

BBA 45691

ENTWICKLUNGSABHÄNGIGE MITOCHONDRIALE ENZYMAKTIVITÄTEN  
BEI DEN KASTEN DER HONIGBIENE<sup>1</sup>

MINORU OSANAI UND HEINZ REMBOLD

*Max-Planck-Institut für Biochemie, München (Deutschland)*

(Eingegangen am 2. Februar, 1968)

## SUMMARY

*Development-dependent mitochondrial enzyme activities in castes of the honey bee*

Mitochondria of queen and worker honey bees were isolated and purified in various developmental stages as follows. The mitochondrial preparation free of sarcosomes, lysosomes and microsomes, was obtained by centrifugation of a crude mitochondrial fraction in a slight gradient of sucrose containing a steep gradient of stractan AF/2 (Meyhall). The fractionated cell particles were characterized by their contents of protein and RNA, and their activities of acid phosphatase, acid ribonuclease, uricase and succinate dehydrogenase, respectively. After gradient centrifugation, three bands corresponding to the maxima of the protein content were observed in the sedimentation pattern. The middle band contained mitochondria. In the larvae and white-eyed pupae the band was separated further into lighter and heavier fractions. The quantity of the mitochondria in the queen is more than 2-fold higher than that of the worker throughout the developmental stages. When succinic acid,  $\alpha$ -glycerophosphoric acid and butyric acid were used as substrates of the oxidation systems, the mitochondria of both castes demonstrated the maximal activity in the 5-day-old larva. The activities of the oxidation systems in the queen were substantially higher than those in the worker, particularly in the larval stages. It was further shown by the difference spectra of mitochondria, that both castes were deficient in cytochrome *c* in the early developmental stages. The worker larva contained quantitatively less cytochrome *c* and cytochrome oxidase than the queen larva. It was concluded from these results, that the production of mitochondria in the queen is quantitatively and qualitatively stimulated and the cytochrome system is sufficiently built up by the influence of the determining substance contained in royal jelly. Because of the low content of mitochondria in addition to the diminished activity of the respiratory chain, the worker larva showed an oxygen consumption half as large as that of the queen larva.

## EINLEITUNG

Soweit bisher bekannt ist, steigt als erste Reaktion auf die im Weiselfutter enthaltene determinierende Substanz<sup>2</sup> die Atmung bei der Königinnenlarve stark an.

Schon bei der dreitägigen Larve ist der Sauerstoffverbrauch doppelt so hoch wie bei der gleichaltrigen Arbeiterinnenlarve<sup>3</sup>. Es ist denkbar, dass die Ursache für diese drastischen physiologischen Unterschiede in einer verschiedenen Aktivität der Mitochondrien beider Kasten begründet ist. Dabei kann die Menge, aber auch die Qualität dieser Zellorganellen verschieden sein. Um zu klären, wie weit das Energie liefernde System an der Entstehung der weiblichen Kasten bei der Honigbiene beteiligt sein kann, haben wir Mitochondrien aus Königinnen und Arbeiterinnen folgender Entwicklungsstadien isoliert: 3- und 5-tägige Larven, weissäugige und schwarzäugige Puppen, frisch geschlüpfte Imagines. Für zwei unabhängige Untersuchungsreihen wurden knapp 1000 Königinnen und etwa die doppelte Menge Arbeiterinnen verschiedener Entwicklungsstadien aufgearbeitet.

#### MATERIAL UND METHODIK

##### *Isolierung der Mitochondrien*

Die frisch gesammelten Tiere (10–50 g Frischgewicht) wurden in der zehnfachen Menge eiskalter 0.3 M Saccharoselösung mit einem Homogenisator nach Potter (Teflonstempel) 3 Min lang homogenisiert. Die erwachsenen Bienen wurden zuerst im eisgekühlten Mörser fein zerrieben, die erhaltene Suspension durch drei Lagen Mull filtriert und dann wie oben beschrieben homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung ist in Schema I dargestellt. Die übliche Methode der Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten führt, im Gegensatz z.B. zum Rattenleber-Homogenat, nicht zur Trennung von Mitochondrien und Lysosomen. Die nach Zentrifugation des Gesamthomogenats zwischen 1200 und  $30000 \times g$  erhaltene rohe Mitochondrien-Fraktion wurde deshalb einem flachen Saccharose-Gradienten überschichtet, der gleichzeitig einen steilen linearen Polysaccharid-Gradienten enthält (Abb. 1). Aus einer Serie verschieden hochmolekularer Verbindungen erhielten wir mit Stractan AF/2\* die besten Trennergebnisse. Das Gesamtvolumen betrug 56–58 ml; für die Zentrifugation wurde der Ausschwingrotor SW 25/2 mit der präparativen Ultrazentrifuge L 2 (Beckman) verwendet. Durch Zentrifugation bei  $1200 \times g$  werden die Sarkosomen der frisch geschlüpften erwachsenen Tiere abgetrennt. Zum Homogenisieren und bei der Zentrifugation bis  $30000 \times g$  wurde eine mit  $10^{-3}$  M Trispuffer auf pH 7.2 eingestellte 0.3 M Saccharoselösung verwendet. Die nach der Gradientenzentrifugation abgetrennte Mitochondrien-Fraktion wurde durch eine 15 Min lange Zentrifugation bei  $100000 \times g$  gesammelt.

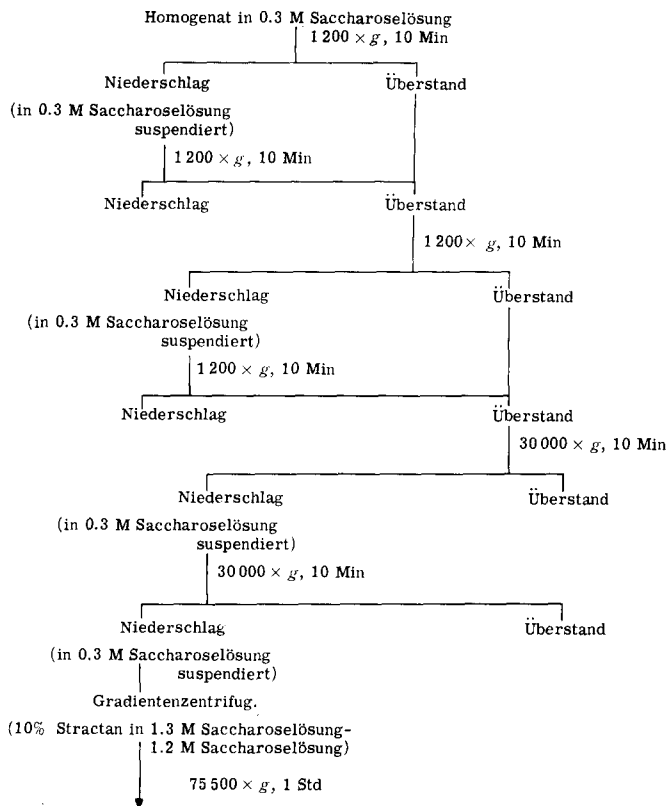
##### *Eiweiss- und RNA-Gehalt*

Nach der Gradientenzentrifugation wurde der Eiweissgehalt jeder Fraktion nach LOWRY *et al.*<sup>4</sup> bestimmt. RNA wurde zuerst nach Schmidt-Thannhauser-Schneider fraktioniert und dann der durch Orcin-Reaktion gebildete Farbstoff kolorimetrisch bei 660 m $\mu$  gemessen<sup>5</sup>.

\* Stractan AF/2 ist ein stark verzweigtes Arabinogalaktan aus Lärchenholz, welches in 10 % wässriger Lösung eine Viskosität von 10–20 cP besitzt. Die Autoren danken der Firma Meyhall, Kreuzlingen, Schweiz, für die Überlassung verschiedener Polysaccharide.

### Enzymaktivitäten

Die Succinatdehydrogenaseaktivität (Succinate:(acceptor) oxidoreductase, EC 1.3.99.1) wurde nach SLATER UND BONNER<sup>6</sup> bestimmt. Nach der Reaktion wurde die Abnahme der Lichtintensität von Kaliumferricyanid je Min bei 420 m $\mu$  gemessen.



Schema I. Isolierung von Mitochondrien aus der Honigbiene.

Zur Messung der Aktivität von Uricase (Urate:oxygen oxidoreductase, EC 1.7.3.3) und saurer Ribonuclease (Ribonucleate pyrimidine-nucleotido-2'-transferase, EC 2.7.7.16) wurde nach SCHNEIDER UND HOGEBOOM<sup>7</sup> bzw. McDONALD<sup>8</sup> und SUMNER<sup>9</sup> gearbeitet. Bei der sauren Ribonuclease wurde die Enzymlösung mit dem Substrat bei pH 5.0 und 37° 1 Std lang inkubiert. Zur Messung der sauren Phosphataseaktivität (Orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.2) wurde als Substrat *p*-Nitrophenylphosphat<sup>10</sup> verwendet. 0.1 ml Fraktionslösung wurden 1.0 ml 2 · 10<sup>-3</sup> M Dinatrium-*p*-Nitrophenylphosphatlösung in 0.05 M Zitratpuffer (pH 5.0) zugesetzt und bei 37° 30 Min lang inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zusatz von 1 ml 10 % Trichloressigsäure beendet und der gebildete Eiweiss-Niederschlag abzentrifugiert. 1.5 ml der überstehenden Lösung wurden mit 1.5 ml gesättigter Natriumkarbonatlösung versetzt und die Menge des gespaltenen *p*-Nitrophenols bei 430 m $\mu$  gemessen.

### *O<sub>2</sub>-Verbrauch*

Für diese Messungen wurde die manometrische Methode verwendet. Ein Gefäß enthält die folgenden Lösungen: im Hauptraum 0.1 ml 50 mM Natriumsuccinat, 400 mM Natriumpyruvat mit oder ohne 20 mM Natriummalat, 40 mM  $\alpha$ -Glycerophosphat oder 40  $\mu$ M Buttersäure als Substrat, 0.05 ml 20 mM ADP, 0.05 ml 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 ml 0.1 % Rinderserumalbumin-Lösung, 0.05 ml 0.2 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.2), 0.1 ml  $5 \cdot 10^{-4}$  M Cytochrom *c*, 0.05 ml 0.4 M D-Glucose, 0.05 ml dialysiertes Hexokinasepräparat (2 mg/ml) der Firma Boehringer und Soehne, Mannheim, als Kofaktoren und 0.5 ml Mitochondrien-Suspension; im Einsatz 0.2 ml 20 % KOH mit Filterpapier; im Seitenarm 0.3 ml Wasser oder andere Kofaktoren wie NAD, Thiaminpyrophosphat, CoA oder Liponsäure. Als Gasphase wurde Luft verwendet. Die Reaktionslösung wurde bei 35° mit einer Frequenz von 110/Min geschüttelt und alle 5 Min abgelesen.

Vor der Messung des Sauerstoffverbrauchs wurden die Einflüsse der Kofaktoren kontrolliert. ADP, MgCl<sub>2</sub>, Rinderserumalbumin, Kaliumphosphat, Cytochrom *c* und das Glucose-Hexokinase-System aktivieren; wir haben deshalb diese Kofaktoren mit dem Substrat zugesetzt. NAD hemmt alle Oxydationssysteme leicht und wurde daher nicht zugesetzt; es scheint in den isolierten Mitochondrien in genügender Menge vorhanden zu sein. Bei Verwendung von Pyruvat als Substrat wurde bei Zusatz von Thiaminpyrophosphat, Liponsäure und CoA kein aktivierender Effekt festgestellt.

### *Differenzspektren*

Zur Messung der Differenzspektren wurde in die Vergleichsküvette eine Mitochondrien-Suspension mit einem Proteingehalt von 5 mg/ml als oxydierte Form gegeben, in der Messküvette die Suspension mit einer geringen Menge festem Natriumdithionit reduziert. Die Differenzspektren der Mitochondrien wurden bei 10° mit dem selbstregistrierenden Spektralphotometer SP 800 (Leitz-Unicam) unter Verwendung eines Skalendehnungs-Zusatzes aufgenommen und mit der Absorption eines Holmium- und Didymium-Filters standardisiert.

## ERGEBNISSE

Zur Charakterisierung der Mitochondrien wurde nach der Gradientenzentrifugation in jeder Fraktion der Protein- und RNA-Gehalt, die Aktivität der sauren Phosphatase, sauren Ribonuclease, Uricase und Succinatdehydrogenase bestimmt. Die Werte wurden ferner mit denen des Überstands und der Mikrosomenfraktion verglichen (Abb. 1). Die Proteinbestimmung zeigt drei Maxima, wobei die schwere Komponente bis Fraktion 3 die beim Homogenisieren nicht voneinander getrennten gemischten Partikel enthält, wie ein Vergleich der Enzymaktivitäten und des RNA-Gehalts zeigt. Der mittlere Proteingipfel deckt sich auch im Maximum mit der Uricase- und Succinatdehydrogenase-Aktivität. Bei der Rattenleber wurde nachgewiesen<sup>11</sup>, dass die Uricase enthaltenden Partikel von den Lysosomen verschieden sind, für welche Kathepsin, saure Phosphatase und saure Ribonuclease charakteristische

Leitenzyme sind. Im Falle der Honigbiene lässt sich nicht sicher entscheiden, ob Uricase in den Mitochondrien selbst oder in Partikeln enthalten ist, welche sich von den Mitochondrien nicht abtrennen lassen. Der zweite Proteingipfel trennt sich bei den Larven und den weissäugigen Puppen in eine schwere und eine leichte Fraktion auf. Erst im späten Puppenstadium und bei den frisch geschlüpften Imagines erscheint

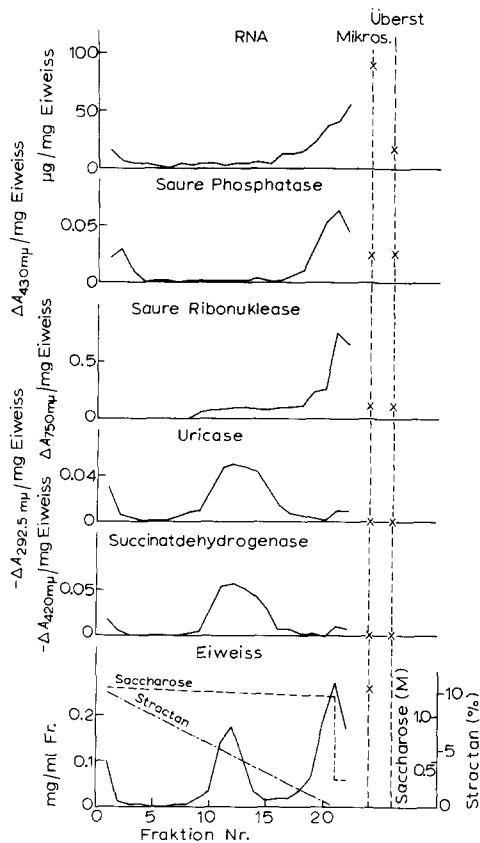


Abb. 1. Charakterisierung der gesammelten Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation.

nur noch eine Mitochondrienbande. Die dritte Proteinzone deckt sich mit dem Aktivitätsmaximum der sauren Phosphatase, der sauren Ribonuklease und enthält den Anstieg der RNA. Die saure Ribonuklease verläuft bei den verschiedenen Entwicklungsstadien immer parallel zur sauren Phosphatase und zeigt damit, dass hier die Lysosomen angereichert sind. Das Differenzspektrum zeigt die Anwesenheit einer geringen Menge Mitochondrien.

Mit der beschriebenen Methode lässt sich aus allen Entwicklungsstadien der Honigbiene ein gereinigtes Mitochondrienpräparat gewinnen, welches weitgehend frei von Lysosomen, Mikrosomen und von Sarkosomen ist. Das Verfahren wurde zunächst dazu benutzt, bei beiden Kasten die Mitochondrienmenge in verschiedenen

Entwicklungsstadien zu bestimmen (Abb. 2). Die dreitägige Königinnenlarve enthält bereits fast 6-mal mehr Mitochondrien als die gleichaltrige Arbeiterinnenlarve. Wegen des sehr viel grösseren Körpergewichts enthält die Königin kurz vor dem Schlüpfen sogar die zehnfache Menge Mitochondrien, die immer noch der doppelten Konzentration pro g Körpergewicht entspricht.

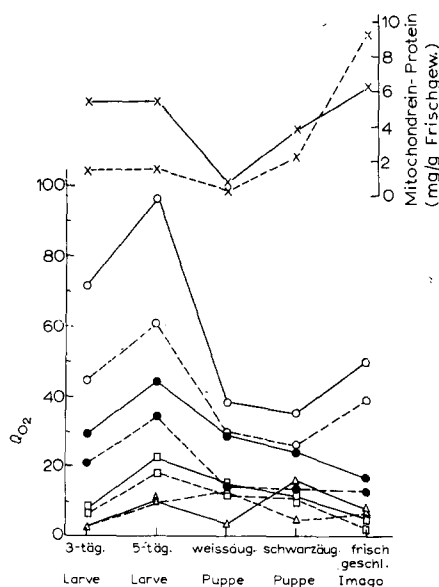


Abb. 2. Mitochondrienmenge (mg Protein pro g Tiergewicht) und  $Q_{O_2}$ -Werte (μl O<sub>2</sub> pro Std pro mg Protein) in Abhängigkeit von der Entwicklung der weiblichen Kasten der Honigbiene. —, Königinnen; ---, Arbeiterinnen. ○, Succinat; ●, α-Glycerophosphat; □, Butyrat; △, Pyruvat.

Zur weiteren Charakterisierung der Mitochondrien wurde der Sauerstoffverbrauch nach Zusatz der Substrate Succinat<sup>12</sup>, α-Glycerophosphat<sup>12</sup>, Pyruvat<sup>12</sup> und Butyrat<sup>13</sup> auf manometrischem Wege bestimmt (Abb. 2). Mit Ausnahme des Pyruvat-Oxydationssystems, dessen Aktivität in allen Entwicklungsstadien sehr niedrig ist, zeigen die oxydierenden Systeme ein Aktivitätsmaximum in den Mitochondrien der 5-tägigen Larven. Ihre Aktivität ist besonders während der Larvenentwicklung in den Königinnen wesentlich höher als in den entsprechenden Entwicklungsstadien der Arbeiterin.

Dieser qualitative Unterschied zwischen den Mitochondrien der beiden Kasten wird besonders deutlich in den Differenzspektren der Komponenten ihrer Atmungskette (Abb. 3). Mitochondrien aus frisch geschlüpfte erwachsenen Tieren zeigen bei beiden Kasten ein komplettes Cytochromsystem. Ein Vergleich besonders des α-Gebiets zeigt, dass frühere Entwicklungsstadien eine geringere Menge Cytochrom *c* enthalten. Dieser Unterschied ist bei den Mitochondrien aus Puppen stärker als bei denen aus Larven und ist besonders ausgeprägt bei den frisch geschlüpfte weissäugigen Puppen. Neben diesem für beide Kasten zutreffenden Unterschied findet man beim Vergleich der Differenzspektren charakteristische Unterschiede zwischen

Königinnen und Arbeiterinnen besonders im Larvenstadium. Die Arbeiterinnenlarven enthalten weniger Cytochromoxydase ( $a+a_3$ ) und auch weniger Cytochrom  $c$ . Bei den Mitochondrien aus Königinnenlarven erkennt man ein deutliches für Cytochrom  $c$  charakteristisches Maximum bei  $550\text{ m}\mu^{14}$ , das bei den Arbeiterinnen durch ein  $c_1$ -Maximum bei  $553\text{--}554\text{ m}\mu$  verdeckt ist. Bei den Königinnenlarven ist dagegen

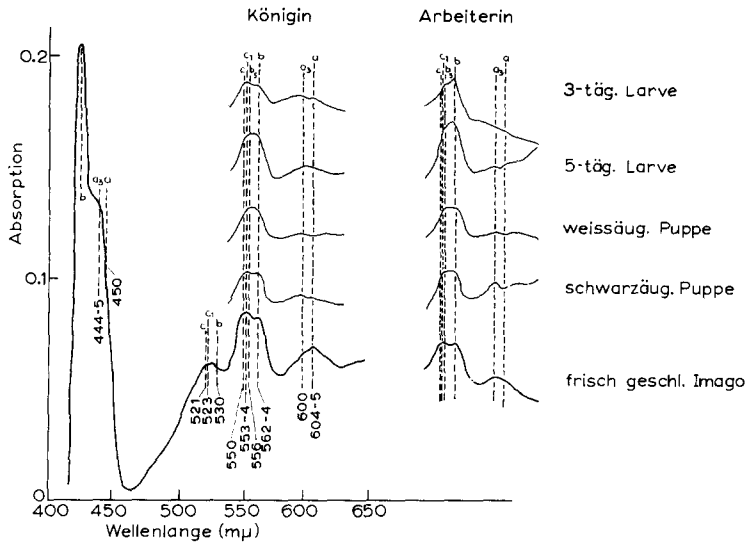


Abb. 3. Differenzspektren von Mitochondrien aus verschiedenen Entwicklungsstadien der weiblichen Kasten der Honigbiene.

das Maximum von Cytochrom  $c$  im  $\alpha$ -Gebiet etwa gleich oder sogar etwas höher als das Maximum für die Cytochrome  $c_1$  und  $b$ . Ob letzteres vorhanden ist, vermögen wir besonders im Larven- und Puppenstadium nicht mit Sicherheit zu sagen. In den erwachsenen Tieren zeigt sich das charakteristische Maximum im  $\gamma$ -Gebiet bei  $430\text{ m}\mu$ , bei den Larven und Puppen dagegen bei  $424\text{--}426\text{ m}\mu$ . Dieser Wert ist kleiner als der für Cytochrom  $b$  ( $430\text{ m}\mu$ )<sup>14</sup> und nahe von Cytochrom  $b_5$  ( $424\text{ m}\mu$ )<sup>15</sup>. HEROLD UND BOREI<sup>16</sup> wiesen Cytochrom  $b_5$  durch die bei  $-196^\circ$  gemessenen Spektren des Puppenhomogenats der Honigbiene nach und noch früher entdeckten ESTABROOK UND SACKTOR<sup>17</sup> in *Musca*-Sarkosomen ein dem  $b_5$  ähnliches Cytochrom mit einer Absorptionsbande bei  $555\text{ m}\mu$ . YAMANAKA, TOKUYAMA UND OKUNUKI<sup>18</sup> isolierten und reinigten ein Cytochrom  $b_{555}$  aus *Musca*-Larven und Puppen, dessen Ultraviolett-Werte  $b_5$  ungefähr gleich sind, dessen Löslichkeit aber vom mikrosomalen Cytochrom  $b_5$  verschieden ist. Diese Frage wird im Falle der Honigbiene noch weiter untersucht werden müssen.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Cytochromsystem nur unter der Wirkung der determinierenden Substanz des Weiseldzellenfuttersaftes und damit nur bei der Königinnenlarve optimal aufgebaut werden kann. Andererseits hat die alimentäre Kastration bei der Arbeiterinnenlarve zur Folge, dass besonders Cytochrom  $c$  und seine Oxydase die Aktivität der Atmungskette limitieren. Zusammen mit einer wesentlich

geringeren Mitochondrienmenge führt dies dazu, dass der spezifische Sauerstoffverbrauch der Arbeiterinnenlarve nur halb so hoch wie der der Königinnenlarve ist.

#### DISKUSSION

Die Isolierung und Reinigung von Insektenmitochondrien bereitet vor allem aus zwei Gründen besondere Schwierigkeiten. Erstens ist es bei solch kleinen Organismen in den meisten Fällen nicht möglich, isolierte Organe aufzuarbeiten; man muss als Ausgangsmaterial ein Homogenat der ganzen Tiere verwenden, welches dann Zellorganellen aus verschiedenen Geweben enthält. Zweitens enthalten Insektengewebe, besonders der Fettkörper von Larven und Puppen grosse Mengen Glykogen. Diese Körnchen beeinflussen die Abtrennung der Mitochondrien von anderen Zellpartikeln und lassen durch ihre Trübung die Mitochondrienzone nach der Dichtegradienten-Zentrifugation nicht so deutlich erkennen, wie es beispielsweise mit Lebermitochondrien aus glykogenarmen Hungerratten möglich ist. Die oben beschriebene Methode der Fraktionierung im Saccharose-Stractan-Dichtegradienten erlaubt aber trotzdem die Gewinnung verhältnismässig reiner Mitochondrien. Das zeigt sich besonders deutlich im Verlauf der verschiedenen Enzymaktivitäten und des RNA-Gehalts über das Sedimentationsprofil.

Die vergleichende Analyse der Differenzspektren zeigt, dass sich die Mitochondrienpräparate der beiden weiblichen Bienenkasten vor allem im Larvenstadium stark voneinander unterscheiden. Die Aktivität der Atmungskette wird bei den Arbeiterinnen durch die beiden Komponenten Cytochrom *c* und Cytochromoxydase limitiert. Dieser starke quantitative Unterschied darf wohl als Hauptursache für die grosse Differenz im Sauerstoffverbrauch von Königinnen und Arbeiterinnen angesehen werden. Dazu kommt die grössere Mitochondrienmenge bei der Königin, deren Atmung in allen Entwicklungsstadien<sup>3</sup> wesentlich höher als die einer gleichaltrigen Arbeitsbiene ist. Man darf wohl als sicher annehmen, dass für die Stimulierung des Mitochondrienwachstums und für die schon im Larvenstadium erfolgende Komplettierung des Cytochromsystems die im Futtersaft der Königinnenlarve enthaltene determinierende Substanz<sup>2</sup> verantwortlich ist.

Eine quantitative Aussage über die einzelnen Komponenten des Cytochromsystems bleibt einer Analyse bei tiefen Temperaturen vorbehalten. Wir haben aber schon jetzt verschiedene Hinweise darauf, dass die Larven und Puppen der Arbeiterin einen Mangel an Cytochrom *c* haben (M. OSANAI UND H. REMBOLD, un veröffentlichte Ergebnisse). So führt zum Beispiel ein Zusatz dieses Kofaktors zum Gesamthomogenat aus Larven und Puppen zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch; ein Homogenat frisch geschlüpfter Arbeiterinnen wird nicht stimuliert. Die spezifische Aktivität der Succinatdehydrogenase ist dagegen bei den Larven beider Kasten gleich hoch.

Für die vollständige Abtrennung der Sarkosomen sprechen die folgenden Überlegungen. Ihre Isolierung aus dem fibrillären Thoraxmuskel der Dipteren und Hymenopteren ist bei unterschiedlichen Schwerefeldern beschrieben<sup>12,19,20</sup>. Da diese Organellen bei der Honigbiene etwa 2-mal grösser als gewöhnliche Mitochondrien sind<sup>21,22</sup>, beobachtet man bei Zentrifugation des Homogenats frisch geschlüpfter Imagines schon mit  $1200 \times g$  ein Sediment, das sich als braune Schicht auf der Kernfraktion absetzt. Bei weiterer Zentrifugation scheidet sich dann kein Niederschlag

mehr ab. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Sarkosomen der Honigbiene durch zweimalige Zentrifugation bei  $1200 \times g$  vollständig abgetrennt werden.

Als Leitenzyme der Lysosomen haben wir zunächst die Aktivität der sauren Desoxyribonuclease und des Kathepsins zu bestimmen versucht. Sie ist aber in allen Stadien so gering, dass wir zur Charakterisierung die saure Phosphatase heranziehen mussten. Auch deren Aktivität lässt sich bei Verwendung der Substrate  $\beta$ -Glycerophosphat und AMP nicht quantitativ bestimmen. Dagegen ist *p*-Nitrophenylphosphat<sup>10</sup> als hydrolysierbares Substrat gut geeignet, wenn auch seine Reaktion von der natürlichen Substrate der sauren Phosphatase verschieden ist<sup>23,24</sup>.

Die dritte Proteinzone der Gradientenzentrifugation hat im Vergleich zur Mikrosomenfraktion eine höhere Aktivität der sauren Phosphatase. Diese kann also nicht von der mikrosomalen Glucose-6-phosphatase<sup>25</sup> herrühren, welche bei Säugern neben Glucose-6-phosphat auch *p*-Nitrophenylphosphat hydrolysieren kann<sup>23</sup>. Die Aktivität der dritten Proteinzone ist auch höher als die der im Zentrifugationsüberstand vorhandenen sauren Phosphatase (Abb. 1). In den Partikeln der dritten Proteinzone wird die saure Phosphatase durch Alloxan, nicht aber durch Tatronsäure gehemmt. Im Falle der Überstandsfraction liegen die Verhältnisse genau umgekehrt. Neben diesem Ergebnis spricht auch der Verlauf der sauren Ribonuclease dafür, dass es sich bei den im Dichtegradienten in der dritten Proteinzone sedimentierenden Partikeln hauptsächlich um Lysosomen handelt.

#### DANKSAGUNG

Herrn Professor A. BUTENANDT sind wir für die Förderung dieser Untersuchung zu Dank verpflichtet. Der A. v. HUMBOLDT-STIFTUNG danken wir für ein Forschungstipendium an M. OSANAI, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Biochemie der Morphogenese". Wertvolle technische Hilfe leistete Fräulein NANCY FITZGERALD. Das Tiermaterial wurde in grosszügiger Weise von Herrn Dr. K. A. FORSTER, Fa. H. Mack Nachf. zur Verfügung gestellt.

#### LITERATUR

- 1 H. REMBOLD, Vorl. Mitt., 21st Intern. Apicult. Congr., University of Maryland, 1967; M. OSANAI UND H. REMBOLD, *Z. Physiol. Chem.*, 348 (1967) 1240.
- 2 H. REMBOLD UND G. HANSER, *Z. Physiol. Chem.*, 339 (1964) 251; Übersicht: H. REMBOLD, *Vitamins, Hormones*, 23 (1965) 359.
- 3 R. M. MELAMPY UND E. R. WILLIS, *Physiol. Zool.*, 12 (1939) 302.
- 4 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR UND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 5 E. VOLKIN UND W. E. COHN, *Methods Biochem. Anal.*, 1 (1954) 287.
- 6 E. C. SLATER UND W. D. BONNER, *Biochem. J.*, 52 (1952) 185.
- 7 W. C. SCHNEIDER UND G. H. HOGEBOOM, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 161.
- 8 M. R. McDONALD, *Methods Enzymol.*, 2 (1955) 427.
- 9 J. B. SUMNER, *Science*, 100 (1944) 413.
- 10 Y. OHMORI, *Enzymologia*, 4 (1937) 217.
- 11 P. L. SAWANT, S. SHIBKO, U. S. KUMTA UND A. L. TAPPEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 85 (1964) 82.
- 12 E. R. BALBONI, *J. Insect Physiol.*, 11 (1965) 1559.
- 13 C. BODE UND M. KLINGENBERG, *Biochem. Z.*, 341 (1965) 271.
- 14 B. CHANCE UND G. R. WILLIAMS, *Advan. Enzymol.*, 17 (1956) 65.

- 15 D. GARFINKEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 199.
- 16 R. C. HEROLD UND H. BOREI, *Develop. Biol.*, 8 (1963) 67.
- 17 R. W. ESTABROOK UND B. SACKTOR, *Arch. Biochem. Biophys.*, 76 (1958) 532.
- 18 T. YAMANAKA, S. TOKUYAMA UND K. OKUNUKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 77 (1963) 592.
- 19 J. C. CERNEY, *J. Insect Physiol.*, 12 (1966) 1093.
- 20 M. J. WATANABE UND C. M. WILLIAMS, *J. Gen. Physiol.*, 34 (1951) 675.
- 21 M. ROCKSTEIN UND P. L. BHATNAGAR, *J. Insect Physiol.*, 11 (1965) 481.
- 22 M. J. WATANABE UND C. M. WILLIAMS, *J. Gen. Physiol.*, 37 (1954) 71.
- 23 M. W. NEIL UND M. W. HORNER, *Biochem. J.*, 84 (1962) 32P.
- 24 A. L. TAPPEL, P. L. SAWANT UND S. SHIBKO, *Ciba Found. Symp., Lysosomes*, (1963) 78.
- 25 H. BEAUFAY, D. S. BENDALL, P. BANDHUIN UND T. C. DE DUVE, *Biochem. J.*, 73 (1959) 623.

*Biochim. Biophys. Acta*, 162 (1968) 22-31