

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
8. Jg., S. 85—91, Januar 1970

## Hydrolasen im Vollhomogenat des menschlichen Pankreas

### *Pankreasenzyme, 1. Mitteilung*

Von W. PILZ, H. HÖRLEIN† und I. JOHANN

*Aus dem Physiologisch-Chemischen und Analytischen Labor (Leiter: Dr. W. Pilz) der Ärztlichen Abteilung  
(Leiter: Dr. H. Hörlein†) der Farbenfabriken Bayer AG, Werk Leverkusen*

(Eingegangen am 14. August 1969)

Als erste Mitteilung unserer Untersuchungsergebnisse über Pankreasenzyme werden die Hydrolasen eines menschlichen Pankreasvollhomogenates beschrieben. Es wurden im einzelnen die hydrolytischen Aktivitäten für die Tween-Sorten 20, 40, 60 und 80, für Maisöl („Mazola“), Lipoproteide, Triglyceride,  $\alpha$ -Naphthylester,  $\beta$ -Naphthylester, Phenylester und das Alkylphosphat E 600 untersucht. Nach Feststellung des Optimums der Kettenlänge der Fettsäure wurde jeweils mit dem am stärksten hydrolysierten Ester das pH-Optimum der Hydrolyse ermittelt. Außerdem wurde für alle Substrate im Optimum der Kettenlänge und im pH-Optimum die Wirkung des Phosphorsäureesters E 600 auf die Reaktion untersucht.

Von den Tween-Sorten wird Tween 20 am stärksten hydrolysiert, das pH-Optimum (auch für die anderen untersuchten Tween-Sorten) liegt zwischen pH 6,5 und pH 7. Die Hydrolyse wird durch E 600 mäßig gehemmt. Die Hydrolyse von Maisöl durch Pankreasvollhomogenat erfolgte durch Messung der Trübungsabnahme. Die Reaktion verläuft nicht linear, ihr pH-Optimum liegt bei pH 8,2. Die Hydrolyse von reinen Triglyceriden zeigt ein deutliches Optimum beim Tricaprylsäureester, das pH-Optimum liegt bei pH 8,6, die Reaktion wird durch E 600 (im Vergleich zu den anderen untersuchten Estern) nur schwach gehemmt. Von den  $\alpha$ -Naphthylestern wird das Propionat am stärksten gespalten, das pH-Optimum liegt bei pH 7,7, die Reaktion ist sehr empfindlich gegen E 600. Die Variation der Kettenlänge für  $\beta$ -Naphthylester ergab 2 Kettenlängenoptima (Buttersäure und Capronsäure), beide haben dasselbe pH-Optimum von pH 7,5, die Reaktion wird durch E 600 stark gehemmt. Das Optimum bei den Phenylestern liegt beim Valeriansäurephenylester das pH-Optimum bei pH 8,0, die Reaktion wird ebenfalls durch E 600 sehr stark gehemmt.

Bei der Aktivität für  $\beta$ -Naphthylester und Phenylester (beides sind sehr gute synthetische Substrate für die Serumarylesterasen) handelt es sich nicht um Arylesterasen, da ein Pankreasvollhomogenat nicht in der Lage ist, die für Arylesterasen typische Umesterungsreaktion zu katalysieren; auch die hohe Empfindlichkeit gegenüber E 600 widerspricht einer Definition dieser Aktivitäten als Arylesterasen.

Menschliches Pankreasvollhomogenat enthält keine Lipoproteidlipase. Die durch die vorgelegten Befunde erklärbar gewordenen äußerst komplizierten Reaktionsfolgen, die bei den bisher üblichen Methoden zur Bestimmung der Pankreaslipase im Serum ablaufen, werden ausführlich diskutiert.

### *Hydrolases in whole homogenate of human pancreas Pancreatic enzymes, I*

The first communication in this study of pancreatic enzymes describes the hydrolases in whole homogenates of human pancreas. The hydrolase activities for Tween-types 20, 40, 60 and 80, for maize oil („Mazola“), lipoproteins, triglycerides,  $\alpha$ -naphthyl esters,  $\beta$ -naphthyl esters, phenyl esters and the alkyl phosphate E 600 were studied. After determining the optimum chain length of the fatty acid, the optimum pH was determined using the most actively hydrolysed ester. In addition for all substrates in the determination of optimum chain length, and in the determination of the optimum pH, the action of the phosphate ester E 600 on each reaction was investigated.

Of the Tweens, type 20 was hydrolysed most strongly, while the optimum pH (also for the other Tweens studied) lay between 6.5 and 7. The hydrolysis was moderately inhibited by E 600. The hydrolysis of maize oil by whole pancreas homogenate was followed by measurement of the decrease in turbidity. The reaction was not linear and the optimum pH was 8.2. The hydrolysis of pure triglycerides showed a marked optimum at tricaprylic acid esters, with an optimum pH at 8.6; in comparison with the other ester studied, the reaction was only weakly inhibited by E 600. Of the  $\alpha$ -naphthyl esters, the propionate was attacked most actively; the optimum pH was 7.7 and the reaction was very sensitive to E 600. Variation of the chain length of the  $\beta$ -naphthyl ester substrates showed two optimum chain lengths (butyric and caproic), both with the same optimum pH of 7.5; the reaction was strongly inhibited by E 600. For the phenyl esters the optimum chain length lay at valeric acid, the pH optimum was 8.0 and this reaction was also strongly inhibited by E 600.

The activities for  $\beta$ -naphthyl esters and phenyl esters (both are very good synthetic substrates for serum aryl esterase) are not due to aryl esterases, because pancreas whole homogenate is not able to catalyse the transesterification reactions that are typical of aryl esterases. Also the high sensitivity towards E 600 confirms that these activities are not due to aryl esterases.

Human pancreas whole homogenate contains no lipoprotein lipase. The very complicated reaction sequences, that occur in the hitherto usual methods for the measurement of pancreatic lipase in serum, can be explained by the present findings and they are discussed in detail.

H. WEBER (1) hat vor kurzem festgestellt, wie schwierig es ist, eine chronische Pankreatitis klinisch zu diagnostizieren. So wurden in der Medizinischen Klinik des Kantonsspitals St. Gallen zwischen 1957 und 1962 20 621 Patienten behandelt. Nur in 5 Fällen war es möglich, klinisch eine chronische Pankreatitis zu diagnostizieren.

Von H. WEBER (1) stammt auch eine Methode zur Bestimmung der Pankreaslipase im Serum. Als Substrat wird eine Olivenölemulsion verwendet. Die nach einer definierten Zeit in Freiheit gesetzte Menge freier Fettsäuren wird dann mit 0,05N NaOH titriert<sup>1)</sup>.

Nach unserer Kenntnis ist jedoch die Spaltung von Olivenöl durch Serum ein wesentlich komplizierterer Vorgang: Zunächst wird ein Teil des Olivenöls durch das Serum in Lipoproteide verwandelt (2—4); diese Lipoproteide werden dann von der Lipoproteidlipase (clearing enzyme (2)) hydrolysiert, wodurch langkettige Fettsäuren entstehen, die sofort durch das Arylesterase-system mit O-Acetyl-Tyrosin, das Bestandteil von Lipo-

<sup>1)</sup> Die während der redaktionellen Bearbeitung dieser Arbeit erschienene Publikation von W. RICK (36) wird in der nächsten Mitteilung dieser Reihe besprochen.

proteiden ist, umgeestert werden, wobei Lipoproteide, die langkettige Fettsäureester des Tyrosins enthalten, und Essigsäure entstehen (5—10). Die oben beschriebene Reaktionsfolge kommt zum Stillstand, sobald das Arylesterasesystem erschöpft ist. Deshalb ist es auch verständlich, daß die Beziehung zwischen Lipaseaktivität und der Inkubationszeit (nach der Arbeitsvorschrift von H. WEBER (1)) nicht linear ist, da zunächst die Essigsäure und anschließend die freien langkettigen Fettsäuren titriert werden; Essigsäure und langkettige Fettsäuren haben jedoch verschiedene pK-Werte. Es ist mit der Methode von H. WEBER daher nicht klar zu unterscheiden, welcher Teil der verbrauchten NaOH der Pankreaslipase und welcher der endogenen Lipoproteidlipase (clearing enzyme) zuzuschreiben ist.

Dadurch werden die Resultate auch einer klinischen Untersuchung von WEBER und STEGEMANN (11) erklärbar. Demnach ist eine Erhöhung der „Pankreaslipase“ nicht nur bei Pankreatitis, sondern auch bei Alkoholismus, benignen Gallenwegserkrankungen, Neoplasmen, Hepatitis, Niereninsuffizienz, Vergiftungen, Infektionskrankheiten, Myokardinfarkt und einigen anderen Erkrankungen gefunden worden. Es ist jedoch bekannt, daß bei einem Teil der hier angeführten Erkrankungen die Lipoproteidlipase erhöht ist.

Gegen die Verwendung von Olivenöl als Substrat ist weiterhin einzuwenden, daß offensichtlich keine systematische Untersuchung eines menschlichen Pankreas-homogenates durchgeführt wurde. Die richtige Auswahl eines Substrates bedingt eine vorherige intensive biochemische Untersuchung — im vorliegenden Fall die des menschlichen Pankreas-homogenates und menschlichen Serums —, da sonst bei der praktischen Durchführung der Bestimmungsmethode unweigerlich Fehler und Mißdeutungen auftreten können.

Eine andere Möglichkeit der Pankreasdiagnostik besteht in der Überwachung der exokrinen Funktion, wie sie vor kurzem von MEYER-BERTENRATH und KAFFARNIK (12, 13) angegeben wurde. Dabei können nach Angaben der Autoren Insuffizienzen und Überfunktionen erkannt werden. Es ist möglich, daß dieser Weg zu einer allgemein anwendbaren Methode der Messung der *exokrinen* Pankreasfunktion führt. Allerdings wird man vorher nach exakten und ausführlichen toxikologischen Untersuchungen der Fluoresceindiester, Fluoresceinmonoester und des unveränderten Fluoresceins fragen müssen.

Außerdem wurden die entscheidenden biochemischen Untersuchungen außer an Pankreatin in der Hauptsache an Lipasen aus *Rhizopus arrhizus* sowie *Aspergillus oryzae* durchgeführt, deren Verhalten mit menschlichen Pankreasenzymen nicht unbedingt vergleichbar ist, zumindest ist der Beweis dafür nicht erbracht worden. Wir sind aufgrund unserer Erfahrungen sehr skeptisch, da sich z. B. Pankreatin (ein Präparat aus Schweinepankreas) gegenüber verschiedenen Substraten grundsätzlich anders verhält als ein Homogenat aus menschlichem Pankreas (14).

Wir selbst haben Homogenate aus menschlichem Pankreas auf ihre Fähigkeit untersucht, Ester verschied-

ener Typen zu hydrolysieren (1. Mitteilung). Später wird über eine Auftrennung der verschiedenen Enzyme aus menschlichem Pankreas mittels präparativer Stärkebreielektrophorese (15) und über die so isolierten Enzyme berichtet werden. Untersuchungen dieser Art wurden selten durchgeführt. Meist begnügt man sich mit Tierorganen (z. B. l. c. (16)). Erst nach Durchführung aller Vorarbeiten mit menschlichem Pankreas, über die wir laufend berichten werden, besteht die Aussicht, eine exakte und spezifische Methode (Reaktionsbedingungen, Wahl des Substrates usw.) zur Bestimmung der Pankreaslipase im menschlichen Serum angeben zu können.

### Material und Methoden

Menschlicher Pankreas wurde von Verkehrstoten (Höchstalter 25 Jahre), die keine organischen Schäden aufwiesen, möglichst schnell nach dem klinischen Tod gewonnen. Der Pankreas wurde sofort auf Temperaturen von  $-40^{\circ}$  gebracht und in diesem Zustand im Mixer zerkleinert. Anschließend wurde mit Wasser, das Thioharnstoff im Verhältnis 1:10000 enthielt (vgl. 15)), versetzt, erneut homogenisiert und das so gewonnene Homogenat sofort wieder eingefroren. Dabei stellte sich heraus, daß die in Wasser löslichen Pankreasproteine ein sehr hohes Emulsionsvermögen haben. Der früher beschriebene Wechsel in der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen emulgiertem Substrat und nicht emulgiertem Substrat trat bei uns nie auf (17). Für manche Untersuchungen wurde das Homogenat durch ein hartes Faltenfilter (Schleicher & Schüll Nr. 602h) filtriert. Es resultierte eine leicht grau bis bräunliche Flüssigkeit, die nur noch etwa  $\frac{1}{10}$  der Aktivität des Ausgangshomogenates hatte; es traten jedoch keine Unterschiede in der Spezifität ein. Nicht filtriertes Homogenat enthielt z. B. 2,45 mg Protein-N/ml, das daraus filtrierte Homogenat nur noch 49,0  $\mu$ g Protein-N/ml. Es besteht kein Zweifel, daß in den abgeschiedenen Stromata sehr viel Aktivität liegt. Diese Aktivität unterscheidet sich jedoch in ihrer Spezifität in keiner Weise von den löslichen Pankreasenzymen, wovon wir uns in ausführlichen Voruntersuchungen überzeugt haben: wir konnten bei der Herstellung von etwa 40—50 verschiedenen Homogenaten diese Tatsache immer wieder feststellen.

Allen enzymatischen Methoden gemeinsam ist die generelle Anordnung: Die vorzulegenden Substrate unterliegen einer starken Zeit-, Temperatur- und Volumen-abhängigen Eigenverseifung (18). Diese nicht enzymatische Hydrolyse läßt sich vollkommen ausschalten, wenn zu jedem einzelnen Bestimmungsansatz und für jedes Substrat ein Vergleichswert mit angesetzt und in die Berechnung einbezogen wird. Der Vergleichswert enthält alle Reagenzien mit Ausnahme des biologischen Materials und hat dasselbe Ansatzvolumen wie die Meßwerte (18).

Die Aktivität für Triglyceride wurde durch Überführung des nicht umgesetzten Substrates mittels alkalischem Hydroxylamin in die entsprechenden Acethydroxamsäuren und deren Reaktion mit Eisen-(III)-Ionen in saurer Lösung zu innerkomplexen Eisen-(III)-hydroxamaten, die violett-gefärbte Lösungen liefern, photometrisch bestimmt.

Dabei wurden niederkettige Triglyceride (19, 20) in wäßr. Lösung mit Eisen-(III)-ammoniumsulfat, längerkettige Triglyceride (21, 22) in alkoholisch-ätherischer Lösung mit Eisen-(III)-chlorid umgesetzt.

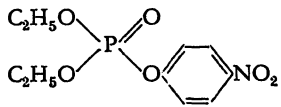
Die Bestimmung der Aktivität für  $\alpha$ -Naphthylester wurde durch Kupplung des in Freiheit gesetzten  $\alpha$ -Naphthols mit diazotiertem 4-Amino-4'-methoxydiphenylamin (23), die für  $\beta$ -Naphthylester durch Kupplung des in Freiheit gesetzten  $\beta$ -Naphthols mit diazotiertem 4-Aminophenetol (24), die für Phenylester durch Kondensation des in Freiheit gesetzten Phenols mit 4-Aminoantipyrin (25) durchgeführt.

Sämtliche entstandenen Farbstoffe wurden mit *n*-Pentanol extrahiert und photometrisch gemessen.

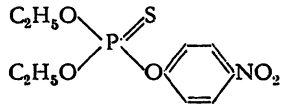
Wenn nicht anders angegeben, wurde stets Tris-Essigsäurepuffer (26) der Ionenstärke 0,1 verwendet.

Der Umsatz von Maisöl wurde durch die Abnahme der Trübung einer Emulsion von Mazola gemessen. Sofern die Substrate wasserunlöslich waren, wurden sie unter Zusatz von 1 ml einer 1proz. Lösung von Gummiarabicum emulgiert (Endvolumen 150 ml). In allen Fällen war nach Beendigung der Bebrütung die Emulsion, soweit sichtbar, unverändert.

Das als Hemmstoff verwendete E 600 wurde in jedem einzelnen Ansatz nach der in l. c. (27) angeführten Methode, mit der man sowohl E 605 als auch E 600 in gleicher Weise analysieren kann, bestimmt. Das Prinzip der Methode ist die Hydrolyse des Phosphorsäureesters zu *p*-Nitrophenol und dessen Reduktion mit  $TiCl_3$  zu *p*-Aminophenol in Gegenwart von Phenol; dabei entsteht ein Indophenol-Farbstoff, der in wäbr. Lösung photometrisch gemessen werden kann (27). (Ein Vollhomogenat aus menschlichem Pankreas hydrolysiert im Gegensatz zu menschlichem Serum (35) E 600 nicht.)



Paraoxon „E 600“



Parathion „E 605“

Von allen als Substrat verwendeten Estern wurde zunächst eine konzentrierte Stammlösung in Alkohol hergestellt (alle anderen Lösungsmittel haben wir aufgrund früherer Erfahrungen (24) nicht in Betracht gezogen). Zur Bereitung der Substrate wurde der zu verwendende Puffer im Mixer bei höchster Drehzahl bewegt und die gemessene Menge der Substratstammlösung langsam eintropfen gelassen; die Substrate waren alle 1,33 mm. Da nach der in l. c. (18) angegebenen Methode zu jedem einzelnen Meßwert ein ohne biologisches Material bebrüteter Vergleichswert mit-analysiert wurde, ergab sich in den meisten Fällen eine Kontrolle der Substratkonzentration. Die Eigenhydrolyse der einzelnen Estertypen (z. B. (28)) ist uns seit kurzer Zeit für alle eingesetzten Ester und alle verwendeten pH-Werte bekannt (29).

**Resultate**

Abbildung 1 gibt die Aktivität eines Pankreasvollhomogenates für die Tween-Sorten 20, 40, 60 und 80 wieder. Die Aktivität ist für Tween 20 am höchsten, sinkt für Tween 40 tief ab und steigt über Tween 60 bis zu Tween 80 wiederum an. Alle Typen haben ein pH-Optimum von pH 7,0, mit Ausnahme von Tween 60, dessen pH-Optimum bei pH 6,3 liegt.

Die Aktivität für Tweens war besonders interessant, da Tweens als synthetische Substrate für die endogene Lipoproteidlipase dienen können (2—4).

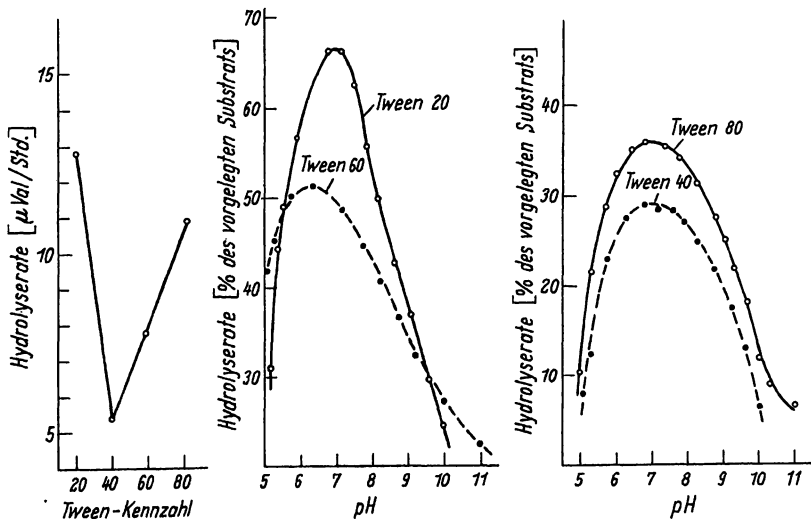


Abb. 1

Variation der Kettenlänge und pH-Optima von 4 Tween-Sorten. Tween-Sorten (Monoester des Sorbitan-Polyäthylenglykoläthers: Tween 20 = Laurinsäureester, Tween 40 = Palmitinsäureester, Tween 60 = Stearinsäureester, Tween 80 = Ölsäureester); Homogenatmenge 612,5  $\mu$ g (links) bzw. 1,225 mg Protein-N (Mitte und rechts) entsprechend. Ansatz: 10 ml Substrat (Substratkonzentration 5,32 mM) + 5 ml biologisches Material entsprechend oben angegebener Protein-N-Konzentration = Ansatzvolumen 15 ml. Verwendete Puffer: Phosphat, Veronal, Glykokoll

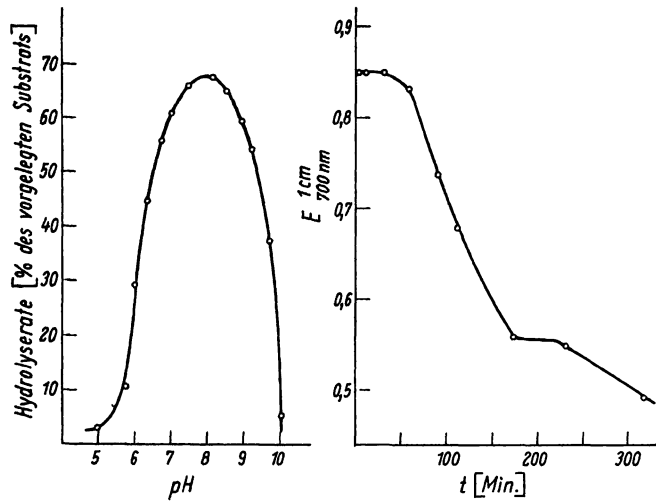


Abb. 2

Spaltung und pH-Optimum von Maisöl (Mazola). Bestimmung als Ferrilhydroxamat (links) bzw. Trübungsmessung (rechts); eingesetzte Homogenatmenge 1,225 mg Protein-N entsprechend Ansatz: 10 ml Substrat (Substratkonzentration 2,66 mM, Emulgator Gummiarabicum) + 5 ml biologisches Material = Ansatzvolumen 15 ml; Tris-Essigsäure-Puffer

Abbildung 2 gibt die Spaltung eines käuflichen langkettigen Triglycerides, nämlich Maisöl („Mazola“) wieder. Hier wurde die Abnahme der Trübung bei 700 nm gemessen. Aus dem Verlauf der Kurve läßt sich vermuten, daß es sich hierbei nicht um eine einfache Reaktion, sondern wahrscheinlich um eine komplexe Reaktionsfolge handelt. Das pH-Optimum liegt bei pH 8,2. In diesem Fall kann es sich nicht um eine Hydrolyse handeln, die durch die Lipoproteidlipase bewirkt wird, da sich aus Mazola nur in Gegenwart von Serum oder von Leberhomogenat Lipoproteide bilden können. Wir sind nicht im Besitz von Hinweisen, daß auch Pankreas-homogenat in der Lage wäre, aus Triglyceriden Lipoproteide zu formieren.

Zur weiteren Klärung dieser Tatsache wurde lipämisches Serum, das über 12 Std. bei 60° im Brutschrank vorinkubiert wurde (zur Inaktivierung der Lipoproteidlipase), als Substrat verwendet. Zweifellos bestand der größte Teil des Substrates aus Lipoproteiden (gesamte veresterte Fettsäuren = 1263 mg/100 ml). Bei einer Inkubation dieses Substrates mit Pankreashomogenat konnten wir keine Spaltung feststellen; weder nahm die Trübung

ab, noch war eine Abnahme der gesamten veresterten Fettsäuren meßbar. Damit ist eindeutig bewiesen, daß Pankreashomogenat nicht in der Lage ist, Lipoproteide zu hydrolysieren, eine Tatsache, die für die weitere Bearbeitung der Probleme von großer Bedeutung ist. Abbildung 3 zeigt die Hydrolyse von reinen Triglyceriden. Bei einer Variation der Kettenlänge ist deutlich sichtbar, daß der Glycerintricaprylsäureester bei weitem am stärksten gespalten wird, während die langkettigen Triglyceride (C-Zahl der Fettsäuren C<sub>14</sub> bis C<sub>18</sub>) wesentlich schwächer hydrolysiert werden. Als Test wurde zusätzlich Triolein eingesetzt (ein kommerzielles Produkt), das von allen untersuchten Estern am schwächsten gespalten wurde. Für die Hydrolyse des Tricaprylsäure-

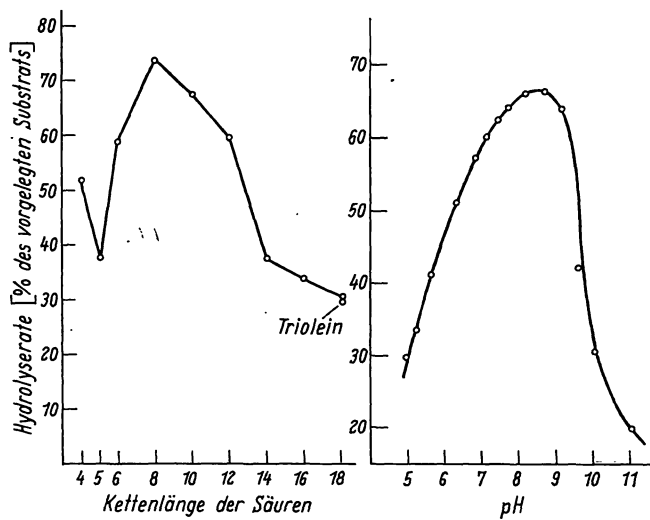


Abb. 3

Variation der Kettenlänge und pH-Optimum von Triglyceriden. Eingesetzte Homogenatmenge entsprechend 2,45 mg Protein-N  
 Ansatz: 10 ml Substrat (Substratkonzentration 2,66 mM, Emulgator Gummiarabicum) + 5 ml biologisches Material entsprechend oben angegebener Protein-N-Konzentration = 15 ml Ansatzvolumen. Puffer: Phosphat, Veronal, Glykokoll

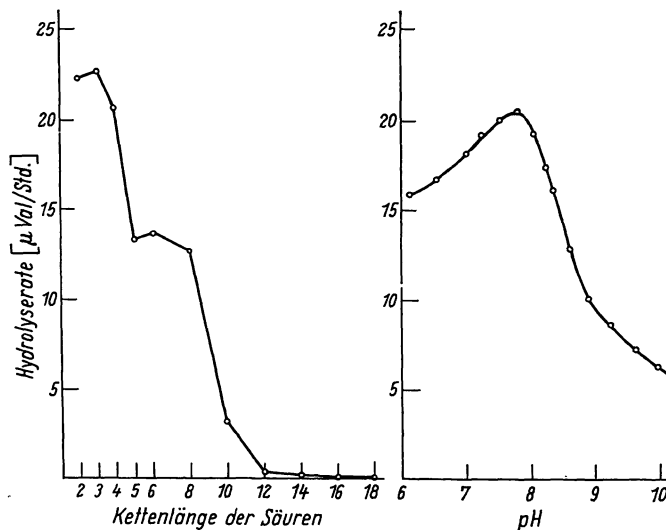


Abb. 4

Variation der Kettenlänge und pH-Optimum von  $\alpha$ -Naphthylestern. Eingesetzte Homogenatmengen: für Untersuchung des Kettenlängenoptimums entsprechend 122,5  $\mu$ g Protein-N; für Untersuchung des pH-Optimums 61,25  $\mu$ g Protein-N  
 Ansatz: 25 ml Substrat (Substratkonzentration 1,33 mM, Emulgator Gummiarabicum) + 1 ml biologisches Material entsprechend der oben angegebenen Konzentration = 26 ml Ansatzvolumen. Puffer: Phosphat, Tris-Essigsäure

glycerinesters wurde ein pH-Optimum von pH 8,6 gefunden.

Abbildung 4 zeigt die Hydrolyse von  $\alpha$ -Naphthylestern. Das Optimum der Kettenlänge liegt bei der Propionsäure; das Acetat wird fast gleich stark gespalten. Es ist auffallend, daß beim Capronsäureester ein zweiter Peak besteht, was wahrscheinlich macht, daß bei der Hydrolyse von  $\alpha$ -Naphthylestern mindestens 2 voneinander verschiedene Enzyme beteiligt sind. Das pH-Optimum wurde mit dem  $\alpha$ -Naphthylpropionsäureester untersucht und liegt bei pH 7,7.

Abbildung 5 zeigt die hydrolytische Aktivität eines Pankreasvollhomogenates für  $\beta$ -Naphthylester. Es ist auch hier wahrscheinlich, daß es sich um zwei Enzyme

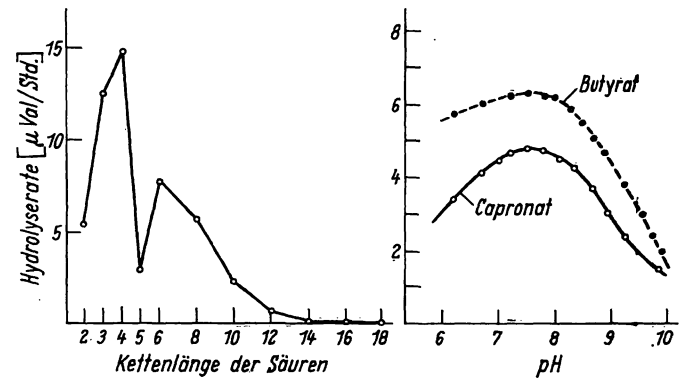


Abb. 5

Variation der Kettenlänge und pH-Optima von  $\beta$ -Naphthylestern. Eingesetzte Homogenatmengen: zur Variation der Kettenlängen entsprechend 122,5  $\mu$ g Protein-N; zur Untersuchung der pH-Optima für  $\beta$ -Naphthylbutyrat 12,25  $\mu$ g Protein-N und für  $\beta$ -Naphthylcapronat 24,5  $\mu$ g Protein-N entsprechend  
 Ansatz: 25 ml Substrat (Substratkonzentration 1,33 mM, Emulgator Gummiarabicum) + 1 ml biologisches Material der oben angegebenen Konzentration entsprechend = 26 ml Ansatzvolumen. Puffer: Tris-Essigsäure

handelt, wobei die Optima der Kettenlängen bei der Buttersäure und Capronsäure liegen. Die Ester beider Kettenlängen haben jedoch dasselbe pH-Optimum bei etwa pH 7,5.

$\beta$ -Naphthylester sind ein ausgezeichnetes synthetisches Substrat für Arylesterasen (6–10). Wir untersuchten daher, ob Buttersäure- $\beta$ -naphthylester oder Capronsäure- $\beta$ -naphthylester in Gegenwart von Pankreashomogenat zu Umesterungen entsprechend l. c. (6, 8) in der Lage sind. Wir konnten in keinem Fall Anzeichen für Umesterungsreaktionen finden. Allerdings ist das noch kein endgültiger Beweis, daß es sich hierbei nicht doch um Arylesterasen handelt, da z. B. bei einem Vollhomogenat aus menschlicher Leber ebenfalls keine Umesterungsreaktion im oben beschriebenen Sinne zu erreichen ist; erst nach Auftrennung der wasserlöslichen Proteine konnte eine Fraktion mit sehr hohem Umesterungsvermögen isoliert werden (8).

Ein weiteres sehr gutes synthetisches Substrat für die Arylesterasen sind Phenylester (5). Abbildung 6 zeigt die hydrolytische Aktivität eines Pankreasvollhomogenates für Phenylester. Wie ersichtlich, liegt das Optimum der Kettenlänge bei der Valeriansäure, das pH-Optimum bei pH 8,0. Aus der Variation der Kettenlänge ist (ähnlich wie bei den  $\beta$ -Naphthylestern) zu

Buddecke

# Grundriß der Biochemie

für Studierende der Medizin, Zahnmedizin, und Naturwissenschaften

Von Prof. Dr. E. BUDECKE

Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster/Westf.

Mit zahlreichen Formeln, Tabellen und Diagrammen

Etwa 520 Seiten. Plastik flexibel DM 27,50

(de Gruyter Lehrbuch)

Die progressive Zunahme des biochemischen Fachwissens erfordert eine überschaubare und zusammenfassende Darstellung der Biochemie als Hilfsmittel für den Unterricht. Der Grundriß der Biochemie von E. Buddecke gliedert den Wissensstoff in die Kapitel „Stoffe und Stoffwechsel“, „Stoffwechselregulation“ und „Funktionelle Biochemie der Organe und Gewebe“ mit dem Ziel, durch knappe Darstellung gesicherter Fakten und gezielte Stoffauswahl dem Leser einerseits eine rasche Information zu bieten, andererseits jedoch auf die vielfältigen Beziehungen und Anwendungsmöglichkeiten der Biochemie zur klinischen Chemie und Molekularpathologie hinzuweisen, um damit dem Studierenden der Medizin und Zahnmedizin sowie der anderen Gebiete der Naturwissenschaften das Verständnis klinischen Fachwissens zu erleichtern.

## Inhaltsübersicht

Stoffe und Stoffwechsel	Einführung · Glanduläre Hormone · Gewebshormone
Chemische Zusammensetzung und Stoffwechsel der Zelle · Der Stoffwechsel als chemische Reaktionsfolge	Vitamine
Enzyme · Coenzyme · Aminosäuren · Nucleinsäuren	Definition und Klassifizierung · Vitamine mit Coenzymfunktion · Vitamine ohne Coenzymfunktion · Vitaminähnliche Wirkstoffe
Proteine · Glucose und Kohlenhydrate · Lipide · Citratzyklus und biologische Oxydation · Porphyrine · Wasserhaushalt · Mineralhaushalt	Funktionelle Biochemie der Organe und Gewebe
Stoffwechselregulation	Biochemie der Zelle · Blut · Leber · Verdauung und Resorption · Niere und Urin · Muskel · Nervengewebe
Selbstregulation durch Rückkopplung · Regulation durch Metabolitkonzentrationen · Enzymkonkurrenz	Binde- und Stützgewebe · Wachstum und Abwehr
Hormone	



---

Walter de Gruyter & Co · Berlin 30

---

# Magenoperation und Magenoperierter

Herausgegeben von

**Prof. Dr. med. Heinrich Bartelheimer**

Direktor der I. Medizinischen Universitäts-Klinik Hamburg

**Prof. Dr. med. Hans-Joachim Maurer**

Institut und Klinik für Medizinische Strahlenkunde  
der Universität Düsseldorf

**Prof. Dr. med. Hans W. Schreiber**

Chefarzt der Chirurgischen Abteilung  
des Marien-Krankenhauses, Hamburg

unter Mitwirkung von

**Priv.-Doz. Dr. med. Kurt Müller-Wieland**

Oberarzt der I. Medizinischen Universitäts-Klinik Hamburg

Groß-Oktav. XVI, 513 Seiten.

Mit 210 Abbildungen und

2 mehrfarbigen Tafeln.

1969. Ganzleinen DM 88,—

## Inhaltsübersicht

Die Probleme des Kranken mit operiertem Magen (H. BARTELHEIMER-Hamburg — H.-J. MAURER-Düsseldorf — H. W. SCHREIBER-Hamburg)

### Magenresektion

Indikationen zur Magenoperation und Darstellung der konventionellen und modernen Verfahren (L. ZUKSCHWERDT und E. FARTHMAN-Hamburg) — Postoperative Frühkomplikationen nach einer Magenoperation (F. STELZNER-Hamburg)

### Der operierte Magen

Physiologie und Pathologie des operierten Magens (H. W. SCHREIBER und K. KRENTZ-Hamburg) — Pathologische Anatomie des resezierten Magens (V. BECKER-Berlin) — Immunpathologie gastritischer Veränderungen (K. O. VORLAENDER-Bonn)

### Klinik des Magenresezierten

Der funktionell gut operierte Magen (K. MÜLLER-WIELAND-Hamburg) — Subjektive und objektive Symptome (K. MÜLLER-WIELAND-Hamburg) — Psychologische Aspekte der Magenoperation und des Magenoperierten (H. FREYBERGER-Hamburg)

### Diagnostik

Sekretionsanalyse (K. KRENTZ-Hamburg) — Gastrobiopsie (K. KRENTZ-Hamburg) — Zytologie (K. KRENTZ-Hamburg) — Gastroskopie (K. KRENTZ-Hamburg) — Röntgenuntersuchung des Magenoperier-

ten (H.-J. MAURER-Düsseldorf) — Nuklearmedizinische Untersuchungsmethoden (H. BERNDT-Berlin-Buch)

### Spätsyndrom des Magenresezierten

Ernährungsstörungen, Magenstumpfkarcinom, Lungentuberkulose der Magenoperierten (K. MÜLLER-WIELAND-Hamburg) — Anämien nach Magenresektion und Gastrektomie (W. PRIBILLA-Berlin-Moabit) — Skelett- und Calcium-Stoffwechselferänderungen nach Magenresektion (F. KUHLENCORDT-Hamburg) — Beeinflussung der Nachbarorgane (Leber, Galle, Pankreas) (E. WILDHIRT-Kassel)

### Therapie bei Kranken mit Magenresektion

Therapie bei Kranken mit einer Magenoperation vom Standpunkt des Chirurgen (A. GÜTGEMANN und H. W. SCHREIBER-Bonn-Hamburg) — Therapie bei Kranken mit einer Magenoperation vom Standpunkt des Internisten (M. GÜLZOW und K. DIWOK-Rostock) — Operationsfehler (A. GÜTGEMANN und H. W. SCHREIBER-Bonn-Hamburg)

Besondere Gesichtspunkte bei magenoperierten Kindern (F. MEISSNER-Leipzig)

### Nachsorge und Begutachtung

Rehabilitation und Resozialisierung (A. LUCHMANN-Bad Salzig) — Begutachtung (Th. O. LINDENSCHMIDT-Hamburg)



**Walter de Gruyter & Co - Berlin 30**

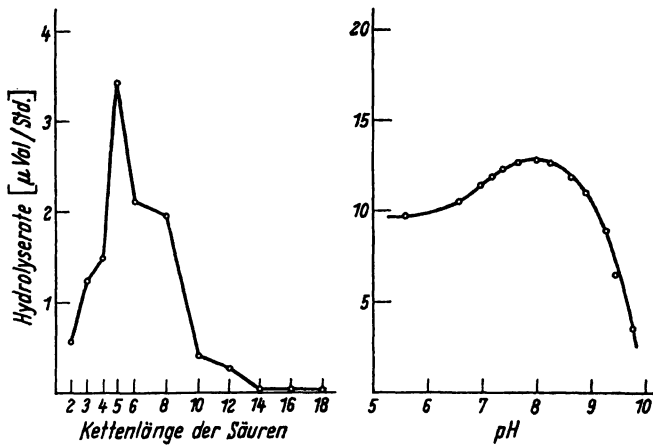


Abb. 6

Variation der Kettenlänge und pH-Optimum von Phenylestern. Eingesetzte Homogenatmengen: für Untersuchung des Kettenlängenoptimums entsprechend 12,25 μg Protein-N. Zur Untersuchung des pH-Optimums entsprechend 24,5 μg Protein-N

Ansatz: 25 ml Substrat (Substratkonzentration 1,33 mM, Emulgator Gummiarabicum) + 1 ml biologisches Material der oben angegebenen Konzentration entsprechend = 26 ml Ansatzvolumen. Puffer: Phosphat und Tris-Essigsäure

vermuten, daß es sich um 2 Enzyme handelt (hohe Aktivität auch beim Phenylcaprylsäureester). Eine Entscheidung kann auch hier erst nach einer Auftrennung der einzelnen Enzyme und deren Reingewinnung erwartet werden.

Zur Prüfung auf ein für Arylesterasen typisches Verhalten wurde untersucht, ob Phenylvaleriansäureester und Phenylcaprylsäureester in Gegenwart von Pankreasvollhomogenat und langkettigen oder kurzkettigen Fettsäuren in der Lage sind, umzuestern. Es ist aufgrund theoretischer Überlegungen durchaus möglich, daß in diesem Falle eine Umesterung sowohl zu kurzkettigen als auch zu langkettigen Estern erfolgen kann. Experimentell war es nicht möglich, derartige Umesterungsreaktionen (analog (6, 8)) zu erreichen. Trotzdem gilt auch für die Phenylester das für die β-Naphthylester Gesagte (vgl. (8)).

Die Abbildungen 7—10 zeigen das Verhalten eines Pankreasvollhomogenates für verschiedene Substrate

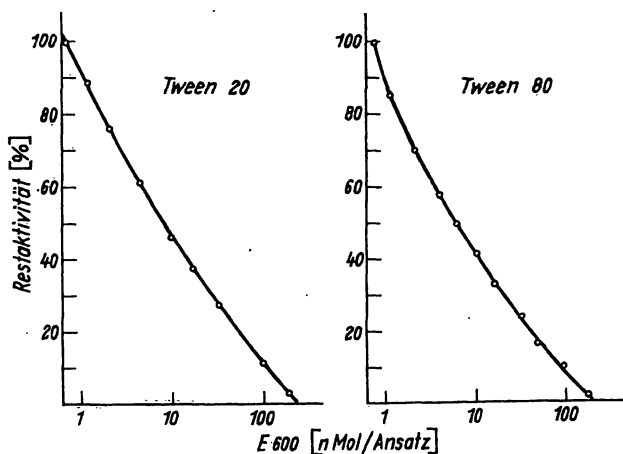


Abb. 7

Wirkung von E 600 auf die Hydrolyse von Tween 20 (linke Kurve) und Tween 80 (rechte Kurve) (vgl. Abb. 1). Eingesetzte Homogenatmengen: entsprechend 2,45 mg Protein-N

Ansatz: 1 ml biologisches Material der oben angegebenen Konzentration entsprechend + 1 ml wäbr. Lösung von E 600 (Konzentration siehe Abb.), 30 Min. präinkubiert, + 10 ml Substrat (Substratkonzentration 5,32 mM), im pH-Optimum (vgl. Abb. 1) = 12 ml Ansatzvolumen

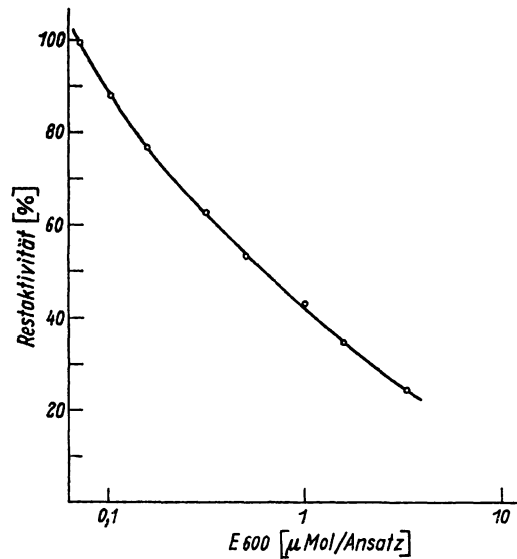


Abb. 8

Wirkung von E 600 auf die Hydrolyse von Tricaprylsäureglycerinestern. Eingesetzte Homogenatmenge entsprechend 2,45 mg Protein-N.

Ansatz: 1 ml biologisches Material der oben angegebenen Konzentration entsprechend + 1 ml wäbr. Lösung von E 600 (Konzentration siehe Abb.), 30 Min. präinkubiert, + 10 ml Substrat (Substratkonzentration 2,66 mM, Emulgator Gummiarabicum) im pH-Optimum (vgl. Abb. 3) = 12 ml Ansatzvolumen

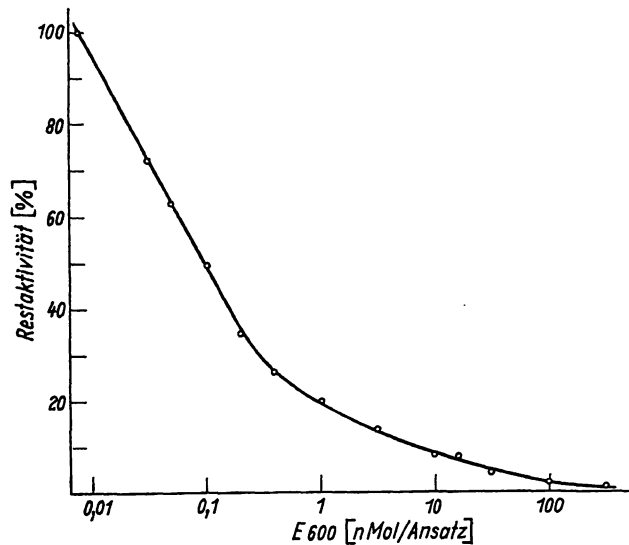


Abb. 9

Wirkung von E 600 auf α-Naphthylpropionat. Eingesetzte Homogenatmenge entsprechend 49,9 μg Protein-N

Ansatz: 1 ml biologisches Material der oben angegebenen Konzentration entsprechend + 1 ml wäbr. Lösung von E 600 (Konzentration siehe Abb.) 30 Min. präinkubiert, + 25 ml Substrat (Substratkonzentration 1,33 mM, Emulgator Gummiarabicum) im pH-Optimum (vgl. Abb. 4) = 27 ml Ansatzvolumen

(jeweils im Optimum der Kettenlänge und im pH-Optimum untersucht) in Gegenwart verschiedener Mengen von E 600. Auf diese Weise ist es häufig möglich, Enzyme bzw. Enzymtypen auch in Vollhomogenaten zu differenzieren.

Abbildung 7 gibt das Spaltungsvermögen für Tween 20 und Tween 80 (die beiden Optima der Kettenlängen) wieder. Es ist zu beachten, daß bei Zugabe von 1 nMol E 600 noch 100% Spaltung stattfindet. Noch deutlicher ist diese Tendenz beim Tricaprylsäureglycerinester (Abb. 8), wo 0,1 μMol E 600 je Ansatz kaum eine Störung der Hydrolyse bewirkten. Dagegen beginnt die Hemmung beim α-Naphthylpropionat bereits bei 10 pMol (Abb. 9). Von den beiden synthetischen Substraten für

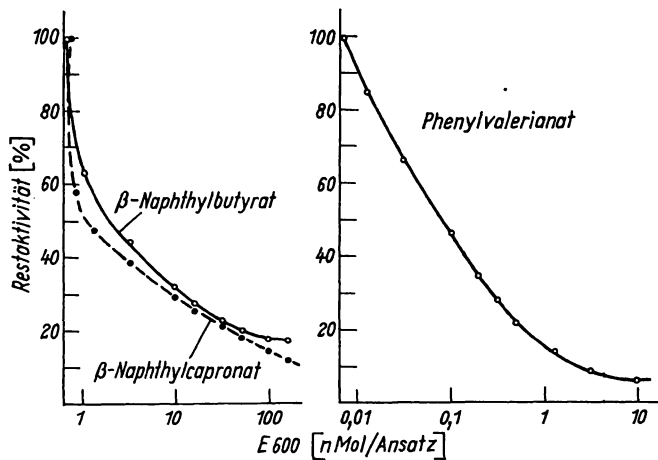


Abb. 10

Wirkung von E 600 auf  $\beta$ -Naphthylbutyrat,  $\beta$ -Naphthylcapronat und Phenylvalerianat. Eingesetzte Homogenatmengen: bei  $\beta$ -Naphthylbutyrat und Phenylvalerianat entsprechend 24,5  $\mu$ g Protein-N, bei  $\beta$ -Naphthylcapronat entsprechend 49  $\mu$ g Protein-N

Ansatz: 1 ml biologisches Material der oben angegebenen Konzentration entsprechend + 1 ml wäfr. Lösung von E 600 (Konzentration siehe Abb.) 30 Min. präinkubiert, + 25 ml Substrat (Substratkonzentration 1,33 mM, Emulgator Gummiarabicum) im pH-Optimum (vgl. Abb. 5 und Abb. 6) = 27 ml Ansatzvolumen

die Arylesterase liegt bei den  $\beta$ -Naphthylestern der Beginn der Hemmung bei 1 nMol E 600, während er bei Phenylvalerianat bereits bei 10 pMol eintritt (Abb. 10). Gerade dieser Befund läßt es möglich erscheinen, daß im Pankreasvollhomogenat ein Arylesterasesystem enthalten ist, das wohl  $\beta$ -Naphthylester als synthetische Substrate bevorzugt, während im Unterschied zum menschlichen Serum (5–10) Phenylester nicht brauchbar sind. Wenn sich dieser Befund bestätigt, würde es sich um ein Arylesterasesystem ganz neuen Typs handeln, das von den bis jetzt aufgefundenen Arylesterasen (5–10) entscheidend differiert. Eine endgültige Klärung kann erst nach einer Auftrennung des Vollhomogenates und einer Isolierung der einzelnen Enzyme getroffen werden.

### Diskussion

Es ist uns bekannt, daß derzeit an mehreren Instituten verschiedene Wege zu einer einfachen und sicheren Pankreasdiagnostik beschritten werden. Wir halten deswegen die Diskussion so kurz wie möglich, um jede unnötige Polemik zu vermeiden. Wie drängend das Problem einer exakten Pankreasdiagnostik ist (wobei es sich hauptsächlich um chronische Pankreopathien handelt), zeigt z. B. eine Leserzuschrift (30).

Es scheint uns besonders wichtig zu sein, daß ein Vollhomogenat aus menschlichem Pankreas keine Lipoproteidlipase enthält. Diese Feststellung konnte getroffen werden, da Charakterisierung und Analysemethoden für die Lipoproteidlipasen inzwischen sehr weit gediehen sind (2–4, 31–34). Dafür spricht auch die Hydrolyse von verschiedenen Tween-Typen, die zwar der Kettenlänge entsprechend sehr wohl durch eine Lipoproteidlipase bedingt sein könnte; die Beachtung der entsprechenden pH-Optima schließt jedoch die Interpretation der Tween-spaltung als durch Lipoproteidlipase bedingt aus.

Weitgehend ungeklärt bleibt die Spaltung von Maisöl, insbesondere die unregelmäßige Abnahme der Trübung. Kontrollversuche mit Triolein und Olivenöl ergeben fast gleiche Resultate. Eine Erklärung hierfür wird erst nach Auftrennung der einzelnen Enzyme möglich sein. Völlig unerwartet ist bei der Hydrolyse von Triglyceriden das Optimum der Kettenlänge von  $C_8$ . Die außerdem hohe Spaltung von Tributyrin dürfte auf  $\alpha$ -Chymotrypsin zurückzuführen sein. Außerdem zeigt sich, daß Triolein nicht optimal gespalten wird. (Olivenöl und Mazola werden noch etwas weniger als reines Triolein hydrolysiert.) Diese langkettigen Triglyceride eignen sich demnach wenig als Substrate.

Die Hydrolyse der  $\alpha$ -Naphthylester (insbesondere die Variation der Kettenlänge der Fettsäure) läßt auf mindestens 2, wenn nicht 3 Enzyme schließen; auch hier kann erst nach einer Auftrennung der Enzyme und deren Isolierung entschieden werden, um welchen Enzymtyp es sich handelt. Die Hydrolyse für  $\beta$ -Naphthylester und Phenylester wurde bereits im vorhergehenden Kapitel erläutert; weitere Aussagen sind nach den bisher vorliegenden Resultaten nicht zu machen.

Die Hemmversuche mit E 600 werden vor allem für eine Charakterisierung der einzelnen Enzyme nach der Trennung mit Hilfe der präparativen Stärkebreielektrophorese von hohem Interesse sein. Eine Differenzierung im Vollhomogenat war auf diesem Weg nicht möglich. Bemerkenswert ist nur die Tatsache, daß die Spaltung von Triglyceriden, speziell des Tricaprylsäureglycerinesters durch E 600 vergleichsweise wenig gehemmt wird. Dadurch unterscheidet sich die Hydrolyse von Triglyceriden durch ein Pankreashomogenat von allen anderen bisher im menschlichen Organismus gefundenen Enzymen dieses Typs.

Für die Praxis einer Pankreasdiagnostik folgt aus der Tatsache, daß Pankreas keine Lipoproteide spaltet, immerhin die Möglichkeit, die Hydrolyse eines dem Serum zugesetzten Triglycerides zu verfolgen. Entsprechend unseren Untersuchungen eignet sich dazu Tricaprylsäureglycerinester am besten, da er am stärksten gespalten wird. Selbstverständlich darf man nicht mit Titrationen arbeiten, da sonst Fehlinterpretationen durch das im Serum immer anwesende Arylesterasesystem auftreten. Es besteht lediglich die Möglichkeit, die Esterbilanz zu Beginn und nach Beendigung der Bebrütung nach den l. c. (21, 22) angeführten Methoden zu messen. Alle anderen Methoden sind von vornherein als fehleranfällig abzulehnen.

Wir haben mit den Methoden l. c. (21, 22) eine große Anzahl von Patienten der mittleren Altersklasse untersucht, indem wir deren Serum eine gemessene Menge emulgierter Tricaprylsäureglycerinesters zusetzten, in dem Wert 1 die Gesamtsumme des zugesetzten Esters und der veresterten Fettsäuren im Serum maßen und nach der Bebrütung dieselbe Operation wiederholten.

Nach unserer bisherigen Kenntnis finden dabei folgende Reaktionen statt:

1. Im Serum sind immer Lipoproteide vorhanden.
2. Ein Teil der Tricaprylsäureglycerinester-Emulsion, die als Substrat verwendet wird, wird vom Serum mit hoher Geschwindigkeit in Lipoproteide verwandelt.
3. Die im Serum zu Beginn der Reaktion bereits vorhandenen, sowie die aus dem Substrat Tricaprylsäureglycerinester neu gebildeten Lipoproteide werden vom clearing enzyme (Lipoproteidlipase) (2) zwar langsam, aber deutlich meßbar hydrolysiert.
4. Der nicht zu Lipoproteiden umgesetzte Anteil des Tricaprylsäureglycerinesters wird rasch, die natürlichen Triglyceride des Serums werden langsam von der Pankreaslipase hydrolysiert, sofern dieses Enzym im Serum anwesend ist.
5. Bei den Reaktionen 3. und 4. entstehen freie langkettige Fettsäuren, die sofort enzymatisch durch das Arylesterasesystem mit O-acetyliertem Tyrosin, das Bestandteil eines intakten Lipoproteids sein muß (9), umgeestert werden, wobei freie Essigsäure entsteht. Diese Reaktion läuft nur so lange ab, bis etwa 80% des geeigneten O-Acetyltyrosins umgeestert ist (5—10). Dann werden die weiter entstehenden langkettigen freien Fettsäuren an Albumin adsorbiert. Papierchromatographische Untersuchungen nach der in l. c. (4) angegebenen Methode zeigten einwandfrei, daß unmittelbar nach Zugabe des Substrates Essigsäure, Caprylsäure und langkettige Fettsäuren in veresterter Form vorlagen; nach 2stdg. Bebrütung waren nur noch langkettige Fettsäuren und Caprylsäure als Ester nachweisbar.
6. Daraus ergibt sich folgende Situation (Zustand nach Bebrütung):

a) Es liegen (an Albumin adsorbierte) freie Essigsäure, freie Caprylsäure und freie langkettige Fettsäuren vor;  
 b) Die Bildung der in a) erwähnten freien Säuren erfolgt durch eine Hydrolyse von Lipoproteiden durch das clearing enzyme (2, 3); ist zusätzlich Pankreaslipase vorhanden, wird der vom Serum nicht in Lipoproteide verwandelte Teil des Substrates (Tricaprylsäureglycerinester) gespalten. Durch eine maßanalytische Bestimmung der entstandenen Fettsäuren oder durch eine photometrische Messung (21, 22) der Esterbilanz vor und nach der Reaktion kann nicht zwischen beiden Enzymen unterschieden werden. Hier liegt ein außerordentlich schwieriges analytisches Problem vor.

c) Eine maßanalytische Bestimmung des Gemisches aus freier Essigsäure und freien langkettigen Fettsäuren scheidet für exakte Analysen aus (vgl. Einleitung und l. c. (1)). Wir werden in Kürze eine Methode bekanntgeben, mit deren Hilfe die Pankreaslipase spezifisch bestimmt wird, ohne daß eine Störung durch das clearing enzyme (Lipoproteidlipase) eintritt.

Wir konnten feststellen, daß der zugesetzte Tricaprylsäureglycerinester vom Serum einer größeren Anzahl von Patienten gespalten wird. Eingehende Recherchen in den Krankenblättern der Patienten ergaben ausnahmslos ein oder mehrmals die Bemerkung „unklare Oberbauchbeschwerden“. Wahrscheinlich handelt es sich in diesen Fällen um chronische Pankreopathien. Wir geben dieses klinische Resultat lediglich bekannt, weil wir zeigen wollen, daß man bereits mit Hilfe einer exakten Anylase des Vollhomogenates aus menschlichem Pankreas zu Methoden kommen kann, die für die Pankreaslipase spezifisch sind. Alle weiteren Befunde werden wir demnächst publizieren.

### Literatur

1. WEBER, H., Dtsch. med. Wschr. 90, 1170 (1965). — 2. HÖRLEIN, H. und W. PILZ, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 327, 256 (1962). — 3. PILZ, W. und H. HÖRLEIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 330, 212 (1963). — 4. PILZ, W. und I. JOHANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 348, 73 (1967). — 5. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 1 (1962). — 6. PILZ, W. und H. HÖRLEIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 335, 221 (1964). — 7. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 338, 238 (1964). — 8. PILZ, W., H. HÖRLEIN und E. STELZL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 65 (1966). — 9. PILZ, W., diese Z. 6, 337 (1968). — 10. PILZ, W., E. STELZL und I. JOHANN, Enzymol. biol. clin. 9, 97 (1968). — 11. WEBER, H. und T. STEGEMANN, Dtsch. med. Wschr. 90, 1203 (1965). — 12. MEYER-BERTENRATH, J. G. und H. KAFFARNIK, diese Z. 6, 484 (1968). — 13. MEYER-BERTENRATH, J. G., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 728 (1968). — 14. PILZ, W. und I. JOHANN, Publ. in Vorbereitung. — 15. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 243, 587 (1968). — 16. MORGAN, R. G. H., J. BARROWMAN, H. FILIPEK-WENDER und B. BORGSTRÖM, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 167, 355 (1968). — 17. SARDA, L. und P. DESNU-

ELLE, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 30, 513 (1958). — 18. PILZ, W., Z. ges. exper. Med. 132, 310 (1959). — 19. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 162, 81 (1958). — 20. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 166, 190 (1959). — 21. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 218, 426 (1966). — 22. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 193, 338 (1963). — 23. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 210, 113 (1965). — 24. PILZ, W., Mikrochim. Acta 1961, 614. — 25. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 212, 410 (1965). — 26. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 215, 105 (1966). — 27. PILZ, W., Mikrochim. Acta 1958, 383. — 28. PILZ, W. und I. JOHANN, diese Z. 4, 215 (1966). — 29. PILZ, W. und I. JOHANN, Publ. in Vorbereitung. — 30. HUCH, L. W., Dtsch. med. Wschr. 94, 289 (1969). — 31. KORN, E. D., Methods biochem. Analysis 7, 145 (1959). — 32. KORN, E. D., J. biol. Chemistry 215, 1 (1955). — 33. KORN, E. D. und T. W. QUIGLEY, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 18, 143 (1955). — 34. KORN, E. D., Science (Washington) 120, 399 (1954). — 35. KRISCH, K., diese Z. 6, 41 (1968). — 36. RICK, W., diese Z. 7, 530 (1969).

Dr. W. Pilz  
 Leiter des physiologisch-chemischen  
 u. analytischen Labors der ärztlichen Abteilung  
 509 Leverkusen-Bayerwerk