittelbar zum Induktor seiner eigenen Synthese.

Diese Deutung kann jedoch nicht die Änderung der Syntheserate beim Übergang zur nächsten Entwicklungsphase erklären. Hier spielen vermutlich dem zelleigenen System übergeordnete Steuervorgänge eine Rolle. Anknüpfungspunkte für diese Vorstellungen liefern die Beobachtungen an den polytären Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsen der Dipteren. Diese besitzen aufgelockerte und aufgeblähte Bereiche, sog. Puffs und Balbiani-Ringe, welche sich als Orte einer intensiven Synthese von

Ribonucleinsäure erwiesen haben (vgl. BEERMANN 1963). Das Verteilungsmuster der Puffs ist nicht nur für die einzelnen Organe, sondern auch für die verschiedenen Entwicklungsphasen der Dipteren spezifisch. Es ist ferner durch Stoffe beeinflussbar, die von außen auf den Kern einwirken. So beobachtete KROEGER (1960) gesetzmäßige Abwandlungen des Puffspektrums in isolierten Speicheldrüsenkernen von *Drosophila*, wenn er diese in homogenisiertem Ei-Cytoplasma inkubierte. Eier verschiedener Entwicklungsstadien erzeugten dabei verschiedene Puffspektren. Weiterhin konnten CLEVER & KARLSON (1960) zeigen, daß das Häutungshormon Ecdyson bei *Chironomus* 2 bestimmte Puffs induziert. Größe und Beständigkeit der Puffs waren von der Hormonkonzentration abhängig.

Möglicherweise ist daher die phasenabhängige Änderung der Syntheserate der β -Galaktosidase, die wir bei der *Lymnaea* beobachten können, auf eine hormonale Steuerung der verantwortlichen Gene zurückzuführen. Die zeitliche Übereinstimmung von Phasenänderung und Einsetzen der Herztätigkeit spricht dafür, daß das wirksame Agens mit der pulsierenden Hämolymphe vom Ort seiner Entstehung an die einzelnen Zellen des Embryos gelangen kann. Diese Deutungen erwarten jedoch noch die experimentelle Überprüfung.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei Embryonen von *Lymnaea stagnalis* wurden Sauerstoffverbrauch, Trockengewicht und Aktivität der β -Galaktosidase gemessen, und zwar während der Furchung und Keimblätterbildung (*a*), bei den Larven (*b*) und bei älteren Embryonen nach Beginn der Herztätigkeit (*c*).
2. Jede dieser Meßgrößen zeigte während der Entwicklungsabschnitte *b* und *c* einen zweiphasigen exponentiellen Anstieg, wobei die Phasenänderung mit dem Einsetzen der Herztätigkeit erfolgte.
3. Im Entwicklungsabschnitt *a* stieg nur der Sauerstoffverbrauch exponentiell an. Eine β -Galaktosidase konnte zu dieser Zeit noch nicht gefunden werden.
4. Die mit dem Einsetzen des Herzschlages erfolgende Änderung der Syntheserate der β -Galaktosidase wird als hormonale Steuerung der Genaktivität gedeutet.

ZITIERTE LITERATUR

- ATLAS, M., 1938. The rate of oxygen consumption of frogs during embryonic development and growth. *Physiol. Zoöl.* **11**, 278–291.
- BEERMANN, W., 1963. Cytologische Aspekte der Informationsübertragung von den Chromosomen in das Cytoplasma. In: *Induktion und Morphogenese*. **13**. Coll. Ges. Physiolog. Chemie, Moosbach. Springer-Verlag, Berlin, pp. 64–97.
- BOELL, E. J., 1955. Energy exchange and enzyme development during embryogenesis. In: B. H. WILLIER, P. A. WEISS & V. HAMBURGER, *Analysis of development*. W. B. Saunders Company, London, pp. 520–555.
- CLEVER, W. & KARLSON, P., 1960. Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. *Exp. Cell. Res.* **20**, 623–626.

- COHN, M. & HORIBATA, K., 1959. Analysis of the differentiation and of the heterogeneity within a population of *Escherichia coli* undergoing induced β -galactosidase synthesis. *J. Bact.* **78**, 613–620.
- HORSTMANN, H. J., 1956. Der Galaktogengehalt der Eier von *Lymnaea stagnalis stagnalis* während der Embryonalentwicklung. *Biochem. Z.* **328**, 342–347.
- 1958. Sauerstoffverbrauch und Trockengewicht der Embryonen von *Lymnaea stagnalis* L. *Z. vergl. Physiol.* **41**, 390–404.
- 1960. Untersuchungen zum Stoffwechsel der Lungenschnecken. I. Glykolyse bei den Embryonen von *Lymnaea stagnalis*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **319**, 110–119.
- 1964. Untersuchungen zum Stoffwechsel der Lungenschnecken. IV. β -Galaktosidase in den Embryonen von *Lymnaea stagnalis*. *Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem.* **337**, 57–60.
- KROEGER, H., 1960. The induction of new puffing patterns by transplantation of salivary gland nuclei into egg cytoplasm of *Drosophila*. *Chromosoma* **11**, 129–145.
- LELOIR, L. F., 1951. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem.* **33**, 186–190.
- MAY, F., 1931. Beitrag zur Kenntnis des tierischen Sinistrins. *Z. Biol.* **91**, 215–220.
- Über den Galaktogengehalt der Eier von *Helix pomatia*. *Z. Biol.* **92**, 325–330.
- Chemische und biologische Untersuchungen über Galaktogen. *Z. Biol.* **95**, 277–297.
- MOOG, F., 1944. The chlorotone sensitivity of frogs' eggs in relation to respiration and development. *J. cell. comp. Physiol.* **23**, 131–155.
- MONOD, J. & JACOB, F., 1962. General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **26**, 389–401.
- SPIEGELMAN, S., 1951. The particulate transmission of enzymeforming capacity in yeast. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **16**, 87–98.
- STRITTMATTER, C. F., 1963. Differentiation of electron transport systems in mitochondria and microsomes during embryonic development. *Arch. Biochem.* **102**, 293–305.
- TUFT, P., 1953. Energy changes in development. *Arch. neerl. Zool.* **10** (Suppl.), 59–75.
- ZEUTHEN, E., 1950a. Respiration and cell division in the egg of *Urechis caupo*. *Biol. Bull., Woods Hole* **98**, 152–160.
- 1950b. Respiration during cell division in the egg of the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Biol. Bull., Woods Hole* **98**, 144–151.

Diskussion im Anschluß an den Vortrag HORSTMANN

KRÜGER: Es ist ungewöhnlich, bei der mathematischen Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Wachstums die Zeit in den Exponenten zu setzen: $Y = ae^{kt}$. Man kann auf diese Weise höchstens kürzere Perioden mathematisch erfassen. Im übrigen stellen Ihre Untersuchungen einen sehr wichtigen Beitrag zur mathematischen Analyse des embryonalen Wachstums dar, für das uns bis heute nur sehr wenige Unterlagen zur Verfügung stehen.

HORSTMANN: Die von mir verwendete Formel hat eine gewisse Tradition bei der Beschreibung von Wachstumsvorgängen während der Entwicklung (ATLAS 1938, MOOG 1944, BOELL 1955). Eine mathematische Analyse habe ich hiermit nicht beabsichtigt. Es trifft zu, daß die Formel bei unverändertem Wert von k nur kürzere Perioden der Entwicklung zu erfassen gestattet. Auffällig ist nur, daß diese Perioden bei der *Lymnaea* zeitlich genau mit morphologisch definierten Entwicklungsabschnitten übereinstimmen. Die gesamte Wachstumsperiode eines Organismus, der in der Entwicklung und Differenzierung begriffen ist, mit einer einzigen Formel beschreiben zu wollen, scheint mir ohne Zwang nicht möglich zu sein.