

Aus dem Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere der Universität Bonn,  
Lehr- und Forschungsbereich Biochemie, und dem Zoologischen Forschungsinstitut  
und Museum Alexander Koenig, Bonn, Herpetologische Abteilung

## Die Aminosäurezusammensetzung von Reptilien-Eischalen in biochemischer und evolutiver Sicht

Von G. KRAMPITZ, W. BÖHME, K. KRIESTEN und W. HARDEBECK

Eingegangen am 9. Mai 1973

### I. Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Zusammenfassung des seither zu diesem Thema vorliegenden Materials in Form eines Vorblickes.

Es ist beabsichtigt, eine Serie spezieller Arbeiten folgen zu lassen, die sich, auf verbreiteter Materialgrundlage, mit den Eischalen der einzelnen Reptiliengruppen gesondert befassen werden.

Ein wichtiger Schritt in der Evolution der Wirbeltiere war die Fähigkeit zur Ablage von beschaltem Eiern auf dem Lande. Diese Eier sind im Gegensatz zu denen von Fischen und Amphibien durch eine pergamentartige oder kalkige Schale besser gegen mechanische Beschädigungen geschützt. Andererseits sind die beschaltem Eier landbewohnender Vertebraten nicht mehr befähigt, sich im Wasser zu entwickeln.

Im Vergleich zu Vogeleiern ist demzufolge hier mit einer vielseitigeren Konstruktion der Eischalenproteine zu rechnen. KRAMPITZ et al. (1973 a) haben nachweisen können, daß in nicht eindeutig verkalkten Eischalen, z. B. *Eublepharis macularis*, *Varanus bengalensis*, *Natrix natrix* u. a. gänzlich andere Proteine zu finden waren als in Vogeleischalen. Ferner hat ERBEN (1972) auf Eischalen von *Natrix natrix* Kristalle festgestellt, so daß wir hinsichtlich der Ausbildung von Biomineralisaten bei Reptilien offenbar gleitende Übergänge zwischen kalkigen Eischalen – z. B. Krokodile – und eindeutig kalkfreien Eischalen (Schlangen) rechnen müssen. Dies läßt rein funktionell gesehen ebenfalls eine Vielseitigkeit der Proteine erwarten. Vom Standpunkt der Biomineralisation aus betrachtet, findet man in kalkigen Eischalen von Reptilien sowohl Calcit (Krokodile und Gekkoniden) als auch Aragonit (Schildkröten) (KRAMPITZ et al. 1972). Dies dürfte ebenfalls auf eine verschiedenartige Protein-Matrix zurückzuführen sein. Daß zwischen der organischen Matrix und der sich bildenden mineralischen Phase ein Zusammenhang bestehen soll, ist nach der Matrixtheorie angenommen worden (SEIFERT 1971; MATHEJA und DEGENS 1968). ERBEN (1970) hat kürzlich entsprechende Auffassungen für die kalkigen Eischalen von Vögeln und Reptilien vertreten.

Im Fall der Molluskenschale haben GHISELIN, DEGENS, SPENCER und PARKER (1967) aus ihren Ergebnissen gefolgert, daß die Aminosäuren-Zusammensetzung der organischen Matrices im Verlauf der Evolution Änderungen unterworfen war, die bestimmten generellen Tendenzen folgten. Außerdem hat sich inzwischen gezeigt, daß im

Bereich der Ultrastrukturen der anorganischen Eischalenkomponenten phylogenetisch bedingte Veränderungen durchaus feststellbar sind (ERBEN 1970). KRAMPITZ et al. (1973 a) konnten stammesgeschichtliche Zusammenhänge innerhalb der Infraklasse Ratitae an Hand des Aminosäureprofils von Proteinen aus morphologischen Eischalenfraktionen ableiten. Eine umfassende Klärung dieses Problems wird aber erst nach weiteren systematischen Studien zu erwarten sein.

Über die Natur der Proteine aus Reptilieneischalen ist verhältnismäßig wenig bekannt. KRAMPITZ et al. (1972) haben die Aminosäurezusammensetzung einiger verkalkter Reptilien-Eischalen analysiert. Dabei sind die Daten der gesamten Eischalen und der Membranafraktion vorgelegt worden.

Die Membranafraktionen von Krokodil-Eischalen und von verkalkten Schildkröten-Eischalen zeichneten sich durch einen vergleichsweise hohen Gehalt an Cystin aus. Dagegen fanden sich in nicht verkalkten Eimembranen auffallend hohe Prolin-Werte (KRAMPITZ 1973 a).

Es ist deshalb zwischen „prolin-armen“ und „prolin-reichen“ Schalenproteinen bei Reptilien unterschieden worden. Der „cystein-reiche“, aber gleichzeitig „prolin-arme“ Typ an Schalenproteinen findet sich regelmäßig in der Membrana testacea von Vogeleischalen und eindeutig verkalkten Reptilieneischalen. Der „prolin-reiche“ Proteintyp findet sich stets in den Eischalen-Membranen, die wenig oder gar nicht verkalkt sind.

## II. Material und Methoden

### a. Material

Das in dieser Arbeit verwendete Material wurde uns von folgenden Personen bzw. Institutionen zur Verfügung gestellt:

Dr. CH. BRANDES, Bremen, Dr. J. CHAUSIER, Paris, Dr. W. FIEDLER, Wien, Dr. H. CHR. FREUND, Buenos Aires, Fa. Happ, Ravensburg, Dr. JACOBY, Amsterdam, Dr. T. JOANEN, Grand Chenier/Louisiana, Loggerhead Turtle Laboratory, Ramrod Kay/Florida, Dr. G. MELCHIOR, Straubing, Dr. W. NEUGEBAUER, Stuttgart, Dr. J. U. OHLAU, Calcutta, R. H. PARKER, Durban, Dr. A. RODRIGUEZ, Buenos Aires, CHR. R. SCHMIDT, Zürich, OTHMAR STEMMLER, Basel, Dr. J. D. VAN DAM, Rotterdam, J. VAN ROON, Rotterdam, Dr. D. R. WELLS, Kuala Lumpur, Dr. ZAHN, Düsseldorf.

Für diese freundliche Unterstützung sagen wir unseren verbindlichen Dank. Für wertvolle technische Hilfe danken wir Frl. U. DEGEN, Bonn.

### b. Methoden

Die kalkigen Eischalen ließen sich morphologisch in folgende Fraktionen trennen: Membrana testacea und Matrix (löslicher und unlöslicher Anteil); ein Tegmentum konnte in den meisten Fällen nicht gewonnen werden. Über die Präpariertechnik ist an anderer Stelle bereits berichtet worden (KRAMPITZ et al. 1972).

Auch die weitere Aufbereitung der Proben zur chemischen Analyse und die Bestimmung der Proteinbausteine haben wir an anderer Stelle ausführlich beschrieben (KRAMPITZ et al. 1972), so daß hier auf eine detaillierte Darstellung verzichtet werden kann.

## III. Ergebnisse

Wir haben keine Bestimmungen von Aminosäuren in verkalkten Gesamtschalen von Reptilien vorgenommen, da dabei erhaltene Werte nur eine begrenzte Aussagekraft besitzen. Aus vergleichenden Studien an Vogeleischalen wissen wir, daß verschieden

konstruierte Strukturproteine in den einzelnen morphologischen Fraktionen (KRAMPI TZ 1973 a) vorkommen. Ferner existieren in Eischalen neben Proteinen auch noch Peptide, vielleicht sogar freie Aminosäuren.

Aus diesem Grund legen wir hier Daten von morphologischen Eischalen-Fractionen vor. In Einheiten nicht verkalkter Reptilieneier ist dagegen eine solche Unterteilung praktisch nicht möglich. Analysen verschiedener Schichten nicht verkalkter Eischalen haben keine Unterschiede gebracht. Deshalb können in diesem Fall nur Untersuchungsergebnisse der Gesamtschale genannt werden.

## A. Testudinata (Schildkröten)

### a. *Membrana testacea*

Die Aminosäuren-Analysen der Membranen von Schildkröteneiern sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die Aminosäurezusammensetzung der *Membrana testacea* der in Tab. 1 genannten Schildkröten zeigt ein nur relativ gleichmäßiges Bild. Daß Methionin in geringer Konzentration vorkommt, überrascht nicht. Dagegen fällt bei diesen Testudo-Arten ein vergleichsweise niedriger Cystin-Gehalt (3,9–6,71 Mol-%) auf. Der Prolin-Gehalt liegt bei allen in diesen Tabellen genannten Testudo-Arten einheitlich bei 8 Mol-%. Während die Glutaminsäure-Werte bei *T. hermanni* und *T. denticulata* ein annähernd gleiches Niveau halten, läßt sich eine ähnliche Beobachtung für die Daten von Serin bei *T. pardalis* und *T. elegans* feststellen. Eine entgegengesetzte Tendenz findet man für Threonin. *T. elegans* fällt durch einen verhältnismäßig hohen Wert für Asparaginsäure auf. Ein vergleichbar hoher Wert konnte bei anderen Testudinaten bisher nicht beobachtet werden. *T. elegans* hebt sich noch durch die Daten für Histidin, Lysin, Phenylalanin, Leucin und Valin von *T. hermanni* und *T. denticulata* ab. Die Membranproteine von *T. pardalis* weisen einen auffallend niedrigen Cystingehalt auf. In Tab. 2 sind die Daten der Aminosäurezusammensetzung von *T. carbonaria*, *T. elephantopus*, *Emys orbicularis* und *Dermochelys coriacea* zusammengestellt. Die hier dargestellten Werte zeigen wesentlich größere Abweichungen als die in Tab. 1 genannten Daten. Vor allem fällt auf, daß *T. carbonaria* und *Emys orbicularis* hohe Cystinwerte in der Membrana aufweisen. Dies ist um so bemerkenswerter, weil die anderen bisher untersuchten Schildkröten in der *Membrana testacea* wesentlich niedrigere Werte für diese spezielle Aminosäure besitzen. *T. elephantopus*, *Emys* und *Dermochelys* liegen in ihren Gehalten für Prolin wesentlich höher als alle anderen bisher analysierten Testudo-Arten. Bei *Emys* ist ein hoher Prolin-Gehalt mit einem ebenso hohen Wert für Cystin gekoppelt. *Emys* und *Dermochelys* weisen einen z. T. doppelt so hohen Glycin-Gehalt auf als alle bisher genannten Testudo-Arten. Alanin, Tyrosin, Histidin und Lysin liegen bei den Testudo-Arten höher als bei *Emys* und *Dermochelys*. Die Daten für Arginin sind bei *Emys* eindeutig höher als bei Testudo, aber der Gehalt dieser Aminosäure ist bei *Dermochelys* noch niedriger als bei Testudo. Bei den hier untersuchten Testudo-Arten findet sich stets ein höherer Isoleucin-Gehalt als bei *Emys* und *Dermochelys*.

### b. Matrix

In Tabelle 2 ist die Aminosäurekomposition der unlöslichen Matrix von Schildkröten zusammengestellt. Die Daten für praktisch alle Aminosäuren steigen von *T. hermanni* über *T. marginata* und *T. denticulata* zu *T. sulcata* hin an. Die Aminosäurewerte der Matrices von *T. sulcata* und *T. elephantopus* stimmen für verschiedene Aminosäuren überein, jedoch liegen die Daten für Serin, Lysin, Arginin und Histidin bei

Tabelle 1  
Aminosäuren-Zusammensetzung der Membrana testacea von Schildkröten und Krokodilen  
(Angaben in Mol-%)

	<i>Testudo hermanni</i>	<i>Testudo denticulata</i>	<i>Testudo pardalis</i>	<i>Testudo carbonaria</i>	<i>Testudo elephantopus</i>	<i>Testudo elegans</i>	<i>Emys orbicularis</i>	<i>Dermochelys coriacea</i>	<i>Crocodylus niloticus</i>	<i>Caiman crocodilus</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>
Asp	7,41	7,62	6,81	5,47	6,07	10,30	5,22	7,16	7,35	7,15	5,57
Thre	6,72	6,05	5,75	2,80	5,81	5,22	7,34	7,06	6,73	7,17	4,86
Ser	6,75	7,17	8,82	6,04	6,50	8,02	6,10	3,94	5,00	6,08	3,37
Glu	8,48	8,54	7,58	6,04	7,66	7,12	6,84	8,46	4,97	8,39	5,88
Pro	8,58	8,66	8,07	7,92	13,85	8,12	13,13	10,79	9,35	9,39	5,32
Gly	7,16	6,79	6,67	7,45	7,04	6,25	13,87	11,49	6,78	8,36	9,30
Ala	5,30	5,60	5,97	4,80	4,73	4,53	3,51	2,87	3,24	5,27	3,96
Cys <sup>1/2</sup>	6,71	5,79	3,94	14,08	6,29	6,27	14,32	4,76	11,07	13,86	4,16
Val	5,71	5,43	5,36	5,05	5,94	4,09	4,98	7,34	8,82	6,48	7,13
Meth	0,65	0,72	0,78	0,66	0,72	0,40	0,52	0,34	0,41	0,37	Spuren
Ileu	4,18	3,52	4,19	4,82	5,01	4,79	2,50	2,77	2,88	3,65	2,78
Leu	5,27	5,22	5,02	4,80	5,44	4,71	5,34	5,53	3,58	7,29	5,28
Tyr	3,70	3,58	3,72	3,62	3,39	3,18	2,17	1,08	1,53	0,93	2,72
Phe	3,27	3,08	3,41	2,52	2,56	2,10	1,63	3,81	1,28	2,00	1,62
Lys	5,10	4,24	4,18	5,66	4,18	6,22	3,96	1,42	4,85	4,16	7,72
His	2,34	2,55	2,38	2,53	2,56	3,10	1,39	Spuren	5,03	4,78	5,68
Arg	4,75	5,43	5,48	6,18	4,46	5,99	7,34	3,74	5,28	5,29	11,67

*T. sulcata* eindeutig höher als bei *T. elephantopus*. Andererseits finden sich bei *T. elephantopus* eindeutig höhere Werte für Prolin, Glycin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin und Phenylalanin.

Die Aminosäuren-Profile der Matrices von *Testudo*-Arten lassen sich nach einem anderen Gesichtspunkt gliedern. Die Matrices von *T. hermanni*, *T. marginata* und *T. denticulata* weisen eindeutig einen geringen Cystingehalt auf, während *T. sulcata* und *T. elephantopus* einen beachtlichen Gehalt an Cystin besitzen. Die niedrigen Werte an Aminosäuren bei *T. hermanni* und *T. marginata* sind durch einen hohen Gehalt an Amiden (Glutamin und Asparagin) erklärbar. Deshalb grenzen sich diese beiden Spezies gegenüber *T. sulcata*, *T. denticula* und *T. elephantopus* ab. Das wird bei einer Reihe von Aminosäuren erkennbar, z. B. Threonin, Prolin, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Arginin.

In den Eischalen von Vögeln kommen neben unlöslichen Proteinen bzw. Glykoproteinen auch noch verhältnismäßig niedermolekulare, aber lösliche Peptide vor (KRAMPITZ et al. 1973a; KRAMPITZ et al. 1972).

Wir haben dies bei *T. sulcata* ebenfalls unter-

Tabelle 2

## Aminosäuren-Zusammensetzung der unlöslichen Matrix von Schildkröten und Krokodilen

(Angaben in Mol-%)

	<i>Testudo hermanni</i>	<i>Testudo marginata</i>	<i>Testudo sulcata</i>	<i>Testudo denticulata</i>	<i>Testudo elephantopus</i>	<i>Crocodylus niloticus</i>	<i>Caiman crocodilus</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>
Asp	3,96	6,61	7,03	7,52	7,16	8,64	10,66	7,60
Thre	2,45	3,44	5,91	4,76	5,57	8,07	7,49	6,64
Ser	3,32	5,52	7,68	5,76	6,03	6,10	5,34	4,04
Glu	3,98	7,13	6,55	7,80	7,09	5,74	9,17	6,57
Pro	4,49	6,12	9,12	8,20	10,94	10,62	6,16	4,58
Gly	4,02	4,00	9,79	6,10	11,04	10,55	6,13	8,71
Ala	2,11	2,99	6,80	4,37	7,05	5,99	4,52	3,80
Cys 1/2	Spuren	Spuren	5,85	0,79	5,58	4,03	1,84	2,23
Val	1,92	2,52	8,55	4,58	8,86	9,31	5,18	7,06
Meth	Spuren	Spuren	0,77	0,82	1,09	0,74	0,34	Spuren
Ileu	1,19	1,57	4,28	2,39	5,50	4,73	2,99	3,52
Leu	1,46	2,68	5,63	4,73	6,30	5,60	5,44	6,09
Tyr	0,72	0,65	2,90	2,27	3,98	2,17	1,28	2,31
Phe	0,34	0,89	3,26	2,68	3,80	1,78	1,40	2,35
Lys	1,73	2,18	8,04	3,54	5,48	5,49	3,89	4,39
His	0,89	1,17	1,21	1,38	0,78	4,49	3,52	2,12
Arg	1,59	1,80	3,54	3,32	3,67	6,04	6,90	4,93

sucht. Bei den Analysen der löslichen Schalenbestandteile fiel auf, daß innerhalb einer Spezies starke individuelle Schwankungen auftreten können. Bemerkenswert ist aber, daß in löslichen Matrixbestandteilen von Testudinaten bisher keine schwefelhaltigen Aminosäuren gefunden werden konnten. Dies stimmt mit Befunden an Vogeleiern überein (KRAMPITZ et al. 1973 a). Wegen der starken individuellen Streubreite ist darauf verzichtet worden, weitere Spezies-Vergleiche vorzunehmen.

## B. Crocodylia

a. *Membrana testacea*

Die Daten der *Membrana testacea* von *Crocodylus niloticus* und *Caiman crocodilus* stimmen nur in einigen wenigen Aminosäuren überein, z. B. Asparaginsäure, Prolin, Methionin, Lysin und Arginin (Tab. 1). Dagegen fällt eine relative Übereinstimmung bei Cystin auf. Der Leucin-Gehalt der Eischalenmembran ist beim Nilkrokodil doppelt so hoch wie beim Brillenkaiman. Alle anderen – bisher in diesem Zusammenhang nicht genannten Aminosäuren – zeigen bei diesen Spezies ebenfalls Unterschiede, z. B. für Glutaminsäure, Alanin, Valin, Isoleucin, Tyrosin und sehr deutlich für Histidin.

b. *Matrix*

Die Aminosäuren-Gehalte der unlöslichen Matrix vom Nilkrokodil und vom Brillenkaiman sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

*Crocodylus niloticus* unterscheidet sich in seinem Aminosäuren-Profil deutlich von *Caiman crocodilus*. Besonders auffallend ist der Cystin-Gehalt, der beim Nilkrokodil um ein Mehrfaches höher liegt als beim Kaiman. Im Vergleich der unlöslichen Matrix vom Kaiman sind beim Krokodil außerdem noch folgende Aminosäuren deutlich erhöht: Threonin, Serin, Prolin, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Tyrosin, Lysin und

Histidin. Niedriger als beim Kaiman liegen Asparaginsäure und Glutaminsäure. Arginin und Leucin sind in beiden Fällen gleich hoch.

Wie an anderer Stelle bereits ausgeführt, sind die löslichen Matrixbestandteile nicht unerheblichen, individuellen Schwankungen ausgesetzt, so daß ein Artenvergleich keine besondere Aussagekraft gewinnt. Deshalb ist auf eine gesonderte Tabelle hier verzichtet worden. Ferner ist ein Vergleich von löslichen und unlöslichen Matrixbestandteilen von der gleichen Probe vorgenommen worden. Die löslichen Anteile enthalten praktisch nur spurenhafte Aminosäuren. Verglichen mit der unlöslichen Matrix findet man im löslichen Anteil eindeutig mehr an Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Isoleucin und Tyrosin. Threonin, Serin, Glycin, Valin, Methionin und Phenylalanin werden in der löslichen Matrix-Fraktion erniedrigt.

### C. Squamata

#### 1. Lacertilia

##### *Gekkonidae* (Geckos)

Bei den Geckos kommen Eier mit kalkiger und pergamentartiger Schale vor. Eine Trennung in Membrana testacea und morphologische Kalkschalenfraktionen war bei den verkalkten Eischalen praktisch nicht möglich. Die uns zur Verfügung stehenden Proben enthielten sehr geringe Mengen an organischem Material, so daß wir bei der ohnehin geringen Menge an Untersuchungsgut auf eine Aufteilung verzichten mußten. Bei Eischalen von *Eublepharis* stellt sich dieses Problem nicht; bei dieser Spezies und auch bei allen anderen nicht eindeutig verkalkten Eischalen von Squamaten ließen sich keine morphologischen Schalenstrukturen (wie z. B. bei Krokodileiern) abtrennen. Dabei sind die gereinigten Gesamtschalen der im folgenden beschriebenen Squamaten analysiert worden. Die Analysenergebnisse sind in Tabelle 3 enthalten.

Tabelle 3

#### Aminosäuren-Zusammensetzung der Eischalen von Echsen

(Angaben in Mol-%)

	<i>Tarentola mauretanica</i>	<i>Phelsuma cepediana</i>	<i>Eublepharis macularius</i>	<i>Iguana iguana</i>	<i>Basiliscus plumifrons</i>	<i>Anolis leachi</i>	<i>Anolis equestris</i>	<i>Chamaeleo chamaeleon</i>	<i>Amphibo- lurus barbatus</i>
Asp	11,00	3,92	2,97	5,03	6,24	5,87	5,41	10,33	3,60
Thre	4,98	2,76	3,01	2,47	1,45	2,20	2,32	5,10	1,58
Ser	11,58	4,44	3,63	3,79	2,83	4,21	3,07	6,11	2,71
Glu	13,70	4,32	3,65	3,70	3,87	5,02	4,18	7,21	3,30
Pro	7,39	34,31	37,43	41,72	33,86	27,68	18,92	27,12	24,65
Gly	5,03	6,43	5,74	6,79	9,71	9,49	9,66	7,56	9,29
Ala	7,58	3,57	4,62	6,36	10,10	6,47	8,54	3,35	5,08
Cys 1/2	0,48	Spuren	6,73	3,57	4,00	1,79	2,82	1,81	2,55
Val	5,92	3,73	5,35	3,21	4,29	4,22	4,42	4,25	2,01
Meth	2,05	Spuren	Spuren	0,46	Spuren	0,39	—	0,38	Spuren
Ileu	4,45	2,35	2,20	1,86	1,17	2,10	1,54	3,45	0,76
Leu	7,99	2,52	0,98	3,16	3,44	4,08	4,32	3,30	2,74
Tyr	1,97	1,17	4,78	3,80	6,35	5,33	6,47	3,68	8,63
Phe	3,04	0,62	0,72	1,69	3,03	1,41	1,86	1,59	0,67
Lys	7,55	1,90	0,99	1,72	0,32	1,96	1,13	2,50	0,93
His	2,18	4,93	7,37	3,26	2,29	3,85	3,73	4,84	4,16
Arg	3,02	5,44	4,01	1,48	1,37	1,41	2,13	2,98	2,36

In einer früheren Arbeit (KRAMPITZ et al. 1972) ist bereits zum Ausdruck gebracht worden, daß sich die Aminosäuren-Daten von Gecko-Eischalen nur schwer in einen Zusammenhang bringen lassen. Die kalkigen Eischalen von *Gekkonidae* – z. B. *Tarentola mauritanica* und *Phelsuma cepediana* – enthalten nur sehr geringe Mengen an Cystin. Alle anderen Aminosäuren zeigen praktisch keine übereinstimmenden Werte.

Bei *Phelsuma cepediana* fällt zusätzlich ein besonders hoher Prolin-Wert auf, der in gleicher Größenordnung von der nicht verkalkten Eischale von *Eublepharis macularis* erreicht wird. Ähnliche Zusammenhänge lassen sich auch für andere Aminosäuren erkennen, z. B. Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Histidin, Lysin, Alanin, Glutaminsäure, Serin, Threonin und Asparaginsäure. Es zeichnet sich folgender Trend ab: *Eublepharis* fällt bei hohem Prolin-Gehalt mit einem gleichzeitig hohen Cystin-Wert auf. Obwohl noch verkalkt, nehmen die Proteine der Eischalen von *Phelsuma* eine Mittelstellung ein, denn es fehlt der typische Gehalt an Cystin – wie bei *Tarentola* oder *Lygodactylus* (KRAMPITZ et al. 1972). Dafür tritt Prolin in erhöhtem Maße auf. Ein hoher Prolin-Wert ist im übrigen charakteristisch für eindeutig nicht verkalkte Schalen. Ferner steigt der Gehalt an Histidin von *Tarentola* über *Phelsuma* zu *Eublepharis* an. Ein ähnlicher Übergang läßt sich für Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Glutaminsäure, Serin und Asparaginsäure feststellen.

Cystin dagegen findet sich in größeren Mengen nur bei *Eublepharis*, während Methionin in deutlich erkennbarem Maße bei *Tarentola* vorkommt. Die Aminosäurezusammensetzung der Membranproteine von *Phelsuma* und *Eublepharis* ähneln sich mehr als die von *Tarentola* und *Phelsuma* bzw. *Eublepharis*.

#### *Iguanidae* (Laguane)

Von dieser Gruppe sind keine verkalkten Eischalen bekannt. In Tabelle 3 sind die Untersuchungsergebnisse von *Iguana iguana* und *Basiliscus plumifrons* zusammengefaßt. Das Aminosäuren-Profil der Eischalen von *Iguana iguana* fällt durch einen extrem hohen Wert an Prolin auf. Neben Prolin kommt aber auch Cystin vor (3,6 Mol-%).

*Basiliscus* besitzt einen ebenfalls hohen Gehalt an Prolin; dieser Wert ist aber entschieden niedriger als bei *Iguana*. Besonders hoch ist vor allem auch der Wert für

<i>Agama mossambica</i>	<i>Chlamydosaurus kingii</i>	<i>Ablepharus kitaibelii</i>	<i>Ophisops elegans</i>	<i>Lacerta agilis</i>	<i>Lacerta saxicola</i>	<i>Ophisaurus apodus</i>	<i>Gerrhonotus multicarinatus</i>	<i>Varanus salvator</i>	<i>Varanus mertensi</i>
5,89	3,27	5,80	2,46	4,17	7,31	3,60	4,62	2,70	3,65
2,04	3,83	3,31	3,05	3,91	5,34	2,03	1,89	1,85	1,56
2,93	4,09	6,08	4,57	3,64	5,67	2,53	4,19	4,43	3,08
2,81	3,63	6,85	5,29	5,04	6,48	3,80	3,94	2,14	2,30
33,51	42,16	26,25	36,77	32,13	32,40	31,71	53,19	34,64	35,55
13,47	8,40	6,47	8,86	4,86	5,73	4,65	4,32	5,64	8,29
4,18	5,67	5,83	4,03	3,66	4,65	4,02	2,67	3,81	4,21
3,29	3,45	0,67	2,73	1,84	2,82	2,47	0,98	3,34	3,69
3,63	2,19	4,01	2,90	4,39	2,46	1,81	1,79	1,86	3,10
0,51	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	0,24	0,45	Spuren	Spuren
1,31	1,64	2,68	1,23	2,46	2,10	1,51	1,38	0,53	1,17
2,36	2,71	4,66	2,52	4,09	3,97	1,99	2,32	3,37	4,93
6,37	0,81	2,39	2,07	4,47	2,88	7,11	1,58	1,83	2,27
1,74	0,63	2,48	0,92	1,09	1,33	1,10	1,25	0,38	0,98
1,16	1,39	1,49	1,72	1,38	1,36	0,70	1,33	2,03	1,57
4,55	4,77	2,65	3,49	0,75	2,91	4,08	3,87	12,76	7,97
1,92	2,10	3,85	3,36	3,72	3,62	2,49	2,08	6,70	4,66

Glycin. Es fehlt aber praktisch Cystin. Der Wert für Histidin ist hier ebenfalls niedriger als bei der ausgesprochen prolin-reichen Eischalenmembran von *Iguana*. Bei aller Verschiedenheit im Aufbau der Eischalen-Membran-Proteine besitzen alle Spezies einen gemeinsam niedrigen Gehalt an Methionin. Auch die Proportionen der Aminosäuren untereinander – z. B. das Verhältnis von Tyrosin zu Phenylalanin – sind hier so völlig verschieden, so daß es sehr schwer ist, verwandtschaftliche Beziehungen allein von der Aminosäuren-Zusammensetzung der Eischalen abzuleiten.

#### *Chamaeleonidae* (Chamäleons)

Zur Untersuchung von Eischalenmaterial der Familie *Chamaeleonidae* standen uns nur Proben von *Chamaeleo chamaeleon* zur Verfügung. Wir vergleichen deshalb das Aminosäuren-Profil von *Chamaeleo chamaeleon* mit *Iguana iguana*.

Die vorherrschende Aminosäure ist auch hier – wie bei praktisch allen nicht verkalkten Eischalen – Prolin. Allerdings ist der Prolin-Gehalt im Vergleich zu anderen nicht verkalkten Eischalen nicht auffallend hoch, wie z. B. bei *Iguana*. Bemerkenswert ist jedoch der vergleichsweise hohe Gehalt an Asparaginsäure. Relativ hoch sind ferner die Werte für Threonin, Serin und Glutaminsäure. Verhältnismäßig niedrig liegen Alanin und Cystin. Alle anderen Aminosäuren – z. B. Phenylalanin und Leucin – entsprechen denen von *Iguana*. Die Eischalen von *Chamaeleo* enthalten im Vergleich zu *Iguana* und *Basiliscus* viel Histidin.

#### *Agamidae* (Agamen)

Tabelle 3 stellt auch das Aminosäurenprofil der Eischalen von *Agama mossambica* dar. Diese Daten, verglichen mit Werten von *Iguana iguana*, ähneln sich stark. Bei *Agama mossambica* herrscht typischerweise ebenfalls Prolin vor. Alle anderen Aminosäuren-Daten, mit Ausnahme von Glycin, Alanin und Tyrosin, ähneln denen von *A. mossambica*. Glycin ist gegenüber *Iguana* stark erhöht, Alanin dagegen gesenkt. Tyrosin liegt bei *Agama* wesentlich höher als bei *Iguana*. Bei *Iguana*, *Chamaeleo* und *Agama* findet sich ein Verhältnis von Tyrosin zu Phenylalanin von ungefähr 2 : 1, während bei *Basiliscus* genau das umgekehrte Verhältnis vorliegt. Die Daten weisen auf ein enges verwandtschaftliches Verhältnis zwischen den *Iguanidae* und *Agamidae* hin.

#### *Scincidae* (Skinke)

Die Eischalen von *Ablepharus kitaibelii* enthalten relativ viel Prolin bei gleichzeitig sehr geringem Cystin-Gehalt (Tab. 3). Ebenfalls kann man hier einen verhältnismäßig hohen Anteil von Histidin beobachten. Das Tyrosin-Phenylalanin-Verhältnis beträgt hier 1 : 1. Diese Aminosäurenkomposition ist nicht mit der von *Iguana* zu vergleichen.

#### *Lacertidae* (Eidechsen)

Die Aminosäuren-Gehalte der Eischalen von *Lacertidae* sind in Tabelle 3 angegeben. Gemeinsam ist allen untersuchten Formen der hohe Prolin-Wert; ferner stimmen die Daten für Arginin, Lysin, Valin, Cystin, Alanin und Glutaminsäure überein. *Lacerta saxicola* besitzt einen höheren Gehalt an Asparaginsäure, Threonin, Serin, Isoleucin, Leucin und Phenylalanin, dagegen niedrige Werte für Glycin und Histidin als *Ophisops elegans*. Methionin fehlt beiden Formen. Das Tyrosin-Phenylalanin-Verhältnis liegt bei ca. 2 : 1.

#### *Anguidae* (Schleichen)

Vorherrschende Aminosäure bei *Ophisaurus* und *Gerrhonotus* ist Prolin (Tab. 3). Extrem hohe Prolin-Werte haben wir bei *Gerrhonotus* gefunden. Das Aminosäurenprofil beider Spezies stimmt in einer Reihe von Aminosäuren überein, z. B. Phenyl-



alanin, Valin, Glutaminsäure. Bei einigen anderen Aminosäuren kann eine starke Annäherung festgestellt werden, z. B. Glycin, Isoleucin usw. Starke Abweichungen voneinander treten bei Prolin, Alanin, Cystin, Tyrosin, Methionin und Lysin auf. Das Tyrosin-Phenylalanin-Verhältnis liegt bei *Ophisaurus* bei ca. 7 : 1, bei *Gerrhonotus* dagegen bei 1 : 1.

#### *Varanidae* (Warane)

Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Eischalen von *Varanidae* ist ebenfalls aus Tabelle 3 ersichtlich. Hier ist ebenfalls – wie bei praktisch allen anderen nicht eindeutig verkalkten Eischalen – Prolin die am meisten vorkommende Aminosäure. Methionin tritt nur spurenhaf auf. Auffällig ist der vergleichsweise hohe Gehalt an Histidin, der beim *V. salvator* über 12 % ausmacht, bei *V. mertensi* aber nicht 8 % erreicht. Geringe Übereinstimmung zwischen beiden Spezies besteht bei Isoleucin, Valin, Glycin und Phenylalanin. Bei allen anderen Aminosäuren deutet sich – wenn auch keine exakte Identität zu beobachten ist – zumindest ein einheitlicher Trend an.

## 2. *Serpentes*

#### *Boidae* (Riesenschlangen)

Die Ergebnisse der Aminosäuren-Analysen von Eischalen einiger *Boidae* sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Im Vordergrund steht auch hier Prolin. *P. reticulatus* und *P. curtus* zeigen gleiche Prolin-Gehalte, während *P. molurus* einen erheblich höheren Wert für die Aminosäuren aufweist. *P. reticulatus* fällt durch einen vergleichsweise hohen Cystin-Wert auf. Die beiden anderen Python-Arten besitzen einen wesentlich niedrigeren Cystin-Gehalt. Der Histidin-Wert ist bei allen 3 Spezies relativ hoch. Die Aminosäuren-Profile der hier untersuchten *Boidae* weisen eine gleiche Grundtendenz auf, obwohl in Einzelheiten keine Übereinstimmung der Daten feststellbar ist. Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin und Histidin zeigten bei allen 3 Spezies unterschiedliche Daten. Die Threonin- und Lysin-Werte von *P. reticulatus* und *P. molurus* liegen auf etwa gleicher Höhe, während die Daten für Glycin und Arginin von *P. molurus* und *P. curtus* vergleichsweise eng zusammenliegen. Im Falle des Phenylalanins stimmen die Daten für *P. reticulatus* und *P. curtus* annähernd überein.

Das Tyrosin-Phenylalanin-Verhältnis liegt um ca. 2 : 1. Bemerkenswert ist bei den Aminosäuren-Profilen der Eihüllen von Pythonidae, daß neben dem hohen Wert für Prolin auch Glycin und Histidin in beachtlichem Maße vertreten sind.

#### *Colubridae* (Nattern)

Als Vertreter einer primitiven Natterngruppe haben wir *Lycodon aulicus* untersucht. Die Aminosäuren-Daten sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Hierbei ist bemerkenswert, daß zwar Prolin noch die beherrschende Aminosäure ist, aber ihr Gehalt ist wesentlich niedriger als der anderer Schlangenarten. Auffallend sind die hohen Werte für Serin und vor allem für Lysin. Bei den von uns untersuchten Schlangenarten konnte ein Gehalt von 4,5 Mol-% an Lysin bisher nicht registriert werden. Auch andere Reptilienarten mit eindeutig nicht verkalkten Eihüllen besitzen keinen derartig hohen Anteil an Lysin, mit Ausnahme von *Basiliscus basiliscus*. Allerdings beträgt bei *L. aulicus* das Verhältnis Histidin zu Lysin bei allen anderen bisher untersuchten Reptilienarten mit nicht verkalkten Eischalen 1 : 2 bis 1 : 4 und mehr, auch bei *Basiliscus*. In den Eihüllen von *L. aulicus* beträgt dieses Verhältnis 1 : 1. Mit dem relativ niedrigen Prolin-Wert geht ein entsprechend herabgesetzter Wert für Cystin einher. Die Daten für Histidin liegen bei dieser primitiven Natternform in der gleichen Größenordnung wie bei *Boidae* und anderen Schlangen.

Tabelle 4 stellt auch die Aminosäuren-Profile von Eischalen eigentlicher Nattern dar. Am meisten kommt Prolin vor, und zwar in einem relativ engen Bereich. Methionin dagegen findet sich wie in anderen nicht verkalkten Eischalen von Reptilien. Der Gehalt an Cystin schwankt in erheblichem Umfang von Spezies zu Spezies. Asparaginsäure liegt bei allen hier untersuchten Formen verhältnismäßig ausgeglichen am oberen Rand der Werte, die sonst bei Schlangen gefunden werden.

Die Hydroxyaminosäuren Threonin und Serin weisen bereits eine größere Streubreite auf. Das gleiche gilt auch für Glutaminsäure. Dagegen zeigen die Werte für Glycin bei *Elaphe* eine relative Einheitlichkeit; *Natrix* enthält einen etwas niedrigeren Anteil. Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei Alanin und Valin. Die Daten für die beiden Leucine deuten auf arteigene Schwankungen; das gleiche gilt auch für die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. Mit Ausnahme von *E. obsoleta* lassen sich bei Nattern ausgeglichene, aber verhältnismäßig niedrige Werte für Lysin feststellen. Hohe Gehalte – besonders bei *Natrix* – sind bemerkenswert. *E. longissima* liegt dabei am niedrigsten. Schwankungen kann man bei den Daten für Arginin erkennen.

Trotz dieser genannten Unterschiede bleibt ein einheitlicher Trend erhalten; auch die Proportionen der einzelnen Aminosäuren zueinander verschieben sich nicht so stark, daß eine Beurteilung unmöglich wird. Untersuchungen an einer größeren Zahl von frischen Eiern von *Natrix natrix* haben gezeigt, daß die Schwankungen der Daten innerhalb der Spezies relativ gering sind. Sie sind keinesfalls größer als die Streubreite von Art zu Art. Dies gilt für alle in dieser Arbeit untersuchten Spezies einschließlich Testudinata und Crocodylia. Der Fragenkomplex der individuellen Variabilität soll anderenorts eingehend diskutiert werden.

In dem Eischalenmaterial von *Dispholidus typus* und *Malpolon monspessulanus* (Tabelle 4) kommt in besonderem Umfang Prolin vor. Der Gehalt liegt ungefähr in der gleichen Größenordnung wie bei den eigentlichen Nattern. Im übrigen weichen die Aminosäuren-Daten dieser beiden Trugnattern wesentlich stärker voneinander ab als

Tabelle 4

## Aminosäuren-Zusammensetzung der Eischalen von Schlangen

(Angaben in Mol-%)

	<i>Python reticulatus</i>	<i>Python molurus</i>	<i>Python curtus</i>	<i>Lycodon anlicus</i>	<i>Natrix natrix</i>	<i>Elaphe situla</i>	<i>Elaphe schrencki</i>	<i>Elaphe obsoleta</i>	<i>Elaphe carinata</i>
Asp	5,51	3,55	4,18	8,52	5,18	7,78	5,21	6,56	5,65
Thre	3,61	3,57	4,06	2,56	2,26	2,81	1,50	2,12	1,95
Ser	4,28	3,94	4,95	8,57	2,36	5,01	4,21	4,82	4,76
Glu	4,95	3,64	5,56	8,34	3,92	7,52	5,26	5,65	4,95
Pro	30,94	40,17	30,03	16,71	26,61	27,42	27,35	26,87	28,69
Gly	7,81	8,09	8,12	5,04	5,15	8,68	6,46	6,80	6,21
Ala	4,43	4,18	5,00	4,39	5,51	6,19	3,52	4,45	3,16
Cys 1/2	8,41	2,90	4,30	1,27	8,01	3,63	0,32	2,85	2,43
Val	3,53	2,90	3,90	3,20	3,95	4,06	3,09	3,04	2,77
Meth	0,39	Spuren	0,27	0,26	0,61	0,41	Spuren	Spuren	Spuren
Ileu	2,02	1,77	1,72	2,52	1,25	3,22	2,21	2,71	2,01
Leu	3,95	3,74	4,38	5,46	5,37	5,05	3,78	5,15	3,31
Tyr	4,24	2,37	3,13	2,33	4,33	2,44	1,12	2,13	3,62
Phe	1,62	1,07	1,76	1,73	0,82	3,70	1,70	1,30	3,06
Lys	0,65	0,52	1,12	4,54	0,89	3,28	0,76	1,46	0,92
His	4,32	3,57	4,96	4,06	9,51	4,94	4,95	4,55	5,04
Arg	3,99	3,20	3,24	3,76	5,71	3,78	2,44	4,12	3,41

die Colubridae untereinander. Verhältnismäßig übereinstimmend liegen die Werte für Cystin und Leucin. Trotz dieser geringen Übereinstimmung läßt sich noch ein verbindender Bauplan erkennen.

#### *Elapidae* (Giftnattern)

Als Untersuchungsmaterial standen Eischalen von *Naja naja* und *Naja nigricollis* zur Verfügung (Tab. 4). Hier ist ein sehr hoher Prolin-Gehalt zu beobachten; er liegt viel höher als bei anderen Nattern. Deutlich unterscheiden sich beide Formen in ihren Cystin-Werten und den Daten für Histidin. Alle übrigen Aminosäuren-Gehalte ähneln sich z. T. sehr stark.

#### *Viperidae* (Vipern)

Der einheitlich hohe Prolin-Gehalt der Vipern-Eischalen entspricht ungefähr dem der Nattern. Einige Aminosäuren-Daten stimmen zwischen *Causus rhombeatus* und *Vipera lebetina* verhältnismäßig gut überein, z. B. Threonin, Serin, Isoleucin und Tyrosin. Bei anderen Aminosäuren ist die Übereinstimmung nicht ganz so gut. Starke Abweichungen sind vor allem bei Cystin, Glycin, Alanin, Valin, Lysin und Histidin festzustellen. Die Relationen der einzelnen Aminosäuren zueinander bleiben trotzdem im wesentlichen erhalten. Auf diese Weise wird ein Profilvergleich der Viperidae mit anderen Schlangen möglich.

#### *Crotalidae* (Grubenottern)

Die Aminosäuren-Zusammensetzung von Eischalen von *Agkistrodon rhodostoma* (*Crotalidae*) ist in Tabelle 4 aufgeführt. Prolin erreicht in diesem Fall einen vergleichsweise sehr hohen Wert von ca. 37 Mol-%. Dieser hohe Anteil an Prolin wird begleitet von einem ebenfalls relativ hohen Gehalt an Histidin und Arginin. Methionin fehlt praktisch ganz, während Cystin fast 3 Mol-% erreicht. Die Relation von Tyrosin-Phenylalanin beträgt 2,3. Das Verhältnis zwischen Lysin und Histidin erreicht mit 9,2 einen extrem hohen Wert.

<i>Elaphe longissima</i>	<i>Dispholidus typus</i>	<i>Malpolon monspessulanus</i>	<i>Chrysopelea ornata</i>	<i>Naja naja</i>	<i>Naja nigricollis</i>	<i>Causus rhombeatus</i>	<i>Vipera lebetina</i>	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>
5,36	3,85	5,80	5,10	4,08	3,80	4,70	5,83	4,32
1,26	1,70	3,05	1,27	2,90	2,21	2,75	2,82	1,77
3,27	4,98	3,30	3,62	4,88	4,31	5,35	5,33	2,86
3,87	5,05	5,88	4,17	6,47	6,52	5,57	6,42	5,78
32,73	23,30	28,02	24,74	39,02	37,35	26,71	26,96	36,96
6,12	6,78	9,42	7,85	6,65	6,16	5,85	7,79	5,27
3,37	9,15	6,01	5,18	4,04	4,09	4,99	6,18	4,73
1,58	2,59	3,30	3,02	1,53	7,61	6,19	2,75	2,94
3,05	2,93	5,12	3,49	3,12	3,42	2,01	3,26	3,36
Spuren	Spuren	0,57	Spuren	0,35	0,44	0,37	Spuren	Spuren
1,38	2,24	1,35	1,23	1,65	1,29	2,34	2,22	1,50
3,36	3,24	3,47	3,81	3,59	3,54	3,62	4,96	4,74
1,10	2,82	4,01	4,24	2,41	2,26	3,21	3,31	2,90
1,62	2,06	1,59	1,00	0,85	0,82	0,84	0,43	1,22
0,92	1,85	1,20	1,80	1,13	1,08	2,12	1,87	0,94
3,33	6,95	5,61	9,56	4,39	6,18	5,36	4,60	7,89
3,07	3,86	5,93	3,37	4,82	3,95	3,87	3,93	5,03

#### IV. Diskussion der Ergebnisse

Die beschriebenen Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß Eischalenproteine von eindeutig verkalkten Eischalen anders konstruiert sein müssen als Proteine von Eischalen, die gar keine oder nur eine sehr geringe Calcifikation aufweisen. Deshalb sollen diese beiden Gruppen einander gegenübergestellt werden. Es tritt jedoch eine Schwierigkeit bei der Benutzung einer Vergleichsgrundlage auf. Während sich morphologisch in der verkalkten Eischale mehrere, mindestens aber 2 Fraktionen (Membrana testacea und Matrix) finden, lassen sich derartig eindeutig getrennte Abschnitte in den weichschaligen Reptilieneischalen nicht trennen. Zieht man die zeitliche Folge des Schalenbildungsprozesses heran, dann müßte man annehmen, daß die Membrana testacea eher mit den nicht verkalkten Eischalen zu vergleichen ist als die eigentliche Schalenmatrix. Die Diskussion, ob man die Matrix oder die Membrana testacea mit den nicht kalzifizierten Eischalen – z. B. von Schlangen – vergleichen sollte, erübrigt sich deshalb. Die Aminosäuren-Daten von nicht verkalkten Eischalen unterscheiden sich so drastisch von denen der Membrana testacea und auch der Matrix, daß man beide morphologischen Abschnitte der kalzifizierten Schale zu Vergleichszwecken heranziehen könnte.

Die eindeutig verkalkten Eischalen von Reptilien und Vögeln besitzen – wie schon diskutiert – eine Membrana testacea. Diese ist bei Klasse Aves (KRAMPITZ et al. 1973 a), bei Schildkröten und Krokodilen, aus cysteinreichen Proteinen aufgebaut.

Nach den bisherigen Befunden zu urteilen, scheint die cysteinreiche Membrana bei Vögeln innerhalb der Infraklasse Ratitae sehr einheitlich aufgebaut zu sein. Bei den Schildkröten ergeben sich bereits erhebliche Unterschiede innerhalb der Familie der *Testudinidae* hinsichtlich des Cystingehaltes. Der Cystin-Gehalt reicht von 4 Mol-% (*T. pardalis*) bis 14 Mol-% (*T. carbonaria*). Wie weit diese Aminosäuren am Aufbau von solchen Proteinen in Zusammenhang steht, die mit den Gewohnheiten der Eiablage der Tiere – d. h. mit dem Ort der Eiablage, den klimatischen Bedingungen während des Ausbrütens usw. – zu tun haben, mag zur Diskussion gestellt sein. Die nicht in einheitlichen Klimaten lebenden Spezies der Familie *Testudinidae* lassen zwar ein grundsätzlich einheitliches Bauprinzip erkennen, deuten aber auf geographische und klimatische Sonderentwicklungen hin. Dies kommt bei *T. pardalis* (trocken, heiße Klimaten) und *T. elephantopus* deutlich zum Ausdruck. Es fällt auf, daß Spezies, die in Trockengebieten leben, einen niedrigeren Cystin-Gehalt der Membrana testacea aufweisen gegenüber solchen, die in Wassernähe oder feuchten Waldgebieten ihre Heimat haben (*T. carbonaria*). Dies sind nach unseren Beobachtungen die einzigen Beispiele für eine am Aminosäurenprofil von Schalen bzw. Schalenfraktionen ablesbare Veränderung, die auf eine Lebensraumbindung hinweisen könnten.

Es ist die Vermutung geäußert worden, daß es sich bei Membranproteinen um Keratine handeln könne (CREWTER et al. 1965), obwohl bislang ein exakter Beweis hierfür noch aussteht. Sollten echte Keratine am Aufbau der Membranproteine beteiligt sein, dann würde ein hoher Cystin-Gehalt auf eine starke Vernetzung innerhalb der Proteinmoleküle hindeuten. Ein dichtes Netzwerk von Disulfid-Brücken würde für eine bessere Stabilität und mechanische Belastbarkeit der Membranen sprechen.

Der relativ hohe, aber für die meisten *Testudinidae* einheitliche Gehalt an Prolin macht die besondere Funktion dieses Eiweißbausteins für die Einstellung der Sekundärstruktur von Proteinen deutlich. Da vorerst praktisch nichts über die Struktur der Membran-Proteine bekannt ist, kann man nur vermuten, daß ein hoher Prolin-Gehalt mit der Stabilität der Membrana testacea in Zusammenhang steht. *T. elephantopus* enthält deutlich mehr Prolin in der Membran-Fraktion als andere Landschildkröten. Ob dies mit der Eigröße in Zusammenhang steht, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die *Emydidae* (Sumpfschildkröten) zeigen einen wesentlich höheren Cystin-Gehalt als die meisten Testudinidae. *T. carbonaria* entspricht als einzige bisher untersuchte Landschildkröte in dieser Beziehung *E. orbicularis*. Ob der erhöhte Cystin-Gehalt, der im übrigen auch bei *Trionyx triunguis* und *Trionyx sinensis* zu beobachten ist, sich nur bei solchen Schildkrötenarten findet, die verkalkte Eier legen und ein Leben im Wasser oder in feuchten Klimaten führen, kann abschließend noch nicht beurteilt werden. Eine Reihe von Indizien sprechen dafür.

*E. orbicularis* enthält in der Membrana testacea einen ebenso hohen Prolin-Gehalt wie *T. elephantopus*. Hinzu kommt ein sehr beachtlicher Gehalt an Glycin. Glycin und Prolin gehören zu solchen Aminosäuren, die bei der Sumpfschildkröte anteilmäßig neben Cystin am höchsten liegen. Isoleucin, Phenylalanin, Histidin und Arginin kommen in geringerem Umfang in der Membrana testacea der Emydidae gegenüber Testudinidae vor. Der Tyrosin-Gehalt ist von besonderem Interesse, da er bei den Testudinidae höher liegt als bei den Emydidae und bei diesen noch relativ höher als bei Dermochelydidae. Tyrosin scheint eine Leitaminosäure zu sein, die in der Membrana testacea kalkiger Schalen von Reptilien eine erhebliche Rolle spielen könnte. In einem späteren Abschnitt wird noch zu diskutieren sein, welche entwicklungsgeschichtliche Bedeutung möglicherweise diesen Aminosäuren zukommt. Innerhalb der Testudinata ergibt sich folgende Rangordnung für Tyrosin: *Trionychidae* > *Testudinidae* > *Emydidae* > *Dermochelydidae*. Es ist zu vermuten, daß in der genannten Reihenfolge ein bestimmtes tyrosinreiches Protein (vielleicht auch mehrere Proteine) quantitativ reduziert wurde(n) bzw. verschwunden ist (sind). Ferner ist möglicherweise ein gradueller Rückgang von Tyrosin-Molekülen innerhalb aller Proteine der Membrana testacea zu vermuten (Gen-Mutation?). Welche Bedeutung diese mengenmäßig reduzierten Proteine – z. B. bei *Trionychidae* – und bei *Emydidae* haben, ist völlig unbekannt. Am ehesten läßt sich diese Beobachtung in der Weise deuten, daß entweder tyrosinreiche Proteine von der Funktion her entbehrlich oder überflüssig geworden sind und im Laufe der Evolution nicht mehr gebraucht wurden. Eine Aufklärung dieser Frage könnte durch die Fraktionierung von Proteinen der Membrana testacea und anschließende Charakterisierung dieser Proteine erreicht werden. Dies ist aber vorerst aus methodischen Gründen kaum möglich.

*Dermochelydidae* (Lederschildkröten) enthalten in der nicht verkalkten Eischale ein wesentlich anderes Aminosäuren-Profil als alle anderen bis jetzt untersuchten Schildkrötenarten. Der für die Membrana-Proteine sonst typische hohe Cystin-Gehalt besteht in diesem Fall nicht mehr in dem gleichen Umfang. Es handelt sich bei *Dermochelys coriacea* um cystinarmer Proteine, deren Baupläne im Vergleich zu Testudinidae und Emydidae verändert sind. Zwar beobachtet man einen hohen Wert für Prolin und Glycin. Der Gehalt an Alanin ist im Vergleich zu den Land- und Sumpfschildkröten in folgender Sequenz verändert: *Testudinidae* ~ *Trionychidae* > *Emydidae* > *Dermochelydidae*. Die Gehalte an Lysin und Histidin entsprechen dieser Einordnung ebenfalls. Dagegen ist der Valin-Gehalt bei *Dermochelys* am höchsten von allen Schildkröten.

Die bei Landschildkröten, Sumpfschildkröten und Lederschildkröten im Prinzip gleich oder sehr ähnlich konstruierten Membran-Proteine zeigen eine Reihe von familien-spezifischen Eigentümlichkeiten, die sich in die genannten Sequenzen einfügen lassen. Vermutlich handelt es sich bei den Proteinvariationen um die Ergebnisse evolutiver Prozesse.

Die Membran-Proteine der Ordnung Crocodylia zeigen ein anderes Aufbauprinzip als die der Testudinata. Aber auch die Aminosäuren-Zusammensetzung der Membrana-Proteine innerhalb der Ordnung Crocodylia schwankt sehr stark. Für die Membrana testacea der Crocodylia ist der hohe Cystin-Gehalt auffallend. Ein vergleichbar hoher Wert ist bisher nur bei *T. carbonaria* und *E. orbicularis* gefunden worden. Ähnlich

hohe Cystin-Werte haben wir auch bei Ratiten beobachtet. Eine weitere Beziehung zwischen der Membrana testacea der Crocodylia und der Klasse Aves läßt sich nicht ableiten. Zwischen Testudinata und Crocodylia existiert ein Zusammenhang, der sich durch Erweiterung der Sequenz für Tyrosin innerhalb der Ordnung Testudinata ergibt: *Trionychidae* > *Testudinidae* > *Emydidae* > *Dermochelydidae* > *Crocodylidae* > *Alligatoridae*. Die Werte für Tyrosin liegen bei Crocodylia wesentlich niedriger als bei Testudinata. Die Relationen der Werte für Lysin : Histidin liegen bei den Testudinata bei mindestens 2 : 1, während sie bei Crocodylia ca. 1 : 1 betragen.

Die säureunlöslichen Bestandteile der Matrix von Testudinata und Crocodylia unterscheiden sich stärker voneinander als die entsprechenden Membrana-Fractionen. Die Daten für Asparaginsäure liegen bei Crocodylia deutlich höher als bei Testudinata. Ganz ähnlich ist die Situation bei Threonin. Auffällig ist die Sequenz für Histidin: Testudinata < Crocodylia ~ Ratitae und für Arginin: Testudinata < Crocodylia < Ratitae.

Andere Beobachtungen haben uns zu der Ansicht geführt, daß die Matrices von Eischalen eine stärkere spezies-spezifische Prägung besitzen als die Membrana testacea (KRAMPITZ et al. 1973 a; KRAMPITZ et al. 1972). Es war infolgedessen zu erwarten, daß die Aminosäuren-Zusammensetzung der Matrices von Schildkröten von denen der Krokodile abweichen dürfte. Daß aber auch einige Aminosäuren – insbesondere basische Aminosäuren – eine Verbindung zu den Vögeln schaffen, hat nicht überrascht. WALKER (1972) hat kürzlich detaillierte Beweise vorgelegt, nach denen eine größere Ähnlichkeit zwischen Vögeln und Krokodilen besteht als bisher vermutet worden ist. Nach seiner Ansicht scheinen rezente Krokodile ein „eingefrorenes Stadium“ in der Evolution der Vögel darzustellen.

Nach den vorliegenden Aminosäuren-Daten scheinen die untersuchten Krokodileier eine Stellung innerhalb der Wirbeltiere einzunehmen, die in der Nähe der Ratiten zu suchen ist. Diese taxonomische Stellung ist aber nicht losgelöst von den übrigen Reptilien, die verkalkte Eier legen, zu sehen. Eischalenproteine dürften insofern bis zu einem gewissen Grade ein Evolutionsmerkmal darstellen, da sie durch Anpassung der Tiere an Umweltbedingungen zur Erhaltung der Arten beitragen könnten.

Die *chemische Charakteristik* von Membrana- und Matrix-Proteinen ähnelt derjenigen von Vögeln. Die Membrana-Proteine von Schildkröten- und Krokodileischalen lassen sich ebenso wie Membrana-Proteine von Vögeln durch  $\text{Na}_2\text{S}$ -Harnstoff-Behandlung in Lösung bringen und chromatographisch weiter aufarbeiten (KRAMPITZ et al. 1973 a). Membrana-Proteine von Testudinata und Crocodylia besitzen Molekulargewichte über 200 000 Daltons, wie sich durch vergleichende Gelpermeations-Untersuchungen gezeigt hat. Ob Membrana-Proteine von Reptilien als Keratine bezeichnet werden können, kann noch nicht entschieden werden. Wir haben diese Fragen an anderer Stelle (KRAMPITZ et al. 1973 a) bereits diskutiert. Zum augenblicklichen Zeitpunkt halten wir es für richtiger, diese Proteine vorerst als cystin-reiche Proteine zu bezeichnen.

Unentschieden muß die Frage bleiben, ob sich an der Membrana testacea und damit auch an den dort vorkommenden Proteinen die primären Verkalkungsvorgänge abspielen, wie das von ROBINSON et al. (1966) für das Hühnerei beobachtet worden ist.

Die Behandlung der Reptilien-Eischalen ergibt neben der Membrana testacea eine säureunlösliche und eine säurelösliche Fraktion. Die säureunlösliche Fraktion enthält sulfatierte Proteoglykane, die durch geeignete Solventien in Lösung gebracht werden können. Durch Gelpermeation und Ionenaustauscherchromatographie lassen sich diese Proteine in reiner Form auch aus Eischalen von Schildkröten und Krokodilen darstellen (KRAMPITZ et al. 1972 b). Sie besitzen Molekulargewichte über 200 000 Daltons. Der Wirkungsmechanismus der sulfatierten Proteoglykane soll nach SIMKISS und TYLER (1959) darin bestehen, daß sie als Chelatbildner  $\text{Ca}^{2+}$  an die Matrix binden

und auf diese Weise die spätere Ausfällung des Calciumcarbonats in der Eischale bewirken. Nach diesen Untersuchungen sollen die Chelatwirkungsmechanismen von Hühnern und Schildkröten sehr ähnlich konstruiert sein, während der gleiche Vorgang bei *Crocodylia* anders abläuft. Die Grundlage für diesen unterschiedlichen Mechanismus wird darin gesehen, daß bei *Crocodylia* der saure Mucopolysaccharid-Anteil der Matrix in Proteine eingebettet liegt, aber keine Kombination zwischen Protein und Polysaccharid besteht. Außerdem seien Carboxylat-Gruppen mit Carboxylat-Gruppen in einem Chelat-Mechanismus vereinigt. Bei Hühnern und Schildkröten sind nach Ansicht von SIMKISS und TYLER (1959) die sauren Mucopolysacchariden mit Proteinen verknüpft, so daß dort ein Chelatmechanismus von Carboxylat-Gruppen zu Amino-Gruppen existiert.

Neben säureunlöslichen Matrixbestandteilen kommen in den verkalkten Eischaln noch säurelösliche, organische Substanzen mit vorwiegend relativ niedrigem Molekulargewicht vor. Es handelt sich offenbar um Mischungen von Peptiden, Glykopeptiden und freien Aminosäuren bzw. Konjugaten (KRAMPITZ et al. 1973). In Eischaln von Vögeln (KRAMPITZ et al. 1973, 1972a), im Dentin und in Knochen (LEAVER 1968) sowie in Schaln von Gastropoden (ERBEN et al. 1973) sind diese Verbindungen, vor allem Peptide, festgestellt worden. Die kalkigen Reptilienschalen enthalten ebenfalls solche Gemische. Im allgemeinen enthält diese Fraktion wenig oder gar keine Thioaminosäuren. Reichlich vertreten sind meist Glycin, Alanin, Prolin, Valin und Leucin. Es handelt sich um Aminosäuren, die von URRY (1971) als solche Peptid- bzw. Proteinbausteine erkannt wurden, die primär mit der Calcifizierung in Zusammenhang gebracht worden sind. Ob und wie weit sie mit den unlöslichen Teilen der Schalnmatrix in einer Wechselbeziehung stehen, ist bisher unbekannt.

Eine Sonderrolle scheint die Membrana testacea bei Geckos zu spielen. Ganz im Gegensatz zu dem Aufbau der Membrana-Proteine bei Schildkröten, Krokodilen sowie Vögeln findet sich bei kalkigen Eischaln von Gekkoten eine Membrana testacea, die cystin-arme, praktisch cystin-freie, Proteine enthält. Dies spricht für einen gänzlich anderen Aufbau dieser Proteine. Es ist zu vermuten, daß hier nicht von einer möglichen Netzwirkbildung durch Disulfidbrücken Gebrauch gemacht worden ist. Vielmehr scheint hier ein Seitenweg beschritten worden zu sein, der es cystinfreien Proteinen erlaubt, eine stabile Membrana testacea zu entwickeln. Demnach eignen sich auch andere Proteine zur Ausbildung von Primärkristallen, wenn die Vorstellung richtig ist, daß die Membrana testacea hierfür die Grundlage bildet (KRAMPITZ et al. 1972b). Dabei müssen die Aminosäuren-Profile von *Tarentola mauretana* und von *Phelsuma cepediana* getrennt betrachtet werden.

Die Aminosäuren-Komposition von *T. mauretana* ähnelt dem Protein-Typ, der gelegentlich in Gastropoden-Schaln gefunden wird (KRAMPITZ et al. 1972c). Auffallend ist in solchen Proteinen der hohe Anteil an sauren Aminosäuren, Lysin und Serin. Dabei ist denkbar, daß diese Aminosäuren mit Hilfe ihrer reaktiven Seitenketten ebenfalls in der Lage sind, ein Netzwerk auszubilden.

Das bei *Ph. cepediana* gefundene Aminosäuren-Profil läßt erstmalig bei kalkigen Eischaln einen hohen Prolin-Gehalt erkennen. Dies stellt eine Ausnahme dar, weil sonst ein hoher Prolin-Gehalt nur bei nicht verkalkten Eischaln festgestellt wird. Der *Phelsuma*-Proteintyp entspricht einem Copoly-Prolin. Die Eigentümlichkeit des Polyprolins dürfte eine besondere Art der Stabilität der Membrana testacea zur Folge haben.

Polyprolin unterscheidet sich von anderen Polypeptiden dadurch, daß es keine  $\text{NH} \cdots \text{O}$ -Bindungen eingehen kann. Aus sterischen Gründen kann es keine voll ausgedehnte Kette bilden. Mit Amid-Gruppen in der *trans*-Form muß es eine linksdrehende Helix bilden. Im Kristall besitzt das Molekül eine dreifach gewundene Schraubenachse. Von Poly-L-Prolin sind zwei Formen bekannt: I (cis) und II (trans).

In der für Poly-L-Prolin II vermuteten Struktur wird angenommen, daß alle Ketten parallel ausgerichtet sind. Ferner ist auch eine Zufallsstruktur diskutiert worden. Dies ist bei langkettigen Polymeren wahrscheinlicher (MADISON und SCHELLMAN 1972). Röntgenbeugungsspektren und optische Studien haben ergeben, daß die trans-Form von Polyprolin (Polyprolin II) den individuellen Ketten des Kollagens ähnelt (RAMACHANDRAN et al. 1968; TRAUB und YONATH 1966). Ferner können auch Polyglycin und Polyhydroxyprolin diese Eigenschaften zeigen. Copolymere dieser Aminosäuren weisen ebenfalls eine Konformation wie Kollagen auf. Polyaminosäuren mit der Sequenz Gly-Pro-Ala besitzen eine kollagenähnliche Dreifach-Helix; die Sequenz Gly-Pro-Gly bildet eine Struktur mit einer Aggregation von parallel angeordneten linksdrehenden Helices in einer Ebene, bei denen die individuellen Ketten 3 Reste pro Drehung besitzen (TRAUB und YONATH 1966).

Aus diesen Beobachtungen läßt sich der Schluß ziehen, daß in den Eihüllen von *Phelsuma* Proteine enthalten sind, die kollagenähnliche Eigenschaften besitzen. Dies gilt aber auch für andere nicht verkalkte Eischalen, wie sie z. B. bei *Eublepharis macularis* gefunden werden. Zwar stellt sich damit ein weiterer Protein-Typ vor, der aber auch auf einem hohen Prolin-Gehalt beruht. Gleichzeitig findet sich hier zusätzlich noch ein relativ hoher Cystin-Gehalt. Das läßt vermuten, daß neben den prolinreichen, kollagenähnlichen Proteinen noch keratinähnliche Strukturen – zumindest aber Quervernetzungen durch Disulfidbrücken – existieren. Dieser Proteintyp scheint bei nicht eindeutig verkalkten Eiern von Squamaten vorzuherrschen, während bei nicht kalkigen Eihüllen von Testudinata, z. B. *Dermochelys*, ein anderes Aufbaumuster vorliegt. Die Kombination von Proteinen mit kollagenähnlichen Strukturen und zusätzlich kovalenten Quervernetzungen deutet auf eine Stabilität und gleichzeitige Zugfestigkeit solcher Proteine hin. Daß Kollagen sehr stabil und zugfest sein kann, geht aus den Eigenschaften von Sehnen und Bändern hervor. Proteine des Squamaten-Typs, die neben hohen Prolin-Gehalten auch noch cysteinreich sind, weisen auch auf eine hohe Stabilität und Reißfestigkeit sowie eine erhebliche Zugfestigkeit hin, da bekannt ist, daß sich z. B. Schlangeneier sehr erheblich ausdehnen können. Allerdings scheinen diese Proteine ebenfalls die Ausbildung von Kanälen für Gas- und Flüssigkeitsaustauschvorgänge zu ermöglichen (KRAMPITZ et al. 1973).

*Eublepharis macularis* als Vertreter der Geckos mit pergamentartigen, nicht verkalkten Eischalen, tritt als besonderer Typus von Eihüllen auf.

Der *Tarentola*-Typ entspricht allein schon aufgrund seiner Kalkschale eher den Testudinata bzw. Krokodilen und Vögeln als den übrigen Squamaten, obwohl das Aminosäuren-Profil der Membrana testacea-Proteine vollständig von allen anderen bisher bekannten Membranae abweicht.

Der *Phelsuma*-Typ entspricht, obwohl noch verkalkt, der Aminosäuren-Komposition von Eischalen der Squamaten.

Die 3. Protein-Art, die uns bei Gekkota aufgefallen ist und die wir als *Eublepharis*- oder *Squamaten*-Typ bezeichnen, entspricht den übrigen Squamaten. Ob bei der Vielzahl von verschiedenen Entwicklungen bei den Geckos noch weitere Protein-Typen auftreten, kann z. Z. noch nicht abschließend beurteilt werden.

Der Squamaten-Typ liegt auch bei *Iguana iguana* zugrunde. Im Vergleich zu *Eublepharis macularis* liegen die Daten für die meisten Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin und Lysin bei *Iguana iguana* höher. Bemerkenswert ist das Aminosäurenprofil von *Basiliscus basiliscus*. Es läßt sich in keines der bisher gefundenen Protein-Typen einordnen. Offenbar bilden die Basilisken eine Sondergruppe von Eischalen-Proteinen aus, deren Aminosäuren-Komposition aber weder dem Kollagen (HARRINGTON und VON HIPPEL 1961), noch dem Elastin zugeordnet werden kann (PARTRIDGE 1962).

Die Eischalen der Chamaeleoniden und Agamiden entsprechen in ihrem grundsätzlichen Proteinaufbau dem *Squamaten*-Typ. Der bei *Eublepharis* noch relativ hohe



Histidin-Gehalt (7 Mol-%) liegt einheitlich bei *Iguana* bemerkenswert niedriger. Zwischen den Eischal-Proteinen der Iguaniden und Agamiden besteht eine auffällige Ähnlichkeit, die jedoch nicht so weit geht, daß alle Aminosäuren-Daten übereinstimmen. Bei Agamen liegt der Prolin-Gehalt niedriger als bei Leguanen, aber höher als bei Chamaeleons. Auch der auffällige Glycin-Gehalt in Eischal-Proteinen von Agamen läßt sich so interpretieren, daß trotz der relativ nahen Verwandtschaft mit den Leguanen doch typische Unterschiede zu beobachten sind.

Nicht ganz so eindeutig wie sich die Beziehungen zwischen Agamiden und Iguaniden an Hand der Aminosäurenprofile der Eischal-Proteine deuten lassen, gestalten sich die Verhältnisse zwischen Leguanen bzw. Agamen gegenüber den Chamaeleons.

Die Eischal-Proteine der Skinke lassen sich ebenfalls unter dem Oberbegriff des Squamaten-Typus einordnen, neigen aber wegen des niedrigen Cystin-Gehaltes zum *Phelsuma*-Typ. Die Aminosäuren-Profile von Scincidae entsprechen im weiteren Sinne denen der Lacertidae. Das gilt für einige Aminosäuren. Dennoch heben sich die Skinke deutlich von anderen Squamaten ab.

Die Aminosäuren-Kompositionen der Eischal von echten Eidechsen entsprechen dem Squamaten-Typ. Aufgrund der ungefähr 150 vorkommenden Arten war mit einer relativ großen Streubreite der Aminosäuren-Werte von Eischal zu rechnen. Diese Befürchtungen haben sich aber nur teilweise bestätigt, vielmehr findet sich bei einem solchen Artenreichtum eine vergleichsweise große Einheitlichkeit.

Einige Aminosäuren-Relationen deuten auf eine gewisse Verwandtschaft zu den Scinciden, andere dagegen lassen Beziehungen zu den Anguiden vermuten. Klare Aussagen in dieser Hinsicht können zum augenblicklichen Zeitpunkt noch nicht gemacht werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um einen besseren Einblick zu gewinnen.

Eischal-Proteine von *Anguidae* (Schleichen) entsprechen dem *Squamaten*-Typ. Auch hier ist es schwer, entwicklungsgeschichtliche Zusammenhänge mit anderen Familien zu erkennen. Zumindest reicht das bisher untersuchte Material noch nicht aus, um einigermaßen verlässliche Schlüsse zu ziehen.

Auch die Proteine der Eischal von den *Varanidae* (Warane) gehören zum Squamaten-Typ und nicht zum *Phelsuma*-Typ. Der hohe Histidin-Gehalt deutet auf eine besondere Konstruktion dieser Proteine hin. Bei Schlangen kann man ebenfalls hohe Histidin-Werte in den Eischal feststellen. Ebenso scheinen in Eischal von Waranen und Schlangen Proteine vorzukommen, die zusätzlich relativ hohe Arginin-Gehalte besitzen. Dabei dürften die Warane wegen ihrer besonders hohen Lysin- und Histidin-Gehalte eine Schlüsselstellung in der Ausbildung derartiger Proteine einnehmen.

Daß die Warane eine sehr wesentliche Rolle in der Entwicklung von Eischalproteinen von der Unterordnung Sauria zu den Serpentes gespielt haben müssen, zeichnet sich deutlich aus den genannten Befunden ab.

Alle bisher analysierten Eihüllen von Schlangen sind nach dem Squamaten-Typ, der erstmalig bei *Eublepharis macularis* beobachtet worden ist, aufgebaut.

Auch die Proteine der Eihüllen von Riesenschlangen (*Boidae*) gehören deshalb zum Squamaten-Typ. Diese Proteine unterscheiden sich nicht prinzipiell von dem der *Varanidae*. Es läßt sich im Gegenteil aufgrund der Histidin-Arginin-Werte eine Beziehung zu den Waranen herstellen. Es liegen nur graduelle Unterschiede zwischen diesen Familien vor. Innerhalb der Familie *Boidae* sind keine nennenswerten Unterschiede feststellbar.

Dagegen weichen von den *Boidae* und den meisten anderen eierlegenden Schlangen die primitiven Nattern ab. Die Aminosäuren-Komposition ihrer Eischal gehört zwar zu dem Squamaten-Typ; sie unterscheidet sich aber durch einen relativ niedrigen Prolin-Gehalt von anderen Schlangen. Der hier gefundene hohe Lysin-Gehalt hat sich bei anderen Schlangen nicht nachweisen lassen. Trotz dieser Unterschiede bleibt das

allgemeine Konstruktionsprinzip der Eischalen von Squamaten – und im besonderen der relativ hohe, aber typische Gehalt an Histidin und Arginin – erhalten. Dies bedeutet, daß primitive Nattern ihrerseits eine Sonderstellung innerhalb der Serpentes einnehmen dürften. Ob die besondere Konstruktion der Eischalen im Zusammenhang mit einer Anpassung an die speziellen Lebensgewohnheiten dieser Tiere zu sehen ist oder ob sie keine Weiterentwicklung aus früheren Formen bedeutet, kann in diesem Zusammenhang noch nicht entschieden werden. Proteine der Eischalen von höheren Nattern entsprechen erwartungsgemäß dem Squamaten-Typ. Der Prolin-Gehalt liegt erheblich niedriger als bei Boidae, aber gelegentlich höher als bei primitiven Nattern. Dabei sind keine Unterschiede zwischen eigentlichen Nattern und Trugnattern feststellbar! Prolin-Werte in ähnlicher, vergleichbarer Höhe sind noch bei den Viperidae nachweisbar. Die Schalenproteine von Schlangeneiern sind praktisch nicht in den in der Proteinchemie üblichen Solventien löslich. Deshalb ist auch an eine Fraktionierung und Charakterisierung dieser Proteine noch nicht zu denken. Leider kann aber auch die Frage nach den unterschiedlichen Prolin-Gehalten nicht befriedigend beantwortet werden. Theoretisch kann ein Protein mit verschieden hohem Prolin-Gehalt in allen Eischalen vorliegen oder ein Gemisch von prolinreichen und prolinarmen Proteinen vorkommen. Im Fall von Proteingemischen ist eher eine unterschiedliche Entwicklung nach den jeweiligen Gegebenheiten vorstellbar, wobei die Synthese einzelner Partner solcher Gemische gefördert oder gehemmt werden. Schließlich kann man aber auch Mischformen nicht ausschließen. Der Prolin-Gehalt von Schalenproteinen scheint bei Schlangen familienspezifisch zu sein. Die Gehalte an Histidin und Arginin passen zu den in Schalenproteinen von Schlangeneiern im allgemeinen gefundenen Werten. Dies unterstreicht die oben entwickelte Vorstellung über biochemische Unterscheidungsmerkmale von Schalenproteinen von Schlangen, Waranen, Eidechsen, Schleichern und Skinchen.

Die Aminosäurenprofile der Eischalen-Proteine von *Boiginae* (Trugnattern) entsprechen ebenfalls dem Squamaten-Typ. Die Prolin-Gehalte bei eigentlichen Nattern und Trugnattern unterscheiden sich nicht erheblich. Die Histidin- und Arginin-Werte bestätigen die Ansicht, daß Histidin und Arginin als Leitaminosäuren gelten können.

Die Aminosäuren-Daten der Eihüllen von Giftnattern (*Elapidae*) fallen auch in die Kategorie des Squamaten-Typs. Der Prolin-Gehalt ist sehr hoch, auch die charakteristischen, biochemischen Erkennungsmerkmale Histidin und Arginin sind in entsprechender Höhe vertreten. Der unterschiedliche Cystin-Wert innerhalb der Gattung *Naja* ist vermutlich auf artspezifische Eigenheit, die auch bei anderen Formen vorkommt, zurückzuführen.

Die *Viperidae* (Vipern) weisen in der Aminosäuren-Zusammensetzung der Eischalenproteine ein Profil auf, das für den Squamaten-Typus charakteristisch ist. Auffallend ist der einheitliche Gehalt an Prolin, der auch dem der Nattern und Trugnattern entspricht. Auch die übrigen Merkmale Histidin und Arginin kommen in den von anderen Schlangen-Eischalen bekannten Mengen vor. Zwischen den Vertretern der Familie *Viperidae* existieren offenbar auch spezie-spezifische Unterschiede.

Die Eischalen der *Crotalidae* (Grubenottern) besitzen ein Aminosäurenprofil, das sich unter den Begriff Squamaten-Typ einordnen läßt. Der hohe Gehalt an Prolin scheint nicht dem der verwandten Vipern, sondern eher dem der Giftnattern, z. B. den Kobras, zu entsprechen. Die Histidin- und Arginin-Werte unterstreichen ebenfalls die Vermutung, daß Histidin und Arginin in den Eischalen-Proteinen von Schlangen eine wichtige Rolle spielen dürften.

Die Aminosäurezusammensetzungen der Eischalenproteine von Reptilien scheint nach unseren bisherigen Untersuchungen nur wenige Anhaltspunkte für eine Bindung der analysierten Spezies an den Lebensraum zu geben. Das ist bereits für einige Schildkrötenarten erwähnt worden.

Bei Krokodileiern müßten noch weitere Spezies untersucht werden, um eine Bindung dieser Tiere an den Biotop eindeutig erkennen zu können. Trotz des umfangreichen Untersuchungsmaterials bei den Squamaten konnten wir nicht mit Sicherheit ausschließen, daß eine Funktionsbindung zwischen Umweltfaktoren (z. B. Klima) und Komposition der Eischaleneiweißproteine besteht.

Um die – wahrscheinlich nur in seltenen Fällen – bestehenden Funktionsbindungen besonders hervorzuheben, sei auf den charakteristischen Unterschied der Aminosäurezusammensetzung der nicht verkalkten Eischaleneiweißproteine von Testudinata (*Dermochelys*, *Caretta*) und der nicht verkalkten Eischaleneiweißproteine von Squamaten hingewiesen.

Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die bestehenden Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der Eischaleneiweißproteine von Reptilien bei vielen Spezies auf evolutive Prozesse zurückzuführen sind.

In dieser Übersichtsdarstellung haben wir versucht, allgemeine Trends in der Komposition der Eischaleneiweißproteine von Reptilien zu erkennen. Die gefundenen Daten stimmen in vielen Fällen mit der Systematik überein. Unterschiede sind vor allen Dingen bei den Geckonen aufgefallen und haben uns zu einer bisherigen Einteilung in drei Gruppen veranlaßt. Aus diesem Grunde gliederten wir die Schaleneiweißproteine der Geckonen in den „*Tarentola*-Typ“, den „*Phelsuma*-Typ“ und den „*Eublepharis*-Typ“ auf. Weitere Untersuchungen werden speziell auf die Eischaleneiweißproteine von Geckonen gerichtet sein müssen, um zusätzliche Merkmale für die systematische Einteilung dieser Tiergruppe zu liefern.

### Zusammenfassung

Der Vergleich der Aminosäure-Daten von Reptilien-Eischaleneiweißproteinen führte zu einer Zweiteilung des Untersuchungsmaterials. Dabei unterscheiden sich kalkige Schalen wesentlich von nichtverkalkten Eischaleneiweißproteinen. Die Membrana testacea ist bei den Testudinata (soweit verkalkt) und den Crocodylia relativ cystinreich und prolinarm. Beim Aufbau der Proteine der Membrana-Fraktion scheint Tyrosin eine besondere Rolle zu spielen. Die Daten für diese Aminosäure lassen sich in diese Reihenfolge einordnen: Trionychidae > Testudinidae > Emydidae > Dermochelyidae > Crocodylia > Alligatoridae. Möglicherweise handelt es sich hierbei um mehrere Proteine, von denen sich die tyrosinreichen verschieden stark entwickelt haben. Die Daten für Alanin, Lysin und Histidin können ebenfalls in eine Sequenz angeordnet werden: Testudinidae ~ Trionychidae > Emydidae > Dermochelyidae.

Die säureunlöslichen Bestandteile der Schale (Matrix) von Testudinata und Crocodylia unterscheiden sich deutlich voneinander. Für Histidin läßt sich folgende Sequenz aufstellen: Testudinata < Crocodylia ~ Ratitae, so daß eine gewisse Verwandtschaft zwischen Crocodylia und Aves nicht auszuschließen ist.

Bei Geckos können drei Typen von Membrana- bzw. Eischaleneiweißproteinen vorkommen: 1. *Tarentola*-Typ, 2. *Phelsuma*-Typ und 3. *Eublepharis*-Typ.

Der *Tarentola*-Typ enthält eine praktisch cystinfreie Membrana testacea mit einem vergleichsweise hohen Wert an Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin und Serin. Der *Phelsuma*-Typ ist cystinfrei, aber prolinreich. Bei Vertretern des *Eublepharis*-Typ kommt neben viel Prolin auch Cystin vor. Da der *Eublepharis*-Typ bei vielen Squamaten zu finden ist, bezeichnen wir ihn auch als *Squamaten*-Typ.

Proteine des *Phelsuma*- und des *Squamaten*-(*Eublepharis*-)Typs enthalten regelmäßig viel Prolin. Es ist anzunehmen, daß diese Proteine in ihrer Struktur dem (trans)-Poly-L-Prolin II ähneln. Da Polyprolin II verwandte Eigenschaften wie das Kollagen besitzt, lassen sich Stabilität und Zugfestigkeit von *Squamaten*-Eischaleneiweißproteinen erklären, die meist nicht verkalkt sind. Im Gegensatz dazu stehen nicht kalkige Schalen von Schildkröteneiern (*Dermochelys*), die völlig anders aufgebaut sind.

Proteine des *Squamaten*-Typs enthalten regelmäßig neben viel Prolin auch noch relativ viel Cystin. Nach diesem Bauprinzip sind praktisch alle Eischaleneiweißproteine von *Squamaten* konstruiert. Trotzdem bleibt ein genügender Spielraum erhalten, der den einzelnen Familien und Spezies deutliche Unterscheidungsmerkmale gewährt.

Demzufolge zeigen sich sehr auffällige verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Leguanen und Agamen.

Histidinreiche Proteine der Eischaleneiweißproteine kommen bei vielen *Squamaten* vor. Besonders ausgeprägt sind sie bei Waranen.

Zwischen Waranen und Riesenschlangen läßt sich nur ein gradueller Unterschied erkennen. Innerhalb der Unterordnung Serpentes zeigen nur die primitiven Nattern Abweichungen auf. Die Nattern, Trugnattern und Vipern besitzen Eischalen-Proteine, die durch ihren einheitlichen Prolin-Gehalt charakterisiert sind.

Die Eischalen-Proteine der Grubenottern ähneln denen der Giftnattern.

### Summary

*The amino acid composition of reptilian egg-shells in its biochemical and evolutionary aspects*

The comparison of amino acid data of reptile egg-shells resulted in a bipartition of the shell material. Calcified shells differed from noncalcified shells in this respect. The membrana testacea of Testudinata (as far as they are calcified) and of Crocodylia are relatively cysteine-rich and poor in proline. Tyrosine seems to play a particular role in the construction of membrana-proteins. The data of this amino acid can be classified as follows: Trionychidae > Testudinidae > Emydidae > Dermochelyidae > Crocodylidae > Alligatoridae. Possibly it is a matter of several proteins of which tyrosine-rich proteins have developed in a heterogeneous way. The data of alanine, lysine and histidine can also be arranged in a sequence: Testudinidae ~ Trionychidae > Emydidae > Dermochelyidae.

The acid insoluble components of the shells (matrix) of Testudinata and Crocodylia differ remarkably from each other. For histidine the following sequence can be set up: Testudinata < Crocodylia ~ Ratitae. This does not exclude a certain relationship between Crocodylia and Aves.

In egg-shells of Geckoes e types of membrana- resp. egg-shell proteins could be found 1. *Tarentola*-type, 2. *Phelsuma*-type and 3. *Eublepharis*-type.

The *Tarentola*-type contains a practically cystinfree membrana testacea with a comparatively high data for aspartic acid, glutamic acid, lysine and serine. The *Phelsuma*-type is cystin-free, but proline-rich. The *Eublepharis*-type is characterized by a high content of proline as well as cystine. Since the *Eublepharis*-type has been found primarily in egg-shells of Squamates, we termed it also as *Squamate*-type.

Proteins of the *Phelsuma*-type as well as the *Squamate*- (*Eublepharis*) type contained much proline regularly. It can be assumed that those protein resemble the structure of (trans)-poly-L-proline II. Since polyproline II has related properties to collagen, stability and tensile strength of noncalcified Squamate egg-shells could be explained. In contrast to this findings are the results of analyses of noncalcified egg-shells of Testudinata (*Dermochelys*) which are constructed in a completely different way.

Proteins of the Squamate-type contain regularly in addition to a high proportion of prolin relative much cystine. According to this building-principle all egg-shells of Squamates are constructed. There is sufficient margin for distinctive marks of individual families and species.

Accordingly very clearly relations between Iguanidae and Agamidae are indicated.

Histidine-rich proteins of egg-shells of many Squamates have been observed. Particularly marked is this in the case of Varans.

Between Varans and Boidae only a gradual difference can be observed as far as egg-shell proteins are concerned. Within the suborder Serpentes only primitive *Colubridae* show differences, *Colubrinae*, *Boiginae*, and *Elapidae* have egg-shell proteins being characterized by a uniform proportion of prolin.

Egg-shell proteins of *Crotalidae* resemble those of *Elapidae*.

### Résumé

*La composition des acides aminés des coquilles d'oeuf des reptiles en vue de biochimie et d'évolution*

L'examen des dates regardant le contenu en acides aminés dans les coquilles d'oeufs chez les reptiles justifiait de grouper le matériel en deux lots: Les coquilles calcifiées se distinguent nettement des non-calcifiées. La membrana testacea dans les tortues (Testudinata) si elle est bien calcifiée, et des crocodiles (Crocodylia) est relativement riche en cystine et pauvre en proline. La tyrosine semble de jouer un rôle important dans la synthèse des protéines de la partie provenant de la membrana testacea. Les dates pour cet acide aminé se laissent grouper dans cette succession: Trionychidae - Testudinidae - Emydidae - Dermochelyidae - Crocodylidae - Alligatoridae. Il est possible d'avoir affaire avec plusieurs protéines, desquels ceux riches en tyrosine on subi une prolifération hétérogène. Les dates pour alanine, lysine et histidine suivent cette ordre: Testudinidae - Trionychidae - Emydidae - Dermochelyidae.

Les fractions insolubles en acides de la coquille (matrix) des crocodiles et des tortues sont bien différents. Pour l'histidine on pouvait établir la séquence suivante: Testudinidae–Crocodylidae–Ratitae, de façon qu'une certaine affinité d'entre Crocodylia et Aves ne se laisse pas exclure.

Dans la famille des Gekkonidae on distingue trois types de composition des acides aminés dans les coquilles: 1. type *Tarentola*, 2. type *Phelsuma*, 3. type *Eublepharis*.

Coquilles de type *Tarentola* ont la membrane presque sans cystine, par contre des valeurs assez élevées d'acide asparagine, acide glutamine, lysine et sérine. Le type *Phelsuma* ne possède point de cystine et beaucoup de proline. Coquilles de type *Eublepharis* contiennent proline et cystine en pourcentage considérable. Puisqu'on trouve ce type chez la plupart des squamates on pourrait le nommer aussi type Squamata.

Les protéines des types *Phelsuma* et *Squamata* (= *Eublepharis*) sont régulièrement riche en proline. On peut supposer que ces protéines sont structurellement proche du (trans)-poly-L-proline II a des caractères semblables avec la collagène, la stabilité et la résistance à la traction des coquilles des squamates non-calcifiées se laisse aisément expliquer. Par contre les coquilles des tortues (*Dermochelys*) ont une structure tout à fait différent. Malgré toutes les coquilles ce squamates out un contenu considérable en proline et en cystine il y en a une assez grande variabilité caractérisant des espèces ou bien des familles. C'est démontré par une affinité apparente d'entre *Iguanidae* et *Agamidae*.

Des protéines riche en histidine se trouvent dans nombre des Squamata, ils sont très prononcés dans la famille des *Varanidae*. D'entre *Varanidae* et *Boidae* on reconnait seulement des différences graduelles. Au sein des serpents seuls les Colubridés primitifs montrent des divergences appréciables. Les autres couleuvres et les *Viperidae* possèdent des protéines caractérisées par leur contenu très uniforme en proline.

Les protéines des coquilles d'oeufs des *Crotalidae* ressemblent celles des *Elapidae*.

#### Literatur

1. CREWTER, W. G.; FRASER, R. D. B.; LENN, F. G.; LINDLEY, H., 1965: The Chemistry of Keratins. Adv. Prot. Chem. 20, 191.
2. ELLIOT, A.; BRADBURY, E. M.; DOWNIE, A. R.; HANBY, W. E., 1962: Conformation of Polypeptide Chains in the Solid State in Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins. M. A. STAHMANN, Editor, The University of Wisconsin Press Madison, S. 255.
3. ERBEN, H. K., 1970: Ultrastrukturen und Mineralisation rezenter und fossiler Eischalen bei Vögeln und Reptilien. Biomineralisation 1, 1.
4. – Persönliche Mitteilung.
5. ERBEN, H. K.; KRAMPITZ, G., 1973: Ultrastrukturen und Aminosäureverhältnisse in den Schalen von Pleuromaridae (Gastropoda). Biomineralisation 6, 12.
6. GHISELIN, M. T.; DEGENS, E. T.; SPENCER, D. W.; PARKER, R. H., 1967: A phylogenetic survey of molluscan shell matrix protein. Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard, B. viora, 262.
7. HARRINGTON, W. F.; VON HIPPEL, P., 1961: The Structure of Collagen and Gelatin. Adv. Prot. Chem. 16, 1–138.
8. KRAMPITZ, G.; ERBEN, H. K.; KRIESTEN, K., 1972 a: Über Aminosäurezusammensetzung und Struktur von Eischalen. Biomineralisation, Bd. 4, S. 88.
9. KRAMPITZ, G.; KRIESTEN, K.; FAUST, R., 1973: Aminosäurezusammensetzung morphologischer Eischalen von Ratitac. Biomineralisation (im Druck) Bd. 5.
10. KRAMPITZ, G.; ENGELS, J.; KOESTER, U.; KEMPFLE, M., 1972 b: Jahresbericht d. Instituts f. Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, Universität Bonn.
11. KRAMPITZ, G.; ERBEN, H. K.; KRIESTEN, K.; HARDEBECK, H., 1972 c: Jahresbericht d. Instituts f. Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, Universität Bonn.
12. KRAMPITZ, G.; KRIESTEN, K.; BÖHME, W., 1973: Untersuchungen über Ultrastruktur und Aminosäurezusammensetzung der Eischalen von *Natrix natrix*. Experientia 29, 416.
13. LEAVER, A. G., 1968: The Nature and Possible Significance of Peptides Isolated from Bone and Dentine. Calc. Tiss. Res. 2, Suppl. 85.
14. MADISON, V.; SCHELLMAN, J., 1972: Optical Activity of Polypeptides and Proteins. Biopolymer 11, 1041–76.
15. MATHEJA, J.; DEGENS, E. T., 1971: Molekulare Entwicklung mineralisationsfähiger organischer Matrizen. Vlg. Vieweg & Sohn, Braunschweig.
16. PARTRIDGE, S. M., 1962: Elastin. Adv. Prot. Chem. 17, 227–302.
17. RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V., 1968: Conformation of Polypeptides and Proteins. Adv. Prot. Chem. 23, 283–437.
18. ROBINSON, D. S.; KIND, N. R.; BOWEN, D. J., 1966: The Occurrence of Neutral and Acidic Mucins in the Reproductive Tract of the Laying Hen. Histochemie 13, 97–104.

19. SEIFERT, H., 1971: Strukturgenlekte Grenzflächenvorgänge in der unbelebten und belebten Natur. Vlg. Vieweg & Sohn, Braunschweig.
20. SIMKISS, K.; TYLER, C., 1959: The Possible Calcification Mechanisms in Some Reptilian Egg-shells. *Quart. J. Micr. Sci.* 100, 529–38.
21. TRAUB, W.; YONATH, A., 1966: *J. Mol. Biol.* 16, 404.
22. URRY, D. W., 1971: Neutral Sites for Calcium Ion Binding to Elastin and Collagen: A Charge Neutralisation Theory for Calcification and its Relationship to Atherosclerosis. *Proc. Soc. Acad. Sci. USA* 68, 810.
23. WALKER, A. D., 1972: New Light on the Origin of Birds and Crocodils. *Nature* 237, 257–263.

*Anschriften der Verfasser:* Prof. Dr. G. KRAMPITZ, Dr. K. KRIESTEN, Dr. W. HARDEBECK, Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, Lehr- und Forschungsbereich Biochemie, 53 Bonn, Katzenburgweg 7–9. Dr. W. BÖHME, Zoolog. Forschungsinstitut und Museum A. Koenig, Herpetologische Abteilung, 53 Bonn, Adenauerallee 150–164

*Aus dem Zoologischen Institut der Universität Graz, Lehrkanzel für Morphologie und Ökologie, Vorstand: Prof. Dr. R. Schuster*

## Das Serum-Eiweißbild der *Triturus cristatus*-Unterarten

Von GÜNTER FACHBACH

*Mit 4 Abbildungen*

*Eingegangen am 11. September 1973*

### Einleitung

Die systematische Stellung der Kammolchformen war um die Jahrhundertwende ein Problem, das sich am deutlichsten in der Fülle von Namen manifestiert, die man in der älteren Literatur unter dem Oberbegriff „Kammolch“ finden kann (STRAUCH 1870; FEJÉRVÁRY 1910; WOLTERSTORFF 1923, 1925; MERTENS, MÜLLER 1928, 1940; HERRE 1933; MERTENS, WERMUTH 1960).

Erst nach dem ersten Weltkrieg ging man daran, diesen Fragenkomplex einer genaueren Prüfung zu unterziehen. WOLTERSTORFF (1923) hat als erster die Zuordnung aller europäischen und kleinasiatischen Kammolche zu einer einzigen Art erkannt und beschrieben. In weiterer Folge war es vor allem HERRE (1933), der bei 3 Unterarten eine genauere Analyse einer Fülle verschiedenartigster biometrischer Daten durchführte und somit die Ansicht von WOLTERSTORFF erhärten konnte. Daneben gab es aber auch Untersuchungen, die zu anderen Ergebnissen kamen; so z. B. von BOLKAY (1928), der 2 verschiedene Arten mit je 2 Unterarten anführt.

In jüngster Zeit haben nun neue Untersuchungsverfahren auch ihre Bedeutung für die Taxonomie dargelegt. Eines dieser vorwiegend biochemischen Verfahren ist die Auftrennung und Darstellung der Serumproteinmuster durch Elektrophorese. Mit Hilfe dieser Methode war es nun möglich, derartige Probleme von einer völlig neuen Seite her aufzugreifen und in vielen Fällen wertvolle Aufschlüsse zu liefern (DESSAUER, FOX 1956; FRIEDEN et al. 1957; KIORTSIS, KIORTSIS 1960; GALLIEN et al. 1966; CHEN 1967; COATES, TWITTY 1967; FLINDT et al. 1968; SHONTZ 1968; FACHBACH, ALBERT