

**NEUROPEPTIDE UND DIE REGULATION DES
KOHLENHYDRATSTOFFWECHSELS
IM FETTKÖRPER
DER ARGENTINISCHEN SCHABE (*BLAPTICA DUBIA*)**



Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Jana F. Liewald
geb. in Mainz-Mombach

Mainz, 2001

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2002

Gewidmet meinem Vater (1941-2001).
Ich vermisse dich sehr...

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	17
2.1 Die Argentinische Schabe (<i>Blaptica dubia</i>)	17
2.2 Bezugsquellen der Chemikalien	23
2.3 Substanzen & Lösungen	23
2.4 Methoden	29
2.4.1 Isolierung des Fettkörpergewebes	29
2.4.2 Bestimmung durchschnittlicher Frischgewichte	31
2.4.3 Wirkungen von Nahrungsmangel auf das Gewicht	31
2.4.4 Histologische Präparate des Fettkörpergewebes von Hungertieren	31
2.4.4.1 Fixierung des Fettkörpergewebes	32
2.4.4.2 Schnittherstellung	32
2.4.4.3 Entparaffinierung und Färbung der Schnitte	33
A. Glykogen-Nachweis: Karminfärbung nach Best	33
B. Mycetocyten-Nachweis	33
2.4.4.4 Auswertung der Schnitte	34
2.4.5 Bestimmung durchschnittlicher Wassergehalte (Gesamt tier, Fettkörper)	34
2.4.6 Bestimmung des Wasserverlust durch Verdunstung in trockener Luft	34
2.4.7 Inkubation isolierter Fettkörperloben	35
2.4.8 Bestimmung der Friergewichte der Fettkörperloben	36
2.4.9 Aufarbeitung des Fettkörpergewebes	36
2.4.9.1 Saure Aufarbeitung (Metabolite allgemein)	36
2.4.9.2 Basische Aufarbeitung (Fructose-2,6-bisphosphat)	38
2.4.10 Metabolitbestimmungen	38
2.4.10.1 Testsysteme	39
2.4.10.1.1 Citrat	39
2.4.10.1.2 DAP, GAP und Fructose-1,6-bisphosphat	40
2.4.10.1.3 α -Glycerophosphat	41
2.4.10.1.4 F6P, G6P und Fructose-1,6-bisphosphat	41
2.4.10.1.5 Fructose-2,6-bisphosphat	42
2.4.10.1.6 D-Glucose	47
2.4.10.1.7 Glykogen	48
2.4.10.1.8 Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat	49
2.4.10.1.9 Trehalose	50
2.4.10.2 Berechnung der Metabolitkonzentrationen	53
2.4.10.2.1 Allgemein	53
2.4.10.2.2 Fructose-2,6-bisphosphat	54
2.4.10.2.3 Glykogen	55
2.4.10.2.4 Trehalose	56
2.4.11 Untersuchungen mit isolierten Trophocyten	56
2.4.11.1 Isolierung der Trophocyten	56
2.4.11.2 Bestimmung der Zellausbeute	60
2.4.11.3 Überprüfung der Zellpermeabilität	60
2.4.11.4 Permeabilisierung mit Saponin	61
2.4.11.5 Inkubation isolierter Trophocyten	61

2.4.11.6 Aufarbeitung der Trophocyten	62
2.4.11.6.1 Saure Aufarbeitung (Metabolite allgemein)	62
2.4.11.6.2 Basische Aufarbeitung (Fructose-2,6-bisphosphat)	62
2.4.12 Mikrofluorometrische Untersuchungen von Ca ²⁺ -Strömen an isolierten Trophocyten	62
2.4.12.1 Beladung der Trophocyten mit Fura-2	66
2.4.12.2 Mikrofluorometrische Untersuchungen	66
2.4.12.3 Ca ²⁺ -Imaging	68
2.5. Darstellung der Messergebnisse und statistische Auswertung	68
3. Ergebnisse	70
3.1 Wirkung von Nahrungs- und Wassermangel auf den Fettkörperstoffwechsel von <i>Blaptica dubia</i>	70
3.1.1 Durchschnittliche Gewichte und Wassergehalte von Gesamttieren und Fettkörpern	70
3.1.2 Wirkung von Nahrungsmangel auf die Gewichte von Gesamttieren und Fettkörpern	70
3.1.3 Histologische Präparate des Fettkörpergewebes von Hungertieren	73
3.1.4 Wasserverlust durch Verdunstung in trockener Luft	74
3.2 Bestimmung von Metaboliten des Fettkörpers	76
3.2.1 Isolierung der PP _i PFK	76
3.2.2 Wirkung von Nahrungsmangel auf Metabolite im Fettkörper	77
3.2.3 Gehalte von Metaboliten in Fettkörpern nach Inkubation mit Bld HrTH	80
3.2.4 Gehalte von Metaboliten in Fettkörpern nach Inkubation mit Bld HrTH und Iodacetat	83
3.3 Untersuchungen mit isolierten Fettkörpern	85
3.3.1 Variation der Dauer der Vorinkubation	85
3.3.2 Einfluss des Zuckergehaltes der Hämolymphe auf die Trehalogenese	88
3.3.3 Signaltransduktion des Neuropeptids Bld HrTH	92
3.3.3.1 Einfluss von La ³⁺ -Ionen	92
3.3.3.2 Bedeutung von NO	96
3.4 Untersuchungen mit isolierten Trophocyten	101
3.4.1 Optimierung der Zellisolierung	101
3.4.2 Überprüfung der Vitalität und Permeabilität isolierter Trophocyten mit Trypanblau	102
3.4.3 Signaltransduktion des Neuropeptids Bld HrTH	104
3.4.3.1 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Bld HrTH	104
3.4.3.2 Bedeutung von Octopamin	108
3.4.3.3 Bedeutung von Ionen	111
3.4.3.4 Bedeutung von extrazellulärem Ca ²⁺ : Calcium-Ionophor A23187	115
3.4.3.5 Bedeutung von intrazellulärem Ca ²⁺	120
3.4.3.5.1 Thimerosal	120
3.4.3.5.2 Dantrolen	123
3.4.3.6 Bedeutung von Diacylglycerin: Phorbol-12,13-dibutytrat	127
3.4.3.7 Bedeutung von Inositol-1,4,5-trisphosphat	129

3.5 Mikrofluorometrische Untersuchungen von Ca²⁺-Strömen an isolierten Trophocyten	133
3.5.1 Methode.....	133
3.5.2 Änderungen der Fluoreszenzrate bei Inkubation mit Testsubstanzen.....	135
3.5.3 Ca ²⁺ -Imaging.....	137
4. Diskussion	140
4.1 Modellcharakter von Insekten und ihre Bedeutung als Versuchstiere	140
4.2 Vergleich zwischen HrTH, Glukagon und AKH	142
4.3 Wirkung von Nahrungsmangel auf <i>Blaptica dubia</i>	145
4.4 Wassergehalt und Wasserverlust durch Verdunstung in trockener Luft	148
4.5 Metabolite in Fettkörpern	151
4.5.1 Bld HrTH und Metabolite im Fettkörper.....	152
4.5.2 Effekte von Bld HrTH plus Iodacetat auf den Fettkörper <i>in vitro</i>	156
4.6 Einfluss des Zuckergehaltes im Inkubationsmedium auf die Trehalogenese ..	159
4.7 Etablierung einer Methode zur Isolierung der Trophocyten von <i>Blaptica dubia</i>	161
4.8 Signaltransduktion des Neuropeptids Bld HrTH	165
4.8.1 Bedeutung von Ca ²⁺	165
4.8.1.1 Extrazelluläres Ca ²⁺	166
4.8.1.2 Intrazelluläres Ca ²⁺	169
4.8.2 Bedeutung von IP ₃ und Diacylglycerin.....	170
4.8.3 Bedeutung von NO.....	174
4.8.4 Bedeutung von Octopamin.....	176
4.9 Mikrofluorometrische Untersuchungen von Ca²⁺-Strömen an isolierten Trophocyten	181
4.10 Überblick und Schlussbetrachtung	183
5. Zusammenfassung	189
6. Literaturverzeichnis	191
7. Abkürzungsverzeichnis	201
8. Lebenslauf	203

1. EINLEITUNG

Im endokrinen System der Insekten sind vor allem die **Neuropeptide** bedeutsam und finden in den letzten Jahren große Beachtung, da sie wichtige Hormonfunktionen ausüben und auf sehr verschiedene Zielgewebe wirken (siehe unten). Während sich Anfang der 90er Jahre die Zahl der aus Insekten isolierten Neuropeptide noch auf etwa 20 beschränkte (ADAMS 1990), waren 7 Jahre später über 300 bekannt (GÄDE *et al.* 1997).

Die Steuerung durch Neuropeptide wird phylogenetisch als die ursprünglichste hormonelle Regulationsform angesehen (GERSCH 1957) und ist dementsprechend weit verbreitet. Man findet Neuropeptide nicht nur bei Insekten und anderen Invertebraten, sondern auch bei Vertebraten und Pflanzen (STRAND 1999). Dies bedeutet, dass Erkenntnisse über Neuropeptide von allgemeiner wissenschaftlicher Bedeutung sind.

Die Neuropeptide der Insekten werden in den Zellkörpern von neurosekretorischen Zellen (NSZ) synthetisiert. Sie treten insbesondere im Cerebralganglion (pars intercerebralis sowie laterale und tritocerebrale NSZ des Protocerebrums, vereinzelt im Deutocerebrum), in den Ganglien des Bauchmarks sowie im anterioren sympathischen Nervensystem auf. Typisch für diese Zellen sind ein stark ausgebildetes rauhes endoplasmatisches Reticulum (DETTNER & PETERS 1999), sowie die zahlreichen cytoplasmatischen Grana (Durchmesser: 100-400 nm). In den Grana werden die Neuropeptide über das Axon zu neurosekretorischen Endbläschen transportiert und dort gespeichert. Die Abgabe des Neuropeptids in die Hämolymphe erfolgt durch Calcium-vermittelte Exocytose. Im Gegensatz zu konventionellen Transmittern kann der Wirkort der Neuropeptide relativ weit vom Sekretionsort entfernt liegen, und der Abbau des Signalstoffes erfolgt deutlich langsamer. In Form von sogenannten Neurohämälorganen (z.B. Corpora cardiaca (CC), perisymphathetische Organe) können die Axonendigungen mehrerer NSZ gebündelt auftreten oder sie enden direkt am Wirkort (z.B. Muskel, Darm).

Bei Insekten haben Neuropeptide fundamentale Bedeutung bei der Regulation wichtiger Stoffwechselwege (u.a. Fettstoffwechsel durch adipokinetische Hormone/AKH, Kohlenhydratstoffwechsel durch hypertrehalosämische Hormone, Proteinstoffwechsel). Außerdem beeinflussen Neuropeptide Verhalten, Diurese (z.B. diuretisches Hormon/DH), Muskelkontraktionen (z.B. Proctolin, PVK; GÄDE 1997), Fortpflanzung und Herzschlag (z.B. hypertrehalosämische Hormone, SCARBOROUGH *et al.* 1984; CAP/cardioaccelatory peptides bei *Manduca sexta*, Neurohormon D). Ebenso spielen Neuropeptide bei der Entwicklung eine bedeutende Rolle. Zum Beispiel stimuliert das im Gehirn gebildete prothorakotrope Hormon (PTTH) die Prothoraxdrüse (Häutungsdrüse) zur Ausschüttung des Steroidhormons Ecdyson,

welches die Häutung sowie die Ausbildung adulter Strukturen stimuliert (PENZLIN 2001). Seltener sind hingegen durch Neurohormone ausgelöste Farbwechsel, wie sie bei der Stabheuschrecke (*Carausius morosus*) auftreten (HANKE 1969).

Über Details der Regulationsvorgänge und der beteiligten Signaltransduktionswege ist bisher allerdings noch wenig bekannt, da die entsprechenden Neuropeptide oftmals noch gar nicht oder erst seit kurzem in Reinform für Experimente zur Verfügung stehen. Auch die zugehörigen Rezeptoren sind nur in Einzelfällen bekannt und geklont, da sie zumeist in nur geringer Zahl auftreten und somit mit biochemischen Methoden schwer zu erfassen sind. Es handelt sich um membranständige Rezeptoren, bei denen die Signaltransduktion über G-Proteine sowie cAMP, cGMP oder Hydrolyseprodukte des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) erfolgt (DETTNER & PETERS 1999). Die Koordinierung der Organfunktionen und des Metabolismus der Insekten ist zudem, v.a. beim Flug, sehr komplex.

Bei Schaben spielen die **hypertrehalosämischen Hormone** als Neuropeptide eine bedeutende Rolle. Je nach Schabenfamilie treten unterschiedliche Hormone auf, die sich jedoch strukturell und funktionell sehr ähneln (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Hypertrehalosämische Hormone (Nomenklatur nach RAINA & GÄDE 1988). In der Evolution stark konservierte Aminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Hypertrehalosämisches Hormon	Schabenfamilie (namensgebende Schabenart)	Aminosäuresequenz
Bld HrTH	Blaberidae <i>(Blaberus discoidalis)</i>	pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Thr-NH₂
Pea CAH-I	Blattidae <i>(Periplaneta americana)</i>	pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Asn-Trp-NH₂
Poa HrTH	Polyphagidae <i>(Polyphaga aegyptiaca)</i>	pGlu-Ile-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂

Es handelt es sich um Oligopeptide aus 8 bis 10 Aminosäure. Der N-Terminus ist geschützt durch Pyroglutamat, in dem die erste Aminogruppe mit der δ -Carboxylgruppe zum Amid schließt (s. Abb. 1). Die Aminosäure des C-Terminus ist stets amidiert (-NH₂).

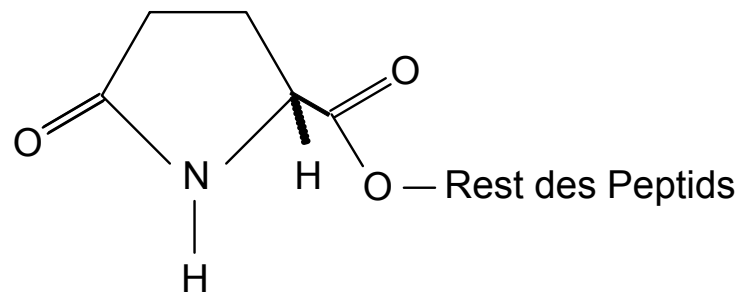


Abbildung 1: Schutz des N-Terminus des Neuropeptids durch Pyroglutamat (pGlu).

Octapeptide sind charakteristisch für die Schabenfamilie *Blattidae*, Decapeptide für die Familien *Blaberidae* und *Blattellidae*. Die jeweilige Bezeichnung des Neuropeptids wird zusammengesetzt aus der Schabenart, bei der das Peptidhormon zuerst identifiziert wurde (z.B. **Blaberus discoidalis** - **Bld** HrTH) und der zuerst beschriebenen Wirkungsweise (z.B. **hypertrehalosaemic hormone** - HrTH, **cardioacceleratory hormone** - CAH) (RAINA & GÄDE 1988).

Die Wirkungen hypertrehalosämischer Hormone sind äußerst vielfältig:

1. Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels
 - Steigerung der Synthese und Sekretion von Trehalose (STEELE 1961)
 - Stimulierung der Glykogenolyse durch Aktivierung der Glykogenphosphorylase (GPase; STEELE 1963)
 - ⇒ liefert Vorstufen für Syntheseprozesse
 - Drosselung des Fluxes durch die Glykolyse (WIENS & GILBERT 1967)
2. Aktivierung der β -Oxidation (WIENS & GILBERT 1965, MCDUGALL & STEELE 1988)
 - ⇒ liefert ATP für Syntheseprozesse
3. Steigerung der Proteinsynthese im Fettkörper (KEELEY 1978)
4. Einfluß auf die Transkriptionsaktivität im Fettkörper (LEE & KEELEY 1994)
5. Erhöhung der Herzschlagrate (SCARBOROUGH *et al.* 1984)

Vergleichbare Hormone konnten bei anderen Insekten, z.B. der Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*, GOLDSWORTHY 1969), der Honigbiene (*Apis mellifera*, NATALIZI & FRONTALI 1966) und der Schmeißfliege (*Phormia regina*, FRIEDMAN 1967), identifiziert werden und man geht inzwischen davon aus, dass "hypertrehalosämische" Hormone ubiquitär bei Insekten auftreten. Allerdings stehen bei verschiedenen Insektengruppen unterschiedliche Funktionen im Vordergrund.

Bei der von uns untersuchten Schabenart *Blaptica dubia* (Argentinische Schabe) tritt das hypertrehalosämische Hormon Bld HrTH auf, das sich auch bei *Blaberus discoidalis* und *Nauphoeta cinerea* findet (GÄDE & RINEHART 1986). Bld HrTH wird von Zellen der **Corpora cardiaca** gebildet, einem komplexen Organ, das hinter dem Gehirn und an der Öffnung des Dorsalgefäßes (Herz) liegt (s. Abb. 2) und sich vom Nervensystem ableitet (GERSCH 1964). Bei den Imagines weisen die Corpora cardiaca mindestens 3 Zelltypen auf, zu denen neuronale (extrinsische) und glanduläre (intrinsische) Zellen sowie Gliazellen zählen. Die neuronalen Zellen speichern und sezernieren Neuropeptide, die in den Somata (Zellkörper) neurosekretorischer Zellen (NSZ) synthetisiert wurden. Axone der NSZ aus dem medianen Teil des Gehirns (pars intercerebralis) sind zu den zwei nervi corporis cardiaci I (NCC I) zusammengefasst (s. Abb. 3), Axone aus den lateralen Bereichen zu den nervi corporis cardiaci II (NCC II). Bei Nerven enthalten neben neurosekretorischen auch "gewöhnliche" Axone.

Die neuronalen Zellen sind innerhalb der Corpora cardiaca häufig zu neuralen Speicherlappen zusammengefasst (PIPA 1978, HUBER *et al.* 1990). Grundlegend ist das System pars intercerebralis/Corpora cardiaca dem Hypothalamus/Hypophysen-System der Vertebraten in punkto Koordinierung von Nerven- und endokrinem System analog (HANSTRÖM 1953, GUPTA 1990).

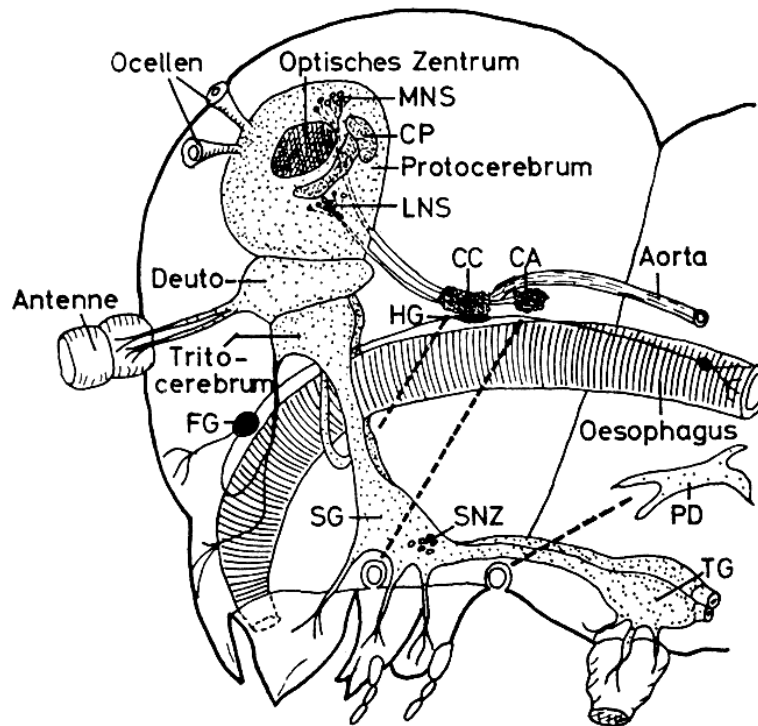


Abbildung 2: Nerven- und Hormonsystem im Insektenkopf (nach WEBER, JENKIN *et al.* in HANKE 1969).
 Abkürzungen: CA-Corpora allata, CC-Corpora cardiaca, CP-Corpora pedunculata, FG-Frontalganglion, HG-Hypocerebralganglion, LNS-laterale neurosekretorische Zellen, MNS-mediane neurosekretorische Zellen, PD-Prothoraxdrüse, SG-Unterschlundganglion, SNZ-neurosekretorische Zellen des Suboesophagalganglions, TG-Thorakalganglion.

Bei den glandulären Zellen liegen die Somata in den Corpora cardiaca verteilt. Immunhistochemische Untersuchungen und radioaktive Markierungen lassen vermuten, dass die hypotrehalosämischen Hormone (ebenso wie adipokinetische Hormone) in eben diesen glandulären Bereichen synthetisiert werden (SCHOONEVELD *et al.* 1986, gezeigt für Pea CAH-I/II; HEKIMI & O'SHEA 1987). Die Sekretion der Neuropeptide erfolgt wahrscheinlich nach einem vesikulären Mechanismus (ORCHARD 1983, ADAMS 1990).

Somit dienen die Corpora cardiaca als paarige Neurohämalogane der Synthese und Freisetzung eigener Neurohormone, sowie der Speicherung und Freisetzung von Neurohormonen neurosekretorischer Zellen des Gehirns (z.B. prothorakotropes Hormon/PTTH; BURROWS 1996). Entsprechend sind sie besonders reich an Neuropeptiden (ADAMS 1990).

Die Corpora cardiaca werden mit den neurosekretorischen Zellen des Gehirns zum cerebralen neurosekretorischen System zusammengefasst. Zusammen mit den Corpora allata, die epithelialen Ursprungs sind und mit denen sie über Nerven in Verbindung stehen (REINBOTH 1980), werden die Corpora cardiaca zum Retrocerebralkomplex zusammengefasst, dem wichtigsten Neurohämalsystem des Insektenkörpers.

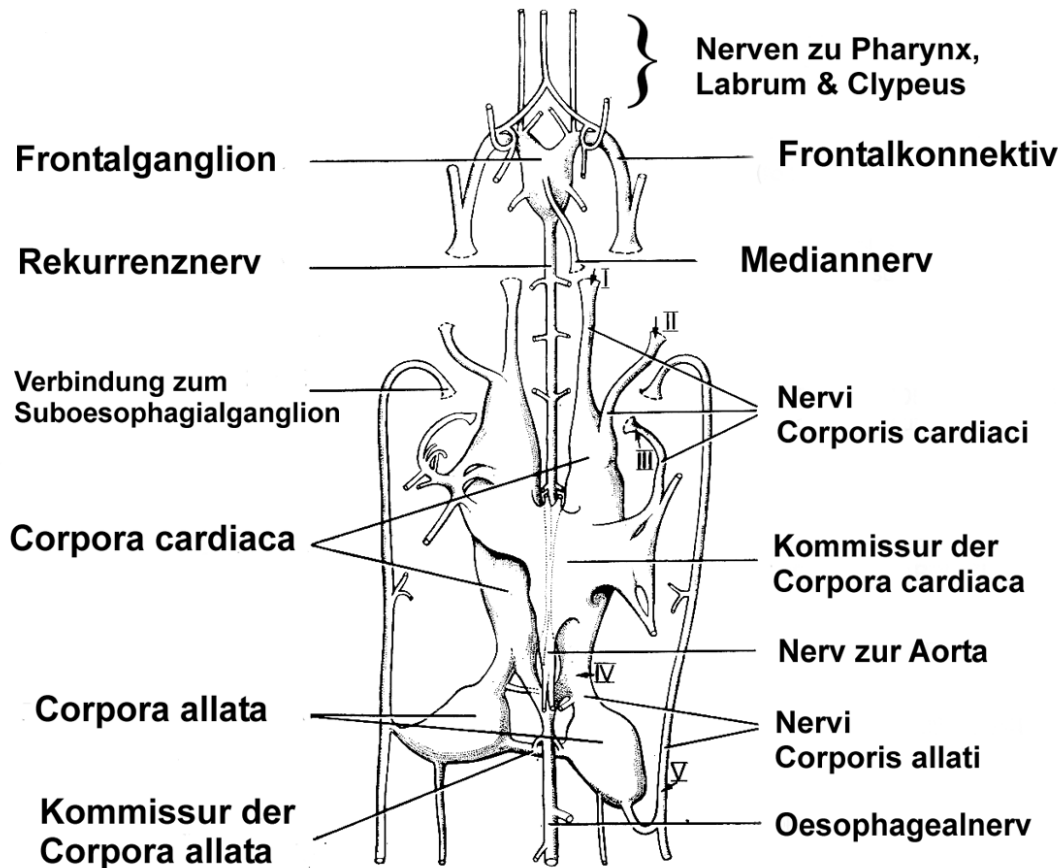


Abbildung 3: Dorsalansicht des anterioren Teils des stomatogastrischen Nervensystems von *Periplaneta americana* (nach WILLEY & CHAPMAN 1968).

Nach ihrer Sekretion durch die Corpora cardiaca gelangen die Neuropeptide über die Hämolymphe zu ihren Wirkorten. Über die Abschaltung des Neuropeptidsignals bei Insekten ist bisher allgemein noch wenig bekannt. Denkbar wäre zum Beispiel, dass das Neuropeptid sich nach einem bestimmten Zeitraum vom Rezeptor löst und wegdiffundiert, dass es durch Peptidasen gespalten wird (Proteolyse) oder dass spezifische Enzyme in den Zielgeweben für den Abbau zuständig sind.

Als Wirkort der hypertrehalosämischen und adipokinetischen Neuropeptide ist vor allem der **Fettkörper** (*Corpus adiposum*) zu nennen. Der Begriff Fettkörper geht auf anfängliche Studien der Insektenmorphologie zurück, bei der das Gewebe nach seinem hohen Fettgehalt benannt wurde.

Die Morphologie und detaillierte Funktion des Fettkörpers variiert je nach Insektengruppe und kann auch innerhalb einer Art abhängig vom Entwicklungsstadium oder Geschlecht variieren. Der Fettkörper kann aus einer lockeren Aggregation von Zellen bestehen, die ungleichmäßig in den Körpersegmenten (einschließlich der Kopfkapsel) verteilt sind oder eine kompakte Zellansammlung bilden. Das Gewebe steht meist in engem Kontakt mit wichtigen Organsystemen (Geschlechtsorgane, Verdauungssystem, Thoraxmuskulatur). Zum einem kann dies als Schutz der Organe vor mechanischen Schäden dienen, zum anderen wird der Stoffaustausch erleichtert. Generell steht der Fettkörper mit der Hämolymphe in Kontakt, wodurch ebenfalls der Stoffaustausch erleichtert wird.

Der Fettkörper der Schaben ist stark ausgeprägt und bildet sich aus der visceralen Wand des Cöloms (sekundäre Leibeshöhle). Besonders auffällig ist er im Abdomen. Morphologisch besteht er aus einer Vielzahl weißer Lappen, die die übrigen Organe umgeben. Aufgrund der gelappten Struktur ergibt sich eine große Oberfläche, die den Stoffaustausch mit der Hämolymphe erleichtert.

Der Fettkörper übernimmt bei Insekten eine Vielzahl von Funktionen und ist in seiner metabolischen Rolle analog zu Leber und weißem Fettgewebe der Vertebraten (KEELEY 1990). Zu seinen Aufgaben zählen vor allem die Synthese und Speicherung von Fetten, Proteinen und Kohlenhydraten (insbesondere zur Produktion von Geschlechtszellen, Überwinterung oder als Hauptsubstratquelle während des Fluges). Dementsprechend variiert die Größe des Fettkörpers mit Menge und Art der zur Verfügung stehenden Nahrung (CORNWALL 1968). Außerdem fungiert der Fettkörper als Hauptorgan des Intermediärstoffwechsels und übernimmt die Speicherung von Exkreten (Harnsäure, siehe unten; KEELEY 1990).

Der Fettkörper setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen, wobei die genaue Zusammensetzung von der jeweiligen Schabenart abhängig ist. Als die am häufigsten auftretenden Zelltypen sind Trophocyten, Mycetocyten und Uratzellen zu nennen (s. Abb. 4).

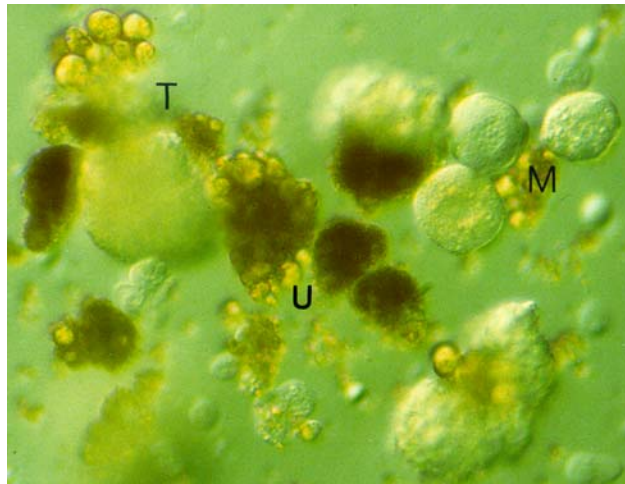


Abbildung 4: Trophocyten (T), Mycetocyten (M) und Uratzellen (U) aus der Sedimentfraktion der Trophocyten-Isolierung aus dem Fettkörpergewebe der Argentinischen Schabe *Blaptica dubia*. (DIC-Aufnahme (Differentieller Interferenzkontrast) an einem Axioplan Mikroskop (CARL ZEISS JENA) mit OLYPUS OM4 Ti-Kamera; Endvergrößerung: 225-fach).

1. Trophocyten (Adipocyten), die typischen Fettkörperzellen, bilden den Hauptanteil der Zellen des Fettkörpers. Sie sind bei allen Schabenarten anzutreffen und vergleichsweise groß (30-50 μm), wobei die Größe mit dem Alter zunimmt (CORNWELL 1968). Trophocyten sind verantwortlich für die Trehaloseproduktion (siehe unten, CANDY & KILBY 1959), sowie für die Synthese und Speicherung von Fetten, Glykogen und Proteinen. Triglyceride werden in Form ölartiger Tröpfchen im Cytoplasma gespeichert, wodurch Trophocyten leicht von den anderen Zelltypen des Fettkörpers unterschieden werden können (s. Abb. 5). Da bei bestimmten Insekten (*Aleyrodes*, Homoptera) Adipocyten auftreten, die frei in der Hämolymphe zirkulieren, vermuten einige Forscher, dass Adipocyten mit Hämocyten verwandt sind.

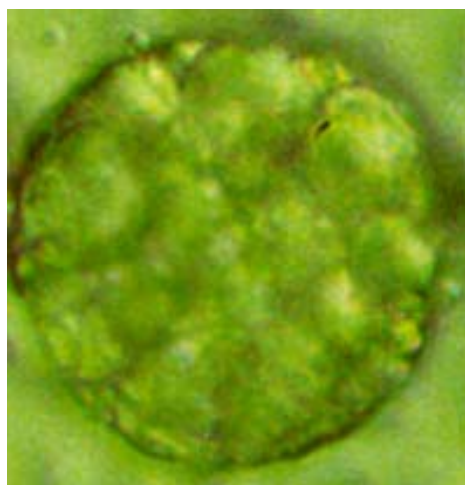


Abbildung 5: Trophocyte - gut zu erkennen ist das Muster der gespeicherten Fetttröpfchen. (DIC-Aufnahme (Differentieller Interferenzkontrast) an einem Axioplan Mikroskop (CARL ZEISS JENA) mit OLYPUS OM4 Ti-Kamera; Ausschnittsvergrößerung ca. 1470-fach).

2. Mycetocyten sind kleiner als die Trophocyten (ca. 25 µm) und enthalten stäbchenförmige symbiontische Mikroorganismen (Bakterioide), die insbesondere für die normale Entwicklung (Körpergröße, Entwicklungsdauer, Überlebensrate) der Schaben (BROOKS 1955, GUTHRIE 1968), sowie für die reproduktive Kapazität der Adulttiere wichtig zu sein scheinen (RICHARDS 1958). Studien zeigen, dass die Symbionten zur Synthese von Aminosäuren (HENRY & BLOCK 1962) und Vitaminen (Ascorbinsäure, Folsäure, Pantothersäure; GALLAGHER 1962, STANLEY & BEDICK 1997) beitragen. Man vermutet, dass es in der frühen Entwicklungsgeschichte der Schaben zu einer Infektion mit einem Bakterium kam, woraus sich eine endosymbiontische Beziehung entwickelte (BANDI *et al.* 1997).

3. Uratzellen haben etwa dieselbe Größe wie Mycetocyten und besitzen wie diese ein fein granuliertes Cytoplasma. Um die Anhäufung stickstoffhaltiger Abbauprodukte von Nucleinsäuren und Proteinen zu verhindern, muß der Organismus sich der toxischen Produkte entledigen. Das Hauptorgan des Stickstoffstoffwechsels ist der Fettkörper (STANLEY & BEDICK 1997).

Stickstoff kann von Schaben (wie auch von Vögeln, Reptilien und anderen terrestrischen Arthropoden) in Harnsäure umgewandelt werden (uricotelische Tiere). Die schwer lösliche Harnsäure bietet sich im Gegensatz zu Harnstoff und Ammoniak an, da Schaben terrestrisch und vielfach in Regionen mit geringem Wasserangebot leben, so dass für die Exkretion keine größeren Wassermengen verfügbar sind. Da Harnsäure (im Gegensatz zu Harnstoff) nicht in einer großen Menge Wasser gelöst vorliegt, kann zudem Gewicht eingespart werden, was insbesondere beim Flug von Vorteil ist. Der primäre, leistungsfähigste Exkretionskomplex der Insekten sind die zwischen Mittel- und Enddarm gelegenen Malpighischen Gefäße und das Rektum (STANLEY & BEDICK 1997). Die Wandzellen der Malpighischen Gefäße nehmen die N-Exkretstoffe aus der Hämolymphe auf (HEITLAND 2001). Der Primärharn kann dann letztlich entweder über den Enddarm abgegeben werden, wo zusätzliche Rückresorption von Ionen und Wasser stattfinden kann, oder die Harnsäure wird von Zellen des Fettkörpers aufgenommen, in kristalliner Form (Uratkristalle) gespeichert und im Verlaufe des Lebens akkumuliert (Exkretspeicherung; CORNWELL 1968). Die Speicherung erfolgt entweder in gewöhnlichen Fettkörperzellen (z.B. Moskito *Culex*) oder in spezialisierten Fettkörperzellen, den Uratzellen (STANLEY & BEDICK 1997), die jedoch nur bei wenigen Insektenarten auftreten (z.B. *Blaptica dubia*, *Periplaneta americana*, *Apis mellifera*). Wie man anhand dieser Beispiele sieht, ist Exkretion nicht immer gleichbedeutend mit Ausscheidung aus dem Körper. Unlösliche Exkretsubstanzen können auch durch Ablagerung aus dem Stoffwechsel entfernt werden. Studien von KELLER (1950) deuten darauf hin, dass die Endosymbionten in den Mycetocyten in der Lage sind, den in der Harnsäure

festgelegten Stickstoff zu mobilisieren und selbst zu verwenden und dass außerdem bei Nahrungsmangel die Harnsäure von den Wirtstieren genutzt werden kann. Demnach würde die gespeicherte Harnsäure auch als Stickstoffspeicher dienen.

Der vorherrschende Blutzucker der meisten Insekten ist nicht die von allen Organismen direkt nutzbare und bei vielen Tieren als einziger Blutzucker verwendete Glucose, sondern **Trehalose**. Durchschnittlich beträgt die Trehalosekonzentrationen in der Hämolymphe der Insekten 5-20 mg/ml (DETTNER & PETERS 1999), bei *Blaberus discoidalis* 9 mg/ml (24 mM, LEE & KEELEY 1994b) und bei *Periplaneta americana* 30-40 mM (SEVALA & STEELE 1989). Im Vergleich dazu beträgt die Blutzuckerkonzentration beim Menschen durchschnittlich nur etwa 1 mg/ml (5,5 mM). Damit stellt die Trehalose bei Insekten bis zu 90 % der in der Hämolymphe auftretenden Kohlenhydrate (HOWDEN & KILBY 1956, Heuschrecken). Glucose (0,2-1 mg/ml) und Fructose kommen hingegen meist nur in Spuren vor (Ausnahme: z.B. Honigbiene *Apis mellifera*, deren Blutzucker Glucose ist; STANLEY & BEDICK 1997). Die Trehalosekonzentration kann je nach Lebensstadium variieren, wird jedoch stets reguliert.

Außer bei Insekten tritt die Trehalose noch bei Pilzen, Algen und bei verschiedenen Invertebraten-Stämmen auf, wird aber von Vertebraten und Blütenpflanzen nicht synthetisiert. Seinen Namen erhielt dieses Kohlenhydrat im Jahr 1858 von dem französischen Chemiker Berthelot, der es in „*Trehala*“ fand, einer Art Manna (s. Fußnote), das in den Wüsten Kleinasiens von dem Rüsselkäfer *Larinus nidificans* produziert wird. Trehalose ist ein Disaccharid, das aus zwei α , α -verknüpften Glucose-Monomeren aufgebaut ist (s. Abb. 6).

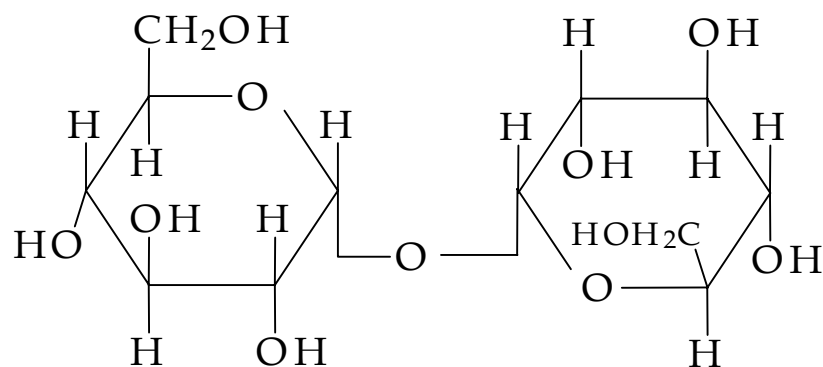


Abbildung 6: Haworth-Formel der Trehalose (α -Glucosido- α -glucosid, α -D-Glucopyranosyl- α -D-Glucopyranosid).

Manna: Der Begriff Manna stammt aus dem hebräischen, griechischen und lateinischen und wurde im Alten Testament zur Bezeichnung des vom Himmel gefallenen Brotes bei der Wüstenwanderung Israels verwendet. Heutzutage bezeichnet man mit dem Begriff unerwartet zur Verfügung stehende essbare Stoffe wie z.B. den Saft der Mannaesche.

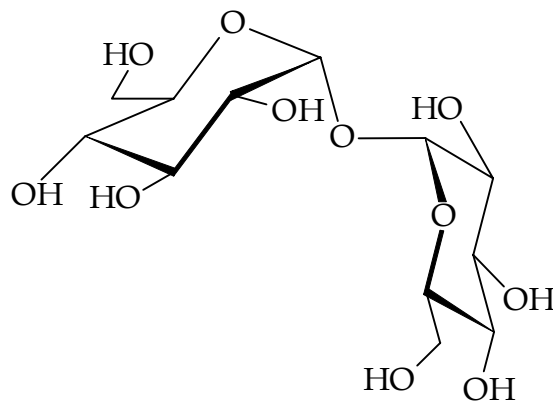


Abbildung 7: Stereoformel der Trehalose.

Trehalose dient in der Hämolymphe als Energieträger (Quelle für Glucosylreste) für Muskulatur und andere Gewebe. Trehalose anstelle von Glucose als Blutzucker hat folgende Vorteile:

- Da die zwei Glucose-Moleküle über die beiden halbacetalischen OH-Gruppen verbunden sind (α, α -Verknüpfung), ist die Trehalose *nichtreduzierend* und somit weitaus *weniger reaktiv* als Glucose. Glucose kann nicht-enzymatisch Proteine glykosylieren (z.B. zirkulierende Proteine wie Hämoglobin und Serumalbumin, Gewebs- und Strukturproteine, Myelin, Enzyme, Hormone) und zu Veränderungen der Konformation, Ligandenbindung und Funktion führen (COHEN 1986). Diese Prozesse finden unausweichlich statt, können jedoch bei Hyperglykämie zu schweren chronischen Schäden führen. Bei der nicht-enzymatischen Glykosylierung handelt es sich um eine bimolekulare Kondensationsreaktion (s. Abb. 8) zwischen der Aldehydgruppe eines Zuckers und den freien Aminogruppen von Proteinen, die entweder am N-Terminus oder an Lysinresten auftreten. Wichtig wird dieser Prozess bei der Stoffwechselstörung Diabetes mellitus, die zu einer der häufigsten Todesursachen in Industrieländern zählt. Durch unzureichende Sekretion von Insulin (Typ I/insulinabhängiger/juveniler Diabetes: verursacht durch Defekt oder Fehlen der β -Zellen des Pankreas durch Autoimmunreaktion) bzw. dessen unzureichende Stimulierung der Zielzellen (Typ II/nicht-insulinabhängiger/Erwachsenen-Diabetes: Insulinresistenz) kommt es bei Diabetes zu einem Anstieg der Glucosekonzentration im Blut, da ohne Insulin die Aufnahme der Blutglucose durch Muskel- und Fettzellen nicht verstärkt wird. Zellen, die Glucose insulinunabhängig aufnehmen (Nerven- und Nierenzellen, Auge) reichern hingegen Glucose übermäßig an.

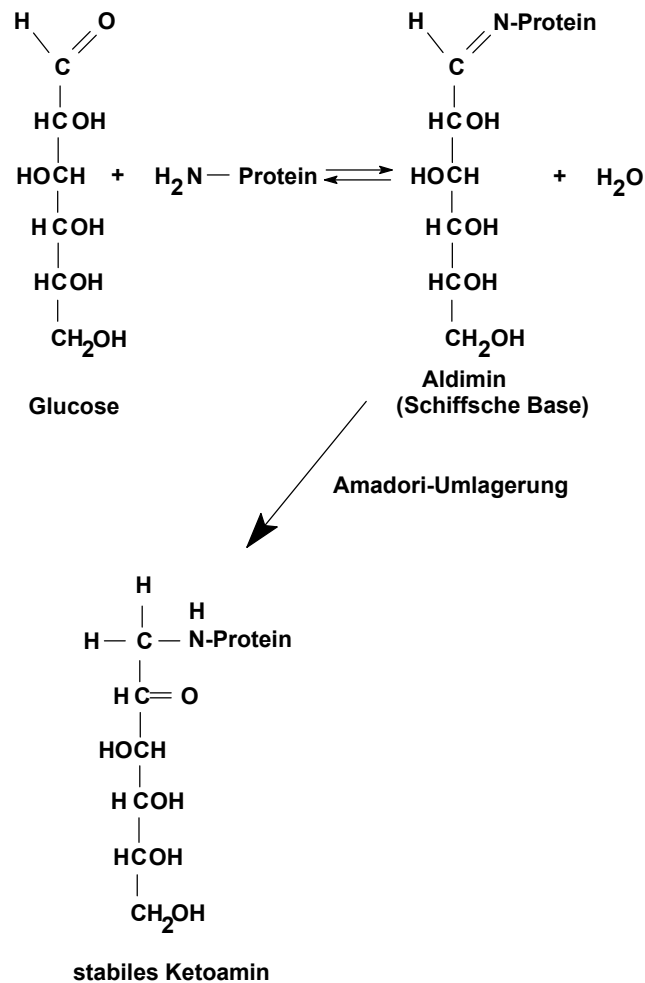


Abbildung 8: Nicht-enzymatische Glykosylierung von Proteinen.

Zu den Folgen langanhaltender Hyperglykämie und daraus resultierender Makro- sowie Mikroangiopathie, zählen neben Schäden des Nerven-, Muskel- und des Gefäßsystems auch Einschränkungen der Nierenfunktion sowie Erblindung und verstärkte Atherosklerose (KLINKE 1994). Die nicht-enzymatische Glykosylierung wird derzeit als wesentliche Ursache für die bei Diabetespatienten auftretenden chronischen Spätschäden wie diabetische Neuropathie, Retinopathie und Mikrovaskulärerkrankungen angesehen. Mit Trehalose als Blutzucker können diese Komplikationen nicht auftreten.

- Des Weiteren ist Trehalose, in Relation zum Energieinhalt, *osmotisch weniger wirksam* als Glucose. Tatsächlich sind in der Hämolymphe von Insekten hohe Konzentrationen von bis zu 50-60 mM (bis 2 Gewichtsprozent, FRIEDMAN 1985) festzustellen. Im Gegensatz dazu beträgt die Glucosekonzentration im Blut des Menschen nur ca. 5,5 mM (0,1 Gewichtsprozent).

- Wegen der geringen Glucosekonzentration in der Hämolymphe besteht ein *Konzentrationsgradient zwischen Hämolymphe und Verdauungssystem*, der die passive Glucoseaufnahme aus dem Verdauungstrakt begünstigt (TREHERNE 1967).

Die hohe Trehalosekonzentration in der Hämolymphe ist für Insekten sehr bedeutend, da diese Tiere ein offenes Kreislaufsystem besitzen. Da bei Insekten das Tracheensystem sehr effizient den Gasaustausch übernimmt, konnte das Blutgefäßsystem stark reduziert werden (offener Kreislauf). Die Organe werden nicht durch Kapillaren versorgt, sondern von der Hämolymphe umspült. Im Gegensatz zum geschlossenen Blutkreislauf entstehen durch die Kontraktion des Herzens keine nennenswerten Druckdifferenzen (kleine Blutdruckamplitude), jedoch kommt es auch nicht zu einem kontinuierlichen Blutstrom. Für den Transport erfordert der offene Kreislauf weniger Energie, ist jedoch auch weniger effizient, die Verteilung erfolgt weniger gezielt und ist vergleichsweise langsam.

Die Trehalosekonzentration in der Hämolymphe der Schaben wird neuroendocrin durch hypertrehalosämische Hormone gesteigert. Sinkt die Konzentration, beispielsweise bei starkem Verbrauch oder Nahrungsmangel, dann stimulieren hypertrehalosämische Hormone die Synthese (und Sekretion) von Trehalose. Diese erfolgt vermutlich ausschließlich in den Trophocyten des Fettkörpers (KEELEY 1990). Die neu synthetisierte Trehalose wird in die Hämolymphe abgegeben. Der Fettkörper selbst enthält intrazellulär keine signifikanten Mengen an Trehalose (STEELE & HALL 1985), so dass es nicht zu einer intrazellulären Rückkopplungshemmung kommt. Die Bausteine für die Synthese (s. Abb. 9) stammen vor allem aus dem Abbau des im Fettkörper gespeicherten Glykogens (Glykogenolyse). Hypertrehalosämische Hormone aktivieren die Glykogenphosphorylase, so dass der im Fettkörper für die Trehalosesynthese zur Verfügung stehende Gehalt an Vorstufen erhöht und die Trehalosesynthese stimuliert wird (ORR *et al.* 1985). Durch das Enzym Trehalose-6-phosphat-Synthase (EC 2.4.1.15) wird aus Glucose-6-phosphat und UDP-Glucose zunächst Trehalose-6-phosphat synthetisiert. Dieses wird dann mittels Trehalose-6-phosphatase (EC 3.1.3.12) zu Trehalose dephosphoryliert (CANDY & KILBY 1959). Die für die Syntheseprozesse notwendige freie Energie stammt vorrangig aus der Fettsäureoxidation (MCDUGALL & STEELE 1988).

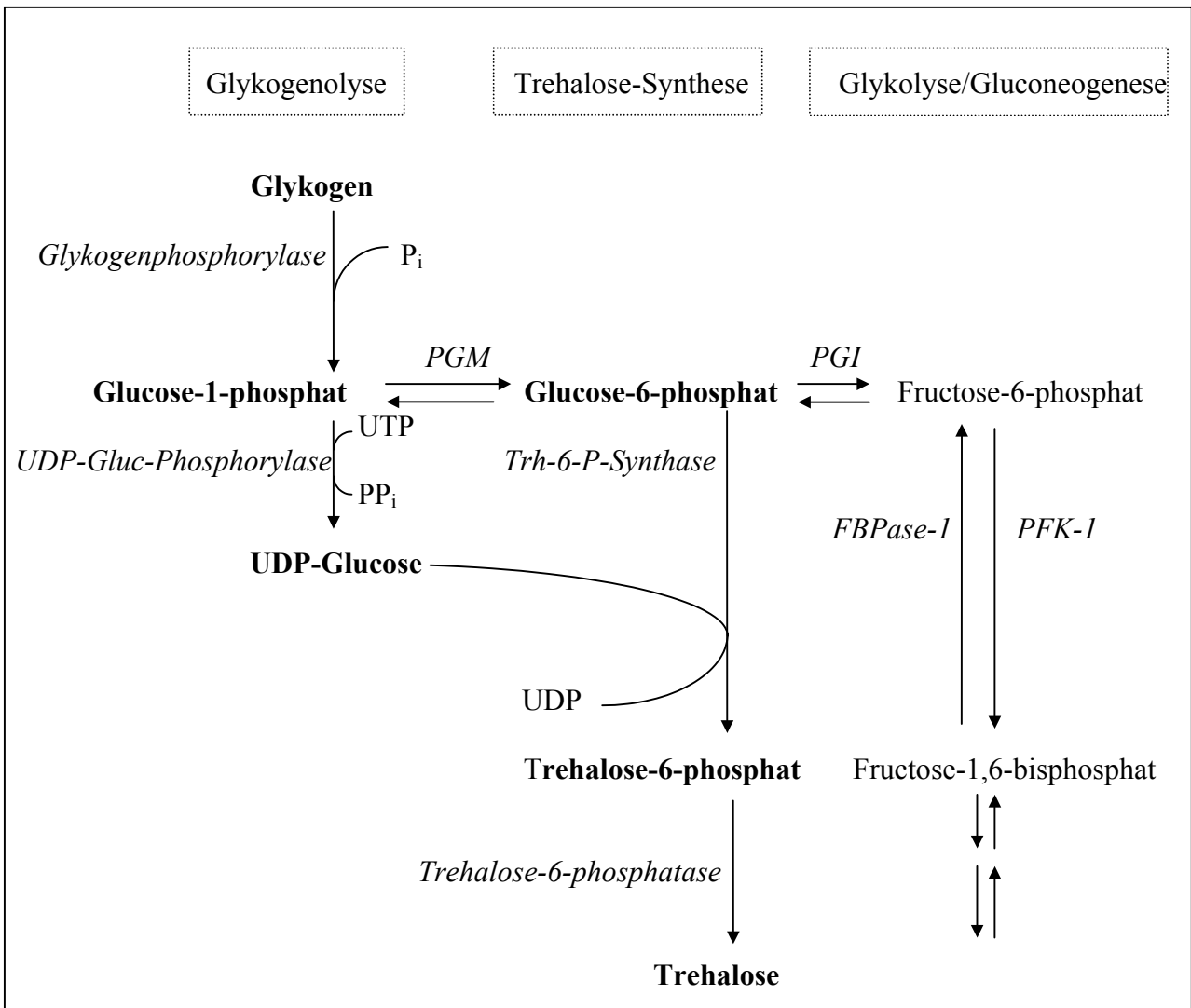
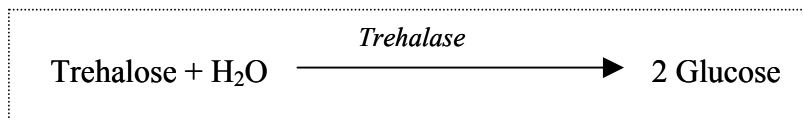


Abbildung 9: Übersicht über die Trehalose-Synthese im Fettkörper von Schaben.

(PGI: Phosphoglucoisomerase, PGM: Phosphoglucomutase, P_i : anorganisches Phosphat, PP_i : anorganisches Pyrophosphat, PFK-1: Phosphofruktokinase 1, FBPase-1: Fructose-1,6-bisphosphatase 2).

Trehalose wird an den Orten des Verbrauches durch das Enzym Trehalase (EC 3.2.1.28) hydrolytisch zu Glucose abgebaut:



Der Syntheseweg der Trehalose ist seit den fünfziger Jahren bekannt, aber über die Regulationsmechanismen und die Signaltransduktion der beteiligten Neuropeptide weiß man noch wenig. Noch nicht genau geklärt ist beispielsweise, wie die Drosselung der Glykolyse erfolgt (MCDUGALL & STEELE 1988), die notwendig ist um zu verhindern, dass die aus der Glykogenolyse stammenden Glucosebausteine im Fettkörper selbst abgebaut werden. Ebenso

unklar ist (KEELEY 1990), ob die hypertrehalosämischen Hormone direkt auf die eigentliche Trehalosesynthese Einfluß nehmen und ob sie die Permeabilität der Trophocyten (z.B. Influx von Vorstufen und Glucose, Efflux von Trehalose) beeinflussen.

Versuche zur hormonellen Regulation der Blutzuckerspiegels bei Insekten wurden zunächst am ganzen Tier und dann an isolierten Fettkörpern durchgeführt. Das Ziel meiner Untersuchungen war, eine neue Methode zu etablieren, bei der Versuche mit isolierten Trophocyten von *Blaptica dubia* durchgeführt werden können. Derartige Versuche bieten gegenüber solchen an vollständigen Fettkörpern entscheidende Vorteile:

- Das Zellmaterial ist besser vergleichbar, da Zellen mehrerer Fettkörper gemischt werden, so dass die individuelle Variabilität weitgehend ausgeschlossen werden kann. Dies ist von großem Vorteil bei der statistischen Auswertung.
- Die Zellen sprechen sensitiver auf die Tests an, da Diffusionsbarrieren entfallen.
- Andere Zelltypen des Fettkörpers (z.B. Mycetocyten, Uratzellen), welche nicht direkt an der Trehalosesynthese beteiligt sind, werden ausgeschlossen, so dass die Untersuchungen insgesamt spezifischer sind.
- Es werden weniger Versuchstiere benötigt.

Nach Etablierung des Verfahrens sollten zunächst die wichtigsten Inkubationsversuche, die zuvor mit Fettkörpern durchgeführt worden waren, an isolierten Trophocyten wiederholt werden, um die Ergebnisse vergleichen und das neue Separierungsverfahren bewerten zu können.

Derzeit richtet sich das Hauptaugenmerk der Untersuchungen über hypertrehalosämische Hormone auf die Signaltransduktion. Aufgrund deutlicher Parallelen zwischen hypertrehalosämischen Hormonen und Glukagon (für detailliertere Information s. Diskussion) wurde zunächst überprüft, ob auch ähnliche Signaltransduktionswege (über G-Potein und cAMP) vorliegen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass exogenes cAMP die Glykogen-Phosphorylase des Fettkörpers von Schaben (*Periplaneta americana*) aktiviert (STEELE 1964) und dass bei Inkubation des Fettkörpers mit einem Extrakt der Corpora cardiaca die Adenylatcyclase des Fettkörpers aktiviert und dementsprechend der cAMP-Gehalt erhöht wird (HANAOKA & TAKHASHI 1976, 1977; GÄDE 1977). Allerdings belegten weiterführende Studien (ORR *et al.* 1985), dass reines hypertrehalosämisches Hormon im Fettkörper von Schaben nicht die Bildung von cAMP stimuliert. Auch konnte gezeigt werden, dass cAMP (oder Analoga) die Trehalosesynthese nicht stimulieren (STEELE *et al.* 1988). Dies würde bedeuten, dass das Insektenhormon über einen anderen Weg der Signaltransduktion wirkt als Glukagon.

Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass Ca^{2+} -Ionen bei der endokrinen Regulation der Trehalosesynthese und insbesondere bei der Signaltransduktion hypertrehalosämischer Hormone eine bedeutende Rolle zukommt (ORR *et al.* 1985, MCCLURE & STEELE 1981, STEELE & PAUL 1985). Eine maximale Steigerung der Trehalosesynthese im Fettkörper durch hypertrehalosämische Hormone ist nur in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} möglich. Dementsprechend wurde insbesondere die Rolle von Ca^{2+} -Ionen im Rahmen dieser Arbeit eingehend studiert. Neben Inkubationsversuchen mit Fettkörpern und isolierten Trophocyten sollte die Wirkung des hypertrehalosämischen Hormons auf den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt mit Hilfe eines Ca^{2+} -spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes (Fura-2) an Einzelzellen untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war es, mehr über die Regulation der Glykolyse durch hypertrehalosämische Hormone zu erfahren. Dieses Thema wurde in den letzten Jahren sehr kontrovers diskutiert (BECKER *et al.* 1996). Trehalogenese und Glykolyse konkurrieren um die aus der Glykogenolyse stammenden Glucosephosphate, was eine Drosselung der Glykolyse notwendig macht. Bei Vertebraten gilt die PFK als das Schlüsselenzym der Glykolyse und die Regulation kann über den stärksten bisher bekannten Aktivator, Fructose-2,6-bisphosphat, erfolgen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Fructose-2,6-bisphosphat auch ein potenter Aktivator der PFK des Schabenfettkörpers ist (BECKER *et al.* 1996) und dass hypertrehalosämische Hormone den Gehalt an Fructose-2,6-bisphosphat im Schabenfettkörper erniedrigen (BECKER & WEGENER 1998).

Schließlich sollte auch die Wirkung von Nahrungsmangel auf Gewicht, Metabolite des Fettkörpers und Endosymbionten untersucht werden. Grundsätzlich handelt es sich bei Schaben um Allesfresser (omnivore Aasfresser), die sich jedoch bevorzugt von abgestorbenem Pflanzenmaterial ernähren und dementsprechend Kohlenhydrate gegenüber Fetten oder Proteinen bevorzugen (CORNWELL 1968). Sie können außergewöhnlich lange ohne Nahrung überleben, artabhängig bis zu 90 Tage (Weibchen von *Periplaneta americana*, WILLIS & LEWIS 1957). Die Überlebensfähigkeit bei Nahrungsmangel ist eine der Ursachen, die die weltweite Verbreitung der Schaben ermöglichte, da die Tiere auch ohne Nahrung lange Reisen überstehen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 DIE ARGENTINISCHE SCHABE (*BLAPTICA DUBIA*)

Die Ordnung der *Blattariae* (Schaben) läßt sich in mehrere Familien mit mehr als 3500 bekannten Arten (FLINDT 1988) unterteilen:

Reich:	Tierreich / <i>Animalia</i>
Unterreich:	Vielzeller / <i>Metazoa</i> <i>Bilateria</i> / <i>Coelomata</i>
Reihe:	<i>Protostomia</i>
Stamm:	Gliedertiere / <i>Articulata</i> Gliederfüßler / <i>Arthropoda</i>
Klasse:	Insekten / <i>Insecta</i> / <i>Hexapoda</i>
Unterklasse:	Fluginsekten / <i>Pterygota</i> (gr.: pterygotós – geflügelt)
Unterklasse:	Hemimetabola
Überordnung:	Schabenverwandte / <i>Blattia</i> / <i>Blattopteroidea</i> : <i>Mantodea</i> (Fangschrecken) & <i>Blattodea</i> (Schaben & Termiten)
Ordnung:	Schaben / <i>Blattariae</i>
Gruppe:	Palaeoblattaria
Familien:	<i>Archimylacridae</i> <i>Mylacridae</i> <i>Pseudomylacridae</i> <i>Pteridomylacridae</i> <i>Idiomylacridae</i> <i>Neomylacridae</i> <i>Spiloblattinidae</i>
Gruppe:	Neoblattaria
Überfamilie:	Mesoblattoidea
Familien:	<i>Poroblattinidae</i> <i>Neothroblattinidae</i> <i>Proteremidae</i> <i>Diechoblattinidae</i> <i>Mesoblattinidae</i>
Überfamilie:	Blattoidea
Familien:	<i>Blattidae</i> (z.B. <i>Blatta orientalis</i> , <i>Periplaneta americana</i>) <i>Cryptoceridae</i>
Überfamilie:	Blaberoidea
Familien:	<i>Blaberidae</i> (z.B. <i>Blaberus discoidalis</i> , <i>Blaptica dubia</i>) <i>Blattellidae</i> (z.B. <i>Blatella germanica</i>) <i>Ectobiidae</i> (z.B. Waldschabe) <i>Nocticolidae</i> <i>Polyphagidae</i>

Abbildung 10: Systematische Einordnung der Schaben im Tierreich (nach GUTHRIE *et al.* 1968, HONOMICHL & BELLMANN 1996).

Zwar sind Schaben mittlerweile infolge der Globalisierung weltweit verbreitet, jedoch bevorzugen sie ursprünglich Regionen mit warmem bis tropischem Klima (z.B. Südamerika). Im deutschen Raum treten nur 12 Arten auf (FLINDT 1988), von denen zudem einige eingeschleppt wurden, so auch die sogenannte Deutsche Schabe (*Blatella germanica*).

Da Schaben grundsätzlich feucht-warme, dunkle Orte aufsuchen, treten sie in den gemäßigten und kälteren Erdzonen bevorzugt in Wohnungen, Bäckereien oder Großküchen auf. Dort ernähren sie sich unter anderem von nicht ausreichend verpackten Nahrungsmitteln und verunreinigen diese häufig mit Kot und Exuvien (bei Häutung abgestoßene Körperhülle; lat.: *exuviae* - leere Hülle), so dass sie als Vorratsschädlinge berüchtigt sind. Zudem werden sie von faulenden Stoffen angezogen und können über die Exkremete oder die Haftpolster an ihren Füßen Krankheits- und Fäulniserreger, sowie Schimmelpilze und somit Krankheiten wie Gastroenteritis, Lebensmittelvergiftung oder Diarrhöe fördern. Ein weiteres Ärgernis sind die unangenehm riechenden Sekrete, die von ihnen ausgeschieden werden und auf die auch ihr Ordnungsname zurückzuführen ist. *Blattaria* stammt von dem lateinischen Begriff *blatta* ab, der soviel wie "ein stinkendes Insekt" bedeutet. Bei vielen Menschen löst außerdem der Staub, der bei der Häutung der Tiere entsteht, Allergien aus.

Gleichwohl sind die meisten Schabenarten nicht in von Menschen stark bewohnten Gegenden beheimatet. Nur etwa 25-30 aller Arten (also weniger als 1 %) werden im wissenschaftlichen Sinn als Schädlinge angesehen, während die in den Tropen auftretenden Arten einen wichtigen Bestandteil des Ökosystems darstellen.

Der überwiegende Anteil der Schabenarten lebt am Boden unter Laub und Steinen, einige bauen jedoch Höhlen und Erdlöcher oder bohren Gänge in Holz. Andere sind semi-aquatisch oder leben in den Nestern staatenbildender Insekten (*Attaphila fungicola*; lebt in Nordamerika in den Nestern von Blattschneiderameisen und ernährt sich von den dort gezüchteten Pilzen).

Der Schabenkörper ist von hellbraun bis schwärzlicher Färbung, meist oval und als Anpassung an das bevorzugte Leben in Ritzen und Spalten dorsoventral stark abgeflacht (s. Abb. 11).



Abbildung 11: Adultes Männchen der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*) in Seitenansicht. Deutlich zu sehen ist der dorsoventral abgeflachte Bau des Körpers.

Die Körperlänge variiert zwischen 4 mm (*Attaphila fungicola*) und 11 cm (Totenkopfschabe, *Blaberus cranifer*). Ein großer Halsschild schützt den Kopf (siehe Abb. 12), der mit beißend-kauenden Mundwerkzeugen und einfachen, langen Antennen ausgestattet ist.



Abbildung 12: Adultes Männchen der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*) in Frontalansicht.

Grundsätzlich weisen Schaben 2 unterschiedliche Flügelpaare auf, wobei die lederartigen Deckflügel die häutigen Hinterflügel schützen. Selbst flugfähige Arten fliegen jedoch gewöhnlich nur ungern. Bei den Weibchen sind die Flügel oftmals nur noch rudimentär vorhanden. Stattdessen sind Schaben mit ihren 6 gleichartigen, langen und muskulären Schreitbeinen überaus flinke Läufer.

Als dämmerungs- oder nachtaktive Tiere bleiben Schaben tagsüber überwiegend in ihren Schlupfwinkeln verborgen, wo sie ca. $\frac{3}{4}$ ihres Lebens verbringen. Die Tiere sind sehr lichtscheu und ihre Augen eher untergeordnete Sinnesorgane. Wichtige Sinnesorgane sind hingegen die

Fühler. Sie tragen, ebenso wie die Schienen der Beine, besondere Sinnesorgane auf der Körperoberfläche, sogenannte *Subgenualorgane*. Diese nehmen feinste Erschütterungen wahr, die die Tiere sofort zur Flucht veranlassen und stellen, in Anbetracht der nachtaktiven Lebensweise, die wichtigsten Sinnesorgane der Schaben dar.

Bezüglich ihrer Ernährung sind Schaben als außerordentlich genügsame Allesfresser (*Omnivoren*) bekannt. Da sie jedoch von Vorfahren abstammen, die sich hauptsächlich von Pflanzenmaterial (*phytophag*) ernährten, bevorzugen sie meist Kohlenhydrate gegenüber Proteinen und Fetten. In Extremsituationen können sie sich aber sogar von Tapetenkleister, stärkehaltigen Farben oder Seifen ernähren. Die Nahrung wird mit den beißend-kauenden Mundwerkzeugen und den Zähnen des Kaumagens zerkleinert.

Die Atmung erfolgt, wie bei *Tracheaten* (Insekten und Tausendfüßler) üblich, mit Hilfe von Einstülpungen der Körperhaut, den *Tracheen* (Atemröhren; gr.: *tracheía* – die Raue). Sie münden auf der Körperoberfläche an den Seiten der Hinterleibssegmente als *Stigmen* (Atemöffnungen, je 2 pro Segment; gr.: *to stigma* - der Stich, Malzeichen). Die Stigmen weisen oftmals mit Reusen versehene Vorhöfe oder Schließvorrichtungen auf, welche das Eindringen von Schmutzpartikeln in das Tracheensystem verhindern sollen bzw. eine Regulation des Gastransportes ermöglichen. Im Körperinneren verzweigen sich die Tracheen und bilden durch Längs- und Querverzweigungen ein kompliziertes Röhrensystem. Besonders ausgeprägt sind die Verzweigungen in Körperregionen mit hohem Sauerstoffverbrauch. Die Tracheenstämme sind ektodermaler Herkunft und innen mit einer cuticularen Intima ausgekleidet. Spiralförmige Verdickungen der Intima verhindern ein Kollabieren der Äste, die als sehr dünnwandige Endverzweigungen (*Tracheolen*) schließlich zu den Organen führen. Die Tracheolen enden als Tracheenendzellen, treten mit den Körperzellen in Kontakt und versorgen sie durch Gasaustausch äußerst effektiv mit Sauerstoff. Der Gastransport erfolgt primär durch einfache Diffusion, wobei jedoch bei vielen adulten Insekten zusätzlich eine Ventilation der größeren Tracheenstämme durch Bewegungen des Abdomens und Schließbewegungen der Stigmen erfolgt. Da die durch Diffusion transportierte Sauerstoffmenge unter anderem von der Diffusionsstrecke abhängt, ist der Körpergröße von Insekten durch das Respirationssystem (ebenso wie durch die Cuticula) eine obere Grenze gesetzt. Das Kohlendioxid wird teilweise über das Tracheensystem, teilweise über die Körperoberfläche abgegeben. Die Hämolymphe hingegen spielt beim Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid eine untergeordnete Rolle.

Die Fortpflanzung der Schaben erfolgt fast immer zweigeschlechtlich (Parthenogenese/ungeschlechtliche Fortpflanzung wurde bei der Surinamschabe *Pygocelis surinamensis* nachgewiesen). Die Eier werden in einer vom Weibchen gebildeten derben Eikapsel

(Eikokon, *Oothek*) abgelegt, die dem Schutz der Eier dient und eine artspezifische Form aufweist. Zu diesem Zweck werden die Eier im Genitalraum des Weibchens in eine schnell erhärtende Substanz eingebettet, die von Anhangsdrüsen ausgeschieden wird. In manchen Fällen wird das Eipaket vom Weibchen noch eine Weile aus der Geschlechtsöffnung herausragend herumgetragen oder vor Feinden getarnt. Eine Oothek enthält durchschnittlich 14-36 Eier. Insgesamt ist die Anzahl der Nachkommen recht hoch (200-1000 Eier pro Weibchen bei *Periplaneta americana*; FLINDT 1988)



Abbildung 13: Typische Oothek der Blattodea (© TU München) und Querschnitt durch eine Oothek.

Schaben sind *hemimetabole* Insekten (unvollkommene Verwandlung; gr.: *he metabole* - die Verwandlung), deren Larven sich nach dem Durchlaufen mehrerer Entwicklungsstadien ohne Puppenstadium zu adulten Tieren entwickeln. Die Entwicklungsdauer bis zur letzten Häutung ist bei der von uns gezüchteten Art *Blaptica dubia* temperaturabhängig und beträgt durchschnittlich zwischen 6 Wochen und 6 Monaten. 2-6 Wochen nach der Adulthäutung werden die Tiere geschlechtsreif.

Im Fettkörper der Schaben finden sich Endosymbionten. Es handelt sich um Bakterien, die in den *Mycetocyten* (s. Einleitung) des Schabenfettkörpers auftreten und in bestimmten Bereichen des Fettkörpers verstärkt anzutreffen sind. Generell beherbergen viele Tieren in ihren Körpern Mikroorganismen. Oftmals handelt es sich dabei um ein Abhängigkeitsverhältnis zu beiderseitigem Nutzen (extra- oder intrazelluläre Symbiose), insbesondere im Bereich der Ernährung. Als Symbionten in Betracht kommen vor allem Bakterien, Hefen, Protozoen oder Algen, die häufig in bestimmten Bereichen des Darmtraktes auftreten. Symbiosen mit Mikroorganismen sind in den Geweben und Organen von Insekten weit verbreitet. Sie treten vor allem bei Insekten mit einförmiger Ernährungsweise auf, wie z.B. Blut- oder Säftesauger. Hier bilden die Symbionten lebenswichtige Stoffe (essentielle Aminosäuren, Vitamine, Sterole), die das Insekt nicht selbst aufnehmen oder synthetisieren kann. Die Symbionten sind im einfachsten Fall im Darmhohlraum beherbergt oder treten in Hämolymphe oder Fettkörper auf. Weitaus häufiger noch stellt das Insekt jedoch spezielle Gewebe, sogenannte *Myzetome*, zur Verfügung.

Zudem wird sichergestellt, dass die Symbionten an die Nachkommen weitergegeben werden - normalerweise über die Eier. Bei den Endosymbionten der Schaben im speziellen handelt es sich um Bacteroide. Ihre genaue Funktion konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden vorrangig adulte Männchen der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*) verwendet, da diese im Vergleich zu verwandten Arten bezüglich Haltung und Präparation einige Vorteile aufweisen. Argentinische Schaben sind relativ träge und können nicht gut an glatten Flächen empor laufen, so dass sie nicht so leicht aus der Zucht entkommen können. Zudem erfordert ihre Haltung einen relativ geringen Zeitaufwand und sie weisen eine hohe Vermehrungsrate auf. Der vergleichsweise große Fettkörper (Gewicht: $\bar{0},241 \pm 0,038$ mg; n=5) liefert ausreichend Gewebe für Versuche. Des Weiteren kann man als Referenz auf eine Vielzahl an Untersuchungsergebnissen für die ähnliche Art *Periplaneta americana* zurückgreifen.



Abbildung 14: Adultes Männchen bzw. Weibchen der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*).

Blaptica dubia ist im ausgewachsenen Zustand durchschnittlich 2 cm breit und 4 cm lang. Die Lebensdauer beträgt 1-1½ Jahre. Im Gegensatz zu den Männchen besitzen die Weibchen nur rudimentäre Flügel (s. Abb. 14), sind etwas größer und etwa doppelt so dick (5-7 mm), so dass die Geschlechter leicht unterschieden werden können.

Die von uns verwendeten Tiere stammten aus einer institutseigenen Zucht. Sie wurden in Glas-Terrarien (35x35x35 cm) gehalten, die mit einem Kunststoffdeckel verschlossen waren. Ein mit Fliegengaze aus Metall verschließbares kreisrundes Loch im Deckel (\varnothing 15 cm) ermöglichte ausreichenden Luftaustausch. Die Raumtemperatur betrug 25-28°C und die relative Luftfeuchtigkeit circa 45 %. Über eine Zeitschaltuhr wurde ein jeweils zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus aufrechterhalten. Als Untergrund diente Vermiculit (Firma KLEIN, 67308 Zellertal, Füllhöhe ca. 6 cm), welches in regelmäßigen Abständen erneuert wurde. Um den Tieren

Versteckmöglichkeiten zu bieten, enthielt jedes Terrarium außerdem noch 2 Pappkartons (8x20 cm).

Die Tiere wurden mit Hundefutter der Marke „CHAPPI 2 Brocken Vollkost“ gefüttert, zwischendurch erhielten sie zusätzlich Obstreste (v.a. Äpfel). Wasser wurde mittels eines liegenden 150 ml Erlenmeyerkolbens angeboten, der mit Laborwischtüchern (KIMBERLY-CLARK, Kimwipes Lite 100) verschlossen wurde. Das Papier saugte sich mit der Flüssigkeit voll und diese konnte von den Tieren *ad libitum* aufgenommen werden.

2.2 BEZUGSQUELLEN DER CHEMIKALIEN

Die Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen BOEHRINGER-MANNHEIM (Mannheim; mittlerweile: ROCHE Mannheim), SIGMA (Deisenhofen), SERVA (Heidelberg), MERCK (Darmstadt) und ROTH (Karlsruhe) bezogen. Das hypertrehalosämische Hormon Bld HrTH wurde von der Firma BACHEM Biochemica GmbH (inzwischen MERCK, Bruchsal) geliefert. Sauerstoff stammte von der Firma MESSER-GRIESHEIM (Frankfurt a.M.), flüssiger Stickstoff von der Firma LINDE AG (Mainz-Kostheim).

2.3 SUBSTANZEN & LÖSUNGEN

In allen Versuchen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Mit Ausnahme des hypertrehalosämischen Hormons wurden sämtliche Stammlösungen jeweils am Tage der Versuchsdurchführung frisch angesetzt. Bei den physiologischen Salzlösungen war die Pufferkapazität so stark, dass sie auch beim Zusatz saurer Lösungen den pH-Wert konstant hielten.

Anthron-Reagenz

Verwendung: Anthron-Test

Herstellung: Die Herstellung erfolgte nach der Vorschrift von CARROLL *et al.* (1956).

Das Reagenz war eine 0,05 %ige Anthron-Lösung in 72 %iger Schwefelsäure. Zusätzlich enthielt die Lösung noch 1 % Thioharnstoff als Reduktionsmittel, da das Reagenz oxidationsempfindlich ist. Zur Herstellung von 500 ml Anthron-Reagenz wurden 140 ml Aqua dest. auf einem Magnetrührer in ein Eiswasserbad gestellt. Dann wurden 360 ml konzentrierte H₂SO₄ langsam zugegeben, so dass die Temperatur +100°C nicht überstieg. Sobald die Lösung auf +80-90°C abgekühlt war, wurden 250 mg Anthron (MERCK Art.1468; C₁₄H₁₀O) und 5 g Thioharnstoff (MERCK Art. 7979; H₂N CS NH₂) hinzugefügt.

Lagerung: lichtgeschützt, +4°C

Haltbarkeit: circa 2-4 Wochen

Bld HrTH

Allgemeines: BACHEM Biochemica GmbH H-6815 (isoliert von *Nauphoeta cinerea*; Reinheit: 98 %), MG: 1074,17 g/mol

Verwendung: Inkubation isolierter Fettkörperloben und isolierter Fettkörperzellen

Lösung: Stammlösung: 1 mg/ml; um das Peptid vor Oxidation zu schützen, wurde es in 20 %iger Essigsäure gelöst.

Testkonzentration: 1-100 nM; die Verdünnung auf die in den Versuchen benötigten Konzentrationen erfolgte mit Ringerlösung und wurde jeweils direkt vor den Experimenten durchgeführt.

Lagerung: -80°C

Haltbarkeit: Stammlösung mehrere Monate haltbar

BSA-Lösung

Verwendung: Trophocyten-Isolierung

Herstellung: Ca²⁺-freie Insekten-Ringerlösung mit 1 % BSA (SIGMA A-6003)

Ca-Ionophor A 23187 / Calcimycin

Allgemeines: SIGMA C-7522 (freie Säure), C₂₉H₃₇N₃O₆, MG: 523,6 g/mol

Verwendung: Ionophor, das hochgradig selektiv für Ca²⁺ ist; Untersuchungen zur Signaltransduktion von Bld HrTH (Bedeutung von extrazellulärem Ca²⁺)

Lösung: Testkonzentration: 5 µg/ml = 9,5 µM

Lösungsmittel: Ethanol p.a.

Lagerung: Raumtemperatur

Dantrolen / (1-[(5-[p-Nitrophenyl]furfurylidene)-amino]hydantoin]

Allgemeines: SIGMA D-9175, Natriumsalz, MG: 336,2 g/mol

Verwendung: Inhibitor der Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarcoplasmatischen Reticulum; Untersuchungen zur Signaltransduktion von Bld HrTH (Bedeutung von intrazellulärem Ca²⁺)

Lösung: Testkonzentration: 100 µM

Lösungsmittel : DMSO

EGTA / Titriplex VI / Bis(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure

Allgemeines: Merck 108435

Verwendung: Ca²⁺-Chelator; Ca²⁺-freie Ringerlösung

Enzymgemisch

Verwendung: Fructose-2,6-bisphosphat-Test

Herstellung: 312,5 µl Aldolase (28 U), 125 µl GDH (212,5 U) und 12,5 µl Triosephosphatisomerase (625 U) wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Das Gemisch wurde dann für 10 Minuten zentrifugiert, so dass sich die Enzyme als Sediment absetzten, während der Überstand das Lösungsmittel Ammoniumsulfat enthielt. Der Überstand wurde verworfen, wohingegen das Sediment auf dem Schüttler in 450 µl TrisAc NaCl-Puffer (pH 8) in Lösung gebracht wurde. Dann wurde das Gemisch in einen circa 10 cm langen Dialyseschlauch gefüllt, der kurz mittels Aqua dest. gespült worden war und dessen eines Ende mit einem Clip verschlossen war. Nach dem Einfüllen wurde auch das andere Ende mittels Clip verschlossen. Die Dialyse erfolgte gegen 150 ml TrisAc NaCl-Puffer (pH 8) über 2 Stunden und wurde auf einem Magnetrührer bei +4°C durchgeführt. Während dieser Zeit wurde der Puffer zweimal erneuert (nach 30 bzw. 60 Minuten). Die Dialyse war notwendig, um die Hilfsenzyme zu entsalzen, da die PP_i-PFK bereits durch millimolare Konzentrationen von Anionen, vor allem polyvalente Anionen, gehemmt wird. Dem Enzymgemisch wurde dann zur Stabilisierung noch 10 mg BSA und 1 U der selbstgereinigten PP_i-PFK hinzugefügt und schließlich mit TrisAc NaCl-Puffer auf 5 ml aufgefüllt.

Haltbarkeit: jeweils am Versuchstag frisch angesetzt

Eosinlösung 0,1 %

Allgemeines: MERCK 1345

Verwendung: Färbung von Schnitten des Fettkörpergewebes, färbt Kerne kräftig dunkelblau und das übrige Gewebe rot

Herstellung: 0,1 g Eosin wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst und 1 Tropfen Eisessig (verbessert Färbung) zugegeben

ET-18-OCH₃

Allgemeines: Calbiochem 341207, C₂₇H₅₈NO₆P, MG: 523,7

Verwendung: Inhibitor der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C, hemmt jedoch nicht die Phosphatidylcholin spezifische Phospholipase C oder PLD

Lösung: Testkonzentration: 20 µM

Lösungsmittel: Ethanol

Lagerung: frisch angesetzt

Extraktionsmedium

Verwendung: Isolierung der PP_i-PFK aus Kartoffelknollen

Herstellung: Hepes (20 mM), Kalium-Acetat (20 mM), Dithiothreitol (2 mM); pH-Wert mit 5 M KOH bei 4°C auf pH 8,2 einstellen

Glucose-Oxidase

Allgemeines: Sigma G-6891, 1200 U/ml, Typ V-S: Aspergillus niger, EC 1.1.3.4

Verwendung: Trehalase-Test

Fructose-2,6-bisphosphat

Allgemeines: Sigma F-7006, Tetratrium Salz (95%), MG: 340,1 (F₂,6P₂) bzw. 428 (F₂,6P₂Na₄)

Verwendung: Fructose-2,6-bisphosphat-Standards zur Bestimmung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes

Fura-2-AM / Fura-2-Acetoxy-methylester

Allgemeines: Calbiochem 344905, C₄₄H₄₇N₃O₂₄, MG: 1001.87, gelber Feststoff, sehr lipophil 1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino- 5'-methylphenoxy) - ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid pentaacetoxy-methyl ester

Verwendung: Fura-2 ist ein sehr sensitiver, fluoreszierender Ca²⁺-Chelator, der zur Konzentrationsbestimmung (10 nM - 1µM) von freiem Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) in Zellen eingesetzt wird. Fura-2-AM ist ein membranpermeables Ester-Derivat von Fura-2, das benutzt wird, um den Chelator in Zellen einzubringen, da Fura-2 selbst nicht membrangängig ist.

Lösung: Stammlösung: 100 µM

Testkonzentration: 3 µM

Lösungsmittel: DMSO

Lagerung: -20°C, auf Blaugel, lichtgeschützt

Hämalaun-Lösung nach Mayer

Verwendung: Kernfärbung bzw. H&E-Doppelfärbung von Schnitten des Fettkörpergewebes, färbt rasch und intensiv, führt selbst bei längeren Einwirkzeiten selten zu Überfärbungen

Herstellung: 1 g Hämatoxylin wurden in 1 l Aqua dest. gelöst. 200 mg Natriumjodat (NaJO₃, Oxidationsmittel) und 50 g Kalialaun wurden unter kräftigem Rühren zugefügt, bis eine blauviolette Färbung erreicht war. Abschließend wurden 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure zugegeben (Farbumschlag nach rotviolett).

Lagerung: gut verschlossen aufbewahren

Haltbarkeit: über längeren Zeitraum haltbar

Hepes / 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure

Allgemeines: Boehringer 737151 (pH-Bereich: 6,8-8,2), C₈H₁₈N₂O₄S, MG: 238,2 g/mol

Insekten-Ringerlösung (Fettkörper)

Herstellung: (verändert nach STEELE *et al.* 1984)

NaCl (150 mM), KCl (5 mM), MgCl₂ (2 mM), CaCl₂ (2 mM) und Hepes (40 mM, pH 7,4) wurden zunächst in 800 ml Aqua dest. gelöst. Mittels NaOH (5 M) wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung dann mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

Lagerung: +4°C

Insekten-Ringerlösung, Ca²⁺-frei

Herstellung: NaCl (150 mM), KCl (5 mM), MgCl₂ (2 mM), EGTA (2 mM) und Hepes (40 mM, pH 7,4) wurden in 800 ml Aqua dest. gelöst. Mittels NaOH (5 M) wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt und dann die Lösung mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

Lagerung: +4°C

Insekten-Ringerlösung (isolierte Trophocyten)

Herstellung: NaCl (150 mM), KCl (5 mM), MgCl₂ (2 mM), CaCl₂ (2 mM) und Hepes (40 mM, pH 7,4) wurden zunächst in 800 ml Aqua dest. gelöst. Mittels NaOH (5 M) wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung dann mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. Am Versuchstag wurde der Ringerlösung Glucose (2 mM) hinzugefügt.

Lagerung: +4°C

Insekten-Ringerlösung, Ca²⁺-frei (isolierte Trophocyten)

Herstellung: NaCl (150 mM), KCl (5 mM), MgCl₂ (2 mM), EGTA (1 mM) und Hepes (40 mM, pH 7,4) wurden zunächst in 800 ml Aqua dest. gelöst. Mittels NaOH (5 M) wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung dann mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. Am Versuchstag wurde der Ringerlösung Glucose (2 mM) hinzugefügt.

Lagerung: +4°C

myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat

Allgemeines: SIGMA I-9766

Verwendung: Untersuchungen zur Signaltransduktion von Bld HrTH an isolierten Trophocyten

Lösung: Testkonzentration: 10 µM

Iodessigsäure

Allgemeines: SIGMA I-4386, freie Säure, C₂H₃IO₂, MG: 185,9

Verwendung: hemmt bestimmte Enzyme wie z.B. die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und blockiert damit die Glykolyse

Karminstammlösung

Verwendung: Karminfärbung nach Best zur Glykogendarstellung an Schnitten des Fettkörpergewebes

Herstellung:

Stammlösung: 2 g Karmin wurden mit 5 g KCl in 60 ml Aqua dest. unter Erwärmung gelöst. Dann wurde 1 g Kaliumcarbonat zugegeben und man ließ die Lösung sehr vorsichtig einige Minuten aufkochen (schäumt stark, Farbumschlag nach dunkelrot). Nach dem Erkalten der Lösung wurden 20 ml Ammoniak zugegeben.

Karminlösung: Direkt vor der eigentlichen Färbung wurden 20 ml der Stammlösung filtriert und anschließend 30 ml Ammoniak und 30 ml Methanol zugefügt. Die Karminlösung sollte möglichst frisch eingesetzt werden und man sollte darauf achten, dass möglichst wenig Ammoniak aus der Lösung verdunsten kann, da es bei zu geringem Ammoniakgehalt zu unbefriedigenden Färberesultaten kommen kann.

Aufbewahrung: +4°C, lichtgeschützt

Haltbarkeit: Stammlösung: circa 2 Monate im Winter, 1 Monat im Sommer. Verdünnte Lösung: nur einige Tage haltbar.

Magnesiumacetat-Tetrahydrat

Allgemeines: MERCK 105819 (hygroskopisch), $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, MG: 214,46 g/mol

Verwendung: Bestandteil des Reaktionsgemisches für den Fructose-2,6-bisphosphat-Test

Lösung: Stammlösung: 100 mM

Lagerung: -30 °C

NADH

Allgemeines: Boehringer 837075 (Grad I; Disodiumsalz), Absorptionsmaximum 260 und 340 nm

Lagerung: lichtgeschützt, +4 °C

Natriumpyrophosphat / PP_i

Allgemeines: SIGMA S-9515 (pH 9,5-10,5), $\text{Na}_4\text{O}_7 \text{P}_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, MG: 446,06 g/mol

Verwendung: Fructose-2,6-bisphosphat-Test

Lösung: Stammlösung: 10 mM

Lagerung: -30 °C

N⁶-Methyl-L-Arginin (L-NMA)

Allgemeines: SIGMA M-7033, $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, Acetatsalz, ~98%, MG: 248,3 g/mol

Lösungsmittel: DMSO

Lagerung: -20 °C

D,L-Octopamin / D,L-p-Hydroxyphenylethanolamin Hydrochlorid

Allgemeines: SIGMA 0-0250, MG: 189,6 g/mol

Lösung: Lösungsmittel: Ringerlösung

Testkonzentration: 10^{-4} M

Lagerung: Raumtemperatur

Phorbol-12,13-dibutyrat

Allgemeines: SIGMA P-1269, $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8$, MG: 504,6, starker NO-Promotor, Aktivator der Proteinkinase C

Lagerung: -0 °C

Pikrinsäure-Formol-Eisessig-Gemisch nach Gendre

Verwendung: Fixierlösung für Fettkörpergewebeschnitte

Herstellung: Stammlösung: 35 %iges Formol wurde mit Leitungswasser 1:4 verdünnt. Danach wurde Pikrinsäure im Überschuss zugegeben und die Lösung über Nacht stehengelassen.

Fixierlösung: Direkt vor der Fixierung wurden zu 100 ml der Stammlösung 5 ml Eisessig hinzugefügt.

Lagerung: Stammlösung über längere Zeit haltbar

Polyethylenglykol 8000

Allgemeines: SIGMA P-2139

Verwendung: Isolierung der PP_i-PFK aus Kartoffelknollen

Prolin

Allgemeines: L-Prolin, SIGMA P-0380, MG: 115,1 g/mol

Verwendung: Inkubation isolierter Trophocyten

Herstellung: Testkonzentration: 10 mM

Puffer für PP_i-PFK

Verwendung: Aufbewahrung der aus Kartoffelknollen isolierten PP_i-PFK

Herstellung: Tris-(hydroxymethyl) aminomethan-HCl (20 mM), KCl (20 mM), DTT (2 mM);

pH-Wert mit KOH (5 M) bei 4°C auf pH 8,2 eingestellt

Reaktionsgemisch

Verwendung: Fructose 2,6-bisphosphat-Test

Herstellung: Das Reaktionsgemisch bestand aus Tris/Acetat (50 mM, pH 8), Mg-Acetat (2 mM), NADH (0,15 mM) und Fructose 6-phosphat (1 mM). Zu diesem Zweck wurden 5 ml Tris/Acetat-Puffer (1 M, pH 8) mit circa 40 ml Aqua dest. vermischt. Dann wurden 2 ml Magnesiumacetatlösung (0,1 M), 1 ml Fructose 6-phosphat-Lösung (0,1 M) und 10,64 mg NADH-Pulver darin gelöst und die Lösung schließlich in einem Meßkolben auf 50 ml aufgefüllt.

Haltbarkeit: jeweils frisch angesetzt

Saponin

Allgemeines: SIGMA S-4521, von *Quillaja bark*

Verwendung: Permeabilisierung der Trophocyten

Herstellung: Testkonzentration: 75 µg/ml

SBTI-Lösung

Verwendung: Trophocyten-Isolierung

Herstellung: BSA-Lösung + SBTI (30 µM; soybean trypsin inhibitor; SIGMA T-9128)

Trypanblaulösung

Allgemeines: Sigma T-8154, 0,4 %ige Lösung, MG: 960,6, C₃₄H₂₄N₆O₁₄S₄N

Verwendung: Farbstoff zur Überprüfung der Vitalität und Permeabilität von Zellen

Thimerosal / Sodium ethylmercurithiosalicylate

Allgemeines: SIGMA T-8784, C₉H₉HgO₂SNa, MG: 404,8 g/mol

Verwendung: Untersuchungen zur Signaltransduktion von Bld HrTH

Herstellung: Testkonzentration: 50 µM

Lösungsmittel: Ringerlösung

TRAP

Allgemeines: SIGMA T-1502, Triethanolamine, (2, 2', 2''-Nitrilotriethanol), C₆H₁₅NO₃·HCl, MG: 185,7 g/mol

Tris Acetat-Puffer / Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat Puffer

Allgemeines: ROTH 4855, MG: 121,13 g/mol

Herstellung: Zur Herstellung von 500 ml Tris Acetat Puffer (1 M) wurden 60,57 g Tris in 300 ml Aqua dest. gelöst. Mittels konzentrierter Essigsäure (Eisessig) wurde der pH-Wert auf pH 8 eingestellt und die Lösung dann mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.

Lagerung: lichtgeschützt, +4°C

Haltbarkeit: 2-3 Monate

Tris Acetat NaCl-Puffer

Verwendung: Dialyse des Enzymgemisches des Fructose-2,6-bisphosphat-Tests

Herstellung: Zur Herstellung eines 1 M Puffers waren Tris Acetat (25 mM) und NaCl (50 mM) notwendig. 25 ml Tris Ac Puffer (1 M, pH 8) wurden mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und 2,925 g NaCl hinzugefügt.

Lagerung: lichtgeschützt, +4°C

Trehalase / α , α -Trehalose Glucohydrolase

Allgemeines: SIGMA T-8778 (EC 3.2.1.28), 1,4 U/mg, 2,3 mg Protein/ml

Verwendung: Bestimmung der Trehalose-Konzentration

Lagerung: 0 bis -20°C

Trehalose / Mycose / α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside

Allgemeines: SIGMA T-5251, C₁₂H₂₂O₁₁, MG: 342,3 g/mol, Glucose-Gehalt: < 0,1%

2.4 METHODEN

2.4.1 ISOLIERUNG DES FETTKÖRPERGEWEBES

Als Versuchstiere dienten möglichst jüngere, männliche Schaben, um hormonelle und stoffwechselphysiologische Schwankungen, wie sie bei weiblichen Tieren verstärkt auftreten, zu minimieren.

Die Schaben wurden am Versuchstag einzeln in Plastikbehältern (10x7 cm) gehalten. Die Behälter wurden im Dunkeln aufbewahrt und enthielten jeweils ein Laborwischtuch (KIMBERLY-CLARK, Kimwipes Lite 100) als Versteckmöglichkeit. Auf diese Weise sollte der Stress für die Tiere minimiert werden.

Zur Präparation des Fettkörpers wurde die Schabe mit einer Pinzette eingefangen und dekapitiert. Danach wurde das Abdomen direkt hinter dem Metathorax mit einer Schere abgetrennt. Kopf und Thorax wurden verworfen. Das Abdomen wurde mit der Ventralseite (stärker gefärbt, rotbraun) nach oben in einer kleinen, mit Insekten-Ringerlösung gefüllten Präparierschale (\varnothing 5 cm) mit Hilfe von Präpariernadeln justiert. Nach einer kurzen Ruhephase (5 min) wurden dann mit einer Präparierschere (Augenschere, s. Abb. 15) an der Cuticula zwei laterale und ein weiterer querverlaufender Schnitt vor dem letzten Abdominalsegment durchgeführt, so dass die ventrale Cuticula abpräpariert werden konnte.



Abbildung 15: Augenscheren und feine Pinzetten zur Präparation des Fettkörpers von *Blaptica dubia*.

Das Verdauungssystem (Kaumagen, Blinddärme, Mitteldarm, Malpighische Gefäße, Dickdarm und Rektalblase) wurde mit einer feinen Pinzette (s. Abb. 15) vorsichtig angehoben und möglichst vollständig entfernt. Dabei war darauf zu achten, dass der Darm nicht abriß, da es andernfalls zu einer Verunreinigung des Gewebes gekommen wäre.

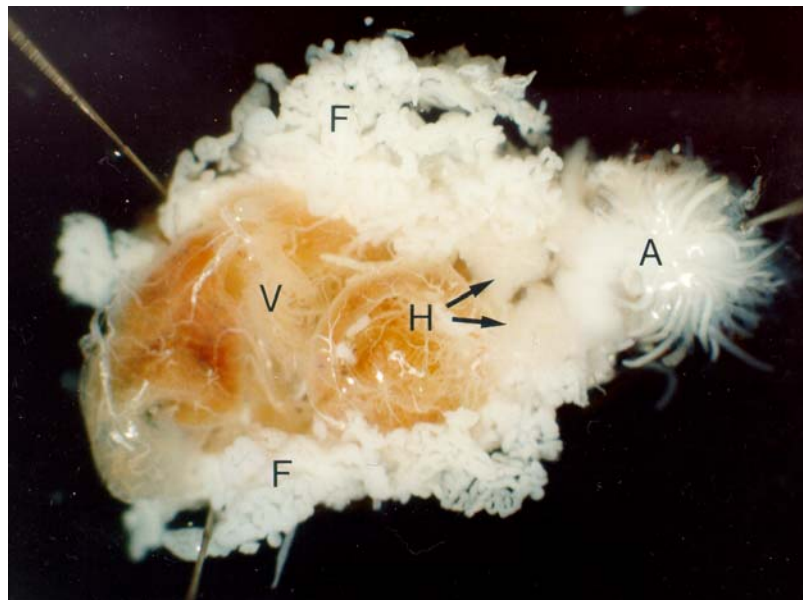


Abbildung 16: Präpariertes Abdomen (Ventralansicht) der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*) mit Fettkörper (*Corpus adiposum*, F), Verdauungssystem (V), Akzessorischer Geschlechtsdrüse (A) und Hoden (H).

Schließlich wurden auch noch die beiden Hoden und die akzessorische Geschlechtsdrüse (Nebendrüse) entfernt. Der Fettkörper wurde dann in zwei möglichst gleich große Loben unterteilt und herauspräpariert. Dabei war darauf zu achten, dass möglichst kein Muskel- oder

Nervengewebe mit heraus präpariert wurde. Das Fettkörpergewebe blieb für mindestens eine Stunde metabolisch aktiv.

2.4.2 BESTIMMUNG DURCHSCHNITTLICHER FRISCHGEWICHTE

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Frischgewichte adulter Tiere der Art *Blaptica dubia* und ihrer Fettkörper wurden 5 völlig ausgewachsene Weibchen bzw. Männchen aus der institutseigenen Zucht 3 Wochen lang in einem separaten Käfig gehalten, mit ausreichend Futter und Wasser versorgt und täglich beobachtet, um offensichtlich kranke Tiere ausschließen zu können. Nach Ablauf der 3 Wochen wurden die Tiere auf einer Laborwaage (METTLER AE240) gewogen. Anschließend wurden die Tiere dekapitiert, die Fettkörper heraus präpariert (s. 2.4.1) und ebenfalls gewogen.

2.4.3 WIRKUNG VON NAHRUNGSMANGEL AUF DAS GEWICHT

Um die Auswirkungen des Hungerns auf das Gewicht von Gesamttier und Fettkörper zu untersuchen, wurden 8 adulte Männchen der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*) einzeln in Plastikgefäßen (10,5 x 10,5 cm) gehalten. Die Tiere erhielten Wasser *ad libitum*, jedoch keine Nahrung. Alle Gefäße wurden von außen partiell mit einem Tuch abgedeckt, um eine Versteckmöglichkeit zu simulieren, ohne jedoch Papier (was eine mögliche Futterquelle dargestellt hätte) in das Gefäß einzubringen. Zusätzlich enthielt jedes Plastikgefäß noch ein braunes Glasgefäß mit breiter Öffnung als Unterschlupf. Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen (0, 4, 7, 14, 21, 30 Tage) gewogen und die Gewichtsveränderungen festgehalten.

Unter identischen Bedingungen wurden weitere 56 adulte Männchen einzeln gehalten. Nach 0, 1, 4, 7, 14, 21 und 30 Tagen wurde bei jeweils 8 Tieren der Fettkörper präpariert und dessen Gewicht bestimmt.

2.4.4 HISTOLOGISCHE PRÄPARATE DES FETTKÖRPERGEWEBES VON HUNGERTIEREN

Die Auswirkungen von Nahrungsmangel speziell auf den Glykogengehalt und die symbiontischen Bakterien der Mycetocyten sollte anhand von Schnitten des Fettkörpergewebes von Hungertieren untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden 4 männliche Argentinische Schaben 28 Tage einzeln in Plastikgefäßen (10,5 x 10,5 cm) gehalten. Alle Gefäße wurden von außen partiell mit einem Tuch abgedeckt, um eine Versteckmöglichkeit zu simulieren, ohne jedoch Papier (was eine mögliche Futterquelle dargestellt hätte) in das Gefäß einzubringen. Zusätzlich enthielt jedes Plastikgefäß noch ein braunes Glasgefäß mit breiter Öffnung als Unterschlupf. Während die Kontrolltiere

(n=2) regelmäßig frisches Wasser und ausreichend Futter erhielten, bekamen die Hungertiere (n=2) ausschließlich Wasser *ad libitum*.

2.4.4.1 Fixierung des Fettkörpergewebes

Nach Ablauf des Versuchszeitraumes wurden die 4 Schaben dekapitiert und die Fettkörper auf Eis präpariert (s. 2.4.1).

Direkt nach der Entnahme wurde das Fettkörpergewebe fixiert. Die Fixierung dient der Konservierung durch Unterbrechung von Stoffwechselprozessen, der Verhinderung von Zerfallserscheinungen (z.B. durch Autolyse, Verwesung, Fäulnis) und damit der Festlegung der Strukturen des zu untersuchenden Objektes im Augenblick der Fixierung. Die Makromoleküle werden vernetzt, so dass sie in einen unbeweglichen und unlöslichen Zustand übergehen und die Gewebekomponenten in möglichst nativer Struktur erhalten werden.

Im Fall der Fettkörper wurde eine Immersionsfixation durchgeführt, d.h. das Fettkörpergewebe wurde in der Fixierflüssigkeit eingelegt. Hierbei war darauf zu achten, dass das Gewebe möglichst rasch mit der Fixierlösung durchdrungen wurde.

A. Glykogen-Nachweis

Zur Glykogendarstellung wurden die Fettkörper eines Kontroll- und eines Hungertieres separat in Eppendorf-Gefäße mit gekühltem Isopentan (2-Methylbutan, 99%) überführt und sofort in flüssigem N₂ eingefroren. Nach 5 min erfolgte die Überführung in eine Einbettkassette (LAB EUROLINE, Scharnierversion, Universal). Die Fixierung wurde bei +4°C unter ständiger Durchmischung nach *Gendre* (Glykogen-Fixierung, 24 h; ROMEIS 1989) mit Pikrinsäure-Formol-Eisessig-Gemisch, modifiziert nach *Langeron*, durchgeführt. Anschließend wurde das Fettkörpergewebe in 96 %igem Alkohol ausgewaschen

B. Mycetocyten-Nachweis

Zur Darstellung der Mycetocyten und der in ihnen auftretenden Endosymbionten wurden die beiden anderen Fettkörper ebenfalls in Einbettkassetten (LAB EUROLINE, Scharnierversion, Universal) überführt. Die Fixierung erfolgte für 4 h in Pikrinsäure-Formol-Eisessig-Gemisch nach *Gendre* (*Langeron*-Abwandlung) bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung.

2.4.4.2 Schnitttherstellung

Um die Gewebeproben schneiden zu können, müssen sie eine gewisse Härte aufweisen und wurden daher zunächst in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden an einem Mikrotom mit einem trockenen Messer Schnitte der Schnittdicke 5 µm angefertigt und auf Glas-Objektträgern aufgefangen, welche zuvor mehrmals durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen worden waren.

2.4.4.3 Entparaffinierung und Färbung der Schnitte

A. Glykogennachweis: Karminfärbung nach Best

Der Glykogennachweis wurde an den mikroskopischen Präparaten mittels Karminfärbung nach BEST (1906), verändert nach ROMEIS (1989) durchgeführt. Diese Färbemethode liefert kräftig rot gefärbte, klare Bilder und ist geeignet, um selbst Spuren von Glykogen noch nachzuweisen.

Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung, um das Einbettungsmittel herauszulösen. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte wenige Minuten in Xylol gestellt. Anschließend wurden sie durch eine absteigende Alkoholreihe (Alkohol absolut, 96 %, 80 %, 60 %) in Aqua dest. überführt, wobei sie in jeder Lösung circa 2 Minuten verblieben. Ein Austrocknen der Schnitte war auf jeden Fall zu vermeiden.

Anschließend wurde für 5 min eine Kernfärbung in saurem Hämalaun durchgeführt, die eine sehr selektive, kontrastreiche, stark blaue bis violette Kernfärbung herbeiführt. Die Schnitte wurden in Aqua dest. abgespült, bis keine Farbwolken mehr abgingen und schließlich in warmem Leitungswasser gebläut (ca. 10 min). Die Blaufärbung tritt aufgrund der pH-Veränderung (saurer Hämalaun) erst im Leitungswasser auf. Da das Hämalaun im neutralen bis alkalischen pH-Bereich zudem schlecht wasserlöslich ist, wurde die Färbung beim Bläuen zusätzlich fixiert.

Zur eigentlichen Glykogendarstellung wurden die Schnitte für 5-20 min in Karminlösung inkubiert. Die Differenzierung erfolgte in einer Mischung aus 40 ml Methanol, 80 ml Ethanol abs. und 100 ml Aqua dest. bis keine Farbwolken mehr abgingen (wenige Sekunden bis Minuten). Anschließend wurden die Schnitte in 80 %igem Ethanol gespült, entwässert (90 %, 100 %), mit Xylol behandelt und schließlich eingedeckt.

B. Mycetocyten-Nachweis

Die Färbung der Mycetocytenpräparate erfolgte mittels Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin (H & E). Diese Färbemethode hob insbesondere die Mycetocyten und die in ihnen vorkommenden Mikroorganismen deutlich hervor (rot bzw. dunkelrot), Kerne erschienen aufgrund der Hämalaunfärbung kräftig dunkelblau, während das übrige Gewebe rot gefärbt wurde.

Nach der Entparaffinierung der Schnitte wurde zunächst eine Alkoholreihe abwärts bis zu reinem Aqua dest. durchgeführt. Zur Kernfärbung erfolgte für ca. 8 min die Inkubation in Hämalaun-Lösung nach Mayer. Nach Spülen mit Aqua dest. erfolgte Bläuen in lauwarmem Leitungswasser für circa 10 min, bevor die Schnitte erneut in Aqua dest. überführt wurden.

Die eigentliche Färbung erfolgte in 0,1 %iger Eosinlösung (ca. 8 min). Die Überfärbung der Schnitte stellte dabei kein Problem dar und ist sogar eher erwünscht, da im nachfolgenden

Waschschritt mit Aqua dest. (~5 min) überschüssige Farbe wieder abging. Nach Differenzierung in 80 %igem Ethanol und einer Alkoholreihe aufwärts (Ethanol 96 %, 100 %; jeweils 2 min), wurden die Schnitte schließlich in Rotihistat, Xylol und Eubitt überführt und eingedeckt.

2.4.4.4 Auswertung der Schnitte

Bilder der fertigen Schnitte wurden an einem Axioplan Mikroskop (Olympus OM4 Ti, Carl Zeiss Jena) mit einem Kodak Elite II 100 Film (35 mm für Farbdiapositive; Tageslicht; 36 Aufnahmen) aufgenommen (Belichtungszeit: 1-4 s). Es wurden sowohl Übersichtsbilder als auch Detaildarstellungen mit 25 bzw. 100-facher Vergrößerung angefertigt.

2.4.5 BESTIMMUNG DURCHSCHNITTLICHER WASSERGEHALTE (GESAMTTIER, FETTKÖRPER)

Jeweils 10 adulte Weibchen bzw. Männchen aus der institutseigenen Zucht wurden in einem separaten Käfig gehalten und mit ausreichend Futter und Wasser versorgt. Die Tiere erhielten neben dem üblichen Trockenfutter regelmäßig Obst.

Nach 3 Wochen wurden jeweils 5 Weibchen bzw. Männchen getötet, in Wäggläschen bekannten Gewichtes gewogen (=Frischgewicht) und in einem Trockenschrank (HERAEUS T/ST 5042, Nenntemperatur: 250°C) bei 105°C mehrere Stunden getrocknet. In regelmäßigen Abständen wurde das Gewicht kontrolliert. Der Trocknungsprozess wurde beendet, sobald über einen längeren Zeitraum keine Veränderungen der Gewichte mehr zu verzeichnen waren. Zur Abkühlung wurden die Wäggläschen in einen Exsikkator gestellt und dann nochmals das Gewicht bestimmt (=Trockengewicht).

Die übrigen Tiere wurden ebenfalls getötet, der Fettkörper präpariert, in Wäggläschen bekannten Gewichtes gewogen (=Frischgewicht) und in einem Trockenschrank (HERAEUS T/ST 5042, Nenntemperatur: 250°C) bei 105°C über mehrere Stunden getrocknet, bis Gewichtskonstanz erreicht war. Zur Abkühlung wurden die Wäggläschen in einen Exsikkator gestellt und dann nochmals das Gewicht bestimmt (=Trockengewicht).

Der Wassergehalt wurde als Differenz von Frisch- und Trockengewicht ermittelt.

2.4.6 BESTIMMUNG DES WASSERVERLUST DURCH VERDUNSTUNG IN TROCKENER LUFT

4 Weibchen und 4 Männchen von *Blaptica dubia* wurden über 4 Wochen in einem separaten Käfig gehalten, dessen Luftfeuchtigkeit durch offene Schälchen mit Wasser hoch gehalten wurde. Zudem erhielten sie regelmäßig Obst als Zusatznahrung.

Direkt vor Beginn des eigentlichen Versuches wurden die Tiere einzeln in Plastikgefäßen (10 x 7,7 cm) gehalten, die dann für mehrere Stunden in einem Exsikkator über Trockenperlen (Alumosilicatgel mit Farbindikator (blau), ROTH 0728.1) bei Raumtemperatur (28°C) und einer

relativen Luftfeuchtigkeit von 14 % aufbewahrt wurden. Das Gewicht der Tiere wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Beim Umsetzen war jeweils darauf zu achten, dass die Gefäße nur mit Handschuhen berührt wurden, da die menschliche Haut stets Feuchtigkeit aufweist.

2.4.7 INKUBATION ISOLIERTER FETTKÖRPERLOBEN

Direkt nach der Präparation (s. 2.4.1) ließ man das Fettkörpergewebe zunächst 4 min ruhen, dann wurden die Fettkörperloben getrennt inkubiert, wobei jeweils einer der Loben als interne Kontrolle diente, während der andere mit der Testsubstanz inkubiert wurde („paired tissue“-Technik, verändert nach STEELE *et al.* 1988). Dies hat den Vorteil, dass beide Loben bei Versuchsbeginn gleiche Metabolitgehalte aufwiesen.

Da Insektengewebe nicht durch Kapillaren versorgt werden (offenes Blutkreislaufsystem, s. Einleitung), kommt die Inkubation in Insekten-Ringerlösung den natürlichen Austauschvorgängen mit der Hämolymphe sehr nahe. Aufgrund der gelappten Struktur hat das Fettkörpergewebe eine große Oberfläche, was den Stofftransport erleichtert.

Durch eine Vorinkubation sollten die Fettkörperloben zunächst gespült und eventuell während der Präparation abgegebene Stoffe ausgewaschen werden. Die Vorinkubation erfolgte für 20 min in verschlossenen 25 ml Glasgefäßen mit 2 ml vortemperierter Insekten-Ringerlösung in einem Schüttelwasserbad (+30°C, Schüttelfrequenz: 85 min⁻¹).

Anschließend wurden die Loben für die Hauptinkubation in 25 ml Glasgefäße mit 2 ml frischem Inkubationsmedium überführt und verblieben dann für weitere 30 min im Wasserbad (+30°C, Schüttelfrequenz: 85 min⁻¹). Der Kontrolllobus wurde in Insekten-Ringerlösung inkubiert, der Versuchslobus hingegen in Insekten-Ringerlösung, die die jeweilige Testsubstanz enthielt. Die Zugabe der Testsubstanz zur vorpipettierten Ringerlösung erfolgte jeweils direkt vor dem Beginn der Hauptinkubation.

Nach Abschluß der Hauptinkubation wurden die Loben auf einem Rundfilter (SCHLEICHER & SCHÜLL GmbH, Dassel, 1506, Ø 125 mm, #301 311, aschefrei) mit Hilfe einer feinen Pinzette möglichst verlustfrei trockengerollt, um die Insekten-Ringerlösung zu entfernen. In einer Styroporwanne mit flüssigem Stickstoff (-196°C) konnten die Loben dann einzeln eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Vom Inkubationsüberstand wurde 1 ml entnommen und bis zur Bestimmung der abgegebenen Trehalosemenge ebenfalls eingefroren (-30 °C). Das übrige Medium wurde verworfen.

2.4.8 BESTIMMUNG DER FRIERGEWICHTE DER FETTKÖRPERLOBEN

Auf einer Analysenwaage (METTLER AE240) wurde zunächst ein N₂-Reaktionsgefäß als Nullwert abgeglichen, dann der Fettkörperlobus in das Gefäß überführt und nochmals gewogen. Das Wiegen mußte sehr zügig erfolgen, damit das Gewebe in der Zwischenzeit nicht auftaute und es zu Umsetzungen kommen konnte. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bis zur Aufarbeitung des Gewebes wieder in flüssigem N₂ (-196 °C) aufbewahrt.

2.4.9 AUFARBEITUNG DES FETTKÖRPERGEWEBES

2.4.9.1 Saure Aufarbeitung (Metabolite allgemein)

Mit Hilfe von Säure konnten Metabolite, mit Ausnahme des Fructose-2,6-bisphosphates (s. 2.4.9.2), aus dem Fettkörper extrahiert werden. Zu diesem Zweck wurde das gefrorene, gewogene Gewebe mit 10 Teilen (w/v) eiskalter 6 %iger Perchlorsäure versetzt und mittels Ultraschall (BRANSON Sonifier B-12, Mikrospitze, Stufe 3, ~20 s) unter sorgfältiger Durchmischung und ständiger Kühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend zentrifugiert (EPPENDORF Centrifuge 5412, 3 min, 10.000 g). Der Überstand (Ü1) wurde mit K₂CO₃ (5 M) neutralisiert (Überprüfung des pH-Wertes über Indikator Methylorange (5 µl) und abschließende Kontrolle mit pH-Indikatorpapier) und erneut zentrifugiert (3 min, 10.000 g, Ü2).

Das resultierende Perchloratsediment (S2), sowie das Sediment aus der ersten Zentrifugation (S1) wurden jeweils in 100 µl EDTA-Lösung (2 mM, pH 7) resuspendiert und nochmals zentrifugiert (3 min, 10.000 g, Ü3, Ü4). Anschließend wurden die Überstände 2-4 vereinigt und, ebenso wie die Sedimente, bei -80°C eingefroren. Die Überstände dienten nachfolgend der Metabolitbestimmung, während die Sedimente zur Glykogenbestimmung verwendet wurden.

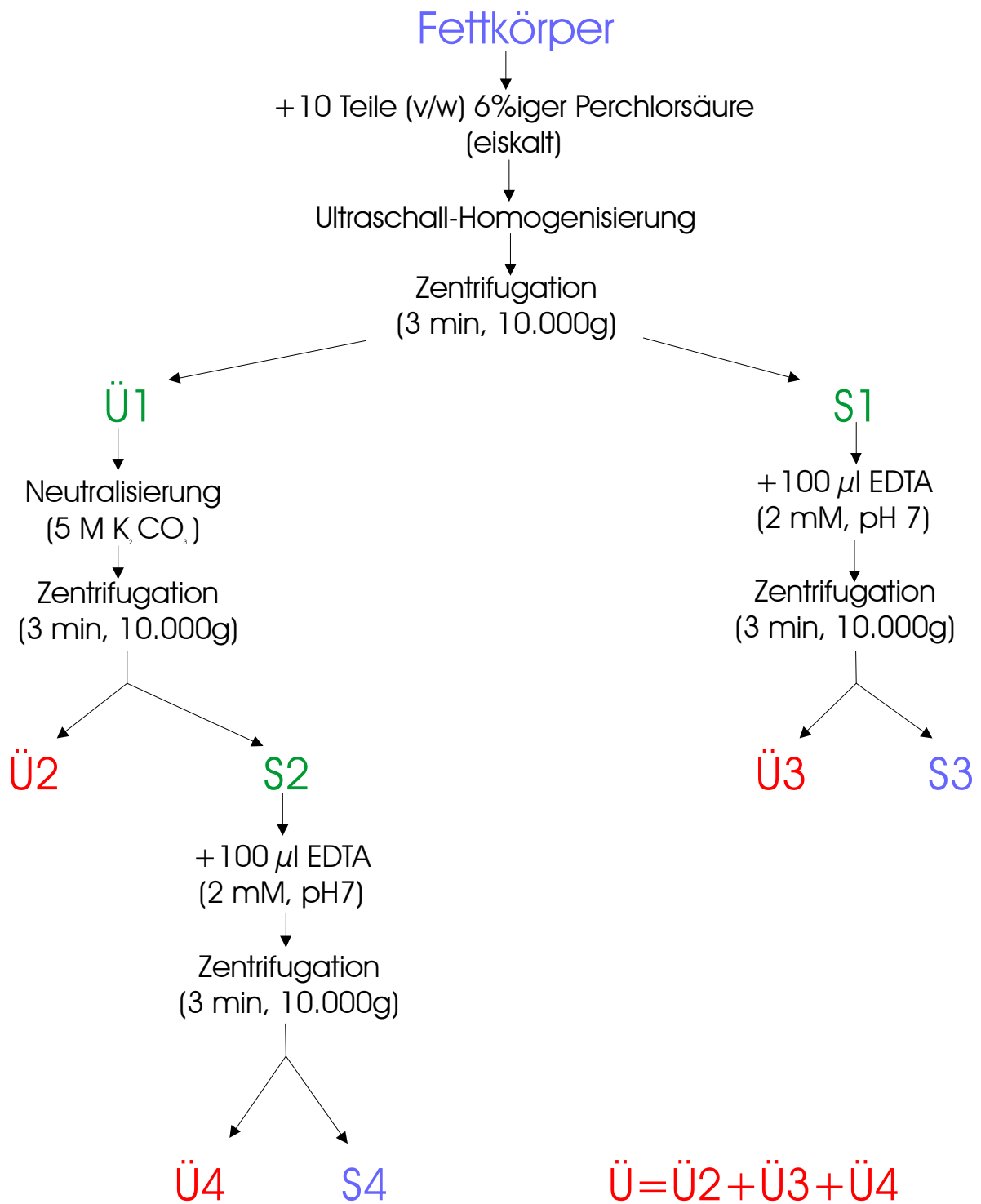


Abbildung 17: Übersicht über die Schritte zur sauren Aufarbeitung des Fettkörpergewebes.

2.4.9.2 Basische Aufarbeitung (Fructose-2,6-bisphosphat)

Zur Bestimmung von Fructose-2,6-bisphosphat mußten zunächst die in den Loben enthaltenen Proteine denaturiert werden, um weitere enzymatischen Umsetzungen zu unterbinden. Dabei war es sehr wichtig, die Denaturierung im basischen Milieu durchzuführen, da Fructose-2,6-bisphosphat sehr säurelabil ist.

Zu jeder Probe wurde die zehnfache Menge des Friergewichts (vol/weight bzw. µl/mg; s. 2.4.8) an 200 mM NaOH hinzugefügt und das Gewebe anschließend mit Hilfe von Ultraschall (BRANSON-Sonifier B-12 mit Mikrospitze, Stufe 2) ca. 25 s lang homogenisiert. Dabei war darauf zu achten, dass möglichst wenig Luft in die Probe eingebracht wurde. Die 200 mM NaOH gewährleistete, dass der pH-Wert nach der Homogenisation über 10 lag und so das Fructose-2,6-bisphosphat auch bei längerer Lagerung stabil blieb. Im Anschluß wurden die Proben für 5 min in ein Wasserbad (+80°C) gestellt, um eine vollständige Proteindenaturierung zu erreichen, und dann für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert (EPPENDORF Mikrofuge 5412). Auf der Oberfläche setzte sich eine Fettschicht ab. Sie wurde mit einer Pipettenspitze vorsichtig durchstoßen und 50 µl des wässrigen Überstandes abgenommen. Von der Fettschicht sollten dabei möglichst wenige Verunreinigungen mitgeführt werden. Anschließend wurden zu den 50 µl Überstand 450 µl 10 mM NaOH gegeben und die Probe bis zur Bestimmung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes eingefroren (-30 °C). Der restliche Überstand wurde, ebenso wie das Sediment, in dem Fructose-2,6-bisphosphat nicht nachweisbar war, verworfen.

2.4.10 METABOLITBESTIMMUNGEN

Die Inkubationsmedien aus den Inkubationen (s. 2.4.7) wurde zur Bestimmung der von den Fettkörpern freigesetzten Trehalose verwendet, basisch aufgearbeitete Fettkörperloben zur Bestimmung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes und sauer aufgearbeitete Fettkörperloben zur Bestimmung der übrigen Metabolite.

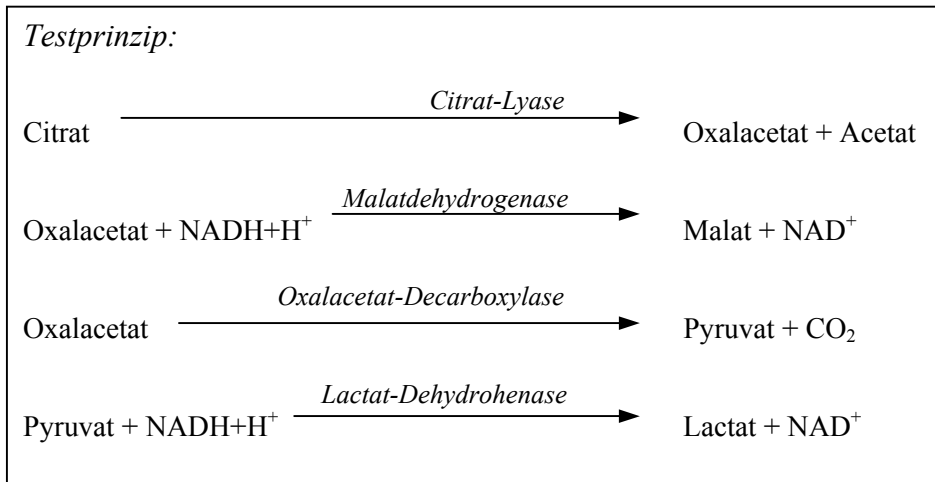
Die Bestimmung der Metabolitgehalte erfolgte enzymatisch in einfachen und gekoppelten optischen Tests nach BERGMAYER (1984) in leicht verändert Form. Die Tests wurden an einem ZEISS-Spektralphotometer (PM6) bzw. einen KONTRON Spektralphotometer (Uvikon 922) bei einer Wellenlänge von $\lambda=340$ nm durchgeführt. Die Schichtdicke betrug 1 cm, das Meßvolumen 500 µl. Die Temperatur (+30°C) wurde über ein Wasserbad konstant gehalten. Abweichungen von diesen Basisbedingungen sind bei den jeweiligen Testsystemen vermerkt.

Hilfsenzyme, die in gesättigter Ammoniumsulfatlösung vorlagen, wurden bei +4°C vier Minuten abzentrifugiert (EPPENDORF Mikrofuge 5412, 10.000 g) und dann im jeweiligen Testpuffer gelöst. Bei jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um Extinktionsveränderungen auszuschließen, die nicht auf die zu messende Substanz

zurückzuführen waren, wurden zudem 2 Leerwerte bestimmt: Ein Leerwert mit Aqua dest. anstelle des Extraktes, der andere mit Aqua dest. anstelle der Enzymlösung.

2.4.10.1 Testsysteme

2.4.10.1.1 Citrat

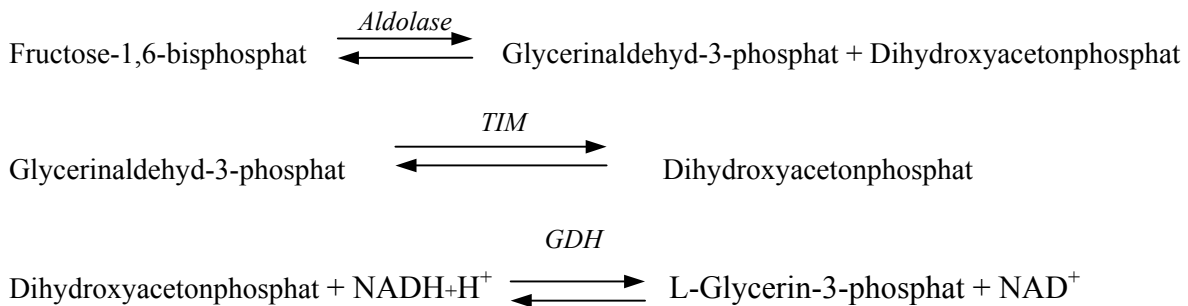


Testsystem:

Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μl]
TRAP (pH 7,6)	250 mM	100 mM	200
MgCl ₂	100 mM	4 mM	20
EDTA	25 mM	0,5 mM	10
NADH	2,5 mM	0,1 mM	20
LDH		3,6 U/ml	20
MDH		2,4 U/ml	20
Probe			var.
Aqua dest.			ad 460
E ₁ (5 min)			
CL		1, 28 U/ml	20
E ₂ (10 min)			
PK		1,6 U/ml	20
E ₃			

2.4.10.1.2 Dihydroxyacetonphosphat, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat

Testprinzip:



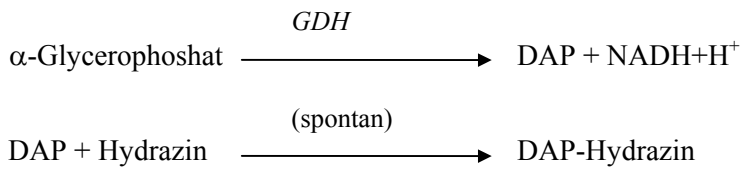
Der Test wurde mit einem Überschuß an NADH durchgeführt, damit die Reaktion mit ausreichender Geschwindigkeit ablief.

Testsystem:

Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μl]
TRAP (pH 7,6)	250 mM	100 mM	200
NADH	2,5 mM	0,1 mM	20
Probe			var.
Aqua dest.			ad 440
E ₁			
GDH	3,25 U/ml	0,13 U/ml	20
E ₂			
TIM	1,125 U/ml	0,83 U/ml	20
E ₃			

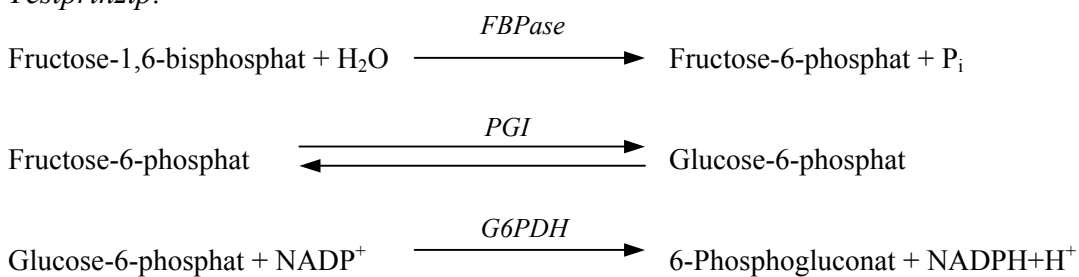
$$\Delta E_{\text{DAP}} = E_1 - E_2$$

$$\Delta E_{\text{GAP}} = E_2 - E_3$$

2.4.10.1.3 α -Glycerophosphat*Testprinzip:**Testsystem:*

Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μl]
Glycin-Hydrazin	250 mM	160 mM	200
MgCl ₂	100 mM	8 mM	40
ATP	25 mM	1 mM	20
NAD ⁺	25 mM	2 mM	20
Probe			var.
Aqua dest.			ad 480
E ₁ (5 min)			
GDH		13 U/ml	20
E ₂ (25 min)			

2.4.10.1.4 Fructose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat

Testprinzip:

Testsystem:

Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μ l]
TRAP (pH 7,6)	250	100 mM	200
MgSO ₄	100	8 mM	40
NADP ⁺	15	0,6 mM	20
Probe			var.
Aqua dest.			ad 440
E ₁ (5 min)			
G6PDH	7 U/ml	0,28 U/ml	20
E ₂ (5 min)			
PGI	35 U/ml	1,4 U/ml	20
E ₃ (5 min)			
FBPase	8 U/ml	0,32 U/ml	20
E ₄ (5 min)			

$$\Delta E_{G6P} = E_2 - E_1$$

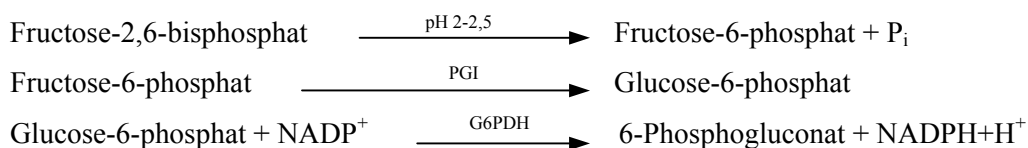
$$\Delta E_{F6P} = E_3 - E_2$$

$$\Delta E_{F1,6P2} = E_4 - E_3$$

*2.4.10.1.5 Fructose-2,6-bisphosphat**Herstellung einer Fructose-2,6-bisphosphat-Standardlösung*

Das von der Firma SIGMA bezogene Fructose-2,6-bisphosphat-Tetranatriumsalz ist stark hygroskopisch, so dass eine genaue Einwaage nicht möglich ist. Daher musste die exakte Konzentration einer Standardlösung vorab über einen enzymatischen Test auf Fructose-6-phosphat vor bzw. nach saurer Hydrolyse des Fructose-2,6-bisphosphats bestimmt werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst 9 mg Substanz in 1 ml 15 mM NaOH gelöst, um eine circa 20 mM Stammlösung zu erhalten. 900 μ l dieser Stammlösung wurden im Gefrierfach (-30°C) aufbewahrt. Die restlichen 100 μ l wurden zwecks exakter Konzentrationsbestimmung 1:10 (v/v) mit 10 mM NaOH verdünnt. 100 μ l dieser verdünnten Lösung wurden auf Eis aufbewahrt (P1), während die restlichen 900 μ l einer milden Säuredenaturierung unterworfen wurden. Hierbei macht man sich die Säurelabilität des Fructose-2,6-bisphosphats zunutze, welches unter den angegebenen Bedingungen innerhalb weniger Minuten zu Fructose-6-phosphat und anorganischem Phosphat (P_i) zerfällt. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Wasserbad (+30°C) wurde der pH-Wert mittels 1 N HCl auf pH 2-2,5 eingestellt und weitere 10 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Neutralisierung mit 1 M NaOH (P2). In beiden Proben wurde der Fructose-6-phosphat-Gehalt bestimmt.

Testprinzip:

Die in der Standardlösung enthaltene Fructose-2,6-bisphosphat-Konzentration berechnet sich aus der Differenz der Fructose-6-phosphat-Konzentrationen vor (P1) bzw. nach saurer Hydrolyse (P2).

Testsystem:

Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μl]
TRAP (pH 7,6)	250 mM	100 mM	200
MgSO ₄	100 mM	8 mM	40
NADP ⁺	15 mM	0,6 mM	20
Probe			var.
G6PDH	7 U/ml	0,28 U/ml	20
Aqua dest.			ad 480
E ₁ (5 min)			
PGI	35 U/ml	1,4 U/ml	20
E ₂ (10 min)			

Isolierung der PP_iPFK

Die für den Fructose-2,6-bisphosphat-Test benötigte pyrophosphatabhängige Fructose-6-phosphat-1-phosphotransferase (PP_i-PFK, PP_i: Fructose-6-phosphat-1-phosphotransferase) wird in unserem Labor selbst isoliert (VAN SCHAFTINGEN 1984). Es handelt sich um ein cytosolisches Dimer, das scheinbar eng mit der ATP-abhängigen PFK verwandt ist. Das Enzym wurde zuerst in Ananasblättern (Reeves *et al.*) und bei *Entamoeba histolytica* entdeckt. Es ist bei höheren Pflanzen (z.B. Kartoffelknollen, Ananasblätter, Spinatblätter, Mungobohnen, Avocadofrucht, Bananen) weit verbreitet, kommt jedoch auch in einigen wenigen Bakterien, parasitische Protisten und Amöben vor. Während bei Pflanzen ATP- und PP_i-abhängige PFKs nebeneinander auftreten, treten bei Protisten beide alternativ auf.

Zur Isolierung des Enzyms bieten sich insbesondere Kartoffelknollen an, da sie in unseren Breitengraden ganzjährig erhältlich sind, einen geringen Gehalt an anorganischem Pyrophosphat aufweisen und das aus ihnen gewonnene Enzym sich als ausgesprochen sensitiv für die Aktivierung durch Fructose-2,6-bisphosphat erwiesen hat. Bereits picomolare

Konzentrationen reichen zur Aktivierung des Enzyms aus. Des weiteren wird die PP_i-PFK durch Effektoren der PFK wie ATP, AMP, Citrat oder PEP kaum beeinflusst.

Die Kartoffeln wurden geschält (Endgewicht: 1 kg), in kleine Stücke geschnitten und in 4 Portionen à 250 g aufgeteilt. Diese wurden in einem Küchenmixer (KRUPS Typ 240) jeweils mit 2 Volumen Extraktionsmedium (v/w, 500 ml) überschichtet und 3 x 15 s homogenisiert. Die Homogenate wurden durch dreifach geschichtete Gaze filtriert und dann das exakte Volumen des Filtrats bestimmt. Durch Zugabe von Natriumpyrophosphat und MgCl₂ in einer Endkonzentration von 2 mM wurde die PP_i-PFK stabilisiert. Der pH-Wert wurde überprüft (4°C) und bei Bedarf erneut auf pH 8,2 eingestellt.

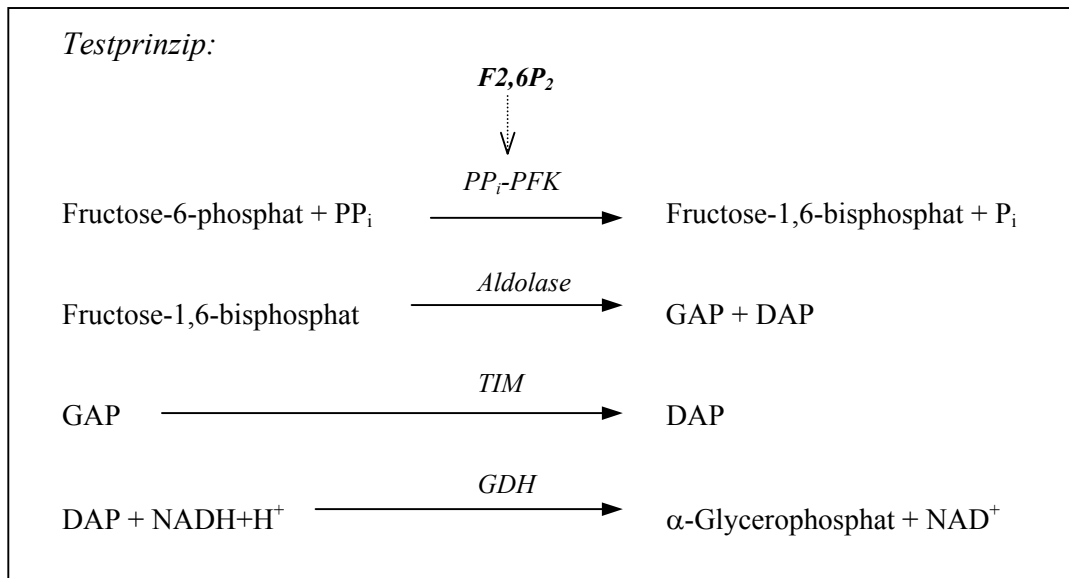
Anschließend wurde das Filtrat auf zwei 2 l Erlenmayerkolben verteilt, in einem Wasserbad unter ständigem Rühren auf 59°C erhitzt und verblieb dort nach Erreichen der Temperatur für weitere 5 Minuten, um hitzesensitive Proteine zu denaturieren. Anschließend wurde die Lösung im Eiswasserbad auf 4°C abgekühlt und der pH-Wert auf pH 7,1 eingestellt.

Im nächsten Schritt wurden die hitzedenaturierten Proteine durch Zugabe von Polyethylenglykol 8000 (6 g/100 ml) unter sorgfältiger Durchmischung gefällt (4°C, ca. 15 min). Die PP_iPFK ist hitzestabil und bleibt daher in Lösung. Nach Zentrifugation (4000g, 10 min) wurde mit dem Überstand nochmals eine Fällung mit Polyethylenglykol 8000 (9 g/100 ml) durchgeführt. Das nach einer weiteren Zentrifugation erhaltene Pellet enthielt die PP_iPFK. Es wurde in 50 ml Puffer resuspendiert und à 1 ml auf Reaktionsgefäße verteilt. Es war bei -80°C über mehrere Monate haltbar.

Im Verlauf der Extraktion wurden mehrere Proben entnommen, um die jeweilige Maximalaktivität zu bestimmen.

Maximalaktivitätstest

Die Maximalaktivität für die aus Kartoffelknollen isolierte PP_iPFK wurde über einen Maximalaktivitätstest mit Fructose-2,6-bisphosphat-Standards (0,6-1 nM) bestimmt.

*Testsystem:*

Substanz	Stammkonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μ l]
Tris-Acetat (pH 8)	100 mM	50 mM	500
Mg-Acetat	100 mM	5 mM	50
NADH	5 mM	0,2 mM	40
Fructose-6-phosphat (sd)	100 mM	5 mM	50
Fructose-2,6-bisphosphat	40 μ M	1 μ M	25
Enzymgemisch			90
Aldolase	45 U/9 ml	0,45 U/ml	
TIM	1000 U/9 ml	10 U/ml	
GDH	340 U/9 ml	3,4 U/ml	
PP_i -PFK			var.
Aqua dest.			ad 950
PP_i ♣	50 mM	2,5 mM	50

Da die PP_i PFK bereits durch millimolare Konzentrationen von Anionen, vor allem polyvalente Anionen, gehemmt wird, mußte die Ammoniumsulfatlösung, in denen die Hilfsenzyme gelöst sind, per Dialyse entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden die Hilfsenzyme gemeinsam in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Ammoniumsulfatlösung) wurde verworfen, während das Sediment in 400 μ l TrisAc NaCl gelöst wurde. Anschließend wurde die Enzymlösung in einen Dialyseschlauch gefüllt und bei 4°C auf einem Magnetrührer 2 h gegen 150 ml Tris Ac NaCl-Puffer dialysiert. Nach 30 und 60 Minuten Dialysezeit wurde der Puffer jeweils ausgetauscht. Abschließend wurde die dialysierte Enzymlösung in ein Glasvial umgefüllt und 4 ml TrisAc NaCl sowie 10 mg BSA zur Stabilisierung zugefügt.

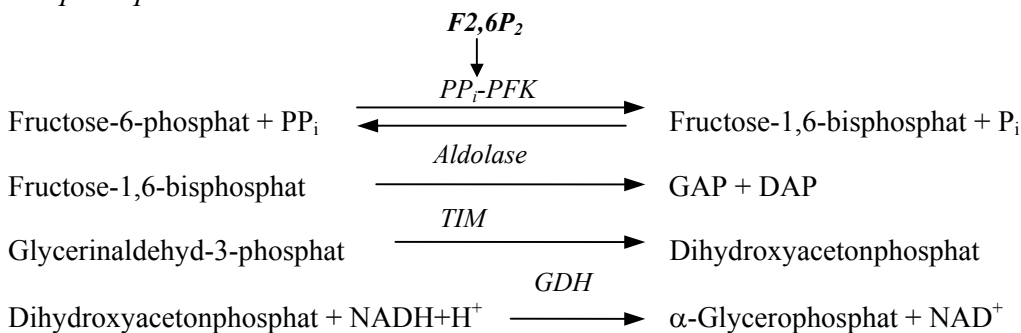
$$\text{PP}_i\text{PFK (U/ml)} = \frac{\Delta E/\text{min} \cdot V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot 2 \cdot V_P}$$

Fructose-2,6-bisphosphat-Test

Früher erfolgte die Messung von Fructose-2,6-bisphosphat vor allem über die Aktivierung der PFK aus der Leber. Allerdings ist dies nicht ganz unproblematisch, unter anderem aufgrund der großen Sensitivität der Fructose-2,6-bisphosphat-Aktivierung auf andere Effektoren oder selbst kleine pH-Veränderungen.

Pflanzliche PP_i-PFK ist um ein Vielfaches sensitiver für Fructose-2,6-bisphosphat und weist stabilere Kinetiken auf, so dass mit Hilfe dieses Enzyms Konzentrationen messbar sind, die unter 1 pM liegen (PFK: 3-15 pM). Die PP_i-PFK bildet Fructose-1,6-bisphosphat in einer reversiblen, leicht umkehrbaren Reaktion. Im Gegensatz zur PFK ist das Enzym absolut von Pyrophosphat (anstelle von ATP) als Phosphatdonator abhängig. Die Aktivierung der PP_i-PFK durch Fructose-2,6-bisphosphat wird über eine Senkung des K_m-Wertes (deutliche Erhöhung der Affinität für Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat) und eine damit verbundene Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Die Aktivierbarkeit der PP_i-PFK ist im Bereich von 0,1-1 nM proportional zur Fructose-2,6-bisphosphat-Konzentration. Die Bestimmung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes im Fettkörpergewebe erfolgte mittels eines zusammengesetzten Enzymtests der auf der aktivierenden Wirkung des Fructose-2,6-bisphosphats auf die pyrophosphatabhängige Fructose-6-phosphat-1-phosphotransferase (SABULARSE & ANDERSON) bei niedrigen Fructose-6-phosphat-Konzentrationen beruht.

Testprinzip:



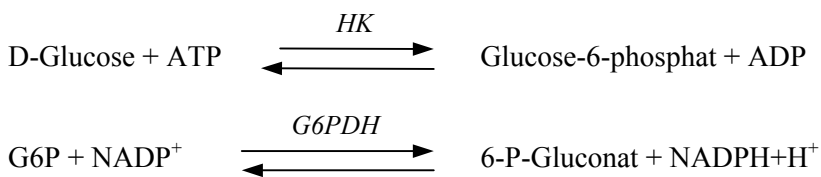
Ausgehend von einer 4 nM Fructose-2,6-bisphosphat-Stammlösung wurden durch Verdünnung mit Aqua dest. Fructose-2,6-bisphosphat-Standards für eine Standardgerade hergestellt:

Konzentration [nM]	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
4 nM Fructose 2,6-bisphosphat [μ l]	12,5	25	50	75	100	125
Aqua dest. [μ l]	162,5	150	125	100	75	50

Testsystem:

Substanz	Testkonzentration	Einsatzmenge [μ l]
Reagenziengemisch		250
Tris-Acetat (pH 8)	50 mM	
Mg-Acetat	2 mM	
NADH	0,15 mM	
Fructose 6-phosphat	1 mM	
Enzymgemisch		50
Aldolase	0,45 U/ml	
Triosephosphat-Isomerase	10 U/ml	
GDH	3,4 U/ml	
PP _i -PFK	0,01 U/ml	
Überstand der Gewebeprobe		var.
PP _i ♣	0,5 mM	25
Aqua dest.		ad 500

2.4.10.1.6 D-Glucose

Testprinzip:

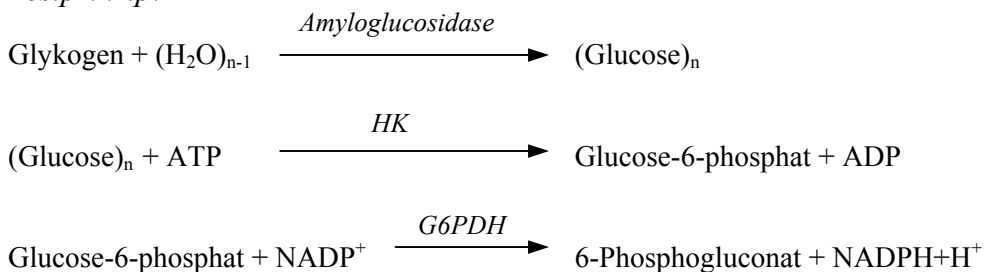
Testsystem:

Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μl]
TRAP (pH 7,6)	250	100 mM	300
MgCl ₂	100	8 mM	40
NADP ⁺	15	0,6 mM	20
ATP	25	1 mM	20
Probe			var.
Aqua dest.			ad 440
E ₁			
G6PDH	7 U/ml	0,28 U/ml	20
E ₂			
HK	28 U/ml	1,12 U/ml	20
E ₃			

$$\Delta E_{\text{Glucose}} = E_3 - E_2$$

2.4.10.1.7 Glykogen

Das in den Proben enthaltene Glykogen wurde mittels Amyloglucosidase (α -D-Glucan-glucohydrolase, EC 3.2.1.3) enzymatisch hydrolysiert und die entstehende Glucose photometrisch bestimmt.

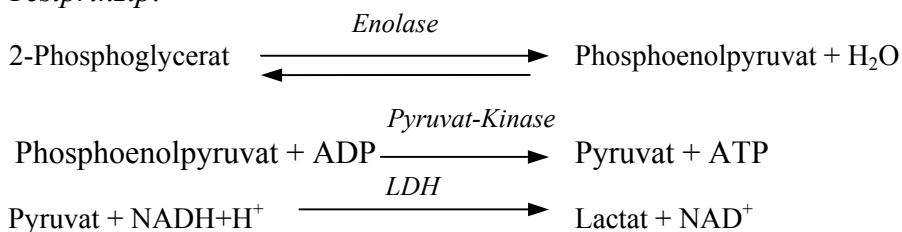
Testprinzip:

Zu diesem Zweck wurden die aus der sauren Aufarbeitung (s. 2.4.9.1) stammenden Sedimente (S3, S4) jeweils in 150 μl Aqua dest. resuspendiert und zweimal 5 s beschallt (BRANSON Sonifier, Mikrospitze, Stufe 1). Zur resultierenden Suspension wurden 200 μl Amyloglucosidase (67 U/ml, in 500 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,8) zugegeben, während zu 20 μl des Gewebeextraktes (Ü, vereinigte Überstände der sauren Aufarbeitung) 27 μl Amyloglucosidase hinzugefügt wurden. Im Wasserbad bei +50°C erfolgte eine 3-stündige Inkubation. Anschließend wurden die Hydrolysate auf +4°C abgekühlt. Vor Einsatz in den Test wurden die Hydrolysate der Sedimente nochmals 2 min bei 10.000 g (4°C) zentrifugiert.

Testsystem:

Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μ l]
TRAP (pH 7,6)	250 mM	150 mM	300
MgCl ₂	100 mM	8 mM	40
NADP ⁺	15 mM	0,6 mM	20
ATP	25 mM	1 mM	20
G6PDH	7,5 U	0,3 U/ml	20
Hydrolysat			var.
Aqua dest.			ad 480
E1 (5 min)			
HK	28 U	1,12 U/ml	20
E2 (5 min)			

Üblicherweise wird zusätzlich noch die in den Überständen enthaltene freie Glucosemenge bestimmt. Im Fettkörpergewebe muß der Gehalt an freier Glucose jedoch nicht gesondert berücksichtigt werden, da er nur 0,1 % der durch Hydrolyse des Glykogens freigesetzten Glucoseeinheiten entspricht (Glucosegehalt: $0,209 \pm 0,07 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (n=5); Glykogengehalt: $337,81 \pm 53,51 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (n=5)) und somit im Bereich des Meßfehlers liegt.

2.4.10.1.8 *Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat**Testprinzip:*

Testsystem:

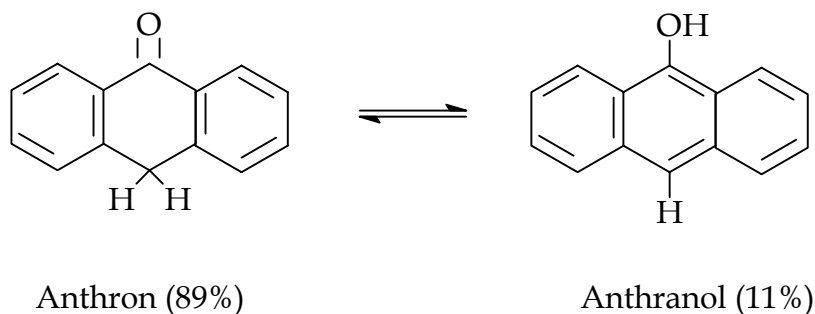
Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μ l]
TRAP (pH 7,6)	250 mM	100 mM	200
KCl	75 mM	6 mM	40
MgSO ₄	100 mM	8 mM	40
ADP	25 mM	1 mM	20
NADH	2,5 mM	0,1 mM	20
Probe			var.
Aqua dest.			ad 460
E ₁ (5 min)			
LDH	90 U/ml	3,6 U/ml	20
E ₂ (5 min)			
PK	40 U/ml	1,6 U/ml	20
E ₃ (5 min)			

$$\Delta E_{\text{PEP}} = E_3 - E_2$$

2.4.10.1.9 Trehalose

I. Anthron-Test: Colorimetrische Bestimmung (Fettkörper)

Die während der Inkubation vom Fettkörper ins Medium abgegebene Trehalosemenge wurde über den Anthron-Test bestimmt (ROE 1955, CAROLL *et al.* 1956). Löst man das farblose Anthron (9(10 H)-Anthracenon) in Schwefelsäure, so enthält das entstehende braungelbe Anthron-Reagenz das Ketotautomer (Anthron) und das Enoltautomer (Anthranol) im Verhältnis 89:11 (BEYER & WALTER 1981).

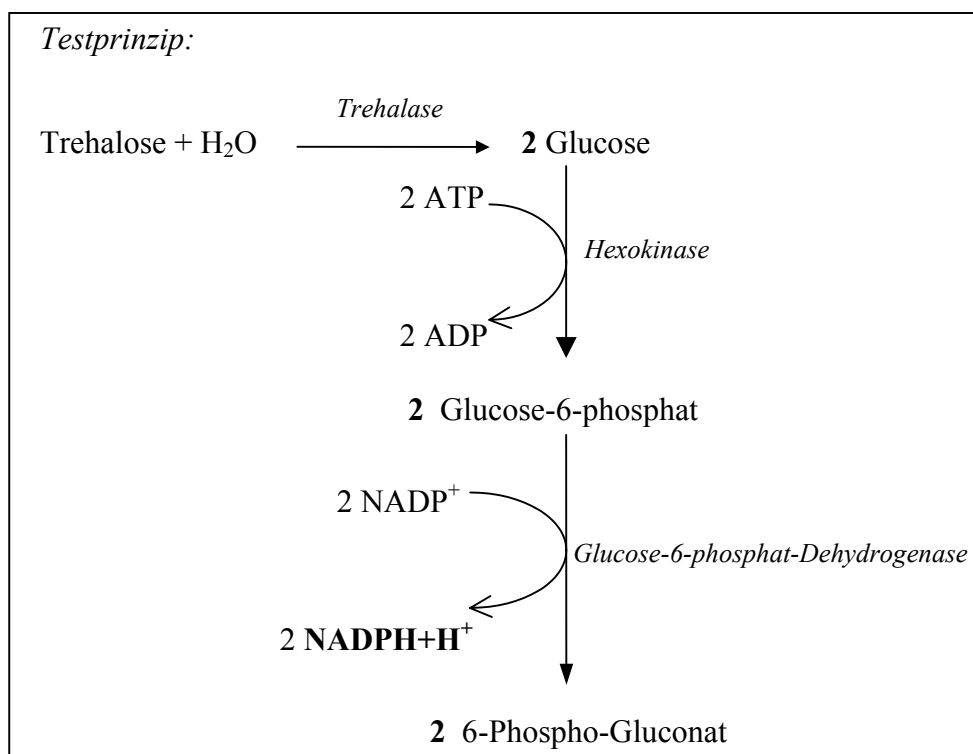


Erhitzt man Kohlenhydrate in Anwesenheit von Säure, so entstehen Furanderivate, die mit Anthranol zu Farbstoffkomplexen blauer Färbung kondensieren (HANKE *et al.* 1977). Die Farbstoffkomplexe können photometrisch ($\lambda=620$ nm) nachgewiesen werden, da die Extinktion proportional zur Kohlenhydratkonzentration ist. Grundsätzlich reagiert Anthranol mit einer Vielzahl von Kohlenhydraten, da die Trehalose jedoch mindestens 95 % der *in vitro* vom Fettkörper der Schaben abgegebenen Kohlenhydrate stellt, kann der Test in unserem Fall als spezifisch für Trehalose angesehen werden (STEELE *et al.* 1984, BECKER 1996).

Für die Konzentrationsbestimmung war es zunächst notwendig, mittels eines Trehalosestandard (0,4 mg/ml) eine Standardgerade zu erstellen (0-60 µg Trehalose). 60 µl der jeweiligen Überstände aus der Inkubation wurden mit Aqua dest. auf 200 µl aufgefüllt und dann, ebenso wie die Trehalosestandards, auf Eis gestellt. Auf dem Eisbad wurden zu jedem Ansatz 1000 µl Anthron-Reagenz hinzugefügt. Alle Testansätze wurde dann mit Hilfe eines Rüttlers gut durchmischt (~ 5 s), 15 min in einem Wasserbad (+100°C) gekocht, für 15 min in einem Eisbad unter Lichtabschluß abgekühlt und für weitere 15 min unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dann wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=620$ nm die Extinktion an einem Photometer (ZEISS PM2D) gegen einen Leerwert (Trehalosestandard mit 0 µg Trehalose) bestimmt. Mit Hilfe der Standardgeraden konnte die Trehalosekonzentration in den Proben berechnet werden.

II. Trehalase-Test: Photometrische Bestimmung (Trophocyten)

Die nach Inkubation isolierter Trophocyten in den Inkubationsmedien enthaltenen Trehalosekonzentrationen sind so gering, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze des bei den Fettkörpern angewendeten Anthron-Tests liegen (d.h. im nmol-Bereich). Daher wurde bei den Trophocyten ein empfindlicherer enzymatischer Test eingesetzt.



Einengung der Enzymlösung:

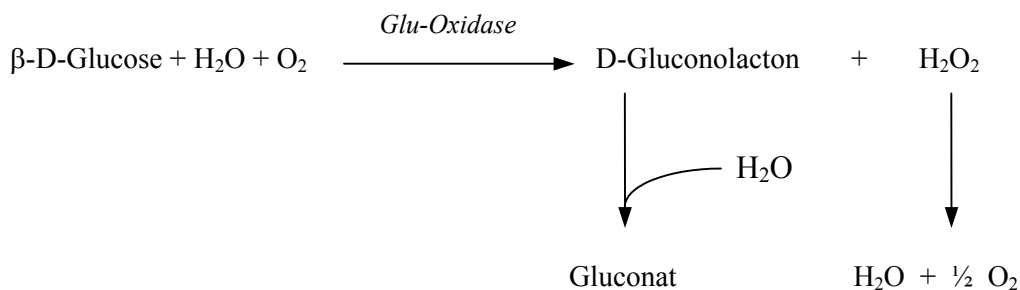
Da die Trehalase von BOEHRINGER nur mit einer Enzymaktivität von 5 U/19 ml vertrieben wird, mußte das Enzym vor Testbeginn eingengt werden. Zu diesem Zweck wurde

eine Ultrafiltrationsmembran (DIAFLO, Porengröße: YM 30) 2 h in Aqua dest. eingelegt, um Glycerin und Natriumazid auszuwaschen, die die Membran bei längerer Lagerung vor dem Austrocknen schützen sollen. Das Aqua dest. wurde jeweils nach 45 bzw. 90 min erneuert. Anschließend wurde die Membran mit der glatten Fläche nach oben in eine Magnetrührzelle (AMICON Magnetrührzelle 8010) gelegt und die Trehalase eingefüllt. In der Kühlkammer (+4°C) wurde das Enzym auf einem Magnetrührer bei einem Druck von 3,3 bar eingengt und konnte dann bis zur Durchführung des Tests im Gefrierfach (-30°C) aufbewahrt werden.

Inkubation mit Glucose-Oxidase:

Vor dem eigentlichen Test mußte die aus der Insekten-Ringerlösung (für isolierte Trophocyten; s. 2.3) stammende Glucose entfernt werden, da sie ansonsten den Test gestört hätte. Zu diesem Zweck wurden zum Inkubationsmedium 10 U Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4) hinzugefügt und das Reaktionsgefäß anschließend im Wasserbad bei +35°C für 1 h inkubiert. Im Verlauf dieser Inkubation wurde die Probe zweimal (nach 20 und 40 min) mit Sauerstoff durchperlt, um die Reaktion zu beschleunigen. Die Glucose wird durch das Enzym zu Gluconolacton oxidiert. Um anschließend eine vollständige Denaturierung der Glucose-Oxidase zu erreichen, wurde die Lösung für 10 min auf +90°C erhitzt.

Testprinzip:



Testsystem:

Substanz	Vorratskonzentration	Testkonzentration	Einsatzmenge [μ l]
KAc-Puffer (pH 6,5)	300 mM	120 mM	200
MgCl ₂	250 mM	10 mM	20
NADP ⁺	15 mM	0,6 mM	20
ATP	25 mM	1 mM	20
G6PDH	2,1 U/ml	0,84 U/ml	20
HK	33,5 U/ml	1,34 U/ml	20
Probe			var.
Trehalase ♣	var.	0,38 U/ml	var.
Aqua dest.			ad 500

Temperatur: 45 °C

Vor Zugabe des Inkubationsmediums zum Test wurden die Proben noch einmal 3 min abzentrifugiert (EPPENDORF Mikrofuge 5412, 10.000 g), so dass sich das ausgefallene Protein als Sediment absetzte und nicht als Verunreinigung in den Test eingebracht wurde. Sofort nach Zugabe der Trehalase wurde die Extinktion bestimmt (Anfangs-Extinktion: E_A). Danach wurde die Küvette mit 2 Lagen Parafilm (AMERICAN NATIONAL CAN, Greenwich, USA) verschlossen und im Trockenschrank (+45°C) aufbewahrt. Nach 30 min wurde die Extinktion in kurzen Abständen regelmäßig kontrolliert, bis ein Maximalwert erreicht war. Dieser Wert wurde dann als End-Extinktion (E_E) notiert.

2.4.10.2 Berechnung der Metabolitkonzentrationen

Nähere Informationen zu den verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis (s. Kapitel 7) zu finden.

2.4.10.2.1 Allgemein

$$\text{Metabolitkonzentration} = \frac{(\Delta E - \Delta E_L) \cdot V_T \cdot F_H}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P}$$

$$F_H = \frac{V_{PS} + V_N + V_E}{F_g}$$

2.4.10.2.2 Fructose-2,6-bisphosphat

A. Allgemein

$$F_{2,6P_2} [\text{nmol} \cdot \text{g Friergewicht}^{-1}] = \frac{(F_{2,6P_2})_K \cdot V_T \cdot V_{f_1} \cdot V_{f_2}}{1000 \cdot V_P}$$

mit V_{f_1} : Verdünnungsfaktor 1 (11)
 (Verdünnung mit 10-fachem Volumen des Friergewichtes an NaOH)
 V_{f_2} : Verdünnungsfaktor 2 (10)
 (Verdünnung von 50 μl Überstand mit 450 μl NaOH)

B. Fructose-2,6-bisphosphat-Stammlösung

	Leerwert ohne Enzym	Probe 1	Probe 2	Leerwert ohne Substrat	
E_1	a	d	g	j	säuredenaturiert (sd)
E_2	b	e	h	k	
ΔE	c	f	i	l	
E_1	m	p	s	v	nicht säuredenaturiert (nsd)
E_2	n	q	t	w	
ΔE	o	r	u	x	

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

$$\Delta E_{sd} = \frac{f + i}{2}$$

$$\Delta E_{nsd} = \frac{r + u}{2}$$

$$\Delta E_{\text{Leerwert}} = \frac{c + l}{2}$$

$$c (\text{Fructose-6-phosphat}_{sd}) = \frac{(\Delta E - \Delta E_L) \cdot V_T \cdot F_1 \cdot F_2}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P}$$

$$c (\text{Fructose-6-phosphat}_{nsd}) = \frac{(\Delta E - \Delta E_L) \cdot V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P}$$

Nach Berechnung der Konzentrationsänderung durch Verdünnung mit HCl und NaOH während der Säuredenaturierung kann der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt wie folgt berechnet werden:

$$F_{2,6P_2} [\text{mmol/l}] = F_{6P}\text{-Gehalt säuredenaturiert} - F_{6P}\text{-Gehalt nicht säuredenaturiert}$$

2.4.10.2.3 Glykogen

Gewebsextrakt (Ü):

$$\text{Glykogengehalt } [\mu\text{mol Glucoseeinheiten} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Gewebe}] = \frac{(\Delta E - \Delta E_1) \cdot V_t \cdot F_1 \cdot F_2}{\varepsilon \cdot d \cdot V_p}$$

F_1 : Verdünnungsfaktor durch Amyloglucosidase

F_2 : Homogenisationsfaktor

$$F_2 = \frac{G_w + V_1 + V_2}{F_g}$$

G_w : Wassergehalt des Gewebes (75% von G (w/w) [mg])

V_1 : Volumen Perchlorsäure [μl]

V_2 : Volumen Methylorange + K_2CO_3 [μl]

Sedimente:

$$\text{Glykogengehalt } [\mu\text{mol Glucoseeinheiten} \cdot \text{g Gewebe}^{-1}] = \frac{(\Delta E - \Delta E_1) \cdot V_t \cdot F_3}{\varepsilon \cdot d \cdot V_p}$$

Verdünnungsfaktor:

$$F_3 = \frac{V}{F_g}$$

mit V : Amyloglucosidase-Lösung [μl]

Zur Bestimmung des Gesamtglykogengehaltes ($\mu\text{mol Glucose} \cdot \text{g Gewebe}^{-1}$) wurden die Glykogengehalte im Gewebsextrakt und den beiden Sedimenten addiert.

2.4.10.2.4 Trehalose

A. Anthron-Test

Trehalosekonzentration pro g Fettkörper und Minute :

$$\text{Trh}_I [\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}] = \frac{\text{Trh}_K \cdot V_I}{V_P \cdot \text{MG}_{\text{Trh}} \cdot F_g \cdot t}$$

mit Trh_I : Trehalosekonzentration im Inkubationsmedium
 Trh_K : Trehalosekonzentration in der Küvette (ermittelt über die Standardgerade)
 V_I : Inkubationsvolumen (2000 μl)
 MG_{Trh} : Molekulargewicht der Trehalose (343,3 g/mol)

B. Trehalase-Test

$$\Delta E = E_E - E_A$$

$$\text{Trehalosegehalt [nmol} \cdot 100.000 \text{ Zellen}^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot V_T \cdot V_f \cdot 100.000}{\varepsilon \cdot V_P \cdot U_q \cdot U_f \cdot (\text{Zellzahl}/250 \mu\text{l})}$$

mit:

V_f : Verdünnungsfaktor durch Glucose-Oxidase (208/200)
 U_q : Umrechnungsquotient von Glucose- auf Trehalosekonzentration (2)
 U_f : Umrechnungsfaktor für Konzentrationsangabe in [pmol/250 μl]

2.4.11 UNTERSUCHUNGEN MIT ISOLIERTEN TROPHOCYTEN

2.4.11.1 Isolierung der Trophocyten

Das Verfahren zur Trennung der Zelltypen des Schabenfettkörpers beruht auf einer Methode, die 1995 von MICHAEL J. LEE und GRAHAM J. GOLDSWORTHY (Universität London) für den Fettkörper von *Locusta migratoria* veröffentlicht wurde.

Zunächst wurden die Fettkörper von 10 adulten, männlichen Schaben in Ca^{2+} -freier Insekten-Ringerlösung (für isolierte Trophocyten) präpariert und mit zwei feinen Pinzetten vorsichtig zerzupft. Nach einer sechsminütigen Ruhephase wurden jeweils zwei Fettkörper gemeinsam in einem 25 ml Plastikgefäß in 2 ml einer vorgewärmten Ca^{2+} -freien Insekten-Ringerlösung, die α -Chymotrypsin (0,25 %) und DNase I (0,1 %) enthielt, in einem Schüttelwasserbad (bei $+30^\circ\text{C}$, Schüttelfrequenz: 85 min^{-1}) für eine Stunde inkubiert.

α -Chymotrypsin ist eine Serin-Endopeptidase, die Proteine am C-Terminus von hydrophoben, aromatischen Aminosäuren (Tyr, Phe, Trp) und solchen mit sperrigen, polaren Resten hydrolysiert. Es wird in der Bauchspeicheldrüse von Vertebraten produziert. Bei der Trophocytenisolierung diente es zur Spaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix und somit zur Disaggregation des Fettkörpergewebes. Desoxyribonuclease I soll aus zerstörten Zellen austretende DNA spalten, die die Zellen verkleben würde.

Während der Inkubation wurde die Gewebssuspension nach 30 und 60 Minuten mit einer Pipette (EPPENDORF Multiplex, 2,5 ml Pipettenspitze, Öffnung, zur Minimierung von Scherkräften, mit Hilfe einer erhitzten Nadel auf einen Durchmesser von ca. 2 mm erweitert) siebenmal sehr vorsichtig aufgezogen, um die Disaggregation des Gewebes zu unterstützen.

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension durch ein Metallsieb (Maschenweite: 0,5 mm) filtriert, um Tracheen- und Chitinreste zu entfernen und anschließend auf zwei Zentrifugenröhrchen (FALCON, 20 ml) verteilt. Das Metallsieb und die Plastikgefäße wurden mit 8 ml BSA-Lösung nachgespült. BSA (bovines serum albumin, Albumin aus Rinderserum) diente als Substrat für das Chymotrypsin und sättigte das Enzym ab, um so die Disaggregation des Fettkörpergewebes zu beenden. Bei der folgenden Zentrifugation (HETTICH Universal II Tischzentrifuge, 450 Upm, 6 min) sammelten sich die spezifisch leichteren Trophocyten an der Oberfläche der Suspension, während Uratzellen und Mycetocyten sowie nicht disaggregierte Gewebestücke und Zelltrümmer als lockeres zweischichtiges Sediment sedimentiert wurden.

Die oberhalb des Sediments befindliche Spülflüssigkeit (BSA-Lösung) wurde dekantiert und auf zwei *cell harvester* (STEELE & IRELAND 1994) verteilt. Der *cell harvester* (s. Abb. 18) ist eine umgearbeitete 10 ml Einwegspritze (BRAUN MELSUNGEN) mit einer verkürzten Kanüle, über die ein Polyethylen-Schlauch (PHARMACIA BIOTECH, Kapillarschlauch Nr.:19-0040-01) gezogen war. Mittels eines Klebebandes konnte das Ende des Schlauches so am oberen Ende der Spritze befestigt werden, dass die Lösung während der Zentrifugation (HETTICH Universal II Tischzentrifuge, 450 Upm, 6 min) nicht auslief.

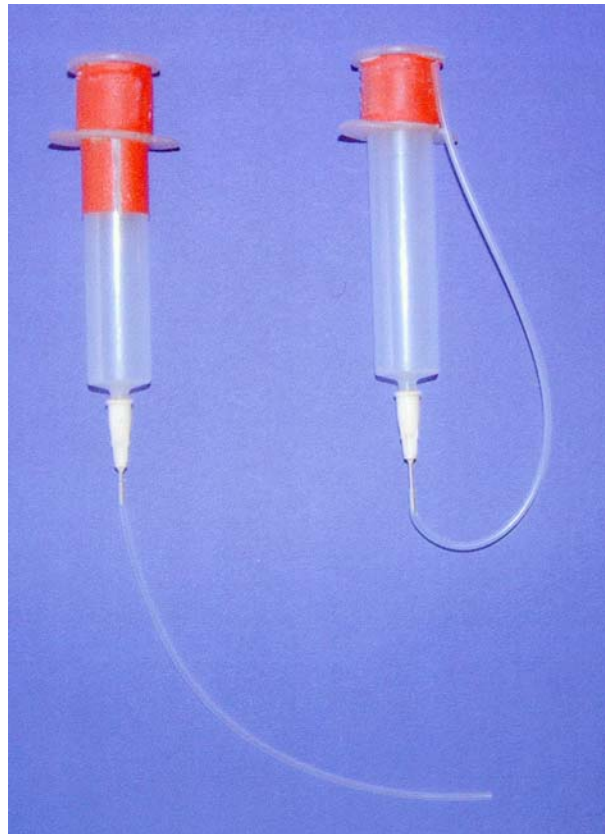


Abbildung 18: *Cell harvester*.

Die Öffnung des cell harvesters wurde zusätzlich mit 2 Lagen Parafilm (American Nation Can, Greenwich, USA) verschlossen. Nach der Zentrifugation wurde das Klebeband gelöst, so dass die Lösung, die den größten Teil der Chymotrypsin-Aktivität enthielt, über den Schlauch abgelassen werden konnte, bis nur noch die oben schwimmenden Trophocyten in ca. 200 μ l Lösung zurückblieben.

Der Waschschrift wurde mit 10 ml frischer BSA-Lösung wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit über den Schlauch abgelassen und die zurückbleibenden Trophocyten in 8 ml SBTI-Lösung resuspendiert. SBTI (*soybean trypsin inhibitor*) ist ein Trypsin-Inhibitor, der aus Sojabohnen gewonnen wird und die weitere Proteolyse durch Reste von α -Chymotrypsin unterbinden sollte.

Anschließend ruhte die Zellsuspension 1h, damit sich die Zellen von der Separierung erholen können. Es folgte ein weiterer Waschschrift in SBTI-Lösung (wie zuvor), die Trophocyten aus beiden *cell harvestern* wurden vereinigt und in 4 ml Ca^{2+} -haltiger Insekten-Ringerlösung (für isolierte Trophocyten) suspendiert. Nach der Zelltrennung reagierten die isolierten Trophocyten auf das Neuropeptid mit einer gesteigerten Trehalosesynthese.

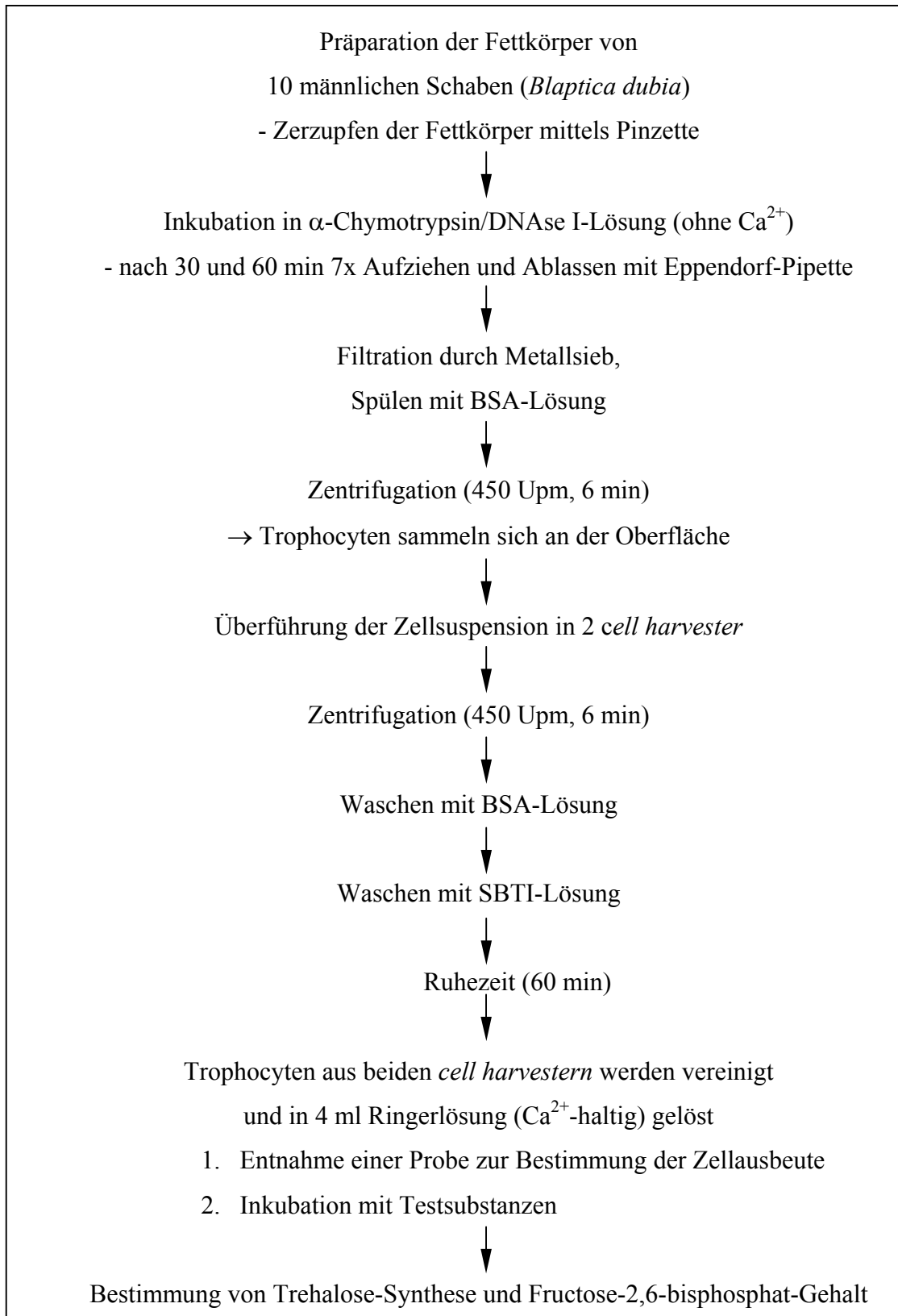


Abbildung 19: Methode der Trophocyten-Separierung.

2.4.11.2 Bestimmung der Zellausbeute

10 μl der Trophocyten-Suspension wurden auf dem mittleren Steg eines Hämocytometers (NEUBAUER Zählkammer, Kammertiefe: 0,1 mm) am Rand des Deckglases aufgetragen. Die Lösung wurde aufgrund von Adhäsionskräften unter das Deckglas gezogen. Vier Quadrate, die aus jeweils 16 Einzelquadraten aufgebaut sind (s. Abb. 20), wurden mit Hilfe eines Mikroskopes (REICHERT Austria, Typ 7940, 10er Objektiv) ausgezählt und aus den Ergebnissen ein Mittelwert gebildet.

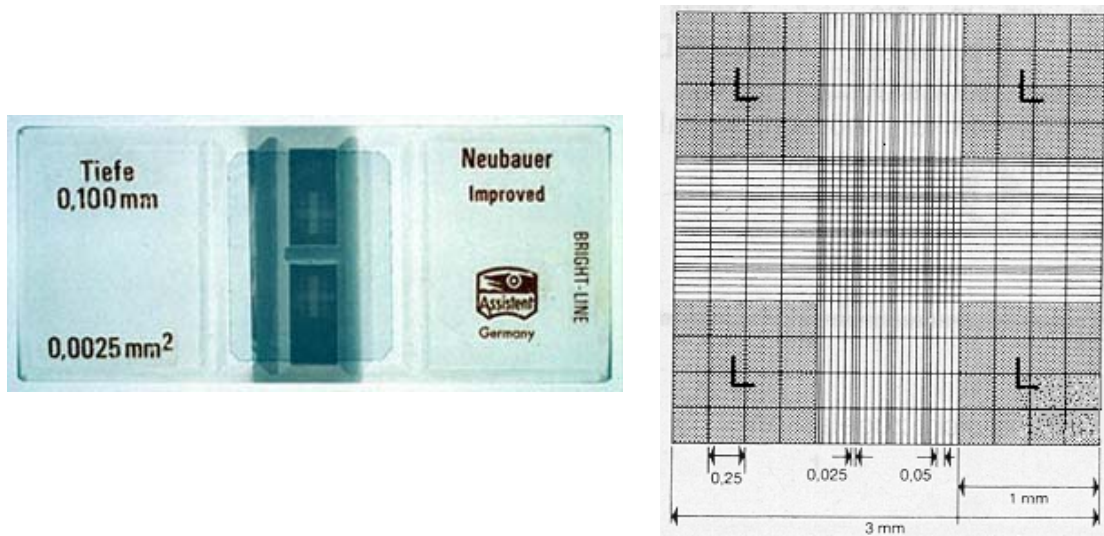


Abbildung 20: Zählkammer nach Neubauer - Das Zählnetz besteht aus 9 Großquadraten à 1 mm². Die 4 Großquadrate in den Ecken des Zählnetzes (gekennzeichnet mit L) sind in 16 kleinere Quadrate unterteilt (Seitenlänge: 0,25 mm). Zur Bestimmung der Zellzahl werden diese 4 Großquadrate ausgezählt. (Foto Neubauer Kammer: © <http://www.aum.iawf.unibe.ch>).

Berechnung:

$$\text{Mittelwert} = \frac{Z_{Q1} + Z_{Q2} + Z_{Q3} + Z_{Q4}}{4}$$

mit Z_Q : Zellzahl im jeweiligen Quadrat

Zellzahl · ml ⁻¹	= Mittelwert · 10 ⁴
Zellzahl · 250 μl^{-1}	= (Zellzahl · ml ⁻¹) ÷ 4
Zellzahl · 250 μl^{-1} · (g Fettkörper ⁻¹)	= (Zellzahl · 250 μl^{-1}) ÷ (Gesamtgewicht der Fettkörper)

2.4.11.3 Überprüfung der Zellpermeabilität

Zur Überprüfung der Vitalität und Permeabilität der isolierten Trophocyten wurde der Farbstoff Trypanblau eingesetzt. 50 μl der Zellsuspension wurden nach der Ruhephase 1:1 mit 0,4 %iger Trypanblaulösung vermischt und 15 Minuten inkubiert (Wasserbad +30°C). Während

der Inkubation wurde die Lösung regelmäßig durch vorsichtiges Schwenken durchmischt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer Zählkammer (NEUBAUER, Kammertiefe 0,1 mm) mikroskopisch (REICHERT Austria, Typ 7940, 20er Objektiv) ausgezählt (siehe auch 2.4.11.2).

Trypanblau kann die intakte Zellmembran vitaler Zellen nicht passieren, der Farbstoff wird ausgeschlossen und das Zellinnere nicht angefärbt. Bei permeablen Zellen hingegen dringt der Farbstoff ins Cytoplasma ein und färbt selektiv die toten Zellen an (Trypanblauausschlussmethode).

2.4.11.4 Permeabilisierung mit Saponin

Zur Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen von Trophocyten im Rahmen von Untersuchungen mit IP_3 wurden die Fettkörperzellen nach der Isolierung in 4 ml Ca^{2+} -freier Insekten-Ringerlösung suspendiert. 1 ml der Zellsuspension wurde im cell harvester für 5-20 Minuten in einem $+30^\circ C$ Wasserbad mit Saponin (75 $\mu g/ml$ bzw. 150 $\mu g/ml$) inkubiert. Während der Inkubation wurde die Lösung regelmäßig sorgfältig durchmischt. Anschließend wurden die Trophocyten mehrfach mit Ca^{2+} -freier Insekten-Ringerlösung gewaschen (Zentrifugation: 500-750 Upm, 4 min) und dann in 1 ml Ca^{2+} -haltiger Insekten-Ringerlösung suspendiert. Zum Abschluss wurde eine Zellprobe 15 Minuten mit Trypanblaulösung (0,4 %) inkubiert (s. 2.4.11.3), um die Permeabilität der Zellmembranen zu überprüfen.

2.4.11.5 Inkubation isolierter Trophocyten

Sofort nach der Separierung wurden von der Zellsuspension je 800 μl abgezogen und in 25 ml Glasgefäßen mit 800 μl Ca^{2+} -haltiger Ringerlösung mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert (30 min bei $+30^\circ C$ in einem Schüttelwasserbad, Schüttelfrequenz: 85 min^{-1}). Danach wurden die Zellsuspensionen noch einmal sorgfältig durchmischt, je Glasgefäß drei Proben a 250 μl in Reaktionsgefäße (EPPENDORF, Safe-Lock 0,5 ml, #0030121.023) überführt und für 5 min zentrifugiert (HETTICH Universal II Tischzentrifuge, 750 Upm). Hierbei setzte sich auf der Oberfläche der Lösung eine Trophocytenschicht ab. Sie wurde mit einer extra feinen Pipettenspitze (ROTH, Multi®Flex-Tips, 1-200 μl , rund) vorsichtig durchstoßen, und 200 μl des Inkubationsmediums wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (Lagerung bei $-30^\circ C$). Im Inkubationsmedium konnte die von den Trophocyten abgegebene Trehalosemenge bestimmt werden (s. Trehalase-Test 2.4.10.1.9). Die 0,5 ml Reaktionsgefäße mit den Adipocyten wurden bis zur Aufarbeitung für den Fructose-2,6-bisphosphat-Test in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.4.11.6 Aufarbeitung der Trophocyten

2.4.11.6.1 Saure Aufarbeitung (Metabolite allgemein)

Die Methode der sauren Aufarbeitung der Trophocyten entspricht dem Verfahren zur sauren Aufarbeitung des Fettkörpergewebes (s. 2.4.9.1).

2.4.11.6.2 Basische Aufarbeitung (Fructose-2,6-bisphosphat)

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellproben wurden mit 200 µl 50 mM NaOH versetzt und mittels Ultraschall (BRANSON Sonifier, Mikrospitze, Stufe 3) circa 25 s homogenisiert. Dann wurden sie für 5 min in ein +80°C Wasserbad gestellt, um eine vollständige Denaturierung der in den Proben enthaltenen Proteine zu erreichen und schließlich für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert (EPPENDORF Mikrofuge 5412). An der Oberfläche setzte sich eine Fettschicht ab. Sie wurde mit einer extra feinen Pipettenspitze (ROTH, Multi@Flex-Tips, 1-200 µl, rund) vorsichtig durchstoßen, um soviel wie möglich des wässrigen Überstandes abzunehmen. Dabei sollten möglichst keine Verunreinigungen aus der Fettschicht mit in die Probe eingebracht werden. Der Überstand konnte bei -30°C aufbewahrt werden und wurde dann unverdünnt in den Fructose-2,6-bisphosphat-Test eingesetzt.

2.4.12 MIKROFLUOROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN VON Ca^{2+} -STRÖMEN AN ISOLIERTEN TROPHOCYTEN

Der polyzyklische Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 ist geeignet, um die Wirkung von Substanzen auf die Ca^{2+} -Konzentration isolierter Zellen zu untersuchen. Fura-2 zählt zu einer relativ neuen Familie von stark fluoreszierenden, sehr sensitiven Ca^{2+} -Indikatoren, die nach dem Vorbild des Ca^{2+} -Chelators EGTA entwickelt wurden und daher eine sehr ähnliche Struktur wie dieser aufweisen (s. Abb. 21). Mit Hilfe von Fura-2 kann die Konzentration an freiem Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$ = freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration) sowie deren Veränderung in Einzelzellen bestimmt werden.

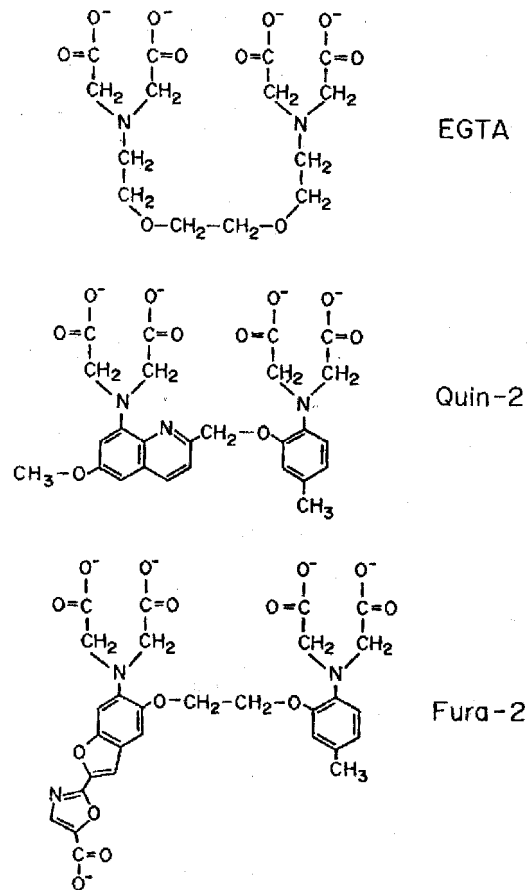


Abbildung 21: Vergleich der Struktur des Ca^{2+} -Chelators EGTA mit den Fluoreszenzfarbstoffen Quin 2 und Fura-2.

Vorteile von Fura-2 gegenüber anderen Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. dem Vorläufer Quin 2) sind folgende:

- stärkere Fluoreszenzintensität (~30-fach)
- verbesserte Selektivität für Ca^{2+} gegenüber anderen divalenten Ionen (z.B. Mg^{2+} , Schwermetalle)
- stärkere Resistenz gegenüber Lichtbleichung ("Photobleaching") ermöglicht Messungen über mehrere Stunden
- deutlichere Verschiebung des Anregungsmaximums bei Ca^{2+} - Bindung
- höhere Sensitivität die erlaubt, die Zellen mit geringeren Mengen an Farbstoff zu beladen, so dass toxische Effekte und Artefakte vermindert sind

Die Salzform Fura-2 ist nicht membrangängig, so dass der Farbstoff nicht direkt eingesetzt werden kann. Der Acetoxymethylester Fura-2-AM ist ein lipophiles, membranpermeables Derivat von Fura-2, das zusätzlich 5 $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ -Reste trägt. Es wird benutzt, um den Chelator in vitale Zellen einzubringen, in denen dann intrazelluläre cytosolische Esterasen es zum aktiven,

calciumsensitiven Fura-2 hydrolysieren, welches aufgrund seiner fehlenden Membrangängigkeit im Cytosol der Zelle gefangen bleibt.

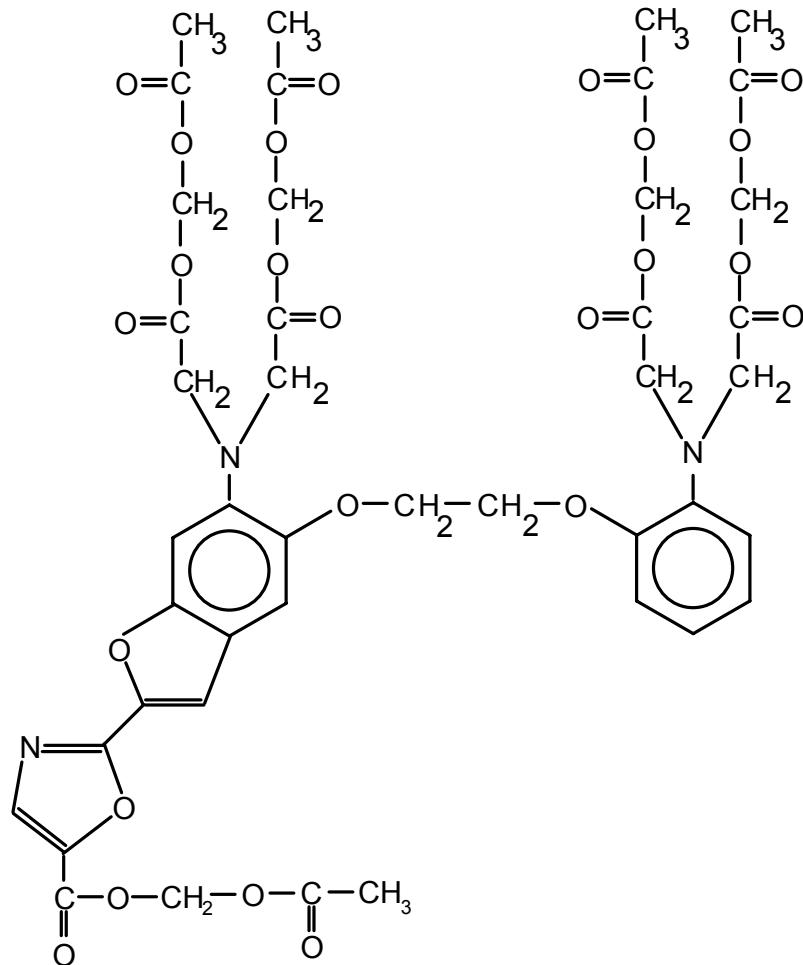


Abbildung 22: Strukturformel von Fura-2-AM.

Die mit Fura-2 beladenen Zellen werden mittels eines Invertmikroskops und einer Epifluoreszenzeinrichtung im schnellen Wechsel mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt, wobei die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes bei 510 nm gemessen wird. Die Aufzeichnung der Meßwerte erfolgt mit Photomultipliern im Bereich von ms.

Bei Ca^{2+} -Bindung werden die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Fura-2 verändert und es erfolgt eine spektrale Verschiebung des Anregungsmaximums. Während das Ca^{2+} -freie Fura 2 ein Anregungsmaximum von 380 nm aufweist, liegt das Maximum nach Ca^{2+} -Bindung bei 340 nm. Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol (= Erhöhung der Konzentration an Fura-2- Ca^{2+} -Komplexen) führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Anregung mit 340 nm, wogegen diejenige nach Anregung mit 380 nm sinkt (s. Abb. 23).

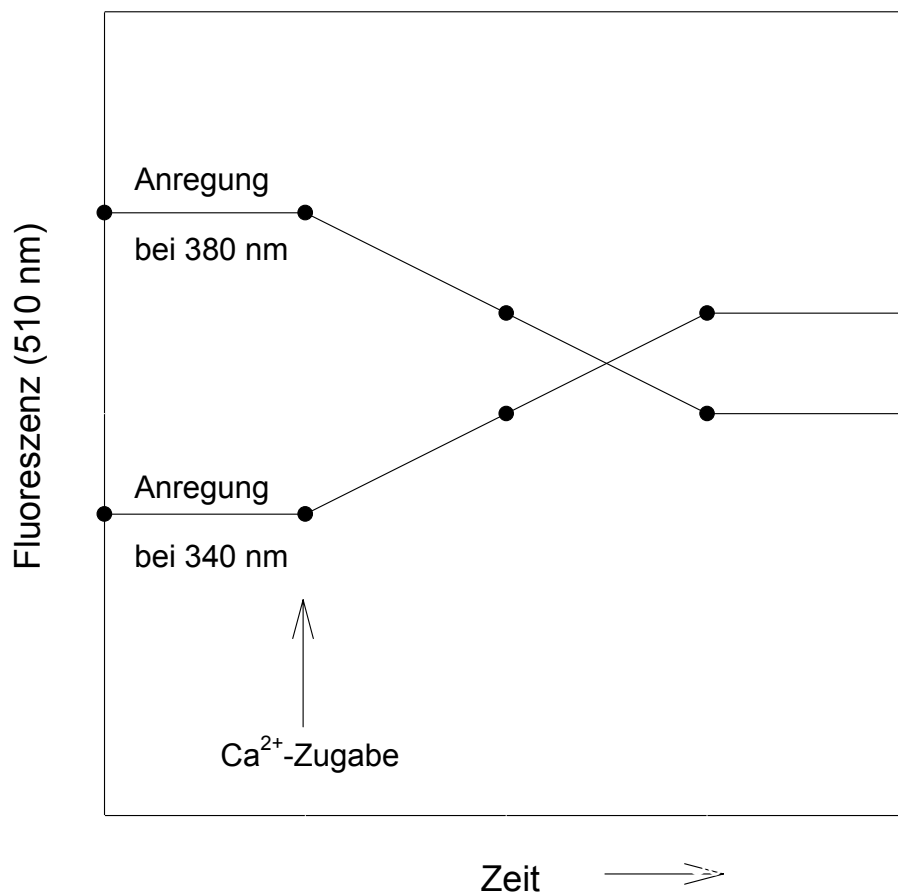


Abbildung 23: Fluoreszenzintensität (510 nm) einer Fura-2-Lösung bei den Anregungswellenlängen 340 und 380 nm vor und nach Zugabe von Ca^{2+} . Ca^{2+} -freies Fura-2 wird durch Licht von 380 nm maximal angeregt, der Fura-2- Ca^{2+} -Komplex hingegen fluoresziert maximal nach Anregung bei 340 nm. Ca^{2+} erhöht daher die Fluoreszenzrate ($[\text{340}/\text{380}]_{510}$) (Details siehe Text).

Anhand der Veränderung der Fluoreszenzrate (R), dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit diesen beiden Wellenlängen ($[\text{340}/\text{380}]_{510}$), kann man mit Hilfe eines speziellen Computerprogrammes auf Veränderungen der freien, intrazellulären (=cytosolischen) Ca^{2+} -Konzentration rückschließen. Hierbei sind Schwankungen in der Farbstoffkonzentration, der Zellgröße und die absolute optische Effizienz der Instrumente vergleichsweise unwichtig. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber älteren Meßmethoden, bei denen diese Faktoren deutlichen Einfluß auf die Güte der Meßergebnisse hatten.

Allgemein wird Fura-2 in Studien zur physiologischen Rolle von Ca^{2+} eingesetzt. Es ermöglicht die Analyse intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen in lebenden Zellen und die Darstellung von Effekten, die Wirkstoffe auf Ca^{2+} in Zellen haben. Messungen sind auch im

submikromolaren Bereich (10 nM - 1 μ M) möglich, was bei den zuvor eingesetzten Methoden oft Schwierigkeiten bereitet hatte. Damit eignet sich Fura-2 zur Klärung der physiologischen Rolle von Ca^{2+} im Zellstoffwechsel.

2.4.12.1 Beladung der Trophocyten mit Fura-2

Zu 5 ml einer Suspension isolierter Trophocyten (s. 2.4.11.1) wurde in einem cell harvester (s. Abb. 18) Fura-2-AM (3 $\mu\text{mol/l}$, CALBIOCHEM, Stammlösung: 100 μM gelöst in DMSO) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 37 min in absoluter Dunkelheit (abgedunkelter Raum) bei Raumtemperatur, wobei die Zellsuspension alle 10 min durch vorsichtiges Schwenken durchmischt wurde. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Insekten-Ringerlösung (5 ml) gewaschen und zentrifugiert, um überschüssiges Fura-2-AM zu entfernen (Zentrifugation: Hettich Universal Zentrifuge, 450 Upm, 5 min). Die Trophocyten schwammen auf der Lösung auf, so dass die Waschlösung über den Schlauch des cell harvesters ablaufen konnte. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 2 ml Insekten-Ringerlösung resuspendiert.

2.4.12.2 Mikrofluorometrische Untersuchungen

200 μl der Zellsuspension wurden in eine speziell präparierte Petrischale (\O 2 cm) gebracht. Diese wies in der Mitte eine Bohrung auf, an der das Plastik durch Plexiglas ersetzt worden war, da Plexiglas durchlässiger für die Wellenlängen des Anregungslichts ist. Über die Zellen wurde eine Lage Gaze (Maschenweite: 30 μm) gelegt, die mit Hilfe eines Spannrings (s. Abb. 24) justiert und auf den Boden der Petrischale geschoben wurde, um die Zellen dort zu fixieren. Die Gaze sollte verhindern, dass die Trophocyten aufgrund ihres hohen Fettgehaltes aufschwimmen oder beim Zupipettieren von Testsubstanzen ihre Position verändern. Es war zu beachten, dass möglichst keine Luftblasen im Bereich der Bohrung auftraten.

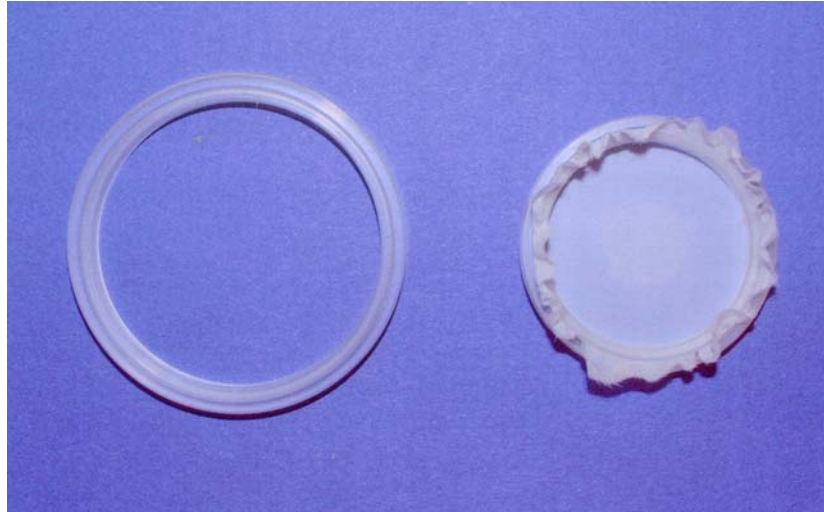


Abbildung 24: Spannring mit Gaze zur Fixierung der Trophocyten auf dem Petrischalenboden während der mikrofluorometrischen Untersuchungen (Details siehe Text).

Schließlich wurden die Zellen mit 2 ml Insekten-Ringerlösung vorsichtig überschichtet, um ein Eintrocknen zu verhindern. Die Testsubstanz wurde beim Start eines Versuches im Abstand von ca. 1 cm neben der Bohrung zupipettiert.

Die eigentliche Messung (s. Abb. 25) erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IMT-2 mit Photomultiplier 710 PTI, Photometer D-104 PTI; 20er bzw. 40er Objektiv), bei dem über ein Filterrad oder einen rotierenden Spiegel schnell zwischen den Anregungswellenlängen (340 bzw. 380 nm) gewechselt werden konnte (15 Hz). Emittiertes Licht (510 nm) wurde über Emissionsfilter gesammelt und die Photonenzählung erfolgt in Synchronität mit dem Spiegel jeweils separat für beide Anregungswellenlängen (in photon counts \cdot s⁻¹). Nach Abschluß jedes Versuches wurde kontrolliert, dass eine Veränderung der Fluoreszenzrate nicht auf eine Verschiebung der Zelle zurückzuführen war.

Alle Daten wurden über einen Computer gespeichert und graphisch ausgewertet (PTI/Photon Technology International Computerprogramm). Aus den ermittelten Fluoreszenzen bei beiden Anregungswellenlängen konnte eine Fluoreszenzrate (Ratio: R = Fluoreszenz bei 340 nm/Fluoreszenz bei 380 nm) berechnet werden, die <1 sein sollte. Werte >1 wiesen darauf hin, dass die jeweilige Zelle, beispielsweise aufgrund von Zellschädigungen, schon mit Ca²⁺ überladen war.

Fura-2 wirkt in der verwendeten Konzentration über längere Zeiträume (mehrere Stunden) hinweg zunehmend zelltoxisch. Daher wurden die Messungen nach Beladung mit Fura-2 stets innerhalb von maximal 5 Stunden abgeschlossen.

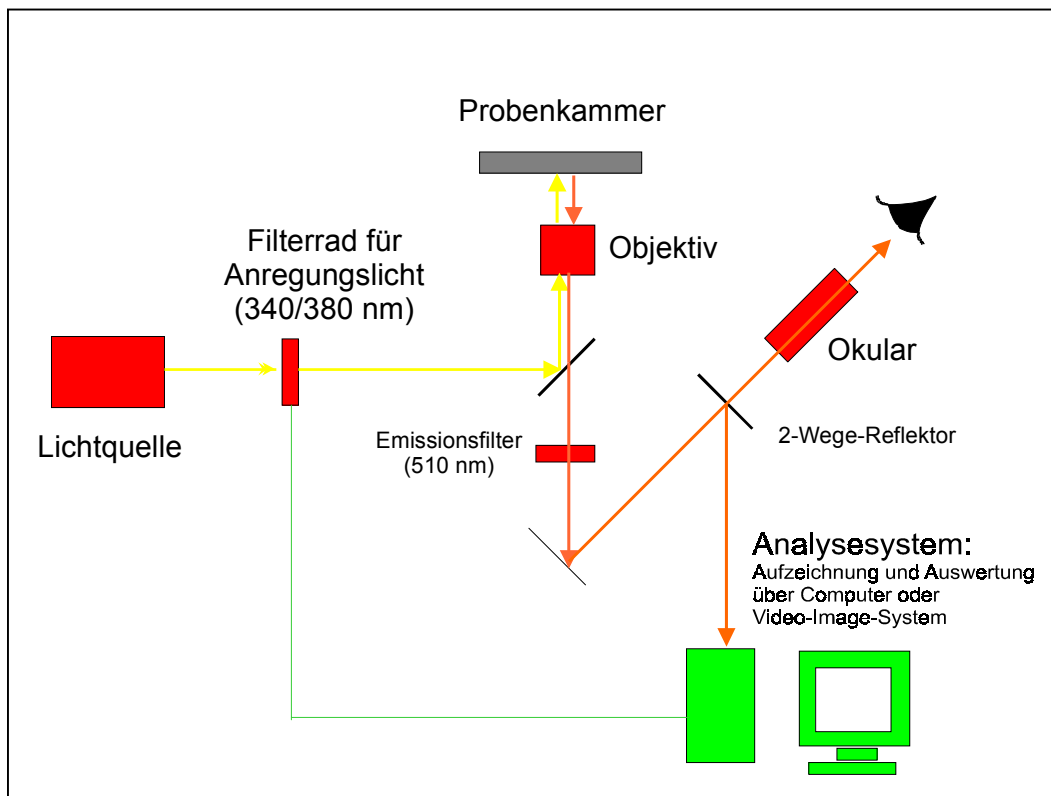


Abbildung 25: Übersicht über den Versuchsaufbau bei den Fluoreszenzmessungen mit Fura-2.

2.4.12.3 Ca²⁺-Imaging

Alternativ kann die Messung auch mit einem Fura-2-Mikrospektrofluorimeter erfolgen, bei dem die Aufzeichnung der Meßwerte mit einer besonders lichtempfindlichen Kamera (ICCD, intensified CCD (Charge-Coupled Device)-Kamera = extrem lichtempfindliche Kamera mit PC-Anschluß, SIM Infravision, SIM-ICCD-04) erfolgt und eine Visualisierung ermöglicht. Es werden in Abständen von 15 s Bilder der Einzelzelle erstellt, wobei verschiedene Fluoreszenzraten und damit unterschiedliche freie, intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration durch unterschiedliche Farben (blau bis rot) dargestellt und ausgewertet werden können. Dieses Verfahren ermöglicht eine Zuordnung unterschiedlicher Ca²⁺-Konzentrationen zu intrazellulären Kompartimenten. Die intrazellulären Veränderungen der Ca²⁺-Konzentrationen können anhand der Einzelbilder verfolgt und dokumentiert werden.

2.5 DARSTELLUNG DER MESSERGEBNISSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Aus den Ergebnissen von n unabhängigen Einzelerperimente wurde jeweils der Mittelwert (arithmetisches Mittel) sowie der Standardfehler des arithmetischen Mittels (S.E.M.) berechnet. Die Anzahl der unabhängigen Einzelerperimente (n) ist den Tabellen zu entnehmen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm S.E.M.

Standardfehler des arithmetischen Mittels (S.E.M.) :

$$S.E.M. = \frac{S.D.}{\sqrt{n}}$$

Die Standardabweichung (S.D.) wurde hierbei nach folgender Formel berechnet:

$$S.D. = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Mittelwerte der Meßreihen wurden mit dem t-Test auf Unterschiedlichkeit überprüft (SACHS 1984). Der t-Test dient dazu, zwei Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten, deren Streuungen nicht bekannt sind, von denen man jedoch begründet annimmt, dass sie gleich sind, zu vergleichen. Eine Voraussetzung für den t-Test ist die Normalverteiltheit, jedoch ist der Test in dieser Hinsicht nicht besonders empfindlich. Es reicht aus, wenn die Häufigkeitsverteilungen nicht allzu sehr von der Normalverteilung abweichen oder mehrgipflig sind.

Die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die Mittelwerte von Messwertreihe und Kontrollmesswertreihe nicht unterscheiden, wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit (p) bezeichnet. Lag dieser Wert $p \geq 0,05$ (entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\geq 5\%$), wurde der Mittelwert als nicht signifikant verschieden von der Kontrolle (n.s.) eingestuft. Lag der Wert $p < 0,05$ wurden die Mittelwerte als signifikant verschieden angesehen.

Die Inkubation der isolierten Fettkörper erfolgte nach der „paired tissue-Technik“, bei der jeweils einer der Fettkörperloben als Kontrolllobus fungierte, während der andere Lobus desselben Tieres in der Testsubstanz inkubiert wurde. Bei diesen Versuchen konnte daher ein *zweiseitiger t-Test für verbundene Stichproben* (gepaart; SACHS 1984) angewendet werden, um Irrtumswahrscheinlichkeit und Signifikanz zu bestimmen.

Bei den Experimenten mit isolierten Trophocyten wurde die Signifikanz der berechneten Werte über einen *zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben nach Student* (SACHS 1984) analysiert. Über einen F-Test wurde vorab die Homogenität der Varianzen auf dem 5 %-Fehlerniveau überprüft, um festzustellen, ob sich die Varianzen zweier Stichproben signifikant unterscheiden (SACHS 1984). Ausgehend vom Ergebnis des F-Tests wurde entweder ein t-Test für gleiche (homoskedastische) oder ungleiche (heteroskedastische) Varianzen (Fisher-Behrens-Problem) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 WIRKUNG VON NAHRUNGS- UND WASSERMANGEL AUF DEN FETTKÖRPERSTOFFWECHSEL VON *BLAPTICA DUBIA*

3.1.1 Durchschnittliche Gewichte und Wassergehalte von Gesamttieren und Fettkörpern

Es wurden zunächst Durchschnittsgewichte und Wassergehalte von Gesamttieren und Fettkörpern (*Corpus adiposum*) von Weibchen bzw. Männchen der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*) aus der institutseigenen Zucht bestimmt. Sie dienten als Vergleichswerte für nachfolgende Versuche und ermöglichten es außerdem, bereits bei der Präparation deutlich untergewichtige Fettkörper auszuschließen, die beispielsweise auf erkrankte Tiere, eine erst kürzlich abgeschlossene Häutung oder bei Weibchen auf kürzlich erfolgte Eiablage zurückzuführen sind.

Tabelle 2: Durchschnittliche Frischgewichte und Wassergehalte von Weibchen bzw. Männchen von *Blaptica dubia* sowie ihrer Fettkörper. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n=5).

	Frischgewicht [g]	Wassergehalt [%]	Frischgewicht Fettkörper [mg]	Wassergehalt Fettkörper [%]
Weibchen	2,971 \pm 0,140	67,1 \pm 1,4	0,357 \pm 0,081	55,9 \pm 1,3
Männchen	1,635 \pm 0,056	62,3 \pm 2,0	0,241 \pm 0,038	51,4 \pm 1,5
p<	0,001	n.s.	n.s.	0,05

Das durchschnittliche Gewicht von *Blaptica dubia* (s. Tab. 2) betrug bei den Weibchen 2,971 \pm 0,140 g, bei den Männchen 1,635 \pm 0,056 g (jeweils n=5). Das um knapp 82 % größere Durchschnittsgewicht der Weibchen spiegelt sich auch darin wider, dass die weiblichen Tiere größer sind wie die Männchen. Als durchschnittlicher Wassergehalt des Gesamttieres waren bei den Weibchen 67,1 \pm 1,4 % zu verzeichnen, bei den Männchen 62,3 \pm 2,0 % (jeweils n=5). Das durchschnittliche Gewicht des Fettkörpers betrug bei den Weibchen 0,357 \pm 0,081 g, bei den Männchen 0,241 \pm 0,038 g. Der durchschnittliche Wassergehalt betrug bei den Weibchen 55,9 \pm 1,3 %, bei den Männchen 51,4 \pm 1,5 % (jeweils n=5).

3.1.2 Wirkung von Nahrungsmangel auf die Gewichte von Gesamttieren und Fettkörpern

In einer parallelen Versuchsreihe wurde die Wirkung von Nahrungsmangel auf die Gewichte von Gesamttieren und Fettkörpern untersucht. Eine Hungerperiode von bis zu 30 Tage, während der den Tieren nur Wasser angeboten wurde, führte bei adulten Männchen von *Blaptica*

dubia zu einer Gewichtsabnahme um mehr als 26 % (s. Tab. 3 und Abb. 26). Dennoch starb nur eines der 48 Versuchstiere vorzeitig, was die Fähigkeit von Schaben zeigt, mehrere Wochen ohne Nahrung überleben zu können.

Tabelle 3: Durchschnittliche Frischgewichte von adulten, männlichen *Blaptica dubia*, die nur Wasser *ad libitum*, jedoch keine Nahrung erhielten, sowie ihrer Fettkörper. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n siehe Tabelle).

Hungerperiode [d]	n	Gewicht Gesamttier [g]	p<	n	Gewicht Fettkörper [mg]	p<
0	8	1,640 \pm 0,096		8	240,0 \pm 11,8	
1	8	1,599 \pm 0,045	n.s.	8	198,9 \pm 17,7	n.s.
4	8	1,430 \pm 0,047	n.s.	8	186,0 \pm 14,1	0,05
7	8	1,431 \pm 0,043	n.s.	8	147,5 \pm 19,7	0,01
14	8	1,456 \pm 0,044	n.s.	7	164,9 \pm 19,1	0,01
21	8	1,364 \pm 0,056	0,05	8	134,8 \pm 13,1	0,001
30	7	1,213 \pm 0,033	0,01	7	81,2 \pm 12,9	0,001

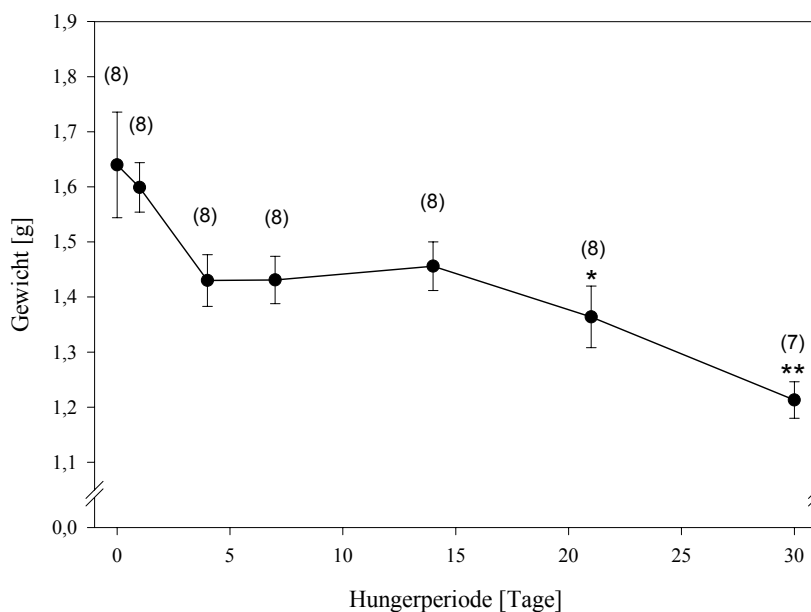


Abbildung 26: Gewichtsabnahme adulter Männchen von *Blaptica dubia* während einer Hungerperiode von 30 Tagen. Die Tiere wurden einzeln gehalten und erhielten Wasser *ad libitum*, jedoch keine Nahrung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den Kontrollwert: 0 Tage) sind durch folgende Symbole dargestellt: *:p<0,05; **:p<0,01.

Drastischer wirkte sich der Nahrungsmangel auf das Gewicht des Fettkörpers aus. Hier war nach 30 Tagen ein durchschnittlicher Rückgang um mehr als 66 % im Vergleich zu gefütterten Kontrollen zu verzeichnen (s. Tab. 3 und Abb. 27). Die Ursache hierfür liegt sicherlich in der Tatsache, dass der Fettkörper das zentrale Speicherorgan für Fette, Proteine und Kohlenhydrate (KEELEY 1990) ist. In Zeiten des Nahrungsmangels werden diese Reservestoffe abgebaut.

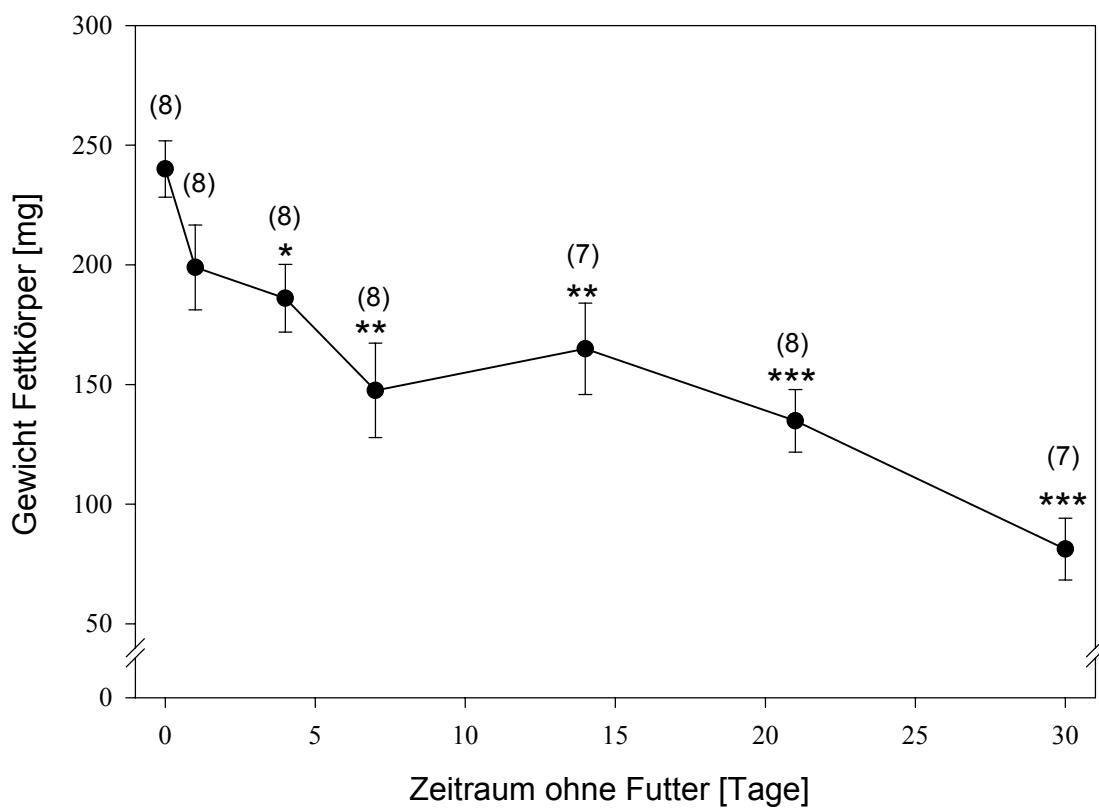


Abbildung 27: Gewichtsabnahme der Fettkörper adulter Männchen von *Blaptica dubia* während einer Hungerperiode von 30 Tagen. Die Tiere wurden einzeln gehalten und erhielten Wasser *ad libitum*, jedoch keine Nahrung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den Kontrollwert: 0 Tage) sind durch folgende Symbole dargestellt: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

3.1.3 Histologische Präparate des Fettkörpergewebes von Hungertieren

1. Glykogennachweis

Durch die Karminfärbung wurde das Glykogen im Fettkörpergewebe rot angefärbt. Es bestanden sehr deutliche Unterschiede zwischen Kontrolltieren und solchen, die 28 Tage ohne Nahrung gehalten worden waren. Während die Präparate von Kontrolltieren sowohl bei der 25- als auch der 100-fachen Vergrößerung (s. Abb. 28) stark dunkelrot bis violett gefärbt waren, wiesen die Schnitte der Hungertiere nur eine schwach rötliche Färbung auf.

Dies ist Beleg dafür, dass im Fettkörper große Mengen an Glykogen gespeichert sind und dass die Tiere während der Hungerperiode diese Glykogenreserven nahezu völlig aufgebraucht haben. STEELE (1963) konnte bei Hungerversuchen mit *Periplaneta americana* innerhalb weniger Tage eine Abnahme des Glykogengehaltes im Fettkörper um mehr als 60 % feststellen.

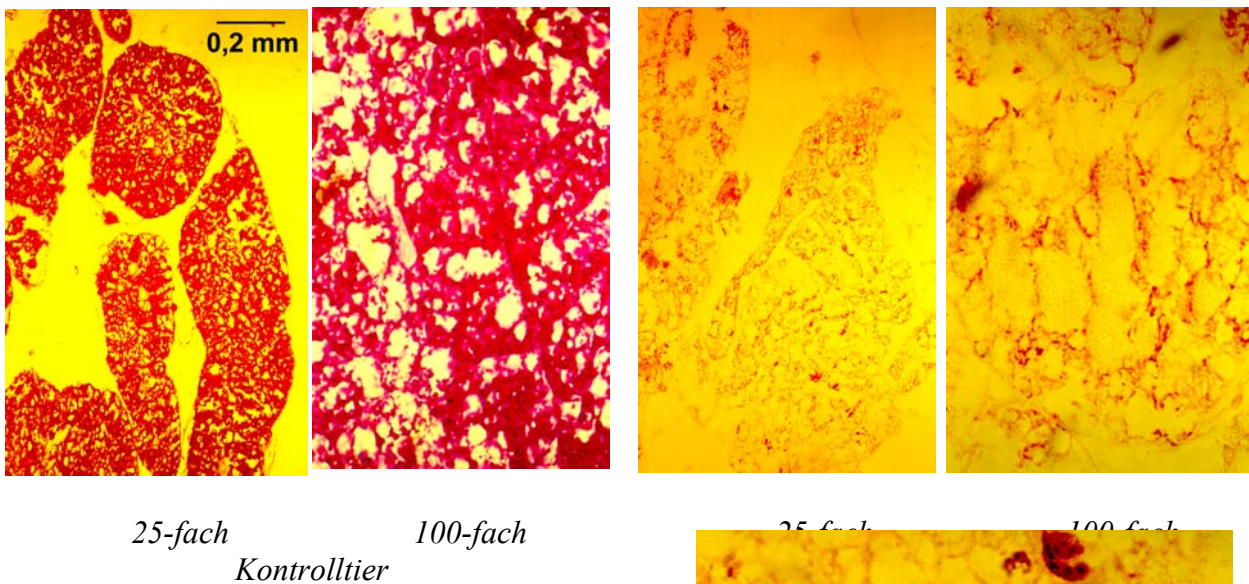
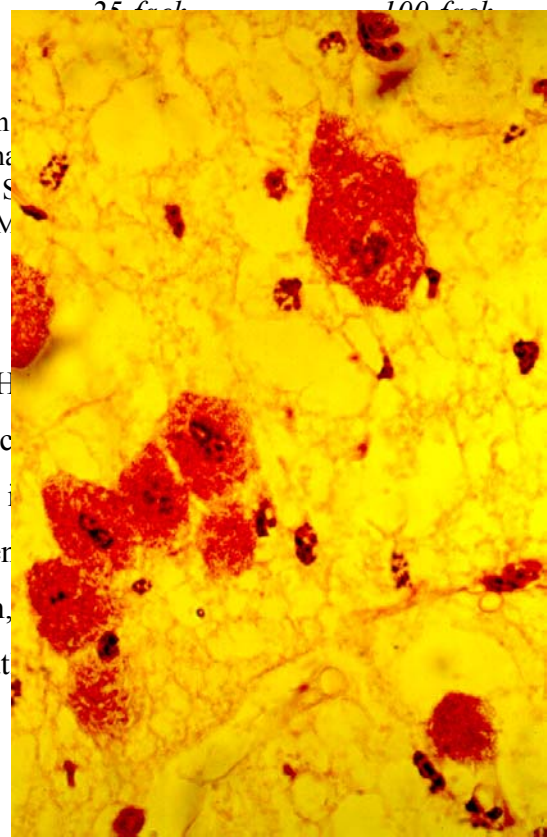
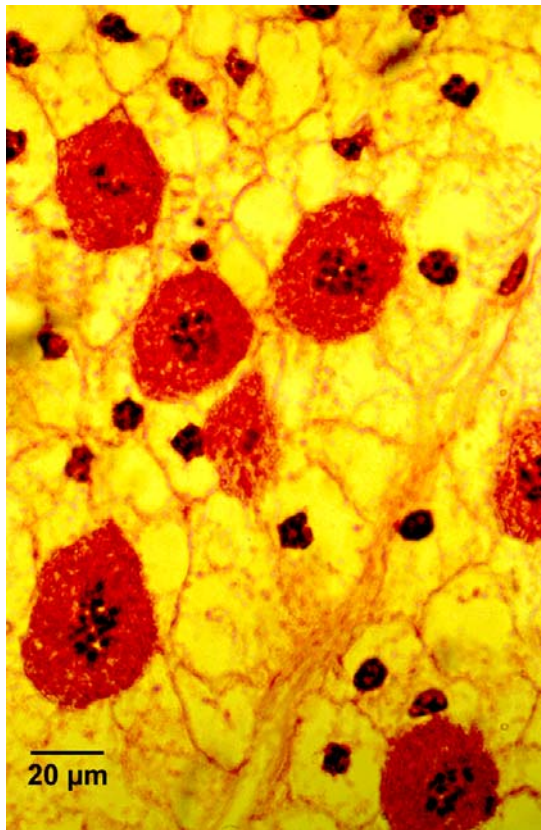


Abbildung 28: Schnitte durch das Fettkörpergewebe von Kontrolltieren (Kontrolltier) bzw. 28 Tage gehungert gehaltenen Tieren (Hungertier). Primärvergrößerung: 25- bzw. 100-fach, Sekundärvergrößerung: ca. 1,8-fach. Bildbearbeitung: ca. 1,8-fach. (Axioplan M, Kodak Elite II 100 Film).

2. H & E-Färbung

Die H & E-Färbung (Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin) zeigt die Endosymbionten in den Mycetocysten. Die Schnitte (s. Abb. 29) zeigten bei den Kontrolltieren eine deutliche Färbung der Endosymbionten (in den Mycetocysten) und eine stärkere Färbung der Endosymbionten (in den Mycetocysten) bei den Hungertieren. Dies läßt darauf schließen, dass die Endosymbionten pro Zelle bei Nahrungsmangel deut-





Kontrolltier

Hungertier

Abbildung 29: Schnitte durch das Fettkörpergewebe von adulten, männlichen *Blaptica dubia*, die nicht (*Kontrolltier*) bzw. 28 Tage gehungert hatten (*Hungertier*). Die roten Zellen sind Mycetocyten, die zentral endosymbiontische Bakterien tragen. Hämalaun-Eosin-Färbung. Primärvergrößerung: 100-fach, Sekundärvergrößerung durch photographische Bildbearbeitung: ca. 4,5-fach (Axioplan Mikroskop [Olympus OM4 Ti, Carl Zeiss Jena] mit einem Kodak Elite II 100 Film).

3.1.4 Wasserverlust durch Verdunstung in trockener Luft

Die bisherigen Versuchsergebnisse zeigen, dass Schaben lange ohne Futter auskommen. Zudem können die Tiere auch mehrere Wochen ohne Wasser überleben (Weibchen von *Periplaneta americana* bis zu 42 Tage, WILLIS & LEWIS 1957). Demnach müssen sie über Möglichkeiten verfügen, ihren Wasserbedarf zu decken, beziehungsweise sich vor Wasserverlust zu schützen. Eine Reihe von Tieren, insbesondere solche, die in trockenen Zonen leben, haben Schutzvorrichtungen entwickelt, um die Verdunstung herabzusetzen und Wasser einzusparen. Der Grad der Verdunstung wird durch verschiedene Faktoren wie Temperatur, Sättigungsgrad der Luft und Windverhältnissen beeinflusst.

Die Effektivität des Verdunstungsschutzes kann getestet werden, indem man die Tiere ohne Zugang zu Wasser und Futter in trockener Luft (Exsikkator mit Trockenperlen: 14 % r.F. bei 26°C) hält und die Gewichtsabnahme feststellt. Der Gewichtsverlust bei der Argentinischen

Schabe war unter diesen Bedingungen relativ gering. Nach 1 Stunde war bei den Weibchen nur eine Abnahme um -0,037 % des Anfangsgewichtes zu verzeichnen, innerhalb von 24 Stunden betrug die Abnahme -1,4 %.

Tabelle 4: Abnahme des Körpergewichtes von Männchen bzw. Weibchen von *Blaptica dubia*, die in einem Exsikkator über Blaugel bei 26°C gehalten wurden. Für jeden Meßpunkt wurden jeweils dieselben Tiere gemessen. Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M.

Zeit [h]	n	Weibchen	p<	n	Männchen	p<
0,5	4	-0,062±0,102	n.s.	4	-0,012±0,322	n.s.
1	8	-0,037±0,113	n.s.	8	0,044±0,501	n.s.
2	8	-0,117±0,149	n.s.	8	0,187± 0,434	n.s.
3	8	-0,146±0,233	n.s.	8	-0,295±0,313	n.s.
4	4	-0,273±0,204	n.s.	4	-0,250±0,179	n.s.
5	4	-0,317± 0,303	n.s.	4	-0,538±0,124	0,01
21	4	-1,204±0,394	0,05	4	-0,977±0,434	0,05
24	4	-1,398±0,361	0,01	4	-1,748±0,392	0,01

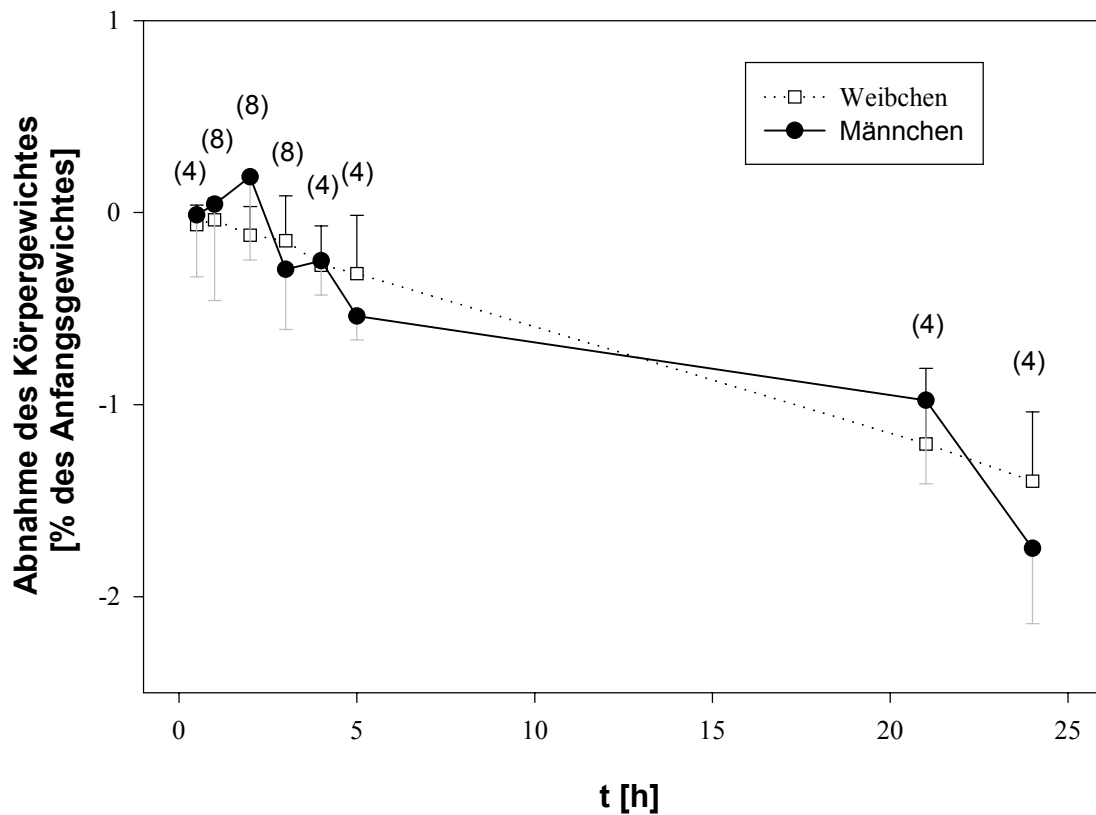


Abbildung 30: Abnahme des Körpergewichtes von Weibchen bzw. Männchen von *Blaptica dubia*, die in einem Exsikkator über Blaugel bei 26°C gehalten wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. Signifikanzniveaus sind Tab. 4 zu entnehmen.

3.2 BESTIMMUNG VON METABOLITEN DES FETTKÖRPERS

3.2.1 Isolierung der PP_iPFK

Die Pyrophosphat: D-Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase (PP_iPFK, EC 2.7.1.90) wurde für die Bestimmung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes von isolierten Fettkörpern und isolierten Fettkörperzellen benötigt. Das Enzym wurde in unserem Labor aus Kartoffelknollen isoliert (nach VAN SCHAFTINGEN *et al.* 1982). Bei Vorversuchen zeigte sich, dass der Auswahl der Kartoffelsorte eine entscheidende Bedeutung zukommt. Bei vielen Kartoffelsorten war die Aktivität des Enzyms zu gering, um ausreichend aktive Enzympräparate herstellen zu können.

In Zusammenarbeit mit der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt (SLVA) Oppenheim, Abteilung Landwirtschaft, wurden daher von mir mehr als 20 verschiedene Kartoffelsorten vergleichend getestet (z.B. *Agata*, *Agria*, *Berber*, *Biohof*, *Cilena*, *Exquisa*, *Filea*, *Grata*, *Hela*, *Inora*, *LaRatte*, *Marabel*, *Melina*, *Nicola*, *Pfälzer*, *Premiere*, *Quarta*, *Salina*, *Secura*, *Sefina*,

Selma, Simone, Solara, Solare, sowie einige rote Kartoffelsorten wie z.B. *Vitelotte*). Die unter optimalen Testbedingungen bestimmte Enzymaktivität im Rohextrakt variierte je nach Sorte zwischen 0,002 (*Salina*) und 0,033 U/ml (*Vitelotte*). Es traten keine deutlichen Qualitätsunterschiede zwischen länger gelagerten Kartoffeln und solchen aus neuer Ernte auf, und auch die Verwendung von Kartoffeln aus biologischem Anbau zeigte keine Vorteile.

Am geeignetsten erwiesen sich vorwiegend festkochende Kartoffelsorten, insbesondere *Quarta* ('Wüst's Feinste', Aldi, Alzey), mit einer Enzymaktivität von 0,024 U/ml Rohextrakt und von 3,74 U/ml im gereinigten Enzympräparat.

3.2.2 Wirkung von Nahrungsmangel auf Metabolite im Fettkörper

Es wurden die Effekte von 30 Tagen Hunger auf den Gehalt an Glykogen und Fructose-2,6-bisphosphat sowie die Trehalosesynthese untersucht.

Tabelle 5: Metabolitgehalte des Fettkörpers von adulten, männlichen *Blaptica dubia*, die Wasser *ad libitum*, jedoch keine Nahrung erhielten. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n siehe Tabelle).

Adulte Männchen wurden einzeln in Plastikgefäßen (10 x 7,7 cm) gehalten. Alle Gefäße wurden von außen partiell mit einem Tuch abgedeckt, um den Stress für die Tiere zu minimieren. Die Gesamtversuchsdauer betrug 30 Tage. Zu bestimmten Zeiten wurde ein Teil der Tiere dekapitiert und ihr Fettkörper präpariert. Für die Glykogenbestimmung wurden die Fettkörper sauer, für die Bestimmung von Fructose-2,6-bisphosphat basisch aufgearbeitet. Zur Bestimmung der vom Fettkörper sezernierten Trehalose wurde das Gewebe 30 min in Insekten-Ringerlösung inkubiert und in dieser die Trehalose bestimmt.

Tage ohne Nahrung	n	Glykogen in Form von Glucoseeinheiten [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$]	p<	n	Trehalosesynthese [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]	p<	n	Fructose-2,6- bisphosphat [$\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$]	p<
0	8	407,2 \pm 7,12	n.s.	8	0,719 \pm 0,016	n.s.	8	3,999 \pm 0,184	n.s.
1	8	405,2 \pm 52,5	n.s.	8	0,664 \pm 0,088	n.s.	8	3,996 \pm 0,352	n.s.
4	8	354,0 \pm 68,1	n.s.	8	0,715 \pm 0,136	n.s.	8	3,478 \pm 0,347	n.s.
8	8	222,3 \pm 31,8	0,001	8	0,948 \pm 0,234	n.s.	8	3,114 \pm 0,377	n.s.
16	7	221,4 \pm 40,9	0,001	8	0,731 \pm 0,120	n.s.	8	3,647 \pm 0,352	n.s.
23	6	169,1 \pm 39,7	0,001	8	0,523 \pm 0,090	0,05	8	5,139 \pm 0,496	0,05
30	7	113,2 \pm 19,4	0,001	5	0,557 \pm 0,149	n.s.	7	4,954 \pm 0,663	n.s.

Der Glykogen-Gehalt nahm in der Hungerperiode ab, von anfänglich 407,2 auf 113,2 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (s. Tab. 5 und Abb. 31) - in der ersten Woche um fast 50 %, später wesentlich langsamer, insgesamt um 72,2 %. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der histologischen

Untersuchungen, die ebenfalls eine drastische Abnahme des Glykogen im Fettkörpergewebe zeigten (s. 3.1.3).

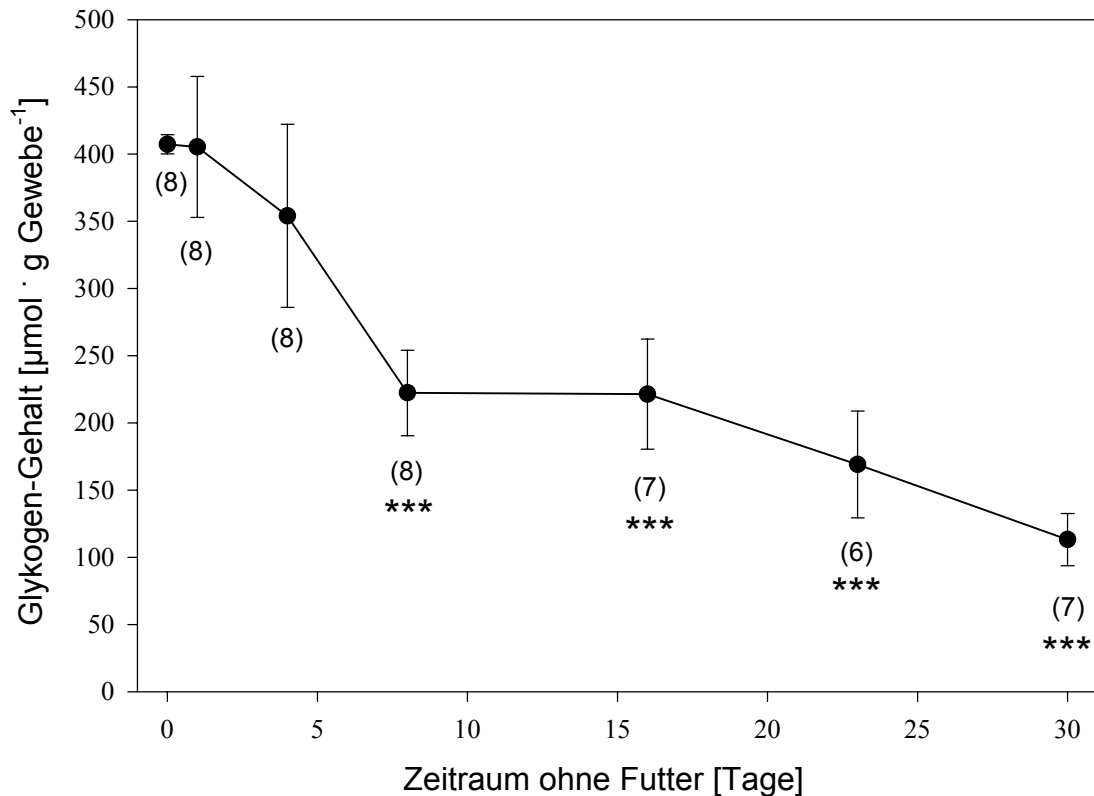


Abbildung 31: Glykogen-Gehalt im Fettkörpergewebe von adulten, männlichen *Blaptica dubia* bei 30-tägigem Hungern. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den Kontrollwert: 0 Tage): ***: $p < 0,001$. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 5 zu entnehmen.

Im Gegensatz zum Glykogengehalt verringerte sich die Trehalosesynthese der isolierten Fettkörper von Hungertieren praktisch nicht. Im Versuchszeitraum (30 Tage) nahm die durchschnittliche Synthese insgesamt von 0,719 auf 0,557 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ab (s. Tab. 5 und Abb. 32). Auffällig ist, dass nach 8 Tagen Hungerns ein Anstieg der Trehalogenese um +32 % des 0 Tage-Wertes zu verzeichnen war, wobei hier allerdings die relativ großen S.E.M.-Werte sowie die relativ geringen Gewichte der Fettkörper bei diesem Meßpunkt zu berücksichtigen sind. Anschließend sank die Syntheserate wieder. Nach 23 Tagen wurden eine maximale Abnahme um -23 % des Ausgangswertes (0 Tage) erreicht.

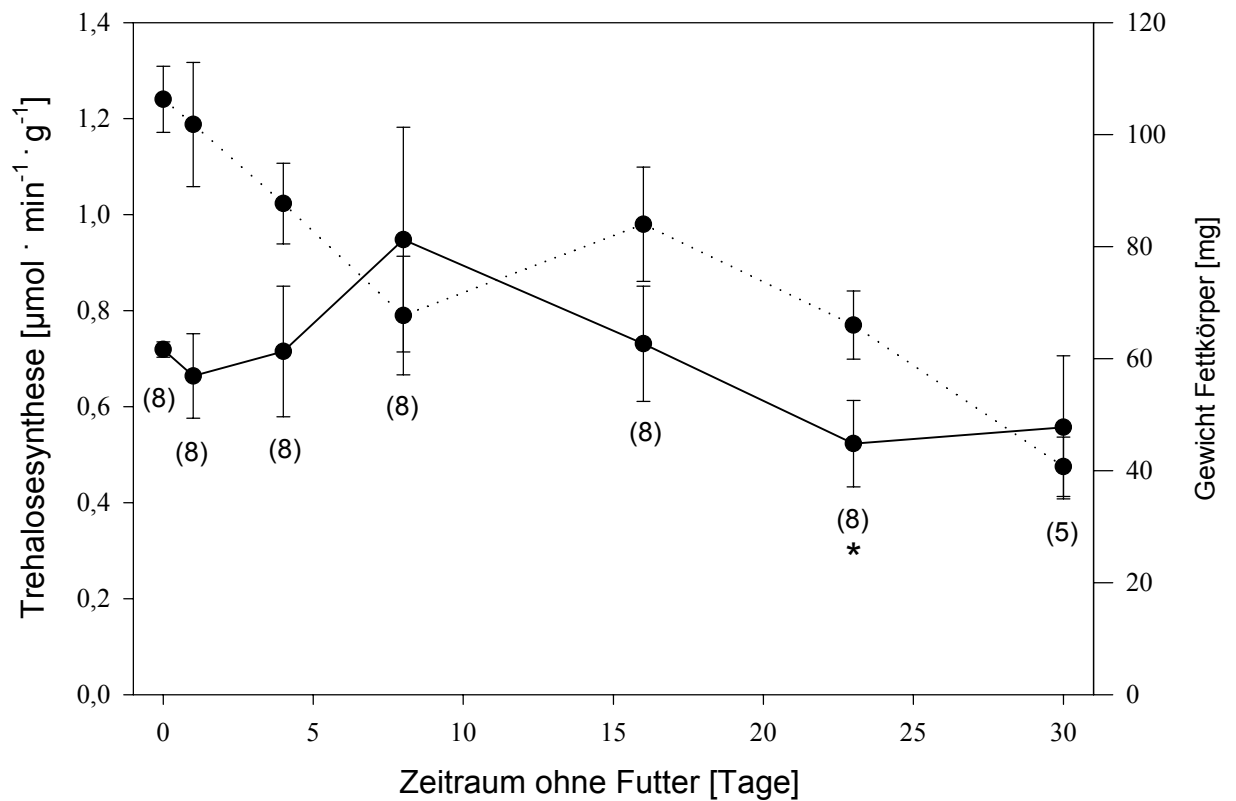


Abbildung 32: Trehalosesynthese und Gewicht isolierter Fettkörper von adulten Männchen von *Blaptica dubia* bei 30-tägigem Hungern. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert: 0 Tage): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 5 zu entnehmen.

Der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt des Fettkörpergewebes nahm innerhalb der ersten 8 Tage um rund 22 % ab, nahm danach aber deutlich zu und erreichte in der 4. Hungerwoche einen Maximalwert von $5,1 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$, +29 % über dem Kontrollwert von $3,99 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ (s. Tab. 5 und Abb. 33).

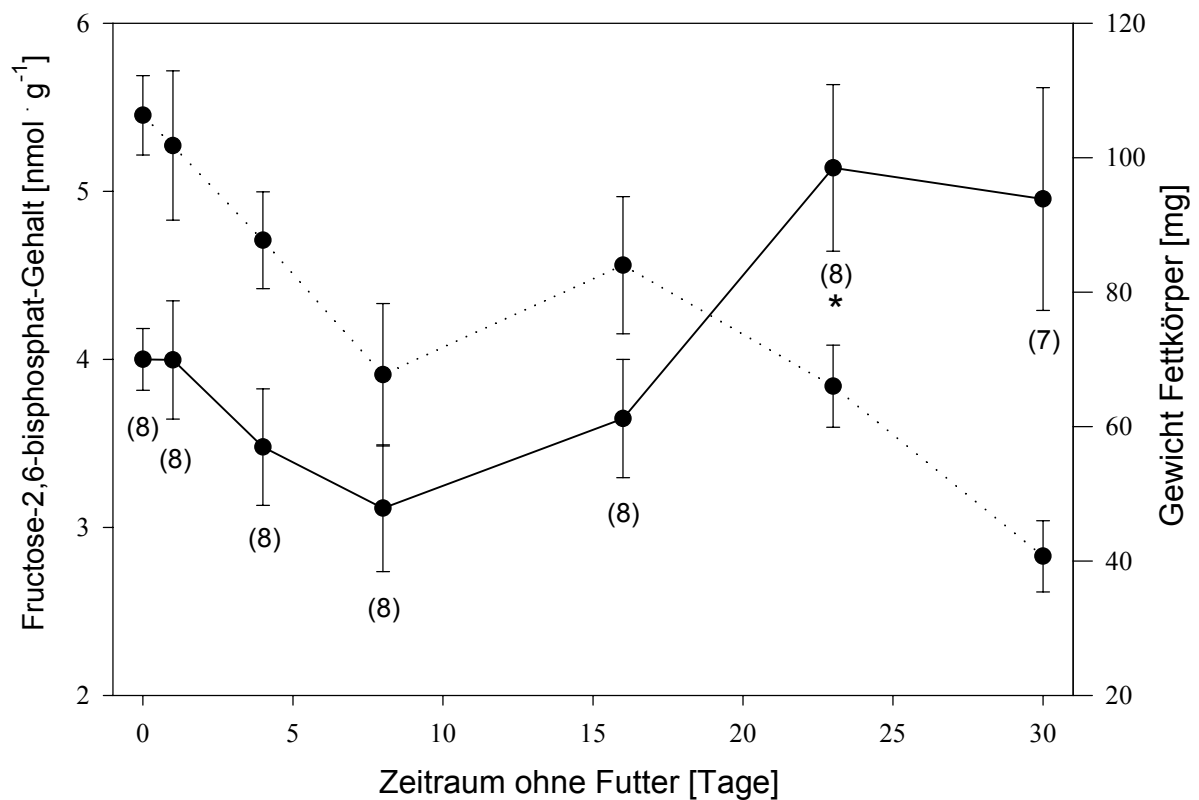


Abbildung 33: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte im Fettkörpergewebe von adulten, männlichen *Blaptica dubia* bei 30-tägigem Hungern. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert: 0 Tage): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 5 zu entnehmen.

3.2.3 Gehalte von Metaboliten in Fettkörpern nach Inkubation mit Bld HrTH

Der Kontrolllobus wurde nach 20-minütiger Vorinkubation 1 Stunde in Insekten-Ringerlösung inkubiert, während der Versuchslobus entsprechend in Insekten-Ringerlösung mit Bld HrTH (10 nM) inkubiert wurde. Danach wurde das Gewebe sauer aufgearbeitet, für die Bestimmung von Fructose-2,6-bisphosphat wurde Lauge für die Homogenisation benutzt, da Fructose-2,6-bisphosphat säurelabil ist. Gemessen wurden neben Glykogen Zwischenprodukte der Glykolyse (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Pyruvat), sowie Citrat und Glycerin-3-phosphat. Außerdem wurde die Trehalosesynthese gemessen.

Tabelle 6: Gehalte von Metaboliten in isolierten Fettkörpern von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH (10 nM). Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M aus n unabhängigen Experimenten. Einige Werte wurden in Kooperation mit Herrn A. Becker bestimmt.

Die Inkubation erfolgte nach der „paired-tissue“ Technik. Vom dem Versuchstier wurde der Kontrolllobus 60 min in 2 ml Ringerlösung inkubiert, der Versuchslobus hingegen in 2 ml Ringerlösung mit Bld HrTH (10 nM).

Metabolit	n	Kontrolllobus [nmol · g ⁻¹]	Versuchslobus [nmol · g ⁻¹]	Änderung [%]	p<
Glykogen (als Glucose)	9	403.000 \pm 34.200	351.000 \pm 31.500	-13,4\pm3,0	0,01
Glucose-6-phosphat	8	66 \pm 9	113 \pm 14	+85,4\pm21,6	0,01
Fructose-6-phosphat	4	44 \pm 11	82 \pm 16	+98,2\pm18,2	0,01
Fructose-1,6-bisphosphat	8	11 \pm 2	83 \pm 3	+750,0\pm116,0	0,01
Dihydroxyacetonphosphat	3	123 \pm 27	35 \pm 6	-70,8\pm11,7	0,01
Pyruvat	6	184 \pm 25	361 \pm 46	+120,0\pm54,3	0,05
Citrat	9	265 \pm 24	387 \pm 34	+53,9\pm18,5	0,01
Glycerin-3-phosphat	9	2.270 \pm 260	3.890 \pm 190	+93,0\pm24,3	0,001
Trehalosesynthese	5	642 \pm 66	1580 \pm 257	+145,8\pm32,1	0,01

Inkubation mit dem Hormon führte zu einer signifikanten Senkung des Glykogengehaltes im Fettkörper um -13,4 %, ebenso fiel auch der Dihydroxyacetonphosphat-Gehalt (-70,8 %). Alle anderen anderen gemessenen Metaboliten (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, Pyruvat, Citrat, Glycerin-3-phosphat) stiegen an, besonders stark Fructose-1,6-bisphosphat (+750,0 %).

Glykogen diene bei dieser 60-minütigen Inkubation offenbar als Substrat für die Trehalosesynthese. Sein Abbau wird hervorgerufen durch Aktivierung der Glykogenphosphorylase durch das hypertrehalosämische Hormon (STEELE 1963). Der Glykogengehalt des Fettkörpers war bei den Kontrollloben so hoch (403 μ mol Glucoseeinheiten · g⁻¹), dass das innerhalb von 60 Minuten abgebaute Glykogen nur etwas mehr als 13 % des insgesamt im Fettkörper gespeicherten ausmachte.

Die glykolytischen Intermediate Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und vor allem Fructose-1,6-bisphosphat stiegen signifikant an (s. Tab. 6). Glucose-6-phosphat wird durch das Enzym Phosphoglucomutase aus dem der Glykogenolyse entstammenden Glucose-1-phosphat gebildet. Vermittelt durch das Enzym Phosphoglucoisomerase steht es mit Fructose-6-phosphat im Gleichgewicht. Fructose-6-phosphat wiederum wird durch die Phosphofruktokinase zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert. Diese Reaktion ist unter physiologischen Bedingungen irreversibel. Die Bildung von Fructose-6-phosphat aus Fructose-1,6-bisphosphat wird daher in

der Gluconeogenese durch ein separates Enzym katalysiert, die Fructose-1,6-bisphosphatase. PFK und FBPase sind Schlüsselenzyme ihres jeweiligen Stoffwechselweges und werden von Effektoren allosterisch moduliert.

Dihydroxyacetonphosphat nahm um -70,8 % ab. Es wird durch das Enzym Fructosebisphosphat-Aldolase aus Fructose-1,6-bisphosphat gebildet und steht mit Glycerinaldehyd-3-phosphat über die Triosephosphat-Isomerase im Gleichgewicht. Aldolase gilt in vielen Geweben als Enzym, das seine Reaktion "nahe am Gleichgewicht" katalysiert. Für den Fettkörper ist das bisher nicht unzweifelhaft nachgewiesen worden. Meine Ergebnisse sprechen nicht für eine Gleichgewichtsreaktion, da das Substrat Fructose-1,6-bisphosphat stark ansteigt, das Produkt Dihydroxyacetonphosphat aber signifikant abfällt. Zu dieser Frage sind weitere Experimente wünschenswert.

Pyruvat, das Produkt der Glykolyse, entsteht aus Phosphoenolpyruvat durch Pyruvat-Kinase. Die freie Energie der Reaktion wird zur Synthese von ATP genutzt. Bei Inkubation mit dem hypertrehalosämischen Hormon zeigte der Pyruvatgehalt einen signifikanten Anstieg um +120,0 %.

Änderungen des Citratgehaltes erlauben Rückschlüsse, ob mitochondriale Stoffwechselwege, zum Beispiel der Citratzyklus, durch das Hormon beeinflusst werden. Es wäre sowohl eine direkte Wirkung des Bld HrTH denkbar, als auch Effekte durch veränderte Gehalte von Metaboliten des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels. Citrat ist das Eingangssubstrat des Citratzyklus. Es wird durch Kondensation von Acetyl-Coenzym A (aus der Glykolyse oder dem Fettsäurenabbau) mit Oxalacetat gebildet. Der Citrat-Gehalt des Fettkörpergewebes wurde bei Inkubation mit Bld HrTH um +53,9 % erhöht.

Glycerin-3-phosphat wird durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat mittels Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase gebildet. Es dient unter anderem zur Synthese von Mono-, Di- oder Triglyceriden. Im Rahmen der Regulation der Trehalosesynthese ist erwähnenswert, dass Glycerin-3-phosphat ein Inhibitor der Phosphofruktokinase-2-Funktion des bifunktionellen Enzyms PFK-2/FBPase-2 aus der Vetrebratenleber ist. PFK-2/FBPase-2 ist aus dem Fettkörpergewebe von Schaben bisher nicht isoliert und charakterisiert worden, doch wäre ein entsprechendes bifunktionelles Enzym aufgrund der funktionellen Analogie von Vetrebratenleber und Insektenfettkörper durchaus zu erwarten. Nach Glykogen wies Glycerin-3-phosphat mit $2.270 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ den höchsten Gehalt aller getesteten Metabolite auf. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass im Fettkörper große Mengen an Fetten gespeichert sind und hier auch ein Großteil des Lipidstoffwechsels abgewickelt wird. Durch das Hormon kam es zu einem Anstieg des Glycerin-3-phosphat-Gehaltes um +93,0 %. Geht man von einem hemmenden Effekt dieses

Metaboliten auf die Fructose-2,6-bisphosphat-Synthese aus, so wäre eine Verringerung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes und somit eine geringere Aktivität der PFK-1, d.h. eine Hemmung der Glykolyse, zu erwarten.

3.2.4 Gehalte von Metaboliten in Fettkörpern nach Inkubation mit Bld HrTH und Iodacetat

Damit der Fettkörper effizient Trehalose bilden kann ist es wichtig, dass gleichzeitig die Glykolyse gedrosselt wird, so dass ein Großteil der aus dem Glykogenabbau stammenden Glucosephosphate der Synthese zugeführt und nicht oxidativ abgebaut wird. Um weitere Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wo in der Glykolyse die Kontrolle durch das hypertrehalosämische Hormon erfolgt, wurden die Gehalte ausgewählter Metabolite im Fettkörpergewebe von *Blaptica dubia* bestimmt, das mit Bld HrTH plus Iodacetat inkubiert worden war.

Iodacetat wurde oft als Stoffwechsellinhibitor eingesetzt, um Stoffwechselwege aufzuklären. Es verbindet sich mit den Thiolgruppen (SH-Gruppen von z.B. Cystein) von Proteinen zu stabilen S-Carboxymethylderivaten und kann daher bestimmte Enzyme, und offenbar besonders effizient die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, hemmen.

Fettkörperloben wurden 60 min mit Bld HrTH (10 nM) inkubiert. Nach 30 min wurde zum Inkubationsmedium der Versuchsloben Iodacetat (1 mM) hinzugefügt, während das Inkubationsmedium der Kontrollloben mit Natriumacetat (1 mM) versetzt wurde. Anschließend wurden die Metabolite Glucose, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat und Dihydroxyacetonphosphat, sowie die Trehalosesynthese bestimmt.

Tabelle 7: Gehalte ausgewählter Metabolite in isolierten Fettkörpern von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) und Iodacetat (1 mM). Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M aus n unabhängigen Einzelexperimenten.

Die Inkubation erfolgte nach der „paired-tissue“ Technik. Vom Versuchstier wurden beide Loben 30 min in 2 ml Ringierlösung mit Bld HrTH (10 nM) inkubiert. Nach 30 min wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Beim

Versuchslobus wurde neben Bld HrTH (10 nM) zusätzlich Iodacetat (1 mM) hinzugefügt, während der Kontrolllobus zusätzlich Natriumacetat (1 mM) erhielt.

Metabolit	n	Kontrolllobus Bld HrTH [nmol · g ⁻¹]	Versuchslobus Bld HrTH + Iodacetat [nmol · g ⁻¹]	Änderung [%]	p<
Glucose	5	155±45	547±176	+384,8±183,6	n.s.
Glucose-6-phosphat	5	276±39	90±17	-67,1±3,7	0,01
Fructose-6-phosphat	5	76±7	145±18	+92,2±16,2	0,01
Fructose-1,6-bisphosphat	4	157±18	1332±181	+752,1±51,7	0,01
Dihydroxyacetonphosphat	3	92±49	524±106	+583,7±324,3	n.s.
Trehalosesynthese (30 min)	6	1705±98	1057±129	-37,7±6,6	0,01

Iodacetat verursachte einen deutlichen Anstieg des Fructose-1,6-bisphosphat- und Dihydroxyacetonphosphat-Gehaltes im Vergleich zu den Kontrollloben, welche nur in Bld HrTH (10 nM) inkubiert worden waren (s. Tab. 7). Der zusätzliche Anstieg des Fructose-1,6-bisphosphat-Gehaltes lag mit +752,1 % sehr deutlich über dem Wert, der bei 60-minütiger Inkubation mit dem Hormon erzielt wurde (s. 3.2.3). Dihydroxyacetonphosphat nahm durch Inkubation mit dem Hormon plus Iodacetat zu (+583,7 %), während es bei Inkubation nur mit Hormon abgenommen hatte (-70,8 %). Die hohen S.E.M.-Werte sind darauf zurückzuführen, dass Dihydroxyacetonphosphat an der unteren Nachweisgrenze des photometrischen Tests lag. Bei Glucose und Fructose-6-phosphat war ebenfalls ein zusätzlicher Anstieg des Metabolitgehaltes im Fettkörpergewebe um +348,8 bzw. +92,2 % zu verzeichnen. Insbesondere der Glucosegehalt scheint überraschend. Die Herkunft der Glucose ist unklar, da das Inkubationsmedium frei von Glucose war. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Fettkörper, ebenso wie die Leber, über das Enzym Glucose-6-phosphatase verfügt, welches Glucose-6-phosphat zu Glucose dephosphoryliert. Diese kann dann den Fettkörper über die Plasmamembran verlassen und in die Hämolymphe eintreten.

Hingegen sank der Gehalt an Glucose-6-phosphat um -67,1 % und auch die Trehalose-Synthese, angeregt durch das hypertrehalosämische Hormon, wurde durch Iodacetat herabgesetzt. Sie lag durchschnittlich um -37,7 % unter den für die Kontrollloben ermittelten Werten. Die Änderungen der Metabolitgehalte waren, mit Ausnahme von Glucose und Dihydroxyacetonphosphat, signifikant auf dem 1 %-Niveau.

3.3 UNTERSUCHUNGEN MIT ISOLIERTEN FETTKÖRPERN

3.3.1 Variation der Dauer der Vorinkubation

Die Vorinkubation mit Insekten-Ringerlösung dient vor allem dazu, für alle Loben identische Ausgangsbedingungen zu schaffen. Da der Fettkörper *in vivo* von der Hämolymphe umspült wird (offenes Blutkreislaufsystem) und offenbar nicht innerviert ist, imitiert die Inkubation die Bedingungen *in vivo* recht gut.

Um zu untersuchen, ob die Dauer der Vorinkubation der isolierten Fettkörperloben einen Einfluss auf die Experimente hat, wurde die Vorinkubation zwischen 10 und 40 min variiert. Es schloß sich die Hauptinkubation in Bld HrTH (10 nM, 30 min) an. Untersucht wurden die Effekte auf Trehalosesynthese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt.

Die Trehalosesynthese stieg bis zu 30 Minuten mit der Dauer der Vorinkubation an. Es trat eine maximale Änderung um $+1,548 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ auf (s. Tab. 8 und Abb. 34). Ein deutlicher Sprung war zwischen dem 10 und 20 Minuten-Wert zu verzeichnen. Bei noch längeren Vorinkubationszeiten (40 min) erfolgte wieder ein leichter Rückgang der vom Fettkörper synthetisierten Trehalosemenge.

Tabelle 8: Trehalosesynthese isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach unterschiedlich langer Vorinkubation in Ringerlösung und anschließender Inkubation mit Bld HrTH (10 nM). Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M. (n siehe Tabelle).

Die Inkubation erfolgte in Insekten-Ringerlösung (Kontrolllobus) bzw. Insekten-Ringerlösung mit Bld HrTH (10 nM, Versuchslobus) in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C für 30 Minuten. Danach wurde 1 ml des Inkubationsmediums entnommen und Trehalose mit dem Anthron-Test bestimmt.

Dauer der Vorinkubation	n	Trehalosesynthese [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]		Hormon-induziert [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]	p<
		Kontrolllobus	Versuchslobus		
10 min	5	0,496±0,092	0,930±0,262	+0,434±0,171	n.s.
20 min	5	0,563±0,115	1,668±0,278	+1,106±0,244	0,05
30 min	5	0,700±0,155	2,248±0,365	+1,548±0,251	0,01
40 min	4	0,585±0,204	1,545±0,517	+0,960±0,317	n.s.

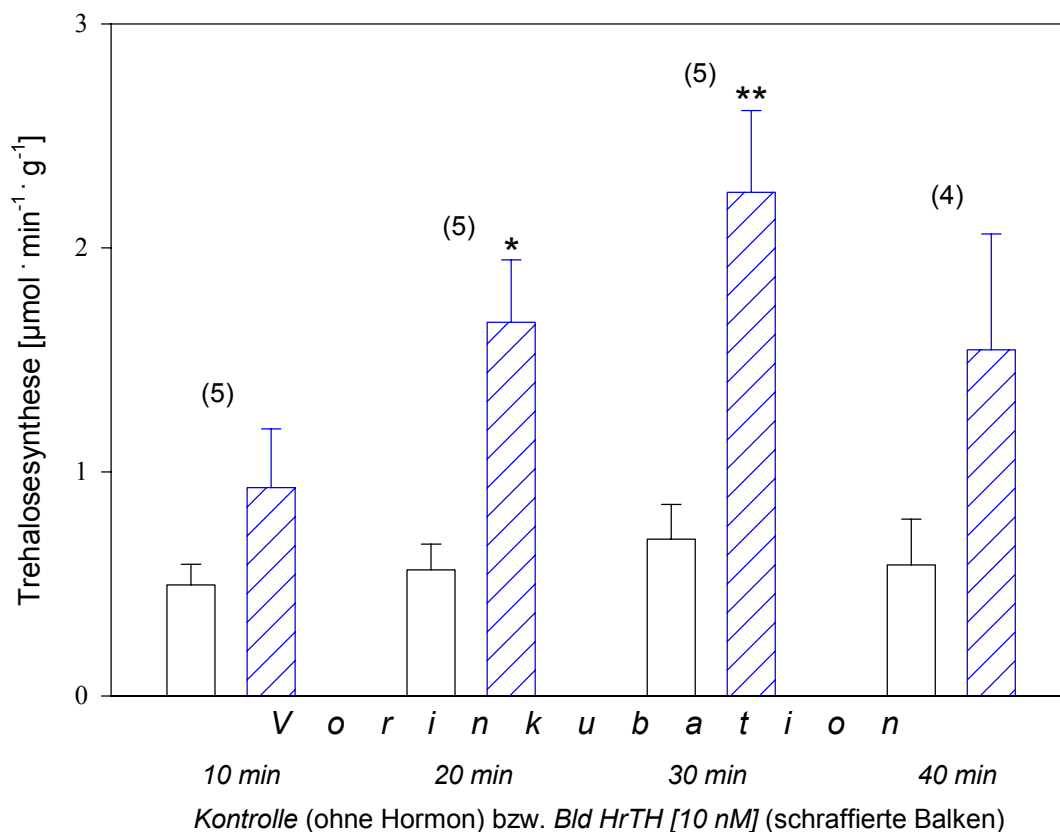


Abbildung 34: Trehalosesynthese isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach unterschiedlich langer Vorinkubation und anschließender Inkubation mit Bld HrTH (10 nM). Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert): *:p<0,05; **:p<0,01. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 8 zu entnehmen.

Der Hormon-induzierte Abfall von Fructose-2,6-bisphosphat im Fettkörper war nach 20 Minuten Vorinkubation maximal (s. Tab. 9 und Abb. 35).

Tabelle 9: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach unterschiedlich langer Vorinkubation in Ringerlösung und anschließender Inkubation mit Bld HrTH (10 nM). Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M. (n siehe Tabelle).

Die Inkubation erfolgte in Insekten-Ringerlösung (Kontrolllobus) bzw. Insekten-Ringerlösung mit Bld HrTH (10 nM, Versuchslobus) in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C für 30 Minuten. Danach wurden die Fettkörper basisch aufgearbeitet, um den im Gewebe enthaltenen Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt zu bestimmen.

Dauer der Vorinkubation	n	Fructose-2,6-bisphosphat [nmol · g ⁻¹]		Hormon-induziert [nmol · g ⁻¹]	p<
		Kontrolllobus	Versuchslobus		
10 min	5	3,398±0,786	2,486±0,828	-0,91±0,35	n.s.
20 min	5	3,576±0,768	2,034±0,479	-1,54±0,42	0,05
30 min	5	5,143±0,798	3,615±0,703	-1,53±0,35	0,05
40 min	3	3,221±0,481	1,854±0,448	-1,37±0,43	n.s.

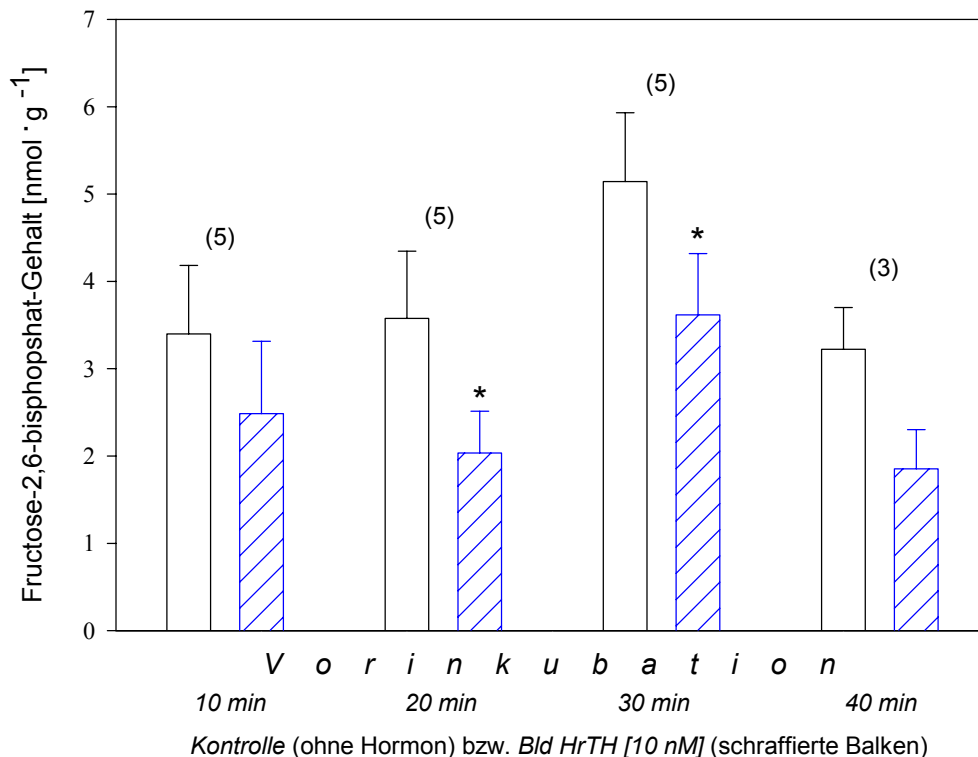


Abbildung 35: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach unterschiedlich langer Vorinkubation in Ringerlösung und anschließender Inkubation mit Bld HrTH (10 nM). Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 9 zu entnehmen.

Eine Vorinkubation von 20-30 Minuten scheint am besten geeignet zu sein, um maximale Effekte zu erzielen. Da inkubierte Fettkörper *in vitro* in ihrer metabolischen Aktivität nachlassen, wurde eine Vorinkubation von 20 Minuten gewählt.

3.3.2 Einfluss des Zuckergehaltes der Hämolymphe auf die Trehalogenese

Es sollte getestet werden, ob die Trehalogenese im Fettkörpergewebe durch in der Hämolymphe vorhandenen Mengen an Zucker beeinflusst werden kann. Eine Regulation der Synthese durch Rückkopplungshemmung erscheint physiologisch sinnvoll. Um dies zu überprüfen, wurden isolierte Fettkörperloben mit Bld HrTH (10 nM) in Insekten-Ringerlösungen mit Glucose bzw. Trehalose inkubiert. Bei Inkubation mit Glucose-haltiger Ringerlösung wurde die zugegebene Glucose vor der Metabolitbestimmung mittels Glucose-Oxidase abgebaut.

Nur mit 2 mM Glucose kam es zu einer deutlichen Steigerung der Trehalosesynthese (+125,8 %) durch das Neuropeptid. Glucose in höheren Konzentration (10 mM) und auch Trehalose in geringen Konzentrationen (2 mM) führte zu einer Herabsetzung des Hormoneffektes (s. Tab. 10 und Abb. 36). In Anwesenheit von 10 mM Trehalose war der Hormoneffekt fast völlig unterbunden (+8,2 %). Der Kohlenhydratgehalt des Mediums übte also einen deutlichen Einfluss auf die Trehalogenese des Fettkörpergewebes aus. Dies lässt vermuten, dass auch *in vivo* der Kohlenhydratgehalt der Hämolymphe über eine Rückkopplungs- (Feedback-) Hemmung auf die Trehalosesynthese im Fettkörper Einfluss nimmt.

Auffällig ist jedoch, dass insbesondere bei Anwesenheit von 10 mM Trehalose in der Ringerlösung schon die Trehalosesynthese der Kontrollloben vergleichsweise hoch schien ($3,789 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ gegenüber $0,608 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ in physiologischer Ringerlösung). Eine Erklärung wäre, dass durch die Subtraktion der bereits vor der Inkubation in der Insekten-Ringerlösung enthaltenen Trehalose, sich Ungenauigkeiten ergeben. Hierfür würde auch sprechen, dass insbesondere der Basallevel bei der Insekten-Ringerlösung mit 10 mM Trehalose gesteigert war. Dass bei hohen Trehalosekonzentrationen im Medium der Basallevel der Trehalosesynthese gesteigert wird, scheint nicht wahrscheinlich. Der Effekt ist vermutlich versuchsbedingt.

Tabelle 10: Trehalosesynthese isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) in Insekten-Ringerlösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Glucose bzw. Trehalose.

Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n siehe Tabelle).

Die Dauer der Vorinkubation in den jeweiligen Ringerlösungen betrug 20 min. Die Hauptinkubation erfolgte in den jeweiligen Insekten-Ringerlösungen (Kontrolllobus) bzw. in den jeweiligen Insekten-Ringerlösungen mit Bld HrTH (10 nM, Versuchslobus) in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C für 30 Minuten. Danach wurde 1 ml des Inkubationsmediums entnommen. Bei den Versuchsansätzen mit Glucose-haltiger Ringerlösung wurde das Medium zunächst mit Glucose-Oxidase behandelt (Abbau der Glucose des Inkubationsmediums) und anschließend die enthaltene Trehalosemenge über den Trehalase-Test bestimmt. Bei den Versuchsansätzen mit Trehalose-haltiger Ringerlösung wurde die enthaltene Trehalosemenge mit dem Anthron-Test bestimmt und die bereits vor der Inkubation enthaltene Trehalosemenge vom Gesamttrehalosegehalt subtrahiert.

Ringerlösung mit...	n	Trehalosesynthese [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]		Änderung [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]	Änderung [%]	p<
		Kontrolllobus (ohne Hormon)	Versuchslobus (mit Hormon)			
Glucose [2 mM]	5	0,608 \pm 0,068	1,374 \pm 0,159	0,766 \pm 0,095	+125,8 \pm 5,8	0,01
Glucose [10 mM]	6	1,250 \pm 0,211	1,336 \pm 0,317	0,086 \pm 0,295	+16,1 \pm 28,0	n.s.
Trehalose [2 mM]	6	1,017 \pm 0,086	1,413 \pm 0,171	0,397 \pm 0,139	+40,5 \pm 15,3	0,05
Trehalose [10 mM]	6	3,789 \pm 0,434	4,104 \pm 0,854	0,312 \pm 0,784	+8,2 \pm 20,2	n.s.

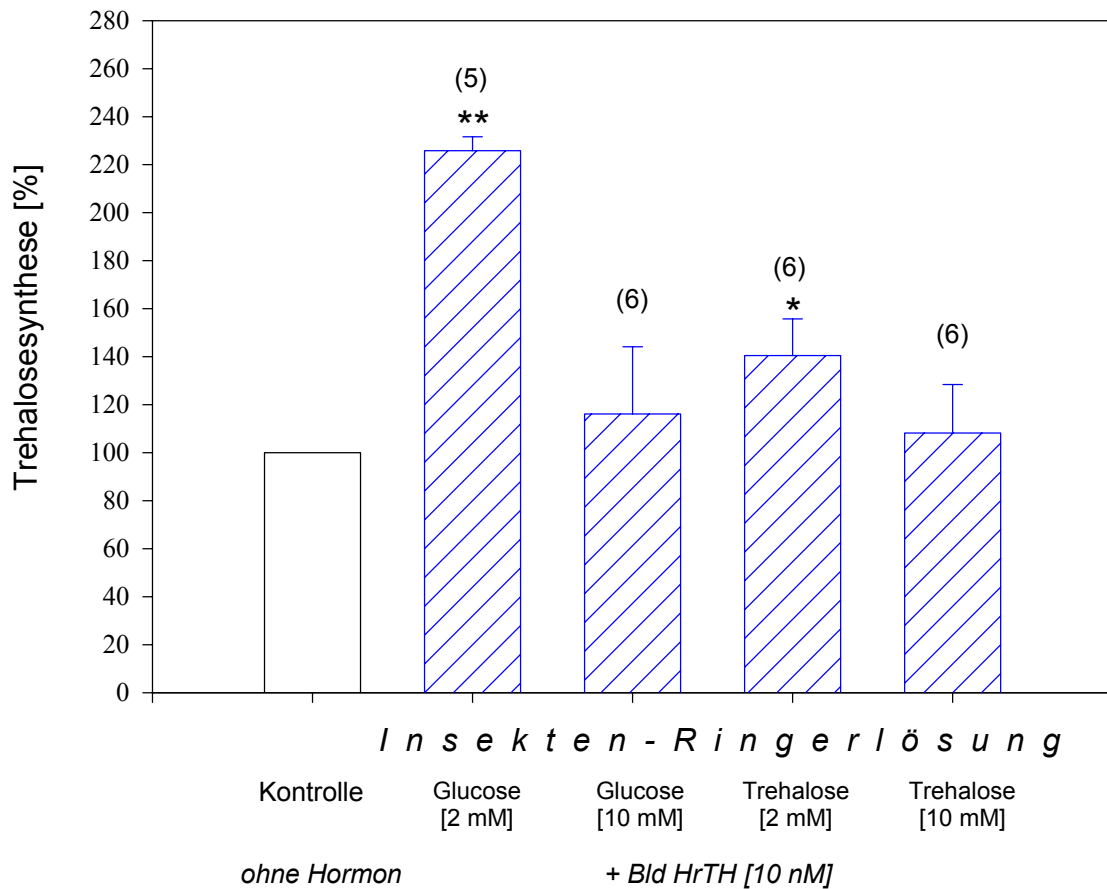


Abbildung 36: Trehalosesynthese isolierter Fettkörper von adulten Männchen von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) in Insekten-Ringerlösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Glucose bzw. Trehalose. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert): *:p<0,05; **:p<0,01. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 10 zu entnehmen.

10 mM Glucose oder 2 mM Trehalose im Inkubationsmedium hatten einen relativ geringen Einfluss auf die durch das hypertrehalosämische Hormon hervorgerufene Senkung des Fructose-2,6-bisphosphatgehaltes. Die Änderung wurde geringfügig vermindert, von -34,9 % auf -25,9 % bzw. -23,7 % (s. Tab. 11 und Abb. 37). Die verminderte Absenkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes erscheint physiologisch sinnvoll, um bei hohem Kohlenhydratangebot in der Hämolymphe dieses im Fettkörper für Synthesen und zur ATP-Gewinnung zu nutzen. Höhere Trehalosekonzentrationen (10 mM) hingegen führten zu einer stärkten Absenkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes von -52,3 %.

Tabelle 11: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) in Insekten-Ringerlösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Glucose bzw. Trehalose. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n siehe Tabelle).

Die Dauer der Vorinkubation in den jeweiligen Ringerlösungen betrug 20 min. Die Hauptinkubation erfolgte in den jeweiligen Ringerlösungen (Kontrolllobus) bzw. in den jeweiligen Ringerlösungen mit Bld HrTH (10 nM, Versuchslobus) in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C für 30 Minuten. Danach wurden die Fettkörper basisch aufgearbeitet, um Fructose-2,6-bisphosphat zu bestimmen.

Ringerlösung mit...	n	Fructose-2,6-bisphosphat [nmol · g ⁻¹]		Änderung [nmol · g ⁻¹]	Änderung [%]	p<
		Kontrolllobus (ohne Hormon)	Versuchslobus (mit Hormon)			
Glucose [2 mM]	6	2,132 \pm 0,412	1,517 \pm 0,475	-0,62 \pm 0,08	-34,9 \pm 7,0	0,01
Glucose [10 mM]	11	1,883 \pm 0,261	1,358 \pm 0,203	-0,53 \pm 0,17	-25,9 \pm 6,9	0,01
Trehalose [2 mM]	6	4,739 \pm 0,444	3,754 \pm 0,707	-0,98 \pm 0,51	-23,7 \pm 13,8	n.s.
Trehalose [10 mM]	10	3,697 \pm 0,324	1,871 \pm 0,326	-1,83 \pm 0,18	-52,3 \pm 5,5	0,001

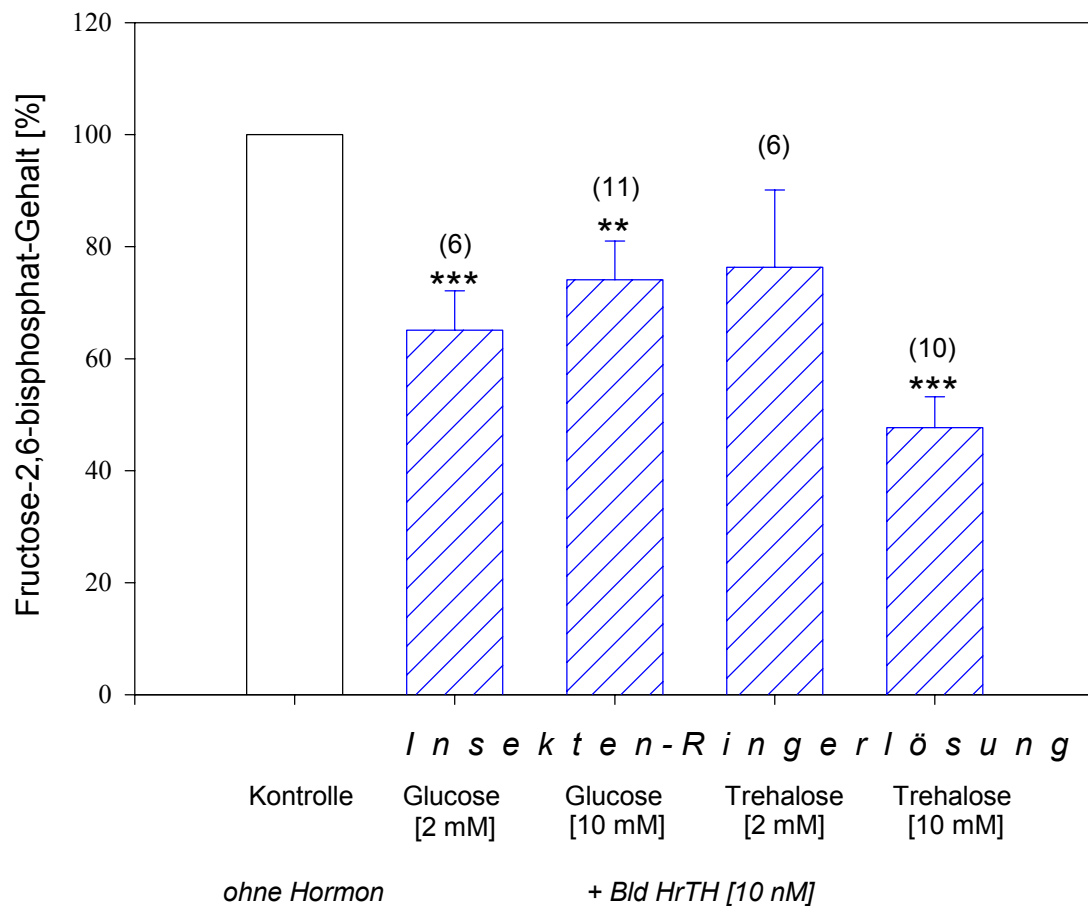


Abbildung 37: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Fettkörper adulter Männchen von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) in Insekten-Ringerlösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Glucose bzw. Trehalose. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert): **:p<0,01; ***:p<0,001. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 11 zu entnehmen.

3.3.3 Signaltransduktion des Neuropeptids Bld HrTH

3.3.3.1 Einfluss von La^{3+} -Ionen

Eine maximale Steigerung der Trehalosesynthese isolierter Fettkörper durch Bld HrTH ist nur in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} möglich. Ca^{2+} ist folglich für die Signaltransduktion hypertrehalosämischer Neuropeptide wichtig (MCCLURE & STEELE 1981, STEELE & PAUL 1985, ORR *et al.* 1985, LIEWALD 1997). Lanthan-Ionen können Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktionswege beeinflussen, indem sie mit Ca^{2+} um Bindungsstellen an der Membran konkurrieren und Ca^{2+} -Kanäle bzw. -Pumpen inhibieren (MORLEY & WHITFIELD 1993, HEPLER 1992).

Isolierte Fettkörper wurden in Anwesenheit von La^{3+} -Ionen inkubiert. Lanthan-Ionen verminderten die Steigerung der Trehalosesynthese durch Bld HrTH (10 nM) in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen von +125,8 auf +56,2 %, in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen auf +46,4% (s. Tab. 12). Bei nicht mit Hormon behandelten Fettkörpern war die freigesetzte Trehalosemenge durch La^{3+} -Ionen (in Ca^{2+} -freiem Medium) um 35,7 % erniedrigt. Dies läßt sich zum einen dadurch erklären, dass der Lanthan-haltigen Ringerlösung kein Ca^{2+} zugefügt wurde, welches bei der Signaltransduktion eine bedeutende Rolle spielt. Jedoch hatte die Inkubation mit Bld HrTH und beiden Ionen gezeigt, dass auch in Anwesenheit von Ca^{2+} die Trehalosesynthese durch La^{3+} deutlich herabgesetzt ist (+56,2 %). Zudem ist auffällig, dass bei den Kontrollansätzen, in denen Lanthan-Ionen zugesetzt wurden, die Trehalosesynthese sehr niedrig ist ($0,059$ bzw. $0,088 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) im Vergleich zum Ansatz mit physiologischer Ringerlösung ($0,608 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Dies läßt darauf schließen, dass extrazellulärem Ca^{2+} auch bei der basalen Trehalosesynthese (in Abwesenheit des Hormons) eine wichtige Rolle zukommt.

Tabelle 12: Trehalosesynthese isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation in Insekten-Ringerlösungen mit verschiedenen Ionen (Ca^{2+} , La^{3+}) mit bzw. ohne Bld HrTH (10 nM). Die den Versuchsloben zugefügte Substanz ist jeweils in Fettdruck hervorgehoben. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n siehe Tabelle).

Die Dauer der Vorinkubation in den jeweiligen Ringerlösungen betrug 20 min. Die Hauptinkubation erfolgte in den jeweiligen Insekten-Ringerlösungen ohne (Kontrolllobus) bzw. mit Testsubstanz (Versuchslobus) in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C für 30 Minuten. Danach wurde 1 ml des Inkubationsmediums entnommen und die enthaltene Trehalosemenge mit dem Anthron-Test bestimmt.

	n	Trehalosesynthese [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]		Änderung [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]	Änderung [%]	p<
		Kontrolllobus	Versuchslobus			
Bld HrTH [10 nM] + (Ca^{2+} [1,8 mM])	3	0,608 \pm 0,068	1,374 \pm 0,159	0,766 \pm 0,095	+125,8\pm5,8	0,05
La^{3+} [1,8 mM] (Ca^{2+}-frei)	6	0,191 \pm 0,057	0,121 \pm 0,034	-0,071 \pm 0,025	-35,7\pm3,3	0,05
Bld HrTH [10 nM] + (La^{3+} [1,8 mM], Ca^{2+}-frei)	5	0,088 \pm 0,030	0,129 \pm 0,047	0,041 \pm 0,020	+46,4\pm25,1	n.s.
Bld HrTH [10 nM] + (La^{3+} [1,8 mM], Ca^{2+} [1,8 mM])	5	0,059 \pm 0,010	0,090 \pm 0,016	0,031 \pm 0,011	+56,2\pm21,5	0,05

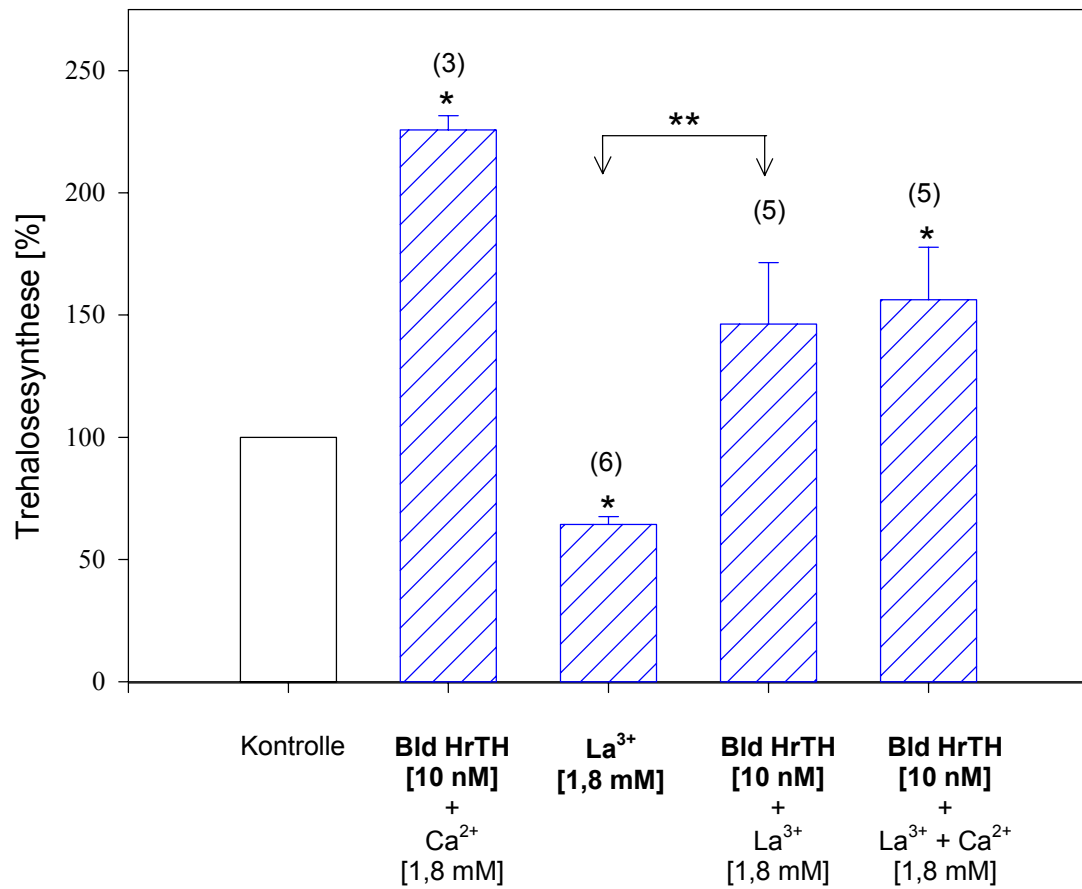


Abbildung 38: Effekte von Bld HrTH (10 nM), Ca²⁺ und La³⁺ auf die Trehalosesynthese isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia*. Die den Versuchsloben zugefügte Substanz ist jeweils in Fettdruck hervorgehoben. Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 12 zu entnehmen.

Überraschend war die Wirkung von La^{3+} auf den Fructose-2,6,-bisphosphat-Gehalt des Fettkörpers, welcher um +156 % gesteigert wurde (s. Tab. 13). Der Effekt des Hormons wurde, sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von Ca^{2+} , durch Lanthan-Ionen fast vollständig unterbunden (s. Tab. 13).

Tabelle 13: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation in Insekten-Ringerlösungen mit verschiedenen Ionen (Ca^{2+} , La^{3+}) mit bzw. ohne Bld HrTH (10 nM). Die den Versuchsloben zugefügte Substanz ist jeweils in Fettdruck hervorgehoben. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n siehe Tabelle).

Die Dauer der Vorinkubation in den jeweiligen Ringerlösungen betrug 20 min. Die Hauptinkubation erfolgte in den jeweiligen Ringerlösungen ohne (Kontrolllobus) bzw. mit Testsubstanz (Versuchslobus) in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C für 30 Minuten. Danach wurden die Fettkörper basisch aufgearbeitet, um Fructose-2,6-bisphosphat zu bestimmen.

	n	Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt [nmol · g ⁻¹]		Änderung [nmol · g ⁻¹]	Änderung [%]	p<
		Kontrolllobus	Versuchslobus			
Bld HrTH [10 nM] + (Ca^{2+} [1,8 mM])	3	1,583 \pm 0,086	1,096 \pm 0,051	-0,468 \pm 0,088	-30,4 \pm 4,5	0,05
La³⁺ [1,8 mM] (Ca^{2+} -frei)	5	1,462 \pm 0,758	3,127 \pm 1,512	1,665 \pm 1,138	+156,0 \pm 105,5	0,05
Bld HrTH [10 nM] + (La^{3+} [1,8 mM], Ca^{2+} -frei)	6	2,908 \pm 1,271	2,893 \pm 2,098	-0,016 \pm 1,192	-2,4 \pm 44,2	n.s.
Bld HrTH [10 nM] + (La^{3+} [1,8 mM], Ca^{2+} [1,8 mM])	5	4,214 \pm 0,782	4,065 \pm 1,557	-0,150 \pm 1,407	-3,9 \pm 39,9	n.s.

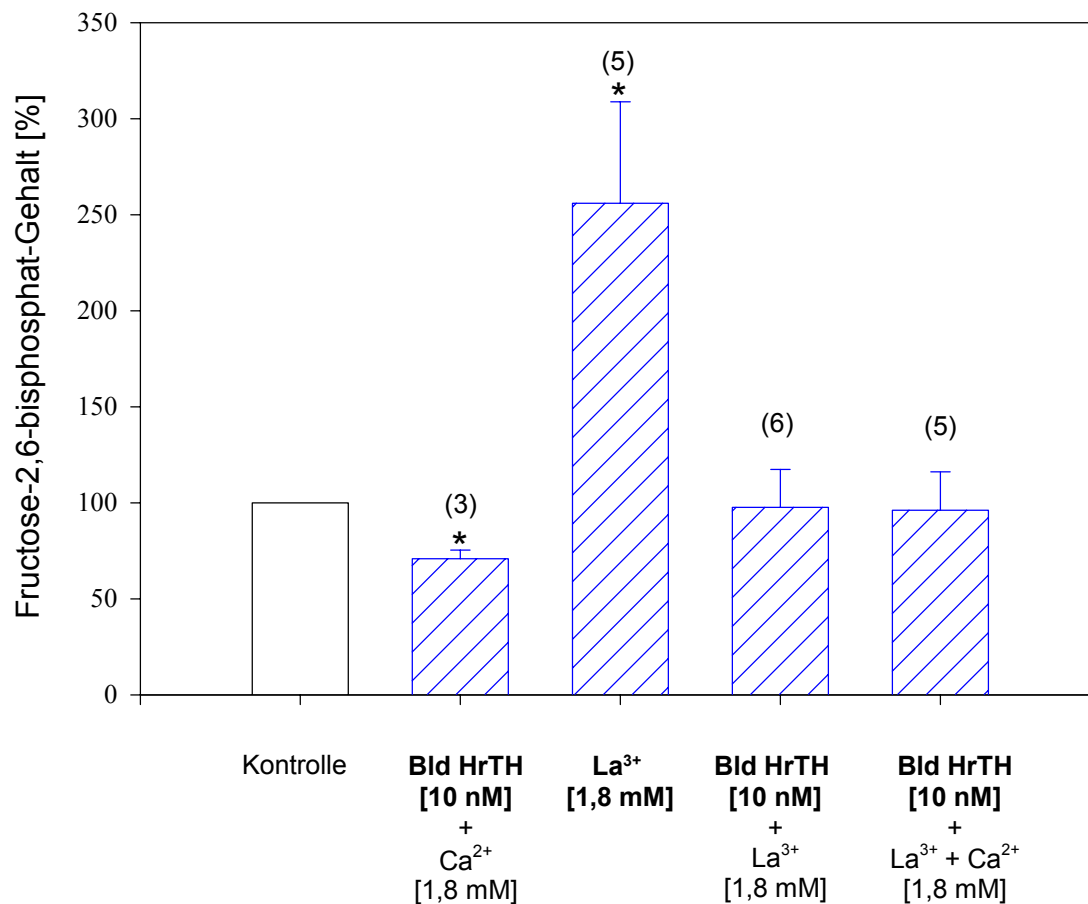


Abbildung 39: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) in Insekten-Ringerlösungen mit unterschiedlichen Ionenzusammensetzungen. Die den Versuchsloben zugefügte Substanz ist jeweils in Fettdruck hervorgehoben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert): *: $p < 0,05$. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 13 zu entnehmen.

3.3.3.2 Bedeutung von NO

Erst in den letzten Jahren wurde die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) als Botenmolekül deutlich, und die NO/cGMP-vermittelte Signaltransduktion wurde intensiv erforscht. Durch Aktivierung der cytosolischen Isoform der Guanylylzyklase (z.B. in Gehirn, peripherem Nervensystem, Blutgefäßen) kann NO die Synthese von cGMP veranlassen, welches die NO-Wirkung vermittelt, indem beispielsweise Proteinkinasen (Proteinkinase G) aktiviert werden. Bei Vertebraten spielt dies bei vielen physiologischen Prozessen, insbesondere im kardiovaskulären und im Nervensystem, eine wichtige Rolle (KOESLING 2000). Außerdem kann NO an Metallatome im aktiven Zentrum von Enzymen binden und diese hemmen. Dies wird zum

Beispiel von Makrophagen genutzt, um essentielle Enzyme in Tumorzellen oder Parasiten zu inaktivieren.

Die Synthese des NO erfolgt aus der Aminosäure L-Arginin durch das Enzym NO-Synthase (s. 4.8.3), welches in 2 Isoformen auftritt, einer induzierbaren und einer konstitutiven. Letztere wird durch Erhöhung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert (KLINKE & SILBERNAGEL 1996).

N^6 -Methyl-L-Arginin (L-NMA), ein vielfach eingesetzter kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase, ist ein Arg-Analogon, welches das Enzym irreversibel hemmt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Arg-Analoga zeigt es keine Präferenz für eine der NO-Synthase-Isoformen (induzierbar bzw. konstitutiv). Die Fettkörperloben von *Blaptica dubia* wurden 30 Minuten mit Bld HrTH (10 nM) und N^6 -Methyl-L-Arginin (0,25 mM) inkubiert. Dies führte zu einer Steigerung der Trehalosesynthese um +158,3 % (s. Tab. 14). Der Wert liegt nicht signifikant über dem Ergebnis, das bei alleiniger Inkubation mit dem Hormon erreicht wurde (+136,6 %). Bei alleiniger Inkubation mit N^6 -Methyl-L-Arginin zeigte sich ebenfalls keine signifikante Wirkung auf die Trehalose-Synthese (90,8 % der Trehalosesynthese der Kontrollloben).

Tabelle 14: Trehalosesynthese isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) und N⁶-Methyl-L-Arginin (0,25 mM). Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M. (n siehe Tabelle). Die Dauer der Vorinkubation betrug 20 min. Die Hauptinkubation erfolgte in Insekten-Ringerlösung (Kontrolllobus) bzw. Insekten-Ringerlösung mit der jeweiligen Testsubstanz (Versuchslobus) in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C für 30 Minuten. Danach wurde 1 ml des Inkubationsmediums entnommen und die enthaltene Trehalosemenge mit dem Anthron-Test bestimmt.

Testsubstanz	n	Trehalosesynthese [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]		Änderung [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]	Änderung [%]	p<
		Kontrolllobus	Versuchslobus			
Bld HrTH [10 nM]	3	0,302±0,105	0,632±0,189	0,330±0,098	+136,6±46,7	n.s.
Bld HrTH [10 nM] + Methyl-Arginin [0,25 mM]	7	0,262±0,054	0,597±0,086	0,335±0,064	+158,3±34,1	0,01
Methyl-Arginin [0,25 mM]	8	0,197±0,041	0,180±0,040	-0,017±0,023	-9,2±9,6	n.s.

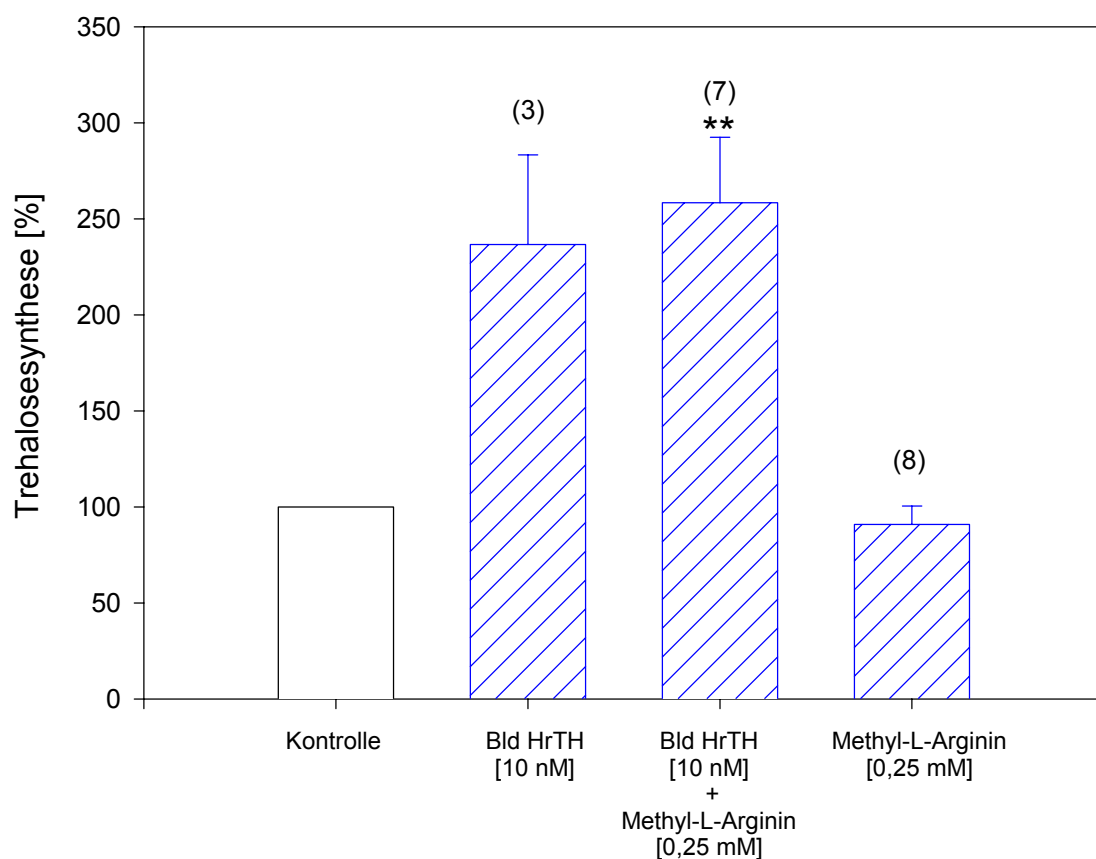


Abbildung 40: Trehalosesynthese isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) und N^G-Methyl-L-Arginin (0,25 mM). Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenanzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert): **:p<0,01. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 14 zu entnehmen.

Auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt der inkubierten Fettkörper hatte L-NMA ebenfalls keinen signifikanten Effekt (s. Tab. 15). Die Werte mit und ohne L-NMA lagen dicht beieinander. Bei Inkubation des Fettkörpers mit L-NMA (ohne Hormon) wurde der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt um +16,9 % gesteigert. Der Effekt ist aber statistisch nicht signifikant und nur bei 4 der 8 Ansätze war tatsächlich eine Steigerung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes zu verzeichnen.

Tabelle 15: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) und N⁶-Methyl-L-Arginin (0,25 mM). Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M. (n siehe Tabelle).

Die Dauer der Vorinkubation betrug 20 min. Die Hauptinkubation erfolgte in Insekten-Ringerlösung (Kontrolllobus) bzw. Insekten-Ringerlösung mit der jeweiligen Testsubstanz (Versuchslobus) in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C für 30 Minuten. Danach wurden die Fettkörper in flüssigem N₂ eingefroren und basisch aufgearbeitet.

Testsubstanz	n	Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt [nmol · g ⁻¹]		Änderung [nmol · g ⁻¹]	Änderung [%]	p<
		Kontrolllobus	Versuchslobus			
Bld HrTH [10 nM]	3	2,814±0,371	1,850±0,408	-0,964±0,126	-35,9 ±7,1	0,05
Bld HrTH [10 nM] + Methyl-Arginin [0,25 mM]	7	3,333±0,253	2,422±0,360	-0,971±0,234	-30,2 ±7,6	0,01
Methyl-Arginin [0,25 mM]	8	3,036±0,531	3,527±0,665	0,491±0,382	+16,9 ±12,1	n.s.

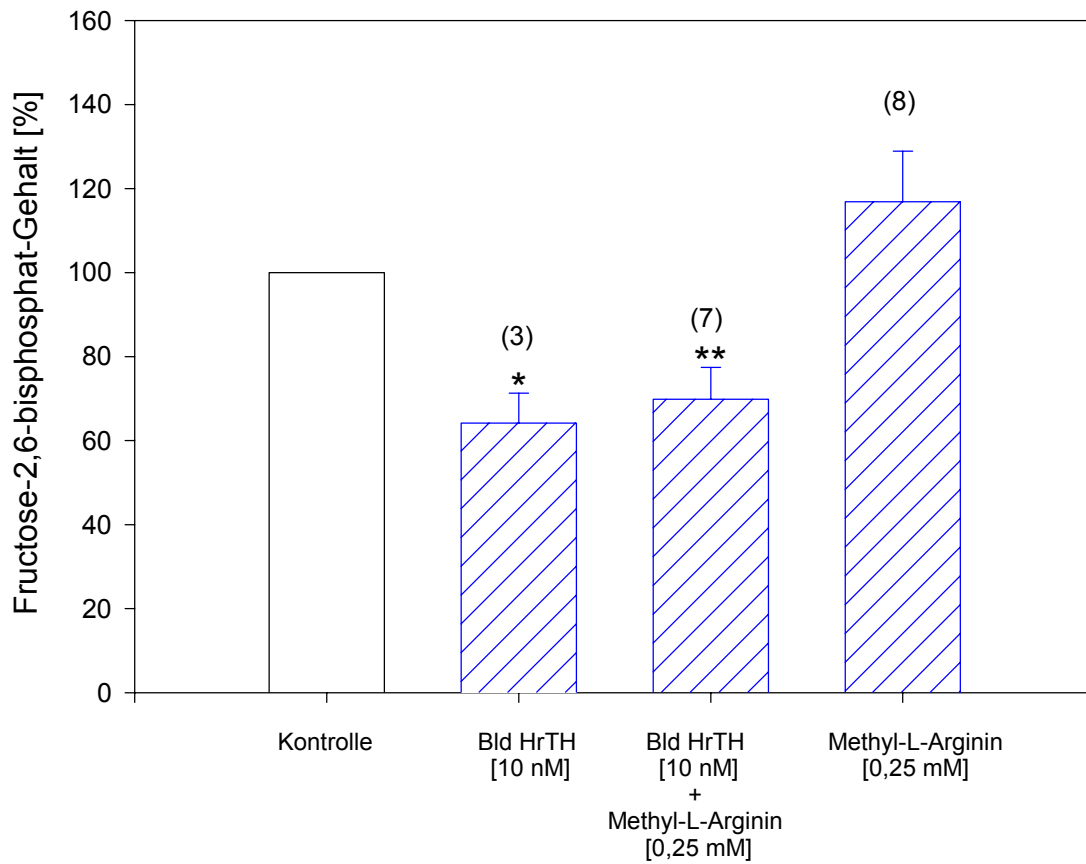


Abbildung 41: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation in Insekten-Ringerlösung mit Bld HrTH (10 nM) und N⁶-Methyl-L-Arginin (0,25 mM). Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert): *:p<0,05; **:p<0,01. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 15 zu entnehmen.

3.4 UNTERSUCHUNGEN MIT ISOLIERTEN TROPHOCYTEN

3.4.1 Optimierung der Zellisolierung

Untersuchungen zur hormonellen Regulation mit isolierten Fettkörperzellen, erstmals erfolgreich bei *Locusta migratoria* durchgeführt (ASHER *et al.* 1984), erlangten erst in den letzten Jahren Bedeutung. Problematisch für die Zellen erweisen sich zum einen die relativ aggressiven Isolierungsmethoden (Verwendung proteolytischer Enzyme), sowie die veränderten Milieubedingungen *in vitro*.

Frühere Studien in unserem Labor (BECKER 1996) hatten gezeigt, dass nach der von LEE & GOLDSWORTHY (1995) für *Locusta migratoria* entwickelten Methode isolierte Trophocyten der Argentinischen Schabe keine maximale Steigerung der Trehalosesynthese und keine signifikante Änderung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes zeigten, wie sie bei Versuchen mit isolierten Fettkörpern beobachtet wurden. Bei 30-minütiger Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) war die Trehaloseproduktion nur um $+61,5 \pm 9,61$ % erhöht, gegenüber $+130,0$ % bei isoliertem Fettkörpergewebe (BECKER 1996). Der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt verringerte sich nur um $-11,6$ %, verglichen mit $-41,6$ % bei isolierten Fettkörpern. Auf ähnliche Probleme stießen auch STEELE & IRELAND 1994 bei Versuchen mit isolierten Trophocyten der Amerikanischen Schabe (*Periplaneta americana*), die auf die hypertrehalosämischen Hormone Pea CAH-I und -II ebenfalls mit geringer gesteigerter Trehalogenese reagierten als isolierte Fettkörper.

Untersuchungen mit einem Ca^{2+} -spezifischen Fluoreszenzfarbstoff deuteten darauf hin, dass die Trophocyten im Verlauf der Isolierung ihre Ca^{2+} -Homöostase nicht aufrechterhalten können, so dass es zu einem unkontrollierten Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen kommt (BECKER, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies könnte Ursache für den ausbleibenden Effekt des Neuropeptids auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt sein. Der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} ist für die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes notwendig (LIEWALD 1997, BECKER 1996). Die ausbleibende Hemmung der Glykolyse wiederum würde zum Abbau der für die Trehalosesynthese benötigten Substrate führen und so auch diese vermindern.

Aus diesem Grund wurde zunächst die Zelltrennung für die Fettkörperzellen von *Blaptica dubia* optimiert. Versuche, bei denen Alter und Größe der Schaben, Zentrifugationsdauer, -geschwindigkeit, Zusammensetzung der Insekten-Ringerlösung, Konzentration des zur Lösung der Zellkontakte verwendeten Chymotrypsins und der DNase sowie Dauer der Ruhephase der isolierten Zellen, variiert wurden, führten zu dem Ergebnis, dass ein unkontrollierter Ca^{2+} -Einstrom verhindert werden konnte, wenn die Zelltrennung in Ca^{2+} -freier Insekten-Ringerlösung durchgeführt wurde und die isolierten Trophocyten erst nach einer einstündigen Ruhephase in

Ca²⁺-haltiger Insekten-Ringerlösung suspendiert wurden. Zudem wirkte es sich positiv auf die Zellausbeute aus, wenn die Fettkörper möglichst junger und großer Schaben verwendet wurden, anstelle einer größeren Anzahl von Fettkörpern kleinerer Tiere. Es empfiehlt sich, das Abdomen nach dem Dekapitieren zunächst 5 Minuten ruhen zu lassen, bevor mit der Präparation fortgefahren wird. Bei der Präparation sollte man zudem sorgfältig darauf achten, möglichst kein Nerven- und Muskelgewebe und möglichst wenig Tracheen mit dem Fettkörpergewebe heraus zu operieren. Auch wenn in früheren Publikationen (HAYES & KEELEY 1985) darauf hingewiesen wurde, dass Tracheen das Fettkörpergewebe von *Blaberus discoidalis in vitro* länger metabolisch aktiv halten können, ist dies bei isolierten Fettkörperzellen nicht von Bedeutung. Ein entscheidender Schritt ist schließlich das Aufziehen der Zellsuspension mit der Eppendorf-Pipette, um die Disaggregation zu unterstützen. Hier sollte man sehr vorsichtig vorgehen und das Gewebe nur sehr langsam aufziehen und ablassen, um die Scherkräfte möglichst niedrig zu halten.

Tabelle 16: Veränderte Parameter bei der Separierung von Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia*.

1. Auswahl von jungen Schaben mit möglichst großem Fettkörper
2. 5-minütige Ruhephase nach dem Dekapitieren
3. saubere Präparation des Fettkörpergewebes ohne Nachbargewebe
4. Separierung in Ca²⁺-freier Insekten-Ringerlösung
5. weniger häufiges Aufziehen des disaggregierten Fettkörpergewebes mit Eppendorf-Pipette
6. Herabsetzung der Zentrifugationsgeschwindigkeit (450 Upm)
7. Verkürzung der Zentrifugationsdauer (5 min)

Mit der neuen Methode wurden durch Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) ebenso deutliche Effekte auf die Trehalosesynthese und den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten erreicht wie mit isolierten Fettkörpern (s. 3.4.3.1). Die durchschnittliche Zellausbeute betrug 167.349 ± 16.413 Trophocyten $\cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{g Fettkörper}^{-1}$ (n=11).

3.4.2 Überprüfung der Vitalität und Permeabilität isolierter Trophocyten mit Trypanblau

Die Überprüfung der Vitalität bzw. Permeabilität von Trophocyten mit dem Azofarbstoff Trypanblau (s. Abb. 42) erwies sich als vergleichsweise schwierig.

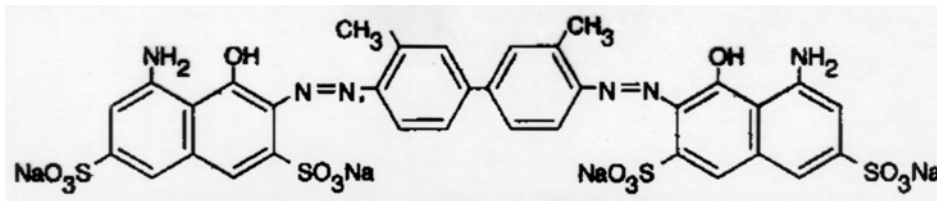


Abbildung 42: Strukturformel von Trypanblau.

Generell ist Trypanblau nicht in der Lage, die intakte Cytoplasmamembran lebender Zellen zu passieren. Es kann jedoch durch die Membran toter Zellen diffundieren und deren Cytoplasma selektiv blau anfärben (Trypanblauausschlussmethode). Da die Fettkörperzellen sehr dicht mit Fettvakuolen angefüllt sind (s. Abb. 43), war eine Blaufärbung dieses Zelltyps jedoch nur mit starker Vergrößerung (20er oder 40er Objektiv) und bei intensiver Auswertung der Einzelzellen zu beobachten. Die Blaufärbung war meist am besten in der Mitte der Zelle zu erkennen.

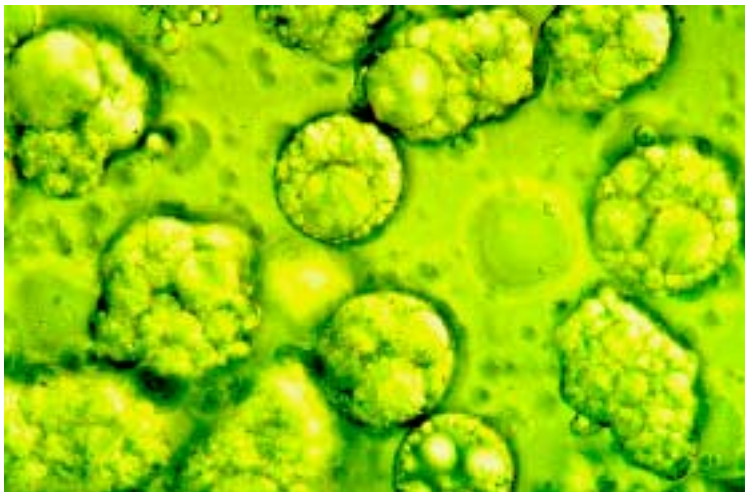


Abbildung 43: Isolierte Trophocyten aus dem Fettkörpergewebe der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*).

Die Aufnahme erfolgte an einem Axioplan Mikroskop (CARL ZEISS JENA) mit einer OM4 Ti Kamera (OLYMPUS) im differentiellen Interferenzkontrast (DIC). Primärvergrößerung: 225fach, photographische Nachvergrößerung: ca. 1,7fach.

Die Auswertung in der Neubauer-Zählkammer bei 2 unabhängigen Versuchen unmittelbar nach Separierung der Zellen ergab, dass 90 bzw. 98 % der isolierten Zellen nicht permeabel für Trypanblau und somit vital waren. 90 Minuten nach Abschluß der Zellisolierung wiesen durchschnittlich noch 89 % der Zellen keine Blaufärbung auf. Diese Ergebnisse zeigen die Qualität des modifizierten Verfahrens zur Separierung von Trophocyten, da bei der ursprünglichen Methode mindestens 40 % der Trophocyten Blaufärbung aufwiesen.

3.4.3 Signaltransduktion des Neuropeptids Bld HrTH

3.4.3.1 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Bld HrTH

Für die nach dem verbesserten Separierungsverfahren isolierten Trophocyten wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve für das hypertrehalosämische Hormon Bld HrTH erstellt. Die Wirkung des hypertrehalosämischen Hormons auf die isolierten Trophocyten war konzentrationsabhängig. Bereits 1 nM Bld HrTH führte zu einer Steigerung der Trehalosesynthese um +105,9 %, während bei isolierten Fettkörpern dieselbe Hormonkonzentration nur eine nicht signifikante Steigerung um +13,6 % brachte (BECKER 1996). Ebenso wie bei isolierten Fettkörpern wurde eine maximale Steigerung im Bereich von 10 bis 100 nM Bld HrTH erreicht und auch der Maximalwert lag mit +133,7 % im selben Bereich wie beim Fettkörpergewebe (+130,0 %).

Insgesamt entspricht die Dosiswirkungskurve der hyperbolischen Wirkungskurve des Neuropeptids auf isoliertes Fettkörpergewebe (BECKER 1996). Der halbmaximale Effekt (EC_{50} -Wert) für die isolierten Trophocyten betrug allerdings 0,46 nM Bld HrTH, gegenüber 2 nM bei isolierten Fettkörpern (BECKER 1996).

Tabelle 17: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. (n siehe Tabelle).

Die Inkubation erfolgte jeweils in 1,6 ml Insekten-Ringerlösung (Kontrolle) bzw. Insekten-Ringerlösung mit der jeweiligen Testsubstanz in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C über 30 Minuten. Danach wurden 200 μ l des Inkubationsmediums entnommen und die Trehalosekonzentration über den Trehalase-Test bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus 2 separaten Experimenten mit identischen Versuchsbedingungen, jedoch jeweils unterschiedlichen Hormonkonzentrationen (0,3; 0,6; 40 und 70 nM (I) bzw. 1; 4; 10; 100 nM (II) Bld HrTH).

Bld HrTH	n	Trehalosesynthese [nmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle I	3	15,84 \pm 1,26		
Kontrolle II	4	17,62 \pm 0,54		
[0,3 nM]	3	22,41 \pm 0,50	+41,5\pm3,2	0,05
[0,6 nM]	3	29,19 \pm 0,68	+84,3\pm4,3	0,01
[1 nM]	4	36,28 \pm 0,74	+105,9\pm4,2	0,001
[4 nM]	4	38,98 \pm 0,77	+121,2\pm4,4	0,001
[10 nM]	3	40,44 \pm 0,21	+129,5\pm1,2	0,001
[40 nM]	3	36,66 \pm 0,97	+131,5\pm6,1	0,001
[70 nM]	3	37,01 \pm 1,87	+133,7\pm11,8	0,001
[100 nM]	3	41,18 \pm 0,24	+133,7\pm1,4	0,001

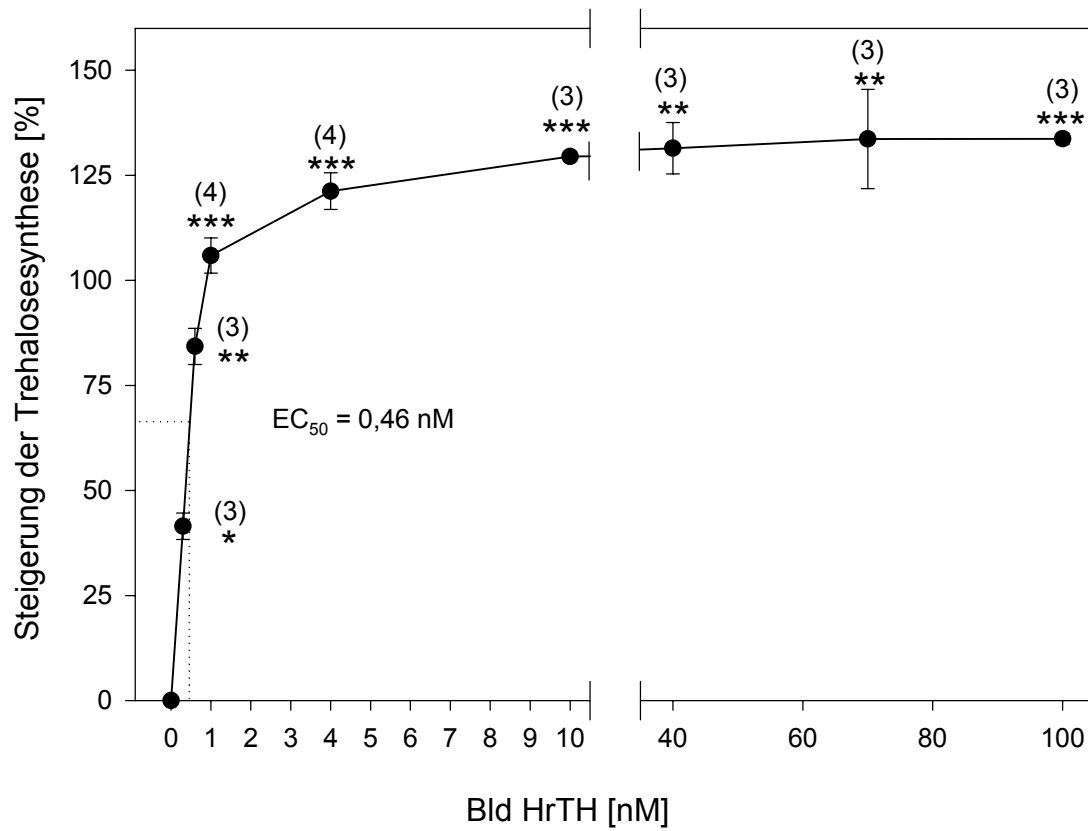


Abbildung 44: Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von Bld HrTH auf die Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den Kontrollwert): *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 17 zu entnehmen.

Auch die Wirkung des hypertrehalosämischen Hormons auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt der isolierten Trophocyten war konzentrationsabhängig. Während 1 nM Neuropeptid den Gehalt an Fructose-2,6-bisphosphat nur um -11,2 % senkte, wurde eine maximale Erniedrigung (-30,2 %) durch 70 nM Bld HrTH erreicht. Der EC_{50} -Wert lag bei 5,9 nM Bld HrTH.

Tabelle 18: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M.

Die Inkubation erfolgte jeweils in 1,6 ml Insekten-Ringerlösung (Kontrolle) bzw. Insekten-Ringerlösung mit der jeweiligen Testsubstanz in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C über 30 Minuten. Danach wurden die Trophocyten bis zur basischen Aufarbeitung und der Bestimmung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes in flüssigem N₂ aufbewahrt. Die Ergebnisse stammen aus 2 separaten Experimenten mit identischen Versuchsbedingungen, jedoch jeweils unterschiedlichen Hormonkonzentrationen (0,3; 0,6; 40 und 70 nM (**I**) bzw. 1; 4; 10; 100 nM (**II**) Bld HrTH).

Bld HrTH	n	Fructose-2,6-bisphosphat [pmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle I	3	2,00 \pm 0,18		
Kontrolle II	4	2,23 \pm 0,14		
[0,3 nM]	3	1,91 \pm 0,12	-4,5\pm5,9	n.s.
[0,6 nM]	3	1,82 \pm 0,05	-8,7\pm2,6	n.s.
[1 nM]	4	1,98 \pm 0,14	-11,2\pm6,1	n.s.
[4 nM]	4	1,93 \pm 0,07	-13,7\pm3,3	n.s.
[10 nM]	3	1,84 \pm 0,10	-17,4\pm4,6	n.s.
[40nM]	3	1,51 \pm 0,07	-24,4\pm3,3	n.s.
[70 nM]	3	1,39 \pm 0,02	-30,2\pm1,0	0,05
[100 nM]	4	1,58 \pm 0,17	-29,4\pm7,6	0,05

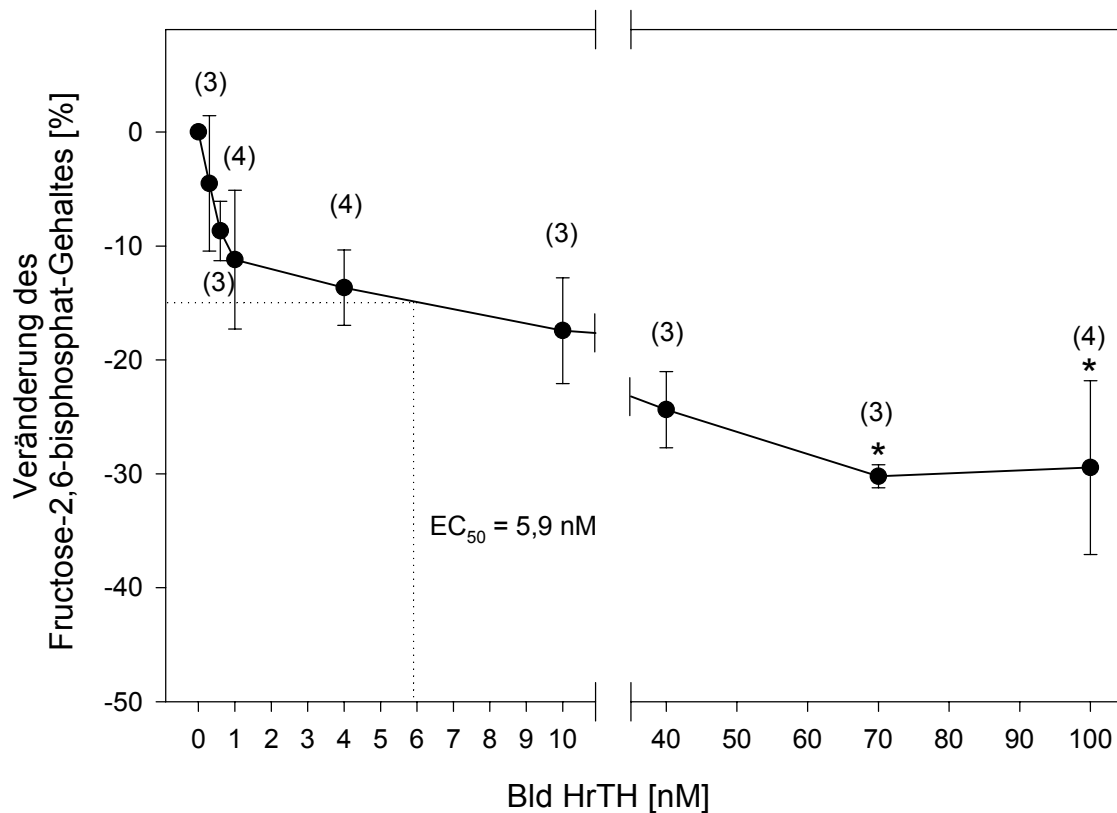


Abbildung 45: Effekte von Bld HrTH auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): *: $p < 0,05$. Die Versuchsbedingungen sind Tab.18 zu entnehmen.

Die Ergebnisse zeigen die Qualität des veränderten Separierungsverfahrens. Sowohl bei der Trehalogenese als auch beim Fructose-2,6-bisphosphat wurden Maximaleffekte erreicht, wie sie von Versuchen mit isolierten Fettkörpern bekannt sind. Dementsprechend liefert die Methode eine wertvolle Alternative, um die hormonelle Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels im Fettkörper von *Blaptica* zu untersuchen.

Die Trehalogenese reagiert deutlich empfindlicher als Fructose-2,6-bisphosphat auf das hypertrehalosämische Hormon Bld HrTH. Die Beobachtung ist interessant, da sie eine abgestufte Reaktion anzeigt, welche bei isolierten Fettkörpern bislang nicht festgestellt worden war. Zunächst könnte es zu einer Stimulation der Glykogenolyse (Bereitstellung von Substraten) sowie der Trehalogenese kommen. Erst bei deutlich erhöhtem Hämolympf Spiegel des Neuropeptids würde dann über eine Absenkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes die

Glykolyse gehemmt und gleichzeitig die Gluconeogenese aktiviert, so dass die Trehalogenese abhängig von der Konzentration des Hormons in der Hämolymphe effizienter wird.

3.4.3.2 Bedeutung von Octopamin

Octopamin (1-p-Hydroxyphenylethanolamin) ist ein biogenes Amin, das im Nervengewebe von Invertebraten (z.B. Insekten, Mollusken, Krebse) zu finden ist. Bei Schaben wurde es im Gehirn und in thorakalen und abdominalen Nervenzellen nachgewiesen (ROBERTSON & STEELE 1974).

Octopamin wirkt bei Insekten sowohl als Neurotransmitter und Neuromodulator als auch als zirkulierendes Neurohormon (EVANS 1980). Für viele Insektengewebe konnte gezeigt werden, dass Octopamin seine Wirkung durch Aktivierung der Adenylatcyclase (DOWNER 1990, gezeigt für *Periplaneta americana*) und Erhöhung der cAMP-Konzentration (GOLE & DOWNER 1979) vermittelt. Es sollte untersucht werden, ob Octopamin die Trehalosesynthese der isolierten Fettkörperzellen von *Blaptica dubia* beeinflussen kann.

D,L-Octopamin zeigte einen leicht stimulierenden Effekt auf die Trehalosesynthese in isolierten Trophocyten von *Blaptica dubia*. Allerdings lagen selbst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen (10^{-4} M) die Änderungen (+39,8 %) deutlich unter denen, die durch das Neuropeptid Bld HrTH erzielt werden können (+133,7 %). Bei einer Konzentration von 10^{-6} M war sogar eine leichte, jedoch nicht signifikante Verringerung der Synthese zu verzeichnen (-26,6 %). Im Vergleich zu Versuchen mit isolierten Fettkörperloben (LIEWALD 1997), bei denen mit Octopamin (10^{-4} M) eine maximale Steigerung der Trehalosesynthese um +101,6 % erreicht wurde, war der Anstieg bei den Trophocyten weniger stark ausgeprägt.

Tabelle 19: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Octopamin. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M.

Die Inkubation erfolgte jeweils in 1,6 ml Insekten-Ringerlösung (Kontrolle) bzw. Insekten-Ringerlösung mit der jeweiligen Testsubstanz in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C über 30 Minuten. Danach wurden 200 μ l des Inkubationsmediums entnommen und die Trehalosekonzentration über den Trehalase-Test bestimmt.

Octopamin	n	Trehalosesynthese [nmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	30,40 \pm 1,36		
[10⁻⁶ M]	3	22,32 \pm 2,97	-26,6\pm9,8	n.s.
[10⁻⁵ M]	3	43,40 \pm 5,26	+42,8\pm17,3	n.s.
[10⁻⁴ M]	3	42,50 \pm 1,25	+39,8\pm4,1	0,01

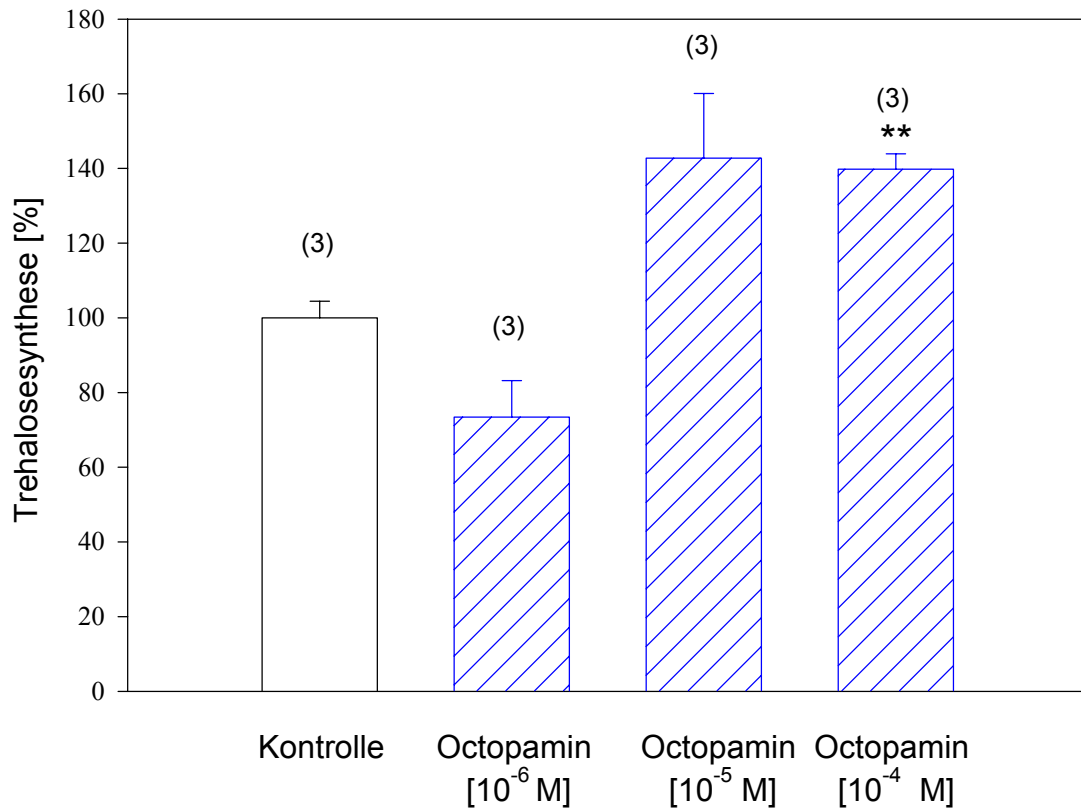


Abbildung 46: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Octopamin. Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): **:p<0,01. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt der isolierten Trophocyten wurde durch Octopamin leicht abgesenkt, maximal um -15,9 % (bei 10⁻⁵ M) und ist damit fast identisch mit dem Wert, der bei Inkubation von isoliertem Fettkörpergewebe zu verzeichnen gewesen war (-14,4 % bei 10⁻⁴ M). Damit ist die Absenkung nur etwa halb so groß wie durch Bld HrTH (-29,4 %). Die Effekte waren allerdings sämtlich nicht signifikant.

Tabelle 20: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Octopamin. Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M.

Die Inkubation erfolgte jeweils in 1,6 ml Insekten-Ringerlösung (Kontrolle) bzw. Insekten-Ringerlösung mit der jeweiligen Testsubstanz in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C über 30 Minuten. Danach wurden die Trophocyten bis zur basischen Aufarbeitung und der Bestimmung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes in flüssigem N₂ aufbewahrt.

Octopamin	n	Fructose-2,6-bisphosphat [pmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	1,91±0,30		
[10 ⁻⁶ M]	3	1,86±0,02	-2,6±1,1	n.s.
[10 ⁻⁵ M]	3	1,61±0,22	-15,9±11,7	n.s.
[10 ⁻⁴ M]	3	1,65±0,06	-13,6±2,9	n.s.

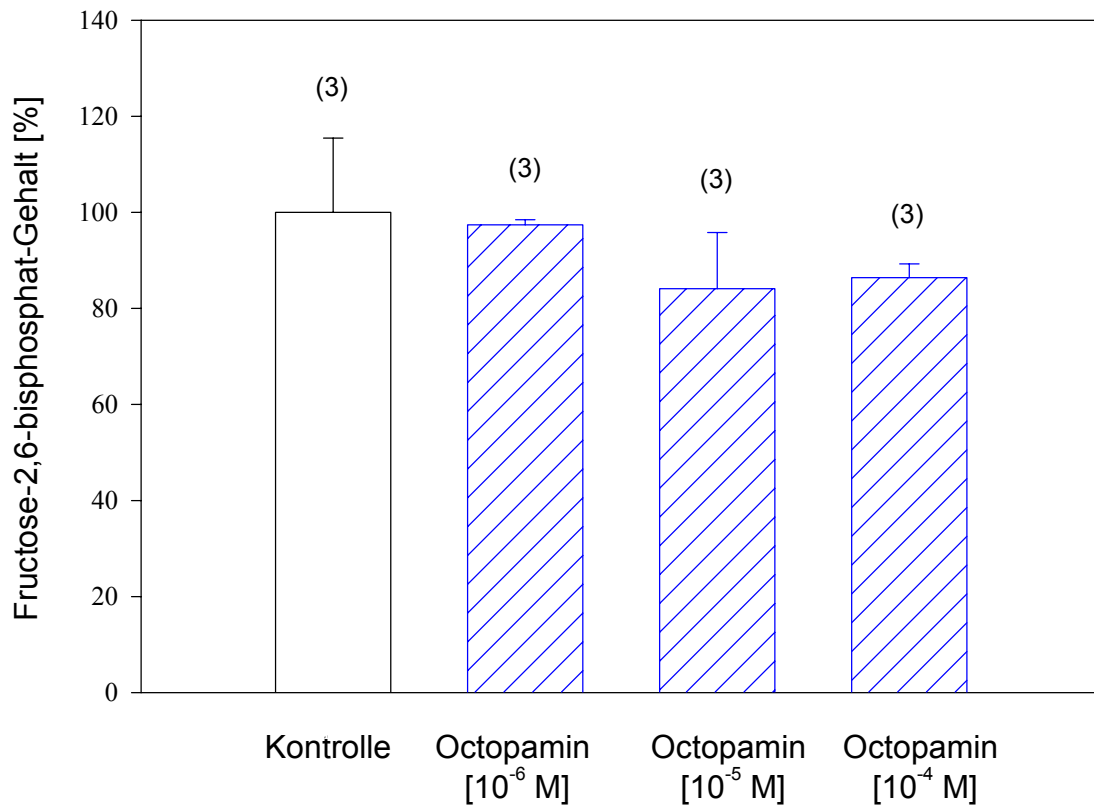


Abbildung 47: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Octopamin. Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

Der physiologische Gehalt an Octopamin in der Hämolymphe von Schaben beträgt bis zu 10^{-7} M (DAVENPORT & EVANS 1984, bestimmt für *Periplaneta americana*). Effekte auf Trehalosesynthese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt waren daher in meinen Versuchen nur bei unphysiologisch hohen Konzentrationen sichtbar. Allerdings muß berücksichtigt werden, dass die Inkubation der Trophocyten mit dem Racemat (D,L-Octopamin) erfolgte, während nur das D-Octopamin in Insekten vorkommt und physiologische Wirksamkeit aufweist.

3.4.3.3 Bedeutung von Ionen

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, scheinen Ca^{2+} -Ionen bei der Signaltransduktion hypertrehalosämischer Hormone eine bedeutende Rolle zu spielen (ORR *et al.* 1985, MCCLURE & STEELE 1981, STEELE & PAUL 1985, BECKER *et al.* 1998), und eine maximale Steigerung der Trehalogenese des Fettkörpers ist nur in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} möglich. Um die Bedeutung von Ionen für die Hormonwirkung zu untersuchen, wurden Trophocyten mit Bld HrTH (100 nM) in Insekten-Ringerlösungen mit unterschiedlicher Ionenzusammensetzung inkubiert. Es wurden insbesondere die Effekte von Ca^{2+} -, La^{3+} -, Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen untersucht.

Es bestätigte sich auch für isolierte Trophocyten, dass Ca^{2+} -Ionen für eine vollständige Hormonwirkung unabdingbar sind (s. Tab. 21 und Abb. 48). In Ca^{2+} -freiem Medium (mit EGTA) wurde die Trehalosesynthese nur um +85,2 % gesteigert, während die Steigerung bei Zugabe von Ca^{2+} durchschnittlich +133,7 betrug (s. 3.4.3.1).

In Mg^{2+} -haltiger Insekten-Ringerlösung (ohne Ca^{2+}) war eine Steigerung um +100% zu verzeichnen. Dementsprechend scheint Mg^{2+} die Ca^{2+} -Ionen nicht vollständig ersetzen zu können. Zudem könnte die verzeichnete Steigerung möglicherweise auf in den Lösungen enthaltene Ca^{2+} -Verunreinigungen zurückzuführen sein, da diese Insekten-Ringerlösung nicht mit dem Ca^{2+} -Chelator EGTA versetzt war. Bei Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen im Inkubationsmedium (ohne Ca^{2+}) war eine Steigerung um +114,8 % zu verzeichnen. Möglicherweise hängt dies mit den Ionenradien zusammen, die bei Ca^{2+} und Mn^{2+} ähnlicher als bei Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen sind.

Bemerkenswert ist die sehr deutliche hormoninduzierte Steigerung der Trehalosesynthese bei Anwesenheit von Ca^{2+} - und La^{3+} -Ionen. Sie übertraf mit +292,3 % die Werte in Anwesenheit von Ca^{2+} allein um mehr als das Doppelte.

Tabelle 21: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Bld HrTH (100 nM) in Ringerlösungen verschiedener Ionenzusammensetzungen. Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M.

Die Inkubation erfolgte in 1,6 ml der jeweiligen Insekten-Ringerlösung ohne (Kontrolle) bzw. mit Hormon in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C über 30 Minuten. Danach wurden 200 µl des Inkubationsmediums entnommen und die Trehalosekonzentration über den Trehalase-Test bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus 2 separaten Experimenten mit identischen Versuchsbedingungen (EGTA, Mn²⁺ (I) bzw. Mg²⁺, Ca²⁺+La³⁺ (II)).

Ringerlösung mit...	n	Trehalosesynthese [nmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle I (ohne Hormon)	3	7,52±0,61		
Bld HrTH, EGTA [2 mM] (Ca ²⁺ -frei)	3	13,93±2,95	+85,2±39,2	n.s.
Bld HrTH, Mn ²⁺ [2 mM]	3	16,16±0,48	+114,8±6,4	0,001
Kontrolle II (ohne Hormon)	3	7,79±1,96		
Bld HrTH, Mg ²⁺ [2 mM]	3	15,58±0,62	+100,0±8,0	0,05
Bld HrTH, Ca ²⁺ + La ³⁺ [2 mM]	3	30,56±3,25	+292,3±41,7	0,01

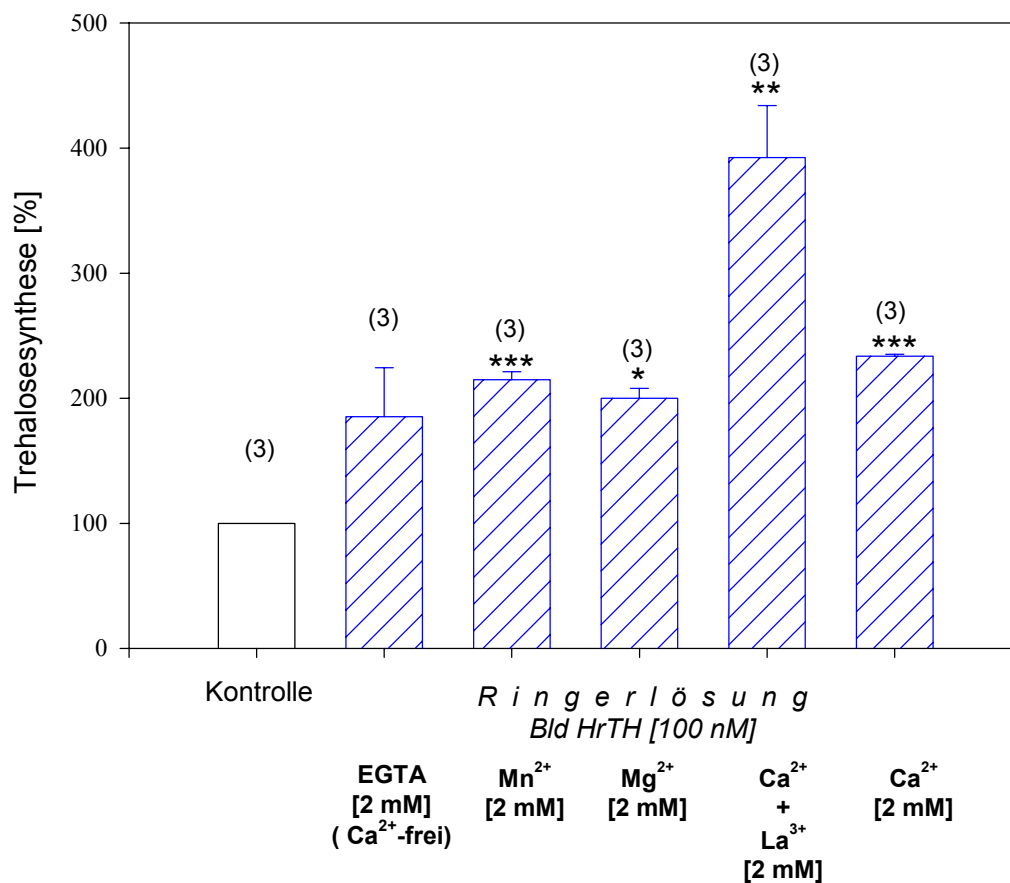


Abbildung 48: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Bld HrTH (100 nM) in Ringerlösungen mit verschiedenen Ionen. Der Wert für Ca²⁺ [2 mM] entstammt Versuch 3.4.3.1. Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveaus (bezogen auf den Kontrollwert): *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 21 zu entnehmen.

Der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten wurde bei Inkubation in Ca²⁺-freier Insekten-Ringerlösung durch das hypertrehalösämische Hormon nur um 11,5 % herabgesetzt, im Gegensatz zu -29,4 % in Ca²⁺-haltiger Insekten-Ringerlösung (s. 3.4.3.1). Extrazelluläre Ca²⁺-Ionen sind nach unseren bisherigen Studien insbesondere für die Effekte des Hormons auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt von Bedeutung. Dass überhaupt ein Effekt in Ca²⁺-freiem Medium zu verzeichnen ist, kann man wohl darauf zurückführen, dass neben extrazellulären Ca²⁺-Ionen noch andere Faktoren (z.B. Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern) eine Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes herbeiführen können.

Weder Mg²⁺- noch Mn²⁺-Ionen konnten Ca²⁺ ersetzen. Die Absenkungen erreichten Maximalwerte (-8,7 %), wie sie auch in Ca²⁺-freiem Medium erzielt wurden (-11,5 %). Dies

weist auf spezifische Ca^{2+} -Effekte hin, was wiederum für die Beteiligung Calcium-spezifischer Rezeptoren spricht. In Anwesenheit von Hormon plus Lanthan-Ionen kam es zu einer leichten Erhöhung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes um +10,3 %. Allerdings war diese Erhöhung nicht signifikant.

Tabelle 22: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH (100 nM) in Ringerlösungen verschiedener Ionenzusammensetzungen. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M.

Die Inkubation erfolgte in 1,6 ml der jeweiligen Insekten-Ringerlösung ohne (Kontrolle) bzw. mit Hormon in einem Schüttel-Wasserbad bei +30°C über 30 Minuten. Danach wurden die Trophocyten bis zur basischen Aufarbeitung und Bestimmung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes in flüssigem N_2 aufbewahrt (EGTA, Mn^{2+} (I) bzw. Mg^{2+} , Ca^{2+} + La^{3+} (II)).

Ringerlösung mit...	n	Fructose-2,6-bisphosphat [pmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle I (ohne Hormon)	3	8,3 \pm 1,27		
Bld HrTH, EGTA [2 mM] (Ca^{2+} -frei)	3	7,34 \pm 0,17	-11,5\pm2,1	n.s
Bld HrTH, Mn^{2+} [2 mM]	3	7,62 \pm 0,19	-8,7\pm2,3	n.s.
Kontrolle II (ohne Hormon)	3	8,35 \pm 0,44		
Bld HrTH, Mg^{2+} [2 mM]	3	8,64 \pm 0,19	+3,5\pm2,3	n.s.
Bld HrTH, Ca^{2+} und La^{3+} [2 mM]	3	9,21 \pm 0,85	+10,3\pm10,1	n.s.

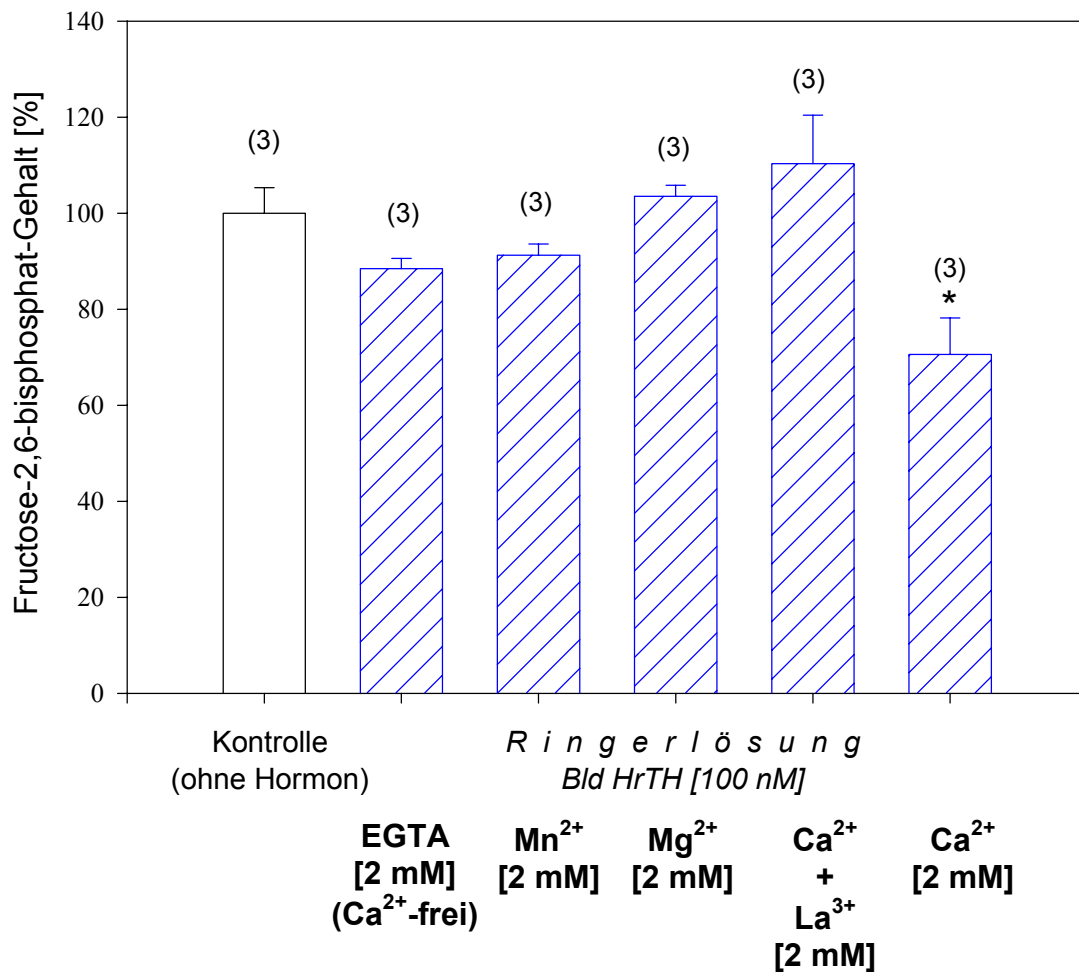


Abbildung 49: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH (100 nM) in Anwesenheit von Ringerlösungen verschiedener Ionenzusammensetzungen. Der Wert für Ca²⁺ [2 mM] entstammt Versuch 3.4.3.1. Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 22 zu entnehmen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass auch die Versuche an isolierten Trophocyten die Bedeutung des Ca²⁺ für die Signaltransduktion hypertrehalosämischer Hormone zeigen. Ca²⁺ konnte bei der Wirkung des Neuropeptids auf Trehalogenese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt durch keines der getesteten Ionen ersetzt werden.

3.4.3.4 Bedeutung von extrazellulärem Ca²⁺: Calcium-Ionophor A23187

Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Neuropeptid sowohl die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern als auch den Einstrom von extrazellulärem

Ca^{2+} hervorruft und dass Ca^{2+} aus diesen Quellen jeweils verschiedene Stoffwechselwege unterschiedlich beeinflusst (LIEWALD 1997, BECKER *et al.* 1998). Während Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} vorrangig zur Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes führt, scheint die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bevorzugt die Trehalogenese zu stimulieren.

Um die Bedeutung des Einstroms von extrazellulärem Ca^{2+} in die Trophocyte näher zu untersuchen, wurde A23187 (Calcimycin) eingesetzt, ein Ionophor für divalente Kationen, welches selektiv für Ca^{2+} -Ionen ist (Spezifität: $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$). A23187 wird häufig eingesetzt, da es recht stabile Komplexe mit divalenten Kationen bilden kann. Es ermöglicht die Translokation von extrazellulären, divalenten Ionen über die Plasmamembran (REED & LARDY 1972) und erhöht damit deren intrazelluläre Konzentration. Es sollte überprüft werden kann, ob der Ca^{2+} -Ionophor Neuropeptideffekte hervorrufen kann. Um mögliche synergistische Effekte zu überprüfen, erfolgte die Inkubation sowohl mit Calcimycin allein, als auch in Kombination mit Bld HrTH und Octopamin.

Die Versuche zeigten, dass A23187 in einer Konzentration von 9,5 μM nur einen geringen Effekt auf die Trehalosesynthese hatte (s. Tab. 23 und Abb. 50). Bei gemeinsamer Inkubation mit Bld HrTH (100 nM) wurde die Trehalosesynthese um +71,0 % erhöht. Dies liegt deutlich unter den bei alleiniger Inkubation mit dem Hormon erzielten Durchschnittswert von +133,7 % (siehe 3.4.3.1). Demnach scheint A23187 die Hormonwirkung eher zu schwächen als zu fördern, so dass synergistische Effekte auszuschließen sind. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits mit isolierten Fettkörpern erzielt (LIEWALD 1997). Gemeinsame Inkubation der Trophocyten mit A23187 und Octopamin (10^{-4} M) erhöhte die Trehalosesynthese um +41,7 % im Vergleich zur Kontrolle. Dies entspricht Werten von +39,8 %, die bei alleiniger Inkubation von Trophocyten mit Octopamin erreicht wurden (s. 3.4.3.2). Demnach schwächt der Ca^{2+} -Ionophor nicht den Effekt des Octopamins auf die Trehalosesynthese.

Tabelle 23: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Calcimycin (A23187), Octopamin und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Trehalosesynthese [nmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	74,05±15,13		
A23187 [9,5 µM]	3	79,09±2,32	+6,8±3,1	n.s.
A23187 [9,5 µM] + Bld HrTH [100 nM]	3	126,62±2,84	+71,0±3,8	0,05
A23187 [9,5 µM] + Octopamin [10 ⁻⁴ M]	3	104,90±2,05	+41,7±2,8	n.s.

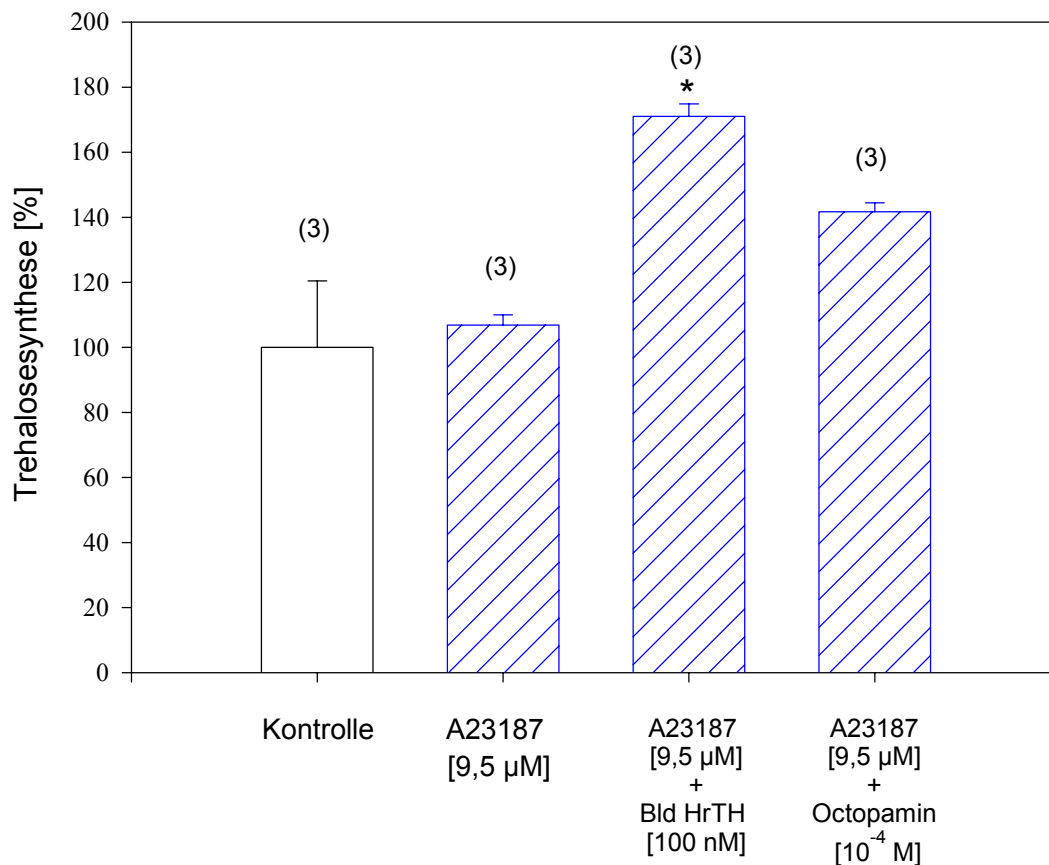


Abbildung 50: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit A23187, Octopamin und Bld HrTH. Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt in Trophocyten wurde durch Calcimycin abgesenkt (-18,3 %; s. Tab. 24 und Abb. 51). Eine vergleichbare Absenkung (-23,6 %) wurde bei gemeinsamer Inkubation der Trophocyten mit Calcimycin und Octopamin (10^{-4} M) erzielt. Da Octopamin in dieser Konzentration bei vorangegangenen Versuchen keine Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes hervorrief (s. 3.4.3.2), kann man davon ausgehen, dass der Effekt vor allem auf den Ca^{2+} -Ionophor zurückzuführen ist, nicht auf Octopamin. Ein synergistischer Effekt der beiden Testsubstanzen war nicht zu erkennen. Bei gemeinsamer Inkubation von Trophocyten mit Bld HrTH (100 nM) und Calcimycin wurde eine Absenkung des Fructose-2,6-bisphosphats erreicht, die mit -44,9 % etwas über dem Bereich lag, der durch Bld HrTH allein erzielt wurde (-29,4 %, s. 3.4.3.1).

Tabelle 24: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Calcimycin (A23187), Octopamin und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Fructose-2,6-bisphosphat [pmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	5,53 \pm 0,54		
A23187 [9,5 μ M]	3	4,52 \pm 0,25	-18,3\pm4,5	n.s.
A23187 [9,5 μ M] + Bld HrTH [100 nM]	3	3,04 \pm 0,44	-44,9\pm7,9	0,05
A23187 [9,5 μ M] + Octopamin [10^{-4} M]	3	4,23 \pm 0,36	-23,6\pm6,5	n.s.

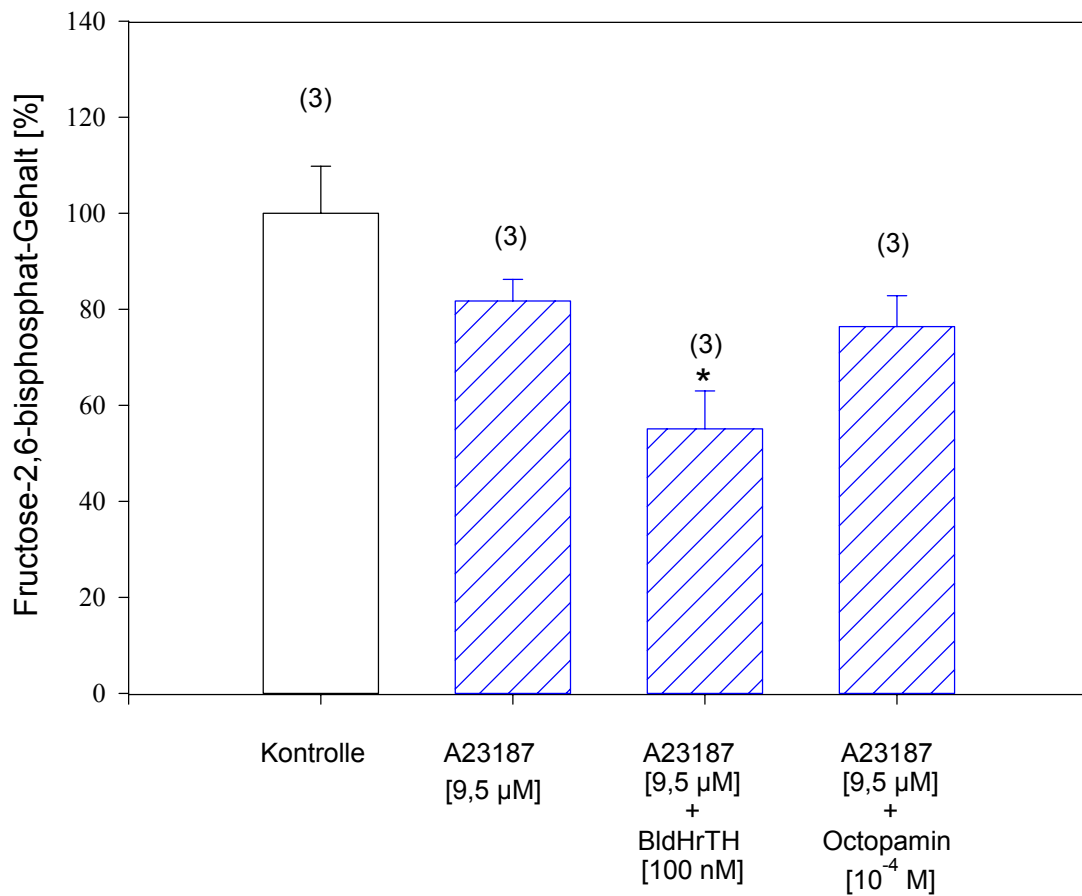


Abbildung 51: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit A23187, Octopamin und Bld HrTH. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Ca^{2+} -Ionophor ähnlich dem Hormon zu einer Absenkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes führte. Beide Substanzen wirken jedoch nicht synergistisch, was ein Hinweis ist, dass dieselben Mechanismen genutzt werden. Auf die Trehalosesynthese hatte Calcimycin hingegen kaum Einfluß. Dies würde bedeuten, dass extrazelluläres Ca^{2+} bei der Signaltransduktion des Bld HrTH, die zur Absenkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes führt, eine Rolle spielt, auf die Trehalosesynthese jedoch kaum. Die Versuchsergebnisse entsprechen denen, die bei Versuchen mit isolierten Fettkörpern erzielt wurden (BECKER *et al.* 1998).

3.4.3.5 Bedeutung von intrazellulärem Ca^{2+}

3.4.3.5.1 *Thimerosal*

Thimerosal ruft durch Aktivierung des Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors des endoplasmatischen Retikulums einen Ca^{2+} -Efflux aus intrazellulären Speichern hervor (BOOTMAN *et al.* 1982). Die Inkubation isolierter Trophocyten mit Thimerosal (50 μM) führte zu einer Steigerung der Trehalosesynthese um +119,7 % in Ca^{2+} -haltiger Insekten-Ringerlösung und um +109,2 % in Ca^{2+} -freier Ringerlösung. Beim selben Versuch mit isolierten Fettkörpern war die Steigerung der Trehalosesynthese nur durchschnittlich +48,6% (LIEWALD 1997). Die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen im Inkubationsmedium hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Stimulation der Trehalogenese durch Thimerosal.

Tabelle 25: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Thimerosal und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab.19 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Trehalosesynthese [nmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	18,89 \pm 4,98		
Bld HrTH [100 nM]	3	47,12 \pm 0,36	+149,4\pm1,9	0,01
Thimerosal [50 μM] <i>Ca²⁺-haltige Ringerlösung</i>	3	41,50 \pm 0,34	+119,7\pm1,8	0,05
Thimerosal [50 μM] <i>Ca²⁺-freie Ringerlösung</i> (EGTA 2 mM)	3	39,53 \pm 0,36	+109,2\pm1,9	0,05

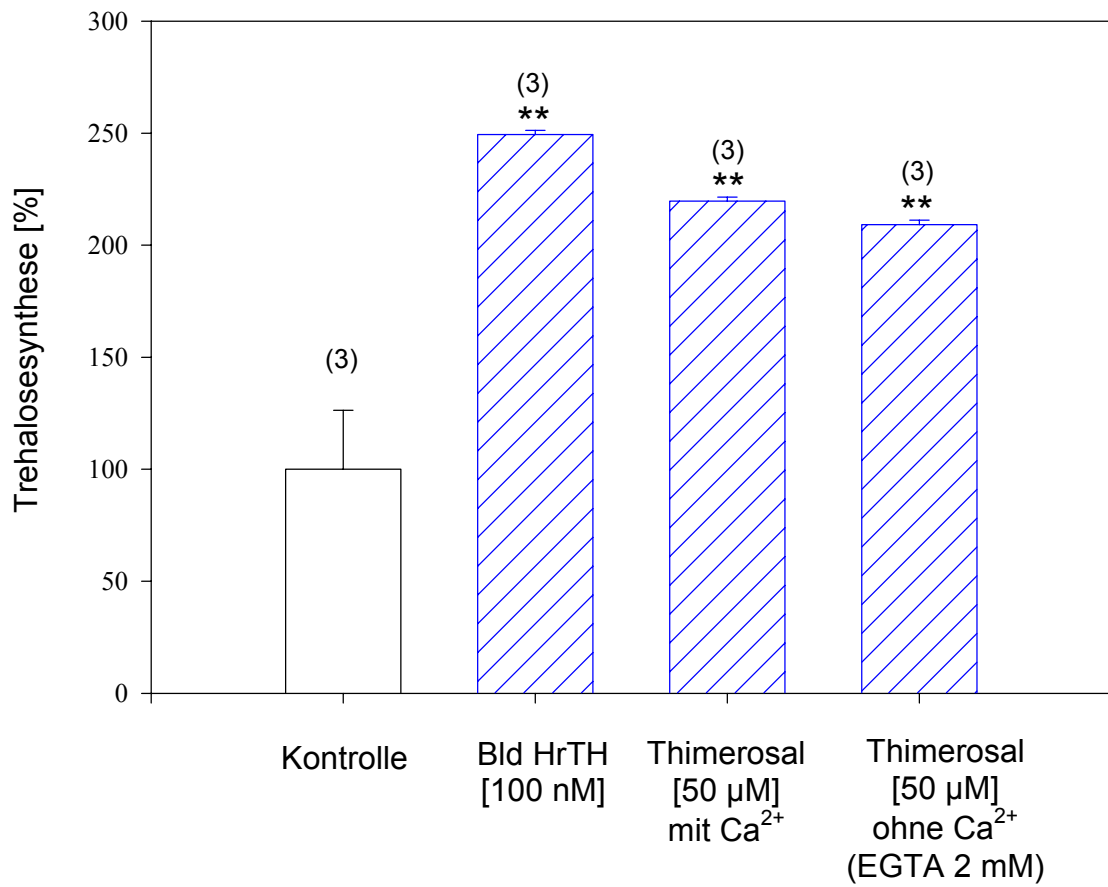


Abbildung 52: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Bld HrTH oder Thimerosal. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): **:p<0,01. Die Versuchsbedingungen sind Tab.19 und 25 zu entnehmen.

Der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt inkubierter Trophocyten wurde durch Thimerosal gesteigert (+136,9 %), wobei erneut keine deutliche Abhängigkeit des Effektes von Ca^{2+} im Medium zu verzeichnen war (+122,9 % in Ca^{2+} -freiem Medium). Auch bei entsprechenden Versuchen mit isolierten Fettkörpern war es zu einem Anstieg von Fructose-2,6-bisphosphat gekommen, der allerdings mit +31,4 % deutlich geringer ausfiel.

Tabelle 26: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Thimerosal und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Fructose-2,6-bisphosphat [pmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	3,70 \pm 1,07		
Bld HrTH [100 nM]	3	2,62 \pm 0,43	-29,2\pm11,6	n.s.
Thimerosal [50 μM] <i>Ca²⁺-haltige Ringerlösung</i>	3	8,77 \pm 0,38	+136,9\pm10,3	0,05
Thimerosal [50 μM] <i>Ca²⁺-freie Ringerlösung</i> (EGTA 2 mM)	3	8,25 \pm 0,17	+122,9\pm4,6	0,05

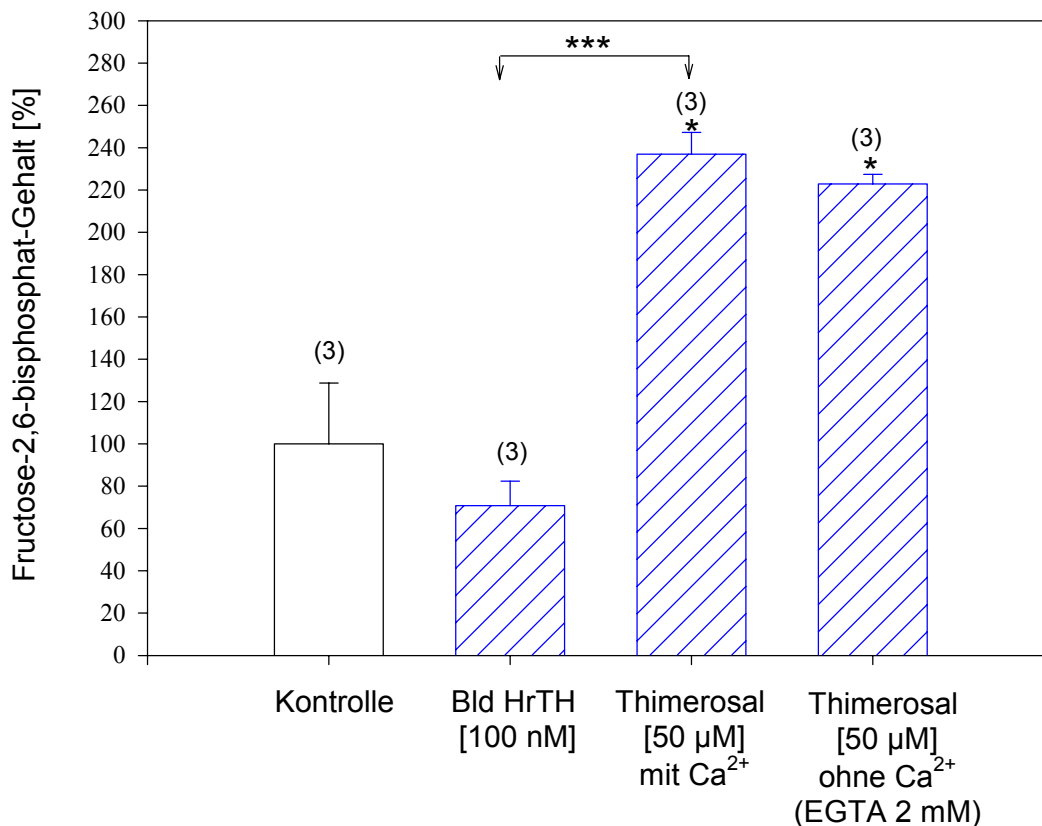


Abbildung 53: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Bld HrTH oder Thimerosal. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 und 26 zu entnehmen.

3.4.3.5.2 Dantrolen

Dantrolen hemmt den Ca²⁺-Efflux aus intrazellulären Speichern wie dem sarkoplasmatischen Retikulum von Muskelzellen (OHTA *et al.* 1990). Während Inkubation der Trophocyten mit Dantrolen (100 µM) allein keinen signifikanten Effekt auf die Trehalogenese hatte, wurde die von Bld HrTH (100 nM) stimulierte Synthese deutlich herabgesetzt, nämlich auf +72,4 %, verglichen mit +133,7 %, wenn Bld HrTH, nicht aber Dantrolen vorhanden war (s. 3.4.3.1). Die Wirkung des Hormons wurde durch Dantrolen also deutlich reduziert. Als zusätzliche Kontrolle wurden Trophocyten mit Bld HrTH plus DMSO, dem Lösungsmittel des Dantrolens, inkubiert. DMSO zeigte keine Wirkung auf den Effekt des hypertrehalosämischen Hormons (Steigerung der Trehalosesynthese um +126,7 %).

Tabelle 27: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Dantrolen (gelöst in DMSO), DMSO und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Trehalosesynthese [nmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	65,45 \pm 1,69		
Dantrolen [100 μ M] <i>in DMSO</i> [36 mM]	3	61,74 \pm 0,90	-5,7\pm1,4	n.s.
Bld HrTH [100 nM] + Dantrolen [100 μ M]	3	112,83 \pm 1,42	+72,4\pm2,2	0,001
Bld HrTH [100 nM] + DMSO [36 mM]	3	148,41 \pm 1,93	+126,7\pm2,9	0,01

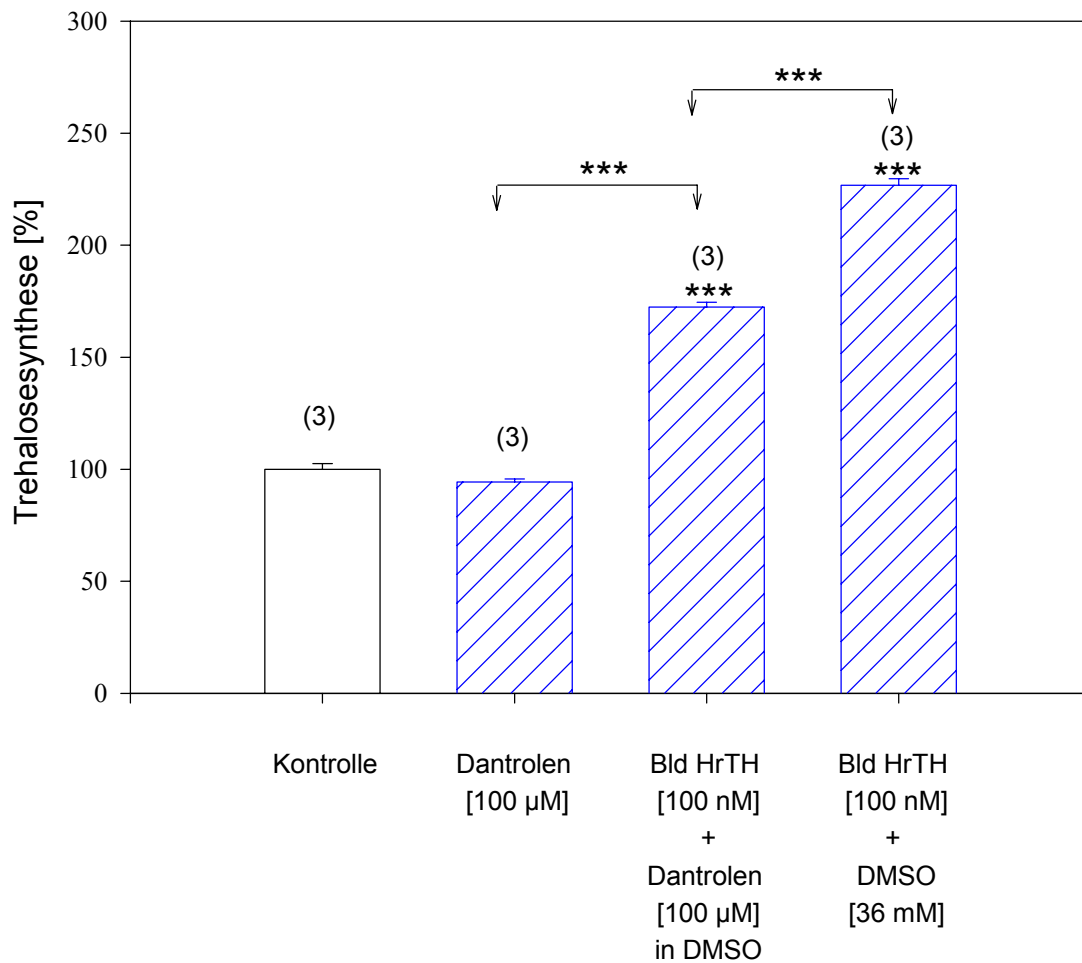


Abbildung 54: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Dantrolen, DMSO und Bld HrTH. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): ***: $p < 0,001$. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Auf die Wirkung des Bld HrTHs (100 nM) auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt hatten weder Dantrolen noch das Lösungsmittel DMSO einen signifikanten Effekt. Bei Anwesenheit von Dantrolen (100 µM) wurde der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt durch das Neuropeptid um 23,1 % verringert. Durch Dantrolen allein wurde die Fructose-2,6-bisphosphat-Konzentration nicht beeinflusst (-2,0 %). Die Effekte des Dantrolens auf isolierte Trophocyten entsprechen den Ergebnissen mit isolierten Fettkörpern (LIEWALD 1997).

Tabelle 28: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Dantrolen (gelöst in DMSO), DMSO und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Fructose-2,6-bisphosphat [pmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	3,40±0,14		
Dantrolen [100 µM] in DMSO [36 mM]	3	3,33±0,11	-2,0±3,2	n.s.
Bld HrTH [100 nM] + Dantrolen [100 µM]	3	2,61±0,20	-23,1±5,9	0,05
Bld HrTH [100 nM] + DMSO [36 mM]	3	2,56±0,23	-24,8±6,9	0,05

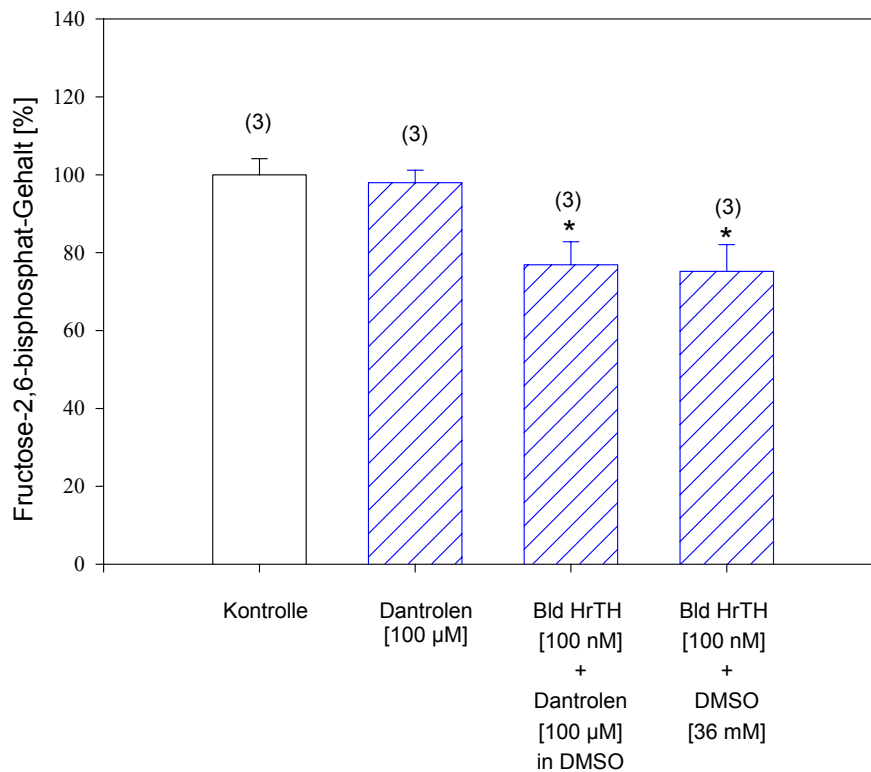


Abbildung 55: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Dantrolen, DMSO und Bld HrTH. Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

3.4.3.6 Bedeutung von Diacylglycerin: Phorbol-12,13-dibutytrat

Phorbolester wie 4 β -Phorbol-12 β ,13 α -Dibutyrat (PDB) sind als Tumorpromotoren bekannt. Sie ähneln dem Signalmolekül Diacylglycerin und aktivieren wie dieses die Proteinkinase C, so dass man mit Hilfe von Phorbolestern die Beteiligung von Diacylglycerin an der Signaltransduktion untersuchen kann. PDB zeigte nur einen minimalen Effekt auf die Trehalosesynthese isolierter Trophocyten (-3,5%). Als zusätzliche Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO getestet. Auch damit waren keine signifikanten Effekte zu verzeichnen.

Tabelle 29: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Phorbol-12,13-Dibutyrat (gelöst in DMSO), DMSO und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Trehalosesynthese [nmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	6	21,69 \pm 1,88		
Bld HrTH [100 nM]	6	47,92 \pm 3,74	+121,1\pm1,9	0,001
Phorbol-12,13-Dibutyrat [10 μM]	6	20,37 \pm 1,48	-3,5\pm8,7	n.s.
DMSO	6	24,46 \pm 3,16	+10,8\pm6,6	n.s.

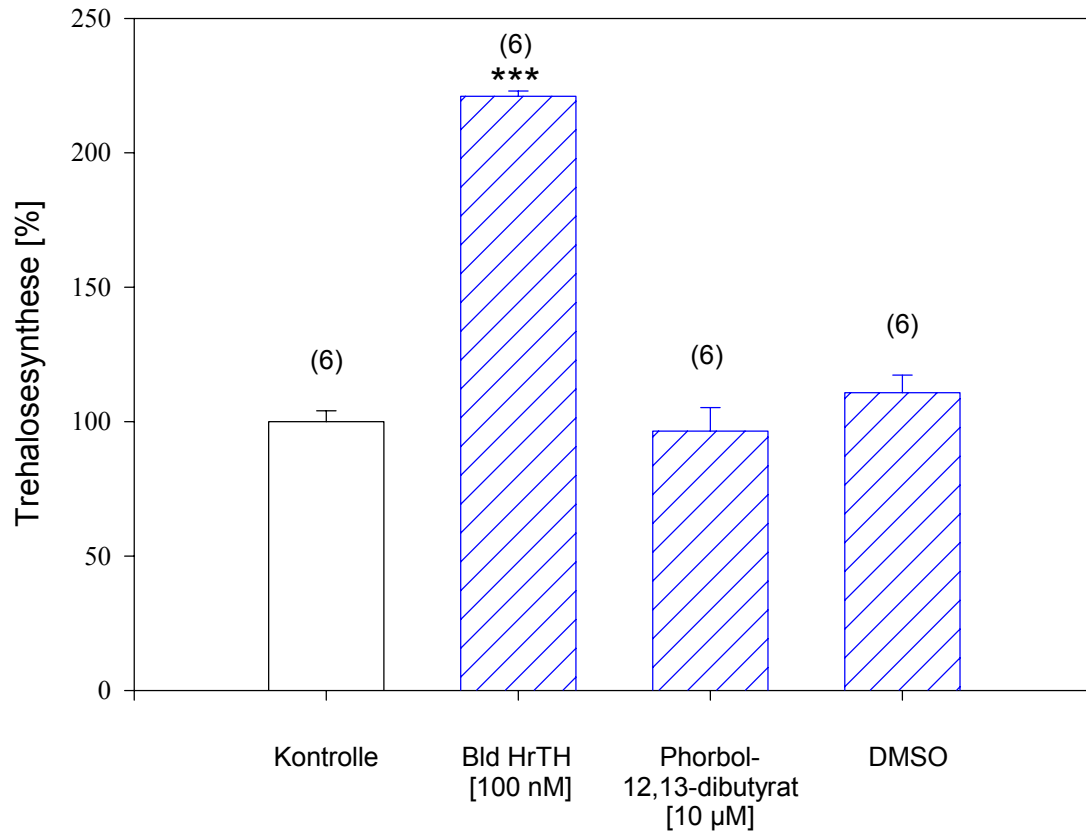


Abbildung 56: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit Phorbol-12,13-Dibutyrat, DMSO und Bld HrTH. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): ***: $p < 0,001$. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt wurde durch Phorbol-12,13-Dibutyrat um -24,3 % erniedrigt. Dies entspricht prozentual der Konzentrationsänderung, die mit dem Hormon erreicht wird. Da das Lösungsmittel DMSO selbst keinen Effekt auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt ausübte, muß die Senkung als ein Effekt des Phorbolesters angesehen werden.

Tabelle 30: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Phorbol-12,13-Dibutyrat, DMSO und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Fructose-2,6-bisphosphat [pmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	6,82 \pm 0,26		
Bld HrTH [100 nM]	3	5,18 \pm 0,11	-24,0 \pm 1,6	0,05
Phorbol-12,13-Dibutyrat [10 μ M]	3	5,17 \pm 0,46	-24,3 \pm 6,7	0,05
DMSO	3	6,57 \pm 0,36	-3,8 \pm 5,3	n.s.

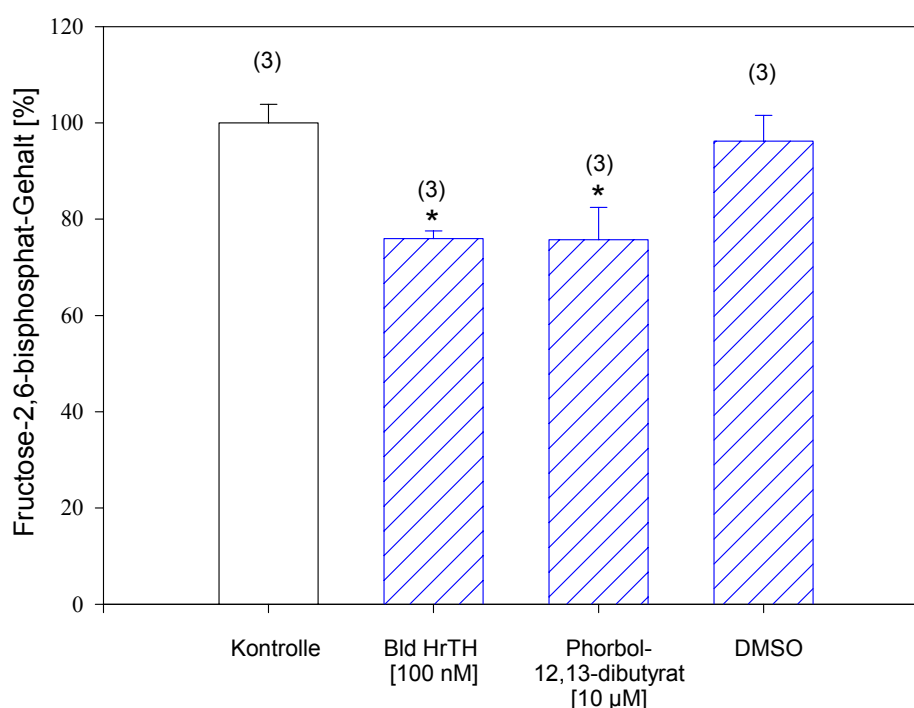


Abbildung 57: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit Phorbol-12,13-Dibutyrat, DMSO und Bld HrTH. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

3.4.3.7 Bedeutung von Inositol-1,4,5-trisphosphat

Eine Beteiligung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) an der Signaltransduktion von Bld HrTH scheint wahrscheinlich. Daher wollte ich den Einfluß dieses Signalmoleküls auf

Trehalosesynthese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten direkt untersuchen.

Versuche mit IP_3 sind schwierig, da IP_3 nicht membrangängig ist. 98 % der Trophocyten waren impermeabel für den Farbstoff Trypanblau und damit vermutlich auch für IP_3 . Dem entspricht, dass die Inkubation nicht-permeabilisierter Trophocyten mit 10 μM IP_3 keine Wirkung auf Trehalosesynthese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt zeigte (Werte nicht dargestellt).

Daher wurde versucht, die Zellen mit Hilfe von Saponin so zu permeabilisieren, dass sie vital blieben. In separaten Ansätzen wurden jeweils 4 ml einer Trophocyten-Suspension in Insekten-Ringerlösung mit zwei verschiedenen Saponinkonzentrationen (75 bzw. 150 $\mu g/ml$) inkubiert. Zusätzlich wurden bei beiden Saponinkonzentrationen die Inkubationszeiten variiert (5, 10, 15, 20 min). Die Permeabilisierung der Zellen wurde anschließend mit Trypanblaulösung überprüft. Saponin erwies sich jedoch als recht aggressiv. Die Zellausbeute war deutlich herabgesetzt und die Zellsuspension wies vergleichsweise viele Zelltrümmer und Fetttropfen auf. Bei Verwendung der niedrigen Saponinkonzentration (75 $\mu g/ml$) und 5-, 10- bzw. 20-minütiger Inkubation zeigten 32, 83 bzw. 98 % der Trophocyten Blaufärbung, bei der hohen Saponinkonzentration (150 $\mu g/ml$) und 15-minütiger Inkubation waren es 75 %.

Nach Inkubation Saponin-behandelter (75 $\mu g/ml$, 10 min) Trophocyten mit IP_3 (10 μM) war weder Fructose-2,6-bisphosphat noch Trehalose nachweisbar. Die Permeabilisierung scheint die Zellmembranen so stark zu schädigen, dass die Zellen nicht mehr vital sind.

IP_3 entsteht durch die Aktivität der Phospholipase C. Es wurden daher die Trophocyten mit dem Phospholipase C-Inhibitor ET-18-OCH₃ inkubiert. Tatsächlich zeigte ET-18-OCH₃ einen deutlich inhibitorischen Einfluß auf die durch Bld HrTH hervorgerufene zusätzliche Trehalosesynthese. Deren Wert sank von +130 % auf +29,6 %. Auf den basalen Trehaloseefflux hatte die Testsubstanz hingegen keinen signifikanten Effekt. Da ET-18-OCH₃ in Ethanol gelöst vorlag, wurde noch eine weitere Kontrolle durchgeführt, bei der Trophocyten mit Bld HrTH und der entsprechenden Menge Ethanol (10 μl) inkubiert wurden. Ethanol zeigte keinen Effekt auf die Neuropeptidwirkung.

Tabelle 31: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit ET-18-OCH₃ (gelöst in Ethanol), Ethanol und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Trehalosesynthese [nmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	28,33±3,26		
ET-18-OCH₃ [20 µM] in Ethanol [0,6 %]	3	26,56±1,92	-6,2±6,8	n.s.
ET-18-OCH₃ [20 µM] + Bld HrTH [100 nM]	3	36,7±1,73	+29,6±6,1	n.s.
Bld HrTH [100 nM] + Ethanol [0,6 %]	3	65,14±3,72	+130,0±13,1	0,05

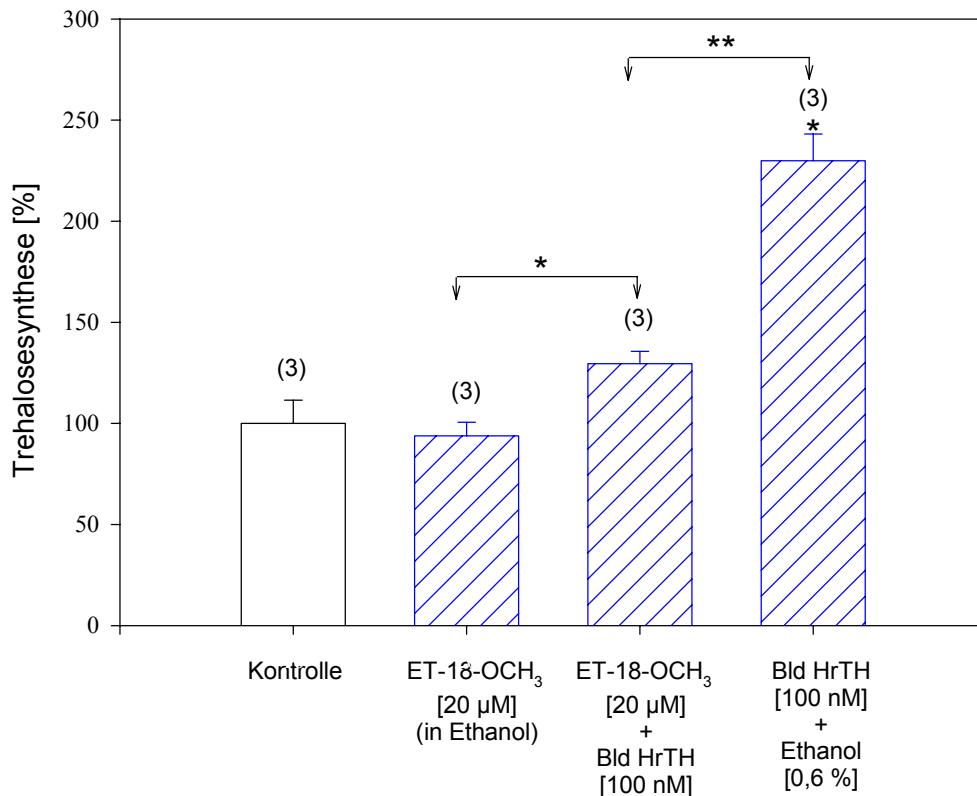


Abbildung 58: Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* bei Inkubation mit ET-18-OCH₃ (gelöst in Ethanol), Ethanol und Bld HrTH. Dargestellt sind Mittelwerte±S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): *:p<0,05. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 19 zu entnehmen.

Auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt hatte ET-18-OCH₃ allein keinen signifikanten Effekt. Allerdings wurde die durch Bld HrTH hervorgerufene Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes verringert. Die Senkung betrug -14,9 % und war damit nur etwa halb so groß wie bei alleiniger Inkubation mit dem hypertrehalosämischen Hormon (-29,4 %). Das Lösungsmittel Ethanol zeigte keinen Effekt auf die Hormonwirkung.

Tabelle 32: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt isolierter Trophocyten aus dem Fettkörper von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit ET-18-OCH₃ (gelöst in Ethanol), Ethanol und Bld HrTH. Angegeben sind Mittelwerte±S.E.M. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

Testsubstanz	n	Fructose-2,6-bisphosphat [pmol/100 000 Zellen]	Änderung [% der Kontrolle]	p<
Kontrolle	3	2,01±0,12		
ET-18-OCH₃ [20 µM] <i>in Ethanol [0,6 %]</i>	3	1,94±0,01	-3,5±0,6	n.s.
ET-18-OCH₃ [20 µM] + Bld HrTH [100 nM]	3	1,71±0,05	-14,9±2,6	n.s.
Bld HrTH [100 nM] + Ethanol [0,6 %]	3	1,49±0,04	-26,2±2,0	0,05

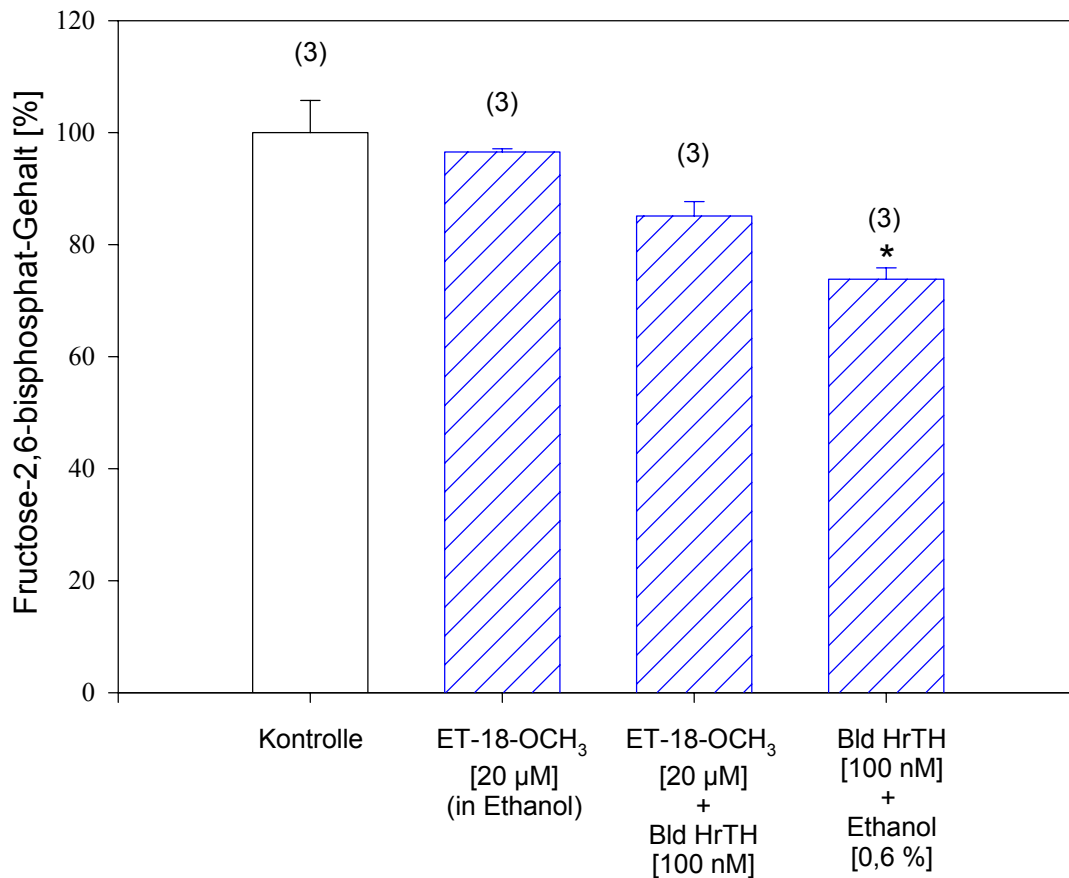


Abbildung 59: Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* nach Inkubation mit ET-18-OCH₃ (gelöst in Ethanol), Ethanol und Bld HrTH. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. und die Probenzahl. Signifikanzniveau (bezogen auf den Kontrollwert): *: $p < 0,05$. Die Versuchsbedingungen sind Tab. 20 zu entnehmen.

3.5 MIKROFLUOROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN VON CA²⁺-STRÖMEN AN ISOLIERTEN TROPHOCYTEN

3.5.1 Methode

Bei ersten mikrofluorometrischen Untersuchungen an isolierten Trophocyten hatte sich gezeigt, dass in Trophocyten, die in Ca²⁺-haltiger Insekten-Ringerlösung isolierte wurden während der Separierung Ca²⁺-Ionen einströmten (BECKER 1996, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Fluoreszenzraten (R = Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm; [340/380]₅₁₀; nähere Informationen sind Kapitel 2.4.12 zu entnehmen) dieser Zellen nach Beladung mit Fura-2 lagen im Bereich von 1.

Nach Optimierung der Zellseparierung (s. 3.4.1), zeigten Fura-2-Untersuchungen, dass die Trophocyten nicht mehr mit Ca^{2+} -Ionen volliefen. Die Fluoreszenzrate lag bei der Mehrzahl der von mir untersuchten Zellen unter 1, durchschnittlich bei 0,65 (0,3-0,8). Dies ist ein Beleg dafür, dass das Separierungsverfahren adäquat ist. Zellen, bei denen die Fluoreszenzrate über 0,8 lag, wurden verworfen.

Ein weiteres Problem war, dass die Trophocyten aufgrund ihrer Fettvakuolen in wässrigen Lösungen oben schwammen. Die Ca^{2+} -Darstellung durch Fura-2 ist jedoch darauf ausgerichtet, dass sich die Zellen am Boden einer Petrischale befinden. Dadurch werden ein optimaler Strahlengang gewährleistet und die Verschiebung der Zellen beim Zupipettieren von Testsubstanzen verhindert. Das Problem konnte mit einem Siebgewebe gelöst werden, dessen Maschenweite mit 30 μm um etwas kleiner war als die durchschnittliche Zellgröße der Trophocyten ($\text{\O} 50 \mu\text{m}$). Mit Hilfe eines Plastikringes, dessen äußerer Durchmesser dem der Petrischale entsprach, konnten die Zellen durch das Siebgewebe am Boden der Petrischale gehalten werden. Für den Strahlengang ergibt sich dabei durch das Siebgewebe kein Problem, da die Zellen von unten beleuchtet werden.

Die isolierten und mit Fura-2 beladenen Zellen hoben sich im Fluoreszenzmikroskop hell gegen den dunklen Hintergrund ab. Die Fluoreszenzintensität der Trophocyten (510 nm; kontrolliert vor der eigentlichen Inkubation) lag bei Einzelzellen bei durchschnittlich 200.000 counts/s (80.000-600.000 counts/s). Allgemein gilt: Je höher die Intensität (Energie), desto stärker ist die jeweilige Zelle mit Fura-2 beladen. Günstig sind Werte >100.000 . Bei Fluoreszenzintensitäten unter 75.000 wurde eine andere Trophocyte für die Messung ausgewählt. Die Fluoreszenzintensität nimmt bei längerer Bestrahlung in Folge von Lichtbleichung ab (Photobleaching: kontinuierliche Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes führt zur Abnahme der Fähigkeit des Farbstoffes zur Absorption von Licht und Emission von Fluoreszenzlicht). Die Dauer der Einzelversuche wurde daher auf 1000 s begrenzt.

Eine Background-Messung (Verschiebung des Meßbereiches auf die Lösung direkt neben der Zelle) diente zu Beginn der Versuche generell als Kontrolle. Ein hoher Background weist auf zu viel Fura-2 im Medium hin. Dies kann auftreten entweder bei nicht ausreichendem Waschen nach der Inkubation mit Fura-2-AM (welches dann nach Austritt von cytosolische Esterasen aus beschädigten Zellen zu Fura-2 hydrolysiert wird) oder vor allem durch beschädigte Zellen mit permeablen Zellmembranen, aus denen Fura-2 austritt. Durch Bestimmung des Hintergrunds (backgrounds) konnte sichergestellt werden, dass extrazellulär kaum freies Fura-2 oder Fura-2- Ca^{2+} -Komplexe vorlagen. Sowohl die Fluoreszenz bei 380 nm als auch die bei 340 nm nahmen bei Verschiebung des Mikroskops auf den Hintergrund normalerweise deutlich ab. Bei

Versuchen, bei denen die Fluoreszenzintensität des Backgrounds erhöht, jedoch noch im Toleranzbereich (<20.000 counts/s) war, wurde über das Computerprogramm (PTI) eine Background-Kompensation durchgeführt.

3.5.2 ÄNDERUNGEN DER FLUORESZENZRATE BEI INKUBATION MIT TESTSUBSTANZEN

Circa 3 min nach Zugabe des Hormons Bld HrTH (100 nM) kam es zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenzrate der untersuchten Zelle (s. Abb. 60), der auf einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration schließen lässt. Der Anstieg war zweiphasig; einer kurzen raschen Konzentrationsänderung folgte eine Phase mit einem langsameren und geringeren Anstieg bis ein Maximum erreicht war.

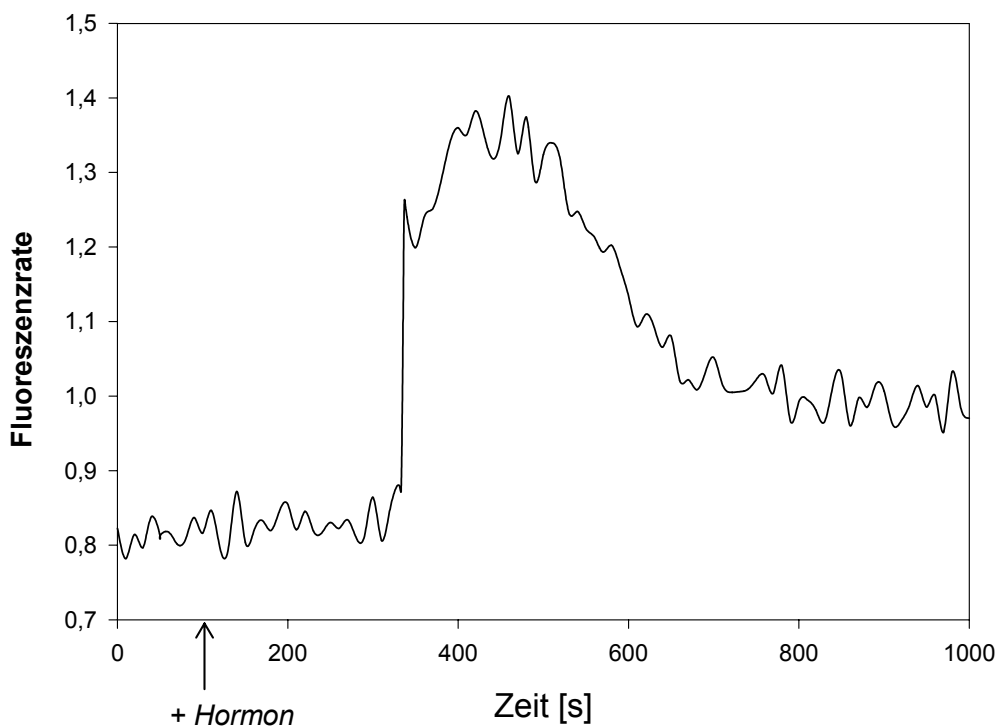


Abbildung 60: Fluoreszenzrate der Anregungswellenlängen 340 und 380 nm einer Trophocyte während Inkubation mit Bld HrTH (100 nM). Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe des Neuropeptids an.

Die anfängliche 3-minütige Latenzphase lässt sich zum Teil auf die vom Hormon zu überwindende Diffusionsstrecke zurückführen. Um eine Verschiebung der Zelle durch beim Zupipettieren der Testsubstanz auftretende Strömungen zu verhindern, wurde das Hormon zum

Rand der Petrischale hin pipettiert (Abstand: circa 2 cm) und nicht direkt auf die Bohrung in der Mitte der Petrischale, wo sich die Trophocyte befand.

Die Zweiphasigkeit könnte auf einen schnellen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} zurückzuführen sein, dem (z.B. nach Erreichen eines Schwellenwertes) eine langsamere Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} folgt oder alternativ auf eine anfängliche Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} , die gefolgt wird vom Einstrom extrazellulären Calciums. Die Fluoreszenzrate fiel ca. 3 min nach Beginn des Anstiegs langsam auf einen Wert, der je nach Zelle mehr oder weniger nahe am Ausgangswert lag („steady state“). In den meisten Fällen wurde im Meßzeitraum kein vollständiger Rückgang zum Ausgangswert erreicht.

Allerdings reagierten circa 30 % der Zellen nicht auf das Hormon mit einem Anstieg. Auch aus diesem Grund war die Messung von Einzelzellen besser zu analysieren, als die gemeinsame Messung mehrerer Zellen. Da bei gleichzeitiger Messung vieler Zellen auch beschädigte und tote mitgemessen werden, lag die Fluoreszenzrate bei derartigen Messungen schon vor Zugabe des Hormons in einigen Fällen nahe 1.

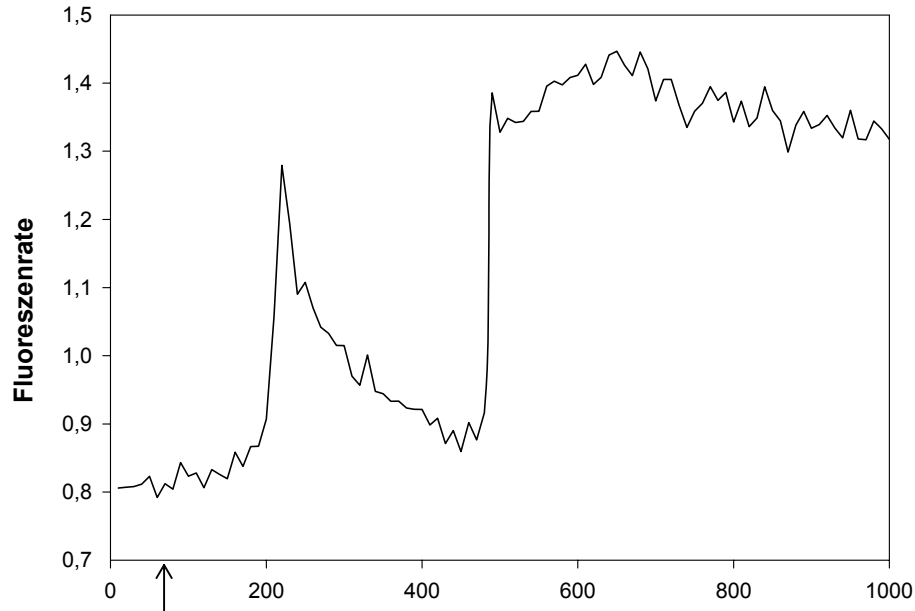


Abbildung 61: Fluoreszenzrate der Anregungswellenlängen 340 und 380 nm einer Trophocyte während Inkubation mit Bld HrTH (100 nm). Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe des Neuropeptids an.

Bei einigen Zellen kam es zu einem transienten, zweigipfligen Signal. Nach einer kurzen Zunahme der Fluoreszenzrate fiel diese wieder bis fast zum Basalwert, dann folgte ein zweiter,

schneller Anstieg des Ca^{2+} -Gehaltes. Diese Zellen kehrten anschließend nicht mehr zum Ausgangswert zurück (s. Abb. 61). Es ist anzunehmen, dass diese Zellen irreversibel geschädigt waren.

Zusätzlich wurden Versuche in Ca^{2+} -freier Insekten-Ringerlösung (2 mM EGTA) durchgeführt, so dass der Einstrom von Calcium ins Cytosol auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern beschränkt war. Zugabe des Neuropeptids Bld HrTH (100 nM) führte bei diesen Trophocyten zu keiner sichtbaren Änderung der Fluoreszenzrate.

Zugabe von KCl (Endkonzentration: 70 mM) zu den Trophocyten führte ebenfalls zu keiner meßbaren Änderung der Fluoreszenzrate. KCl wird in Tests für spannungsabhängige Calcium-Kanäle eingesetzt. Das Ergebnis spricht dafür, dass Fettkörperzellen keine spannungsabhängigen Kanäle besitzen bzw. dass der Hormoneffekt nicht durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Ströme ausgelöst wird.

Inkubation der mit Fura-2 beladenen Zellen mit dem biogenen Amin Octopamin (10^{-4} M, D,L-Octopamin) führten zu keinen erkennbaren Änderungen der Fluoreszenzrate. Demnach ruft Octopamin in Trophocyten keine Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervor. Dies unterstützt unsere Vermutung, dass Octopamin einen Signaltransduktionsweg aufweist, der von dem des Neuropeptids abweicht. Dies würde die äußerst geringen Effekte des Octopamins auf die Trehalosesynthese in isolierten Trophocyten erklären.

3.5.3 Ca^{2+} -IMAGING

Das Ca^{2+} -Imaging ist eine verfeinerte Fura-2-Methode. In regelmäßigen Abständen wurden Bilder einer Trophocyte erstellt, wobei verschiedene Fluoreszenzraten und damit unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen durch unterschiedliche Farben dargestellt werden. Auf diese Weise kann man Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Verteilung räumlich auflösen.

Circa 3 Minuten nach Zugabe des Neuropeptids Bld HrTH (100 nM) kam es zu einer deutlichen Farbänderung (s. Abb. 62 und 63), die zunächst am Rand der Trophocyte zu beobachten war. Innerhalb einiger Sekunden kam es in der gesamten Zelle zu einem Farbwechsel von grün über gelb zu rot. Der Farbwechsel ist auf eine Erhöhung der Fluoreszenzrate bzw. der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zurückzuführen.

Abbildung 62 zeigt 3 repräsentative Einzelbilder der Farbänderungen einer mit dem Neuropeptid Bld HrTH inkubierten Trophocyte: Die Aufnahme des ersten Bildes erfolgte direkt vor Hormonzugabe, Bild 2 zeigt den Start der Zunahme der intrazellulären (=cytosolischen) Ca^{2+} -Konzentration (ca. 3 min nach Hormonzugabe) und Bild 3 das Maximum der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (ca. 5 min nach Hormonzugabe).

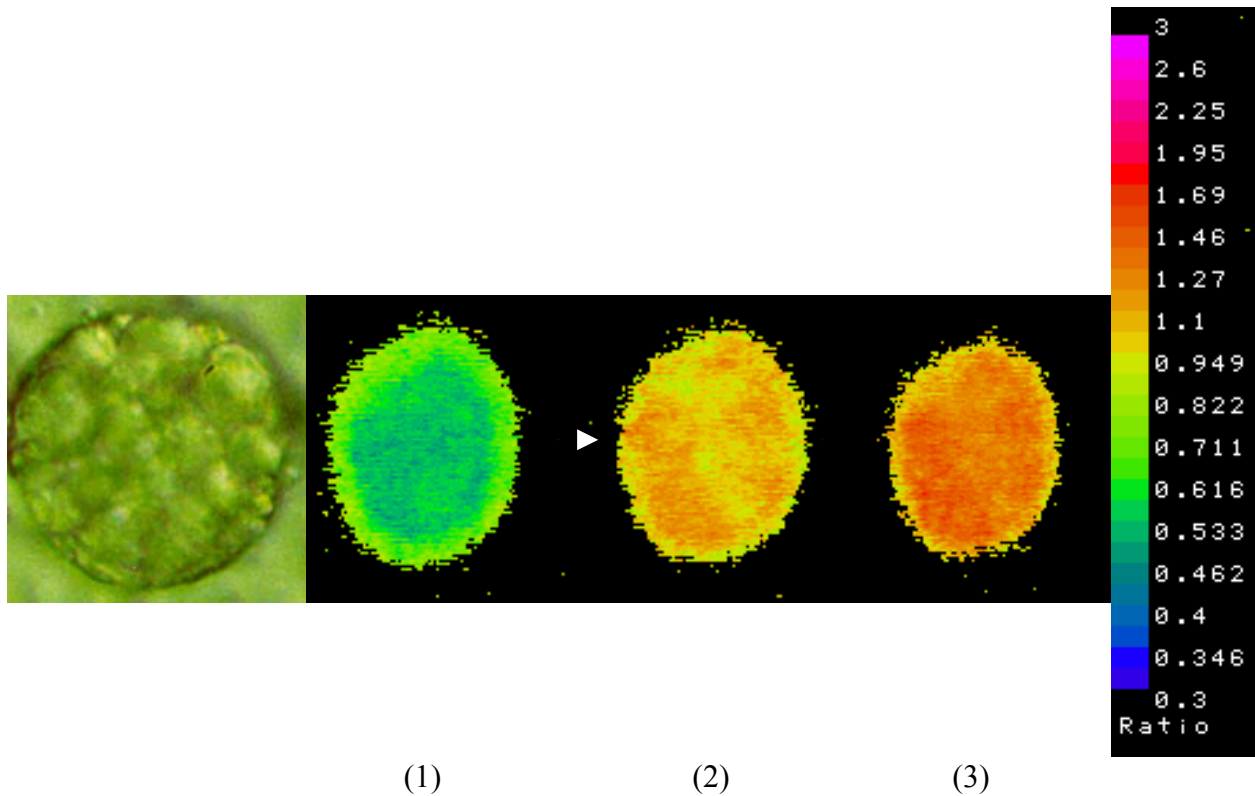


Abbildung 62: Ca^{2+} -Imaging einer isolierten, mit Fura-2 beladenen Trophocyte. Zusammenstellung dreier repräsentativer Phasen während der Änderung der intrazellulären (cytosolischen) Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe des hypertrehalosämischen Neuro-peptids Bld HrTH (100 nM).

(1) Zustand vor Hormonzugabe

(2) Beginn der Zunahme von $[Ca^{2+}]_i$ (ca. 3 min nach Hormonzugabe)

(3) Maximum von $[Ca^{2+}]_i$ (ca. 5 min nach Hormonzugabe)

Links ist zum Vergleich eine Trophocyte in DIC-Aufnahme (Differentialer Interferenzkontrast) dargestellt. Die Aufnahme wurde an einem Axioplan Mikroskop (CARL ZEISS JENA) mit Olympus OM4 Ti-Kamera durchgeführt.

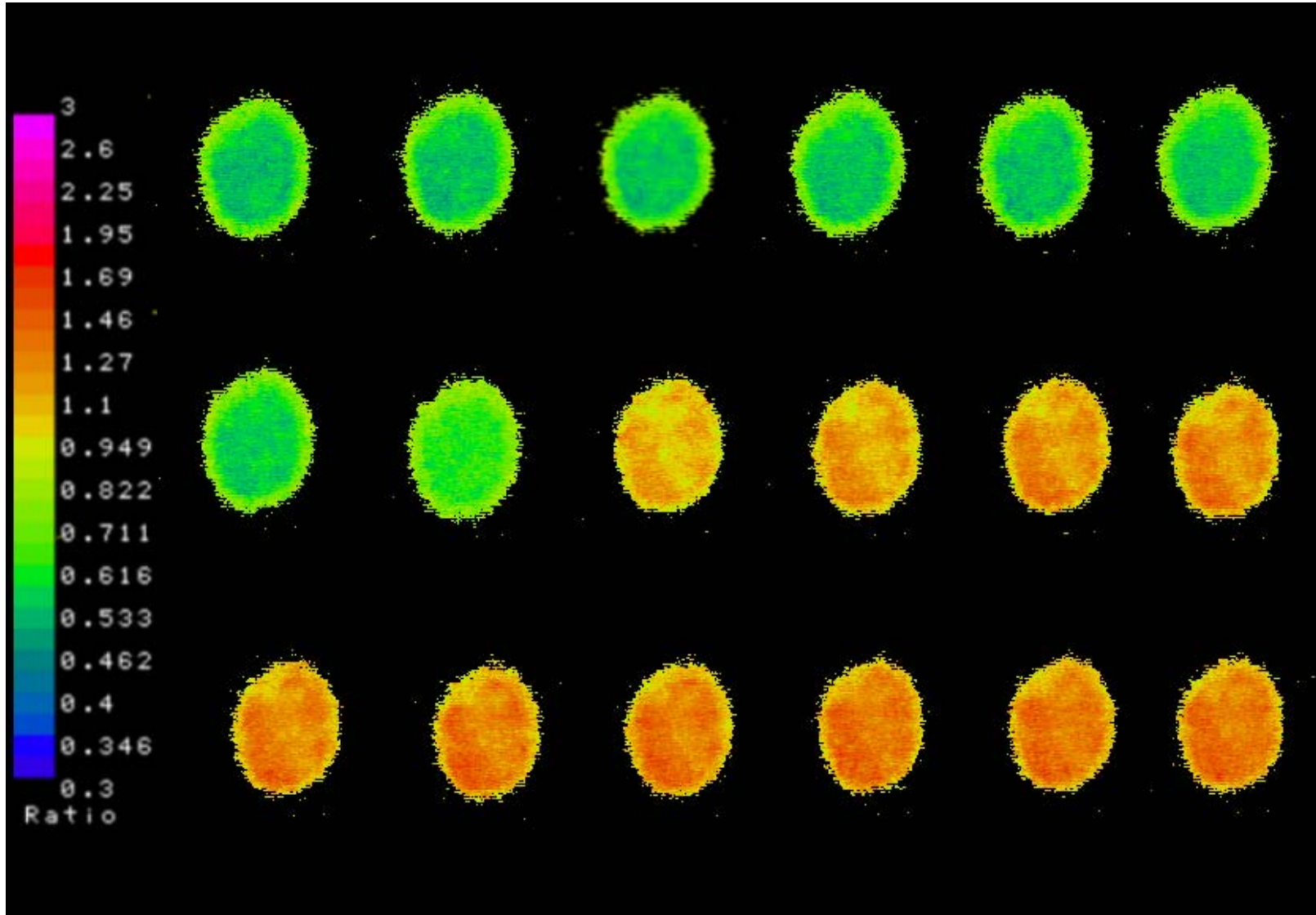


Abbildung 63: Änderung der Fluoreszenzrate einer isolierten Trophocyte bei Inkubation mit Bld HrTH (100 nM). Der Zeitabstand zwischen den Einzelbildern beträgt ca. 15 s, das erste Bild (oben links) wurde ca. 75 s nach Zugabe des Hormons aufgenommen. Bei Bild 8 (gezählt von links nach rechts) beginnt der Farbwechsel (nähere Angaben sind dem Text zu entnehmen).

4. DISKUSSION

4.1 MODELLCHARAKTER VON INSEKTEN UND IHRE BEDEUTUNG ALS VERSUCHSTIERE

Relativ viele wissenschaftliche Untersuchungen werden an Insekten und insbesondere auch an Schaben durchgeführt - an Tieren, die in der Bevölkerung eher Abscheu auslösen und sich einen schlechten Ruf als Schädlinge erworben haben. Ich will daher einige Erläuterungen geben zu der Rolle, die Insekten und insbesondere Schaben als "Modelltiere" spielen.

Die Insekten (lat.: *insecta* - Kerbtiere) sind eine Klasse der *Arthropoda* (Gliederfüßler). Mit derzeit circa 1.000.000 beschriebenen Arten (HONOMICHL & BELLMANN 1996), was etwa 75-80 % aller bekannten Tierarten entspricht, stellen sie die bei weitem artenreichste Tierklasse der Erde. Schätzungen gehen davon aus, dass tatsächlich mehrere (über 10) Millionen Insektenarten existieren, da ein Großteil, vor allem in den Tropen vorkommender Arten noch unentdeckt sein dürften (GULLAN & CRANSTON 1994, HONOMICHL & BELLMANN 1996). Insekten ist es gelungen, sich in ganz unterschiedlichen Klimazonen der Erde zu etablieren. Dennoch weisen alle Vertreter übereinstimmende Grundzüge des Körperbaus auf, darunter das Vorhandensein von 6 Extremitäten und die Segmentierung des Körpers. Insekten haben als Nützlinge, Schädlinge und Krankheitserreger große Bedeutung. Daher ist die Erforschung physiologischer Prozesse von Insekten, besonders auch solchen, in denen sich Insekten von Vertebraten unterscheiden, von Interesse.

Die Ordnung der Schaben (*Blattaria*, lat.: *blatta* - ein stinkendes Insekt, eine Schabe (bei Plinius)) hat viele ursprüngliche Züge bewahrt und ihre Organsysteme weisen einen vergleichsweise geringen Grad an Spezialisierung auf. Dies ist in soweit bemerkenswert als Schaben auf der Erde bereits vor mehr als 300 Millionen Jahren (Oberes Karbon, Steinkohlenzeit) in großer Artenfülle existierten und somit zu den ältesten Insektenordnungen zählen (s. Abb. 64). Es handelt sich um eine vergleichsweise "primitive" Insektenordnung, die sich seit ihrer Entstehung nur wenig verändert hat (HEITLAND 2001), wie ein Vergleich von Fossilien mit heute auftretenden Schaben zeigt (CORNWELL 1968).



Abbildung 64: Übersicht über das Paläozoikum (Erdaltertum) und die darin neu aufgetretenen Tiergruppen (verändert nach BECK 2001). Im Devon kam es zur Entwicklung der Insekten, geflügelte Insekten traten erstmals im oberen Karbon auf. Das Paläozoikum endete im Perm mit dem größten Massensterben der Erdgeschichte, bei dem der überwiegende Teil (schätzungsweise 90-95 %) der Meeresorganismen, sowie säugerähnliche Reptilien ausstarben (HOFBAUER 2001).

Insekten sind, z.B. aufgrund ihrer hohen Artenzahl, weltweiten Verbreitung, Vielfalt und ihrer Bedeutung als Schädlinge und Krankheitsüberträger, eine sehr wichtige Tierklasse und daher häufig Gegenstand von Forschungsarbeiten. Ihre leichte Haltung macht insbesondere Schaben zu beliebten Versuchstieren. Da das Nervensystem im Vergleich zu Vertebraten relativ einfach aufgebaut ist, jedoch dennoch Parallelen bezüglich der auftretenden Neuropeptide (z.B. Sequenz, Signalwege) und der durch sie regulierten Funktionen bestehen (ADAMS 1990; s. 4.2), bieten sich Studien über Neuropeptide an Insekten an, um grundlegende biologische Erkenntnisse zu gewinnen oder neue Testverfahren zu etablieren. Diese können dann in einem anschließenden Schritt auf das komplizierter aufgebaute Vertebratensystem übertragen werden.

Schaben lassen sich relativ leicht und günstig halten und züchten, sie sind widerstandsfähig und, da viele Arten vergleichsweise große Insekten sind, ist auch die Präparation relativ einfach. Zudem stehen Arten unterschiedlicher Größe (4 mm-11 cm) zur Auswahl. Die Länge des Lebenszyklus ist mit durchschnittlich 3 Monaten recht günstig, so dass man mit Arten wie *Blatella germanica* beispielsweise bis zu 4 Generationen pro Jahr erhält (FLINDT 1988).

Ein weiterer Vorteil ist, dass Insektenorgane, allen voran der Fettkörper als wichtigstes Organ des Intermediärstoffwechsels, isoliert in Versuchen *in vitro* direkt mit Testsubstanzen inkubiert werden können. Dieses Verfahren ist bei Vertebratenorganen nicht möglich, da bei der

Isolation die Nerven- und Blutversorgung durchtrennt werden müssen. Grundlage für die Durchführbarkeit derartiger Versuche bei Insekten ist, dass die Inkubation den Bedingungen, denen der Fettkörper *in vivo* ausgesetzt ist, ähneln. Der Fettkörper ist weder innerviert noch kapillarisiert (offener Blutkreislauf). Zudem besitzt er aufgrund seiner gelappten Struktur eine sehr große Oberfläche, die den Stoffaustausch mit dem Medium begünstigt, so dass eine Perfusion weder möglich noch notwendig ist. Die Inkubation des Fettkörpers in Insekten-Ringerlösung kommt den natürlichen Bedingungen recht nahe.

4.2 VERGLEICH ZWISCHEN HRTH, GLUKAGON UND AKH

In ihrer Funktion bei der Steuerung des Kohlenhydratstoffwechsels ähneln hypertrehalosämische Hormone wie das von mir untersuchte Bld HrTH dem Peptidhormon Glukagon der Vertebraten. Außerdem gibt es Homologien zu den adipokinetischen Hormonen (AKH), z.B. der Heuschrecken.

Glukagon (gr.: *glykys* - süß) ist ein 3,5 kD Peptidhormon bestehend aus 29 Aminosäuren (s. Abb. 65), das bei niedrigem Blutglucosespiegel (z.B. Hungerzustand, nächtliche Nahrungskarenz) von den α -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas ins Blut sezerniert wird. In der Leber stimuliert es den Abbau von Glykogen und die Gluconeogenese, so dass Glucose von der Leber ins Blut abgegeben werden kann. Gleichzeitig wird die Glykolyse durch Herabsetzung der Konzentration an Fructose-2,6-bisphosphat, des stärksten bisher bekannten Aktivators der Phosphofruktokinase (PFK), gehemmt. Glukagon hat also blutzuckersteigernde Wirkung, sein Gegenspieler ist das Insulin.

(1) pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Thr-NH₂

(2) pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH₂

(3) ⁺H₃N-His-Ser-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COO⁻

(4) pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH₂

Abbildung 65: Vergleich der Struktur von Bld HrTH (1, *Blaberus discoidalis* und *Blaptica dubia*), Pea CAH-II (2, *Periplaneta americana*), Glukagon (3) und AKH I (4, *Locusta migratoria*).

Ebenso wie Glukagon sind auch hypertrehalosämische Hormone Peptide und zumindest zwischen Glukagon und dem Octapeptid Pea CAH-II besteht eine kurze Sequenzhomologie (s. Abb. 65, -Thr-Phe-Thr-). Analog zum Glukagon reguliert Bld HrTH die Konzentration des wichtigsten im Blut auftretenden Kohlenhydrates Trehalose (Glukagon: Glucose) durch Steuerung der Synthese des Blutzuckers im wichtigsten Organ des Intermediärstoffwechsels, dem

Fettkörper (Glukagon: Leber). Die notwendigen Substrate werden vorrangig durch Aktivierung der Glykogenphosphorylase (GPase) über GPase-Kinase und daraus resultierender Glykogenolyse bereitgestellt. Sowohl Glukagon als auch Bld HrTH stimulieren den Glykogenabbau nur in bestimmten Geweben. Während Glukagon vor allem in der Leber (teilweise auch im Fettgewebe), nicht aber im Muskelgewebe stimulierend wirkt, entfalten hypertrehalosämische Hormone ihre Wirkung im Fettkörper, führen jedoch nicht zum Abbau des in der Muskulatur gespeicherten Glykogens (Übersicht bei GÄDE *et al.* 1997). Um den Abbau der bereitgestellten Substrate im Speicherorgan zu verhindern wird parallel zur Aktivierung der Glykogenolyse die Glykolyse gedrosselt, wozu in beiden Fällen die Herabsetzung der Fructose-2,6-bisphosphat-Konzentration beiträgt.

Da ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Signaltransduktion von Bld HrTH lag, bietet sich in Anbetracht der Parallelen zwischen Bld HrTH und Glukagon ein detaillierterer Blick auf die Signaltransduktionskaskade des Glukagons an. Das Hormon bindet zunächst an einen spezifischen Rezeptor in der Membran von Leberzellen (siehe Abb. 66). Durch Interaktion eines trimeren, membranständigen G-Proteins mit dem intrazellulären Teil des Hormon-Rezeptor-Komplexes wird das an der α -Untereinheit gebundene GDP durch GTP ersetzt. Dies hat zur Folge, dass sich die α -GTP-Untereinheit (G_α) von dem β - γ -Komplex ($G_\beta G_\gamma$), der für die Verankerung in der Plasmamembran verantwortlich ist, löst. Die α -GTP-Untereinheit bindet daraufhin an eine Adenylatcyclase und aktiviert sie, so dass das Enzym aus ATP den second messenger cAMP synthetisiert. Die Synthese wird beendet, sobald das GTP der α -Untereinheit autokatalytisch zu GDP hydrolysiert wird (<1 min; ALBERTS *et al.* 1990) und es zur Reassoziaton der drei Untereinheiten des G-Proteins kommt (inaktive Form). cAMP wiederum aktiviert eine spezifische cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A). Diese in vielen Zellen auftretende Proteinkinase kann bestimmte Enzyme durch Phosphorylierung von Seryl- bzw. Threonylresten aktivieren oder inhibieren und auf diesem Weg die Hormonfunktion vermitteln.

Ein Vorteil der Signalübermittlung über G-Proteine ist zum einen, dass das Hormonsignal verstärkt werden kann, da ein Hormon-Rezeptor-Komplex in der Lage ist, mehrere G-Proteine zu aktivieren. Zudem ergeben sich zusätzliche Steuerungsmöglichkeiten durch Spaltung des second messengers cAMP zu 5'-AMP mittels Diesterase oder durch Dephosphorylierung der von der Proteinkinase A modifizierten Enzyme durch Phosphatasen.

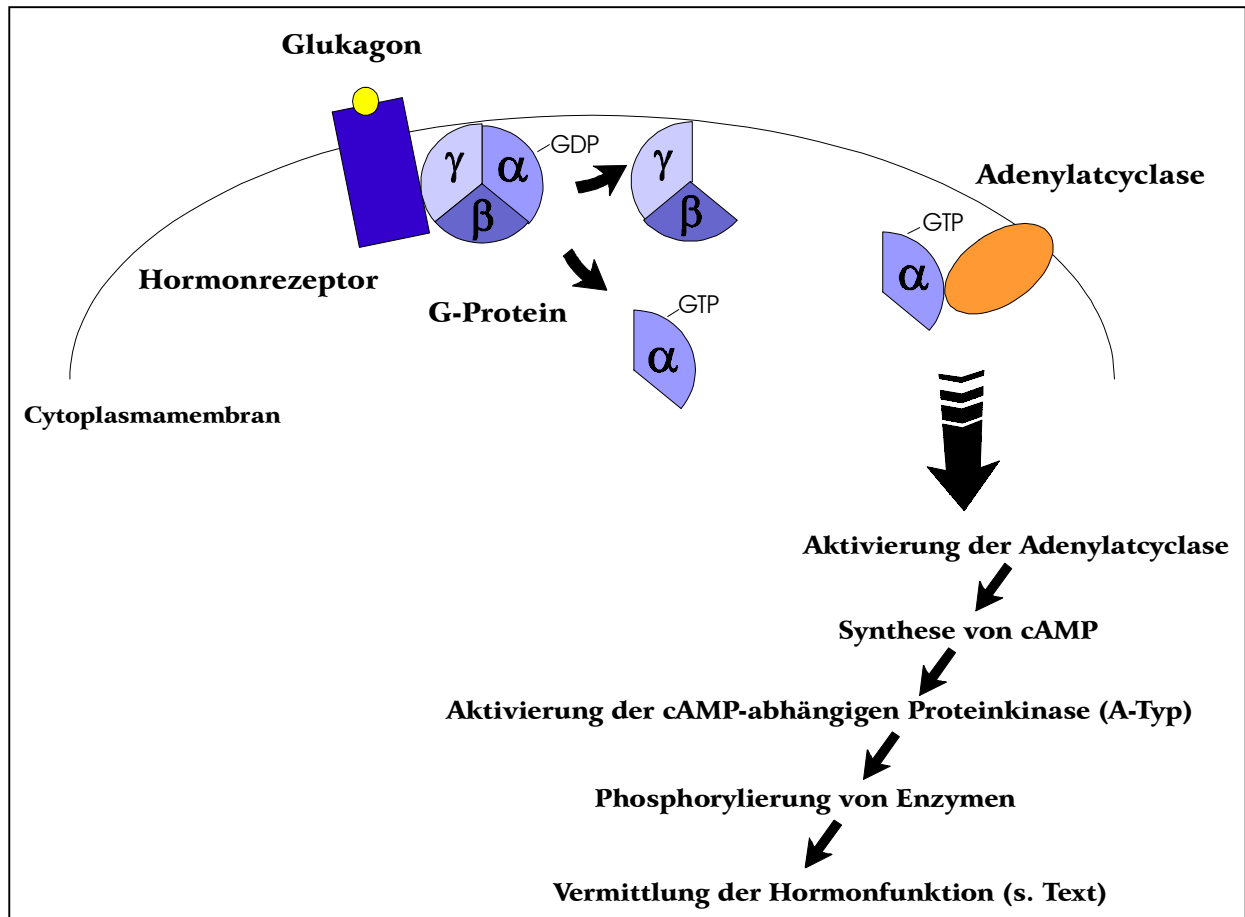


Abbildung 66: Signaltransduktion von Glukagon.

Die bei Heuschrecken gut untersuchten adipokinetischen Hormone (z.B. AKH I, -II, -III bei *Locusta*) sind dem Bld HrTH nahe verwandt. Es handelt sich ebenfalls um zirkulierende, decapeptidische Neurohormone mit deutlichen Sequenzhomologien zum Bld HrTH und anderen hypertrehalosämischen Peptiden (s. Abb. 65). Aufgrund dieser Homologien fasst man die hypertrehalosämischen und adipokinetischen Hormone der Insekten zusammen mit den RPCH (red pigment-concentrating hormones) der Crustacea zur AKH/RPCH-Peptidfamilie zusammen (GÄDE 1990).

AKHs werden ebenfalls von intrinsischen, neurosekretorischen Zellen der Corpora cardiaca synthetisiert und bei Bedarf in die Hämolymphe sezerniert. Sie erhöhen bei Heuschrecken den Lipidgehalt der Hämolymphe (z. B. beim Wanderflug), indem die im Fettkörper gespeicherten Triglyceride mobilisiert (MAYER & CANDY 1969) und Diglyceride vom Fettkörper abgegeben werden. Außerdem wird die Diglyceridaufnahme in die Flugmuskulatur erhöht (ROBINSON & GOLDSWORTHY 1977).

Interessanterweise rufen in Schaben injizierte adipokinetische Hormone von Heuschrecken eine Erhöhung des Trehalosegehaltes in der Hämolymphe der Schaben hervor (GÄDE 1990,

PERRIGIN 2001), während die Lipidfreisetzung aus dem Fettkörper weder durch AKH noch durch Bld HrTH signifikant beeinflusst wird. Umgekehrt rufen Corpora cardiaca Extrakte von Schaben bei Heuschrecken hyperlipämische Effekte hervor (GOLDSWORTHY *et al.* 1972), bei Schaben selbst wird hingegen die Lipidaufnahme durch den Fettkörper (DOWNER 1972), sowie die Freisetzung von Trehalose (HOLWERDA *et al.* 1977) gesteigert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Hormone ihre Wirkungen eher artspezifisch als hormonspezifisch entfalten, was auf Rezeptoren zurückgeführt werden kann, die aufgrund der Sequenzhomologien beide Neuropeptidtypen erkennen, jedoch mit verschiedenen Effektorsystemen gekoppelt sind.

Ebenso wie Glukagon führen AKH zu einer verstärkten Synthese von cAMP (STAGG & CANDY 1996, *Schistocerca gregaria*; WANG *et al.* 1990, *Locusta migratoria*), worin ein Unterschied zu den hypertrehalosämischen Hormonen der Schaben besteht, die den cAMP-Gehalt nicht zu beeinflussen scheinen. Demnach müssen unterschiedliche Signaltransduktionswege vorliegen (ORR *et al.* 1985).

4.3 WIRKUNG VON NAHRUNGSMANGEL AUF *BLAPTICA DUBIA*

Die Fähigkeit von Schaben längere Zeit ohne Nahrung auszukommen, wird ermöglicht durch umfangreiche Speicher von Reservestoffen (insbesondere Glykogen und Fett, daneben auch Protein) im Fettkörper, die bei Hunger mobilisiert werden. WILLIS & LEWIS (1957) konnten zeigen, dass Weibchen von *Periplaneta americana* in der Lage sind, bis zu 90 Tage ohne Futter zu überleben (s. Tab. 33).

Tabelle 33: Überlebensdauer (in Tagen bei 27°C und 36 % relative Feuchte) von Weibchen bzw. Männchen der Amerikanischen Schabe (*Periplaneta americana*), denen Futter und/oder Wasser entzogen wurden (WILLIS *et al.* 1957). Dargestellt sind Mittelwerte±S.D. (n=10).

Versorgung mit...	Weibchen	Männchen
Wasser (kein Futter)	89,6±4,8	43,7±3,5
Trockenfutter (kein Wasser)	40,1±3,0	27,3±1,9
kein Futter, kein Wasser	41,7±2,7	28,1±1,9

Die Überlebensdauer ist abhängig von der Schabenart, und fast immer überleben die Weibchen einer Art länger als die Männchen. Diese Tatsache lässt sich darauf zurückführen, dass weibliche Schaben einen größeren Fettkörper und somit auch mehr Reservestoffe aufweisen (CORNWELL 1968). Bei der von mir untersuchten Art *Blaptica dubia* war der Fettkörper der Weibchen mit 0,357 g um mehr als 48 % schwerer als der Fettkörper der Männchen. Außerdem können Insektenweibchen bei Hunger sich entwickelnde Eier absorbieren (DETTNER & PETERS

1999). Des weiteren ist eine Korrelation der Überlebensdauer mit der Körpermasse festzustellen, die bei den Weibchen durchschnittlich größer ist als bei den Männchen.

Adulte Männchen von *Blaptica dubia* verloren während einer 30-tägigen Hungerperiode durchschnittlich mehr als 26 % ihres Gesamtgewichtes, beim Fettkörper war sogar eine Gewichtsabnahme um 66 % zu verzeichnen. Die Wirkung von längerfristigem Nahrungsmangel auf das Gewicht, insbesondere des Fettkörpers, überraschen insofern nicht, da eine wichtige Funktion des Fettkörpers die eines Speichers ist. Die Nahrung vieler Insekten enthält substantielle Mengen an Kohlenhydraten, entweder als einfache Zucker oder Polymere. Die Zucker werden über das Epithel des Mitteldarmes absorbiert, über die Hämolymphe zum Fettkörper transportiert und von den Trophocyten aufgenommen. Dort kann Glucose in Form von Glykogen gespeichert werden. Vor allem während der Larvalentwicklung und nach der Metamorphose werden im Fettkörper der Insekten Reservestoffe gespeichert und fungieren, wie bei der Leber, als Hauptquelle für die in der Hämolymphe zirkulierenden Energieträger (GUTHRIE & TINDALL 1968). Bei den Imagines dienen die Speicherstoffe vor allem als Reservematerial zur Produktion von Geschlechtszellen, für den Flug, sowie zur Überwinterung.

Bei *Blaptica dubia* betrug der Glykogengehalt des Fettkörpers $407 \mu\text{mol Glucoseeinheiten} \cdot \text{g}^{-1}$ Fettkörper, dies entspricht einem Glykogengehalt von circa $66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Fettkörper (10 % wurden für den Wasseraustritt bei Ausbildung der glykosidischen Bindungen subtrahiert; s. NEWSHOLME & START 1976). Dieser Wert liegt in Bereichen, wie sie für den Glykogengehalt des Fettkörpers von *Periplaneta americana* ermittelt wurden. Hier lag der Glykogengehalt mit $21,86 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Fettkörper (STEELE 1963) deutlich höher als bei anderen Geweben wie z.B. Muskulatur ($9,93 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Fettkörper) oder Darm ($1,96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Fettkörper). Zum Vergleich: Der Glykogengehalt in der Leber des Menschen beträgt durchschnittlich etwa $90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Leber.

Innerhalb der 30-tägigen Hungerperiode nahm der Glykogengehalt des Fettkörpers von *Blaptica dubia* um 72 % ab. Im gleichen Zeitraum sank die vom isolierten Fettkörper abgegebene Menge an Trehalose um 23 %. Bei hungernden Insekten werden zunächst die Glykogenvorräte des Fettkörpers mobilisiert (Glykogenolyse), um insbesondere das Nervensystem und die Muskeln weiterhin ausreichend mit Substraten (Trehalose) versorgen zu können. Die Mobilisierung wird vermutlich nicht durch Neuropeptide, sondern durch das Absinken des Trehalosespiegels gesteuert (DETTNER & PETERS 1999). Der Glykogenabbau führt zu drastischen Gewichtsverlusten, insbesondere da Glykogen hygroskopisch ist, ermöglicht den Tieren aber ein langes Überleben.

Allerdings wurde auch nach längerem Hungern der Argentinischen Schaben von den aus ihnen isolierten Fettkörpern noch viel Trehalose ins Inkubationsmedium sezerniert. Vermutlich

handelt es sich hierbei um *in vitro*-Effekte. Eine weitere Ursache für die vergleichsweise geringe Abnahme der vom Fettkörper von Hungertieren freigesetzten Trehalosemenge könnte der veränderte Protoplasmaanteil der Fettkörper von Hungertieren sein. Durch die Abnahme insbesondere der Speicherstoffe Glykogen und Fett wird der Fettkörper leichter, bei möglicherweise wenig veränderter Kapazität der Trehalosesynthese. Da die Werte für die Trehalosesynthese jeweils pro g Fettkörper berechnet werden, könnte eine parallele Abnahme des Fettkörpergewichtes eine verringerte Trehalosesynthese überdecken.

Überraschend war auch der Anstieg des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes des Fettkörpers über die gesamte Hungerperiode. Allerdings spielt höchstwahrscheinlich auch hier die im gleichen Zeitraum auftretende Abnahme des Fettkörpergewichtes (-66 %) durch Abbau der gespeicherten Reservestoffe eine nicht unbedeutende Rolle, da der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt ebenfalls pro g Fettkörper berechnet wurde.

Die Auswertung der Schnitte von *Blaptica dubia*, bei denen das im Fettkörpergewebe gespeicherte Glykogen angefärbt worden war, zeigte ebenfalls einen drastischen Glykogenabbau unter Hungerbedingungen. Im Vergleich zu den sehr stark gefärbten Schnitten der Kontrolltiere, die auf die großen Mengen an Speicherglykogen hinweisen, war bei den Tieren, die 28 Tage gehungert hatten, nur noch eine sehr schwache Färbung zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass der Glykogenspeicher in den Fettkörperzellen von männlichen Exemplaren von *Blaptica dubia* innerhalb von 28 Tagen zum großen Teil aufgebraucht ist. Um längere Überlebenszeiten zu garantieren, müssen folglich andere Reservestoffe herangezogen werden.

Auch die symbiontischen Bakterien in den Mycetocyten wurden vom Nahrungsmangel in Mitleidenschaft gezogen. Schnitte der Fettkörper von Hungertieren lassen darauf schließen, dass sich die Anzahl der symbiontischen Bakterien verringerte. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die unzureichende Versorgung durch die Wirtszellen. Denkbar wäre auch, dass die Wirtszelle unter diesen für sie sehr kritischen Bedingungen die Symbionten verdaut. Symbionten spielen oft eine wichtige Rolle bei der Ernährung ihres Wirtes, da sie beispielsweise bestimmte Vitamine oder andere Nährstoffe beisteuern, die von den Insekten nicht oder unzureichend über die Nahrung aufgenommen oder synthetisiert werden können.

Neben dem Glykogenspeicher steht den Schaben hauptsächlich noch Fett als Reservestoff zur Verfügung. Der Lipidspiegel in der Hämolymphe ist von Grund aus relativ niedrig, jedoch wird Fett in den Trophocyten in großem Umfang gespeichert und die Triglyceride können bei Bedarf rasch mobilisiert werden (CORNWELL 1968). Das Glycerin kann über Glycerin-Kinase zu L-Glycerin-3-phosphat und mittels Glycerinphosphat-Dehydrogenase zu

Dihydroxyacetonphosphat, einem Zwischenprodukt der Gluconeogenese (Glykolyse), umgewandelt werden.

Grundsätzlich sind Insekten zur Gluconeogenese, d.h. zur Synthese von Kohlenhydraten aus Nicht-Kohlenhydrat-Vorstufen wie Glycerin (aus Lipiden) oder Aminosäuren (aus Proteinen), fähig. Gluconeogenese bietet sich vor allem dann an, wenn die Menge an zur Verfügung stehenden Kohlenhydraten reduziert ist, beispielsweise bei Insektenarten, deren Nahrung einen geringen Gehalt an Kohlenhydraten aufweisen (z.B. blutsaugende Insekten) oder eben im Hungerzustand. Versuche an isolierten Fettkörpern von *Blaptica dubia* zeigten bereits, dass die aus dem Glykogenabbau stammenden Glucosephosphate allein nicht ausreichen, um den Substratbedarf für die Trehalogenese länger als 30 Minuten zu decken (BECKER 1996, BECKER *et al.* 2001).

1942 konnte WIGGLESWORTH zeigen, dass Larven des Moskitos (*Aedes aegyptis*) nach einer Hungerperiode in der Lage sind bei einer reinen Aminosäurediät Glykogen zu bilden. Ebenso konnte für *Periplaneta americana* die Umwandlung radioaktiv markierter Vorstufen über Gluconeogenese in Trehalose und andere Kohlenhydrate nachgewiesen werden (LIPKE 1965). STOREY & BAILEY (1978) analysierten bei *Periplaneta americana* die Gluconeogeneseenzyme des Fettkörpers und fanden, dass deren Aktivitäten und intrazelluläre Verteilung den Enzymen der Säugerleber ähnlich sind - was aufgrund der ähnlichen Funktionen dieser Gewebe nicht verwunderlich ist.

Bezüglich der Regulation der Gluconeogenese ist hingegen noch wenig bekannt. Experimente mit ¹⁴C-markierten Aminosäurevorstufen an *Periplaneta americana* ließen SEVALA & STEELE (1989) vermuten, dass die Gluconeogenese zumindest bei dieser Art nicht von großer Bedeutung für die Synthese von Trehalose oder Glykogen ist, da nur ein ganz geringer Prozentsatz glucogener Aminosäuren tatsächlich in Kohlenhydrat umgewandelt wurde und *in vivo* der Einbau der radioaktiv markierten Aminosäuren in Trehalose durch Corpora cardiaca-Extrakt nicht signifikant gesteigert wurde. Allerdings scheint es ordnungsspezifische Unterschiede zu geben, da beispielsweise für den Mehlkäfer *Tenebrio molitor* (Coleoptera) ein stimulierender Effekt von Corpora cardiaca-Extrakt auf den Einbau von Aminosäuren in Trehalose nachgewiesen wurde (GOURDOUX *et al.* 1983). Ebenso kann beim Flug der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* das aus dem Fettabbau stammende Glycerin in Trehalose umgewandelt werden (CANDY *et al.* 1976).

4.4 WASSERGEHALT UND WASSERVERLUST DURCH VERDUNSTUNG IN TROCKENER LUFT

Wasser ist ein unentbehrlicher Bestandteil jedes Tierkörpers - essentiell zum Überleben und daher insbesondere für Landtiere oftmals ein begrenzender Faktor. Der Wassergehalt des Körpers

kann je nach Tierart stark variieren. Durchschnittlich sind 65-85 % des Körpergewichtes Wasser, bei Zellen beträgt der Wassergehalt fast 90 %. Viele chemischen Reaktionen laufen nur im wässrigen Milieu ab, zudem dient Wasser als wichtiges Lösungs- und Transportmittel. Daher ist es nicht verwunderlich, dass oftmals schon der Verlust eines geringen Prozentsatzes des körpereigenen Wassers zum Tode führen kann. Wassermangel kann zu Zellschrumpfen, Dysfunktionen und letztlich zum Tod durch Dehydrierung führen.

Die Wasseraufnahme kann über sehr unterschiedliche Wege erfolgen - entweder direkt durch Trinken und Wasserdampfabsorption aus feuchter Luft (z.B. Mehlwurm *Tenebrio molitor* über den Rektalkomplex) oder indirekt über die Nahrung (z.B. Blatt- und Fruchtfresser, Blut- und Pflanzensauger) und Bildung von Stoffwechselwasser in der Zellatmung.

Die in unseren Versuchen ermittelten Wassergehalte für *Blaptica dubia* von 67 % bei Weibchen bzw. 62 % bei Männchen liegen im unteren Bereich der allgemein bei Insekten auftretenden Werte. Sie entsprechen aber Ergebnissen, die für andere Schabenarten publiziert wurden (Wüstenschabe *Avrenivaga investigata*: 67 %, MILLER 1996). Bei Insekten liegen typische Wassergehalte um die 65-80 % des Körpergewichtes, z.B. bei der Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*: 60-72 %, PHIPPS 1950) oder der Seidenraupe (*Bombyx mori*; *Lepidoptera*: 77 %, TESCHNER 1979). Generell ist jedoch artabhängig die Spannbreite relativ weit und bei manchen Arten findet man auch Wassergehalte von nur 50 % (Kornkäfer *Sitophilus granarius*) oder mehr als 90 % (Seidenraupenlarve *Telea polyphemus*, MILLER 1996). Zudem kann es natürlich bei jedem Individuum, z.B. infolge Wassermangels und bei großer Trockenheit, zu individuellen Schwankungen kommen.

Die Überlebensfähigkeit von Schaben ist eine bekannte Tatsache. Während viele Tiere nur wenige Tage ohne Wasser überleben, können Schaben 2 Wochen bis maximal 3 Monate ohne Wasser auskommen. Besondere evolutionäre Anpassungen der Insekten an das terrestrische Leben sind einer der Gründe für ihre weltweite Verbreitung, auch in extrem heißen und ariden Regionen der Erde (z.B. Wüstenschabe *Avrenivaga investigata*, Wüstenheuschrecke). Beispielsweise haben die Tiere Wege gefunden, um die Transpiration und damit den Wasserverlust über die als Exoskelett dienende Cuticula zu minimieren. Negativ wirkt sich für Insekten aus, dass sie relativ klein sind und damit ein ungünstiges Verhältnis von Körpervolumen zu Körperoberfläche aufweisen. Das Ausmaß der Transpiration hängt außerdem von Außenfaktoren wie relativer Luftfeuchtigkeit und Luftbewegung ab.

In den von mir durchgeführten Versuchen in trockener Luft war der Gewichtsverlust von *Blaptica dubia* gering (0,037 % des Ausgangsgewichtes nach 1h bei weiblichen Tieren). In dieser trockenen Atmosphäre und aufgrund der relativ kurzen Versuchsdauer kann man davon

ausgehen, dass die Gewichtsabnahme weitgehend auf den Verlust von H₂O (und nicht von CO₂) zurückzuführen ist. Damit liegt *Blaptica dubia* am unteren Ende der Skala von vergleichbaren Versuchen mit anderen Tierarten und scheint über sehr effektive Mechanismen zu verfügen, die vor Wasserverlust schützen. Die Ergebnisse ähneln Werten (-0,14 % innerhalb 1 h), die für die Schabenart *Blatta orientalis* (Orientalische Schabe) ermittelt wurden (TESCHNER 1979). Ebenso effektiv wie die Argentinische Schabe ist der Mehlwurm (*Tenebrio molitor*; 0,05 % pro h), für den im "Lebensraum Mehl" recht extreme Bedingungen im Hinblick auf Luftfeuchtigkeit und Wasserversorgung herrschen.

Um einer starken Transpiration entgegenzuwirken, haben Insekten eine Cuticula entwickelt, die relativ impermeabel für Wasser ist. Insbesondere die sehr hydrophobe Wachsschicht (bestehend aus Paraffinen, Estern von hochmolekularen Fettsäuren und Alkoholen) der Epicuticula ist für die Wasserundurchlässigkeit verantwortlich. Insekten, die in heißen und ariden Klimata leben, weisen Anpassungen in der Zusammensetzung der Epicuticula auf. Von *Periplaneta americana* ist zudem bekannt, dass die Tiere Wasser aus Tropfen auf ihrer Körperoberfläche absorbieren können. Ihre Cuticula ist in Bezug auf Wasseraufnahme asymmetrisch konstruiert, so dass Wasser über die Cuticula leichter in den Körper eintreten kann, als aus ihm heraus (STANLEY & BEDICK 1997).

Außer über die Körperoberfläche erfolgt Wasserverlust vor allem über die Atemluft, bei *Gastrimargus* (Orthoptera, Geradflügler/Schrecken) beispielsweise macht dies 70 % des Gesamtverlustes aus. Im Verlauf der Evolution, ausgehend von aquatischen Vorfahren wurde diesem Faktor dadurch Rechnung getragen, dass das Respirationssystem vollständig in den Körper verlagert wurde und sich Ventile bzw. Schließmechanismen entwickelten. Diese Ventile werden in trockenem Klima so weit wie möglich geschlossen gehalten und die Atmung erfolgt diskontinuierlich.

Exkrete stellen einen dritten Faktor dar, der zum Wasserverlust beiträgt. Unter den terrestrisch lebenden Evertibraten weisen Insekten das effektivste System zur Wassereinsparung bei der Exkretion stickstoffhaltiger und anorganischer Stoffwechselprodukte auf (ECKERT 1986). Durch verstärkte Wasserrückresorption aus dem Kot kann dessen Wassergehalt verringert werden. Auch die Verwendung des schwer wasserlöslichen Stoffwechselproduktes Harnsäure trägt wesentlich zur Wasserersparnis bei.

Eine Quelle zur Kompensierung von Wasserverlusten stellt metabolisches Wasser dar. Innerhalb der Elektronentransportkette ist der letzte Elektronenakzeptor Sauerstoff, der zu Wasser reduziert wird. Die Menge an Wasser, die freigesetzt werden kann, hängt von der Menge und der Art des metabolisierten Substrats und somit von der zur Verfügung stehenden Nahrung

bzw. dem metabolisierten Reservestoff ab. Beispielsweise kann bei der Metabolisierung von 100 g Glykogen 56 g Wasser gewonnen werden. Bei der Metabolisierung von Fettsäuren ist der Wassergewinn fast doppelt so groß (107 g Wasser pro 100 g Fett), so dass die vorrangige Metabolisierung von Lipiden bei Wassermangel eine adaptive Anpassung ist, die man im Fettkörper der Insekten oder auch im Kamelhöcker findet. Einige Insekten (Wüstenbewohner, Vorratsschädlinge) können bei Trockenheit sogar 90 % ihres Wasserbedarfes aus dem Stoffwechsel decken.

4.5 METABOLITE IN FETTKÖRPERN

Seit langem ist bekannt, dass bei Inkubation von Fettkörperloben mit *Corpora cardiaca* Extrakt die Glykolyse gedrosselt wird (WIENS & GILBERT 1965). Da Glykolyse und Trehalosesynthese um die gleichen Substrate (Glucosephosphate) konkurrieren, ist es für die Effizienz der Trehalogenese wichtig, die Glykolyse zu drosseln, wenn Trehalose produziert wird. Allerdings wurde in der Literatur bislang die Frage diskutiert, wo und wie die Kontrolle durch hypertrehalosämische Hormone erfolgt. Es existieren mehrere Hypothesen und die mögliche Beteiligung insbesondere der Phosphofruktokinase (PFK) und der Aldolase wurde kontrovers diskutiert. Bis heute ist der Mechanismus durch den die Glykolyse inhibiert wird nicht vollständig geklärt.

WIENS & GILBERT postulierten 1965 zunächst, dass eine Regulation über die PFK am wahrscheinlichsten ist, konnte diese Hypothese allerdings nicht experimentell beweisen. Später wurde angenommen, dass die Fructosebisphosphat-Aldolase als hauptsächliches Kontrollelement fungiert (SEVALA & STEELE 1991). Diese Hypothese basierte vor allem auf der Beobachtung, dass im Fettkörper von *Periplaneta americana* nach Inkubation mit *Corpora cardiaca* Extrakt die Konzentration an Fructose-1,6-bisphosphat, ein Substrat der Aldolase und Produkt der PFK, ansteigt. Zudem kommt es zu einer Senkung der Konzentration an ATP, des allosterischen Inhibitors der PFK, sowie zu einem Anstieg der Konzentration des Aktivators AMP. Diese Konzentrationsänderungen würden eher zu einer Aktivierung der PFK als zu einer Inhibierung führen. Auf der anderen Seite erscheint es eher unwahrscheinlich, dass gerade Aldolase das wichtigste oder sogar einzige Kontrollelement sein soll. In allen bisher untersuchten Geweben katalysiert dieses Enzym *in vivo* eine "Gleichgewichtsreaktion", d.h. es stellt die Konzentrationen von Substraten und Produkten so ein, wie es dem chemischen Gleichgewicht entspricht (NEWSHOLME & LEECH 1983). Die katalytische Aktivität von "Gleichgewichtsenzymen" reagiert sensibel auf Veränderungen der Konzentrationen von Substraten und Produkten, ansonsten gibt es jedoch nur geringe regulatorische Kapazitäten. Eine Hemmung der Fettkörper-Aldolase würde

zudem zu einem Problem für die Insekten bei Nahrungsmangel führen, da das Enzym dann nicht in der Gluconeogenese fungieren könnte, dieser Stoffwechselweg also blockiert wäre.

Allgemein hat man bei einer Vielzahl von Zellen und Geweben die Phosphofruktokinase (PFK) und die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) als Schlüsselenzyme bei der Kontrolle der Glykolyse bzw. Gluconeogenese identifiziert. Sowohl PFK als auch FBPase katalysieren Reaktionen, die unter physiologischen Bedingungen irreversibel sind. Es konnte gezeigt werden, dass Fructose-2,6-bisphosphat ein potenter Aktivator auch der Fettkörper-PFK ist (KASPRZYK 1993, BECKER *et al.* 1996). Hypertrehalosämische Hormone führen im isolierten Fettkörper von Schaben sowohl zu einer Stimulation der Trehalogenese als auch zu einer Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes (BECKER 1996, BECKER & WEGENER 1998, BECKER *et al.* 2001). Da die einzige bisher bekannte Funktion des Fructose-2,6-bisphosphates die eines starken Aktivators der PFK und Inhibitors der FBPase ist, würde eine Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes zu der gewünschten Hemmung der Glykolyse und Aktivierung der Gluconeogenese beitragen. Eine entsprechende Hormonwirkung auf Glykolyse und Gluconeogenese ist vom Glukagon der Vertebratenleber bekannt (s. 4.2).

Metabolitbestimmungen an isolierten und mit und ohne Hormon inkubierten Fettkörpern von *Blaptica dubia* sollten weitere Erkenntnisse bezüglich der Regulation der Glykolyse durch Bld HrTH liefern. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf Substrate, Produkte und Effektoren der Glykolyse gelegt. Bisher waren vor allem die Wirkungen von Corpora cardiaca Extrakten untersucht worden (STEELE *et al.* 1984, SEVALA & STEELE 1991; *Periplaneta americana*). Diese Extrakte enthalten jedoch neben dem eigentlichen hypertrehalosämischen Hormon (Pea CAH-I, Pea CAH-II) noch eine Reihe weiterer Substanzen, die ebenfalls auf die Metabolitgehalte Einfluss nehmen könnten.

4.5.1 Bld HrTH und Metabolite im Fettkörper

Erwartungsgemäß kam es nach Inkubation von Fettkörperloben mit Bld HrTH zu einer Verringerung des Glykogengehaltes (-13 % nach 60 Minuten). Das Neuropeptid führt zur Mobilisierung von Glykogen, so dass Bausteine (Glucosephosphate) für die Trehalogenese bereit gestellt werden. Laut BECKER (1996) wird in den ersten 20 Minuten der Inkubation mit Bld HrTH im Fettkörpergewebe sogar mehr Glykogen zu Glucosephosphaten abgebaut, als für die Trehalosesynthese benötigt wird. Dieses Verhältnis kehrt sich jedoch mit zunehmender Inkubationsdauer (30 Minuten) um, so dass Substrate anschließend auch durch andere Stoffwechselwege (z.B. Gluconeogenese) bereitgestellt werden müssen.

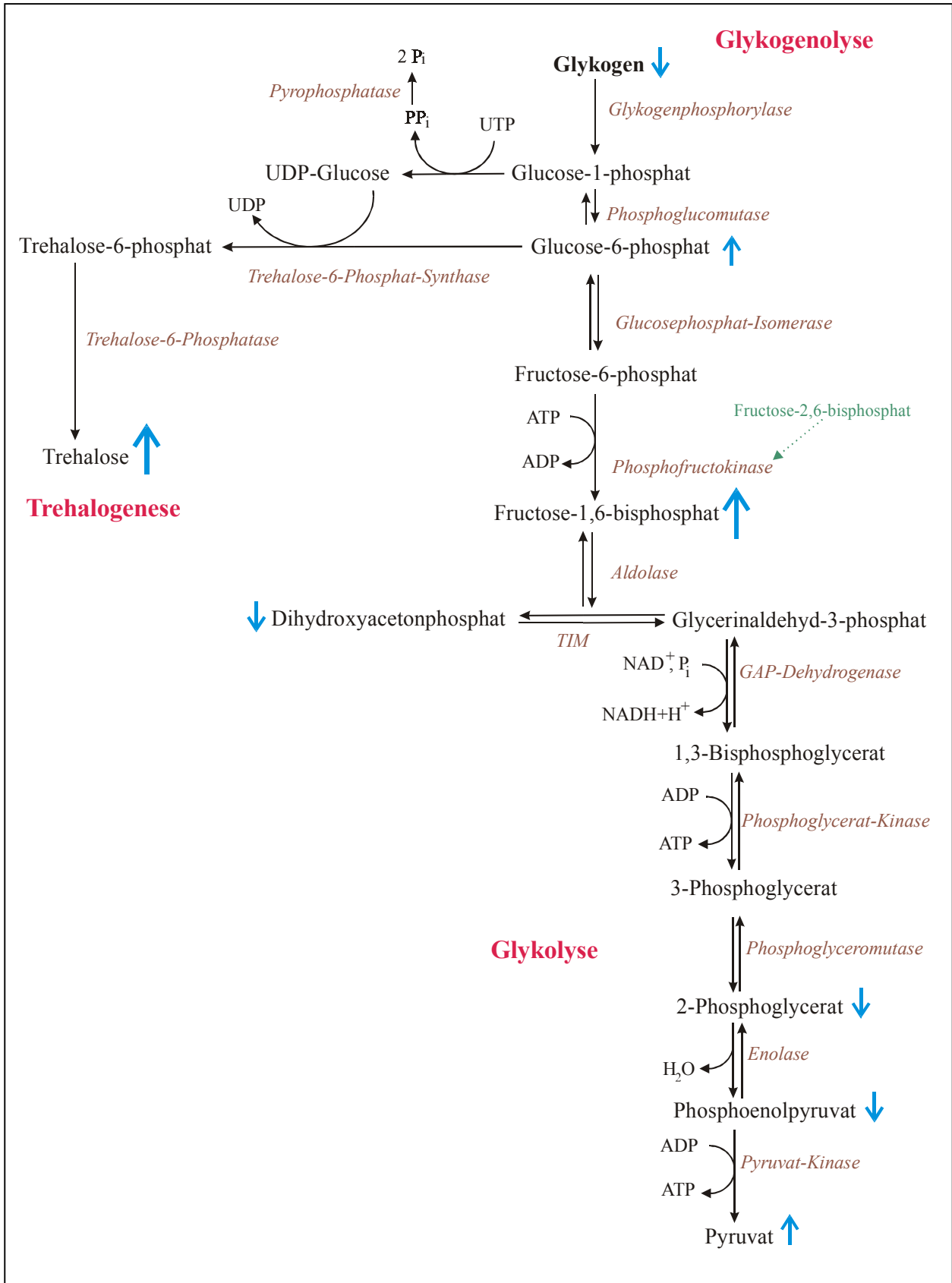


Abbildung 67: Glykogenolyse, Trehalosesynthese und Glykolyse im Fettkörper von *Blaptica dubia*. Die Änderungen der Metabolitgehalte bei Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) über 60 Minuten sind mittels blauer Pfeilen dargestellt.

Der gesteigerten Glykogenolyse entspricht ein Anstieg der Konzentration der freigesetzten Glucosephosphate, Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat (um +85 bzw. +98 %). Die Ergebnisse entsprechen Untersuchungen mit CC-Extrakten (STEELE *et al.* 1984, *Periplaneta americana*), bei denen eine Verdopplung der Konzentration beider Metabolite festgestellt wurde. Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat stehen miteinander über eine Gleichgewichtsreaktion in Verbindung, die durch die Glucosephosphat-Isomerase katalysiert wird. Fructose-6-phosphat machte im Fettkörper 40 % des Gleichgewichtsgemisches aus, was nur leicht über dem für Vertebraten gemessenen Wert von ca. 30 % liegt (KARLSON 1988). Glucose-6-phosphat dient direkt als Substrat für die Trehalosesynthese. Es wird über Trehalose-6-phosphat-Synthase zu Trehalose-6-phosphat umgewandelt und durch die Trehalose-6-Phosphatase dephosphoryliert zu Trehalose. Das Schrittmacherenzym bei der Trehalogenese ist die Trehalose-6-phosphat-Synthase. Dieses Enzym hat bei *Hyalophora cecropia* (Silbermotte) einen K_m -Wert für das Substrat Glucose-6-phosphat von etwa 5 mM, der deutlich über den physiologischen Konzentrationen liegt (MURPHY & WYATT 1965). Glykogenabbau führt demnach durch Erhöhung der Glucose-6-phosphat-Konzentration zu einer Aktivierung der Trehalogenese.

Fructose-6-phosphat wird innerhalb der Glykolyse durch die PFK, in einer unter physiologischen Bedingungen irreversiblen Reaktion, zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert. Der starke Anstieg von Fructose-1,6-bisphosphat (+750 %) nach Inkubation mit Bld HrTH deckt sich mit Ergebnissen von SEVALA & STEELE (1991) für *Periplaneta americana*. Dieser Anstieg, ebenso wie der Abfall der Konzentrationen an Dihydroxyacetonphosphat (-71 %), würde dafür sprechen, dass Bld HrTH zur Hemmung der Aldolase führt. Durch Hemmung der Aldolase würde dann deren Substrat Fructose-1,6-bisphosphat sich ansammeln. Die Konzentrationen der Produkte (Glycerinaldehyd-3-phosphat, Dihydroxyacetonphosphat) könnten dagegen fallen, sofern sie von nachfolgenden Enzymen weiter umgewandelt werden.

Die Ergebnisse meiner Arbeit scheinen, auf den ersten Blick, in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass allein die Hemmung der Aldolase und nicht der PFK die hormoninduzierte Drosselung der Glykolyse verursacht. Der Sachverhalt ist jedoch komplizierter wie folgende Überlegung zeigt. Wenn Bld HrTH nicht zur Hemmung der PFK führte, würde durch die sehr exergonische PFK-Reaktion ATP stark abfallen und Fructose-1,6-bisphosphat stark ansteigen. Fructose-1,6-bisphosphat ist Substrat für zwei Enzyme des Fettkörpers, FBPase und Aldolase, die beide durch hohe Substratkonzentrationen aktiviert würden. Gleichzeitige Aktivität von PFK und FBPase würde aber einen Substratzyklus in Gang halten, in dem Fructose-6-phosphat über

Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat plus P_i umgewandelt und ATP verbraucht wird. Diese Situation wäre sehr ungünstig, da ohne physiologischen Nutzen ATP verbraucht würde.

Die erforderliche Hemmung der PFK beruht wahrscheinlich auf den kombinierten Effekten des Abfalls von Fructose-2,6-bisphosphat und Anstiegs von Fructose-1,6-bisphosphat. Die beiden Hexosebisphosphate konkurrieren um dasselbe regulatorische Zentrum am Enzym, aber nur Fructose-2,6-bisphosphat begünstigt eine aktive Form des Enzyms. Die deaktivierende Wirkung des Abfalls von Fructose-2,6-bisphosphat wird durch den Anstieg von Fructose-1,6-bisphosphat verstärkt. Dieser Mechanismus sollte zu einer wirksamen Inhibition der PFK führen.

Über die Wirkung von Bld HrTH auf die Aktivität der Aldolase im Fettkörper ist bisher nichts bekannt. Hemmung der Aldolase würde den hohen Fructose-1,6-bisphosphat-Gehalt erklären. Es würde aber auch bedeuten, dass der Substratzyklus Fructose-6-phosphat / Fructose-1,6-bisphosphat abläuft oder dass sowohl PFK als auch FBPase gehemmt sind. Ersteres ist sehr unwahrscheinlich, und letzteres würde bedeuten, dass - entgegen der Hypothese - eben doch PFK gehemmt ist. Als zweite Konsequenz der Hemmung von Aldolase würde im hormonstimulierten Fettkörper die Gluconeogenese nach dem klassischen Schema nicht ablaufen können, da der Schritt von den Triosephosphaten zum Fructose-1,6-bisphosphat nicht möglich wäre.

Möglicherweise erfolgt die Regulation der Glykolyse recht komplex und über eine Hemmung sowohl der PFK als auch der Aldolase.

Eine alternative Erklärung für meine Befunde könnte in technischen Schwierigkeiten liegen. Der Abfall von Dihydroxyacetonphosphat (DAP) könnte durch eine rasche Umwandlung in Glycerin-3-phosphat (α -Glycerophosphat) durch Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH) verursacht sein. Die Aktivität der GDH ist vom Redoxzustand der Zelle abhängig. Glycerin-3-phosphat ist im hormonstimulierten Fettkörper höher als in Kontrollen, und dies könnte bedeuten, dass das Verhältnis $NADH+H^+/NAD^+$ im Cytosol zum reduzierten Coenzym verschoben ist. Dies wäre bei Gluconeogenese zu erwarten, da in diesem Stoffwechselweg $NADH+H^+$ benötigt wird. Eine kurze Hypoxiephase nach der Inkubation der Fettkörperloben, könnte sich in den mit Hormon inkubierten Proben stärker auswirken als in den Kontrollen und DAP zu Glycerin-3-phosphat reduzieren. Die Frage kann zur Zeit nicht abschließend beurteilt werden. Es bedarf weiterer Experimente, möglichst mit Methoden, die eine Beobachtung in unzerstörtem Gewebe zulassen wie etwa ^{13}C -NMR.

Glycerin-3-phosphat und Pyruvat sind Produkte der Glykolyse, die eine Verbindung zwischen diesem Stoffwechselweg und dem Lipidmetabolismus bzw. dem Citratzyklus bilden. Bei beiden Metaboliten kam es zu einem Konzentrationsanstieg bei Inkubation mit Bld HrTH (+93 bzw. +120 %). Grundsätzlich war der Glycerin-3-phosphat-Gehalt im Fettkörpergewebe

relativ groß im Vergleich zu den anderen gemessenen Intermediaten. Hypertrehalosämische Hormone rufen eine Steigerung der β -Oxidation der Fettsäuren hervor (WIENS & GILBERT 1965, 1967; MCDUGALL & STEELE 1988), über die Energieäquivalente für die Synthesen zur Verfügung gestellt werden. Somit könnte das Glycerin-3-phosphat nach Abbau von Triglyceriden durch Phosphorylierung des dabei freigesetzten Glycerins synthetisiert werden. Das Glycerin-3-phosphat kann durch Gluconeogenese zu Glucosephosphat umgewandelt werden und, ergänzend zum Glykogenabbau, Bausteine für die Trehalosesynthese liefern. Dies wurde bereits für *Schistocerca gregaria* (Wüstenheuschrecke) und *Locusta migratoria* (Wanderheuschrecke) gezeigt (VAN DER HORST *et al.* 1983). Eine weitere Wirkung des Konzentrationsanstiegs könnte eine Hemmung der PFK-2 sein. Diese inhibitorische Wirkung des Glycerin-3-phosphats wurde bereits für die Leber gezeigt. Hemmung der PFK-2 führt durch Verringerung der Konzentration an Fructose-2,6-bisphosphat zu einer Hemmung der Glykolyse auf der Stufe der PFK.

Ein Vergleich der Gehaltsänderungen von Pyruvat, des Produktes der Glykolyse, und von Citrat, des Eingangsintermediats des Citratzyklus, könnte Hinweise geben, ob Glykolyse und Citratzyklus koordiniert ablaufen. Die Gehalte beider Metabolite stiegen nach Inkubation mit Bld HrTH an. Ob aber zwischen den beiden eine direkte Beziehung besteht, ist nicht zu entscheiden, da die Pyruvat-Dehydrogenase aus dem Fettkörper von Insekten durch Interkonversion reguliert werden kann (ROCHE *et al.* 1980). Der Anstieg der Citratkonzentration könnte auch auf einen gesteigerten Fettabbau zurückzuführen sein, bei dem ein Teil des gebildeten Acetyl CoA in den Citratzyklus einfließt. Citrat gilt als schwacher Inhibitor der Aldolase aus der Flugmuskulatur der Wüstenheuschrecke (STOREY 1980). Jedoch wurde bisher kein inhibitorischer Effekt auf die Aldolase des Fettkörpers nachgewiesen, so dass derzeit ein Anstieg der Citratkonzentration nicht auf eine Hemmung der Aldolase schließen lässt.

4.5.2 Effekte von Bld HrTH plus Iodacetat auf den Fettkörper *in vitro*

Iodacetat wurde oft eingesetzt, um Stoffwechselwege aufzuklären. Allgemein dient es aufgrund seiner alkylierenden Wirkung der chemischen Modifikation von Thiolgruppen (SH-Gruppen). Es verbindet sich mit den Thiolgruppen von Proteinen (z.B. Cystein) zu stabilen S-Carboxymethylderivaten (s. Abb. 68). In der Proteinchemie wird es daher zur anhaltenden Trennung von Disulfidbrücken (nach Trennung der Brücken durch β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol) eingesetzt, insbesondere bei der Sequenzierung von Proteinen. Die Rückbildung der Disulfidbrücken (durch Oxidation mit O₂) ist unterbunden, da S-Alkyl-Derivate an der Luft stabil sind.

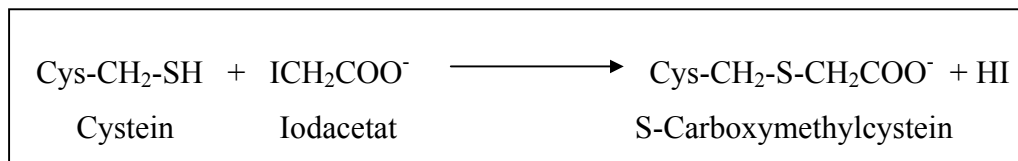


Abbildung 68: Chemische Modifikation von Verbindungen, die Thiolgruppen enthalten (z.B. Cystein), durch Iodacetat.

Des weiteren wird Iodacetat als Stoffwechsellinhibitor eingesetzt. Es kommt infolge Enzyminaktivierung zu einer Anhäufung von Stoffwechselzwischenprodukten, beispielsweise von Fructose-1,6-bisphosphat. Dies diente der Aufklärung von Reaktionen der Glykolyse in Hefeextrakten, da die Akkumulation von Fructose-1,6-bisphosphat dessen Identifizierung möglich machte. Iodacetat wirkt besonders stark auf die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Das Enzym wird durch Alkylierung mit stöchiometrischen Mengen Iodacetat unter Bildung von Carboxymethylcystein inaktiviert, da Iodacetat an eine Cystein-Sufhydrylgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms bindet.

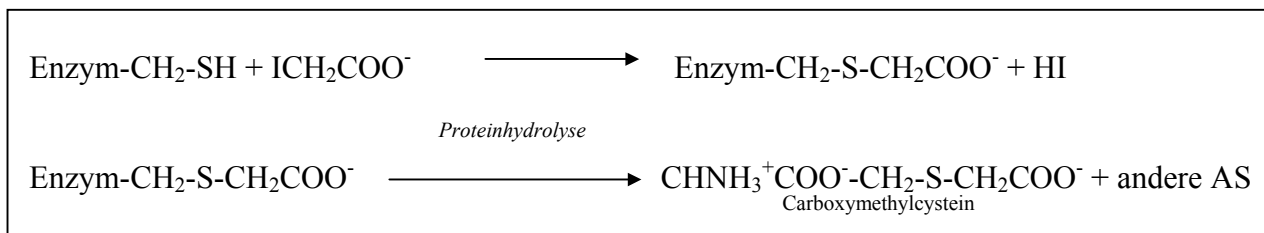


Abbildung 69: Inhibierung von Enzymen (z.B. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) durch Iodacetat.

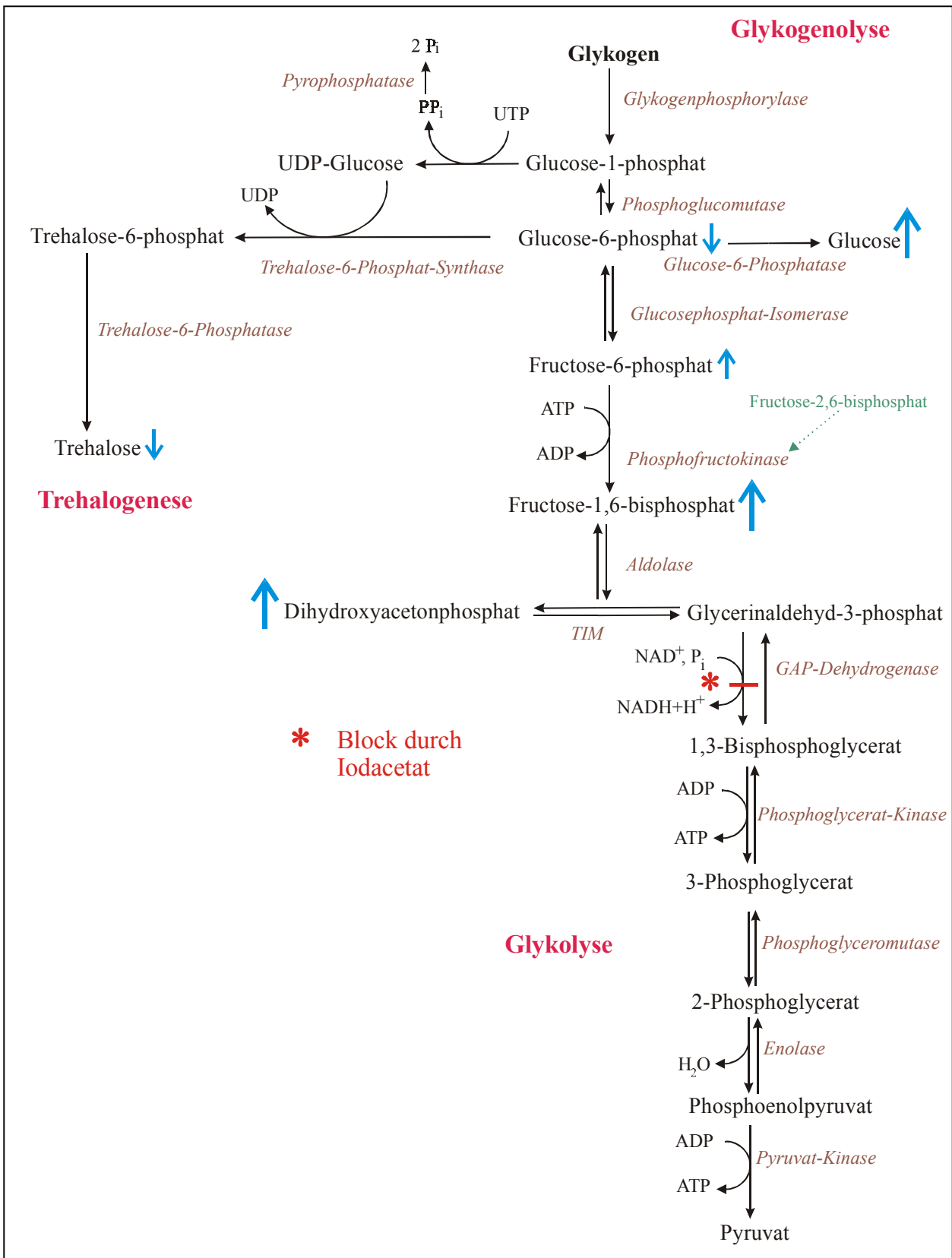


Abbildung 70: Glykogenolyse, Trehalosesynthese und Glykolyse im Fettkörper von *Blaptica dubia*. Die Änderungen der Metabolitgehalte bei Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) und Iodoacetat (1 mM), verglichen mit Inkubation mit Bld HrTH (10 nM) allein, sind mittels blauer Pfeile dargestellt.

Erwartungsgemäß verursachte Iodacetat plus Bld HrTH einen deutlichen Anstieg der Gehalte an Fructose-1,6-bisphosphat (+752 %) und Dihydroxyacetonphosphat (+584 %) im Vergleich zu den ausschließlich mit Bld HrTH (10 nM) inkubierten Kontrollen. Glucose und Fructose-6-phosphat waren ebenfalls erhöht (+385 bzw. +92 %), während die Konzentration von Glucose-6-phosphat (-67 %) ebenso wie die Trehalose-Synthese (-38 %) gegenüber den Kontrollen sank.

Die durch Iodacetat hervorgerufene Senkung der von Bld HrTH stimulierten Trehalose-Synthese könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass Gluconeogenese bei der Bereitstellung von Substraten für die Trehalogenese doch eine nicht unbedeutende Rolle spielt. Durch Hemmung des Glykolyseenzym GAPDH wird nicht nur die Glykolyse blockiert, sondern auch die Gluconeogenese, da viele der beteiligten Enzyme in beiden Stoffwechselwegen eine Rolle spielen.

Angesichts des extremen Anstiegs des Fructose-1,6-bisphosphats scheint die Umsetzung ansonsten eher auf Höhe der PFK/FBPase bzw. GAPDH blockiert zu sein. Der geringere Anstieg des Glucose-6-phosphat-Gehaltes im Vergleich zu den ausschließlich mit Bld HrTH inkubierten Kontrollen deutet darauf hin, dass trotz der Anhäufung einiger Glykolysemetabolite der Substratnachschieb für die Trehalogenese, möglicherweise über Gluconeogenese, eingeschränkt ist und somit die Konzentration der direkten Synthesevorstufen herabgesetzt ist. Allerdings ist die Wirkung des Iodacetats nicht leicht zu deuten, insbesondere da der Inhibitor nicht selektiv wirkt und daher eine ganze Reihe von Enzymen hemmen kann. Möglicherweise führt Iodacetat auch zu einer Hemmung des Fettstoffwechsels, so dass die Bereitstellung von Energieäquivalenten (ATP) gehemmt ist. Die Anhäufung von Fructose-1,6-bisphosphat könnte zu einem verstärkten Phosphatmangel führen, der insbesondere die Trehalosesynthese und die Glykogenolyse beeinträchtigt.

4.6 EINFLUSS DES ZUCKERGEHALTES IM INKUBATIONSMEDIUM AUF DIE TREHALOGENESE

Für die Homöostase der Zuckerspiegel in der Hämolymphe ist es wichtig, dass der Organismus bei Abweichungen regulierend einwirken kann. Mit der Nahrung aufgenommene Nährstoffe werden zum Teil direkt metabolisiert, zum Teil in Speicherstoffe, v.a. Lipide und Glykogen, umgewandelt. An der Regulation sind endokrine Mechanismen beteiligt. Es war daher von Interesse zu untersuchen, ob der Zuckergehalt des Inkubationsmediums die Trehalogenese von Trophocyten beeinflusst.

Glucose und insbesondere Trehalose führten in hohen Konzentrationen zu einer starken Hemmung der durch Bld HrTH (10 nM) induzierten Trehalosesynthese. Sie sank von durchschnittlich +125,8 % bei 2 mM Glucose im Inkubationsmedium auf +16,1 % bei 10 mM

Glucose, auf +40,5 % bei 2 mM Trehalose bzw. +8,2 % bei 10 mM Trehalose. Dies lässt vermuten, dass *in vivo* der Zuckergehalt der Hämolymphe die Trehalosesynthese im Fettkörper beeinflusst und dass dies konzentrationsabhängig geschieht.

Im intakten Tier sind die Verhältnisse vermutlich noch komplexer. Zum einen wirkt der Zuckergehalt in der Hämolymphe von intakten Tieren auf die Sekretion des Neuropeptids durch die *Corpora cardiaca*. Für adipokinetische Hormone konnte gezeigt werden, dass hohe Trehalose- und Glucosekonzentrationen die Freisetzung aus den *Corpora cardiaca* hemmen (VULLINGS *et al.* 1999, FLANIGAN & GÄDE 1999). Da in meinen Versuchen jedoch isolierte Fettkörper bei konstanten Hormonkonzentrationen eingesetzt wurden, ist die beobachtete Hemmung eher auf eine Wirkung auf die an der Trehalosesynthese beteiligten Enzyme, z.B. Trehalose-6-phosphat-Synthase und Trehalose-6-phosphatase, zurückzuführen.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit wäre, dass Glucose zu einer Dephosphorylierung der aktiven Glykogenphosphorylase a (GPase a) in die inaktive b-Form führt, so dass keine zusätzlichen Glucosephosphate durch Glykogenolyse für die Trehalogenese zur Verfügung gestellt werden. Entsprechende Effekte von Glucose auf die GPase a konnten an isolierten Trophocyten von *Periplaneta americana* gezeigt werden (STEELE & IRELAND 1994). Bei Vertebraten existiert ein ähnlicher Mechanismus zur Aufrechterhaltung des Blutglucosespiegels. Glucose kann an die GPase a binden, so dass die Ser-14-Phosphorylgruppe für die Phosphoprotein-Phosphatase-1 zugänglich wird. Durch Dephosphorylierung entsteht die inaktive GPase b. Entsprechend wird die GPase a auch als "Glucosesensor" der Leberzellen bezeichnet. Die Phosphoprotein-Phosphatase-1 dephosphoryliert (aktiviert) außerdem die Glykogen-Synthase, so dass überschüssige Glucose als Glykogen in der Leber gespeichert werden kann.

Bei Vertebraten kommt es bei hoher Blutglucosekonzentration (> 7 mM) außerdem zu einer Sekretion von Insulin durch die β -Zellen des Pankreas. Insulin fördert den Glucose-Transport über die Zellmembran von Muskel- und Fettzellen. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch bei *Blaptica* denkbar.

Im Fettkörper von *Periplaneta americana* wurden sowohl eine Hexokinase mit niedrigem K_m -Wert als auch eine Hexokinase mit hohem K_m -Wert (vergleichbar der Glucokinase der Säugerleber) gefunden (STOREY & BAILEY 1978b). Letztere kann bei hoher Glucosekonzentration Glucose-6-phosphat produzieren. Glucose-6-phosphat dient dann als Substrat für die Trehalogenese, kann ansonsten aber auch in Glykogen oder Lipid überführt werden. Vorausgesetzt, dass eine "Glucokinase" auch bei *Blaptica dubia* zu finden ist, könnte dies den geringeren Hemmeffekt der Glucose gegenüber Trehalose erklären. Das Vorhandensein von 2 Hexokinasen mit unterschiedlichen K_m -Werten stellt eine nützliche Anpassung an stark

variierende Substratmengen dar. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Glucokinase, anders als die Hexokinase, durch Glucose-6-phosphat nicht gehemmt wird.

Auf die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes im Fettkörper durch Bld HrTH hatte die Zuckerkonzentration im Inkubationsmedium nur geringen Einfluss. Glucose in hoher Konzentration (10 mM) verringerte leicht die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphats. Dies könnte insofern physiologisch sinnvoll sein, da im Überschuß vorhandene Glucose über die Glykolyse relativ rasch abgebaut werden kann. Da Fructose-2,6-bisphosphat der stärkste bisher bekannte Aktivator der PFK ist, würde eine verringerte Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes zu einer stärkeren Aktivierung der Glykolyse führen.

Entsprechend wäre es physiologisch sinnvoll, dass auch erhöhte Konzentrationen an Trehalose zu einer geringeren Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes führen. Ist genügend Trehalose vorhanden, um die Organe zu versorgen, verringert sich die Bedeutung der Glykolyse als Konkurrent der Trehalosesynthese um Glucosephosphate. Trehalose in hoher Konzentration (10 mM) verstärkte jedoch im Versuch sogar leicht die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes. Das hypertrehalösämische Hormon könnte in Bezug auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt einer Rückkopplungshemmung durch Glucose und insbesondere Trehalose übergeordnet sein. Sinnvoll könnte dies beispielsweise in Stresssituation sein, wenn eine anhaltende Versorgung der Organe, insbesondere der Muskulatur (→ Flucht), mit Trehalose wichtiger ist, als die Stimulation der Glykolyse im Fettkörper. Allerdings würde man unter diesen Voraussetzungen auch eine weniger deutliche Rückkopplungshemmung auf die Trehalosesynthese erwarten.

4.7 ETABLIERUNG EINER METHODE ZUR ISOLIERUNG DER TROPHOCYTEN VON *BLAPTICA DUBIA*

Experimente zur Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels im Fettkörper durch Neuropeptide wurden bislang vorrangig an isolierten Fettkörpern *in vitro* durchgeführt. Dieses Vorgehen ist sinnvoll, denn die isolierten Fettkörper bleiben mindestens 1 Stunde metabolisch aktiv (BECKER 1996) und die Inkubation in Insekten-Ringerlösung kommt den Bedingungen *in vivo* recht nahe, da Fettkörper weder innerviert noch kapillarisiert sind (offener Blutkreislauf), sondern nur von der Hämolymphe umspült werden. Versuche mit isolierten Fettkörpern haben den Vorteil, dass man das Gewebe als zwei Loben präparieren kann, von denen einer als Kontroll- der andere als Versuchslobus dient. Dies bedeutet, man vergleicht Gewebe desselben Tieres und eliminiert dadurch individuelle Unterschiede, wie sie bei verschiedenen Tieren naturgemäß auftreten. Dies bietet Vorteile bei der statistischen Analyse. Durch die Inkubation schaltet man übergeordnete Kontrollsysteme aus, die *in vivo* die Effekte des Neuropeptids oder einer Testsubstanz beeinflussen können.

Die Isolierung von Fettkörperzellen von Insekten für stoffwechselfysiologische Experimente wird erst seit den 80er Jahren stärker genutzt (PHILIPPE 1982, ASHER *et al.* 1984) und ermöglicht Untersuchungen auf der zellulären und subzellulären Ebene.

Untersuchungen an isolierten Trophocyten sind vorteilhaft verglichen mit solchen an Fettkörpern: Es sind weniger (circa halb so viele) Versuchstiere notwendig, das verwendete Zellmaterial ist homogener durch Ausschluss der Uratzellen und Mycetocyten, die anders auf Hormon (BECKER 1996) und Testsubstanzen reagieren als die Trophocyten. Die Trophocyten sind diejenigen Zellen, die hauptsächlich für die Trehalosesynthese des Fettkörpers von *Blaptica dubia* verantwortlich sind (BECKER 1996). Da man Proben aus einer Zellsuspension verwendet und nicht Fettkörper von verschiedenen Tieren, mitteln sich individuelle Unterschiede heraus (erkennbar an den vergleichsweise niedrigen S.E.M-Werten). Außerdem sind isolierte Zellen für Testsubstanzen besser zugänglich als Zellen im Gewebsverband.

Problematisch ist generell die potentielle Schädigung der Zellen, z.B. durch zur Disaggregation des Gewebes verwendete proteolytische Enzyme. Daher muss darauf geachtet werden, die Isolierung so schonend wie möglich durchzuführen. Ziel ist es, vitale und metabolisch aktive Zellen zu erhalten, die unveränderte physiologische Eigenschaften aufweisen. Im Gegensatz zu diesem Anspruch zeigte eine aus dem Fettkörpergewebe kultivierte Zelllinie (vom Autor bezeichnet als Apa-Linie=adipocytes of *Periplaneta americana*) deutlich veränderte physiologische Eigenschaften gegenüber „gewöhnlichen“ Adipocyten (PHILIPPE 1982). Physiologische Effekte synthetischer AKH (Lipidmobilisierung, Hemmung der Proteinsynthese, verstärkte Synthese von cAMP) konnten zum ersten Mal 1984 für isolierte Fettkörperzellen der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* beschrieben werden (ASHER *et al.* 1984).

Eine Methode zur Isolierung physiologisch reaktiver Fettkörperzellen aus Fettkörpern von Schaben mittels Collagenase konnte jedoch erst 10 Jahre später für *Periplaneta americana* etabliert werden (STEELE & IRELAND 1994), wobei allerdings nach Inkubation mit den hypertrehalosämischen Hormonen Pea CAH-I/-II die Menge an freigesetzter Trehalose deutlich geringer war, als bei Versuchen mit isolierten Fettkörpern. Dies spricht dafür, dass die Zellen im Verlauf der Isolierung beschädigt wurden. Zudem konnten wir die Methode von STEELE und IRELAND nicht erfolgreich auf *Blaptica dubia* übertragen. Die mittels Collagenase aus *Blaptica*-Fettkörpern isolierten Zellen reagierten auf Inkubation mit Bld HrTH nicht mit verstärkter Trehalogenese. Außerdem war die Anzahl isolierbarer Trophocyten gering (113.480 ± 10.418 Trophocyten/Tier ($n=5$), BECKER 1996). Das Ausbleiben einer verstärkten Trehalogenese ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Collagenase die Hormonrezeptoren der Zellmembran bzw. das Hormon angreift oder dass es durch Schädigung der Zellmembran zu

einem unkontrollierten Ca^{2+} -Einstrom kommt (siehe unten). Im Gegensatz zu der von uns entwickelten Methode wurden die Zellen direkt nach der Präparation für die Inkubation eingesetzt und keine Ruhephase zwischengeschaltet, in der sich die Zellen von der Isolierung erholen konnten.

Bessere Ergebnisse wurden mit einer für den Fettkörper von *Locusta migratoria* entwickelten Separierungsmethode erzielt (LEE & GOLDSWORTHY 1995). Bei den nach dieser Methode unter Verwendung von α -Chymotrypsin und anschließend des Trypsininhibitors aus Sojabohnen (SBTI) isolierten Zellen war die Zellausbeute um 132 % höher (263.210 ± 21.222 Trophocyten/Tier ($n=5$), BECKER 1996) im Vergleich zur Isolierung mit Collagenase. Außerdem reagierten die Trophocyten auf Bld HrTH mit verstärkter Trehaloseproduktion. Allerdings betrug die Steigerung durchschnittlich nur 61,5 %, gegenüber 130 % bei inkubierten Fettkörpern (BECKER 1996). Zudem war keine signifikante Verringerung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes festzustellen, die bei Fettkörpern deutlich war. Der ausbleibende Effekt auf Fructose-2,6-bisphosphat ist wahrscheinlich mitverantwortlich für die schwächere Aktivierung der Trehalogenese durch das Neuropeptid. Da die Glykolyse nicht durch Verringerung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes deaktiviert wird, könnte ein größerer Teil der Glucosephosphate aus dem Glykogenabbau oxidativ abgebaut werden, anstatt in die Trehalosesynthese einzufließen. Zudem wirkt Fructose-2,6-bisphosphat noch als Inhibitor der FBPase, einem Schlüsselenzym der Gluconeogenese. Das bedeutet, dass die Gluconeogenese und somit eine Bereitstellung von Trehalosebausteinen aus Nicht-Kohlenhydratvorstufen beeinträchtigt werden könnte.

Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 zeigten dann, dass während der Separierung Ca^{2+} aus dem Inkubationsmedium (Insekten-Ringerlösung mit 2 mM Ca^{2+}) in die Trophocyten einströmt (BECKER 1996). Da Ca^{2+} -Einstrom den Abfall des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes auslöst, ist der Misserfolg verständlich.

Ich habe das Verfahren nach LEE & GOLDSWORTHY (1995) für *Blaptica dubia* modifiziert, um den unkontrollierten Ca^{2+} -Einstrom während der Zellisolierung zu unterbinden. Dazu wurden verschiedene Parameter variiert. Es zeigte sich, dass Isolierung und eine anschließende einstündige Ruhephase in Ca^{2+} -freiem Medium mit späterem Suspendieren der isolierten Zellen in Ca^{2+} -haltiger Ringerlösung, den Ca^{2+} -Einstrom vermeidet. Außerdem muss die Isolierung so schonend wie möglich erfolgen, um Zellschäden zu vermeiden. Daher wurden Zentrifugationszeiten, -geschwindigkeiten, Aufziehen und Ablassen der Zellsuspension minimiert, ohne gleichzeitig die Zellausbeute zu vermindern.

Tatsächlich reagierten die nach dieser Methode isolierten Trophocyten auf Bld HrTH mit einer deutlichen Erhöhung der Trehalosesynthese (maximal +133,7 %) und einer signifikanten

Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes (-30,2 %). 90-98 % der isolierten Zellen waren nicht permeabel für Trypanblau und können daher als vital angesehen werden. Die Zellausbeute war mit 321.227 ± 29.171 Trophocyten/Tier ($n=11$) um 183 % höher im Vergleich zur Isolierung mit Collagenase nach STEELE und um 22 % höher im Vergleich zu der von BECKER durchgeführten Isolierung mit α -Chymotrypsin und SBTI nach LEE & GOLDSWORTHY.

In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, dass bei einigen Insekten, z.B. aus der Unterordnung *Aleyrodina* (Mottenläuse/Mottenschildläuse/Weiße Fliegen; Ordnung: Homoptera/ Gleichflügler/Pflanzensauger), Adipocyten auftreten, die frei in der Hämolymphe zirkulieren. Die *Aleyrodina* umfassen circa 200 Arten (davon 15 einheimische), die insbesondere in den Tropen beheimatet sind (DETTNER & PETERS 1999). Es handelt sich um sehr kleine (1-3 mm) Insekten, die mit weißem Wachs bestäubt sind. Die Tiere sind Phloemsauger und haben Bedeutung als Pflanzenschädlinge, da sie große Mengen Honigtau absondern und Pflanzenviren übertragen können (HEITLAND 2001).

Mit dem neuen Verfahren zur Isolierung von Trophocyten war es erstmals möglich hormoninduzierte Stoffwechseleffekte bei *Blaptica dubia* auf zellulärem Niveau zu untersuchen. Zunächst wurden einige der zentralen Untersuchungen zur Signaltransduktion von Bld HrTH, die zuvor an Fettkörpern durchgeführt worden waren, wiederholt. Auf diese Weise sollte das Separierungsverfahren getestet werden. Da sich das Verfahren bewährte, konnten weiterführende Untersuchungen zur Signaltransduktion von Bld HrTH angeschlossen werden.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve für Bld HrTH zeigte die Konzentrationsabhängigkeit der Neuropeptidwirkung. Eine maximale Steigerung der Trehalogenese wurde ab etwa 10 nM Bld HrTH erreicht. Im Gegensatz zu den von uns nach anderen Methoden isolierten Trophocyten lag der Maximalwert ($+133,7 \pm 1,4$ %) in den Bereichen, wie sie auch mit isolierten Fettkörpern erzielt wurden ($+130,0 \pm 44,9$ %; BECKER 1996) bei deutlich geringerem S.E.M.-Wert. Während die nach LEE & GOLDSWORTHY isolierten Trophocyten keine signifikante Veränderung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes gezeigt hatten ($-11,6 \pm 14,3$ %, BECKER 1996), war mit den nach der neuen Methode isolierten Zellen eine deutliche Fructose-2,6-bisphosphat-Abnahme zu verzeichnen. Allerdings wurde der Maximalwert ($-30,2 \pm 1,0$ %) erst ab einer Konzentration von 70 nM Hormon erreicht (isolierte Fettkörper: $-36,6 \pm 3,7$ % bei 10 nM Bld HrTH, BECKER 1996). Dies könnte dafür sprechen, dass der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt erst auf höhere Hormonkonzentrationen anspricht. Entsprechend käme es zu einer „gestaffelten“ Reaktion von Trehalosesynthese bzw. Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt auf Bld HrTH: Während die Trehalosesynthese bereits durch niedrige Hormonkonzentrationen stimuliert wird, kommt es erst bei höheren Konzentrationen zu einer Abnahme von Fructose-2,6-bisphosphat in den

Fettkörperzellen, um bei zunehmendem und/oder anhaltendem Trehalosemangel die Glykolyse zu hemmen und der Trehalogenese vermehrt Glucosebausteine zukommen zu lassen.

Isolierte Trophocyten von *Blaptica dubia* liefern damit ein brauchbares „Modell“, an dem man die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels durch Neuropeptide und insbesondere die Signaltransduktion studieren kann.

4.8 SIGNALTRANSDUKTION DES NEUROPEPTIDS BLD HRTH

Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen über hypertrehalosämische Hormone von Insekten richtet sich momentan auf die Mechanismen der Signaltransduktion. Bislang liegen noch wenige gesicherte Erkenntnisse auf diesem Gebiet vor, und die beteiligten Botenstoffe sind zum Teil noch nicht identifiziert - zumal es Hinweise gibt, dass die Signaltransduktion auch innerhalb der Familie der hypertrehalosämischen Hormone variiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals mit isolierten Trophocyten von *Blaptica dubia* die Rolle von extra- und intrazellulärem Ca^{2+} und anderen potentiellen Signalsubstanzen untersucht, darunter IP_3 , Diacylglycerin, Stickstoffmonoxid (NO), cGMP, Octopamin und cAMP.

4.8.1 Bedeutung von Ca^{2+}

Viele biologische Prozesse werden durch intrazelluläres Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) gesteuert. Auch bei der Signaltransduktion von Bld HrTH spielen Ca^{2+} -Ionen offenbar eine zentrale Rolle (MCCLURE & STEELE 1981, ORR *et al.* 1985, STEELE & PAUL 1985, LIEWALD 1997, BECKER *et al.* 1998). Unter anderem konnte bei *Periplaneta americana* gezeigt werden, dass der durch CC-Extrakt hervorgerufene Trehalose-Efflux des Fettkörpers bei Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen im Medium deutlich verringert ist (STEELE & PAUL 1985) und dass der CC-Extrakt bei Anwesenheit von Ca^{2+} im Medium zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom führt. Auch für den Fettkörper von *Blaberus discoidalis* konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von synthetisch hergestelltem Bld HrTH auf die Trehalogenese von extrazellulärem Ca^{2+} abhängt (KEELEY & HESSON 1995). Testsubstanzen, die zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führen, riefen eine signifikante Steigerung der Trehalosesynthese (+72 %) hervor (KEELEY & HESSON 1995), so dass die Autoren insbesondere auf die Bedeutung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern für die Bld HrTH-Wirkung schlossen. Meine Ergebnisse an isolierten Trophocyten von *Blaptica dubia* belegen die Bedeutung von extra- und intrazellulärem Ca^{2+} für die Signaltransduktion des Neuropeptids Bld HrTH.

4.8.1.1. Extrazelluläres Ca^{2+}

Einfluss verschiedener Ionen

Die Inkubation von Fettkörpern und Trophocyten mit Bld HrTH in Insekten-Ringerlösungen mit unterschiedlicher Ionenzusammensetzung zeigte die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bld HrTH-Wirkung (KEELEY & HESON 1995, LIEWALD 1997) erstmals auch für isolierte Trophocyten von *Blaptica dubia*. In Ca^{2+} -freiem Medium wurde die Trehalogenese weniger stark durch Bld HrTH stimuliert (+85,2 %), als in physiologischer Insekten-Ringerlösung (mit 2 mM CaCl_2).

Andere divalente Ionen wie Mn^{2+} oder Mg^{2+} waren nicht in der Lage, Ca^{2+} vollständig zu ersetzen. Die Trehalosesynthese lag etwas höher als in Ca^{2+} -freier Ringerlösung ohne zusätzliche Ionen, wobei allerdings beachtet werden muss, dass die Mn^{2+} -/ Mg^{2+} -Ringerlösungen nicht den Chelator EGTA enthielten (der unspezifisch ist und daher auch andere divalente Ionen als Ca^{2+} binden würde), also nicht vollkommen Ca^{2+} -frei waren.

Noch deutlicher waren Abhängigkeit von extrazellulärem Ca^{2+} und Ionenspezifität in Bezug auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt. In Ca^{2+} -freiem Medium war die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes nur noch etwa halb so groß (-11,5 % gegenüber -29,4 %). Mn^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen waren nicht in der Lage, Ca^{2+} zu ersetzen. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass insbesondere extrazelluläres Ca^{2+} für die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes in den Fettkörperzellen von Bedeutung ist. Gemäß dieser These ist der verringerte stimulatorische Effekt des Neuropeptids auf die Trehalogenese bei Fehlen extrazellulären Calciums zumindest teilweise ein indirekter Effekt. Da der Gehalt des glykolytischen Aktivators Fructose-2,6-bisphosphat in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} durch das Neuropeptid kaum verringert werden kann, wird auch die Inaktivierung der PFK und damit die Hemmung der Glykolyse vermindert, so dass eine verstärkte Konkurrenz von Glykolyse und Trehalogenese um Bausteine (Glucosephosphate) zu erwarten ist.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Neuropeptidwirkung nicht nur ladungs-, sondern auch ionenspezifisch ist, was wiederum für die Beteiligung Calciumspezifischer Rezeptoren spricht. Mn^{2+} -Ionen waren besser als Mg^{2+} -Ionen in der Lage, die Ca^{2+} -Effekte zu imitieren. Dies hängt möglicherweise mit den Ionenradien zusammen, die bei Ca^{2+} und Mn^{2+} ähnlicher sind als bei Ca^{2+} und Mg^{2+} .

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Lanthan-Ionen den Ca^{2+} -Effekt schwächen. In vielen biologischen Systemen können die Effekte von Ca^{2+} durch La^{3+} aufgehoben werden. Zwar ist La^{3+} selbst nicht in der Lage, Zellmembranen zu passieren, jedoch verdrängt es Ca^{2+} von der Membran und vermindert deren Ca^{2+} -Permeabilität. Diese Fähigkeit hängt mit der dreifach

positiven Ladung und dem großen Ionenradius zusammen. La^{3+} wirkt als Blocker nicht-selektiver Kationenkanäle sowie als Inhibitor von Ca^{2+} -Pumpen in der Zellmembran (MORLEY & WHITFIELD 1993, HEPLER 1992) und kann daher den Ca^{2+} -Transport durch Plasmamembranen blockieren.

Tatsächlich wurde die durch Bld HrTH induzierte Trehalogenese isolierter Fettkörper von *Blaptica dubia* durch La^{3+} um fast 70 % vermindert. Ebenso wurde die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes fast vollständig unterbunden. Dies steht im Einklang mit unserer Beobachtung, dass der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} für den Abfall des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes von Bedeutung ist. Auch bei Abwesenheit des Neuropeptids wurde die Trehalogenese durch La^{3+} herabgesetzt (-35,7 %). Dies lässt darauf schließen, dass Ca^{2+} auch zur Aufrechterhaltung der basalen Trehalose-Synthese von Bedeutung ist. Überraschend war die deutliche Steigerung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes bei Inkubation in einer Insekten-Ringerlösung, die La^{3+} - jedoch keine Ca^{2+} -Ionen und kein Bld HrTH enthielt. Vermutlich wird durch Blockierung des Ca^{2+} -Influges die Steuerung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes gestört. Diese interessante Beobachtung sollte an Einzelzellen mikroskopisch untersucht werden.

Bei Experimenten mit isolierten Trophocyten war in Anwesenheit von Ca^{2+} - plus La^{3+} -Ionen die Trehalosesynthese signifikant ($p > 0,05$) stärker gesteigert als bei alleiniger Anwesenheit von Ca^{2+} (+292,3 % gegenüber +133,7 %). Dieser Befund ist nicht leicht zu erklären. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die Blockierung des Influxes von extrazellulärem Ca^{2+} durch verstärkten Efflux aus intrazellulären Speichern kompensiert wird, was wiederum die Trehalosesynthese stimulieren würde. In Übereinstimmung mit Versuchen an isolierten Fettkörpern war unter diesen Versuchsbedingungen keine signifikante Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes durch Bld HrTH zu verzeichnen.

Insgesamt unterstreichen die Versuche die Bedeutung von Ca^{2+} -Ionen für die Signaltransduktion hypertrehalosämischer Hormone und lassen darauf schließen, dass dem Ca^{2+} bei der Signaltransduktion eine zentrale Rolle zukommt.

Ca²⁺-Ionophor A 23187

Der Ca^{2+} -Ionophor A23187 (Calcimycin) ermöglicht die Translokation von divalenten Ionen über die Plasmamembran und weist eine relativ hohe Spezifität für Ca^{2+} auf (REED & LARDY 1972).

Die basale Trehalosefreisetzung isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia* wurde durch A23187 nicht signifikant verändert (+6,8 %). Bei gemeinsamer Inkubation mit Bld HrTH war die Steigerung +71,0 %, was unter dem Wert liegt, der bei alleiniger Inkubation mit dem Neuropeptid erreicht wird. Demnach scheint der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} für die Trehalogenese

nicht von primärer Bedeutung, sondern A23187 sogar eher die durch Bld HrTH induzierte Trehalosesynthese zu hemmen. Hingegen führte der Ca^{2+} -Ionophor zu einer Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes, allerdings lag die Senkung mit -18,3 % unter dem mit Bld HrTH erzielten Maximaleffekt (-30,2 %) und war nicht signifikant. Das hypertrehalosämische Hormon ist demnach deutlich effektiver. Der Maximaleffekt wurde durch gemeinsame Inkubation mit Bld HrTH und A23187 leicht gesteigert (-44,9 %), was andeuten könnte, dass der Effekt des Ionophors sich zumindest teilweise additiv zum Effekt des Neuropeptids verhält.

Inkubation von Trophocyten mit Octopamin (10^{-4} M) plus A23187 führte zu einer leichten Steigerung der Trehalosesynthese (+41,7 %), die dem Ergebnis entspricht, das bei alleiniger Inkubation mit Octopamin erreicht wurde (+39,8 %). Zudem wurde Fructose-2,6-bisphosphat verringert (-23,6 %), aber nicht stärker als bei alleiniger Inkubation mit A23187. Dies lässt darauf schließen, dass Octopamin und A23187 keine synergistischen Effekte aufweisen. Da Octopamin in Einzelversuchen keine signifikante Wirkung auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt ausübte, während der Ca^{2+} -Ionophor nur auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt deutliche Wirkungen aufwies, scheint der Effekt auf Fructose-2,6-bisphosphat durch A23187 hervorgerufen zu werden, der Effekt auf die Trehalosefreisetzung hingegen durch Octopamin. Gemeinsam produzieren diese beiden Substanzen Effekte, die tendenziell denen von Bld HrTH entsprechen.

Mit isolierten Fettkörpern wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (LIEWALD 1997). Der Ca^{2+} -Ionophor A23187 imitiert teilweise den Neuropeptideffekt. Allerdings wurde kein synergistischer Effekt von Bld HrTH und A23187 auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt festgestellt.

Vermutlich ist für die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes nicht ausschließlich der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} von Bedeutung, sondern es spielen, wie bei vielen Signalwegen, mehrere Faktoren eine Rolle, die sich wechselseitig beeinflussen. Dennoch scheint die zentrale Rolle des extrazellulären Ca^{2+} klar, da der Hormoneffekt durch zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom mittels A23187 noch gesteigert werden konnte.

4.8.1.2. Intrazelluläres Ca^{2+}

Thimerosal

Thimerosal fördert den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum. Es ruft diesen Effekt durch Sensitivierung des Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptors (IP_3R) des ER für IP_3 hervor (BOOTMAN *et al.* 1982). Thimerosal stimulierte bei isolierten Trophocyten die Trehalosesynthese (+119,7 %) fast so gut wie das Hormon, was dafür spricht, dass Ca^{2+} -Efflux aus intrazellulären Speichern die hormoninduzierte Steigerung der Trehalosesynthese auslöst. Dass extrazelluläres Ca^{2+} in diesem Zusammenhang nur eine untergeordnete Rolle spielt, wurde dadurch deutlich, dass der Effekt in Ca^{2+} -freiem Medium kaum niedriger lag (+109,2 %).

Dem Hormon entgegengesetzt wirkte Thimerosal auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt der Trophocyten, den es hoch signifikant steigerte (+136,9 %). Dieser Effekt war bereits bei isolierten Fettkörpern beobachtet worden, fiel hier allerdings niedriger aus (+31,4 %, LIEWALD 1997, BECKER *et al.* 1998). Der Befund ist unerwartet und nicht leicht zu deuten, gleichwohl aber interessant, da Thimerosal zwei durch das Hormon koordinierte Effekte voneinander dissoziiert. Offenbar reagieren zudem die isolierten Trophocyten sensibler als die Fettkörperloben auf Thimerosal, so dass an ihnen die Effekte von Thimerosal gut weiter untersucht werden können. Vielleicht kann so der Signalweg aufgeklärt werden, durch den Thimerosal den Gehalt an Fructose-2,6-bisphosphat in Trophocyten erhöht.

Dantrolen

Dantrolen hemmt den Ca^{2+} -Efflux aus intrazellulären Speichern wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (OHTA *et al.* 1990). Es verminderte den Neuropeptideffekt auf die Trehalosesynthese deutlich (auf +72,4 % im Vergleich zu Kontrollzellen mit +126,7 %), hatte aber auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt keinen Effekt. Auch dieses Ergebnis unterstützt die These, dass Efflux von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern essentiell zur Stimulierung der Trehalosesynthese ist, jedoch nur geringen Anteil an der Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass meine Experimente deutlich machen, dass Ca^{2+} bei der Signaltransduktion von Bld HrTH in Trophocyten von *Blaptica dubia* eine bedeutende Rolle spielt und als second oder third messenger fungiert. Für die Hormonwirkung scheint Ca^{2+} essentiell zu sein. Hierin unterscheidet es sich vom Vertebratenhormon Glukagon. Glukagon ähnelt in vielen Aspekten den hypertrehalosämischen Hormonen (s. 4.2), seine Wirkung ist jedoch hauptsächlich von cAMP und nur wenig von Ca^{2+} abhängig.

Allerdings muss bei Bld HrTH zwischen Ca^{2+} aus verschiedenen Quellen unterschieden werden, da die Effekte des Neuropeptids auf Trehalogenese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt sich in verschiedenem Umfang von extra- bzw. intrazellulärem Ca^{2+} abhängig erwiesen. Testsubstanzen, welche die beiden Ca^{2+} -Speicher unabhängig voneinander beeinflussen (A23187, Thimerosal, Dantrolen), waren in der Lage Teile der Neuropeptidwirkung zu produzieren, wobei extra- bzw. intrazellulärem Ca^{2+} unterschiedliche Funktionen (Glykogenolyse, Trehalosesynthese, Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt) zukommen, die sich allerdings wechselseitig beeinflussen. Nach neueren Untersuchungen beeinflussen sich extra- und intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher gegenseitig ("capacitative calcium entry", BERRIDGE 1995, 1997;

"store operated Ca^{2+} -influx", LÜCKHOFF 1998). Es wird davon ausgegangen, dass in vielen Zellen der Calcium-Influx durch die Ca^{2+} -Konzentration in intrazellulären Speichern moduliert werden kann. Zudem scheint der kapazitative Calcium-Einstrom durch eine Vielzahl von Stimuli, physiologische und pharmakologische Agonisten, beeinflusst zu werden. Hierzu zählen insbesondere Testsubstanzen, die Ca^{2+} mobilisieren wie IP_3 , A23187, Thimerosal und Thapsigargin. Dementsprechend können mit solchen Testsubstanzen extra- und intrazelluläre Speicher nicht vollständig voneinander getrennt werden.

Der Efflux von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern scheint besonders für die hormoninduzierte Trehalogenese von Bedeutung zu sein. Substanzen, welche Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mobilisieren, hatten dagegen nur geringen Einfluss auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt. Auf der anderen Seite war extrazelluläres Ca^{2+} notwendig zum Erreichen der maximalen Trehalosesynthese über Bld HrTH, essentiell war es jedoch für die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes. Dies setzt voraus, dass in Trophocyten extra- und intrazelluläres Ca^{2+} verschiedene Stoffwechselprozesse steuert und hat zur Folge, dass Bld HrTH diese Stoffwechselprozesse integriert.

4.8.2 Bedeutung von IP_3 und Diacylglycerin

Die Bedeutung von Ca^{2+} für die Signaltransduktion von Bld HrTH führt zur Frage nach Signalsubstanzen, die zwischen dem Neuropeptidrezeptor und den Ca^{2+} -Speichern vermitteln. Hier ist an den Phosphoinositid-Signalweg mit den second messengern IP_3 und Diacylglycerin zu denken.

Diese Signalkaskade wurde in den Speicheldrüsen von Insekten nachgewiesen (BERRIDGE *et al.* 1983). Ebenso konnte die Beteiligung von IP_3 an der Signaltransduktion von Insekten-Neuropeptiden gezeigt werden. Sowohl die Effekte von Proctolin bei *Locusta migratoria* (wirkt myostimulatorisch und ruft Muskelstreckung hervor) als auch von CAH bei *Manduca sexta* (erhöht den Herzschlag) gehen mit einer Erhöhung des IP_3 -Gehaltes einher (WORDEN & O'SHEA 1985, TUBLITZ & TROMBLEY 1987). Für Proctolin geht man davon aus, dass die Signaltransduktion im Muskel über Aktivierung der Phospholipase C zur Produktion von IP_3 und DAG führt (MAZZOCCO-MANNEVAL *et al.* 1998). Ebenso wie Bld HrTH ist Proctolin abhängig von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen (HINTON 1998; gezeigt für *Schistocerca gregaria*) und führt zu einem Ca^{2+} -Influx (DUNBAR & HUDDERT 1982).

Erste Befunde, die für eine konzentrationsabhängige Stimulierung der IP_3 -Synthese durch Neuropeptide und die Funktion des IP_3 als second messenger auch im Fettkörper sprechen, liegen für die adipokinetischen Hormone von *Locusta migratoria* (VROEMEN *et al.* 1997) sowie das hypertrehalosämische Hormon von *Blaberus discoidalis* (PARK & KEELEY 1996) vor. Allerdings

wurden diese Arbeiten an isolierten Fettkörpern und nicht an isolierten Trophocyten durchgeführt. Isolierte Fettkörperzellen eignen sich, insbesondere in Bezug auf Zeitverläufe und Interaktionen, besser als isolierte Fettkörper, um Beziehungen zwischen IP_3 und Ca^{2+} -Speichern eingehend zu untersuchen.

Auch an der durch Bld HrTH hervorgerufenen Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Trophocyten von *Blaptica dubia* scheinen nach meinen Versuchsergebnissen IP_3 (und Diacylglycerin) beteiligt zu sein. Für diese Annahme spricht, dass Thimerosal, welches durch Sensitivierung des IP_3 -Rezeptors des ER für IP_3 einen Ca^{2+} -Efflux ins Cytosol hervorruft (BOOTMAN *et al.* 1982), isolierte Trophocyten zur Trehalosesynthese stimuliert.

ET-18- OCH_3 (s. Abb. 71) ist ein starker und hoch-selektiver Inhibitor der Phosphatidylspezifischen Phospholipase C (PI-PLC; IC_{50} -Wert: 15 μM), der andere Phospholipasen (z.B. Phosphatidylcholin-spezifische PLC, PLD) nicht hemmt (POWIS *et al.* 1992; gezeigt für Swiss 3T3 Fibroblasten und BG1 Adenokarzinomzellen des Ovars).

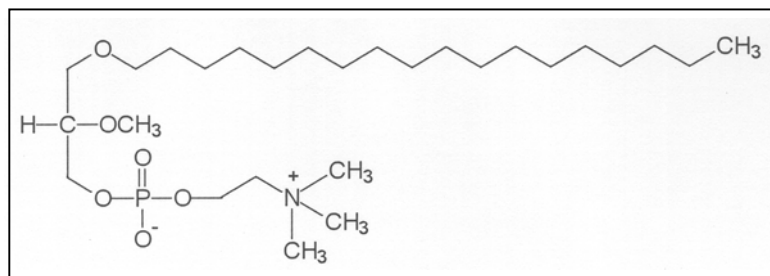


Abbildung 71: Strukturformel von ET-18- OCH_3 (1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholin, $\text{C}_{27}\text{H}_{58}\text{NO}_6\text{P}$), einem Phospholipase C-Inhibitor.

Die Phospholipase C ist eine membrangebundene Phosphodiesterase, die das Phospholipid Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in die sekundären Botenstoffe IP_3 und Diacylglycerin spaltet. Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle innerhalb der Phosphoinositolkaskade (IP_3 -Kaskade), die zur Signalübermittlung bei einer ganzen Reihe von Hormonen dient, die über spezifische Rezeptoren und G-Proteine auf das Enzym wirken - beispielsweise Adrenalin (α_1 -Rezeptoren), Histamin, Acetylcholin und Serotonin. Hemmung der Phospholipase C durch ET-18- OCH_3 führt dementsprechend zu einer Hemmung der IP_3 -Synthese.

ET-18- OCH_3 hemmte die hormoninduzierte Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia*. Ebenso war eine geringere Absenkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes zu beobachten. Demnach scheint der Inhibitor in die Signaltransduktion des Neuropeptides einzugreifen, indem die Spaltung von PIP_2 und damit die Synthese der second messenger IP_3 und Diacylglycerin vermindert wird. Dies spricht dafür, dass IP_3 und/oder Diacylglycerin an der Übermittlung des Neuropeptidsignals beteiligt sind, indem sie zwischen Hormon und Ca^{2+} -

Speichern vermitteln, und es deutet auf eine IP₃-Kaskade hin. Bei Swiss 3T3 Fibroblasten inhibiert ET-18-OCH₃ den IP₃-induzierten Ca²⁺-Efflux (SEEWALD *et al.* 1990). Dementsprechend würde ET-18-OCH₃ durch Hemmung der IP₃-Synthese den Ca²⁺-Efflux aus intrazellulären Speichern verhindern, welcher wiederum zur maximalen Aktivierung der Trehalogenese notwendig ist.

Im Einklang mit dieser Hypothese konnte bei isolierten Fettkörpern von *Blaberus discoidalis* ein konzentrationsabhängiger Anstieg (2- bis 3-fach) des IP₃-Gehaltes innerhalb von 2 Minuten nach Inkubation mit Bld HrTH gezeigt werden (PARK & KEELEY 1996). Ebenso führten AKH-II und -III im Fettkörper von *Locusta migratoria* innerhalb von 1 Minute zu einer Steigerung des IP₃-Gehaltes (VROEMEN *et al.* 1997). Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass AKHs auch zu einer Erhöhung des cAMP-Gehaltes führen, während cAMP bei hypertrehalosämischen Hormonen (Pea CAH-I, -II, Bld HrTH) nach bisherigen Erkenntnissen keine Rolle spielt (ORR *et al.* 1985, BECKER 1996).

IP₃ selbst ist nicht membrangängig. Versuche, die Trophocyten von *Blaptica dubia* mit Saponin zu permeabilisieren brachten keinen Erfolg, da die Zellmembranen durch Saponin zu stark geschädigt wurden.

Die Beteiligung von Diacylglycerin an der Signaltransduktion von Bld HrTH wurde mit dem Phorbolster (4β-Phorbolster-12β,13α-Dibutyrat, PDB) geprüft. Phorbolster imitieren das Signalmolekül Diacylglycerin und aktivieren langanhaltend die Proteinkinase C. Bei isolierten Trophocyten führte der Phorbolster zu einer deutlichen Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes (-24,3 %) - fast so wie Bld HrTH (-30,2 %). Dies deutet darauf hin, dass auch Diacylglycerin am Signalweg von Bld HrTH beteiligt ist und zwar an der Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes. Aktivierung der Proteinkinase C über Diacylglycerin könnte zu einer Phosphorylierung der FB Pase-2 und somit zu einer Aktivierung der FB Pase-2 führen, so dass Fructose-2,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat hydrolysiert wird. Außerdem könnte Proteinkinase C die GPase-Kinase aktivieren und somit die Glykogenolyse stimulieren.

Insgesamt sprechen die Berichte in der Literatur und meine Ergebnisse dafür, dass an der Signaltransduktion des Bld HrTH im Fettkörpergewebe eine Phosphoinositidkaskade beteiligt ist. Durch Bindung von Bld HrTH an seinen membranständigen Rezeptor wird, vermutlich über ein stimulierendes G-Protein, eine Phospholipase C aktiviert. Das Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und den wasserlöslichen Botenstoff IP₃ und schaltet somit eine IP₃/DAG-Transduktionskaskade an. Durch Bindung des IP₃ an einen IP₃-Rezeptor/Ca-Kanal kann eine Ca²⁺-Mobilisierung und ein rascher, zeitlich

begrenzter Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ erreicht werden. Dies wiederum stimuliert die Trehalogenese, wobei allerdings wenig darüber bekannt ist, wie die Aktivitäten der Zielenzyme moduliert werden. DAG auf der anderen Seite kann an Proteinkinase C binden und führt eine Konformationsänderung herbei, die eine erhöhte Ca^{2+} -Affinität des Enzyms hervorruft. Nach Ca^{2+} -Bindung geht Proteinkinase C in eine vollständig aktive Form über und überträgt unter ATP-Verbrauch ein Phosphat auf Serin- oder Threonin-Gruppen bestimmter Proteine. Potentielle Zielenzyme sind allerdings bisher nicht identifiziert.

Der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} und die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes könnte ebenfalls durch Botenstoffe der IP_3 /DAG-Transduktionskaskade hervorgerufen werden (z.B. G-Proteine, IP_3 oder von IP_3 abgeleitete Botenstoffe, erhöhte $[Ca^{2+}]_i$; LÜCKHOFF 1998). Für diese Hypothese spricht, dass der Phospholipase C-Inhibitor ET-18-OCH₃ bei gemeinsamer Inkubation mit dem Hormon in den Trophocyten neben einer Hemmung der Trehalosesynthese auch zu einer weniger starken Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes führte (-14,9 % verglichen mit -30,2 % bei alleiniger Inkubation mit Bld HrTH).

Außerdem könnte der Ca^{2+} -Influx über einen separaten Signalweg oder durch Interaktion der intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Speicher gesteuert werden. Laut neueren Studien löst allgemein bei nicht-erregbaren Zellen die Leerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum aus. Man bezeichnet dieses Phänomen als kapazitiven Ca^{2+} -Eintritt („capacitative calcium-entry“, BERRIDGE 1995, 1997) oder auch speicherabhängigen Ca^{2+} -Influx („store-operated Ca^{2+} -influx“, LÜCKHOFF 1998). Das quantitative Ausmaß des Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum kann hierbei vom Füllungszustand der intrazellulären Speicher abhängig sein. Details zum Ca^{2+} -Influx, insbesondere über die molekulare Struktur der beteiligten Ca^{2+} -Kanäle sowie ihre Aktivierung, sind bislang noch wenig bekannt und daher Ziel intensiver Forschungsarbeit.

Gegenwärtig konzentriert man sich auf 2 Mechanismen, wie die Leerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher den Ca^{2+} -Influx hervorrufen könnte: Zum einen könnte die Speicherleerung zur Freisetzung eines chemischen Signals führen (RANDRIAMAMPITA & TSIEN 1993), welches spannungsunabhängige, Ca^{2+} -spezifische Kanäle (SOC = „store operated channels“) in der Zellmembran aktiviert. Ein chemisches Signal, das den Influx auslöst („calcium influx factor“) konnte jedoch trotz mehrjähriger Forschungen bisher nicht identifiziert werden. Man geht davon aus, dass es kleinmolekular (< 1 kD), kein Peptid und Substrat einer Phosphorylierungsreaktion ist. Alternativ könnten die Ca^{2+} -Kanäle der Zellmembran über direkten Kontakt mit Proteinen in der Membran der Ca^{2+} -Speicher reguliert werden (RANDRIAMAMPITA & TSIEN 1993). Diese Proteine würden durch die Ca^{2+} -Konzentration im Speicher reguliert.

4.8.3 Bedeutung von NO

Stickstoffmonoxid (NO), früher hauptsächlich als Schadstoff aus Auto- und Industrieabgasen bekannt, entpuppte sich in den letzten Jahren als ein wichtiges Signalmolekül im Gefäß- und Nervensystem von Säugern und als potenter Regulator verschiedener Körperfunktionen (MONCADA 1991). 1992 wurde es vom Wissenschaftsmagazin Science zum "Molekül des Jahres" gewählt.

Bedeutsam sind seine geringe Größe (es ist eines der kleinsten Moleküle in der Natur) und seine elektrische Neutralität, die es ausgesprochen „wendig“ machen und die Diffusion durch Zellmembranen in benachbarte Zellen ermöglichen, so dass neben intrazellulären Effekten auch interzelluläre Wirkungen vermittelt werden. Die Halbwertszeit des NO in wässrigen Systemen beträgt nur etwa 5 s (SCHMIDT 1994). Es reagiert mit gelöstem Sauerstoff und Wasser zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-), beide Anionen sind biologisch weitgehend unwirksam. Die Oxidation stellt die natürliche Inaktivierung des NO dar. Im Gegensatz zu anderen Botenstoffen benötigt die Zelle daher keine Enzyme, um die Wirkungen des NO zu beenden. Dies ist auch insofern von Bedeutung, da NO in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt. In biologischen Systemen tritt NO aufgrund der kurzen Halbwertszeit nur in sehr geringen Konzentrationen auf und blieb daher lange Zeit unentdeckt. Erst Anfang der 80er Jahre waren Wissenschaftler dem NO auf der Spur, ohne zunächst zu wissen, um welche Substanz es sich handelt. 1987 wurde es schließlich als der „endotheliale Relaxationsfaktor“ (EDRF) identifiziert.

Bis in die 80er Jahre hinein hielten viele Wissenschaftler die Biosynthese von NO in Säugerzellen für unmöglich (FÖRSTERMANN 1994). Inzwischen ist jedoch klar, dass NO in NO-produzierenden Zellen verschiedener Gewebe (Nervengewebe, Endothel, Immunsystem) durch das NADPH-abhängige Enzym NO-Synthase synthetisiert werden kann (s. Abb. 72). Die basische Aminosäure L-Arginin wird zusammen mit dem Cosubstrat O_2 zu L-Citrullin und NO umgesetzt. NO-Synthase tritt in verschiedenen Isoformen auf, die konstitutive Form in Nerven- und Endothelzellen, die nicht-konstitutive (induzierbare) Isoform in Immunzellen. Die Aktivität der nicht-konstitutiven Isoform ist nach bisherigen Erkenntnissen posttranslational kaum reguliert. Die konstitutive Isoform hingegen ist Calcium-abhängig, in ruhenden Zellen inaktiv und bildet erst nach einem Anstieg der intrazellulären freien Calcium-Konzentration signifikante Mengen an NO (SCHMIDT 2001, BICKER 2001). Die Vermittlung der Ca^{2+} -Stimulation erfolgt über Calmodulin.

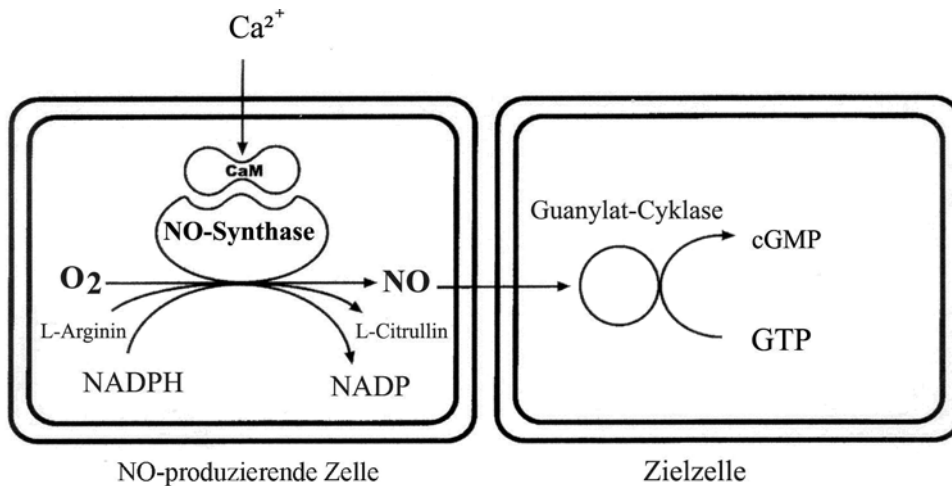


Abbildung 72: Biosynthese von NO und transzelluläre NO/cGMP-Signaltransduktion (CaM = Calmodulin). Verändert nach BICKER 2001.

NO aktiviert in vielen Geweben (Blutgefäße, Gehirn, PNS) die lösliche, cytoplasmatische Guanylat-Cyklase, indem es an das Eisenatom im Porphyringerüst des Enzyms bindet. Das synthetisierte cGMP vermittelt die NO-Wirkung. Unter anderem kann es über cGMP-regulierte Ionenkanäle auf den $[Ca^{2+}]_i$ Einfluss nehmen. Auch im Nervengewebe der Insekten gibt es Hinweise auf den NO-cGMP-Signalweg (ELPHICK *et al.* 1994). Aktivität eines der Säuger NO-Synthase vergleichbaren Enzyms konnte beispielsweise im Nervensystem von *Schistocerca gregaria* (ELPHICK *et al.* 1994), *Manduca sexta*, sowie bei Fruchtfliegen und Honigbienen (BICKER 2001) nachgewiesen werden. NO scheint im Nervensystem der Insekten an der Steuerung einer Vielzahl von zellulären Funktionen beteiligt zu sein, darunter Informationsverarbeitung, Verhaltenskontrolle und Entwicklung (Übersicht bei BICKER 2001). Bei Moskitos (*Anopheles stephensi*) konnte eine induzierbare NO-Synthase nachgewiesen werden, die eine Rolle bei der Immunabwehr spielt und die Entwicklung von Parasiten (Plasmodien; lösen bei Übertragung auf den Mensch Malaria aus) hemmt (LUCKHART *et al.* 1998).

Bei anderen Enzymen als der Guanylat-Cyklase kann die NO-Bindung an ein Metallatom des aktiven Zentrums zu einer Hemmung führen. Makrophagen beispielsweise bilden NO, welches lebenswichtige Enzyme in Tumorzellen oder Parasiten (Bakterien, Protozoen, Pilze, Würmer) inaktiviert, so dass diese vernichtet werden können. Ein ähnlicher Mechanismus wird von Menschen seit über 1000 Jahren beim Pökeln eingesetzt, um Fleisch vor Bakterien (z.B. solche, die Fleischvergiftung übertragen: *Clostridium botulinum*) zu schützen und es so zu konservieren.

Als Hemmstoffe der NO-Synthase (ELPHICK *et al.* 1994) sind vor allem Argininanaloga in Gebrauch, bei denen am terminalen Guanidin-N ein Substituent angefügt ist. Als

Substratanalogon inhibierend wirkt nur jeweils die L-Form. N^G-Methyl-L-Arginin (L-NMA, s. Abb. 73) ist ein verbreitet eingesetzter kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase. Es dient als alternatives Substrat und hemmt vollständig und irreversibel durch Hemmung der Argininbindung. Im Gegensatz zu den meisten anderen Arg-Analoga zeigt L-NMA keine Präferenz für eine der NO-Synthase-Isoformen (konstitutive bzw. induzierbare Isoform).

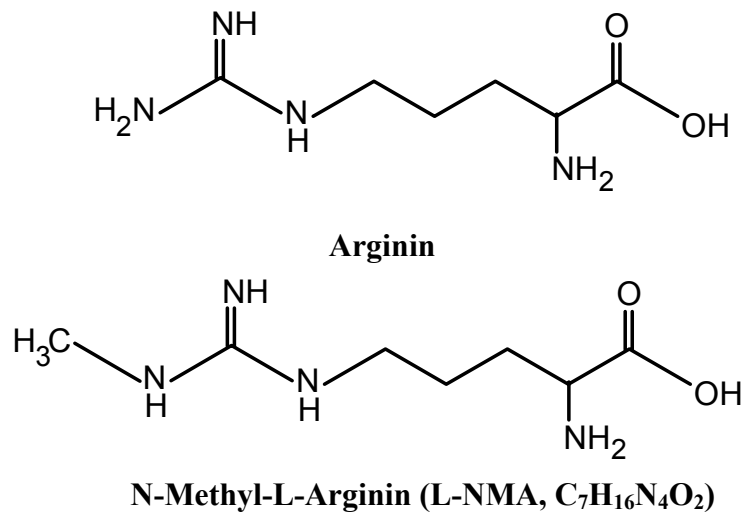


Abbildung 73: Vergleich der Strukturformeln des Substrates der NO-Synthase Arginin und des Strukturanalogons N-Methyl-L-Arginin (L-NMA).

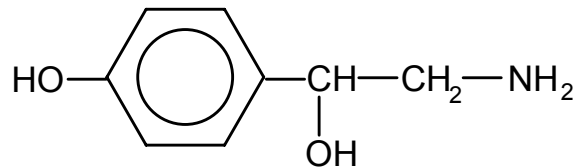
Da die Aktivität der konstitutiven NO-Synthase von der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration abhängig ist und NO, ebenso wie Bld HrTH, Veränderungen der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration hervorrufen kann, wäre eine Beteiligung des NO an der Steuerung der Trehalosesynthese bei Schaben vorstellbar. In den von mir durchgeführten Versuchen zeigte der NO-Synthase Hemmstoff L-NMA allerdings keinen signifikanten Effekt auf die durch das Neuropeptid Bld HrTH hervorgerufene Trehalosesynthese und Veränderung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes von isolierten Fettkörpern. Ebenso zeigte es keinen Effekt auf Trehalosesynthese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt in Abwesenheit des Hormons. Die Ergebnisse lassen nicht erkennen, dass NO an der Signaltransduktion dieses hypertrehalosämischen Hormons beteiligt ist.

4.8.4 Bedeutung von Octopamin

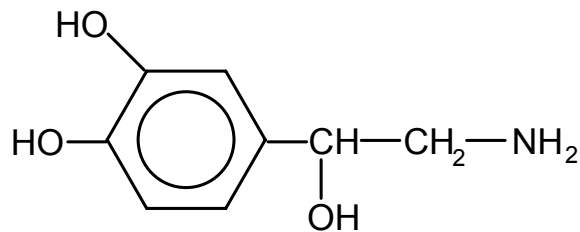
Octopamin (1-p-Hydroxyphenylethanolamin) ist ein biogenes Amin. Biogene Amine wie Serotonin, Dopamin, Histamin oder Octopamin sind als evolutiv konservierte neuronale Signalsubstanzen im gesamten Tierreich verbreitet und steuern zentrale Funktionen wie Stoffwechselaktivität, Schlaf- und Wachrhythmen, Lernvorgänge sowie komplexe

Verhaltensmuster (Nahrungsaufnahme, Sozialverhalten, Flucht, Aggressions- und Meideverhalten). Im Gegensatz zu klassischen Transmittern können biogene Amine sowohl synaptisch als auch nicht-synaptisch aus neuronalen Speichern freigesetzt werden.

Octopamin ist ein Strukturanalogon des Catecholamins Noradrenalin (s. Abb. 74), von dem es sich nur durch die fehlende Hydroxylgruppe in Position 3 des Phenylringes unterscheidet. Beide Substanzen üben ähnliche Funktionen aus (s.u.).



Octopamin (1-p-Hydroxyphenylethanolamin, Norsynephrin)



Noradrenalin (Norepinephrin)

Abbildung 74: Vergleich der Strukturformeln von Octopamin und Noradrenalin.

Octopamin wurde 1940 in der giftproduzierenden Speicheldrüse des Kraken (*Octopus vulgaris*, Cephalopoda) entdeckt (s. ERSPAMER & BORETTI 1951) und findet sich vor allem im Nervengewebe von Invertebraten. Außer bei Insekten, Krebsen und Mollusken wurde es auch bei Vertebraten im zentralen und peripheren Nervensystem nachgewiesen, wo es nach bisherigen Erkenntnissen jedoch nur von untergeordneter Bedeutung ist (AXELROD & SAAVERDA 1977). In biologischem Material findet sich nur die D-Form, und nur sie ist physiologisch wirksam.

Bei Insekten übt Octopamin multiple Funktionen aus und wirkt sowohl als Neurotransmitter und Neuromodulator (EVANS 1980) als auch als zirkulierendes Neurohormon (EVANS *et al.* 1976). Insbesondere beim Insektenflug spielt es eine wichtige Rolle: Bei Heuschrecken steigt die Octopaminkonzentration in der Hämolymphe während der ersten Minuten des Fluges rapide an und durch Injektion in bestimmte Ganglien kann Flugverhalten (ohne Stimulation wie z.B. Wind) ausgelöst werden. Außerdem ist Octopamin ein wichtiger Regulator des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels (BLAU & WEGENER 1994, Übersicht bei CANDY *et al.* 1997). Einige Wirkungen des Octopamins werden durch Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor vermittelt, der an einen Adenylatcyclase-Komplex gekoppelt ist und zu einer Erhöhung der intrazellulären

Konzentration von cAMP führt. In vielen Insektenorganen stimuliert Octopamin daher die Synthese von cAMP (DOWNER 1990).

Bei Schaben wurde Octopamin im Gehirn und in bestimmten Nervenzellen von Thorax und Abdomen nachgewiesen (ROBERTSON & STEELE 1974). Synthetisiert wird es, ebenso wie Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin, aus der Aminosäure Tyrosin (s. Abb. 75).

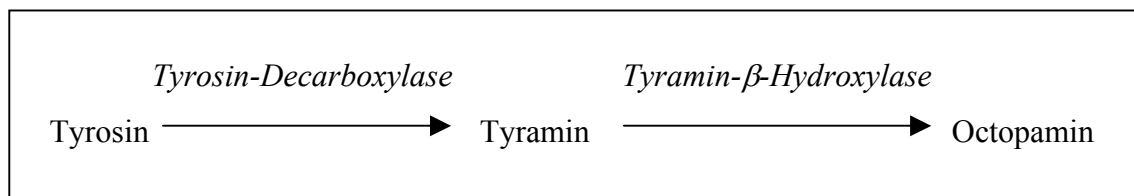


Abbildung 75: Biosynthese von Octopamin.

Octopaminrezeptoren konnten bei Schaben bereits charakterisiert werden (DOWNER 1990), ebenso konnten Adenylatcyclasen nachgewiesen werden, die auf Octopamin reagieren - beispielsweise im Fettkörper (DOWNER 1990; *Periplaneta americana*). Bei Injektion ins Hämocoel von Schaben ruft Octopamin (10^{-5} - 10^{-4} M) einen hypertrehalosämischen Effekt hervor (DOWNER 1979b), was zunächst vermuten ließ, dass es eine ähnliche Wirkung und Signaltransduktion wie hypertrehalosämische Hormone haben könnte.

Octopamin zeigte in meinen Versuchen eine konzentrationsabhängige Steigerung der Trehalosesynthese isolierter Trophocyten von *Blaptica dubia*. Allerdings waren für Effekte auf den Trehalosespiegel unphysiologisch hohe Konzentrationen (10^{-4} M) notwendig. Der physiologische Octopamingehalt in der Hämolymphe von Schaben beträgt jedoch maximal 10^{-7} M (DAVENPORT & EVANS 1984). Zudem lagen die Änderungen der Trehalosesynthese (+39,8 %) deutlich unter den Effekten, die mit Bld HrTH erzielt werden können. Im Vergleich zu Versuchen mit isolierten Fettkörpern (+101,6 %; LIEWALD 1997) war der Anstieg der Trehalosesynthese bei den Trophocyten weniger stark ausgeprägt. Möglicherweise fallen bei Versuchen mit isolierten Zellen unphysiologische Effekte des Octopamins nicht so stark ins Gewicht. Effekte des Octopamins auf den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt wurden in meinen Versuchen ebenfalls nur durch unphysiologisch hohe Octopamin-Konzentrationen erreicht und waren nur etwa halb so groß wie die durch Bld HrTH erzielten Werte (-13,6 % bei 10^{-4} M). Eine physiologische Bedeutung des Octopamins für den Fettkörper von *Blaptica dubia* in Bezug auf Trehalosesynthese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt erscheint somit unwahrscheinlich. Die Ergebnisse unterstützten zudem die These, dass Octopamin einen Signaltransduktionsweg aufweist, der sich vom dem des Bld HrTH unterscheidet.

Es gibt Vermutungen, dass Octopamin außer über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes auch noch über andere Mechanismen wirkt. Eine Möglichkeit wäre ein Octopamin-abhängiger Ca^{2+} -Einstrom, wie er für 5-Hydroxytryptamine bei Speicheldrüsen adulter *Calliphora* beschrieben wurde. Bei Inkubation kultivierter Hämocyten von *Malacosoma disstria* (*Lepidoptera*) mit Octopamin kommt es zu einem raschen, konzentrationsabhängigen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (JAHAGIRDAR *et al.* 1987). Dies findet auch in Ca^{2+} -freiem Medium statt, was vermuten lässt, dass Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mobilisiert wird. Der Maximalwert des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels wurde allerdings nur bei Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} erreicht, was wiederum darauf schließen lässt, dass auch extrazelluläres Ca^{2+} beteiligt ist. Mianserin, ein Inhibitor der durch Octopamin hervorgerufenen gesteigerten cAMP-Synthese, konnte den Effekt des Octopamins auf den Ca^{2+} -Spiegel hemmen. Auf die entsprechenden Effekte von hypertrehalosämischen Hormon oder A23187 auf den Ca^{2+} -Gehalt hatte es hingegen keinen Einfluss. Folglich kann man davon ausgehen, dass Octopamin und das hypertrehalosämische Hormon über verschiedene Signalwege wirken. Bei Untersuchungen von isolierten Trophocyten von *Blaptica dubia* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 konnte ich keine Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes nach Inkubation mit Octopamin (10^{-4} M) erkennen.

Einige Autoren (DOWNER 1979b, DAVENPORT & EVANS 1984) haben berichtet, dass Stress (Temperaturveränderungen, Chemikalien, mechanische Reize) einen schnellen, kurzfristigen Anstieg des Trehalose-Spiegels in der Hämolymphe adulter Schaben auslöst, die sogenannte „EXIT-response“-Reaktion („EXIT“-response = *excitation induced hypertrehalosaemia*). Diese wäre der Reaktion des Adrenalins auf die Vertebratenleber vergleichbar. Die „EXIT-response“-Reaktion führt zu einer Ausschüttung von Octopamin durch abdominale octopaminerge Neurone und folglich zu einem Anstieg der Octopamin-Konzentration in der Hämolymphe (DOWNER 1979b, DAVENPORT & EVANS 1984). Dies führt wiederum in den *Corpora cardiaca* zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration (GOLE & DOWNER 1979), welche zur Sekretion des hypertrehalosämischen Hormons und zu einer Steigerung der Trehaloseproduktion des Fettkörpers führen soll (DOWNER 1979, DOWNER *et al.* 1984). Die physiologische Bedeutung der „EXIT-response“-Reaktion wird in einer gesteigerten Fluchtbereitschaft gesehen.

Wenn überhaupt, so stimuliert Octopamin die Trehalosesynthese von *Blaptica dubia* also nur indirekt, indem es in den *Corpora cardiaca* die Sekretion des hypertrehalosämischen Hormons auslöst, welches dann die Trehalogenese des Fettkörpers anregt. Hingegen hat Octopamin in physiologischen Konzentrationen wohl keinen direkten Einfluss auf die Trophocyten.

Dass bei Versuchen mit isolierten Fettkörpern und Trophocyten dennoch schwache Effekte auf Trehalogenese und Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt zu verzeichnen waren, könnte damit zusammenhängen, dass Octopamin zur Bildung bestimmter Botenstoffe führt, die innerhalb der Signaltransduktion von Bld HrTH ebenfalls eine Rolle spielen. So weisen die im Fettkörper von *Periplaneta americana* gefundenen Octopaminrezeptoren in pharmakologischer Hinsicht Parallelen zu den α -adrenergen Rezeptoren der Vertebraten auf (GOLE & DOWNER 1979). Solche α -adrenergen Rezeptoren treten in verschiedenen Subtypen auf: Der α_1 -Subtyp führt über ein G-Protein und Phospholipase C zur Bildung der sekundären Botenstoffe Diacylglycerin und IP_3 . Während Diacylglycerin die Affinität der Proteinkinase C für Ca^{2+} -Ionen erhöht und die Phosphorylierung von Enzymen ermöglicht, führt IP_3 zum Efflux von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern ins Cytosol und erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Der α_2 -Subtyp führt über ein G_i -Protein zur Hemmung der Adenylatcyclase. Die bisher untersuchten Octopamin-Rezeptoren führen über G-Proteine zu einer verstärkten cAMP-Synthese.

Es gab Berichte über eine Octopamin-induzierte Synthese von IP_3 in Fettkörpern von Schaben (BAINES & DOWNER 1994), die allerdings durch Versuche an isolierten Trophocyten von *Periplaneta americana* (STEELE, im Druck) nicht bestätigt werden konnten. Octopamin ruft in einer Konzentration von 10^{-6} M eine Steigerung der cAMP-Synthese im Fettkörper hervor (GOLE & DOWNER 1979). Da cAMP in Versuchen jedoch keine Wirkung auf die Trehalosesynthese zeigte, müssen andere Signalsubstanzen die Erhöhung der Trehalosesynthese durch Octopamin hervorrufen. Zudem deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es bezüglich der Signaltransduktion Unterschiede zwischen hypertrehalosämischen Hormonen und den adipokinetischen Hormonen der Heuschrecken gibt, bei denen eine Beteiligung von cAMP nachgewiesen wurde (VROEMEN *et al.* 1995). Da die adipokinetischen Hormone außerdem auch den IP_3 -Gehalt erhöhen, scheinen bei diesen Neuropeptiden 2 second messenger Systeme an der Signaltransduktion beteiligt zu sein. Eine mögliche Erklärung wäre, dass (mindestens) 2 Typen von AKH-Rezeptoren auftreten, die jeweils an unterschiedliche Signalwege (cAMP bzw. IP_3) gekoppelt sind (STAGG & CANDY 1996).

4.9 MIKROFLUOROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN VON Ca^{2+} -STRÖMEN AN ISOLIERTEN TROPHOCYTEN

Durch mikrofluorometrische Messungen können Veränderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an Einzelzellen quantitativ erfasst werden. Erstmals konnte in dieser Arbeit die Methode erfolgreich zur Untersuchung der Signaltransduktion von Bld HrTH an Trophocyten des Fettkörpers von *Blaptica dubia* eingesetzt werden.

Inkubation isolierter und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladener Trophocyten mit dem hypertrehalosämischen Hormon (Bld HrTH) führte zu signifikanter Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Circa 3 min nach Zugabe des Bld HrTH (Zeitverzögerung durch Diffusion des Hormons zur Trophocyte) kam es zu einem deutlichen, zweiphasigen Einstrom von Ca^{2+} ins Cytosol der Trophocyte: Ein anfänglicher, schneller und starker Einstrom wurde gefolgt von einer etwas langsamer verlaufenden zweiten Phase bis zum Erreichen eines kurzfristig maximalen, cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nach etwa 2-3 Minuten. Anschließend fiel $[\text{Ca}^{2+}]_i$ langsam ab, blieb allerdings häufig auf einem gegenüber Ruhebedingungen leicht erhöhten Wert stehen. Dies ist ein sehr typischer Verlauf für Messungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei nicht-erregbaren Zellen nach Stimulation mit einem Rezeptor-Agonisten (LÜCKHOFF 1998). Der Rücktransport von Ca^{2+} aus dem Cytosol der Trophocyte dürfte, wie in anderen Zellen, durch Ca^{2+} -ATPasen bewirkt werden. Das Auftreten von zweigipfligen Fluoreszenzraten bei einigen der untersuchten Zellen gibt zu der Vermutung Anlass, dass beim hormonbedingten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen Schwellenwerte eine Rolle spielen.

Parallel zeigte Ca^{2+} -Imaging von Einzelzellen, dass der Einstrom zuerst an der Peripherie der Zelle sichtbar wurde und anschließend das cytosolische Ca^{2+} in der gesamten Zelle rasch anstieg. Man kann dies als Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} deuten. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle scheinen dabei aber keine Rolle zu spielen, da der Effekt durch K^+ nicht auslösbar ist. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass der Fettkörper nicht innerviert ist.

Wie der Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} ausgelöst wird und wie dies mit dem Efflux von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern korreliert, ist bisher nicht klar. Entsprechend dem Ca^{2+} -Eintritt in andere nicht-erregbare Zellen (LÜCKHOFF 1998) ist es jedoch am wahrscheinlichsten, dass es nach Bindung des Hormons an einen Rezeptor, vermittelt über sekundäre Botenstoffe, zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern kommt. Über dieselben sekundären Botenstoffe oder durch die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kommt es entweder parallel oder anschließend zur Öffnung spannungsunabhängiger Ca^{2+} -Kanäle der Zellmembran, zum Ca^{2+} -Einstrom und zur weiteren Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Gemeinsam rufen diese Veränderungen die bekannten Effekte auf Trehalogenese, Glykogenolyse und Fructose-2,6-

bisphosphat-Gehalt hervor, die notwendig sind, um verstärkte Trehalose zu synthetisieren und den Trehalosegehalt der Hämolymphe zu erhöhen.

4. 10 ÜBERBLICK UND SCHLUSSBETRACHTUNG

Tabelle 34: Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Fettkörperloben bzw. Trophocyten zur Signaltransduktion von Bld HrTH.

Testsubstanz	Änderung der Trehalosesynthese [% der Kontrolle]	n	p<	Änderung des Fructose-2,6- bisphosphat-Gehaltes [% der Kontrolle]	n	p<
Bld HrTH						
[0,3 nM]	+41,5±3,2	3	0,05	-4,5±5,9	3	n.s.
[0,6 nM]	+84,3±4,3	3	0,01	-8,7±2,6	3	n.s.
[1 nM]	+105,9±4,2	4	0,001	-11,2±6,1	4	n.s.
[4 nM]	+121,2±4,4	4	0,001	-13,7±3,3	4	n.s.
[10 nM]	+129,5±1,2	3	0,001	-17,4±4,6	3	n.s.
[40 nM]	+131,5±6,1	3	0,001	-24,4±3,3	3	n.s.
[70 nM]	+133,7±11,8	3	0,001	-30,2±1,0	3	0,05
[100 nM]	+133,7±1,4	3	0,001	-29,4±7,6	4	0,05
Bld HrTH [10 nM] mit						
EGTA [2 mM] (Ca²⁺-frei)	+85,2±39,2	3	n.s.	-11,5±2,1	3	n.s.
Ca²⁺ + La³⁺ [2 mM]	+292,3±41,7	3	0,01	+10,3±10,1	3	n.s.
Mg²⁺ [2 mM]	+100,0±8,0	3	0,05	+3,5±2,3	3	n.s.
Mn²⁺ [2 mM]	+114,8±6,4	3	0,001	-8,7±2,3	3	n.s.
A23187 [9,5 µM]	+6,8±3,1	3	n.s.	-18,3±4,5	3	n.s.
A23187 [9,5 µM] + Bld HrTH [10 nM]	+71,0±3,8	3	0,05	-44,9±7,9	3	0,05
A23187 [9,5 µM] + Octopamin [10 ⁻⁴ M]	+41,7±2,8	3	n.s.	-23,6±6,5	3	n.s.
Dantrolen [100 µM]	-5,7±1,4	3	n.s.	-2,0±3,2	3	n.s.
Bld HrTH [10 nM] + Dantrolen [100 µM]	+72,4±2,2	3	0,001	-23,1±5,9	3	0,05
Bld HrTH [10 nM] + DMSO [36 mM]	+126,7±2,9	3	0,01	-24,8±6,9	3	0,05
Thimerosal [50 µM] (Ca²⁺-haltiges Medium)	+119,7±1,8	3	0,05	+136,9±10,3	3	0,05
Thimerosal [50 µM] (Ca ²⁺ -freies Medium)	+109,2±1,9	3	0,05	+122,9±4,6	3	0,05
ET-18-OCH₃ [20 µM]	-6,2±6,8	3	n.s.	-3,5±0,6	3	n.s.
ET-18-OCH ₃ [20 µM] + Bld HrTH [100 nM]	+29,6±6,1	3	n.s.	-14,9±2,6	3	n.s.
Bld HrTH [100 nM] + Ethanol	+130,0±13,1	3	0,05	-26,2±2,0	3	0,05
Phorbol-12,13-dibutyrat [10 µM]	-3,5±8,7	6	n.s.	-24,3±6,7	3	0,05
DMSO	+10,8±6,6	6	n.s.	-3,8±5,3	3	n.s.
Methyl-Arginin [0,25 mM] + Bld HrTH [10 nM]	+158,3±34,1	7	0,01	-30,2±7,6	7	0,01
Methyl-Arginin [0,25 mM]	-9,2±9,6	8	n.s.	+16,9±12,1	8	n.s.
Octopamin						
[10 ⁻⁶ M]	-26,6±9,8	3	n.s.	-2,6±1,1	3	n.s.
[10 ⁻⁵ M]	+42,8±17,3	3	n.s.	-15,9±11,7	3	n.s.
[10 ⁻⁴ M]	+39,8±4,1	3	0,01	-13,6±2,9	3	n.s.

Aus meinen Ergebnissen und aktuellen Veröffentlichungen habe ich folgendes Modell der Signaltransduktion des Neuropeptids Bld HrTH in Trophocyten von *Blaptica dubia* entwickelt (s. Abb. 76):

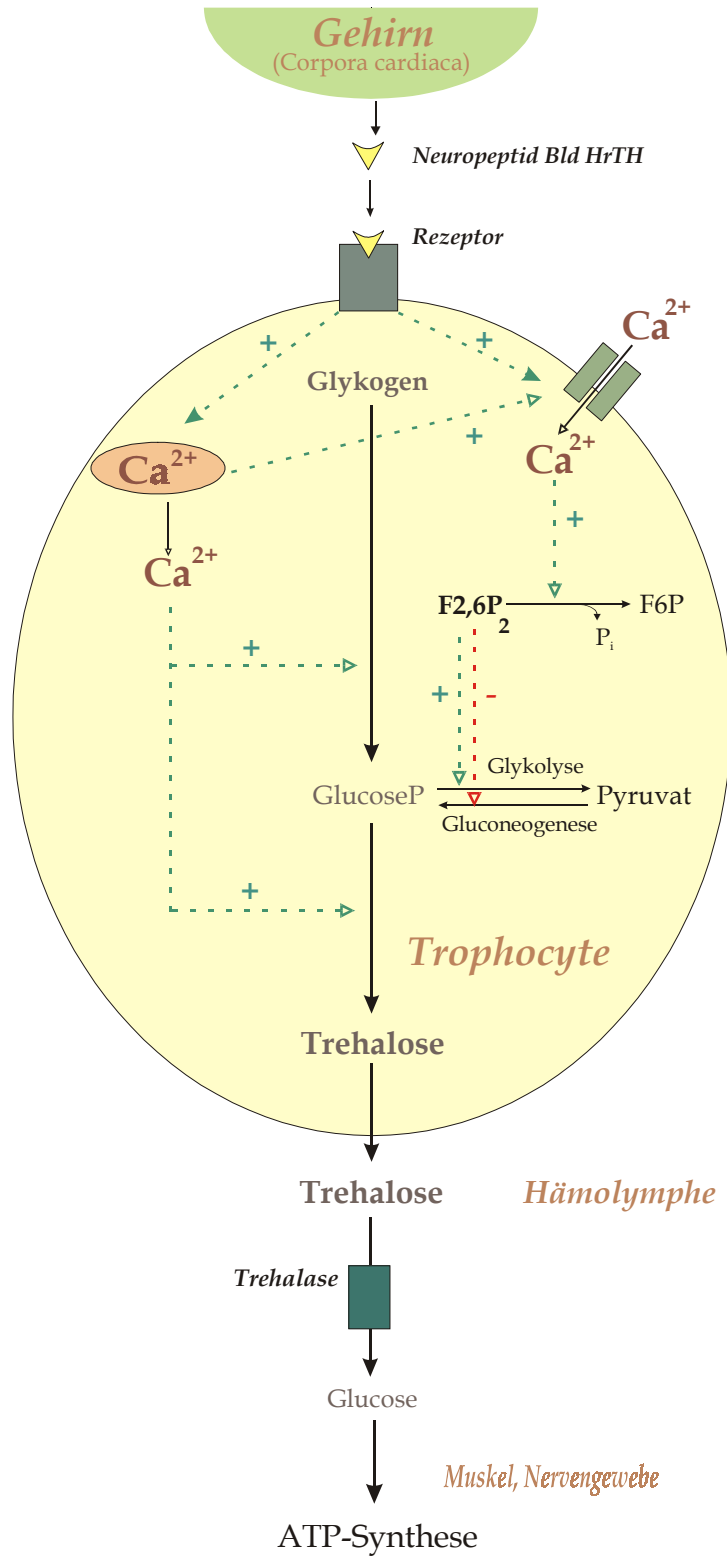


Abbildung 76: Hypothese zur Signaltransduktion von Bld HrTH in Trophocyten von *Blaptica dubia*.

Bei geringem Trehalosegehalt in der Hämolymphe (z.B. bei starkem Verbrauch oder Nahrungsmangel) kommt es zur Sekretion des hypertrehalosämischen Neuropeptids **Bld HrTH** durch neurosekretorische Zellen der *Corpora cardiaca*.

Über die Hämolymphe gelangt Bld HrTH zum Fettkörper. Da das Peptidhormon die Zellmembran der Trophocyten nicht passieren kann, bindet es an spezifische, membrangebundene Zelloberflächen-Rezeptoren und führt dort zu Konformationsänderungen. Vermittelt über ein G_S -Protein wird in der Zielzelle eine **Phospholipase C** aktiviert, die daraufhin PIP_2 in die beiden sekundären Botenstoffe IP_3 und Diacylglycerin spaltet (Phosphoinositidkaskade, IP_3 /DAG-Transduktionskaskade).

IP_3 diffundiert ins Cytosol und bindet an einen IP_3 -Rezeptor des ER, wo es den **Efflux von Ca^{2+} ins Cytosol** auslöst. Entweder über die sekundären Botenstoffe der Phosphoinositidkaskade (z.B. G-Protein, IP_3 oder von IP_3 abgeleitete Botenstoffe) oder durch die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$; speicherabhängiger Ca^{2+} -Influx) kommt es entweder parallel oder anschließend zur Öffnung spannungsunabhängiger Ca^{2+} -spezifischer Kanäle der Zellmembran, zum **Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+}** und zur weiteren Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$. Man kann grundsätzlich von einer engen Verknüpfung von Ca^{2+} -Efflux aus intrazellulären Speichern und Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum ausgehen.

Intrazelluläres Ca^{2+} ist vor allem für die Stimulation der Trehalosesynthese von Bedeutung (Kriterium: Abgabe von Trehalose ins Medium). Neuere Studien sprechen dafür, dass es durch Aktivierung einer **Phospholipase A_2** zur Freisetzung von **mehrfach ungesättigten Fettsäuren** (insbesondere Arachidonsäure, daneben Stearin-, Olein-, Linoleinsäure) aus der sn_2 -Position von Phospholipiden kommt. Die freigesetzten Fettsäuren können mittels des Enzyms Cyclooxygenase in Prostaglandin-ähnlichen Substanzen umgewandelt werden, die wiederum Trehalose-6-phosphat-Synthase und Trehalose-6-phosphatase (autokrin und/oder parakrin) aktivieren und die Trehalogenese stimulieren. Phospholipase A_2 konnte im Insektenfettkörper nachgewiesen werden (USCIAN & STANLEY-SAMUELSON 1993, *Manduca sexta*). Bei *Periplaneta americana* (ALI & STEELE 1995) konnte durch die hypertrehalosämischen Hormone Pea CAH-I und -II eine Aktivierung der Phospholipase A_2 (E.C. 3.1.1.4) und der Cyclooxygenase erzielt werden. Außerdem verursachte der Phospholipase A_2 -Inhibitor Mepacrin bei gemeinsamer Inkubation mit Pea CAH eine deutliche Hemmung der hormoninduzierten Trehalogenese isolierter Fettkörper (Hemmung um ca. 50 %). Auch bei *Blaptica dubia* führte die Inkubation des Fettkörpers mit Mepacrin zu einer Verringerung des Bld HrTH-Effektes auf die Trehalogenese

(auf +77,7 %, BECKER 1996), während die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes nicht beeinflusst wurde. Es scheint daher für weiterführende Studien an dem sensitiven Trophocyten-Testsystem von *Blaptica dubia* sinnvoll zu untersuchen, ob es bei Inkubation der Trophocyten mit Bld HrTH zu einem Konzentrationsanstieg der mehrfach ungesättigten Fettsäuren kommt und ob Aktivatoren bzw. Inhibitoren der Phospholipase A₂ (z.B. Mellitin bzw. Mepacrin) die Fettsäurekonzentration und die Trehalosesynthese beeinflussen.

Ca²⁺ aus dem extrazellulären Raum wirkt am wahrscheinlichsten durch Stimulation der **Phosphorylierung von Proteinen** (z.B. FBPase-2, GPase, Glykogen-Synthase). Unsere Versuche hatten gezeigt, dass Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ zu einer Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes und entsprechend zu einer Inhibition der Glykolyse führt, welche mit der Trehalogenese um Glucosephosphate konkurriert. Die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes wird höchstwahrscheinlich durch Aktivierung (Phosphorylierung) der FBPase-2 erreicht. Allerdings ist das PFK-2/FBPase-2-Enzymsystem bisher nicht aus dem Schabenfettkörper isoliert worden, so dass nicht bekannt ist, ob es ähnlich wie das bifunktionelle Enzym der Säuger reguliert wird und phosphorylierbar ist. Aufgrund der Bedeutung des Fructose-2,6-bisphosphats für die Trehalogenese empfiehlt sich daher eine baldige Isolierung und Charakterisierung des Enzyms.

Durch Phosphorylierung der **GPase-Kinase** kann eine Aktivierung der GPase erreicht werden, um durch Bereitstellung von Substraten die Trehalogenese zu unterstützen und die Trehalose-6-phosphat-Synthase zu stimulieren. Die GPase-Kinase kann durch Ca²⁺ zusätzlich stimuliert werden und nach bisherigen Untersuchungen ist eine Erhöhung von [Ca²⁺]_i eine Voraussetzung für die Aktivierung der GPase. Erhöhung von [Ca²⁺]_i kann sowohl durch Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum, als auch durch Ca²⁺-Efflux aus intrazellulären Speichern erreicht werden. Hypertrehalosämische Hormone rufen eine Zunahme der Menge an GPase hervor und die Aktivierung der GPase erreicht ein Maximum nach 5 Minuten. Dieser Wert entspricht dem Zeitraum, innerhalb dessen bei meinen Fura-2-Untersuchungen an isolierten Trophocyten von *Blaptica dubia* ein Anstieg von [Ca²⁺]_i festgestellt werden konnte.

Die Vermittlung von Ca²⁺-Effekten erfolgt häufig durch Bindung an *Calmodulin*, einem bei allen bisher untersuchten eukaryotischen Zellen auftretendem, spezifisch Ca²⁺-bindenden Protein. Der aktivierte Ca²⁺-Calmodulin-Komplex beeinflusst die Aktivität von Enzymen, die eine zelluläre Antwort auf das ursprüngliche extrazelluläre Signal auslösen. Die Aktivierung der GPase-Kinase könnte demnach durch Ca²⁺-Bindung an eine Untereinheit ausgelöst werden. Für die GPase-Kinase von Säugern konnte gezeigt werden, dass die δ-Untereinheit des Enzyms

Calmodulin ist (COHEN *et al.* 1978). Ca^{2+} -Bindung ruft eine Konformationsänderung hervor und es kommt zu einer Aktivierung des Enzyms. Bislang liegen jedoch keine diesbezüglichen Erkenntnisse für das Enzym aus dem Schabenfettkörper vor. Auch konnte eine Beteiligung von freiem Calmodulin an der Signaltransduktion von Bld HrTH bisher nicht nachgewiesen werden.

Diacylglycerin (DAG), der zweite Botenstoff der Phosphoinositidkaskade, kann an Proteinkinase C binden und eine erhöhte Ca^{2+} -Affinität des Enzyms bewirken. Nach Ca^{2+} -Bindung geht die Proteinkinase C in eine vollständig aktive Form über und kann andere Enzyme an Serin- oder Threonin-Resten phosphorylieren. Als Zielenzyme kommen beispielsweise die GPase-Kinase (Stimulation der Glykogenolyse), aber auch die FBPase-2 (Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes, Reduktion der Glykolyserate) in Betracht. Des Weiteren wäre es durch Phosphorylierung eines Ca^{2+} -spezifischen Kationen-Kanals in der Plasmamembran möglich, Öffnung des Kanals und Ca^{2+} -Einstrom herbeizuführen. Dephosphorylierung führt anschließend wieder zum Schließen des Kanals.

Außerdem kann auch aus DAG Arachidonsäure freigesetzt werden, welche ein Substrat zur Synthese von Eicosanoiden ist. Eicosanoide wie beispielsweise Prostaglandine können modulierend auf durch Hormone hervorgerufene Zellantworten wirken - entweder autokrin oder parakrin durch Bindung an Zelloberflächenrezeptoren von Nachbarzellen, wo sie über G-Proteine cAMP- und Proteinkinase C-Signalwege stimulieren.

Trotz der deutlichen Parallelen zwischen Bld HrTH und Glukagon (s. 4.2), die zunächst einen ähnlichen Signaltransduktionsweg (über G-Protein und cAMP) im Schabenfettkörper vermuten ließen (DOWNER *et al.* 1984) scheint **cAMP** keine Rolle für dieses hypertrehalosämische Hormon zu spielen. Der Fettkörper besitzt alle Enzyme für eine der Leber entsprechende cAMP-abhängige Reaktionskaskade und zunächst konnte tatsächlich gezeigt werden, dass Extrakte der *Corpora cardiaca* von *Periplaneta americana* auch im Fettkörper dieser Schaben (Ca^{2+} -abhängig) den cAMP-Spiegel steigern (GÄDE 1977). Allerdings muss man beachten, dass CC-Extrakt neben dem hypertrehalosämischen Hormon noch eine Reihe weiterer Substanzen aufweist, so dass ein solcher Effekt auf die Adenylat-Cyclase nicht spezifisch sein muss. Synthetische hypertrehalosämische Hormone (Pea CAH-I/-II) führten nicht zu einer Steigerung des cAMP-Spiegels im Fettkörpergewebe (ORR *et al.* 1985). Ebenso hatten bei isolierten Fettkörpern von *Blaptica dubia* (BECKER 1996) und *Blaberus discoidalis* (LEE & KEELEY 1994b) weder cAMP-Analoga (cpt-cAMP, BECKER 1996; Dibutyryl-cAMP, MILLER *et al.* 1975) noch Phosphodiesteraseinhibitoren (IBMX, BECKER 1996) Effekte auf die

Trehalogenese, Glykogenolyse oder den Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass cAMP nicht in die Signaltransduktion von Bld HrTH involviert ist und dass in *Corpora cardiaca*-Extrakten andere Substanzen auftreten, die den cAMP-Gehalt des Fettkörpers beeinflussen.

Die neu synthetisierte Trehalose wird in die Hämolymphe sezerniert und gelangt an die Orte des Verbrauches (z.B. Muskulatur, Nervengewebe). Hier kann sie durch Trehalase in Glucose gespalten und in dieser Form von den Zellen genutzt werden.

Ein weiterer Weg zur Steigerung der Trehalosefreisetzung wäre, dass es, vermittelt durch Ca^{2+} , zu einer erhöhten **Transportgeschwindigkeit** für Trehalose über die Cytoplasmamembran kommt, so dass Trehalose vom Syntheseort (hohe Konzentration) in die Hämolymphe abgegeben wird. Der verstärkte Transport würde zudem eine negative Rückkopplung der synthetisierten Trehalose auf die Neusynthese von Trehalose unterbinden.

Außerdem wäre denkbar, dass Bld HrTH auf die **Genexpression** Einfluss nimmt, indem die Genexpression für Enzyme, die die Trehalosesynthese unterstützen, gefördert wird. Bei *Blaberus discoidalis* konnte bereits gezeigt werden, dass Bld HrTH die Expression des Gens eines Insekten-Cytochrom P450 (CYP4C1) stimuliert (LU *et al.* 1995).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Trehalose (α -D-Glucopyranosyl- α -D-Glucopyranosid), ein nicht-reduzierendes und somit nicht-toxisches Disaccharid aus zwei Glucosebausteinen, ist der Hauptblutzucker in der Hämolymphe der meisten Insekten. Trehalose wird im Fettkörper synthetisiert, dem wichtigsten Organ des Intermediärstoffwechsels bei Insekten. Wie die Homöostase des Blutzuckers reguliert wird, ist nicht vollständig geklärt.

Am Fettkörper und isolierten Adipocyten (Trophocyten) der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*) habe ich Stoffwechseleffekte und Elemente der Signalkette des hypertrehalosämischen Hormons Bld HrTH (ein blockiertes Neuropeptid der *Corpora cardiaca*; pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-ThrNH₂) untersucht.

Die Produktion von Trehalose erfordert eine grundlegende Umschaltung im Stoffwechsel des Fettkörpers, die mehrere wichtige Stoffwechselwege betrifft, so dass die Fettkörperzellen (Trophocyten) von der Speicherung und Katabolisierung von Zucker zur Mobilisierung von Reservestoffen (Glykogen, Fett und möglicherweise Proteinen) und Trehalosesynthese umschalten.

Inkubation isolierter Fettkörperloben mit Bld HrTH verringerte innerhalb von 60 min den Glykogengehalt (um 13,4 %) und steigerte die Konzentration der Hexosephosphate Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat, die Substrat sowohl für die Trehalosesynthese als auch für die Glykolyse sind. Pyruvat, Glycerin-3-phosphat, Citrat und insbesondere Fructose-1,6-bisphosphat (+750 %) waren ebenfalls erhöht.

Der Signalmetabolit Fructose-2,6-bisphosphat wird durch Bld HrTH vermindert. Fructose-2,6-bisphosphat ist ein allosterischer Aktivator des glykolytischen Schlüsselenzyms Phosphofruktokinase (PFK) und ein Inhibitor des gluconeogenetischen Enzyms Fructosebisphosphatase (FBPase) und ermöglicht daher eine inverse Kontrolle dieser beiden Stoffwechselwege. Da Trehalosesynthese und Glykolyse um dieselben Substrate (Glucosephosphate) konkurrieren, fördert der hormoninduzierte Abfall des Glykolyseaktivators Fructose-2,6-bisphosphat die Trehalogenese.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Trophocyten der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*) zu isolieren und die Signaltransduktion von Bld HrTH erstmals an einheitlichen Zellen und sogar an Einzelzellen zu studieren.

Hauptziel dieser Arbeit war es, die Funktion von Ca²⁺ im Signalweg des Bld HrTH im Fettkörper von *Blaptica dubia* genauer zu untersuchen. Daneben wurde auch die Beteiligung

anderer potentieller Botenstoffe (z.B. cAMP, Octopamin, NO, cGMP, IP₃, Diacylglycerin) überprüft.

Die isolierten Zellen reagierten auf das Neuropeptid mit einer deutlichen Steigerung der Trehalosesynthese (+133,7 %) und einer Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes (-30,2 %). Sie bieten somit ein geeignetes System zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen von Bld HrTH und von anderen Signalsubstanzen auf zellulärem Niveau. Testsubstanzen, die verschiedene Ca²⁺-Kompartimente (Extrazellulärraum bzw. intrazelluläre Speicher) beeinflussen, zeigten, dass Ca²⁺-Ionen aus beiden Quellen bei der Signaltransduktion des Bld HrTH eine Rolle spielen. Während extrazelluläres Ca²⁺ insbesondere für die Senkung des Fructose-2,6-bisphosphat-Gehaltes wichtig war, wurde der Efflux aus zellulären Ca²⁺-Speichern insbesondere für die Trehalosesynthese benötigt, wobei sich jedoch beide Wege wechselseitig beeinflussen.

Erstmals konnten an isolierten Trophocyten von *Blaptica dubia* Änderungen von Ca²⁺ mikrofluorometrisch auf der zellulären und subzellulären Ebene studiert werden. Das hypertrehalosämische Hormon ruft eine zweiphasige Erhöhung der freien, intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) hervor. Ein schneller und starker anfänglicher Einstrom im Bereich der Zellmembran wurde gefolgt von einer langsameren, zweiten Einstromphase bis zum Erreichen eines Maximalwertes. Höchstwahrscheinlich ist dies auf eine sukzessive Erhöhung der Ca²⁺-Permeabilität der Plasmamembran und des endoplasmatischen Retikulums zurückzuführen, wobei auch Schwellenwerte eine Rolle zu spielen scheinen. Ein langsamer Rückgang von [Ca²⁺]_i, wahrscheinlich durch aktiven Transport des Ca²⁺ aus dem Cytosol heraus, schließt die hormoninduzierten Ca²⁺-Bewegungen ab.

Meine Untersuchungen deuten auf einen Signalweg über IP₃ und Diacylglycerin hin, entsprechend der Phosphoinositidkaskade. Die beiden Signalsubstanzen könnten als sekundäre Botenstoffe fungieren, um das Neuropeptidsignal intrazellulär weiterzuleiten. Sie könnten außerdem den Einstrom aus extra- und intrazellulären Ca²⁺-Kompartimenten bewirken, sowie die Phosphorylierung bestimmter Enzyme hervorrufen. Eine Beteiligung des biogenen Amins Octopamin, von cAMP oder von Stickstoffmonoxid (NO) an der Signaltransduktion scheint hingegen unwahrscheinlich.

Der Zuckergehalt im Medium scheint ebenfalls auf die Trehalogenese zu wirken. Bei hohen Konzentrationen von Glucose oder Trehalose wurde eine Hemmung der Trehalosesynthese beobachtet, die als Rückkopplungshemmung gedeutet werden kann.

Bei Hunger wird das im Fettkörper gespeicherte Glykogen stark reduziert. Außerdem scheint die Zahl der symbiontischen Mikroorganismen in den Mycetocyten verringert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, M. E. (1990) Peptides as chemical signals: hormones to transmitters. *In*: HUBER, I., MASLER, E. P., RAO, B. R. Cockroaches as models for neurobiology: applications in biomedical research. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida Vol. II, 3-33
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. (1990) Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- ALI, I., STEELE, J. E. (1995) Fatty acids as putative second messengers for hormone mediated trehalose synthesis in cockroach (*Periplaneta americana*) fat body. *Physiological Zoology* **68**, 156
- ALI, I., STEELE, J. E. (1997) Evidence that free fatty acids in trophocytes of *Periplaneta americana* fat body may be regulated by the activity of phospholipase A₂ and cyclooxygenase. *Insect Biochem. Molec. Biol.* Vol 27, 7, 681-692
- ASHER, C., MOSHITZKY, P., RAMACHANDRAN, J., APPLEBAUM, S. W. (1984) The effects of synthetic locust adipokinetic hormone on dispersed locust fat body cell preparations: cAMP induction, lipid mobilization and inhibition of proteinsynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **55**, 167-173
- AXELROD, J., SAAVERDA, J. M. (1977) Octopamine. *Nature* **265**, 501-504
- BAINES, D., DOWNER, R. G. H. (1994) Octopamine enhances phagocytosis in cockroach hemocytes: involvement of inositol trisphosphate. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **68**, 249-261
- BANDI, C., SIRON, M., NALEPA, C. A., CORONA, S., SACCHI, L. (1997) Phylogenetically distant intracellular symbionts in termites. *Parasitologia*, **39**, 71-75
- BECK, E.-G. (2001) Welt der Wissenschaft und Technik. <http://www.egbeck.de>
- BECKER, A. (1996) Die Regulation der Blutzuckerproduktion bei Insekten: biochemische Untersuchungen zur Signaltransduktion und Stoffwechselwirkung von Neuropeptiden. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- BECKER, A., LIEWALD, J. F., STYPA, H., WEGENER, G. (2001) Antagonistic effects of hypertrehalosemic neuropeptide on the activities of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose-1,6-bisphosphatase in cockroach fat body. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **31**, 381-392
- BECKER, A., LIEWALD, J. F., WEGENER, G. (1998) Signal transduction in isolated fat body from the cockroach *Blaptica dubia* exposed to hypertrehalosemic hormone. *J. Comp. Physiol. B.* **168**, 159-167
- BECKER, A., SCHLÖDER, P., STEELE, J. E., WEGENER, G. (1996) The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* **52**, 433-439
- BECKER, A., WEGENER, G. (1995) Hypertrehalosaemic peptides and the content of fructose 2,6-bisphosphate in isolated fat body of the cockroach *Blaptica dubia*. *Physiological Zoology* **68**, 129
- BECKER, A., WEGENER, G. (1998) Hypertrehalosaemic neuropeptides decrease levels of the glycolytic signal fructose 2,6-bisphosphate in cockroach fat body. *J. Exp. Biol.* **201**, 1939-1946
- BERGMEYER, H. U. (1974) Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße, 3. Auflage
- BERRIDGE, M. J. (1995) Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* **312**, 1-11
- BERRIDGE, M. J. (1997) Inositol trisphosphate and calcium: two interacting second messengers. *Amer. J. Nephrol.* **17**, 1-11
- BERRIDGE, M. J., DAWSON, R. M. C., DOWENES, C. P., HESLOP, J. P., IRVINE, R. F. (1983) Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* **212**, 473-482

- BEST, F.** (1906) Über Karminfärbung des Glykogens und der Kerne. *Z. wiss. Mikrosk.* **23**, 319-322
- BEYER, H., WALTER, W.** (1995) Lehrbuch der organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 19. Auflage
- BICKER, G.** (2001) Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems. *Cell Tissue Res.* **303**, 137-146
- BLAU, C.** (1991) Biochemische und pharmakologische Untersuchungen zur Steuerung des Flugstoffwechsels der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- BLAU, C., WEGENER, G.** (1994) Metabolic integration in locust flight: the effect of octopamine on fructose 2,6-bisphosphate content of flight muscle in vivo. *J. Comp. Physiol.* **164**, 11-15
- BOOTMAN, M. D., TAYLOR, C. W., BERRIDGE, M. J.** (1992) The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca^{++} spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 25113-25119
- BROOKS, M. A., RICHARDS, A. G.** (1955) Intracellular symbiosis in cockroaches. *Science*, **122**, 242
- BURROWS, M.** (1996) The neurobiology of an insect brain. Oxford University Press, Oxford
- CABIB, E., LOLOIR, L. F.** (1958) The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* **231**, 259-275
- CANDY, D. J., BECKER, A., WEGENER, G.** (1997) Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comp. Biochem. Physiol.* **117B**, 497-512
- CANDY, D. J., HALL, L. J., SPENCER, I. M.** (1976) The metabolism of glycerol in the locust *Schistocerca gregaria* during flight. *J. Insect Physiol.* **22**, 583-587
- CANDY, D. J., KILBY, B. A.** (1959) Site and mode of trehalose biosynthesis in the locust. *Nature* **183**, 1594-1595
- CANDY, D. J., KILBY, B. A.** (1961) The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. *Biochem. J.* **78**, 531-536
- CARROL, N. V., LONGLEY, R. W., ROE, J. H.** (1956) The determination of glycogen in liver and muscle by the use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* **220**, 583-593
- CHEMICOOOL** (2001) <http://tech-two.mit.edu/Chemicool/>
- COHEN, M. P.** (1986) Diabetes and protein glycosylation. Springer Verlag, New York, Berlin
- COHEN, P., BURCHELL, A., FOULKES, J. G., COHEN, P. T. W.** (1978) Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *FEBS Lett.* **92**, 287-293
- COOK, B. J., HOLMAN, G. M.** (1985) The role of proctolin and glutamate in the excitation-contraction coupling of insect visceral muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **80C**, 65-73
- CORNWELL, P. B.** (1968) The cockroach. Vol. I & II. Hutchinson & Co Ltd.
- DAVENPORT, A. P., EVANS, P. D.** (1984) Stress-induced changes in the octopamine levels of insect haemolymph. *Insect Biochem.* **14**, 135-143
- DAVID, J.-C., COULON, J.-F.** (1985) Octopamine in invertebrates and vertebrates. A review. *Prog. Neurobiol.* **24**, 141-185
- DETTNER, K. PETERS, W.** (1999) Lehrbuch der Entomologie. Gustav Fischer Verlag
- DOWNER, R. G. H.** (1979a) Trehalose production in isolated fat body of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp. Biochem. Physiol.* **62C**, 31-34
- DOWNER, R. G. H.** (1979b) Induction of hypertrehalosaemia by excitation in *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **25**, 59-63
- DOWNER, R. G. H.** (1980) Short term hypertrehalosaemia induced by octopamine in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *L. Insect Neurobiology and Pesticide Action*, 335-339. Society of Chemical Industry, London

- DOWNER, R. G. H.** (1990) Octopamine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in the cockroach nervous system. In: HUBER, I., MASLER, E. P., RAO, B. R. (ed.) Cockroaches as models for neurobiology: applications in biomedical research. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida **2**, 103-124
- DOWNER, R. G. H., ORR, G. L., GOLE, J. W. D., ORCHARD, I.** (1984) The role of octopamine and cyclic AMP in regulating hormone release from corpora cardiaca of the American cockroach. *J. Insect Physiol.* **20**, 457-462
- DOWNER, R. G. H., STEELE, J. E.** (1972) Hormonal stimulation of lipid transport in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **19**, 259-265
- DUNBAR, S. J., HUDDART, H.** (1982) Calcium movement in insect visceral muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **71A**, 425-437
- ECKERT, R.** (1986) Tierphysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- EL-MAGHRABI, M. R., CLAUS, T. H., PILKIS, J., PILKIS, S. J.** (1981) Partial purification of a rat liver enzyme that catalyses the formation of fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 1071-1077
- EL-MAGHRABI, M. R., CLAUS, T. H., PILKIS, J., FOX, E., PILKIS, S. J.** (1982) Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **257**, 7603-7607
- ELPHICK, M. R., GREEN, I. C., O'SHEA, M.** (1994) Nitric oxide signalling in the insect nervous system. In: BORKOVEC, A. B., LOEB, M. J. *Insect neurochemistry and neurophysiology*. C.R.C. Press Boca Raton
- ERSPAMER, V.** (1952) Identification of octopamine as *l-p*-hydroxyphenylethanolamine. *Nature* **169**, 375-376
- ERSPAMER, V., BORETTI, G.** (1951) Substances of a phenolic and indolic nature present in acetone extracts of the posterior salivary glands of octopoda (*Octopus vulgaris*, *Octopus macropus* and *Eledone moschata*). *Experientia* **7**, 271-273
- EVANS, D. R., DETHIER, V. G.** (1957) The regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. *J. Insect Physiol.* **1**, 3-17
- EVANS, P. D.** (1980) Biogenic amines in the insect nervous system. *Adv. Insect Physiol.* **15**, 317-473
- EVANS, P. D., KRAVITZ, E. A., TALAMO, B. R., WALLACE, B.** (1976) The association of octopamine with specific neurons along lobster nerve trunks. *J. Physiol., London.* **262**, 51-70
- FILBURN, C. R., WYATT, G. R.** (1976) Adenylate and guanylate cyclases of cecropia silkworm fat body. *J. Insect Physiol.* **22**, 1635-1640
- FLANIGAN, J. E., GÄDE, G.** (1999) On the release of the three locust (*Locusta migratoria*) adipokinetic hormones: Effect of crustacean cardioactive peptide and inhibition by sugars. *Zeitschrift für Naturforschung* **54**, 100-118
- FLINDT, R.** (1988) Biologie in Zahlen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- FÖRSTERMANN, U.** (1994) Stickoxid (NO): Umweltgift und körpereigener Botenstoff. *Biologie in unserer Zeit.* **2**, 62-69
- FRIEDRICH, U., VOLLAND, W.** (1981) Futtermittelzucht - Lebendfutter für Vivarientiere. Verlag E. Ulmer, Stuttgart 68-76
- FRIEDMAN, S.** (1967) The control of trehalose synthesis in the blowfly, *Phormia regina*. *J. Insect Physiol.* **13**, 397-405
- FRIEDMAN, S.** (1985) Carbohydrate metabolism. In: KERKUT, G. A., GILBERT, L. J. (ed) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, 43-76
- GÄDE, G.** (1977) Effect of corpus cardiacum extract on cyclic AMP concentrations in the fat body of *Periplaneta americana*. *Zool. Jahrb. Physiol.* **81**, 245-249
- GÄDE, G.** (1990) The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family: structures, interrelationships and functions. *J. Insect. Physiol.* **36**, 1-12

- GÄDE, G. (1997) The explosion of structural information on insect neuropeptides. Progress in the chemistry of organic natural products **71**, 1-128
- GÄDE, G., BEENAKKERS, A. M., T. (1977) Adipokinetic hormone-induced lipid mobilization and cyclic AMP accumulation in the fat body of *Locusta migratoria* during development. Gen. Comp. Endocrinol. **32**, 481-487
- GÄDE, G., RINEHART, K. L. JR. (1986) Amino acid sequence of a hypertrehalosemic neuropeptide from the corpus cardiacum of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **141**, 774-781
- GÄDE, G., HOFFMANN, K.-H., SPRING, J. H. (1997) Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. Physiol. Rev. **77**, 963-1032
- GALLAGHER, M. R. (1962) Vitamin synthesis by the symbionts in the fat body of the cockroach, *P. americana* (Linnaeus). Ph. D. Thesis, Fordham Univ.
- GERSCH, M. (1964) Vergleichende Endokrinologie der wirbellosen Tiere. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig
- GIEHR, H. T. (1936) The morphology and behaviour of the intracellular bacterioids of roaches. Biol. Bull. **71**, 69
- GOLDSWORTHY, G. J. (1969) Hyperglycaemic factors from the corpus cardiacum of *Locusta migratoria*. J. Insect Physiol. **15**, 2131-2140
- GOLDSWORTHY, G. J., MORDUE, W., GUTHKELCH, J. (1972) Studies on insect adipokinetic hormones. Gen. Comp. Endocrinol. **18**, 545-551
- GOLE, J. W. D., DOWNER, R. G. H. (1979) Elevation of adenosine 3',5'-monophosphate by octopamine in fat body of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. Comp. Biochem. Physiol. **64 C**, 223-226
- GOURDOUX, J., LEQZELLE, Y., MOREAU, R., DUTRIEU, J. (1983) Gluconeogenesis from some amino acids and its endocrine modification in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). Comp. Biochem. Physiol. **74B**, 273-276
- GRILLOT, J. P. (1983) Morphology and evolution of perisymphatic organs in insects. In "Neurohemal organs in arthropods" Gupta, A. P., CC Thomas, Springfield, IL, 481-512,
- GRZIMEK, B. (1969) Grzimeks Tierleben, Band 2: Insekten. Kindler Verlag
- GULLAN, P. J., CRANSTON, P. S. (1984) The insects: an outline of entomology. Chapman & Hall, London
- GUPTA, A. P., DAS, Y. T., RAO, B. R. (1990) Anatomy of the cockroach. in: HUBER, I., MASLER, E. P., RAO, B. R. (1990) Cockroaches as models for neurobiology: Applications in biomedical research. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- GUTHRIE, D. M., TINDALL, A. R. (1968) The biology of the cockroach. Edward Arnold Publishers Ltd.
- HANAOKA, K., TAKAHASHI, S. Y. (1977) Adenylate cyclase system and the hyperglycemic factor in the cockroach, *Periplaneta americana*. Insect Biochem. **7**, 95-99
- HANKE, W. (1968) Hormone. Walter de Gruyter & Co
- HANKE, W., HAMDORF, K., HORN, E., SCHLIEPER, C. (1977) Praktikum der Zoophysiology. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- HANSTRÖM, B. (1953) Neurosecretory pathways in the head of the crustaceans, insects and vertebrates. Nature **171**, 72-73
- HAYES, T. K., Keely, L. L. (1985) Properties of an *in vitro* bioassay for hypertrehalosemic hormone of *Blaberus discoidalis* cockroaches. Gen. Comp. Endocrinol. **57**, 246-256
- HEITLAND, W. (2001) Bestimmungsübungen an Insekten. http://zoologie.forst.tu-muenchen.de/HEITLAND/DETINVERT/introduction_fr.html
- HEKIMI, S., O'SHEA, M. (1987) Identification and purification of two precursors of the insect neuropeptide adipokinetic hormone. J. Neurosci. **7**, 2773
- HENRY, S. M., BLOCK, R. J. (1962) Amino acid synthesis, a rumen-like effect of the intracellular symbionts of the German cockroach. Federation Proc., **21**, 9

- HENTSCHEL, E., WAGNER, G. (1990) Zoologisches Wörterbuch. Gustav Fischer Verlag
4. Auflage
- HERS, H.-G., VAN SCHAFTINGEN, E. (1982) Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its
discovery. *Biochem. J.* **206**, 1-12
- HINTON, J. M., NEJAD, M., ISSBERNER, J. P., HANCOCK, J. T., OSBORNE, R. H. (1998)
Muscarinic acetylcholine and proctolin receptors in the foregut of the locust *Schistocerca*
gregaria: role of inositol phosphates, protein kinase C and calcium in second messenger
effects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 331-343
- HOFBAUER, A. (2001) Evolutionsgeschichte.
<http://www-cgi.uni-regensburg.de/~hoa21498/EVO/evol.htm>
- HOLLEMANN, A. F., WIBERG, E. (1985) Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Walter de
Gruyter, Berlin/New York
- HOLWERDA, D. S., WEEDA, E., VAN DOORN, J. M. (1977) Separation of the hyperglycemic and
adipokinetic factors from the cockroach corpus cardiacum. *Insect. Biochem.* **7**, 477-481
- HONOMICHL, K., BELLMANN, H. (1996) Biologie und Ökologie der Insekten. Gustav Fischer
Verlag
- HOWDEN, G. F., KILBY, B. A. (1956) Trehalose and trehalase in the locust. *Chem. & Ind.*
1453-1454
- HUBER, I., MASLER, E. P., RAO, B. R. (1990) Cockroaches as models for neurobiology:
Applications in biomedical research. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- JAHAGIRDAR, A. P., MILTON, G., VISWANATHA, T., DOWNER, R. G. H. (1987) Calcium
involvement in mediating the action of octopamine and hypertrehalosemic peptides on
insect haemocytes. *FEBS Lett.*, **219**, 83-87
- KARLSON, P. (1988) Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Thieme Verlag, Stuttgart 11. Auflage
- KARLSON, P., GEROK, W., GROSS, W. (1982) Pathobiochemie. Thieme Verlag, Stuttgart 2.
Auflage
- KEELEY, L. L. (1978) Development and endocrine regulation of mitochondrial cytochrome
biosynthesis in the insect fat body. δ -[¹⁴C]aminolevulinic acid incorporation. *Arch*
Biochem. Biophys. **187**, 87-95
- KEELEY, L. L. (1990) Neuroendocrine regulation of fat body metabolism. *In*: HUBER, I.,
MASLER, E. P., RAO, B. R. Cockroaches as models for neurobiology: applications in
biomedical research, Volume II, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- KEELEY, L. L., HESSON, A. S. (1995) Calcium-dependent signal transduction by the
hypertrehalosemic hormone in the cockroach fat body. *Gen. Comp. Endocrinol.* **99**, 373-
381
- KEELEY, L. L., HAYES, T. K., BRADFIELD, J. Y., SOWA, S. M. (1991) Physiological actions by
hypertrehalosemic hormone and adipokinetic peptides in adult *Blaberus discoidalis*
cockroaches. *Insect Biochem.* **21**, 121-129
- KELLER, H. (1950) Die Kultur der intrazellulären Symbionten von *Periplaneta orientalis*. *Z.*
Naturforschg. **5B**, 269-273
- KLINKE, R., SILBERNAGEL, S. (1996) Lehrbuch der Physiologie. Thieme Verlag Stuttgart
- KOESLING, D. (2000) Forschungsbericht, Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie, Ruhr-
Universität Bochum, [http://www.uv.ruhr-uni-
bochum.de/Forschungsbericht/e20/e200701/b200701.htm](http://www.uv.ruhr-uni-bochum.de/Forschungsbericht/e20/e200701/b200701.htm)
- KUNKEL, J. G. (1997) The cockroach home page.
<http://www.bio.umass.edu/biology/kunkel/cockroach.html>
- KURATO, S., SAITO, H., NATORI, S. (1990) Participation of hemocyte proteinase in dissociation
of the fat body on pupation of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Insect Biochem.* **20**, 461-
465
- KURATO, S., SAITO, H., NATORI, S. (1992 a) Purification of a 29-kDa hemocyte proteinase of
Sarcophaga peregrina. *Eur. J. Biochem.* **204**, 911-914

- KURATO, S., SAITO, H., NATORI, S. (1992 b) The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev. Biol.* **153**, 115-121
- LEE, M. J., GOLDSWORTHY, G. J. (1995) The preparation and use of dispersed cells from fat body of *Locusta migratoria* in a filtration plate. *Anal. Biochem.* **228**, 155-161
- LEE, Y.-H., KEELEY, L. L. (1994a) Hypertrehalosemic hormone effects on transcriptional activity in the fat body of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**, 357-362
- LEE, Y.-H., KEELEY, L. L. (1994b) Intracellular transduction of trehalose synthesis by hypertrehalosaemic hormone in the fat body of the tropical cockroach *Blaberus discoidalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**, 473-480
- LEFKOVITZ, R. J., CARON, M. C. (1988) Adrenergic receptors. In: *Advances in Second Messengers Phosphoprotein Research* (Edited by Adelstein R., Klee, C., Rodbell, M.) pp.1-10, RAVEN Press, New York
- LIEWALD, J. (1997) Hormonelle Regulation der Trehalosesynthese bei der Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*): Versuche mit inkubierten Fettkörpern und isolierten Fettkörperzellen. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- LIPKE, H. (1965) Carbohydrate-amino acid conversions during cuticle synthesis in *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **11**, 1225-1232
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-275
- LU, K.-H., BRADFIELD, J. Y., KEELEY, L.L. (1995) Hypertrehalosemic hormone-related gene expression for cytochrome P4504C1 in the fat body of the neotropical cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **28**, 79-90.
- LUCKHART, S., VODOVOTZ, Y., CUI, L., ROSENBERG, R. (1998) The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 5700-5705
- LÜCKHOFF, A. (1998) Mechanismen und Regulation von Ca²⁺-Eintritt in elektrisch nicht-eregbare Zellen. *BIOforum* **12/98**, 757-762
- MAYER, P. (1920) *Zoomikrotechnik*, Bornträger, Berlin
- MAYER, R. J., CANDY, D. J. (1969) Control of haemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpus cardiacum. *J. Insect Physiol.* **15**, 611
- MAZZOCCO-MANNEVAL, C., KUCZER, M., KONOPINSKA, D., FOURNIER, B., LOUGHTON, B. G., PUIROUX, J. (1998) Pharmacological studies of proctolin receptors on foregut and hindgut of *Blaberus craniifer*. *Peptides* **19**, 1641-1651
- MCCLURE, J. B., STEELE, J. E. (1981) The role of extracellular calcium in hormonal activation of glycogen phosphorylase in cockroach fat body. *Insect Biochem.* **11**, 605-613
- MCDUGALL, G. E., STEELE, J. E. (1988) Free fatty acids as a source of energy for trehalose synthesis in the fat body of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Insect Biochem.* **18**, 591-597
- MILLER, J. P., BECK, A. H., SIMON, L. N., MEYER, R. B. (1975) Induction of hepatic tyrosine aminotransferase *in vivo* by derivatives of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* **250**, 426-431
- MONCADA, S. PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142
- MORISHIMA, I. (1984) Calmodulin stimulation of adenylate cyclase in fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **14**, 491-494
- NATALIZI, G. M., FRONTALI, N. (1966) Purification of insect hyperglycemic and heart accelerating hormones. *J. Insect Physiol.* **12**, 1279-1287
- NEWSHOLME, E. A., START, C. (1976) *Regulation in metabolism*. John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto

- OHTA, T., ITO, S., OHGA, A. (1990) Inhibitory action of dantrolene on Ca-induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **178**, 11-19
- ORCHARD, I. (1983) Neurosecretion: morphology and physiology. *In: DOWNER, R. G. H., LAUFER, H.* (1983)
- ORCHARD, I., LOUGHTON, B. G. (1983) Is octopamine a transmitter mediating hormone release in insects? *J. Neurobiol.* **12**, 143-153
- ORR, G. L., GOLE, J. W. D., JAHAGIRDAR, A. P., DOWNER, R. G. H., STEELE, J. E. (1985) Cyclic AMP does not mediate the action of synthetic hypertrehalosemic peptides from the corpus cardiacum of *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **15**, 703-709
- PARK, J. H., KEELEY, L. L. (1996) Calcium-dependent action of hypertrehalosemic hormone on activation of glycogen phosphorylase in cockroach fat body. *Mol. Cell. Endocrinol.* **116**, 199-205
- PENZLIN, H. (2001) Untersuchungen über die Wirkungsmechanismen von Neurohormonen. <http://www.saw-leipzig.de/sawakade/3vorhabe/neurohor.html>
- PERRIGIN, B. (2001) MSU Entomology. <http://www.msstate.edu/Entomology/ENTPLP.html>
- PHILIPPE, C. (1982) Culture of fat body of *Periplaneta americana*: tissue development and establishment of cell lines. *Insect Physiol.* **28**, 257-265
- PIPA, R. L. (1978) Locations and central projections of neurons associated with the retrocerebral neuroendocrine complex of the cockroach *Periplaneta americana*. *Cell Tiss. Res.* **193**, 443-455
- POWIS, G., SEEWALD, M. J., GRATAS, C., MELDER, D., RIEBOW, J., MODES, E. J. (1992) Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. *Cancer Res.* **52**, 2835-2840
- PSCHYREMBEL, W. (1982) *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter Verlag
- RAINA, A. K., GÄDE, G. (1988) Insect peptide nomenclature. *Insect Biochem.* **18**, 785-787
- RANDRIAMAMPITA, C., TSIEN, R. Y. (1993) Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* **364**, 809-814
- REED, P. W., LARDY, H. A. (1972) A23187: A divalent cation ionophore. *J. Biol. Chem.* **247**, 6970-6977
- REINBOTH, R. (1980) *Vergleichende Endokrinologie*. Thieme Verlag, Stuttgart
- RENNER, M. STORCH, V., WELSCH, U. (1991) *Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 20. Auflage
- RICHARDS, A. G., BROOKS, M. A. (1958) Internal symbiosis in insects. *Ann. Rev. Entomol.* **3**, 37-56
- ROBERTSON, H. A., STELLE, J. E. (1974) Octopamine in the insect central nervous system: distribution, biosynthesis and possible physiological role. *J. Physiol.* **237**, 34-35
- ROBINSON, N. L., GOLDSWORTHY, G. J. (1977) A possible site of action of adipokinetic hormone on the flight muscle of locusts. I. *Insect. Physiol.* **23**, 153
- ROE, J. H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* **212**, 335-343
- ROMEIS, B. (1989) *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg Verlag
- SABULARSE, D. C., ANDERSON, R. L. (1981) D-Fructose 2,6-bisphosphate: A naturally occurring activator for inorganic pyrophosphate: D-Fru-6-phosphate 1-phosphotransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**, 848-855
- SACHS, L. (1984) *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- SCARBOROUGH, R. M., JAMIESON, G. C., KALISH, F., KRAMER, S. J., MCENROE, G. A., MILLER, C. A., SCHOOLEY, D. A. (1984) Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 5575-5579

- SCHMIDT, H. H. H. W. (1994) NO, endogener Botenstoff und Zellgift. *Med. Mo. Pharm.* **17**, 168-185
- SCHMIDT, H. H. H. W. (2001) Struktur und Regulation von NO-Synthasen (NOS). <http://www.zv.uni-wuerzburg.de/forschungsbericht/e88/e880224/b880224.htm>
- SCHOONEVELD, H., ROMBERG-PRIVEE, H. M., VEENSTRA, J. A. (1986) Immunocytochemical differentiation between adipokinetic hormone (AKH)-like peptides in neurons and glandular cells in the corpus cardiacum of *Locusta migratoria* and *Periplaneta americana* with C-terminal and N-terminal specific antisera to AKH. *Cell Tiss. Res.* **243**, 9-14
- SEEWALD, M. J., OLSEN, R. A., SEHGAL, I., MELDER, D. C., MODEST, E. J., POWIS, G. (1990) Inhibition of growth factor-dependent inositol phosphate Ca²⁺ signaling by antitumor ether lipid analogues. *Cancer Res.* **50**, 4458-4463
- SEVALA, V. L., STEELE, J. E. (1989) Absence of stimulatory effect of the *corpus cardiacum* on gluconeogenesis in cockroach (*Periplaneta americana*) fat body. *J. Insect Physiol.* **35**, 1031-1036
- SEVALA, V. L., STEELE, J. E. (1991) Regulation of glycolytic intermediates in cockroach fat body by the corpus cardiacum. *J. Comp. Physiol. B* **161**, 349-355
- SPENCER, I. M., CANDY, D. J. (1976) Hormonal control of diacylglycerol mobilization from fat body of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem.* **6**, 289-296
- STAGG, L. E., CANDY, D. J. (1996) The effect of adipokinetic hormones on the level of inositol phosphates and cyclic AMP in the fat body of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**, 537-544
- STANLEY, D., BEDICK, J. (1997) Entomology. University of Nebraska, Department of Entomology, <http://entomology.unl.edu/ent801/ent801home.html>
- STEELE, J. E. (1963) The site of action of insect hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**, 46-52
- STEELE, J. E. (1964) The activation of phosphorylase in an insect by adenosine, 3',5'-phosphate and other agents. *Am. Zool.* **4**, 328
- STEELE, J. E., COULTHART, K. C., MCCLURE, J. B. (1984) Control of hexose phosphate and citrate in fat body of the cockroach (*Periplaneta americana*) by the corpus cardiacum. *Comp. Biochem. Physiol.* **79 B**, 559-563
- STEELE, J. E., HALL, S. (1985) Trehalose synthesis and glycogenolysis as sites of action for the corpus cardiacum in *Periplaneta americana*. *Insect. Biochem.* **15**, 529-536
- STEELE, J. E., IRELAND, R. (1994) The preparation of trophocytes from diagggregated fat body of the cockroach (*Periplaneta americana*). *Comp. Biochem. Physiol.* **107 A**, 517-522
- STEELE, J. E., MCDUGALL, G. E., SHADWICK, R. (1988) Trehalose efflux from cockroach fat body *in vitro*: paradoxical effects of the corpus cardiacum and methylxanthines. *Insect. Biochem.* **18**, 585-590
- STEELE, J. E., PAUL, T. (1985) Corpus cardiacum stimulated trehalose efflux from cockroach (*Periplaneta americana*) fat body: control by calcium. *Can. J. Zool.* **63**, 63-66
- STRAND, F. L. (1999) Neuropeptides. MIT Press, Cambridge MA
- STORCH, V., WELSCH, U. (1991) Systematische Zoologie. G. Fischer Verlag. 4. Auflage
- STORCH, V., WELSCH, U. (1994) Kurzes Lehrbuch der Zoologie. G. Fischer Verlag. 7. Auflage
- STOREY, K. B., BAILEY, E. (1978) Intracellular distribution of enzymes associated with lipogenesis and gluconeogenesis in fat body of the adult cockroach *Periplaneta*. *Insect Biochem.* **8**, 125-131
- STOREY, K. B., BAILEY, E. (1978b) The intracellular distribution of enzymes of carbohydrate degradation in the fat body of the adult male cockroach. *Insect Biochem.* **8**, 73-79
- TAKEMURA, H., HUGHES, A. R., THASTRUP, O., PUTNEY, J. W. (1989) Activation of calcium entry by the tumor promotor thapsigargin in parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 12266-12271
- TESCHNER, D. (1979) Versuche mit Insekten. Quelle & Mayer, Heidelberg

- THASTRUP, O., CULLEN, P. J., DROBAK, B. K., HANLEY, M. R., DAWSON, A. P. (1990) Thapsigargin, a tumor promotor, discharges intracellular Ca^{++} stores by specific inhibition of the endoplasmatic reticulum Ca^{++} -ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 2466-2470
- TREHERNE, J. E. (1967) Gut absorption. Ann. Rev. Entomol. **12**, 43-58
- TUBLITZ, N. J., TROMBLEY, P. Q. (1987) Peptide action on insect cardiac muscle is mediated by inositol trisphosphate (IP_3). Soc. Neurosci. Abstr. **13**, 285
- USCIAN, J. M., STANLEY-SAMUELSON, D. W. (1993) Phospholipase A_2 activity in the fat body of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. **24**, 187-201
- VAN DER HORST, D. J., VROEMEN, S. F., VAN MARREWIJK, W. J. A. (1999) Metabolism of stored reserves in insect fat body: hormonal signal transduction implicated in glycogen mobilization, and biosynthesis of the lipophorin system. Comp. Biochem. Physiol. **117B**, 463-474.
- VAN MARREWIJK, W. J. A., VAN DEN BROEK, A. T. M., GIELBERT, M.-L., VAN DER HORST, D. J. (1996) Insect adipokinetic hormone stimulates inositol phosphate metabolism: roles for both $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ and $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ in signal transduction? Mol. Cell. Endocrinol. **122**, 141-150
- VAN SCHAFTINGEN, E. (1984) D-fructose 2,6-bisphosphate. In: BERGMAYER, H. U., BERGMAYER, J., GRASSEL, M. (ed.) Methods of enzymatic analysis. Vol. VI: Metabolites 1: Carbohydrates. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, 225-241
- VAN SCHAFTINGEN, E. (1987) Fructose 2,6-bisphosphate. In: MEISTER, A. Adv. Enzymol. Rel. Areas Molec. Biol. John Wiley & Sons, New York, 315-395
- VAN SCHAFTINGEN, E., HUE, L., HERS, H.-G. (1980) Fructose 2,6-bisphosphate, the probable structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. Biochem. J. **192**, 897-901
- VAN SCHAFTINGEN, E., HERS, H.-G. (1981) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. **78**, 2861-2863
- VAN SCHAFTINGEN, E., JETT, M.-F., HUE, L., HERS, H. G. (1981) Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 3483-3486
- VAN SCHAFTINGEN, E., LEDERER, B., BATRONS, R., HERS, H.-G. (1982) A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Eur. J. Biochem. **129**, 191-195
- VOET, D., VOET, J. G. (1992) Biochemie. VCH Verlag Weinheim, New York, Basel, Cambridge
- VROEMEN, S. F., VAN MARREWIJK, W. J. A., VAN DER HORST, D. J. (1995) Stimulation of glycogenolysis by three locust adipokinetic hormones involves G_s and cAMP. Mol. Cell Endocrinol. **107**, 165-171
- VROEMEN, S. F., VAN MARREWIJK, W. J. A., DE MEIJER, J., VAN DEN BROEK, A. T., VAN DER HORST, D. J. (1997) Differential induction of inositol phosphate metabolism by three adipokinetic hormones. Molec. Cell. Endocrinol. **130**, 131-139
- VULLINGS, H. G. B., DIEDEREN, J. H. B. (1999) Multifactorial control of the release of hormones from the locust retrocerebral complex. Microscopy Research and Technique **45**, 142-153
- WANG, Z., HAYAKAWA, Y., DOWNER, R. G. H. (1990) Factors influencing cyclic AMP and diacylglycerol levels in fat body of *Locusta migratoria*. Insect Biochem. **20**, 325-330
- WEGENER, C. (2000) Periviscerokinins, new neuropeptides from the perisymphatic organs of cockroaches: distribution and myotropic mode of action. Doktorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- WEGENER, G., KRAUSE, U., THUY, M. (1990) Fructose 2,6-bisphosphate and glykolytic flux in skeletal muscle of swimming frog. FEBS Lett. **267**, 257-260

- WEGENER, G., MICHEL, R., NEWSHOLME, E. A.** (1986) Fructose 2,6-bisphosphate as a signal for changing from sugar to lipid oxidation during flight in locusts. *FEBS Lett.* **201**, 129-132
- WEHNER, R., GEHRING, W.** (1990) *Zoologie*. Thieme Verlag, Stuttgart
- WIENS, A. W., GILBERT, L. I.** (1965) Regulation of cockroach fat body metabolism by the corpus cardiacum *in vitro*. *Science* **150**, 614-616
- WIENS, A. W., GILBERT, L. I.** (1967) Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in *Leucophaea maderae*. *J. Insect Physiol.* **13**, 779-794
- WILLEY, R. B.** (1961) The morphology of the stomodaeal system in *P.a.* *J. Morph.*, **108**, 219-247
- WILLIS, E. R., LEWIS, N.** (1957) The longevity of starved cockroaches. *J. econ. Ent.* **50**, 438-440.
- WORDEN, M. K., O'SHEA, M.** (1986) Evidence for stimulation of muscle phosphatidylinositol metabolism by an identified skeletal motoneuron. *Soc. Neurosci. Abstr.* **12**, 948
- WYATT, G. R., KALF, G. F.** (1956) Trehalose in insects. *Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. exp. Biol.* **15**, 388
- [HTTP://WWW.ORKIN.COM/ORKIN.HTML](http://www.orkin.com/orkin.html) Cockroaches

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A_{0,5}-Wert	Konzentration eines Aktivators, die notwendig ist, um halbmaximale Aktivierung hervorzurufen	
Bld HrTH	hypertrehalosämisches Hormon (bei <i>Blaptica dubia</i>)	
BSA	bovines Serumalbumin (Albumin aus Rinderserum)	
CC	Corpora cardiaca	
CL	Citrat Lyase	EC 4.1.36
DTT	Dithiotreitol	
EC	engl.: enzyme comission - Klassifikationsnummer für Enzyme	
ε	millimolarer Extinktionskoeffizient (für NAD(P)H bei λ=340 nm : 6,22 cm ² · μmol ⁻¹)	
F₁	Verdünnungsfaktor	
F₂	Homogenisationsfaktor	
F1,6P₂	Fructose-1,6-bisphosphat	
F2,6P₂	Fructose-2,6-bisphosphat	
F6P	Fructose-6-phosphat	
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase	EC 3.1.3.11
Fg	Friergewicht [mg]	
F_H	Homogenisationsfaktor	
FW	engl.: formel weight - Molekulargewicht	
G1P	Glucose-1-phosphat	
G6P	Glucose-6-phosphat	
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	EC 1.1.1.49
GDH	α-Glycerophosphat-Dehydrogenase	EC 1.1.1.8
Hepes	4-(2-Hydroxymethyl)-1-piperazinethansulfonsäure	
HK	Hexokinase	EC 2.7.1.1
I_{0,5}-Wert	Konzentration eines Inhibitors, die notwendig ist, um eine halbmaximale Inhibierung hervorzurufen	
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat	
LDH	Lactatdehydrogenase	EC 1.1.1.28
MDH	Malatdehydrogenase	EC 1.1.1.37
PE	Polyethylen	
PEP	Phosphoenolpyruvat	
PFK	6-Phosphofructo-1-kinase	EC 2.7.1.11
PFK-2	6-Phosphofructo-2-kinase	EC 2.7.1.105
PGI	Phosphoglucoisomerase	EC 5.3.1.9

PGM	Phosphoglucomutase	EC 5.4.2.2
PK	Pyruvat-Kinase	EC 2.7.1.40
PP_i	anorganisches Pyrophosphat	
PP_i-PFK	Pyrophosphat: D-Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase	EC 2.7.1.90
rpm	engl.: rounds per minute - Umdrehungen pro Minute	
RT	Raumtemperatur	
S.E.M.	Standardabweichung des Mittelwertes	
TIM	Triosephosphat-Isomerase	EC 3.5.1.1
TRAP	Triethanolaminhydrochlorid	
Trh	Trehalose	
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	
U	Unit [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$] (Einheit der Enzymaktivität; 1U = 1 μmol Substratumsatz pro Minute)	
Upm	Umdrehungen pro Minute	
V_E	Volumen der EDTA-Lösung (zum Waschen der Sedimente)	
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb einer Testreihe	
V_N	Volumen der zur Neutralisation benötigten Lösungen Methylorange und K ₂ CO ₃	
V_{opt}	Reaktionsgeschwindigkeit, die bei optimalen Testbedingungen erreicht wird	
V_P	Volumen der Probe	
V_{PS}	Volumen Perchlorsäure	
V_T	Volumen des Tests	
♣	Startsubstanz in einem Enzymtest	

8. LEBENS LAUF

Name: Jana F. Liewald
 Geburtsdatum: 01. August 1971
 Geburtsort: Mainz-Mombach
 Adresse: Am Klosterberg 12
 55234 Bermersheim v.d.H.
 Telefon: 06731/42777
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1977 - 1981 St. Marien Grundschule, Alzey
 1981 - 1990 Gymnasium an der Frankenstraße, Alzey
 Mai 1990 Abitur

Studium: seit 1.10.90 Studium der Biologie (Diplom)
 an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
 3.5.93 Diplomvorprüfung (Biologie)

Diplomarbeit: "Hormonelle Regulation der Trehalosesynthese bei der
 Argentinischen Schabe (*Blaptica dubia*)"
 6. Mai 1997
 am Institut für Zoologie
 der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
 Abteilung II,
 Arbeitsgruppe Prof. G. Wegener

Gewährung eines
 Förderungsstipendiums
 im Rahmen der
 Graduiertenförderung: 1. Juli - 31. Dezember 1996
 1. November 1998 - 31. Oktober 1999

Beginn der Doktorarbeit: Juni 1997
 am Institut für Zoologie
 der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
 Abteilung II,
 Arbeitsgruppe Prof. G. Wegener

Anstellung am
 Pharmakologischen Institut
 der Universität Mainz: März 2000 - Februar 2001
 Arbeitsgruppe Prof. H. Nawrath
 Mitarbeit an einem BMBF Forschungsprojektes zum Thema
 Schmerzforschung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig und mit keinen anderen als den im Text angegebenen Mitteln angefertigt habe.

Mainz, Dezember 2001

(Jana F. Liewald)