

**Untersuchungen zur
Regulation der Trehalaseaktivität bei
der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria***

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

Claudia Sandra Macho
geb. in Mutlangen (Baden-Württemberg)

Mainz 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Wanderheuschrecken als gefürchtete Plagen und wertvolle Versuchstiere.	6
1.2	Der Flugstoffwechsel von Wanderheuschrecken.....	7
1.3	Trehalose als Blutzucker und Substrat für den Heuschreckenflug	10
1.4	Trehalase und Regulation der Trehalaseaktivität durch Enzymtranslokation – eine Arbeitshypothese	12
1.5	Trehalaseinhibitoren als Werkzeuge für Untersuchungen der Trehalaseformen in der Flugmuskulatur von <i>Locusta</i>	15
1.6	Ziele der Arbeit	17
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Haltung und Zucht von <i>Locusta migratoria</i>	19
2.2	Chemikalien und Lösungen.....	25
2.2.1	Chemikalien	25
2.2.2	Lösungen	27
2.2.3	Sonstiges	28
2.3	Injektion, Präparation und Gewebeaufarbeitung.....	29
2.3.1	Injektion von Substanzen und Entnahme von Hämolymphe	29
2.3.2	Präparation und Homogenisation von Organen	30
2.3.3	Fraktionierung von <i>Locusta</i> -Flugmuskulatur.....	33
2.4	Messung der Trehalaseaktivität.....	36
2.4.1	Einstufiger Trehalasetest.....	36
2.4.2	Zweistufiger Trehalasetest	38
2.4.3	Überprüfung des zweistufigen Trehalasetests: pH-, Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Trehalaseaktivität	42
2.4.4	Bewertung der Trehalasetests	47
2.5	Kohlenhydratbestimmung mit dem Anthrontest.....	49
2.6	Methodenüberprüfung: Stabilität der Trehalase und des Trehalase- Trehazolin Komplexes	51
2.7	Trehazolindosen, Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur	55
2.8	Trehazolinfütterung, Hämolymphezucker und Flugmuskeltrehalase	56
2.9	Langzeiteffekte von Trehazolin auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von <i>Locusta</i>	56

Inhaltsverzeichnis

2.10	Flug und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Heuschrecken nach Injektion von Trehazolin	57
2.11	Injektion von Insulin und Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur	59
2.11.1	Verabreichung von Insulin.....	59
2.11.2	Insulindosen und Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur	60
2.11.3	Insulin in intakten Heuschrecken und solchen ohne Kopf.....	60
2.12	Flug und Trehazolin in Kombination mit Wortmannin oder Insulin	61
2.12.1	Verabreichung von Wortmannin.....	61
2.12.2	Wortmannin, Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur	61
2.12.3	Insulin und Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur von <i>Locusta</i>	62
2.13	Trehalaseaktivität in Fraktionen verschiedener Organe.....	63
2.14	Zusammenarbeit	63
2.15	Statistik.....	64
3	Ergebnisse	65
	Allgemeines zur Auswertung und Darstellung	65
3.1	Effekte verschiedener Trehazolindosen auf Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von <i>Locusta</i>	65
3.2	Hämolymphezucker und Flugmuskeltrehalase in Wanderheuschrecken nach Fütterung mit Trehazolin	68
3.3	Langzeiteffekte von Trehazolin auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von <i>Locusta</i>	72
3.4	Effekte von Flug auf die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Heuschrecken, denen Trehazolin injiziert worden war.....	78
3.5	Effekte von Insulin auf die Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur	88
3.5.1	Wirkung verschiedener Insulindosen auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von <i>Locusta</i>	89
3.5.2	Insulin in intakten Heuschrecken und solchen ohne Kopf.....	96
3.6	Effekte von Flug und Trehazolin in Kombination mit Wortmannin oder Insulin auf die Hämolymphezucker sowie die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von <i>Locusta</i>	99

Inhaltsverzeichnis

3.6.1	Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Wortmannin	99
3.6.2	Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Insulin....	105
3.7	Wirkung von Trehazolin auf die Trehalaseaktivitäten in verschiedenen Organen von Locusta	108
4	Diskussion	114
4.1	Effekte verschiedener Trehazolindosen auf Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Locusta	116
4.2	Hämolymphezucker und Flugmuskeltrehalase in Wanderheuschrecken nach Fütterung mit Trehazolin	116
4.3	Langzeiteffekte von Trehazolin auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von Locusta.....	120
4.4	Effekte von Flug auf die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Heuschrecken, denen Trehazolin injiziert worden war.....	123
4.5	Effekte von Insulin auf die Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur	124
4.5.1	Allgemeines zu Insulin und Insulin-ähnlichen Peptiden in Insekten.....	124
4.5.2	Insuline in Insekten	126
4.5.3	Wirkung von Insulin in Insekten.....	128
4.6	Effekte von Flug und Trehazolin in Kombination mit Wortmannin oder Insulin auf die Hämolymphezucker sowie die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Locusta.....	131
4.6.1	Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Wortmannin	131
4.6.2	Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Insulin....	132
4.7	Wirkung von Trehazolin auf die Trehalaseaktivitäten in verschiedenen Organen von Locusta	133
4.8	Ausblick	135
5	Zusammenfassung.....	136
6	Literatur.....	138
7	Anhang	143

1 Einleitung

1.1 Wanderheuschrecken als gefürchtete Plagen und wertvolle Versuchstiere

Über Wanderheuschrecken gibt es viele, zum Teil sehr alte Berichte. Am bekanntesten ist in unserem Kulturkreis sicherlich der Bericht der Bibel (Exodus 10₁₂₋₁₅) über die von Gott gesandte Heuschreckenplage, durch die in Ägypten die gesamte Vegetation vernichtet wurde. Fast allen Berichten gemeinsam ist die Sicht, dass Wanderheuschrecken äußerst gefährliche Schädlinge sind, die die Nahrungsgrundlagen der Menschen vernichten können. Die Gefahr ist auch in heutiger Zeit keineswegs gebannt (Bethge 2004). Durch die Erforschung ihrer Biologie und moderne Überwachungsmethoden kann nun die Gefahr von Heuschreckenplagen quantifiziert werden. Falls den Larven reichlich Futter zur Verfügung steht, können die erwachsenen Tiere ca. 2 Gramm Körpergewicht erreichen und während ihrer Wanderflüge verzehren sie pro Tag etwa ihr eigenes Körpergewicht an Futter. Man schätzt, dass Riesenschwärme eine Ausdehnung von bis zu 1000km² haben, wobei 40 Millionen Tieren auf einen Quadratkilometer entfallen können. Folglich kann ein solcher Schwarm 40 Milliarden Tiere enthalten, die pro Tag bis zu 80 000 Tonnen Vegetation vernichten könnten (Steedman 1990). Wegen der Bedrohung, die von ihnen ausgeht, sind Wanderheuschrecken sehr intensiv untersucht worden.

Die Gefährlichkeit von Wanderheuschrecken beruht auf zwei Eigenarten dieser Tiere. Wanderheuschrecken existieren in zwei Formen (Phasen): einer solitären und einer gregären (= Wanderstadium, engl. gregarious phase). Bei ungünstiger Witterung (= Trockenheit) leben die Tiere einzeln und verstreut in isolierten Rückzugsgebieten. Fällt jedoch ausreichend Regen, so dass die solitär lebenden Heuschrecken reichlich Nahrung finden, so vermehren sie sich explosionsartig. Weibliche Tiere legen unter günstigen Bedingungen mehrere Gelege mit etwa je 70 bis 80 Eiern, die auch mehrere trockene Jahre im Boden überstehen können. Halten günstige Klimabedingungen für längere Zeit an, so leben die Tiere bald in großer Dichte und dies beeinflusst über Pheromone ihre Ontogenese und damit ihre Morphologie und ihr Verhalten, d.h. sie gehen von der solitären in die gregäre Phase

über. Die gregären Heuschrecken, zeigen eine andere Färbung und entwickeln längere Flügel. Schließlich entstehen sehr große Populationen. Hier kommt die zweite Besonderheit der Tiere zum Tragen, nämlich die Tatsache, dass die gregären Heuschrecken in Gruppen zusammenbleiben, die als Adulttiere Riesenschwärme von sehr ausdauernden Fluginsekten bilden, die große Distanzen überwinden und die Ernte ganzer Länder vernichten können.

Wanderheuschrecken sind aber nicht nur Schädlinge, sondern auch faszinierende Versuchstiere, da sie extreme physiologische Leistungen zeigen, die mit ihrem ausgezeichneten Flugvermögen in Zusammenhang stehen. Sie verfügen über gutes Seh- und Orientierungsvermögen und über eine sehr rasche Informationsverarbeitung im Nervensystem, um die Flugbewegungen zu steuern. Außerdem haben sie sehr kräftige und leistungsfähige Muskeln, die stoffwechselphysiologisch äußerst interessant sind (siehe 1.2). Wanderheuschrecken haben gegenüber Vertebraten und besonders Säugern als Versuchstiere viele Vorteile, nicht zuletzt weil sie kostengünstig und in großer Zahl erhältlich sind.

Die Tiere sind zudem groß genug für biochemische und physiologische Versuche. Ein weiterer Vorteil ist, dass Teile ihres Körpers isoliert für viele Stunden funktionsfähig bleiben und für Versuche genutzt werden können. Diese letzte Eigenschaft wird durch die für Insekten typische Form der Atmung ermöglicht, bei der Sauerstoff äußerst effizient in Gasform durch das Tracheensystem an die Orte des Verbrauchs gebracht wird (siehe 1.2). Insekten haben kein geschlossenes, sondern ein offenes Gefäßsystem, so dass die Organe nicht von Kapillaren durchzogen sind. Die Organe werden von der Hämolymphe umspült, und Substrate müssen aus dieser in die Gewebe diffundieren. Die Sauerstoff- und Substratversorgung der Organe ist daher bei Insekten viel weniger vom Herz-Kreislaufsystem abhängig als bei Wirbeltieren.

1.2 Der Flugstoffwechsel von Wanderheuschrecken

Wanderheuschrecken sind sehr kraftvolle und ausdauernde Flieger, sie können weite Strecken zurücklegen. So flogen Wüstenheuschrecken (*Schistocera gregaria*) unter Laborbedingungen in einer Flugapparatur 20 Stunden ohne Unterbrechung

(Weis-Fogh 1952). Bei freien Flügen hat man als mittlere Fluggeschwindigkeit 17 Kilometer pro Stunde bei einer Flügelschlagfrequenz von 23 Hertz gemessen (Baker und Gewecke 1981). Die Flugmuskulatur der Tiere arbeitet synchron, d.h. alle Kontraktionen werden von Nervensignalen ausgelöst (Beenakkers et al. 1984). Beim Fliegen nutzen die Tiere oft Luftströmungen, sie sind aber nicht fähig zu „segeln“, d.h. so lange sie in der Luft sind, bewegen sie ihre Flügel ständig mit Muskelkraft. Fliegende Wanderheuschrecken haben folglich einen sehr hohen Energiebedarf (Weis-Fogh 1952). Ganz allgemein ist die arbeitende Flugmuskulatur von Insekten das Gewebe mit dem höchsten ATP-Umsatz aller tierischen Organe. Die große Leistungsfähigkeit der Flugmuskulatur wird ermöglicht durch einen rein aeroben Energiestoffwechsel (Beenakkers 1969; Crabtree und Newsholme 1975; Wegener 1996).

Startet eine Heuschrecke einen Flug, so steigt der ATP-Umsatz ihrer Flugmuskulatur schlagartig sehr stark an. Durch Extrapolation ist geschätzt worden, dass der Sauerstoffverbrauch des gesamten Tieres sich dabei maximal auf das 70fache (Weis-Fogh 1952) erhöhen könnte. Da der Sauerstoff beim Flug ganz überwiegend von der Flugmuskulatur verbraucht wird, diese aber weniger als 20% des Körpergewichts einer Heuschrecke ausmacht, ergäbe sich eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Flugmuskulatur (und des ATP-Umsatzes) von über 350fach (Wegener 1990), wenn man voraussetzt, dass der Sauerstoffverbrauch in Ruhe dem Gewichtsanteil der Organe entspricht. Es handelt sich bei den obigen Angaben jedoch nicht um Mess-, sondern um Schätzwerte, die durch Extrapolation gewonnen wurden (Wegener 1990). Bei einem normalen Flug mit mittlerer Geschwindigkeit dürfte der ATP-Umsatz in der Flugmuskulatur ca. das 100fache des Ruhewertes ausmachen.

Der hohe Sauerstoffbedarf während des Fluges zeigt die Wichtigkeit einer effizienten Versorgung der Flugmuskulatur mit Sauerstoff. Sie wird über das ausgedehnte Tracheensystem gewährleistet, dessen feinste Verzweigungen (Tracheolen) in den Muskeln dicht an die zu Mitochondrien heranreichen (Übersicht bei Beenakkers et al. 1984). Die gute Versorgung mit Sauerstoff macht die Flugmuskulatur der Insekten zu den leistungsfähigsten Muskeln im Tierreich. Da die Flugmuskulatur völlig aerob arbeitet (Kammer und Heinrich 1978), spiegelt der Sauerstoffverbrauch fliegender Insekten den ATP-Verbrauch dieses Gewebes wieder. ATP muss ständig regeneriert werden, da sonst das Fliegen nur für den

Bruchteil einer Sekunde möglich wäre (Wegener et al. 1991). Eine Besonderheit des Flugstoffwechsels von Wanderheuschrecken ist eine zeitlich geordnete Substratwahl („fuel selection“), bei der Kohlenhydrate und Fette eine ausschlaggebende Rolle spielen (siehe unten). Das Zusammenspiel von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel ist generell sehr komplex und nicht gut verstanden. Das gilt auch für den Menschen, bei dem Störungen in der Regulation des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel zu schweren und langwierigen Krankheiten wie Diabetes mellitus führen können, die Patienten und das Gesundheitssystem stark belasten.

Wanderheuschrecken ermüden auch bei Langstreckenflügen nicht, sie können so lange fliegen bis ihre Energiereserven verbraucht sind (Weis-Fogh 1952). Die maximale Flugdauer der Tiere hängt direkt von den gespeicherten Reserven ab. Dabei spielen Lipide aufgrund ihrer hohen Energiedichte eine große Rolle, denn die Strecke, die eine Heuschrecke fliegend zurücklegen kann, hängt von der Menge der gespeicherten Fettreserven ab. An Heuschrecken konnte klar gezeigt werden, dass Skelettmuskeln Fett als wichtiges Energiesubstrat nutzen können (Krogh und Weis-Fogh 1951; Weis-Fogh 1952). Wanderheuschrecken sind daher geeignete Tiere („Modelle“) an denen man allgemein die Regulation des Stoffwechsels von leistungsfähigen Muskeln und speziell die Koordination von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel modellhaft studieren kann.

Die Bedeutung der Integration von Kohlenhydrat- und Fettoxidation wird deutlich, wenn man die Stoffwechselprozesse eines typischen Heuschreckenfluges genauer analysiert. In der Anfangsphase werden überwiegend Kohlenhydrate oxidiert, die als Glykogen in der Flugmuskulatur und als Blutzucker Trehalose in der Hämolymphe schnell verfügbar sind. Aber schon kurz nach Flugbeginn nimmt die Oxidation von Fetten stark zu, während der Abbau von Kohlenhydrat gedrosselt wird (Jutsum und Goldsworthy 1976). Fett hat einen mehr als doppelt so großen physiologischen Brennwert wie Kohlenhydrat, ist hydrophob und kann daher nahezu wasserfrei, d.h. mit hoher Energiedichte gespeichert werden. Fett wird bei Flugbeginn durch hormonelle Signale (adipokinetische Hormone) mobilisiert und vom Fettkörper in die Hämolymphe abgegeben. Nach ca. 30 Minuten Flug beruht der Energiestoffwechsel zu über 80% auf Lipid (Jutsum und Goldsworthy 1976). Die Umschaltung von Kohlenhydraten auf Fett als Hauptsubstrat kann nicht durch Erschöpfung der Kohlenhydratreserven erklärt werden, da auch nach längerem Flug noch reichlich Trehalose (siehe 1.3) in der Hämolymphe vorhanden ist. Vielmehr ist

eine Hemmung der Glykolyse in der Flugmuskulatur fliegender Heuschrecken zu fordern, deren Mechanismus allerdings lange Zeit unbekannt war. Klar war allerdings, dass anders als bei Vertebraten, Citrat als Inhibitor des glykolytischen Schlüsselenzyms Phosphofructokinase (PFK) hier keine Rolle spielen konnte, da die PFK von Insekten nicht durch Citrat gehemmt wird (Wegener 1987). 1980 wurde Fructose-2,6-bisphosphat ($F2,6P_2$), ein bis dahin unbekannter, sehr potenter Aktivator der PFK, in der Rattenleber entdeckt. $F2,6P_2$ ist kein Intermediat der Glykolyse oder eines anderen Stoffwechselweges, sondern ein Signalmolekül, das in der Leber bei der Umschaltung von Glykolyse (viel $F2,6P_2$) auf Gluconeogenese (wenig $F2,6P_2$) eine entscheidende Rolle spielt (Pilkis 1990). Spätere Untersuchungen zeigten, dass $F2,6P_2$ in allen Zellen von Eukaryoten vorhanden ist, die physiologische Funktion der Substanz ist aber in den meisten Organen, insbesondere der Skelettmuskulatur von Vertebraten, immer noch unbekannt. Für die Flugmuskulatur von *Locusta* wurde allerdings gezeigt, dass die abnehmende Glykolyseaktivität mit einem Abfall des Gehalts an $F2,6P_2$ um ca. 80% innerhalb von 10 Minuten Flug einhergeht (Wegener et al. 1986). Der Gehalt an $F2,6P_2$ in der Flugmuskulatur kann durch den Neurotransmitter Octopamin (entspricht dem Noradrenalin der Wirbeltiere) beeinflusst werden (Blau und Wegener 1994). Spezialisierte octopaminerge Neuronen versorgen die Flugmuskulatur, lösen aber keine Kontraktionen aus. Diese Nerven feuern bei ruhenden Heuschrecken und halten damit den $F2,6P_2$ -Gehalt in der Flugmuskulatur hoch (und die Heuschrecken startfähig), stellen jedoch bei Flugbeginn ihre Aktivität ein, wodurch $F2,6P_2$ abfällt und die Glykolyse gedrosselt wird (Mentel et al. 2003). Die Flugmuskeln von *Locusta* sind damit die Skelettmuskeln, für die die Kontrolle und Funktion von $F2,6P_2$ und die Steuerung der Glykolyse am besten verstanden sind. Eine große Kenntnislücke besteht allerdings darin, dass man nicht weiß wie die Versorgung der Flugmuskeln mit Glucose, dem Substrat der Glykolyse, gesteuert wird (siehe unten).

1.3 Trehalose als Blutzucker und Substrat für den Heuschreckenflug

In den ersten Minuten eines Fluges werden hauptsächlich Kohlenhydrate zur ATP-Gewinnung oxidiert, danach vor allem Fette (siehe 1.2). Kohlenhydrate

kommen im Körper von Wanderheuschrecken hauptsächlich als Glykogen (im Fettkörper) und als Trehalose (in der Hämolymphe) vor, während Glucose als Blutzucker quantitativ eine geringe Rolle spielt. Im Fettkörper von Heuschrecken werden die Zucker der Nahrung entweder als Glykogen gespeichert oder zu Trehalose umgewandelt und in die Hämolymphe abgegeben. Bei Bedarf an Blutzucker wird hormongesteuert (hypertrehalosämische Neuropeptide) das Glykogen des Fettkörpers mobilisiert, aber nicht wie von der Leber der Wirbeltiere als Glucose, sondern als Trehalose in die Hämolymphe abgegeben, wo dieser Zucker eine erhebliche Energiereserve darstellt. Trehalose kann allerdings nicht direkt, sondern erst nach Spaltung in Glucose, von den Geweben verwertet werden (siehe unten). *Locusta* besitzt offenbar kein Organ, das (wie die Leber der Wirbeltiere) direkt und in ausreichendem Maße Glucose durch Gluconeogenese produzieren kann. Daher kommt der Trehalase (EC 3.2.1.28; α - α -Trehalose-1-D-Glucohydrolase), dem Enzym, das die Hydrolyse von Trehalose katalysiert, essentielle Bedeutung zu. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass bei Hemmung der Trehalase der Blutglucosespiegel auf sehr niedrige Werte abfällt und die Tiere an einer tödlichen Hypoglykämie verenden können (Wegener et al. 2003).

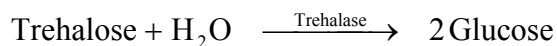
Es stellt sich natürlich die Frage, warum Heuschrecken (und viele andere Insekten) nicht, wie die Wirbeltiere, allein Glucose als Blutzucker nutzen. Zwar findet sich in der Hämolymphe von Heuschrecken auch Glucose, die Konzentration ist aber im Vergleich zu der von Trehalose sehr gering. So hat *Locusta* einen Hämolympheglucosespiegel von weniger als 5mM, d.h. weniger als 1g pro Liter, während oft mehr als 20 Gramm Trehalose pro Liter (über 60mM) in der Hämolymphe zu finden sind (Becker et al. 1996; Wegener et al. 2003). Die Antwort ist in der für Insekten typischen Anatomie in der Stoffwechselphysiologie der Heuschrecken und in der chemischen Struktur der beiden Zucker begründet. Wie schon erwähnt besitzen Wanderheuschrecken ein offenes Blutgefäßsystem. Die Organe sind nicht kapillarisiert und werden von der Hämolymphe nur umspült. Deshalb muss die Konzentration von Blutzucker relativ hoch sein, um die Organe ausreichend versorgen zu können (Crabtree und Newsholme 1975). Glucose ist jedoch in der offenkettigen Form aufgrund ihrer reaktiven freien Aldehydgruppe relativ toxisch. Die Folge hoher Glucosekonzentrationen sind vermehrte nicht-enzymatische Glykosylierungen von Proteinen, die deren Funktion stören würden. Die Situation wäre vergleichbar mit Diabetes mellitus beim Menschen. Da viele

Insekten Trehalose als Hauptblutzucker verwenden, tritt bei ihnen dieses Problem nicht auf. Denn Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über eine α -1-1-Bindung miteinander verknüpft sind (Strukturformel siehe Abbildung 12). Durch die Bildung dieses Dissaccharids wird die Zuckerkonzentration und damit der osmotische Wert bei gleichem Energiegehalt halbiert. Viel wichtiger ist jedoch, dass durch die Art der Verknüpfung die beiden Aldehydgruppen eliminiert werden, so dass Trehalose ohne die Tiere zu schädigen, in hoher Konzentration in der Hämolymphe vorliegen kann (siehe Wegener et al. 2003).

Trehalose ist nicht nur als Substrat für den Energiestoffwechsel von Glucose und als Lieferant von Bausteinen für Synthesen wichtig, sondern hat auch Eigenschaften, die für Physiologie und Biotechnologie generell interessant sind. Trehalose ist im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet (Elbein 1974), und wird von vielen Organismen in Stresssituationen wie Hitze, Trockenheit oder Kälte vermehrt gebildet. Trehalose schützt Membranen und Proteine, indem es deren Strukturen stabilisiert. Über die Mechanismen, mit denen die Wirkungen erzielt werden, ist jedoch nicht viel bekannt (Übersicht bei Elbein et al. 2003).

1.4 Trehalase und Regulation der Trehalaseaktivität durch Enzymtranslokation – eine Arbeitshypothese

Die Trehalase (α , α -Trehalose-1-D-Glucohydrolase, EC 3.2.1.28) katalysiert die unter physiologischen Bedingungen irreversible hydrolytische Spaltung von Trehalose in zwei Glucosemoleküle:



Die von der Trehalase katalysierte Reaktion ist im wässrigen Milieu stark exergonisch, d.h. energetisch begünstigt und damit unter physiologischen Bedingungen irreversibel. Daher würde aktive Trehalase praktisch alle vorhandene und erreichbare Trehalose spalten und so die Glucosekonzentration in der Hämolymphe stark erhöhen. Der Trehalosegehalt in der Hämolymphe von *Locusta* bleibt jedoch auch bei sehr unterschiedlichen Raten der Trehalaseoxidation recht stabil (Van der Horst et al. 1978). Ähnliches gilt für den Glucosespiegel der Hämolymphe. Daraus ergibt sich, dass sowohl die Synthese von Trehalose als auch

die Aktivität der Trehalase reguliert sein müssen, so dass Glucose als Produkt der Trehalase entsprechend dem Bedarf bereitgestellt werden kann. Obwohl seit mehreren Jahrzehnten die Trehalase der Flugmuskulatur von Heuschrecken und anderen Insekten mit synchroner Flugmuskulatur erforscht wird (siehe z.B. Zebe und McShan 1959, Gilby et al. 1967 und Wyatt 1967), ist der Regulationsmechanismus ungeklärt. Die üblichen Kontrollmechanismen für Enzymaktivitäten, wie allosterische Modulation durch Metabolite, Steuerung durch Second Messenger (zum Beispiel cAMP oder Calciumionen) oder Interkonversionen, konnten durch sorgfältige Versuche ausgeschlossen werden (Worm 1981, Müller 1991 Dissertation, Übersichten bei Becker et al. 1996 und Candy et al. 1997).

Der Zeitverlauf und die Dynamik des Trehalosestoffwechsels während des Fluges von *Locusta* sind von van der Horst et al. (1978) sorgfältig untersucht worden. Die potentielle Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur ist deutlich höher als in anderen Organen (siehe Ergebnisse 3.7). In ruhenden Insekten setzt die Trehalase jedoch nur sehr wenig Trehalose um, d.h. die aktuelle Aktivität der Trehalase der Flugmuskulatur nicht-fliegender Tiere ist gering. In der Anfangsphase eines Fluges steigt die Hydrolyse von Trehalose stark an, und die Konzentration der Trehalose in der Hämolymphe fällt ab, d.h. die aktuelle Trehalaseaktivität ist viel höher als in ruhenden Tieren. Bei längeren Flügen oxidieren die Tiere vor allem Fettsäuren (siehe 1.2) und die Trehalosekonzentration in der Hämolymphe bleibt (durch Neusynthese) relativ konstant bei etwa der Hälfte der Ausgangskonzentration, d.h. die aktuelle Trehalaseaktivität nimmt wieder stark ab.

Wir vermuten, dass die katalytische Aktivität der Trehalase durch einen neuartigen Mechanismus der Enzymregulation, nämlich durch eine Translokation des Enzyms, gesteuert wird (siehe Abbildung 1) und wir wollen für diese Arbeitshypothese Indizien sammeln. Es gibt schon einige Beobachtungen die mit unserer Hypothese vereinbar sind.

Die Trehalase der Flugmuskulatur von *Locusta* ist an Membranen gebunden und erscheint nach Zellfraktionierung in der Mikrosomenfraktion. Nach schonender Homogenisation der Flugmuskulatur ist im Gewebehomogenat nur ein geringer Anteil der gesamten Aktivität nachweisbar, die (in vitro) *overte* Trehalase (siehe Abbildung 17 oder Ausklappblatt am Ende der Arbeit). Der größte Teil der Trehalase, die (in vitro) *latente* Trehalase, wird erst nach Zerstörung der Membranintegrität (z.B. durch Detergens oder durch wiederholtes Einfrieren und

Auftauen) messbar, d.h. das Substrat Trehalose ist vermutlich von der (in vitro) *latenten* Trehalase durch intakte Membranen abgeschildert.

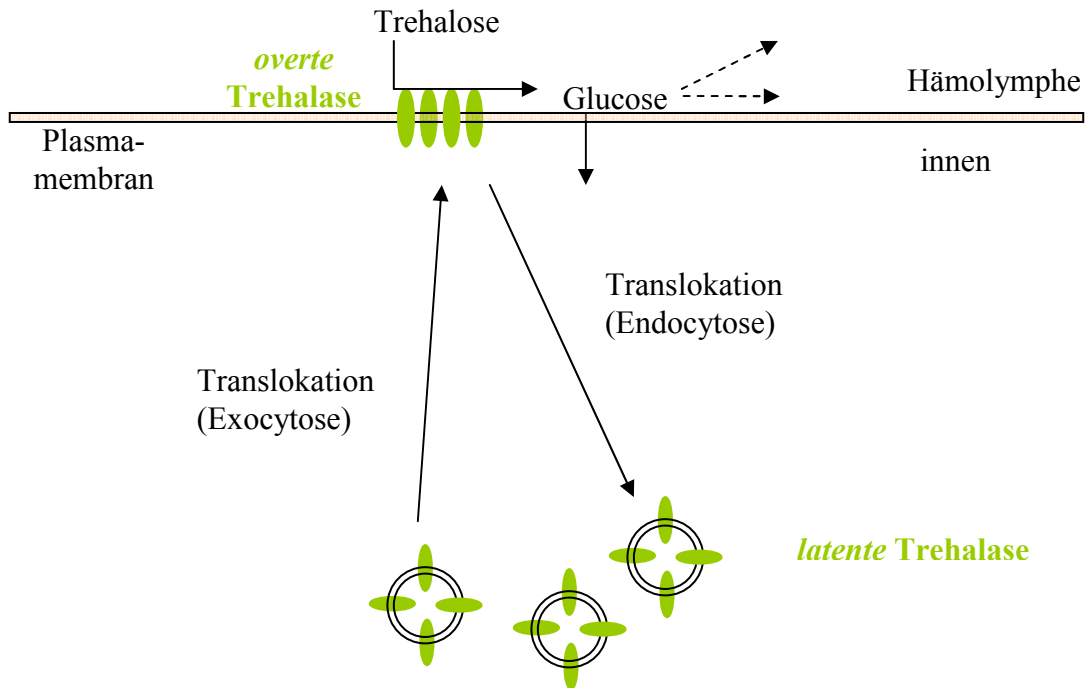


Abbildung 1. Translokationsmodell der Steuerung der Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur der Wanderheuschrecke (Vesikelhypothese). Unsere Arbeitshypothese postuliert, dass Trehalase in den Muskelzellen in inaktiver (*latente*) Form in Membranvesikeln gespeichert ist, die bei Bedarf mit der Außenmembran verschmelzen, so dass das Enzym mit dem Substrat Trehalose in der Hämolymphe in Kontakt kommt und Trehalose gespalten werden kann. Das Produkt Glucose kann in die Zelle transportiert oder mit der Hämolymphe verteilt werden.

Eine für die Beurteilung unserer Hypothese wesentliche Frage ist nun, in welcher Form die (in vitro) *overtre* beziehungsweise die (in vitro) *latente* Form in vivo d.h. in der Flugmuskulatur von intakten Heuschrecken vorliegt. Hierzu gibt es einen wichtigen Hinweis. Die Trehalase der Flugmuskulatur von *Locusta* ist ein Glykoprotein (unveröffentlicht). Bei membrangebundenen Glykoproteinen zeigen die Zuckerreste stets entweder zum Zelläußeren (falls das Enzym an die Plasmamembran gebunden ist) oder zum Lumen (falls eine Bindung an Endomembranen, z.B. des Golgi Apparats oder von Vesikeln vorliegt). Trehalose ist zu groß und zu hydrophil, als dass sie intakte Membranen ohne einen Transporter durchdringen könnte. Für die Flugmuskulatur von *Locusta* ist jedoch ein Transporter

für Trehalose nicht beschrieben worden. Wir vermuten daher, dass die *in vivo* aktive Trehalase so an die Plasmamembran gebunden ist, dass das aktive Zentrum zur Hämolymphe hin zeigt, in der sich das Substrat befindet. Die Trehalase der Flugmuskulatur würde folglich als Ektoenzym aktiv sein. Wir vermuten weiterhin, dass das aktive Zentrum der *latenten* Trehalase (*in vivo*) durch Membranen vom Substrat Trehalose abgeschirmt ist und die Aktivitätsregulation der Trehalase nicht am Enzymmolekül selbst ansetzt, sondern an der Membranumgebung (siehe nächsten Absatz). Weiterhin nehmen wir an, dass die Enzymaktivierung reversibel ist, d.h. dass die akute Trehalaseaktivierung nicht auf Enzymsynthese oder partieller Proteolyse beruht. Diese Annahme ist gleichbedeutend damit, dass die Summe aus *overter* und *latenter* Trehalase in der Flugmuskulatur konstant ist. Diese Annahme wird durch alle bisherigen Ergebnisse gestützt (siehe z.B. Candy 1974). Damit würde sich die Trehalase von anderen Hydrolasen, z.B. Verdauungsenzymen, die in den Darmtrakt abgegeben werden, aber auch von anderen Ektoenzymen, z.B. solchen, deren Substrate sich im Darmlumen befinden, unterscheiden.

1.5 Trehalaseinhibitoren als Werkzeuge für Untersuchungen der Trehalaseformen in der Flugmuskulatur von *Locusta*

Bisher ist nicht bekannt, wo in den Muskelzellen die (*in vitro*) beobachteten Trehalaseformen lokalisiert sind. Jedoch gibt es einige Hinweise auf die Lokalisation der gebundenen *overten* Trehalase der Flugmuskulatur. Diese wurden in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe des kompetitiven Trehalaseinhibitors Trehazolin gewonnen, der 1991 von Ando et al. erstmals beschrieben und uns von Dr. Ando (Tokyo) für Experimente zur Verfügung gestellt wurde (siehe Wegener et al. 2003). Trehazolin ist ein Pseudozucker, dessen Struktur (Abbildung 12) wahrscheinlich der Struktur des Übergangszustandes der Trehalose bei der Katalyse ähnelt, und der sehr fest an das aktive Zentrum der Trehalase bindet, aber nicht gespalten werden kann (Ando et al. 1995). Die apparente Inhibitorkonstante K_i des Trehazolins von 10^{-8}M zeigt, dass dieser kompetitive Inhibitor eine sehr viel größere Affinität zum aktiven Zentrum der Trehalase besitzt als Trehalose (K_m ca. 10^{-3}M , siehe Wegener et al. 2003). Trehazolin ist wie Trehalose sehr hydrophil und kann deshalb Membranen ohne Transporter nicht durchdringen.

Wurde der Inhibitor in die Hämolymphe von *Locusta* injiziert, so war im Homogenat der Flugmuskulatur die (in vitro) *overte* Trehalaseform fast vollständig gehemmt, während die *latente* Trehalaseform nur wenig beeinträchtigt wurde (Wegener et al. 2003). Daraus kann man schließen, dass das aktive Zentrum der (in vitro) *overten* Trehalaseform in vivo für Trehazolin zugänglich gewesen sein muss, das aktive Zentrum der (in vitro) *latenten* Form hingegen weniger oder gar nicht. Da Trehazolin intakte Zellmembranen vermutlich nicht durchdringen kann, muss das aktive Zentrum der *overten* Trehalase von der Hämolymphe aus zugänglich gewesen sein. Dem entspricht die schon erwähnte Entdeckung in unserer Arbeitsgruppe (unpubliziert), dass Trehalase aus der Flugmuskulatur von *Locusta* ein Glykoprotein ist und Glykoproteine der Zellmembran stets extrazelluläre Bereiche haben. Das aktive Zentrum der *latenten* Trehalaseform hingegen muss während der Wirkdauer des Trehazolins durch Membranen vom Inhibitor (weitgehend) abgeschirmt gewesen sein.

Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die in vitro *overte* Form in vivo zum großen Teil in der Plasmamembran lokalisiert ist und daher deren aktives Zentrum während der Wirkdauer des Inhibitors für diesen zugänglich war. Die in vitro *latente* Form der Trehalase hingegen könnte, entsprechend unserer Arbeitshypothese, in vivo in Vesikeln im Zellinneren lokalisiert sein (siehe Abbildung 1). Bei steigendem Energiebedarf der Flugmuskeln, ausgelöst zum Beispiel durch Flug, wird die Aktivität der *overten* Trehalase offenbar erhöht. Unsere Hypothese besagt, dass die (in vitro) *latente* Trehalase in der Flugmuskulatur von *Locusta* an die Membranen von Vesikeln gebunden ist, wobei das aktive Zentrum zum Vesikellumen weist und dass es in der Flugmuskulatur einen Translokationsmechanismus gibt, der die Verschmelzung dieser *latente* Trehalase enthaltenden Vesikel mit der Plasmamembran bewirkt. Nach der Verschmelzung wäre die zuvor (in vivo) *latente* Trehalase der Vesikel nun an die Plasmamembran gebunden und würde mit dem aktiven Zentrum zur Hämolymphe hin orientiert vorliegen und damit für das Substrat zugänglich sein.

Ein solcher Mechanismus für die reversible Regulation der Aktivität eines Enzyms bekannter Funktion ist bisher nicht beschrieben worden. Reversible Translokation von Transportern ist allerdings bekannt. Das am besten untersuchte Beispiel ist der für die Skelettmuskulatur und das Fettgewebe von Säugern typische Glucosetransporter 4 (GLUT-4). GLUT-4 ist als integrales Protein überwiegend in

der Membran von Vesikeln vorhanden, die bei erhöhtem Glucosespiegel durch Insulin zur Verschmelzung mit der Plasmamembran stimuliert werden (für eine Übersicht siehe (Ishiki und Klip 2005)) und durch vermehrte Aufnahme von Glucose in Muskulatur und Fettgewebe den Glucosespiegel schnell auf den Normwert senken.

1.6 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der Arbeit war, zu prüfen ob ein festbindender Inhibitor der Trehalase (in diesem Fall Trehazolin) als Werkzeug genutzt werden kann, um Hinweise auf den Mechanismus der reversiblen Regulation der Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur von *Locusta* zu erhalten. Hierzu wurden folgende Experimente durchgeführt.

1. Homogenisation und Fraktionierung der Flugmuskulatur, um die verschiedenen Formen, insbesondere die *overt* und *latente* Form (siehe Abbildung 17 oder Ausklappblatt am Ende der Arbeit) zu erfassen.
2. Die Wirkung des in die Hämolymphe injizierten Trehalaseinhibitors Trehazolin auf die Aktivitäten der Trehalase in Fraktionen der Flugmuskulatur sollte gemessen werden, und zwar in Abhängigkeit von der Trehazolindosis und der Wirkzeit des Trehazolins.
3. Es sollte geprüft werden, ob Trehazolin an Heuschrecken verfüttert werden kann und welche Effekte dies auf die Gehalte an Trehalose und Glucose in der Hämolymphe, sowie auf die Trehalaseaktivitäten in den Fraktionen der Flugmuskulatur hat.
4. In einem Langzeitversuch sollte getestet werden, wie lange die Hemmwirkung einer subletalen Dosis von Trehazolin auf die verschiedenen Formen der Trehalaseaktivität anhält und welchen Zeitverlauf die Erholung der Trehalaseaktivitäten zeigt. Dieser Versuch sollte auch Hinweise auf mögliche Beziehungen zwischen *latenter* und *overter* Trehalase geben.
5. Die Wirkung von Flugaktivität auf die Aktivitäten der verschiedenen Trehalaseformen sollte bei Versuchstieren analysiert werden, denen Trehazolin injiziert worden war im Vergleich zu Kontrolltieren, die mit Ringerlösung injiziert worden waren.

6. Insulin stimuliert in der Muskulatur von Säugetieren die reversible Verschmelzung von intrazellulären Vesikeln mit der Außenmembran, Wortmannin hemmt diesen Prozess. Die Effekte von Insulin und Wortmannin auf die verschiedenen Formen der Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur wurden daher analysiert.

7. Es wird diskutiert, ob die Ergebnisse der Versuche mit der Arbeitshypothese vereinbar sind, nach der die Regulation der Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur von *Locusta* auf einer reversiblen Translokation von trehalasehaltigen Vesikeln vom Cytoplasma in die Außenmembran der Muskelzellen beruht.

2 Material und Methoden

2.1 Haltung und Zucht von *Locusta migratoria*

Die Wanderheuschrecken (*Locusta migratoria*) wurden von HW-Terra (Tropische Fauna Münster, 45699 Huten) erworben bzw. nach der Anleitung von (Hunter-Jones 1966) selbst gezüchtet.

Die Heuschrecken wurden im Tierhaus bei ca. 30°C und 30 bis 40 Prozent Luftfeuchtigkeit in Käfigen von 40cm x 20cm x 40cm gehalten (Abbildung 2). Die Käfige wurden mit einer 40 Watt Glühbirne 24 Stunden beleuchtet und erwärmt. Der Boden bestand aus einer auswechselbaren Platte mit Löchern, durch die der Kot nach unten fallen konnte. Zusätzlich befand sich im vorderen Teil eine im Durchmesser ca. 5 Zentimeter breite, runde Aussparung, unter die ein Eiablagegefäß gestellt, oder die mit einer Abdeckung verschlossen werden konnte. An der Frontseite befand sich eine auswechselbare Plexiglasscheibe, durch die man die Tiere beobachten konnte. Zusätzlich waren in jedem Käfig ein oder mehrere Zweige vorhanden, an denen die Heuschrecken hochklettern konnten und die ihnen als Sitz- oder Haltemöglichkeit, zum Beispiel während der Häutung, dienten (Abbildung 10).

Die Heuschrecken wurden im Sommer mit frischem Gras von der Universitätswiese nahe dem Tierhaus und mit Weizenkleien (Das gesunde Plus, DM-Drogeriemarkt in 76185 Karlsruhe) versorgt. Im Winter erhielten die Tiere nur Weizenkleie. Zusätzlich wurde ihnen ständig Wasser aus mit Wattebäuschen verschlossenen, liegenden Glasgefäßen angeboten. Jeden zweiten Tag wurden die Käfige gereinigt und Wasser hinein gesprüht.



Abbildung 2. Käfig für *Locusta migratoria*. Der linke Käfig ist mit adulten *Locusta* besetzt, der rechte dient der Aufzucht nach dem Schlupf der Jungtiere. Vorne befand sich eine aufschiebbar Frontscheibe, von oben konnte in die Käfige gegriffen werden. Die linke Bodenplatte hatte große Löcher, durch die der Kot hindurchfallen konnte. Die rechte Bodenplatte hatte kleinere Löcher, damit Jungtiere nicht entweichen konnten.

Die Buchstaben bedeuten folgendes:

- A. Zweig als Sitzgelegenheit
- B. frisches Grünfutter (Gras)
- C. Loch in der Abdeckplatte unter das Eiablagegefäße gestellt werden können
- D. Eiablagegefäß
- E. Beleuchtung (40 Watt Glühbirne)
- F. Eiablagegefäß mit Eiern (verschlossen mit Parafilm)
- G. Schale mit Trockenfutter (Weizenkleie)
- H. mit Watte verschlossenes Trinkgefäß

Weibliche Heuschrecken besitzen einen Legebohrer, mit dem sie Eipakete von 70 bis 80 Eiern ablegen. Für die Zucht wurden ihnen mit feuchtem Sand befüllte Gläser, die unter die Aussparung der Bodenplatte gestellt wurden, zur Eiablage angeboten (Abbildung 2). Die Behälter wurden jede Woche ausgewechselt, und Gläser, die Eier enthielten, wurden mit Parafilm bis auf eine kleine Öffnung verschlossen, um ein Austrocknen der Gelege zu verhindern. Diese Behälter wurden dann in einen Käfig gestellt, der mit einer Bodenplatte mit kleineren Löchern versehen war. Da junge Heuschrecken sehr klein sind, wurden alle Öffnungen des Käfigs mit Textilband abgeklebt, um ein Entweichen der Tiere zu verhindern (Abbildung 3).

Nach 10 bis 14 Tagen schlüpften aus den befruchteten Eiern kleine ca. 5 Millimeter große Hüpfer, die das gleiche Futter wie die adulten Tiere erhielten. Nach der zweiten Häutung (nach ca. 5 Tagen, Abbildung 4) wurden die Tiere bis zur Adulthäutung in einen anderen Käfig umgesiedelt. Nach der letzten (= 5.) Häutung (nach ca. 18 Tagen, Abbildung 8 bis Abbildung 11) wurden die adulten Tiere wieder in einen neuen Käfig gesetzt, der mit dem Datum der Adulthäutung beschriftet wurde. Für die Versuche wurden Tiere im Alter von zwei bis vier Wochen nach der Adulthäutung verwendet.

Die Fertilität der Heuschrecken war abhängig von der Jahreszeit und vom Futter. Nur wenn frisches Gras gefüttert wurde, produzierten die Tiere befruchtete Eier. Ein Nachlassen der Fertilität zeigte sich im Herbst am Absinken der Nachkommenzahl und an der abnehmenden Größe der Tiere. Auch im Verhalten reagierten die Heuschrecken auf den Wechsel der Jahreszeiten. Mit Beginn des Frühjahres waren sie lebhafter und leichter zum Flug zu stimulieren als im Winter.



Abbildung 3. Blick in einen Aufzuchtkäfig mit Locusta im zweiten Larvalstadium (5 Tage nach dem Schlupf). Der Käfig war mit Textilband abgeklebt, um ein Entweichen der Tiere zu verhindern.



Abbildung 4. Nahaufnahme zweier Locusta im 2. Larvalstadium (Größe ca. 14mm, ca. 5 Tage nach dem Schlupf).



Abbildung 5. Nahaufnahme einer Locusta im 3. Larvalstadium (Größe ca. 30mm, ca. 10 Tage nach dem Schlupf).



Abbildung 6. Nahaufnahme einer Locusta im 4. Larvalstadium (Größe ca. 34mm, ca. 14 Tage nach dem Schlupf).



Abbildung 7. Nahaufnahme einer Locusta im 5. Larvalstadium (Größe ca. 38mm, ca. 18 Tage nach dem Schlupf).



Abbildung 8. Adulthäutung von Locusta. Schlüpfen aus der alten Körperhülle, die mit dem Exoskelett der „alten Beine“ an der Befestigung verbleibt.



Abbildung 9. Adulthäutung von Locusta. Ausbreitung der Flügel durch Einpumpen von Hämolymphe (ca. 20 Minuten nach der Häutung).



Abbildung 10. Adulthäutung von Locusta.

Phase des Einpumpens von Hämolymphe zur vollständigen Entfaltung der Flügel: Ausbreitung der Flügel (Tier rechts, ca. 45 Minuten nach der Häutung), Zusammenfalten der Flügel (Tier links, ca. 75 Minuten nach der Häutung)



Abbildung 11. Adulthäutung von Locusta.

Beginnende Dunkelfärbung der Flügel (Tier links, ca. 2 Stunden nach der Häutung)

2.2 Chemikalien und Lösungen

2.2.1 Chemikalien

Feinchemikalien wurden von Sigma-Aldrich (82024 Taufkirchen), Enzyme und das Detergens Triton X-100 von Roche Diagnostics GmbH (68305 Mannheim) bezogen. Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck (64293 Darmstadt) und Serva Feinbiochemica GmbH & Co (69115 Heidelberg) geliefert.

Insulin und Wortmannin wurden von Sigma-Aldrich (82024 Taufkirchen) erworben.

Trehazolin (Abbildung 12 rechts)

Der Trehalaseinhibitor Trehazolin (Ando et al. 1991; Ando et al. 1995) wurde von Dr. O. Ando (Sankyo Co. Ltd., Tokio/Japan) kostenlos zur Verfügung gestellt.

Trehazolin ist ein sehr starker kompetitiver Inhibitor der Trehalase, der von Ando et al. (1991) beschrieben wurde. Sein Hemmeffekt beruht auf der großen Ähnlichkeit mit dem Substrat Trehalose (Abbildung 12 links). Trehazolin bindet mit wesentlich höherer Affinität als Trehalose an das aktive Zentrum der Trehalase, kann jedoch nicht hydrolysiert werden. Auf diese Weise blockiert Trehazolin die Trehalaseaktivität.

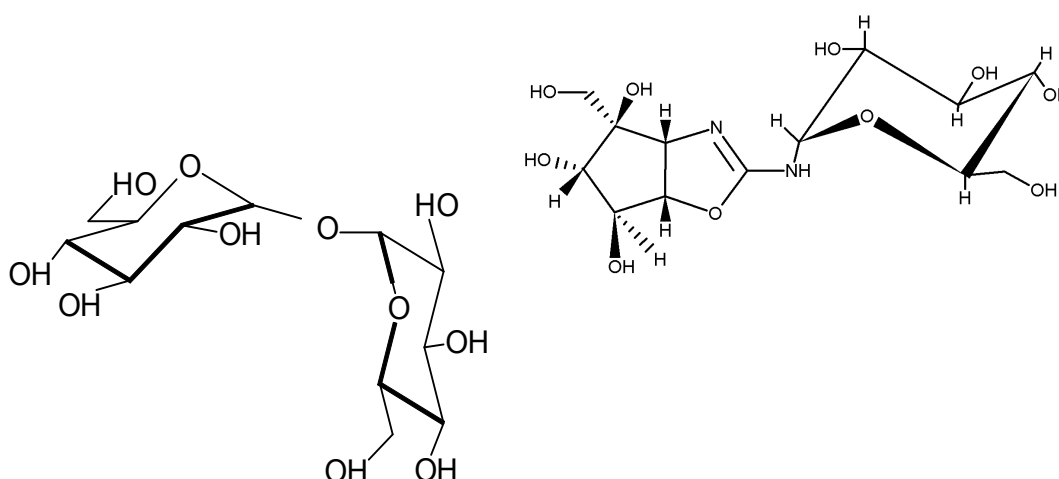


Abbildung 12. Strukturformeln von Trehalose (links) und Trehazolin (rechts)

Die apparente Inhibitorkonstante K_i (= Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes) für Trehalase aus der Flugmuskulatur von *Locusta* liegt bei 8nM ($= 8 \times 10^{-9}$ M) Trehazolin. Die IC_{50} wurde bei einer Trehalosekonzentration von 20mM, pH 6,5 ohne vorherige Inkubation mit dem Inhibitor gemessen und ergab 120nM Trehazolin, d.h. bei 120nM Trehazolin war die Aktivität der Trehalase unter den gewählten Bedingungen um 50% erniedrigt (Wegener et al. 2003).

Trehazolin ist wie Trehalose sehr hydrophil und kann deshalb intakte Zellmembranen nicht durchdringen, es verbleibt daher nach einer Injektion in die Körperhöhle vermutlich in der Hämolymphe. In unserer Arbeitsgruppe wurde entdeckt, dass Trehazolin selektiv die *overte* Trehalase (siehe 1.4 und Abbildung 17) hemmt und dass dadurch eine Unterscheidung zwischen (in vivo) *overter* und *latenter* Trehalaseaktivität möglich sein könnte. Gemäß unserer Hypothese muss das aktive Zentrum blockierter Trehalasemoleküle bei der Bindung von Trehazolin Kontakt mit der Hämolymphe gehabt haben, d.h. die Trehalase muss (in vivo) *overt* gewesen sein. Die *latente* Trehalase hingegen scheint (in vivo) durch Zellmembranen vor dem Inhibitor, der auf die Hämolymphe beschränkt ist, geschützt gewesen zu sein (siehe auch Ergebnisse und Diskussion).

Trehazolin in hohen Dosen (50µg pro Tier) führte bei 50% der *Locusta* zum Tod innerhalb von 24 Stunden. Durch welchen Mechanismus der letale Effekt von Trehalaseinhibitoren bewirkt wird, war viele Jahre unklar. Experimente aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass an dem tödlichen Effekt eine starke Hypoglykämie (sehr starker Abfall der Glucosekonzentration in der Hämolymphe) beteiligt ist, da Fütterung der Heuschrecken mit Glucoselösung die Tiere die tödliche Dosis überleben ließ (Wegener et al. 2003).

2.2.2 Lösungen

Adenosin 5-Triphosphat. 25mM, neutralisiert mit NaOH. Die Neutralisation ist wichtig, da ATP im Sauren sehr labil ist.

Anthronreagenz. Konzentrierte Schwefelsäure wurde mit Aqua dest. auf 72% (v/v) verdünnt (erst das Wasser, dann die Säure zugeben) und darin 0,05% Anthron (w/v) und 1% Thioharnstoff (w/v) gelöst (in lichtundurchlässiger Flasche aufbewahren, Haltbarkeit ca. 4 Wochen)

Dimethylsulfoxid (DMSO)-Ringer. 1 Teil DMSO (von Sigma-Aldrich), 9 Teile Insektenringer

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (700U/ml). 10,5 U/ml G6PDH in TRAP
Von der Enzymsuspension in Ammoniumsulfatlösung (700U/ml) wurden 15µl, entsprechend 10,5U, in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5412) bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Enzymsediment in 1ml TRAP gelöst.

Hexokinase (1500U/ml). Von der Enzymsuspension in Ammoniumsulfatlösung (1500U/ml) wurden 11µl, entsprechend 16,75U, in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5412) bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 1ml TRAP gelöst.

Insektenringer (Hoyle 1953). 130mM NaCl, 10mM KCl, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 6mM NaH₂PO₄, 4mM NaHCO₃. Der pH-Wert war ca. 6,5.

Insulin-Stammlösung

1mg Insulin wurde in 10µl Eisessig (konzentrierte Essigsäure) gelöst und auf 1ml mit Insektenringer aufgefüllt (siehe Produktdatenblatt von Sigma-Aldrich).

Kaliumcarbonatlösung. 5M K₂CO₃

Magnesiumchloridlösung. 250mM MgCl₂

Maleatpuffer (= Homogenisationspuffer), pH 6,5. 50mM Maleinsäure, eingestellt mit NaOH

Natriumacetatpuffer, pH 6,5. 300mM Natriumacetat, eingestellt mit HCl

Perchlorsäure. 15% HClO₄ (v/v)

Triethanolaminhydrochlorid-Puffer (TRAP), pH 7,6. 300mM TRA, eingestellt mit NaOH

Trehaloselösung. 500mM Trehalose in Aqua dest.

Wortmannin Stammlösung. 2mM Wortmannin (von Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen) in DMSO-Ringer. Es wurde 1 Milliliter 2mM Wortmannin-Stammlösung in DMSO-Ringer angesetzt und anschließend jeweils 50µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat. 15mM NADP⁺

2.2.3 Sonstiges

durchsichtige **Plastikschälchen** mit Deckel (10,5cm * 7cm * 4cm) von Büro Wahlich (55120 Mainz), ab 2007 von F.u.G. Gude GmbH (48432 Rheine)

Weizenkleie. Das gesunde Plus (hergestellt für DM-Drogeriemarkt, 76185 Karlsruhe)

2.3 Injektion, Präparation und Gewebeaufarbeitung

2.3.1 Injektion von Substanzen und Entnahme von Hämolymphe

Die Tiere wurden zur Injektion von Trehazolin oder anderen Lösungen dorsal in eine mit Wachsboden gefüllte Präparierschale gelegt und mit einem Gummiband, das zwischen zwei Stecknadeln gespannt wurde, über dem Thorax fixiert (Abbildung 13).

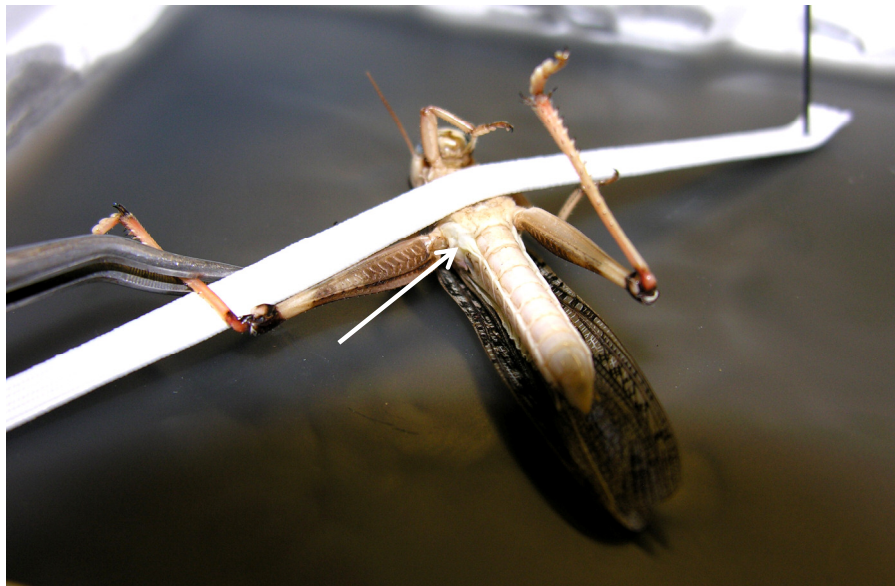


Abbildung 13. Fixierung eines Versuchstieres zur Injektion von Substanzen. Die Injektionsstelle am rechten Sprungbein ist durch den Pfeil markiert.

Für Injektionen wurde eine Mikroliterspritze (10µl) der Firma Hamilton (Hamilton, Bonaduz/Schweiz) verwendet, die vor und nach jeder Injektion sorgfältig mit destilliertem Wasser gespült wurde. Für die Injektion wurde (meist) das rechte Sprungbein der Heuschrecke gestreckt und damit die weiche Hautstelle im Bereich der Hüften freigelegt (siehe Abbildung 13). Die Nadel der Hamiltonspritze wurde nahezu parallel zur Längsachse des Heuschreckenkörpers ca. 1cm tief in das Tier gestochen und die Flüssigkeit langsam injiziert. Erst nach ca. 10 Sekunden wurde die Nadel herausgezogen, um zu verhindern, dass Hämolymphe durch die Einstichstelle austrat.

Wenn Hämolymphe entnommen werden sollte, wurden die Tiere etwa eine Stunde vor der Entnahme einzeln vorsichtig am Thorax ergriffen und mit Leitungswasser aus einer Pipette „getränkt“ (ad libitum). Die Abnahme von

Hämolymphe erfolgte an der weichen Gelenkhaut des Sprungbeines der nicht-injizierten Seite (entsprechend Abbildung 13). Die Gelenkhaut wurde mit einer Präpariernadel punktiert und die austretende Hämolymphe mit einer graduierten Mikrokapillare (Hirschmann Laborgeräte, 74246 Eberstadt) aufgenommen. Die Hämolympheproben wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen auf Eis gesammelt, für 15 Minuten bei 65°C erhitzt, um enzymatische Aktivitäten auszuschalten und dann für 10 Minuten bei 10000g in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5412) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Glucose- und Trehalosebestimmung bei -20°C aufbewahrt, das Sediment verworfen.

2.3.2 Präparation und Homogenisation von Organen

Für alle Versuche wurden männliche *Locusta migratoria* 15 bis 30 Tage nach der Adulthäutung verwendet. Den Tieren wurde die Abdomenspitze abgeschnitten, der Kopf um 180 Grad gedreht und mit dem anhängenden Darmtrakt vom Tier abgezogen. Anschließend wurden die Extremitäten (Beine und Flügel bis auf Stummel) entfernt und das Abdomen vom Thorax getrennt.

Zur Präparation der **Flugmuskulatur** wurde der Thorax ventral entlang der Mittellinie geöffnet, dann mit der Cutikula nach unten durch Nadeln in einer Wachsschale fixiert (Abbildung 14).

Zuerst wurden das gelbliche Fettgewebe sowie die gut sichtbaren großen Tracheen und die Luftsäcke entfernt. Anschließend wurden die Flugmuskeln mit einer feinen Schere (Augenschere) vorsichtig von den Ansatzstellen an der Cutikula abpräpariert und in einem vorgewogenen 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß auf Eis gesammelt.

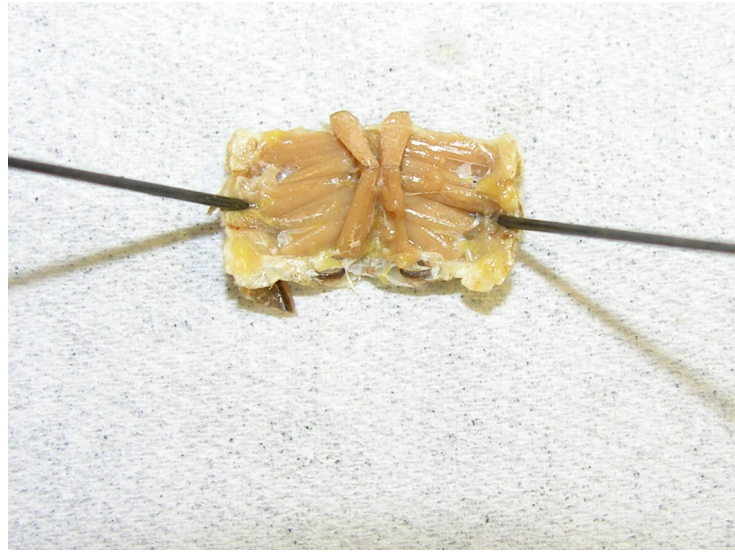


Abbildung 14. Zur Präparation der Flugmuskulatur durch einen Schnitt entlang der ventralen Mittellinie geöffneter Thorax von *Locusta migratoria*. Die kräftigen dorsolongitudinalen Flugmuskeln sind in der Mitte zu sehen, die dorsoventralen Muskeln seitlich davon.

Bei vielen Experimenten wurde die Flugmuskulatur vor der Präparation in kaltem Insektenringer gewaschen, um am Gewebe haftendes Trehazolin zu entfernen. Dazu wurde der Thorax dorsal und ventral entlang der Mittellinie geteilt, das Fettgewebe und die Tracheen entfernt und ein Halbthorax an den Flügelstummeln mit Zwirnfäden befestigt und in eine Schüssel (ca. 1,5l Fassungsvermögen) mit kaltem Insektenringer (4°C) gehängt und dieser mit einem Magnetfisch bewegt. Nach 15 Minuten wurde der Ringer gewechselt und die Halbthoraces weitere 15 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Halbthorax mit weichem Papier vorsichtig trocken getupft und die Muskulatur präpariert.

Um die **Sprungmuskulatur** der Sprungbeine zu gewinnen, wurden die Oberschenkel längs aufgeschnitten, in einer Präparationsschale fixiert und das Muskelgewebe mit einer Pinzette entnommen.

Der **Darm** wurde vom Kopf der Heuschrecke getrennt und in eine kleine, mit Insektenringer gefüllte Präparierschale gelegt. Unter dem Binokular wurden die anhängenden Gewebe und die Tracheen entfernt. Durch vorsichtiges Entlangstreifen mit einer Pinzette wurde der Darminhalt herausgedrückt. Der so präparierte Darm wurde nochmals in ein Glas mit frischem Insektenringer gelegt, d.h. äußerlich gewaschen.

Zur Präparation des **Gehirns** wurde der Kopf der Heuschrecke mit Stecknadeln in einer Präparierschale befestigt. Die folgenden Schritte wurden durch ein Binokular beobachtet. Mit einer Augenschere wurde oberhalb der Augen die Cuticula eingeschnitten und der Schnitt an der Innenseite der Augen entlang bis zu den Mundwerkzeugen geführt. Die so entstandene Chitinplatte wurde vorsichtig angehoben und vom Kopf getrennt (Abbildung 15). Anschließend wurde das weißliche Fettgewebe vom Gehirn entfernt. Dann wurde das Gehirn mit den optischen Bulbi entnommen (Abbildung 16).

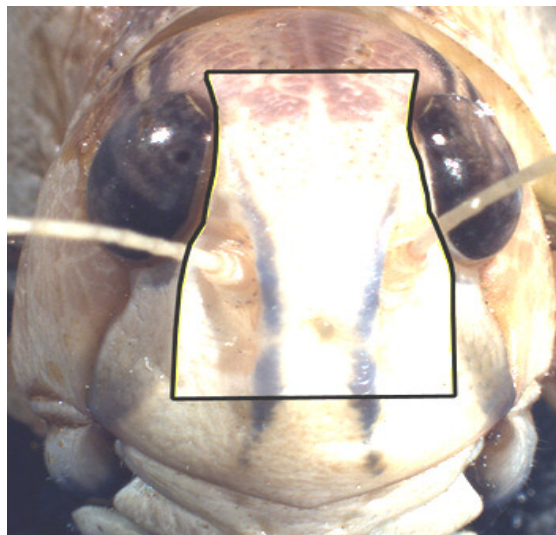


Abbildung 15. Präparation des Gehirns von Locusta. Schnittverlauf in der Cuticula des Kopfes. Der hell eingefärbte Bereich zeigt den zu entfernenden Teil der Cuticula. (Photo: Nelius 2003)

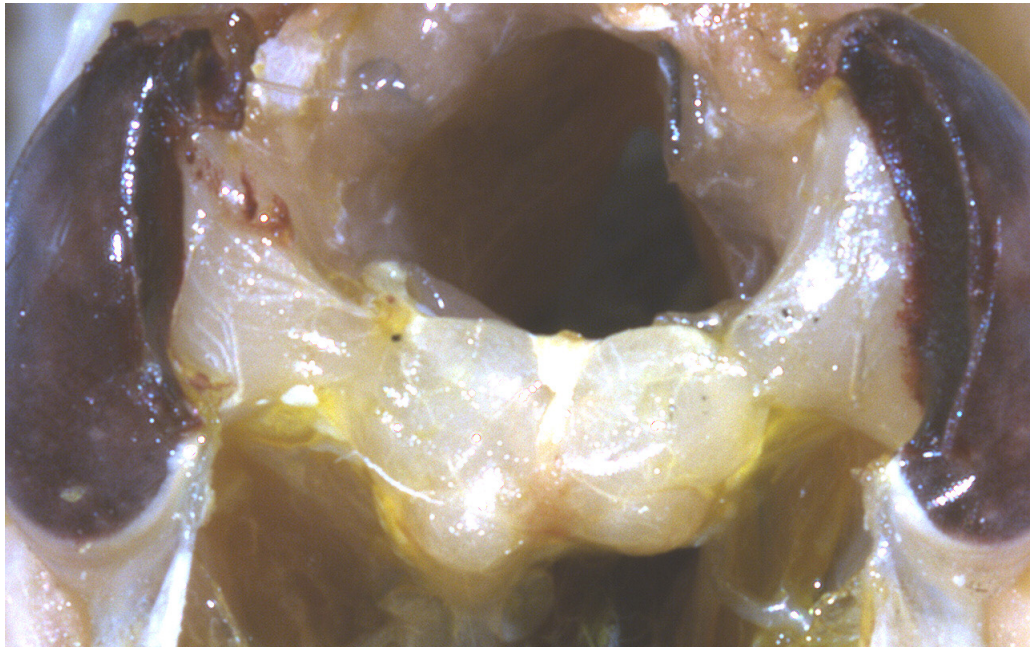


Abbildung 16. Freigelegtes Gehirn von Locusta von vorne betrachtet. Zwischen den dunkel pigmentierten Augen befinden sich die optischen Zentren und das zentrale Gehirn (Photo: Nelius 2003).

2.3.3 Fraktionierung von Locusta-Flugmuskulatur

Aus der Flugmuskulatur wurden vier Fraktionen gewonnen, deren Trehalaseaktivitäten gemessen wurden (siehe Abbildung 17).

Dafür wurden die Gewebe mit 9 Teilen (v/w) eiskaltem Homogenisationspuffer (50mM Natriummaleat, pH 6,5) versetzt und in einem Handhomogenisator (2ml, Glas in Glas von Neolab 69123 Heidelberg) homogenisiert bis keine Gewebestückchen mehr sichtbar waren. Vom entstandenen Homogenat, d.h. der **1. Fraktion** (siehe Abbildung 17), wurden zweimal 20µl in den zweistufigen Trehalasetest (siehe 2.4.2) zur Bestimmung der (in vitro) gesamten *overten* Trehalaseaktivität eingesetzt. Das übrige Homogenat wurde eine Stunde bei 40 000g und 4°C zentrifugiert (RC5C Zentrifuge von Sorvall-Instruments Du Pont de Nemours GmbH / Bad Nauheim, Rotor SS34). Der Überstand wurde in einem Reaktionsgefäß aufbewahrt. Er stellt die **Fraktion 2** dar, in der die (in vitro) lösliche *overt* Trehalaseaktivität gemessen wurde. Das Sediment wurde mit der ursprünglichen Menge Homogenisationspuffer (minus 40µl) versetzt und mit einem Mikrohomonisator (2 Milliliter von Carl Roth GmbH & Co, 76185 Karlsruhe) im Eppendorfreaktionsgefäß homogenisiert sowie mit einer 1000µl Pipette durch

mehrfaches Aufnehmen und Ausdrücken resuspendiert. Im resuspendierten Sediment, d.h. in der **Fraktion 3**, wurde die gebundene *overt*e Trehalaseaktivität ebenfalls mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt. Anschließend wurde die Sedimentsuspension mit TRITON X-100 versetzt (1%, v/v) und für 5 Sekunden ultrabeschallt (Branson Sonic Power Company / Genf, Schweiz; Mikrospitze Einstellung 2), um die membrangebundene Trehalase zu solubilisieren. In der so behandelten Sedimentsuspension, d.h. der **Fraktion 4**, wurde die gesamte gebundene Trehalaseaktivität (= *gebundene overt*e Trehalaseaktivität + *latente* Trehalaseaktivität) bestimmt.

Die (in vitro) *latente* Trehalaseaktivität wurde berechnet als:

Aktivität in Fraktion 4 minus Aktivität in Fraktion 3.

Die (in vitro) gesamte Trehalaseaktivität wurde berechnet als:

Aktivität in Fraktion 4 plus Aktivität in Fraktion 2.

Gewebe wurden wie für die Flugmuskulatur beschrieben homogenisiert und gegebenenfalls fraktioniert.

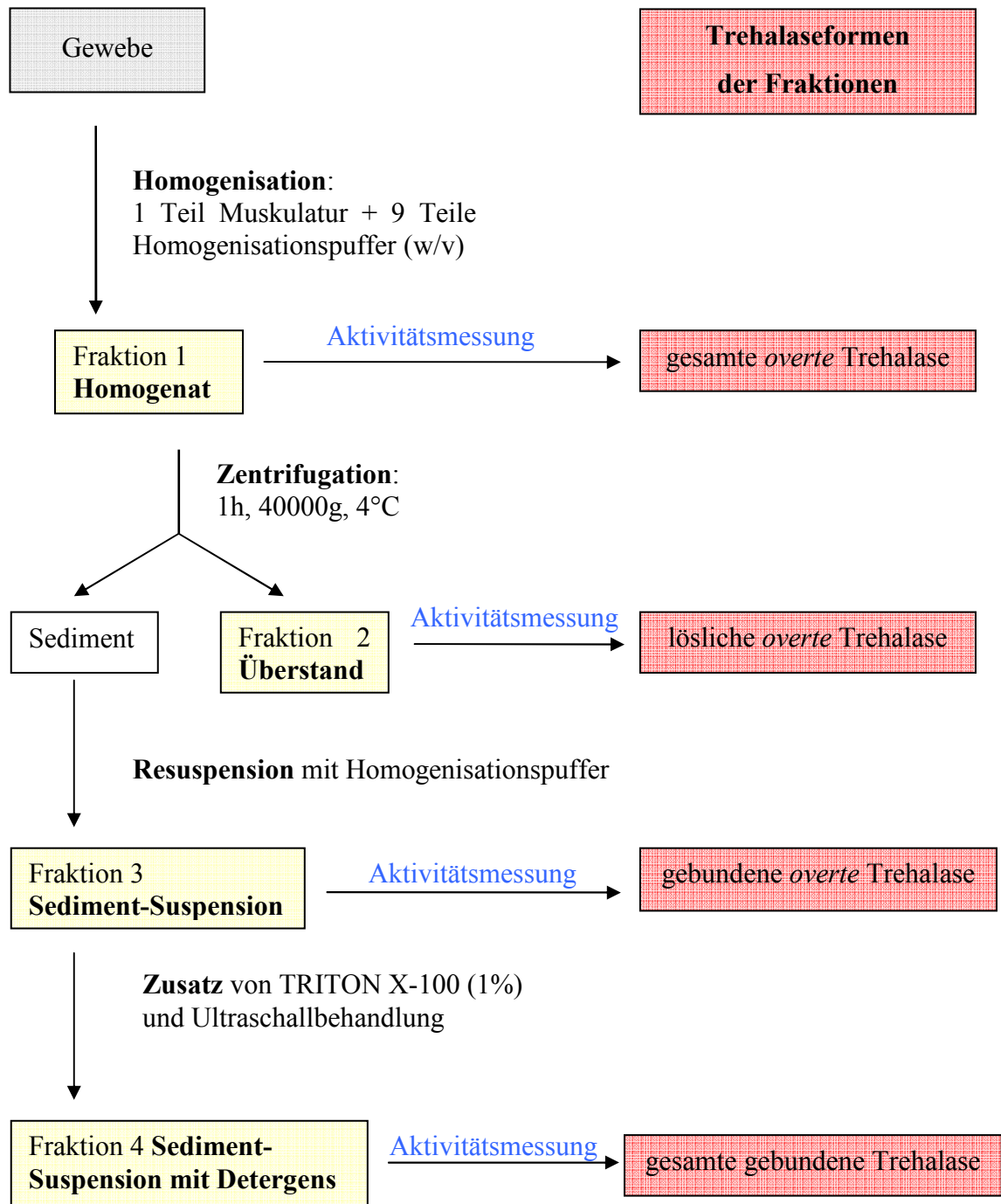


Abbildung 17. Fraktionierung von Geweben von *Locusta migratoria*. Gezeigt werden links die Arbeitsschritte und die verschiedenen Gewebefractionen, in denen die (in vitro) Aktivitäten der Trehalase gemessen wurden, sowie die entsprechenden Formen der (in vitro) Trehalaseaktivität (rechts).

Berechnet wurden:

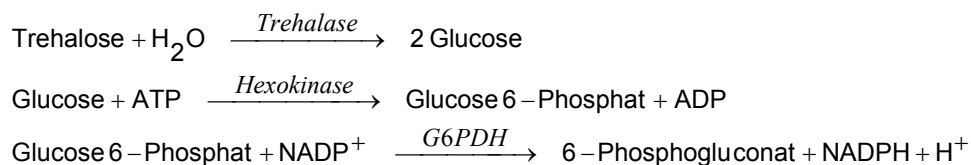
- (in vitro) *latente* Trehalaseaktivität = Aktivität in Fraktion 4 minus Aktivität in Fraktion 3 = gesamte gebundene Trehalase minus gebundene *overt* Trehalase
- (in vitro) gesamte Trehalaseaktivität = Aktivität in Fraktion 4 plus Aktivität in Fraktion 2 = gesamte gebundene Trehalase – lösliche *overt* Trehalase

2.4 Messung der Trehalaseaktivität

2.4.1 Einstufiger Trehalasetest

Dieser photometrische Test (verändert nach Nakano und Sacktor 1984) wurde bei 340nm und 25°C in Einmalküvetten (maximales Volumen = 1,2ml; Testvolumen 500µl; Schichtdicke = 1cm) durchgeführt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte jeweils mit 10µl und 20µl der verschiedenen Trehalasefraktionen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Trehalose gestartet, die von der Trehalase in zwei Moleküle Glucose hydrolysiert wurde. Die entstandene Glucose wurde im selben Test durch die Hexokinase (HK, EC 2.7.1.1) zu Glucose 6-Phosphat umgesetzt, welche durch Glucose 6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) oxidiert wurde, wobei aus NADP^+ dessen reduzierte Form $\text{NADPH} + \text{H}^+$ entstand. Die Produktion von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ entsprach der Trehalaseaktivität und konnte photometrisch als lineare Extinktionszunahme beobachtet werden.

Testprinzip



Testzusammensetzung

Testkomponente	Vorratslösung	Testeinsatz	Testkonzentration
Natriumacetat-Puffer, pH 6,5	300mM	200µl	120mM
MgCl ₂	Gemisch für 96 Wells	20µl	10mM
NADP ⁺		20µl	0,6mM
ATP		10µl	0,5mM
G6PDH	21U/ml	20µl	0,42U/500µl
Hexokinase	33U/ml	20µl	0,67U/500µl
Probe	-	variabel	-
Aqua dest.	-	ad 480µl	-
* Trehalose	500mM	20µl	20mM
* Startreagenz			

Enzymaktivitäten werden in internationalen Units (U) angegeben. Dabei entspricht 1U (Unit), derjenigen Enzymaktivität, die 1 μ mol Substrat pro Minute (gewöhnlich bei 25°C) umsetzt. Im Falle der Trehalase bedeutet eine Aktivität von 1U, dass 1 μ mol Trehalose pro Minute zu 2 μ mol Glucose hydrolysiert wird (daher der Faktor 2 im Nenner der folgenden Formel).

Die Berechnung der Trehalaseaktivität erfolgte nach der Formel

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{Test}}}{\text{min} \cdot 2 \cdot \epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}}$$

ΔE	Extinktionsänderung
V_{Test}	Testvolumen in der Küvette in μ l (500 μ l)
ϵ	millimolarer Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340nm (= 6,22cm ² / μ mol)
d	Schichtdicke der Küvette in cm (= 1cm)
V_{Probe}	Probenvolumen in μ l

Vielfach werden Enzymaktivitäten auf das Gewebsgewicht bezogen (U/g). Aus der Trehalaseaktivität (zum Beispiel im Homogenat) lässt sich die Trehalaseaktivität des Gewebes durch Multiplikation mit dem Homogenisationsfaktor berechnen. Wenn das Gewebe mit 9 Teilen Medium (v/w) homogenisiert wurde, wird in der obigen Formel zusätzlich der Homogenisationsfaktor HF 10 eingesetzt.

Für die Trehalaseaktivität bezogen auf g Gewebegewicht ergibt sich:

$$\frac{U}{g \text{ Gewebe}} = \frac{U \cdot HF}{ml} = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{Test}} \cdot HF}{\text{min} \cdot 2 \cdot \epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}}$$

2.4.2 Zweistufiger Trehalasetest

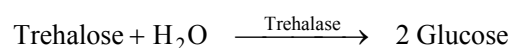
Ich habe einen zweistufigen Trehalasetest neben dem einstufigen Test genutzt, um folgenden Schwierigkeiten bei der Aktivitätsmessung zu begegnen:

- (1) Der einstufige (kontinuierliche) Aktivitätstest ist nicht optimal, da Trehalase und die verwendeten Hilfsenzyme Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase verschiedene pH-Optima haben.
- (2) Der einstufige Test braucht für die Einzelmessung relativ viel Zeit, wodurch größere Messreihen wegen der Labilität der Enzyme erschwert werden.
- (3) Aktivitäten von Enzymen sind in Gewebehomogenaten nicht leicht zu messen, da Partikel in den Homogenaten den Strahlengang des Photometers stören.

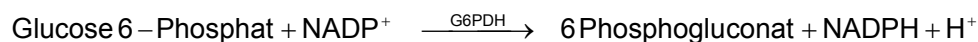
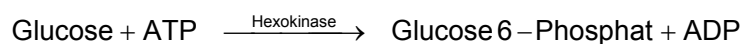
Die Überprüfung des zweistufigen Tests findet sich unter 2.4.3.

Testprinzip des zweistufigen Trehalasetests

1. Stufe (bei pH 6,5)



2. Stufe (bei pH 7,6)



Hydrolyse von Trehalose (1. Stufe)

Testzusammensetzung

Testkomponente	Vorratslösung	Testeinsatz	Testkonzentration
Natriumacetatpuffer, pH 6,5	300mM	200µl	120mM
Enzymprobe	-	20µl	-
Aqua dest.	variabel	ad 480µl	variabel
* Trehalose	500mM	20µl	20mM
		Testvolumen	
		= 500µl	

* Startreagenz

Die erste Stufe des Trehalasetests wurde je Probe in je zwei Reaktionsgefäßen durchgeführt. Diese enthielten 200µl Natriumacetat (Reaktionspuffer, 300mM pH 6,5) plus 260µl oder 280µl (= Kontrolle, wird nicht mit Trehalose versetzt) destilliertes Wasser. Diese Ansätze wurden mit je 20µl Flugmuskelprobe (Homogenat oder Fraktion, siehe Abbildung 17) versetzt und 20 Minuten in einem GFL Wasserbad 1083 mit Schüttelfunktion (GFL GmbH / Burgwedel) bei 30°C temperiert. Nach der Temperierung wurde die Trehalasereaktion in den Versuchsansätzen mit 20µl 500mM Trehalose gestartet und beide Ansätze nach genau 20 Minuten mit 50µl 15%iger Perchlorsäure versetzt. Die Ansätze wurden mit 10µl 5M Kaliumcarbonat neutralisiert. Das ausgefallene Kaliumperchlorat wurde nach kurzem Öffnen der Deckel der Reaktionsgefäße (starke Kohlendioxidentwicklung) in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5412) abzentrifugiert (5 Minuten bei 10 000g). Von den Überständen wurden jeweils 200µl für die zweite Stufe des Trehalasetests aufbewahrt.

2. Stufe: Messung der Glucose (bei pH 7,6)

Testzusammensetzung

Testkomponente	Vorratslösung	Testeinsatz	Testkonzentration
TRAP, pH 7,6	300mM	100µl	150mM
MgCl ₂	250mM	8µl	10mM
NADP ⁺	15mM	8µl	0,6mM
ATP	25mM	4µl	0,5mM
Probe	variabel	10µl/20µl	variabel
Aqua dest.	variabel	ad 160µl	variabel
* Hexokinase / G6PDH -	21U +	40µl	0,21U/200µl /
Gemisch	33U in 4 ml		0,33U/200µl
	Gemisch		Gesamtvolumen:
			200µl

* Startreagenz

In der 2. Stufe des Trehalasetests wurde in den durch Stufe 1 erhaltenen Proben die Glucosekonzentration ermittelt. Die Messung erfolgte in 96-Well Platten

(Cliniplate flat universal) bei 340nm mit dem Multiskan Ascent (Thermo Labsystems / Helsinki, Finnland).

Aus TRA-Puffer (Triethanolaminpuffer), Magnesiumchlorid, NADP^+ und ATP wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches war 7,6, d.h. im Bereich der pH-Optima der im Test verwendeten Hilfsenzyme Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Vom Reaktionsgemisch wurden 120 μl in jedes Well gegeben. Dann wurden jeweils 10 μl und 20 μl jeder Probe (Doppelbestimmung) in die Wells pipettiert, jedes Well mit destilliertem Wasser auf 160 μl aufgefüllt und nach 5 Minuten die Leerwerte bei 340nm gemessen.

Aus 2 Millilitern Hexokinase-Lösung (EC 2.7.1.1) in 300mM TRAP (pH 7,6) mit einer Gesamtaktivität von 21U und 2 Millilitern G6PDH-Lösung (EC 1.1.149) in 300mM TRAP (pH 7,6) mit einer Gesamtaktivität von 33U (siehe 2.2.2) wurde ein Gemisch hergestellt, mit dem die Reaktion durch Zugabe von 40 μl in jedes Well gestartet wurde. Die Reduktion von NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$, angezeigt durch die Extinktionsänderung bei 340nm, war hierbei proportional zur vorhandenen Glucose, die unter den gegebenen Bedingungen umgesetzt wurde.

Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgte in einer Excel Datei, mit der direkt die Glucosekonzentration der gemessenen Probe angegeben wurde.

Berechnung der Glucosekonzentration in der Probe:

$$\text{mM} = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{Test}}}{\epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}}$$

ΔE Extinktionsänderung

V_{Test} 200 μl pro Well

ϵ millimolarer Extinktionskoeffizient (für NADPH bei 340nm = 6,22 cm^2/mmol)

d Schichtdicke $d = 0,543\text{mm}$

V_{Probe} Probenvolumen (hier: 10 μl oder 20 μl)

Aus den erhaltenen Glucosekonzentrationen der Proben (10 μl und 20 μl) wurden die Trehalaseaktivitäten (bezogen auf g Gewebe) in den einzelnen Fraktionen berechnet. Dazu wurden die Werte der Kontrollen von den mit Trehalose versetzten

Proben abgezogen, d.h. nur aus Trehalose entstandene Glucose wurde in die Berechnung einbezogen. Die Werte der mit 10µl Probe befüllten Wells wurden jeweils verdoppelt, die Werte der mit 20µl Probe befüllten Wells addiert und anschließend daraus der Mittelwert berechnet.

Nach folgender Formel wurde dann die Trehalaseaktivität berechnet:

$$\frac{U}{\text{g Gewebe}} = \frac{\mu\text{mol Trehalose}}{\text{min} \cdot \text{g Gewebe}} = \frac{\text{Glucosekonzentration} \cdot \text{HF}}{\text{Zeit} \cdot 2}$$

U	Unit (Substratumsatz in µmol/min)
HF	Homogenisationsfaktor (hier: 10)
Zeit	Inkubationsdauer (hier: 20 Minuten)
Faktor 2	ein Molekül Trehalose wird in zwei Moleküle Glucose gespalten

In der Fraktion 1 wurde die Aktivität der (in vitro) gesamten *overten*, in der Fraktion 2 die Aktivität der (in vitro) löslichen *overten*, in der Fraktion 3 die Aktivität der (in vitro) gebundenen *overten* und in der Fraktion 4 die Aktivität der gesamten gebundenen Trehalase gemessen (Abbildung 17).

Wie schon erwähnt (Abbildung 17) kann die Aktivität der *latenten* Trehalase nicht direkt gemessen werden. Sie wurde folgendermaßen berechnet:

Aktivität *latente* Trehalase = Aktivität gesamte gebundene Trehalase – Aktivität *gebundene overte* Trehalase bzw.

Aktivität *latente* Trehalase = Aktivität Fraktion 4 – Aktivität Fraktion 3

Die Gesamtaktivität der Trehalase wurde ebenfalls berechnet:

Aktivität gesamte Trehalase = Aktivität gesamte gebundene Trehalase + Aktivität lösliche *overte* Trehalase bzw.

Aktivität gesamte Trehalase = Aktivität Fraktion 4 + Aktivität Fraktion 2

2.4.3 Überprüfung des zweistufigen Trehalasetests: pH-, Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Trehalaseaktivität

pH-Abhängigkeit

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Trehalase wurde der erste Schritt des unter 2.4.2 beschriebenen zweistufigen Trehalasetests mit Natriumacetat-Puffer bei pH-Werten von pH 5,9 bis pH 7,1 (in 0,2er Schritten) durchgeführt. Der zweite Schritt des zweistufigen Tests wurde wie zuvor bei pH 7,6 durchgeführt. Es wurden vier Doppelbestimmungen mit Gewebefraktionen von Flugmuskeln von vier Tieren gemacht, deren Ergebnisse jeweils gemittelt wurden.

Der Effekt des pH-Wertes auf die Trehalaseaktivität in den vier Gewebefraktionen (siehe Tabelle 1 und Abbildung 18) war gering, der der gesamten *overten* Trehalase sogar kaum merklich. Die gesamt gebundene Form (Fraktion enthält TRITON X-100 als Detergens) zeigt maximale Aktivität zwischen pH 6,5 und 7,1.

Tabelle 1. Abhängigkeit der Trehalaseaktivität [U/g Flugmuskulatur, 30°C] der Flugmuskulatur von *Locusta* vom pH-Wert des Testmediums. Die Trehalaseaktivität wurde in den 4 Gewebefraktionen (siehe Abbildung 17) gemessen, wobei der erste Schritt mit dem zweistufigen Trehalasetest bei pH-Werten zwischen 5,9 und 7,1 durchgeführt wurde. Die Werte für die *latente* Trehalase und die gesamte Trehalase sind nicht angegeben, da sie nicht gemessen, sondern nur berechnet werden können. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n=4).

pH-Wert	Aktivitäten von Trehalaseformen [U/g bei 30°C]			
	gesamte <i>overt</i>	lösliche <i>overt</i>	gebundene <i>overt</i>	gesamte gebundene
5,9	1,75 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,10	0,91 $\pm$ 0,07	2,60 $\pm$ 0,18
6,1	1,83 $\pm$ 0,13	0,86 $\pm$ 0,16	1,09 $\pm$ 0,01	2,87 $\pm$ 0,11
6,3	1,88 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,16	1,05 $\pm$ 0,08	3,31 $\pm$ 0,18
6,5	1,89 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,09	1,01 $\pm$ 0,17	3,55 $\pm$ 0,25
6,7	1,90 $\pm$ 0,16	0,80 $\pm$ 0,09	1,17 $\pm$ 0,04	3,44 $\pm$ 0,37
6,9	1,99 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,04	3,43 $\pm$ 0,11
7,1	1,78 $\pm$ 0,23	0,73 $\pm$ 0,12	1,14 $\pm$ 0,07	3,54 $\pm$ 0,33

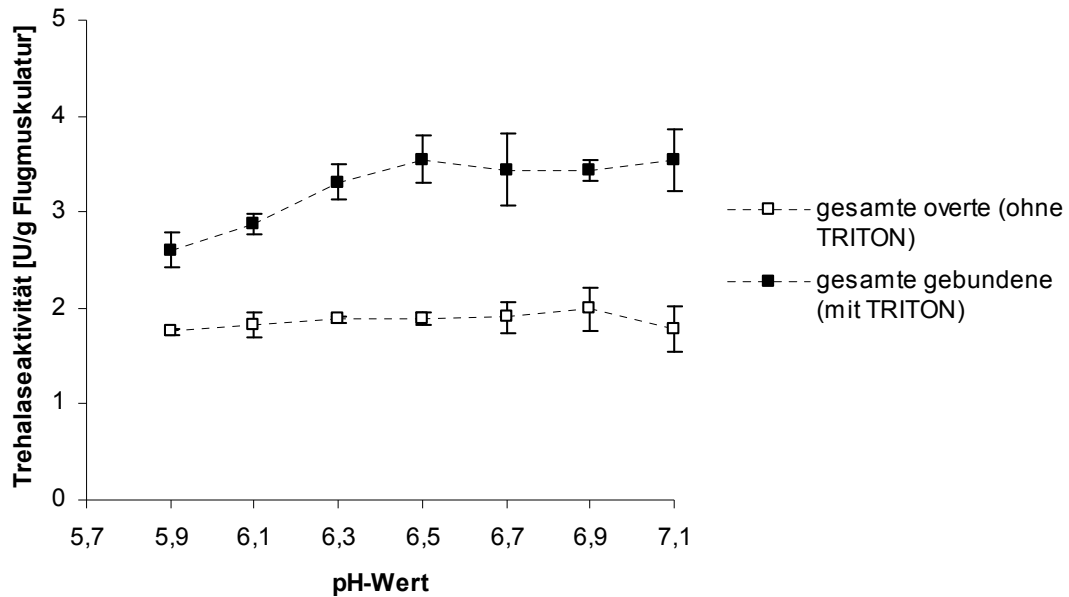


Abbildung 18. Abhängigkeit der Trehalaseaktivitäten [U/g Flugmuskulatur, 30°C] in Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* vom pH-Wert des Testmediums.

Details zur Versuchsdurchführung: siehe Tabelle 1

Insgesamt zeigt das Experiment, dass der pH-Wert des Testmediums für die Aktivität der Trehalase unter den gewählten Bedingungen im Bereich von pH 6,5 bis 7,1 nicht kritisch ist.

Temperaturabhängigkeit

Um den Effekt der Temperatur und gleichzeitig die Zuverlässigkeit des zweistufigen Trehalasetests zu überprüfen, wurde der unter 2.4.2 beschriebene zweistufige Trehalasetest bei drei Temperaturen durchgeführt. Gewählt wurden 25°C, 30°C und 35°C, wobei 35°C etwa der Temperatur der Flugmuskulatur beim Flug von *Locusta* entsprechen. Auch hier wurde der Test in Homogenaten der Flugmuskulatur von vier Tieren in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Vielfach werden Enzymtests konventionell bei 25°C durchgeführt. Die Körpertemperatur fliegender Heuschrecken beträgt jedoch ca. 34°C bis 35°C (Neville und Weis-Fogh 1963). Zudem kann bei höherer Temperatur für die Aktivitätstests der Trehalase weniger Gewebeextrakt eingesetzt werden. Dies ist ein Vorteil bei geringen Homogenatmengen, wie sie bei kleinen Organen, z.B. dem Gehirn anfallen.

Die Erhöhung der Temperatur um 5°C verursachte eine deutliche Aktivitätssteigerung der Trehalase (siehe Tabelle 2, Tabelle 3 und Abbildung 19). Der Aktivitätsanstieg ist generell exponentiell, er war aber nicht gleich groß für die gemessenen Fraktionen. Der Q_{10} -Wert (d.h. Aktivität bei 35°C / Aktivität bei 25°C) liegt für die gesamte *overte* Trehalaseaktivität über 3.

Für die Gesamtaktivität ergab sich ein Q_{10} -Wert über 3. Auffällig ist, dass der Q_{10} -Wert (d.h. die Stimulation der Aktivität durch erhöhte Temperatur) bei allen Formen der Trehalase im Temperaturbereich von 30°C bis 35°C größer ist als im Bereich von 25°C bis 30°C. So ist die Aktivität der gesamt *overten* Trehalase bei 30°C um 55% höher als bei 25 °C, bei 35°C jedoch um 104% höher als bei 30°C. Für die gebundene *overte* Form betragen die Werte 56% und 86% (siehe Tabelle 2). Dies könnte darauf hindeuten, dass der aktivierende Effekt der Temperatur im Bereich der Flugtemperatur stärker ausgeprägt ist. Es könnte aber auch ein Artefakt vorliegen, da Membranen bei 35°C größere Fluidität als bei 30°C haben dürften und damit stärker durchlässig für das Substrat Trehalose wären (siehe 2.4.4).

Tabelle 2. Trehalaseaktivitäten [U/g Flugmuskulatur] in Gewebefractionen der Flugmuskulatur von *Locusta* bei 25°C, 30°C und 35°C. Die Trehalaseaktivitäten wurden mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n=4).

Trehalasefraktion	Aktivitäten von Trehalaseformen [U/g] bei Temperatur		
	25°C	30°C	35°C
gesamte <i>overte</i>	1,32 $\pm$ 0,4	2,05 $\pm$ 0,11	4,19 $\pm$ 0,12
lösliche <i>overte</i>	0,48 $\pm$ 0,08	0,56 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,09
gebundene <i>overte</i>	0,95 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,14	2,39 $\pm$ 0,10
gesamte gebundene	2,18 $\pm$ 0,05	3,39 $\pm$ 0,01	5,75 $\pm$ 0,27

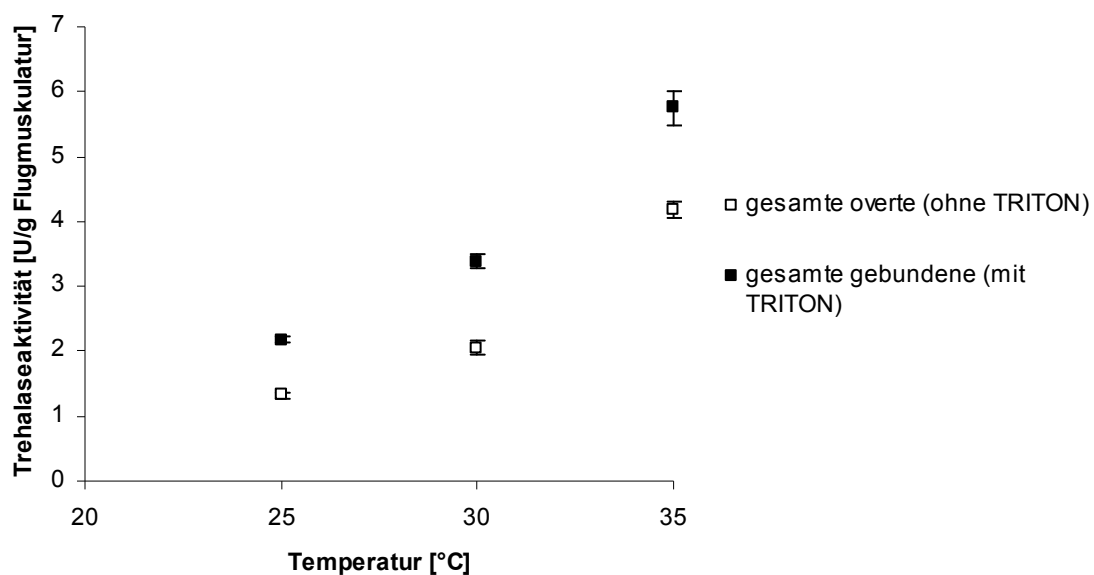


Abbildung 19. Trehalaseaktivitäten [U/g Flugmuskulatur] in Gewebefractionen der Flugmuskulatur von *Locusta* bei 25°C, 30°C und 35°C. Die Trehalaseaktivitäten wurden mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n=4).

Tabelle 3. Steigerung der Trehalaseaktivitäten in Gewebefractionen der Flugmuskulatur von *Locusta* bei Erhöhung der Testtemperatur um jeweils 5°C zwischen 25°C und 35°C. Angegeben sind Steigerungsfaktoren und die Q_{10} -Werte, die jeweils aus Mittelwerten berechnet wurden.

Trehalasefraktion	Aktivitätssteigerungen (und Q_{10} -Werte)		
	30°C / 25°C	35°C / 30°C	35°C / 25°C
gesamte overte	1,6 (2,41)	2,0 (4,18)	3,2 (3,2)
lösliche overte	1,2 (1,36)	1,5 (2,14)	1,7 (1,7)
gebundene overte	1,3 (1,79)	1,9 (3,54)	2,5 (2,5)
gesamte gebundene	1,6 (2,42)	1,7 (2,88)	2,6 (2,6)

Zeitabhängigkeit der Trehalaseaktivität

Eine wichtige Qualitätskontrolle für Enzymtests ist, dass die Enzymaktivität während der Messzeit konstant bleibt. Die Menge des Reaktionsprodukts muss also der Testzeit proportional sein. Der zweistufige Trehalasetest wurde für Inkubationszeiten von 10 Minuten, 20 Minuten und 30 Minuten überprüft und zwar mit den Gewebefractionen der Flugmuskulatur, die wie unter 2.3.2 und 2.3.3

beschrieben, präpariert wurden. Um zu prüfen, ob die Trehalaseaktivität über die Messzeit konstant bleibt, wurde der Schritt 1 des zweistufigen Tests bei 30°C für 10 Minuten, 20 Minuten und 30 Minuten durchgeführt. Der Test wurde mit Fraktionen der Flugmuskulatur von vier Tieren in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die zeitliche Proportionalität des zweistufigen Trehalasetests ist im Rahmen der Schwankungsbreite bis auf zwei Fälle in allen Fraktionen gegeben (Tabelle 4).

Tabelle 4. Trehalaseaktivitäten [U/g Flugmuskulatur, 30°C] in Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* im zweistufigen Trehalasetest mit Inkubationszeiten von 10min, 20min und 30 min. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n=4). Statistische Analyse siehe Tabelle 25 im Anhang.

Trehalasefraktion	10 Minuten	20 Minuten	30 Minuten
gesamte <i>overt</i>	0,651 $\pm$ 0,11	0,704 $\pm$ 0,13	0,852 $\pm$ 0,16
lösliche <i>overt</i>	0,056 $\pm$ 0,03	0,072 $\pm$ 0,02	0,125 $\pm$ 0,03
gebundene <i>overt</i>	0,399 $\pm$ 0,06	0,476 $\pm$ 0,07	0,582 $\pm$ 0,07
gesamte gebundene	3,217 $\pm$ 0,67	3,848 $\pm$ 0,48	3,951 $\pm$ 0,24

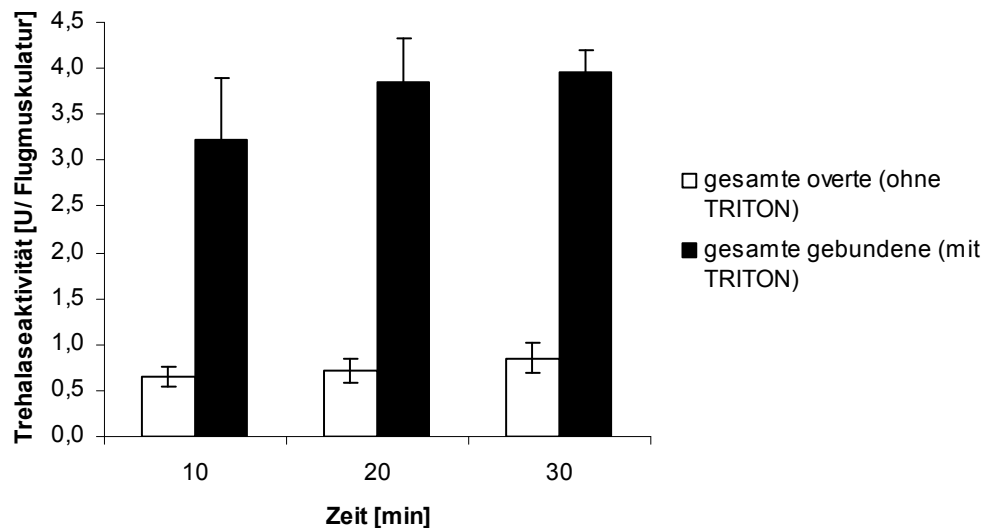


Abbildung 20. Trehalaseaktivitäten [U/g Flugmuskulatur, 30°C] in Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* im zweistufigen Trehalasetest mit Inkubationszeiten von 10min, 20min und 30 min. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n=4).

2.4.4 Bewertung der Trehalasetests

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Trehalaseaktivität ausschließlich mit dem kontinuierlichen Test gemessen (siehe 2.4.1). In derselben Küvette wurde bei pH 6,5 Trehalose in zwei Moleküle Glucose gespalten und diese direkt durch Hexokinase zu Glucose 6-Phosphat und weiter zu 6-Phosphogluconat umgesetzt, wobei die Indikatorsubstanz $\text{NADPH} + \text{H}^+$ entsteht. Dieser kontinuierliche Test ist, wie schon erwähnt wurde, aus mehreren Gründen nicht optimal. Die pH-Optima der Trehalase ($\leq 7,1$) und der Hexokinase ($\text{pH} \geq 7,6$) sind verschieden. Zusätzlich wurde die photometrische Erfassung des im Test entstehenden $\text{NADPH} + \text{H}^+$ durch Partikel, die mit dem Gewebshomogenat in die Küvette gelangten, erschwert. Durch Zugabe von Homogenat war die Extinktion schon zu Beginn relativ hoch, und sie veränderte sich unabhängig von der Trehalaseaktivität, da während der Messung Partikel absanken, welche die Extinktion verringerten. Bei hohen Trehalaseaktivitäten kann dieser Effekt vernachlässigt werden. Bei geringen Aktivitäten hingegen, die zum Beispiel bei Inhibitoreinsatz zu erwarten sind, verursacht er jedoch relativ große Fehler.

Aus diesen Gründen wurde der Test in zwei Schritten durchgeführt (= zweistufiger Test, siehe 2.4.2). Dabei ist z.B. vorteilhaft, dass der erste Schritt nur die Spaltung der Trehalose in Glucose beinhaltet, so dass die Trübung des Testmediums durch Homogenat keine Rolle spielt. Zusätzlich wurde Zeit gespart, da in beiden Schritten viele Proben parallel inkubiert bzw. gemessen werden konnten. Dadurch konnte die doppelte bis dreifache Zahl an Proben pro Tag verarbeitet werden. Letzteres ist vor allem für die Aktivitätsmessung in verschiedenen Geweben von Vorteil. Um vergleichbar zu sein, müssen die Gewebe aus denselben Tieren stammen und sollten schnell nach der Präparation bearbeitet werden, da Zellstrukturen (insbesondere Membranen) labil sind und Enzyme in vitro an Aktivität verlieren können.

Im zweistufigen Test auf Trehalase war die Menge der entstandenen Glucose in den meisten Fällen proportional zur Inkubationszeit. Allerdings war eine Tendenz zu sehen, dass die Aktivitäten mit zunehmender Testdauer zunahmen. Eine Ursache hierfür kann ohne weitere Experimente nicht genannt werden. Möglicherweise wird ein latenter Anteil der Trehalase mit zunehmender Inkubationsdauer und bei erhöhter Temperatur (siehe Tabelle 3 und Abbildung 19) aktiviert (Membranlabilität). In jedem Fall zeigt dieses Experiment, dass die Kapazität des Tests für die gewählte

Dauer von 20 Minuten ausreichend ist, d.h. dass keine der Testkomponenten limitierend ist.

Die Messung der durch Trehalase erzeugten Glucose erfolgte im Multiskan Ascent, wodurch große Probenmengen zu bewältigt werden konnten.

Die pH-Kurven der Trehalase zeigten, dass die Trehalase in den nicht mit Detergens behandelten (d.h. *overten*) Trehalasefraktionen im Bereich von pH 5,9 bis 7,1 wenig pH-Abhängigkeit zeigten, während sich bei der mit Detergens behandelten Membranfraktion ein schwaches pH-Optimum zwischen pH 6,5 und 7,1 andeutete. Dieses Ergebnis entspricht den Ergebnissen von Müller (Müller 1991), die gereinigte Flugmuskeltrehalase von *Locusta* in einem weiten pH-Bereich testete und ein pH-Optimum um pH 7,0 beschrieb.

Effekte der Temperatur sind bei membrangebundenen Enzymen interessant, da die Temperatur nicht nur die Konformation von Proteinen, sondern auch die Struktur der Membranen beeinflusst. So könnte der Effekt einer Temperaturerhöhung von 5°C bei 30°C größer sein als bei 25°C, da bei höherer Temperatur Membranstrukturen labiler sind. Die in Tabelle 2 beobachtete höhere Wirkung der Temperatur könnte folglich ein Artefakt sein.

Manche Organe liefern nur geringe Homogenatmengen, z.B. das Gehirn von *Locusta*. Drei Gehirne ergaben nur etwa 10mg Gewebe, d.h. lieferten im Durchschnitt maximal 100µl Homogenat. Dieses methodische Problem kann durch Erhöhung der Temperatur verringert werden. Generell scheint die Erhöhung der Testtemperatur von 25°C auf 30°C günstig zu sein, da die Körpertemperatur fliegender Heuschrecken, 34°C bis 35°C beträgt (Neville und Weis-Fogh 1963). Allerdings stieg im Falle der Flugmuskulatur die Summe der Aktivität an löslicher *overter* und gebundener *overter* Trehalase mit der Temperatur nicht im gleichen Maße an wie die Aktivität im Homogenat. Da im Homogenat die (gesamte) *overte* Trehalaseaktivität gemessen wird, sollte diese der Summe aus löslicher *overter* und gebundener *overter* Trehalaseaktivität entsprechen. Das war jedoch nicht der Fall. Die Summe der Aktivitäten von löslicher *overter* und gebundener *overter* Trehalase der Flugmuskulatur war mit steigender Temperatur tendenziell kleiner als die Aktivität der Trehalase im Homogenat. Es ist nicht klar worauf dieser Temperatureffekt beruht. Vermutlich werden die Trehalaseaktivität und die zellulären Membranen in den Gewebefractionen nicht nur durch Temperatur,

sondern auch durch Präparationsschritte (Zentrifugation, Resuspendieren, etc.) beeinflusst. Diese Effekte dürften im Einzelnen nur schwer zu analysieren sein.

2.5 Kohlenhydratbestimmung mit dem Anthrontest

Zur Bestimmung der Trehalosekonzentration in Hämolympfproben wurde neben dem spezifischen Trehalasetest (mit käuflicher Trehalase aus Schweineniere) der Anthron-Test (Dreywood 1946; Roe 1955; Carroll et al. 1956) verwendet. Ich habe diesen unspezifischen Test auf Kohlenhydrate für die Trehalosebestimmung gegenüber dem spezifischen Test mit Trehalase bevorzugt, da bei Versuchstieren, denen der potente Trehalaseinhibitor Trehazolin injiziert worden war, die Trehalase im Trehalasetest durch in der Hämolymphe befindlichen Inhibitor gehemmt werden könnte. Anders als mit dem „Trehalasetest“ musste jedoch die Glucosekonzentration in der Hämolymphe in einer separaten Messung (siehe 2.4.2) bestimmt und von der gemessenen Kohlenhydratkonzentration abgezogen werden.

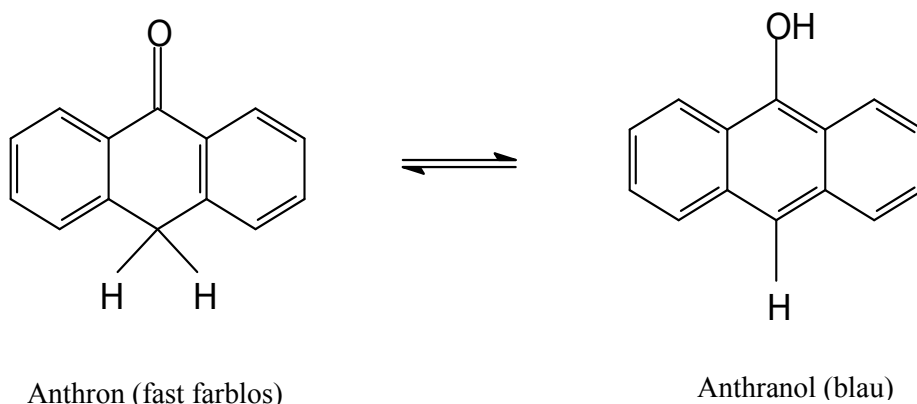


Abbildung 21. Strukturformeln von Anthron und Anthranol

Anthron (fast farblos) liegt mit Anthranol (blau) in Keto-Enol-Tautomerie vor, wobei im Gleichgewicht 89% Anthron sind und nur 11% Anthranol (siehe Abbildung 21). Durch Erhitzen mit Schwefelsäure wird Trehalose in zwei Moleküle Glucose gespalten. Die freigewordene Aldehydgruppe der Glucose reagiert mit Anthranol zu einem Produkt, das ebenfalls blau gefärbt ist, so dass sich mit zunehmender Glucosekonzentration die Blaufärbung verstärkt. Über eine

Standardkurve kann aus der Extinktion bei 620nm die Trehalosekonzentration bestimmt werden.

In den Anthrontest wurden 500µl eiskaltes Anthronreagenz (siehe 2.2.2) zu einer mit destilliertem Wasser auf 100µl aufgefüllten Probe bzw. Standardlösung gegeben. Die Probe wurde gut geschüttelt und dann 15 Minuten bei 98°C gehalten. Dabei entstand das blaugefärbte Produkt. Anschließend wurde die Lösung 2 Minuten auf Eis, dann 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert. Die Extinktion der Lösung wurde bei 620nm im PM2 Photometer (Carl-Zeiss, Jena) gemessen.

Der Reaktionsansatz (Anthronreagenz + Probe) wurde folgendermaßen behandelt:

98°C	15 Minuten
Eis	1 Minute
Dunkel, RT	15 Minuten
Messung	bei 620nm

Die Bestimmung der Kohlenhydratkonzentration erfolgte über den Vergleich mit einer Standardgeraden. Dazu wurden 0µg, 4µg, 8µg bis 40µg Trehalose in den Anthrontest eingesetzt. In den Test wurden jeweils 10µl einer 1:200 verdünnten Hämolympheprobe gegeben.

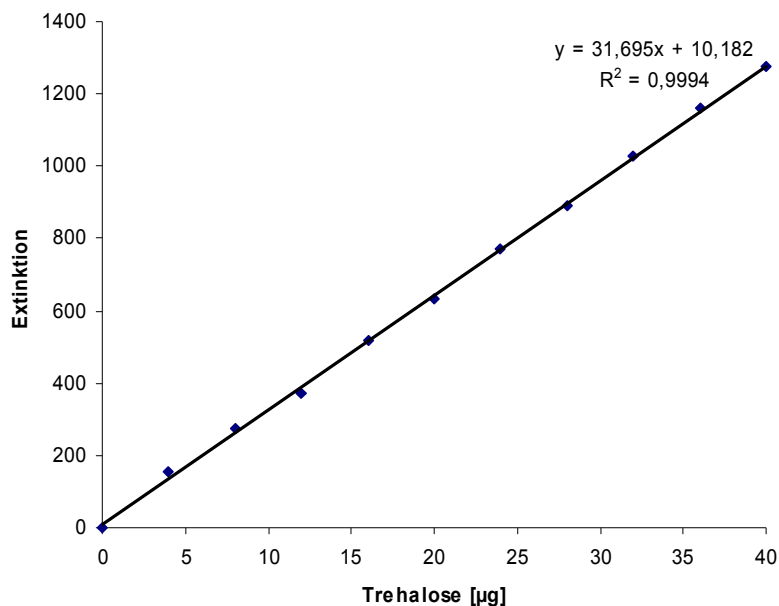


Abbildung 22. Standardgerade für die Messung von Trehalose mit dem Anthrontest (siehe Text)

2.6 Methodenüberprüfung: Stabilität der Trehalase und des Trehalase-Trehazolin Komplexes

Injiziertes Trehazolin kann mit Hämolymphe, die den Geweben anhaftet, nach Homogenisation der Gewebe auch solche Trehalasemoleküle hemmen, die in vivo nicht mit dem Trehazolin in Kontakt gekommen waren (zum Beispiel durch Detergens solubilisierter *latente* Trehalase), und dadurch die Ergebnisse verfälschen. Aus diesem Grund sollte nicht an Trehalase gebundenes Trehazolin vor der Messung der Trehalaseaktivität der Gewebefractionen entfernt werden. Dies kann durch Dialyse der Homogenate geschehen (siehe letzter Abschnitt 2.3.2).

Eine wichtige Frage ist, ob durch Trehazolin gehemmte Trehalase in vitro reaktiviert werden kann, indem man den Inhibitor abdissoziieren lässt. Auch dies kann durch Dialyse geprüft werden. Ebenso erhält man Hinweise auf die Stabilität der Trehalaseaktivität.

Als Versuchstiere wurden 8 männliche *Locusta* verwendet, deren Flugmuskulatur präpariert und homogenisiert wurde (siehe 2.3.2 und 2.3.3). Die Homogenate wurden vereinigt und in 8 Aliquots à 400µl aufgeteilt.

In 4 der 8 Aliquots wurde die gesamte *overte* Trehalase analysiert. Dazu wurden 2 Aliquots mit 5µl Insektenringer und 2 Aliquots mit 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) versetzt, für eine Stunde bei 4°C gehalten und dann jeweils gegen 100ml Insektenringer dialysiert (siehe unten).

In den anderen 4 Aliquots wurde die gesamte Trehalaseaktivität (gesamt gebundene + lösliche *overte* Trehalaseaktivität) analysiert. Die gebundene Trehalase wurde durch Zugabe von Triton X-100 (1%, v/v) zum Homogenat und Behandlung mit Ultraschall freigesetzt (siehe 2.3.3). Zu zwei der so behandelten Aliquots wurden 5µl Insektenringer und zu den beiden anderen Aliquots 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) gegeben.

Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C wurden diese Homogenate ebenfalls bei 4°C gegen 100ml Insektenringer dialysiert, der nach einer Stunde gewechselt wurde. Bei 0 Stunden (vor der Dialyse) und dann nach 4, 8, und 24 Stunden wurden jeweils 40µl Homogenat entnommen und bis zur gleichzeitigen Bestimmung der

Trehalaseaktivität bei 4°C aufbewahrt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 5 zu finden.

Das Homogenat der Flugmuskulatur verlor durch Dialyse gegen Ringerlösung innerhalb von 24 Stunden weniger als 20% der Trehalaseaktivität, sofern es nicht mit Detergens behandelt worden war. Bei Anwesenheit von 1% TRITON X-100 ohne Dialyse blieb bei 24 Stunden in der Kälte genau soviel Trehalaseaktivität erhalten wie ohne das Detergens. Die Dialyse verminderte jedoch die Aktivität deutlich. Schon zwei Stunden Dialyse führten zu ca. 35% Aktivitätsverlust (bei der nach 24 Stunden durchgeführten Messung, siehe Tabelle 5). Vier Stunden Dialyse führten zu über 90% Aktivitätsverlust und nach 8 und 24 Stunden Dialyse blieben weniger als 5% erhalten. TRITON X-100 gilt als schonendes Detergens für die Solubilisierung von Membranproteinen, und diese Einschätzung wird durch die Erhaltung der Aktivität während 24 Stunden Aufbewahrung bei 4°C gestützt. Der Verlust der Aktivität ist daher sehr wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass TRITON X-100 sich von den Trehalasemolekülen löst und diese dadurch an Stabilität verlieren.

Die Experimente mit Trehazolin zeigten, dass dieser Inhibitor bei 24 Stunden Einwirkung die Trehalaseaktivität auf weniger als 15% senkt. (von ca. 2,9 auf 0,4U/g), unabhängig davon, ob TRITON X-100 vorhanden war oder nicht. Es zeigte sich jedoch auch hier, dass bei Anwesenheit von TRITON (und Ultraschallbehandlung) die verbliebene Aktivität bei Dialyse schneller abfällt als bei Abwesenheit des Detergens. Wichtiger ist jedoch die Beobachtung, dass Trehazolin während einer Stunde Wirkdauer (bei 4°C) eine Hemmung verursachte, die auch durch längere Dialyse nicht aufgehoben werden konnte (siehe Tabelle 5). In vitro dürfte Trehazolin also praktisch zu einer irreversiblen Hemmung der Trehalase führen. Dieselbe Eigenschaft zeigte Trehazolin auch in vivo nach Injektion in die Hämolymphe von *Locusta* (siehe Ergebnisse 3.1 und 3.3).

Tabelle 5. Wirkung von TRITON X-100 und Dialyse auf die Aktivität der Trehalase in Homogenaten der Flugmuskulatur von *Locusta*. Angegeben sind die Trehalaseaktivitäten in U/g bei 30°C (gesamte *overte* und gesamte Aktivitäten) sowie in Prozent [%] der Ausgangsaktivität der Homogenate ohne Trehazolin. Die Flugmuskelhomogenate aus 8 Heuschrecken wurden vereinigt und aufgeteilt in 8 Aliquots à 400µl. Vier Aliquots blieben unverändert, um die gesamte *overte* Aktivität messen zu können, die anderen vier Aliquots wurden mit Triton X-100 (1%, v/v) versetzt und mit Ultraschall behandelt (= Gesamtaktivität). Zu jeweils 2 der 4 Aliquots wurden 5µl Insektenringer und zu den anderen 2 jeweils 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei 4°C wurden die Aliquots gegen jeweils 100ml Insektenringer, der nach 1 Stunde gewechselt wurde, dialysiert. Nach 0, 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden jeweils 40µl entnommen und bis zur Bestimmung der Trehalaseaktivität mit dem zweistufigen Trehalasetest bei 4°C aufbewahrt. Gezeigt sind Mittelwerte (n=2).

Dialysezeit [h]	Trehalaseaktivität in Flugmuskelhomogenaten [U/g bei 30°C und (%)] 24 Stunden nach der Homogenisation			
	Homogenat ohne Trehazolin		Homogenat mit Trehazolin	
	ohne TRITON	mit TRITON	ohne TRITON	mit TRITON
0	2,885 (100%)	2,870 (100%)	0,414 (14,4%)	0,381 (13,3%)
2	2,525 (87,5%)	1,854 (64,6%)	0,344 (11,9%)	0,138 (4,8%)
4	2,486 (86,2%)	0,234 (8,2%)	0,328 (11,4%)	0,091 (3,2%)
8	2,349 (81,4%)	0,098 (3,4%)	0,316 (11,0%)	0,043 (1,5%)
24	2,560 (85,7%)	0,118 (4,1%)	0,246 (8,6%)	0,062 (2,2%)

Um zu überprüfen, wie das Homogenisationsmedium auf die Stabilität der Trehalaseaktivität in Homogenaten der Flugmuskulatur von *Locusta* wirkt, wurden 9 Tiere verwendet. Diese wurden getötet und die Flugmuskulatur von je drei Tieren mit 9 Teilen Insektenringer (w/v), 9 Teilen 50mM Natriummaleat pH 6,5 (w/v) oder mit 9 Teilen 50mM Natriummaleat pH 6,5 (w/v) + 1% TRITON X-100 (v/v) homogenisiert. Nach der Homogenisation und nach 24 Stunden bei 4°C wurde die Trehalaseaktivität mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt (Tabelle 6 und Abbildung 28).

Tabelle 6. Wirkung verschiedener Homogenisationsmedien auf die Trehalaseaktivität in Homogenaten der Flugmuskulatur von Locusta [U/g bei 30°C] nach 0 und 24 Stunden Lagerung bei 4°C.

Die Flugmuskulatur von 3 Locusta wurde mit folgenden Medien homogenisiert:

1. mit 9 Teilen Insektenringer (w/v)
2. mit 9 Teilen 50mM Natriummaleat pH 6,5 (w/v)
3. mit 9 Teilen 50mM Natriummaleat pH 6,5 + 1% TRITON X-100 (v/v)

Nach der Homogenisation (= 0 Stunden) und nach 24 Stunden (bei 4°C) wurde die Trehalaseaktivität mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n=3). Statistische Analyse siehe Tabelle 26 und Tabelle 27 im Anhang.

homogenisiert mit:	Trehalaseaktivität [U/g Flugmuskulatur]	
	nach 0 Stunden	nach 24 Stunden
Ringer	1,090 $\pm$ 0,22	0,966 $\pm$ 0,12
Maleat	1,192 $\pm$ 0,32	1,039 $\pm$ 0,27
Maleat + TRITON	5,754 $\pm$ 0,22	5,178 $\pm$ 0,12

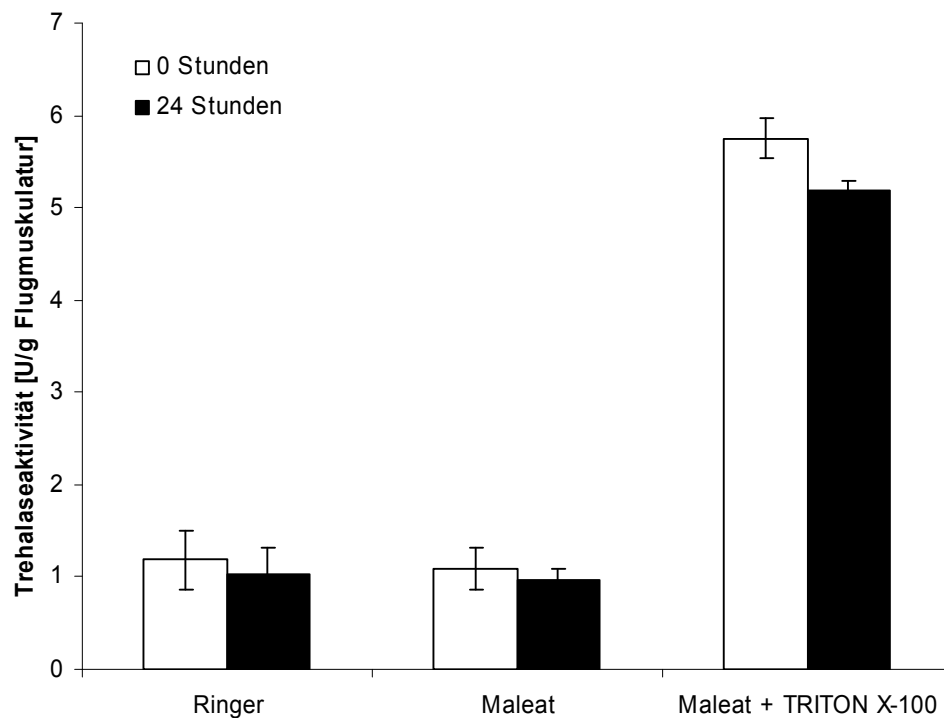


Abbildung 23. Wirkung verschiedener Homogenisationsmedien auf die Trehalaseaktivität in Homogenaten der Flugmuskulatur von Locusta [U/g bei 30°C] nach 0 und 24 Stunden Lagerung bei 4°C. Details zur Versuchsdurchführung siehe Tabelle 6. Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n=3).

Die Trehalaseaktivitäten in den Homogenaten, die mit Insektenringer, Homogenisationspuffer (50mM Natriummaleat pH 6,5) ohne und mit TRITON X-100 homogenisiert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen 0 und 24 Stunden Lagerung bei 4°C.

Da die Dialyse von Flugmuskelhomogenaten, die einer Detergens- und Ultraschallbehandlung ausgesetzt waren, zu einer starken Verminderung der Trehalaseaktivität innerhalb von wenigen Stunden führte, sollte diese Behandlung vermieden werden. Die Dialyse von nicht mit TRITON X-100 behandelten Flugmuskelhomogenaten erscheint jedoch zur Entfernung von nicht an Trehalase gebundenem Trehazolin geeignet. Flugmuskeltrehalase in 50mM Maleat bei einem pH-Wert von 6,5 scheint über 24 Stunden relativ stabil zu sein und auch die Dialyse gegen Ringerlösung vermindert die Aktivität nur geringfügig.

Trehalasehomogenate, die mit Insektenringer, Homogenisationspuffer (50mM Natriummaleat pH 6,5) ohne und mit TRITON X-100 hergestellt wurden, zeigten auch nach 24 Stunden Lagerung bei 4°C keine signifikante Abnahme der Trehalaseaktivitäten im Vergleich zu Proben, die direkt nach der Homogenisation gemessen wurden. Es sollte deshalb kein Problem sein, Flugmuskelhomogenate über Nacht bei 4°C aufzubewahren.

In späteren Versuchen wurde zur Entfernung von nicht-spezifisch gebundenem Trehazolin die Dialyse vielfach durch eine zeitsparende und schonende Waschung der Halbthoraces ersetzt (siehe 2.3.2).

2.7 Trehazolindosen, Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur

Jeweils 6 männliche *Locusta* wurden entweder mit 5µl Insektenringer (= Kontrollen) oder mit Trehazolindosen von 10µg, 20µg oder 40µg (stets in 5µl Insektenringer) injiziert. Die Tiere wurden weiter einzeln in kleinen Plastikschalen gehalten und nach 2 und 4 Stunden nochmals per Pipette getränkt und hatten danach ad libitum Zugang zu Gras und Wasser. Direkt vor der Injektion und nach 24 Stunden wurde den Tieren Hämolymphe entnommen und bis zur Bestimmung des Glucose- und Trehalosegehalts (siehe 2.4 und 2.5) bei -20°C aufbewahrt. Während der Wirkdauer des Trehazolins wurden die Tiere in kleine Plastikschälchen gesetzt,

in denen ihnen frisches Gras und Wasser zur Verfügung standen. Nach 24stündiger Beobachtung wurde Hämolymphe zur Bestimmung von Hämolymphezucker entnommen, dann wurden die Tiere getötet, die Halbthoraces gewaschen (siehe 2.3.2), die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert (siehe 2.3.2) und fraktioniert (siehe 2.3.3). Die Messung der Trehalaseaktivität erfolgte mit dem zweistufigen Trehalasetest (siehe 2.4).

2.8 Trehazolinfütterung, Hämolymphezucker und Flugmuskeltrehalase

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Trehazolin in der Lage ist, nach oraler Gabe aus dem Verdauungstrakt von *Locusta* in die Hämolymphe und an die Organe zu gelangen.

Zehn männliche *Locusta* wurden über Nacht in kleinen Plastikschälchen ohne Wasser und Gras gehalten. Am nächsten Morgen wurden jeweils 5 Tiere mit 5µl Leitungswasser in denen 0µg (= Kontrolle) oder 50µg Trehazolin gelöst waren, gefüttert. Zwei und vier Stunden später wurden die Tiere mit einer Pipette ad libitum mit Leitungswasser getränkt. Nach 24 Stunden, in denen den Tieren Wasser und Gras zur Verfügung standen, wurde den Tieren Hämolymphe zur Bestimmung der Glucose- und Trehalosekonzentrationen abgenommen. Dann wurden die Tiere getötet, die Halbthoraces in Ringer gewaschen (2.3.2), die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert (siehe 2.3.2), fraktioniert (siehe 2.3.3) und in den zweistufigen Trehalasetest eingesetzt (siehe 2.4).

2.9 Langzeiteffekte von Trehazolin auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von *Locusta*

Bei diesem Versuch sollte analysiert werden, wie lange die hemmende Wirkung einer subletalen Dosis von 20µg Trehazolin auf das Verhalten der Tiere und die Aktivitäten der Trehalaseformen anhält und mit welchem Zeitverlauf die Trehalaseaktivität regeneriert wird. Es wurden insgesamt 50 männliche *Locusta* mit je 20µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) injiziert. In einem separaten Experiment

wurden unter denselben Bedingungen 12 *Locusta* mit 5µl Insektenringer (= Kontrollen) injiziert. Drei der mit Ringer injizierten Tiere wurden einen Tag nach der Injektion, jeweils 3 weitere Tiere nach 10, 20 oder 30 Tagen getötet, die Halbthoraces gewaschen (siehe 2.3.2), die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert (siehe 2.3.2), fraktioniert (siehe 2.3.3) und im zweistufigen Trehalasetest (siehe 2.4) die Trehalaseaktivität bestimmt. Von den mit Trehazolin injizierten Tieren wurden täglich jeweils 3 Tiere nach 1, 2 bis 10 Tagen sowie 13, 22, 24 und 30 Tagen getötet und wie die Kontrollen behandelt.

2.10 Flug und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Heuschrecken nach Injektion von Trehazolin

Für Flugversuche (stationärer Flug, „fixed flight“) wurden die Heuschrecken im Bereich zwischen Kopf und Thorax durch ein 4mm breites Textilgummiband gehalten, das mit einem starren Plastikröhrchen fixiert war (siehe Abbildung 24). Bei Flugversuchen musste darauf geachtet werden, dass die Tiere die Flügel frei bewegen konnten. Die Flugtiere waren während der Flugphasen an einem Stativ vor einem Ventilator befestigt und bei niedrigen Raumtemperaturen zusätzlich dem warmen Luftstrom eines Haartrockners ausgesetzt (die Luft kam von vorn und war gegen den Kopf gerichtet). In den Flugpausen ruhten die Tiere in kleinen Plastischälchen.

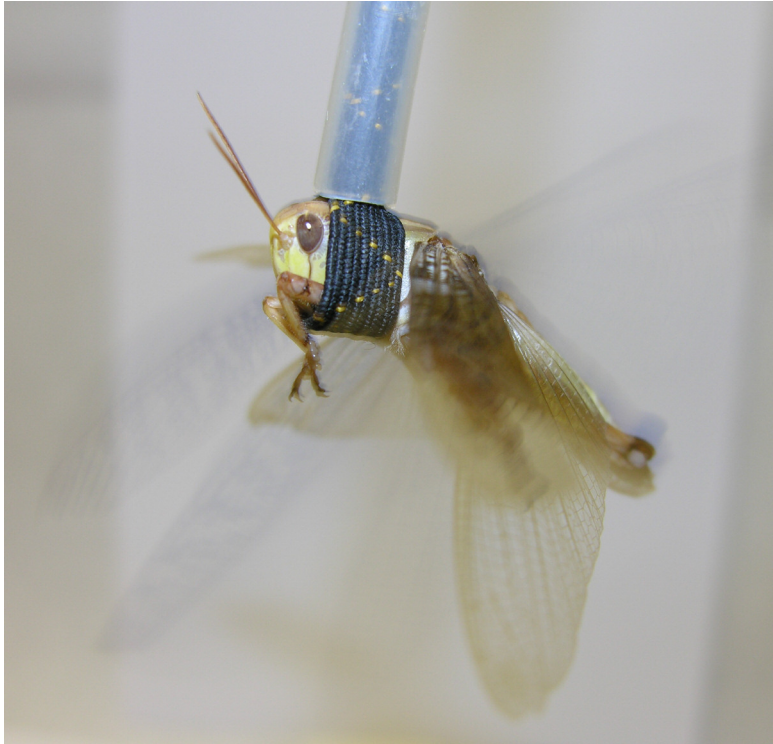


Abbildung 24.

Locusta migratoria
beim (stationären)
Flug

Trehazolintiere (injiziert mit 10 μ g oder 20 μ l Trehazolin in 5 μ l Insektenringer) wurden mit Ringertieren (injiziert mit 5 μ l Insektenringer) verglichen. Acht der Trehazolintiere (10 μ g Trehazolin in 5 μ l Insektenringer) und 8 Ringertiere (= Fluginsekten) flogen jeweils insgesamt 10 Minuten (bei 30 Minuten Trehazolinwirkdauer) mit Flugphasen von Minute 10 bis 15 und von Minute 25 bis 30. Zehn weitere Fluginsekten (injiziert mit 20 μ g Trehazolin in 5 μ l Insektenringer oder mit 5 μ l Insektenringer) flogen insgesamt 10 Minuten (bei 50 Minuten Trehazolinwirkdauer) mit Flugphasen von Minute 20 bis 25 und von Minute 45 bis 50. Bei einer Trehazolinwirkdauer von 16 Stunden (den Heuschrecken stand frisches Gras und Wasser zur Verfügung) flogen 12 Tiere (injiziert mit 10 μ g Trehazolin in 5 μ l Insektenringer oder mit 5 μ l Insektenringer) in der letzten der 16 Stunden für insgesamt 10 Minuten und zwar von 15 Stunden 30 Minuten bis 15 Stunden 35 Minuten und von 15 Stunden 55 Minuten bis 15 Stunden 60 Minuten. Die gleiche Anzahl von Tieren wurde wie die Fluginsekten behandelt, diese wurden jedoch während der gesamten Wirkdauer des Trehazolins in kleinen Plastikschräbchen aufbewahrt.

Dreißig bzw. fünfzig Minuten oder 16 Stunden nach Versuchsbeginn wurden die Tiere wie üblich getötet, die Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert (siehe 2.3.2) und fraktioniert (siehe 2.3.3). Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen Trehalasetest (siehe 2.4) bestimmt.

2.11 Injektion von Insulin und Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur

2.11.1 Verabreichung von Insulin

Rinder-Insulin (Molekulargewicht: 5,8kDa) wurde in Pulverform von Sigma-Aldrich (82024 Taufkirchen) bezogen und bei -20°C gelagert. Aliquots wurden mit einer Konzentration von 1mg/ml angesetzt. Da Insulin nur bei saurem pH löslich ist, wurden zu einem Milligramm Insulin zuerst 10µl Eisessig (nach Produktdatenblatt von Sigma-Aldrich) dann 500µl Insektenringer gegeben. Wenn das Insulin gelöst war, wurde mit 490µl Insektenringer auf 1ml aufgefüllt und das Insulin aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert und nach einmaligem Auftauen nicht wieder verwendet.

Für alle folgenden Versuche mit Insulin wurde den Versuchstieren der Kopf mit Nähgarn im Halsbereich abgeschnürt und anschließend der Kopf vor dem Knoten abgeschnitten, so dass kein Material aus dem Darm entweichen konnte. Die Abschnürung des Kopfes soll die Ausschüttung von Neuropeptiden aus dem Gehirn in die Hämolymphe verhindern (siehe zum Beispiel Downer 1979), die die Insulinwirkung verfälschen könnten. Mehrere Autoren haben berichtet, dass die Ligation zu einer verstärkten Wirkung von Insulin oder Insulin-ähnlichen Peptiden führt. Bei Seidenraupen sanken der Trehalose- und Glucosespiegel ab, während die Trehalaseaktivität nach 5 Minuten anstieg, aber nach 10 Minuten bereits wieder abfiel (Satake et al. 1997). Wurde in geschnürte *Locusta* ein Extrakt aus den *Corpora cardiaca* injiziert, so stieg der Kohlenhydratspiegel in der Hämolymphe um ca. 44% an (Loughton und Orchard 1981).

2.11.2 Insulindosen und Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur

Insgesamt 30 männlichen *Locusta* wurde der Kopf abgeschnürt und entfernt. Nach 3 Stunden wurden jeweils 6 der kopflosen Tiere (= Trehazolin-Insulintiere) entweder mit 5 μ g, 500ng, 50ng, 25ng oder 5ng Insulin (Insulin wurde in Essigsäure gelöst, siehe 2.2.2; die Verdünnungen wurden mit Insektenringer hergestellt) plus 20 μ g Trehazolin (in 5 μ l Insektenringer) injiziert. Beide Substanzen wurden in einer Injektion von 10 μ l Volumen verabreicht. Als Kontrollen (= Trehazolintiere) wurden jeweils 6 Tiere nur mit 5 μ g Insulin (in 5 μ l Insektenringer) oder nur mit 20 μ g Trehazolin (in 5 μ l Insektenringer) injiziert. Nach 30 Minuten Wirkzeit wurden die Tiere wie üblich präpariert, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert (siehe 2.3.2) und fraktioniert (siehe 2.3.3). Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt (siehe 2.4).

2.11.3 Insulin in intakten Heuschrecken und solchen ohne Kopf

Fünf intakte *Locusta* (= Kontrollen) erhielten in einer Injektion 20 μ g Trehazolin plus 5 μ g Insulin. Nach 30 Minuten Wirkzeit wurden die Tiere wie üblich präpariert, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert (siehe 2.3.2) und fraktioniert (siehe 2.3.3). Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt (siehe 2.4).

Zwanzig weitere *Locusta* erhielten in einer Injektion ebenfalls 20 μ g Trehazolin plus 5 μ g Insulin. Nach 5, 10, 20 oder 30 Minuten Wirkzeit wurden die Tiere wie üblich präpariert, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert (siehe 2.3.2) und fraktioniert (siehe 2.3.3). Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt (siehe 2.4).

2.12 Flug und Trehazolin in Kombination mit Wortmannin oder Insulin

2.12.1 Verabreichung von Wortmannin

Wortmannin (siehe Abbildung 25) wurde von Sigma-Aldrich (82024 Taufkirchen) bezogen. Die Substanz ist nicht wasserlöslich. Von Wortmannin wurde deshalb in DMSO (= Dimethylsulfoxid von Sigma-Aldrich) eine 2mM Lösung hergestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -40°C gelagert.

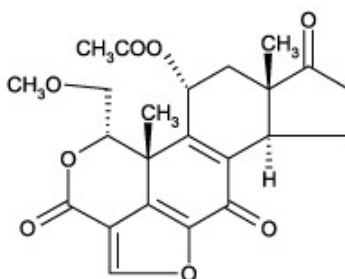


Abbildung 25. Strukturformel von Wortmannin (MW: 428,4 g/Mol, Quelle: Sigma-Aldrich)

2.12.2 Wortmannin, Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur

Wortmannin ist ein selektiver Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase). PI3-Kinase ist bei Säugern als Bestandteil des Insulinsignalweges an der Translokation des Glucose-Transporters 4 (GLUT-4) beteiligt. GLUT-4 ist charakteristisch für Muskulatur und Fettgewebe und wird durch Insulin mit Vesikeln aus dem Cytoplasma in die Plasmamembran transloziert. Dieser Versuch soll klären, ob Wortmannin, allein oder in Kombination mit Flug Effekte auf die Aktivität der Trehalaseformen in der Flugmuskulatur von *Locusta* hat.

Für diese Versuche wurden intakte Tiere (mit Kopf) verwandt. Vor Versuchsbeginn wurden alle Heuschrecken mit Leitungswasser getränkt, um die spätere Hämolymphentnahme zu erleichtern. Trehazolintiere (kein Wortmannin) wurden mit 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) in die rechte Seite und 45 Minuten später mit 5µl DMSO-Ringer (1 Teil DMSO + 4 Teile Insektenringer) in die linke Seite injiziert. Flugtiere wurden 10 Minuten später zum Flug angeregt, die

Ruhetiere wurden in kleinen Plastikschälchen aufbewahrt. Die Trehazolin-Wortmannintiere wurden 45 Minuten nach Injektion von Trehazolin mit 0,4mM Wortmannin in 5µl DMSO-Ringer injiziert. Die Ruhe- und Flugzeiten entsprachen denen der Kontrollen.

Sechzig Minuten nach der Injektion von Trehazolin wurde allen Tieren Hämolymphe entnommen (siehe 2.3.1) und bei -20°C zur späteren Bestimmung der Glucose- und Trehalosekonzentration (siehe 2.5) aufbewahrt. Direkt nach der Hämolymphentnahme wurden die Tiere wie üblich getötet, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert (siehe 2.3.2) und fraktioniert (siehe 2.2.2). Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt (siehe 2.4).

2.12.3 Insulin und Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta

Männlichen Locusta wurde (anders als in 2.12.2) drei Stunden vor Versuchsbeginn der Kopf mit Nähgarn abgeschnürt und dann vor dem Knoten abgeschnitten (siehe 2.11.1). Den „kopfloren“ Tieren wurden Substanzen jeweils in einer Injektion verabreicht, deren Gesamtvolumen stets 15µl betrug. Ein Bestandteil der Injektion war immer 20µg Trehazolin in 5µl Insektenringer. Die Trehazolintiere wurden mit 20µg Trehazolin (in 10µl Ringer) plus 5µl Insektenringer injiziert. Die Trehazolin-Insulintiere wurden mit 20µg Trehazolin (in 10µl Ringer) plus 500ng Insulin (in 5µl Ringer, siehe 2.11.2) injiziert.

Die wie unter 2.1.3 beschrieben injizierten „kopfloren“ Ruhetiere saßen für 30 Minuten in kleinen Plastikschälchen. Dann wurden die Tiere wie üblich präpariert, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur isoliert, homogenisiert (siehe 2.3.2) und fraktioniert (siehe 2.3.3). Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt (siehe 2.4).

Die wie unter 2.11.3 beschrieben injizierten „kopfloren“ Flugtiere wurden 25 Minuten nach der Injektion in die Flugapparatur gespannt und für 5 Minuten zum Fliegen stimuliert. Die Wirkdauer der applizierten Substanzen betrug insgesamt 30 Minuten. Danach wurden die Tiere wie üblich präpariert, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur isoliert, homogenisiert (siehe 2.3.2) und fraktioniert

(siehe 2.3.3). Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen Trehalasetest (siehe 2.4) bestimmt.

Einige Tiere starben während des Versuches. Dadurch verminderte sich die n-Zahl bei manchen Teilgruppen dieser Serie.

2.13 Trehalaseaktivität in Fraktionen verschiedener Organe

Neun männliche *Locusta* wurden mit je 10µg Trehazolin (in 5 µl Ringer) injiziert. Nach 2 Stunden wurden die Tiere getötet, die Gewebe (Flug- und Sprungmuskulatur, Gehirn, Darm und Fettkörper) präpariert und homogenisiert (siehe 2.3.2).

Die Homogenate wurden über Nacht gegen ca. 400ml Ringer (bei 4°C) dialysiert, um nicht an Trehalase gebundenes Trehazolin zu entfernen. Der Insektenringer wurde nach 1 Stunde Dialyse gewechselt. Am nächsten Tag wurden die Homogenate fraktioniert (siehe 2.3.3) und die Trehalaseaktivität mit dem zweistufigen Trehalasetest (siehe 2.4) bestimmt.

2.14 Zusammenarbeit

Die unter 2.8 beschriebene Versuchsreihe wurden in Kooperation mit Christine Seelmann, die unter 2.12.2 und 2.12.3 beschriebenen Versuche mit Sebastian Göttges durchgeführt.

2.15 Statistik

Ob die Ergebnisse von zwei Messreihen sich statistisch signifikant unterscheiden, wurde mit dem t-Test nach Student ermittelt (z.B. in Microsoft Excel). Dazu wurden zuerst die Varianzen mit dem F-Test berechnet. Ergab der F-Test einen Wert von $>0,05$, so hatten die Messreihen gleiche Varianzen (= homoskedastisch), war der F-Test $<0,05$, hatten die Messreihen ungleiche Varianzen (= heteroskedastisch). Bei einer homoskedastischen Verteilung der Messwerte wurde der t-Test 2, bei einer heteroskedastischen Verteilung der t-Test 3 verwendet. Das Ergebnis der t-Tests ergibt einen p-Wert ($p = \text{probability}$). Er repräsentiert die Wahrscheinlichkeit, mit der sich zwei Messreihen nur zufällig voneinander unterscheiden. Ist der p-Wert $<0,05$, so beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Messreihen zufällig voneinander unterscheiden weniger als 5% (d.h. in weniger als 1 von 20 Fällen). Solche Messreihen werden als voneinander statistisch signifikant verschieden angesehen. Ist der p-Wert $<0,01$, so beträgt die zufällige Wahrscheinlichkeit $<1\%$, und Messreihen werden als statistisch hochsignifikant voneinander verschieden bezeichnet.

Im Ergebnisteil sind nur einige statistische Angaben enthalten. Eine detaillierte Analyse findet sich im Anhang.

3 Ergebnisse

Allgemeines zur Auswertung und Darstellung

Im Folgenden finden sich jeweils Tabellen und Abbildungen, in denen der Vollständigkeit halber die gesamte *overte*, lösliche *overte*, gebundene *overte*, die gesamte gebundene sowie *latente* und gesamte Trehalaseaktivität aufgeführt werden. Bei der Beschreibung im Text gehe ich bevorzugt auf die gesamte *overte* und die *latente* Trehalaseform ein (siehe Abbildung 17 oder Ausklappblatt am Ende der Arbeit).

Die Signifikanzzeichen in den Abbildungen beziehen sich entweder auf die Kontrolle und sind dann mit „*“ oder „**“ ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$) gekennzeichnet oder auf einen anderen Wert, wobei die beiden Werte dann mit einer Klammer verbunden sind. Detaillierte Angaben zu den statistischen Analysen finden sich im Anhang.

3.1 Effekte verschiedener Trehazolindosen auf Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von *Locusta*

Es sollte geprüft werden, welche Effekte die Injektion unterschiedlicher Dosen von Trehazolin auf die Gehalte an Zuckern in der Hämolymphe und auf die Aktivitäten der Trehalase in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* hat. Das Fraktionierungsverfahren ist auf einem Ausklappblatt am Ende der Arbeit dargestellt. Es wurden als Dosen 10µg bis 40µg Trehazolin gewählt, als Wirkdauer 24 Stunden.

Allen Tieren wurden vor der Injektion Hämolympheproben entnommen, in denen die Konzentrationen von Glucose und Trehalose (Gesamtzucker) bestimmt wurden.

Den mit Ringer (= Kontrollen), 10µg, 20µg oder 40µg Trehazolin injizierten Heuschrecken wurden nach 24 Stunden Einwirkzeit wiederum Hämolymphe entnommen und darin ebenfalls die Glucose- und die Gesamtzuckerkonzentration (als Trehalose bezeichnet) bestimmt. Nach der Hämolymphabnahme wurden die Tiere getötet, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert und fraktioniert. Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen

Trehalasetest gemessen. Die *latente* und die gesamte Aktivität wurden berechnet wie unter 2.4.2 beschrieben.

Es ist auffällig, dass die Glucosespiegel der Heuschrecken auch ohne Injektion von Trehazolin erheblich schwanken können. Diese Beobachtung ist nicht ungewöhnlich. Vergleichswerte von Hämolympheglucose in *Locusta* in der Literatur schwanken ebenfalls stark. Sehr klar und hochsignifikant war der hypoglykämische Effekt aller Dosen von Trehazolin auf den Blutzucker Glucose, da in den meisten Versuchstieren 24 Stunden nach Injektion keine Glucose in der Hämolymphe mehr nachweisbar war (Tabelle 7A).

Die Wirkung von Trehazolin auf die Hämolymphe Spiegel von Trehalose ist weniger klar ausgeprägt, jedoch ist bei allen Gruppen von Versuchstieren ein hypertrehalosämischer Effekt sichtbar oder zumindest angedeutet (Tabelle 7B). Allerdings wird, wie auch bei der Glucose, eine Abhängigkeit der Zuckerspiegel von der Trehazolidosis nicht deutlich.

Tabelle 7. Glucose- und Trehalosekonzentrationen [mM] in der Hämolymphe von *Locusta* vor und 24 Stunden nach Injektion verschiedener Dosen von Trehazolin.

Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SEM (n=6). Statistische Analyse siehe Tabelle 28 im Anhang.

Zeit [h]	A. Glucosekonzentration [mM] nach Injektion von			
	Ringer	10µg Trehazolin	20µg Trehazolin	40µg Trehazolin
0	4,9 $\pm$ 1,9	4,13 $\pm$ 1,3	0,94 $\pm$ 0,4	1,40 $\pm$ 0,4
24	2,2 $\pm$ 1,1	0,00 $\pm$ 0,0**	0,33 $\pm$ 0,1**	0,03 $\pm$ 0,0
Zeit [h]	B. Trehalosekonzentration [mM] nach Injektion von			
	Ringer	10µg Trehazolin	20µg Trehazolin	40µg Trehazolin
0	50,8 $\pm$ 6,1	57,1 $\pm$ 8,3	43,9 $\pm$ 5,0	75,3 $\pm$ 6,2
24	65,4 $\pm$ 2,8	94,2 $\pm$ 6,3	89,9 $\pm$ 7,8	89,5 $\pm$ 11,0

Sehr viel eindeutiger als auf die Zuckerspiegel ist die Wirkung von Trehazolin auf die Aktivitäten der Trehalaseformen der Flugmuskulatur. Hier wurden in allen Fraktionen dosisabhängige Inhibitoreffekte sichtbar, die zum Teil höchst signifikant sind (Tabelle 8 und Abbildung 26). Die Effekte waren besonders ausgeprägt bei den *overten* Formen, die von allen Trehazolindosen stark gehemmt wurden. Interessant ist der Befund, dass die geringste Trehazolindosis praktisch keine Hemmung der *latenten* Trehalaseaktivität zur Folge hatte ($p=0,84$). Beide Beobachtungen sind mit der Translokationshypothese vereinbar.

Tabelle 8. Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* 24 Stunden nach Injektion von Ringer oder verschiedenen Dosen von Trehazolin.

Ringertiere (= Kontrollen) erhielten eine Injektion von 5µl Insektenringer.

Trehazolintiere erhielten eine Injektion von 10µg, 20µg oder 40µg Trehazolin (jeweils in 5µl Insektenringer).

Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] $\pm$ SEM (n=6). Statistische Analyse siehe Abbildung 26 und Tabelle 29 im Anhang.

Trehalasefraktion	Trehalaseaktivität [U/g bei 30°C]			
	Ringer	10µg Trehazolin	20µg Trehazolin	40µg Trehazolin
gesamte overte	1,623 $\pm$ 0,19	0,189 $\pm$ 0,04	0,086 $\pm$ 0,02	0,027 $\pm$ 0,01
lösliche overte	0,290 $\pm$ 0,03	0,078 $\pm$ 0,07	0,010 $\pm$ 0,01	0,089 $\pm$ 0,09
gebundene overte	1,084 $\pm$ 0,19	0,301 $\pm$ 0,05	0,180 $\pm$ 0,11	0,076 $\pm$ 0,01
gesamte gebundene	4,592 $\pm$ 1,02	3,553 $\pm$ 0,51	1,153 $\pm$ 0,41	0,285 $\pm$ 0,05
latente	3,508 $\pm$ 1,13	3,258 $\pm$ 0,47	0,973 $\pm$ 0,42	0,214 $\pm$ 0,05
Gesamtaktivität	4,881 $\pm$ 1,00	3,631 $\pm$ 0,47	1,163 $\pm$ 0,40	0,374 $\pm$ 0,12

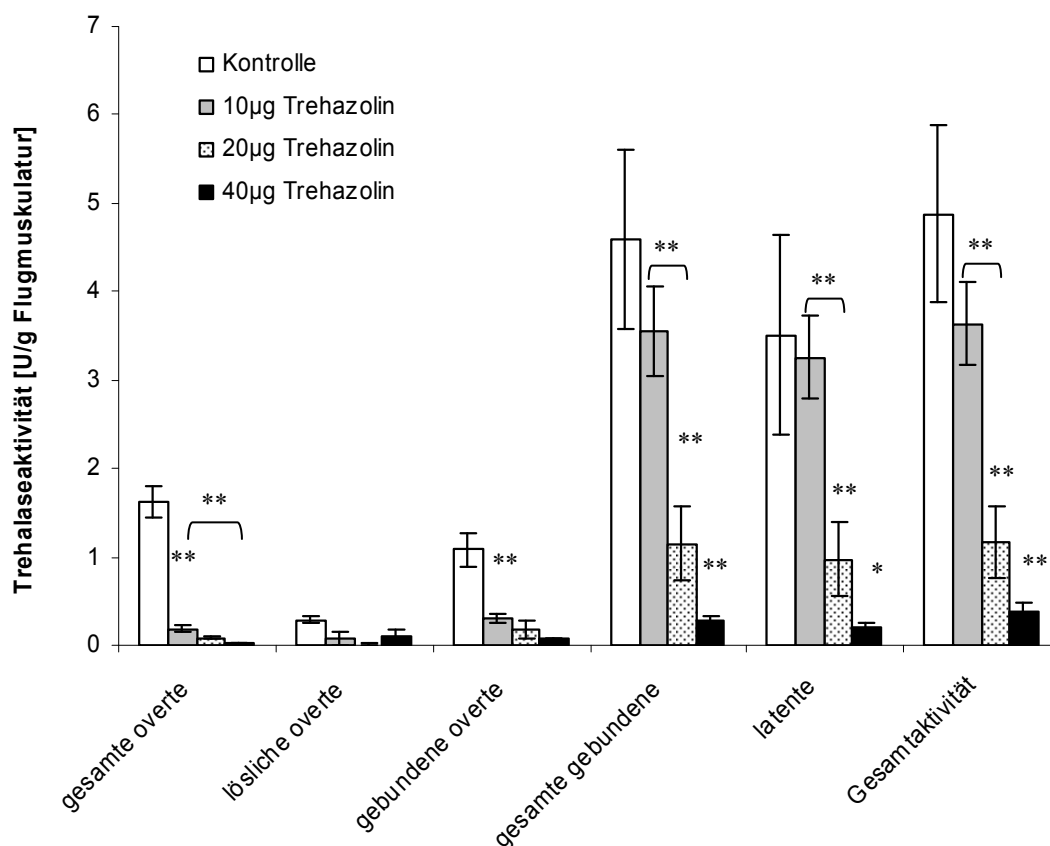


Abbildung 26. Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta 24 Stunden nach der Injektion von Ringer oder verschiedener Dosen von Trehazolin.

Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] $\pm$ SEM (n=6). Statistische Analyse siehe Tabelle 29 im Anhang. Die Signifikanzzeichen beziehen sich auf die Kontrollwerte (Ausnahme: mit Klammern verbundene Werte). Für Details siehe Tabelle 8.

3.2 Hämolymphezucker und Flugmuskeltrehalase in Wanderheuschrecken nach Fütterung mit Trehazolin

Ziel dieses Experiments war zu prüfen, ob oral verabreichtes Trehazolin über den Verdauungstrakt in den Körper der Heuschrecken gelangen und dort Wirkungen entfalten kann oder ob es ohne Effekte ausgeschieden wird. Dazu wurden je 5 Locusta nach einer Nacht ohne Futter und Wasser mit 5µl Leitungswasser (= Kontrolltiere) oder mit 5µl Leitungswasser, in denen 50µg Trehazolin gelöst

waren, aus einer Pipette gefüttert. Zwei und 4 Stunden nach der Fütterung wurden die Tiere mit Leitungswasser aus einer Pipette (ad libitum) getränkt und dann mit Wasser und Gras versorgt. Während der 24 Stunden nach der Fütterung mit Trehazolin bzw. Wasser verhielten sich alle Tiere weitgehend normal. Die Trehazolintiere waren allerdings ruhiger und bewegten sich weniger (kaum Sprungversuche) als die Kontrollen und fraßen auch etwas weniger. Gravierende Vergiftungserscheinungen wurden nicht beobachtet. Nach 24stündiger Beobachtung wurde allen Tieren Hämolymphe zur Bestimmung von Hämolymphezuckern entnommen. Anschließend wurden sie getötet, die Halbthoraces in Ringerlösung gewaschen, um nicht an Trehalase gebundenen Inhibitor zu entfernen. Die Flugmuskulatur wurde präpariert und fraktioniert und die Trehalaseaktivitäten in den Gewebefractionen der Flugmuskulatur wurden gemessen.

Die nur mit Leitungswasser getränkten Tiere zeigten eine sehr große Schwankung in der Glucosekonzentration der Hämolymphe (siehe Tabelle 9). Es wurden Werte zwischen 0,52mM und 6,15mM gemessen, mit einem Mittelwert von 2,71mM. Die mittlere Glucosekonzentration in der Hämolymphe der mit Trehazolin gefütterten Tiere betrug weniger als 10% des Kontrollwertes. Der Effekt der Trehazolinfütterung auf die Glucosekonzentration in der Hämolymphe ist offenbar, da aber ein einzelner Kontrollwert sehr hoch war, war der Effekt bei Anwendung des t-Tests wegen des hohen SEM-Wertes der Kontrollen nicht statistisch signifikant ($p = 0,11$). Es ist bekannt, dass der Glucosespiegel in der Hämolymphe von Heuschrecken stark schwanken kann, so dass dieses Ergebnis nicht überraschend ist (siehe auch Diskussion). Würde man jeweils den höchsten Glucosewert der Kontroll- und Trehazolingruppe außer Acht lassen, so wäre $p = 0,04$.

Die Streuung der Trehalosewerte war geringer als die der Glucosewerte und der Anstieg der Trehalosekonzentration in den mit Trehazolin gefütterten Heuschrecken war auf dem 5% Niveau signifikant.

Tabelle 9. Glucose- und Trehalosekonzentrationen [mM] in der Hämolymphe von *Locusta* 24 Stunden nach Fütterung der Tiere mit 50µg Trehazolin.

Kontrolltiere erhielten 5µl Leitungswasser.

Trehazolintiere erhielten 50µg Trehazolin (in 5µl Leitungswasser).

Gezeigt sind Mittelwerte [mM] $\pm$ SEM (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 30 im Anhang.

Fütterung mit	Zuckerkonzentrationen in der Hämolymphe	
	Glucose [mM]	Trehalose [mM]
Leitungswasser	2,71 $\pm$ 1,21	46,54 $\pm$ 1,09
50µg Trehazolin (in Leitungswasser)	0,22 $\pm$ 0,07	67,19 $\pm$ 4,77*

Fütterung mit Trehazolin führte innerhalb von 24 Stunden zu einer hochsignifikanten Erniedrigung der Aktivität der *overten* Formen der Trehalase in Fraktion 1 und 2 (siehe Tabelle 10 und Abbildung 27). Bei der Messung der Aktivität in Fraktion 3 (gebundene *overt* Trehalase) ergab sich jedoch ein Problem, da die Werte durchweg viel zu niedrig ausfielen, d.h. *overt* Trehalase, die in Fraktion 1 vorhanden war, war in Fraktion 3 (nach Resuspensierung des Zentrifugationssediments) kaum mehr nachweisbar. Eine Denaturierung der Trehalase scheidet als Erklärungsmöglichkeit aus, da die Resuspensierung ein sehr schonender Schritt ist und die Trehalase nach Zugabe von Detergens wieder mit der gewohnten Aktivität vorhanden war. Dieses Phänomen ist am wahrscheinlichsten durch die Annahme zu erklären, dass das Zentrifugationssediment nicht ausreichend resuspendiert wurde, so dass größere Partikel erhalten blieben. In diesen Partikeln war vermutlich die Trehalase so dicht gepackt, dass das Substrat keinen Zugang zum Enzym hatte. In diesem Experiment wurde daher die Aktivität der gebundenen *overten* Trehalase als Differenz der Werte der gesamten *overten* und der löslichen *overten* Trehalase berechnet und diese Werte wurden dann wie üblich weiterverwendet. Aus dem Fraktionierungsverfahren ergibt sich, dass die gebundene *overt* Trehalase, wie hier (ausnahmsweise) geschehen, als Differenz von Fraktion 1 und Fraktion 2 definiert werden kann. In den meisten Experimenten ist dieser Differenzwert auch dem in Fraktion 3 gemessenen Wert sehr ähnlich, so dass das Verfahren akzeptabel ist. Die so berechnete gebundene *overt* Trehalase wird durch das verfütterte Trehazolin ebenfalls hochsignifikant gehemmt (Tabelle 10).

Verfüttertes Trehazolin führte auch zu einer hochsignifikanten Reduktion der gesamten gebundenen Trehalaseaktivität und der Gesamtaktivität der Trehalase. Dies gilt allerdings nicht für den *latenten* Anteil der Trehalase, der nur tendenziell, aber nicht signifikant erniedrigt war ($p=0,14$).

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen an, dass Trehazolin, welches vermutlich intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann, gleichwohl aus dem Darm in die Hämolymphe der Tiere gelangen kann. Die Wirkung ist aber durch orale Gabe offenbar stark abgeschwächt, da bei Injektion die verfütterte Dosis zu 50% Letalität führen würde (siehe auch Diskussion). Der nichtsignifikante Effekt auf die *latente* Trehalase deutet an, dass diese Form der Trehalase innerhalb von 24 Stunden erst durch höhere Konzentrationen an Trehazolin gehemmt werden kann als durch Verfütterung erreicht wurden. Dieses Ergebnis wäre mit einem Abschirmeffekt durch die Membranen der Muskelzellen entsprechend der Vesikelhypothese erklärbar (siehe Diskussion).

Tabelle 10. Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta*, 24 Stunden nach Fütterung der Tiere mit 50µg Trehazolin.

Kontrolltiere erhielten 5µl Leitungswasser.

Trehazolintiere erhielten 50µg Trehazolin (in 5µl Leitungswasser).

Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] $\pm$ SEM (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 31 Anhang.

Trehalasefraktion	Trehalaseaktivität [U/g Flugmuskulatur]	
	Kontrolltiere	Trehazolintiere
gesamte <i>overte</i>	1,814 $\pm$ 0,33	0,335 $\pm$ 0,03**
lösliche <i>overte</i>	0,257 $\pm$ 0,03	0,092 $\pm$ 0,01**
gebundene <i>overte</i>^x	1,557 $\pm$ 0,32	0,243 $\pm$ 0,03**
gesamte gebundene	5,320 $\pm$ 0,46	3,236 $\pm$ 0,13**
<i>latente</i>	3,762 $\pm$ 0,46	2,994 $\pm$ 0,12
Gesamtaktivität	5,576 $\pm$ 0,46	3,329 $\pm$ 0,13**

^xAnmerkung: Die Trehalaseaktivitäten in Fraktion 3 (gebundene *overte* Trehalase) ergaben in diesem Experiment keine sinnvollen Werte, da der Mittelwert (0,069 $\pm$ 0,03) im Vergleich zu anderen Experimenten viel zu gering war. Daher wurden die Werte für Fraktion 3 als Differenz der Werte von Fraktion 1 und Fraktion 2 ($F_3 = F_1 - F_2$) berechnet (siehe Text).

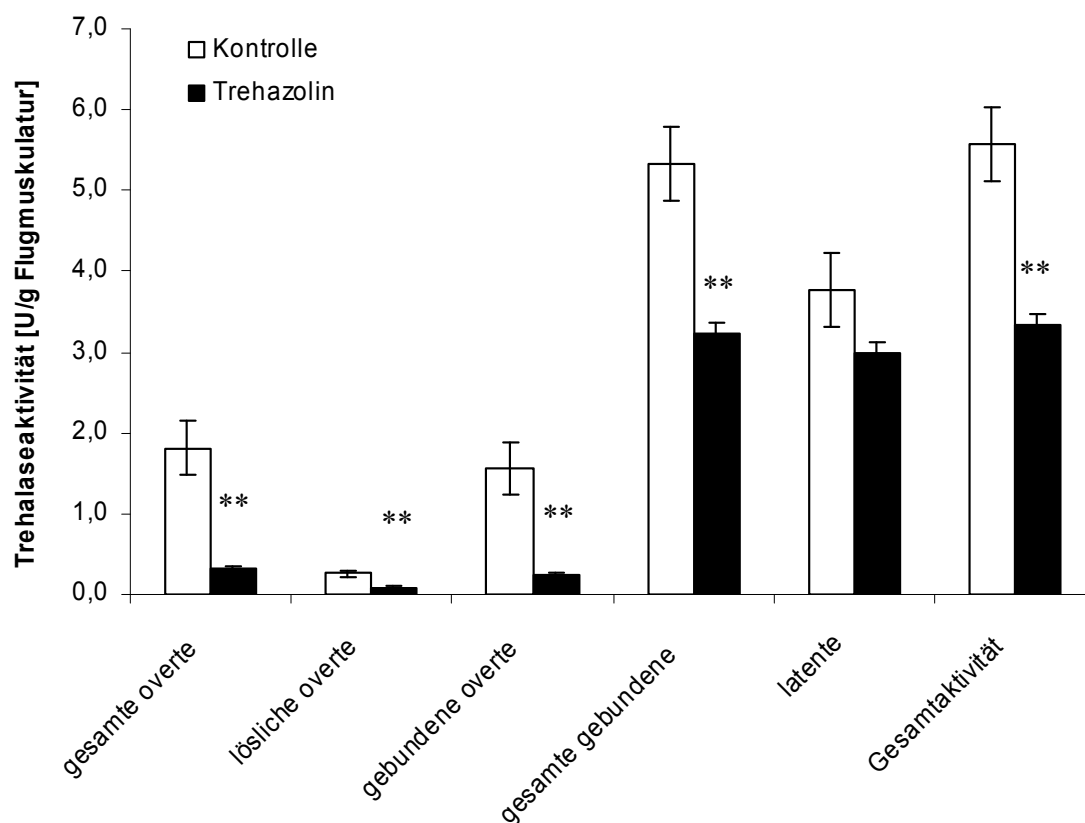


Abbildung 27. Wirkung der Fütterung von Trehazolin an *Locusta* auf die Aktivität der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur der Tiere.

Kontrolltiere erhielten 5µl Leitungswasser.

Trehazolintiere erhielten 50µg Trehazolin (in 5µl Leitungswasser).

24 Stunden später wurden die Tiere getötet, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert und fraktioniert. Gezeigt sind die Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 31 im Anhang.

3.3 Langzeiteffekte von Trehazolin auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von *Locusta*

Die Effekte von Trehalaseinhibitoren wie Validoxylamin A und Trehazolin auf Insekten sind überwiegend in Kurzzeitstudien analysiert worden, in denen die Inhibitoren einige Stunden bis wenige Tage wirken konnten. Ausnahmen betreffen Berichte über Entwicklungsstörungen (siehe Diskussion) und die Beobachtung von Kono et al. (1999), dass nach Injektion von Validoxylamin A in Wanderheuschrecken auch 16 Tage später noch der Trehalosespiegel der

Hämolymphe erhöht war. Dies kann man als Indiz dafür nehmen, dass die Trehalaseaktivität durch Trehalaseinhibitoren ebenfalls längerfristig inhibiert wird. Die langfristige Wirkung von Trehalaseinhibitoren auf das eigentliche Zielmolekül, nämlich die Trehalase, ist jedoch meines Wissens noch nicht untersucht worden. Das wäre nötig, um die Langzeitwirkung von Trehalaseinhibitoren auf Trehalosestoffwechsel und Trehalaseaktivität beurteilen zu können. Ein solches Experiment ist recht aufwendig, insbesondere, wenn die Effekte auf die verschiedenen Aktivitätsformen der Trehalase in der Flugmuskulatur analysiert werden sollen. Es ist aber auch interessant, da es Hinweise auf die Beziehungen geben könnte, die zwischen der *overten* und *latenten* Trehalase in vivo bestehen.

Ich habe daher untersucht, welche Langzeiteffekte die Injektion von 20µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) auf die Aktivität der Trehalase in Fraktionen der Flugmuskulatur hat. Dazu wurden im August 2004 fünfzig männliche Heuschrecken ca. 10 Tage nach der Adulthäutung mit jeweils 20µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) injiziert. Einige Tiere wurden als Kontrollen mit 5µl Ringer injiziert. Die Tiere für die Messungen wurden zufällig ausgewählt. Falls Versuchstiere jedoch auffällig schwach oder ungewöhnlich ruhig wirkten, wurden sie nicht verwendet. Nach der Injektion wurden die Heuschrecken in den üblichen Käfigen (siehe 2.1) zu je 25 Tieren gehalten und mit Futter und Wasser versorgt (siehe 2.1). Die Kontrolltiere (Kurzzeitkontrollen) wurden nach einem Tag analysiert, sie zeigten während der „Wirkdauer“ des Insektenringers normales Verhalten, d.h. sie waren sehr lebhaft, sprangen im Käfig und fraßen gut (siehe auch die Langzeitkontrollen im nächsten Absatz). Im Gegensatz dazu waren die Trehazolintiere sehr viel ruhiger, zeigten weniger Reaktionen, wenn der des Heuschreckenraume betreten wurde und sie Futter erhielten (kaum Sprungversuche). Sie nahmen auch wesentlich weniger Futter an. In der 30tägigen Versuchsphase starben einige Versuchstiere. Dabei gab es aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Trehazolintieren. Die Mortalität schien aber gegenüber unbehandelten oder zur Kontrolle injizierten Tieren nicht merklich erhöht (siehe nächsten Absatz).

Zu festgelegten Zeitpunkten (1 bis 30 Tage nach Injektion) wurden jeweils 3 zufällig ausgewählte Tiere getötet, präpariert, deren rechte Halbthoraces gewaschen und die Flugmuskulatur isoliert, homogenisiert und fraktioniert. Die Trehalaseaktivitäten in den Fraktionen wurden mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt.

In einem separaten Experiment wurden im Januar als Kontrollen wurden weitere 20 *Locusta* mit 5µl Insektenringer injiziert und nach 1, 10, 20 oder 30 Tagen jeweils 3 Tiere wie die Versuchstiere aufgearbeitet, um Alterungseffekte auf die Trehalaseaktivität erfassen zu können.

Innerhalb der 30 Tage, die das Experiment dauerte, waren bei den Kontrolltieren keine signifikanten altersbedingten Veränderungen in den Trehalaseaktivitäten der verschiedenen Fraktionen und damit auch in der gesamten und *latenten* Aktivität der Trehalase zu beobachten (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11. Einfluss des Lebensalters auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in Fraktionen der Flugmuskulatur von Wanderheuschrecken, die im Alter von 10 Tagen mit 5µl Insektenringer injiziert worden waren.

Innerhalb von 30 Tagen gab es keinen signifikanten Effekt des Alters auf die Aktivitäten der Trehalaseformen und die Gesamtaktivität der Trehalase. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=3). Statistische Analyse siehe Tabelle 32 im Anhang.

Trehalasefraktionen	Trehalaseaktivitäten [U/g Flugmuskulatur bei 30°C] (Zeit nach Injektion von Ringer)			
	1 Tag	10 Tage	20 Tage	30 Tage
gesamte overte	1,292 ± 0,07	1,096 ± 0,11	1,276 ± 0,22	1,353 ± 0,22
lösliche overte	0,203 ± 0,03	0,207 ± 0,01	0,317 ± 0,01	0,244 ± 0,01
gebundene overte	1,145 ± 0,04	1,136 ± 0,05	1,211 ± 0,13	0,975 ± 0,13
gesamte gebundene	4,437 ± 0,27	4,252 ± 0,05	5,130 ± 0,18	4,406 ± 0,29
latente	3,293 ± 0,13	3,116 ± 0,00	3,919 ± 0,03	3,432 ± 0,09
Gesamtaktivität	4,640 ± 0,24	4,459 ± 0,04	5,447 ± 0,16	4,651 ± 0,28

Die mit 20µg Trehazolin injizierten Tiere zeigten neben den zuvor beschriebenen Veränderungen im Verhalten sehr deutlich Änderungen in den Trehalaseaktivitäten. Bereits einen Tag nach der Injektion betrug die Gesamtaktivität der Trehalase nur noch 1,75U/g (verglichen mit 4,64U/g in den Kontrollen) und am Tag 2 nur 0,94U/g. Danach erreichte die gesamte Aktivität von Tag 4 bis Tag 13 ein Minimum mit Aktivitäten zwischen 0,537U/g an Tag 4 und 0,78U/g an Tag 13. Anschließend stieg

Ergebnisse

die gesamte Trehalaseaktivität langsam wieder an, auf 2,78U/g an Tag 22 und auf 2,98U/g an Tag 24. Beim Abschluss des Experiments an Tag 30 hatte die Gesamtaktivität wieder einen Wert erreicht, der der Aktivität in den Kontrollen entsprach (siehe Tabelle 12 und Abbildung 28).

Tabelle 12. Langzeitwirkung von Trehazolin auf die Aktivitäten von Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta. Die Tiere wurden zu Beginn der Experimente mit folgenden Substanzen injiziert.

Ringertiere (= Kontrollen) erhielten eine Injektion von 5µl Insektenringer sie wurden einen Tag später analysiert.

Trehazolintiere erhielten eine Injektion von 20µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer).

Die Wirkdauer betrug 1, 2 bis 10, 13, 22, 24 oder 30 Tage. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=3).

Zeit [d] nach der Injektion	Trehalaseaktivität [U/g Flugmuskulatur bei 30°C]					
	gesamte overt	lösliche overt	gebundene overt	gesamte gebundene	latente	gesamte
Kontrollen	1,292 ± 0,07	0,203 ± 0,03	1,145 ± 0,04	4,437 ± 0,27	3,293 ± 0,28	4,640 ± 0,30
1	0,459 ± 0,14	0,235 ± 0,06	0,204 ± 0,09	1,516 ± 0,07	1,312 ± 0,11	1,751 ± 0,65
2	0,145 ± 0,01	0,088 ± 0,00	0,081 ± 0,01	0,855 ± 0,08	0,774 ± 0,08	0,943 ± 0,12
3	0,150 ± 0,01	0,092 ± 0,01	0,117 ± 0,01	0,862 ± 0,22	0,745 ± 0,23	0,954 ± 0,08
4	0,222 ± 0,01	0,163 ± 0,03	0,067 ± 0,01	0,374 ± 0,04	0,307 ± 0,05	0,537 ± 0,06
5	0,457 ± 0,07	0,241 ± 0,01	0,281 ± 0,03	0,467 ± 0,06	0,186 ± 0,04	0,707 ± 0,06
6	0,332 ± 0,05	0,225 ± 0,02	0,192 ± 0,03	0,270 ± 0,06	0,078 ± 0,03	0,495 ± 0,04
7	0,485 ± 0,07	0,144 ± 0,03	0,300 ± 0,04	0,355 ± 0,04	0,055 ± 0,00	0,499 ± 0,05
8	0,430 ± 0,08	0,289 ± 0,05	0,360 ± 0,02	0,414 ± 0,04	0,053 ± 0,03	0,703 ± 0,08
9	0,475 ± 0,13	0,353 ± 0,04	0,314 ± 0,01	0,503 ± 0,15	0,189 ± 0,14	0,856 ± 0,17
10	0,355 ± 0,01	0,234 ± 0,01	0,262 ± 0,03	0,449 ± 0,09	0,187 ± 0,08	0,683 ± 0,09
13	0,232 ± 0,01	0,124 ± 0,02	0,207 ± 0,02	0,658 ± 0,11	0,451 ± 0,10	0,783 ± 0,12
22	1,921 ± 0,18	1,633 ± 0,05	1,735 ± 0,08	2,589 ± 0,23	0,856 ± 0,26	2,777 ± 0,27
24	1,413 ± 0,16	1,088 ± 0,06	1,172 ± 0,04	2,740 ± 0,27	1,567 ± 0,29	2,980 ± 0,35
30	1,127 ± 0,23	0,206 ± 0,06	0,742 ± 0,15	3,763 ± 0,49	3,067 ± 0,34	4,635 ± 0,52

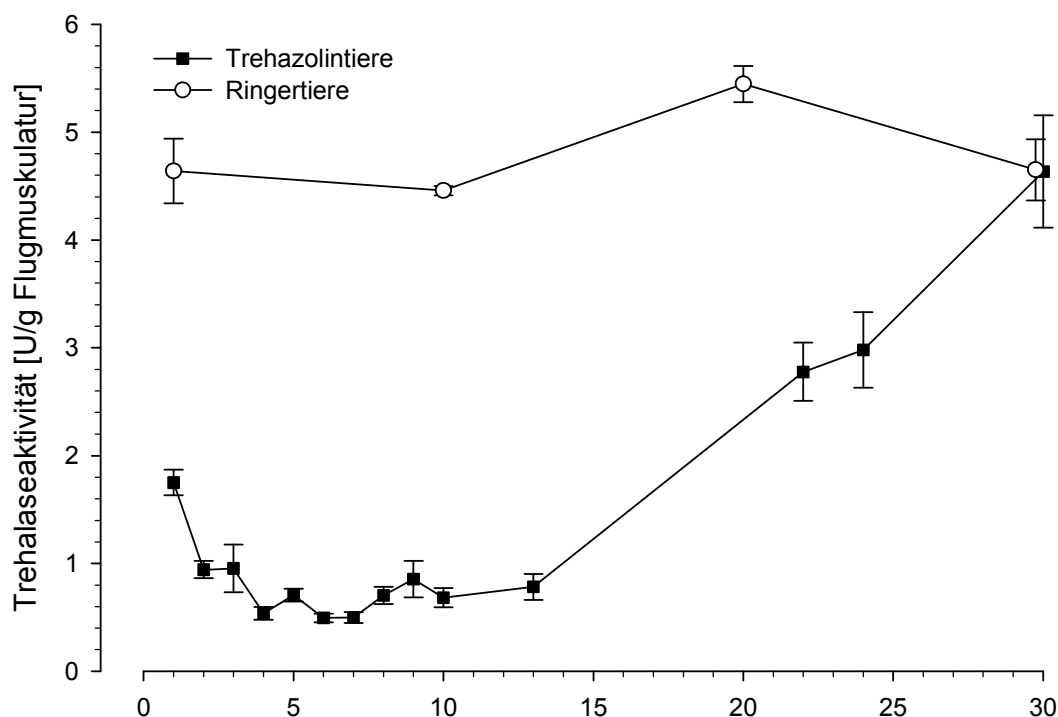


Abbildung 28. Langzeitwirkung von injiziertem Trehazolin (= Trehazolintiere) oder Insektenringer (= Ringertiere) auf die Aktivität der gesamten Trehalase in der Flugmuskulatur von *Locusta*, die am Tage 0 injiziert worden waren.

Ringertiere (offene Symbole) hatten eine Injektion von 5 μ l Insektenringer erhalten.

Trehazolintiere (geschlossene Symbole) hatten eine Injektion von 20 μ g Trehazolin (in 5 μ l Insektenringer) erhalten.

Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] $\pm$ SEM (n=3).

Der Zeitverlauf der gesamten Trehalaseaktivität ergab eine typische Kurve, in der einem steilen Abfall ein ausgedehntes Minimum und dann eine Erholung der Aktivität folgte (Abbildung 28). Dieser Befund war zu erwarten. Die Ergebnisse werden aber interessanter, wenn die *overt*e und *latente* Trehalase, die gemeinsam die Gesamtaktivität ergeben, gesondert betrachtet werden (Abbildung 29). Die Aktivität der gesamten *overt*en Trehalase fiel schnell ab und erreichte ein Minimum von 0,15U/g bereits 2 Tage nach der Injektion. Dies entspricht einer Hemmung von 88%. Die *overt*e Aktivität blieb bis Tag 4 sehr niedrig und stieg dann leicht an, so dass von Tag 5 bis Tag 9 ein Plateau erreicht wurde mit Aktivitäten zwischen 0,33U/g und 0,49U/g. Nach einer kleinen Absenkung stiegen die Aktivitätswerte in der zweiten Versuchphase auf Werte ähnlich denen der Kontrolltiere (siehe Tabelle 12).

Die Aktivität der *latenten* Trehalase (d.h. der Trehalase, die erst nach der Zerstörung der Membranintegrität durch Detergens messbar wurde) in der Flugmuskulatur der Trehazolintiere folgte einem ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die *overt* Trehalase, jedoch mit einer Verzögerung von einigen Tagen. Die *latente* Trehalaseaktivität fiel langsamer ab und hatte ein Minimum zwischen Tag 6 und 8, während die *overt* Trehalase zu dieser Zeit ein temporäres Maximum hatte. Die resultierenden Kurven zeigen eine Art Spiegelsymmetrie, die auch deutlich wird, wenn man die Aktivitäten relativ zu den jeweiligen Kontrollwerten (= 100%) aufträgt (Abbildung 30). Die gegenläufigen Veränderungen könnten eine Verbindung zwischen den beiden Trehalaseformen anzeigen. Das Ergebnis wäre vereinbar mit der Deutung, dass *latente* Trehalase als Vorläufer oder Speicherform der *overten* Trehalase dient (siehe Diskussion).

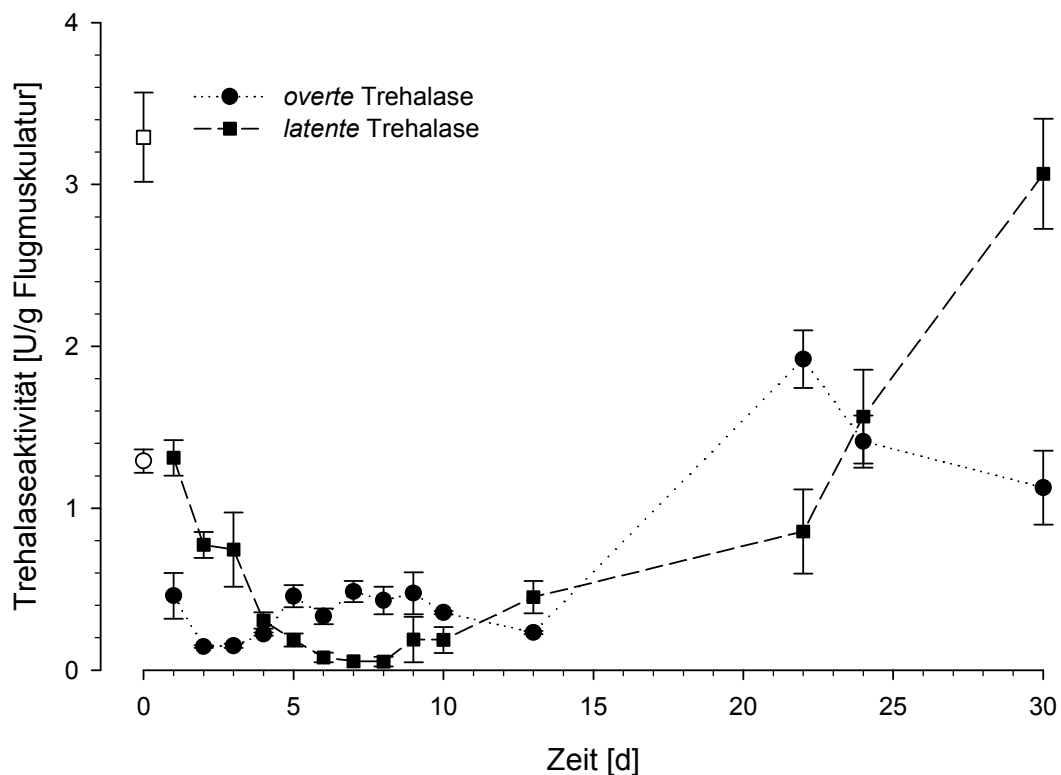


Abbildung 29. Langzeitwirkung von Trehazolin auf die Aktivitäten der gesamten *overten* und der *latenten* Trehalase in der Flugmuskulatur von *Locusta*, die am Tage 0 mit 20µg Trehazolin injiziert worden waren.

Die Werte für die Kontrollen (Ringertiere) sind mit offenen Symbolen dargestellt, die Werte der Trehazolintiere mit geschlossenen (siehe Abbildung 28). Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] $\pm$ SEM (n=3).

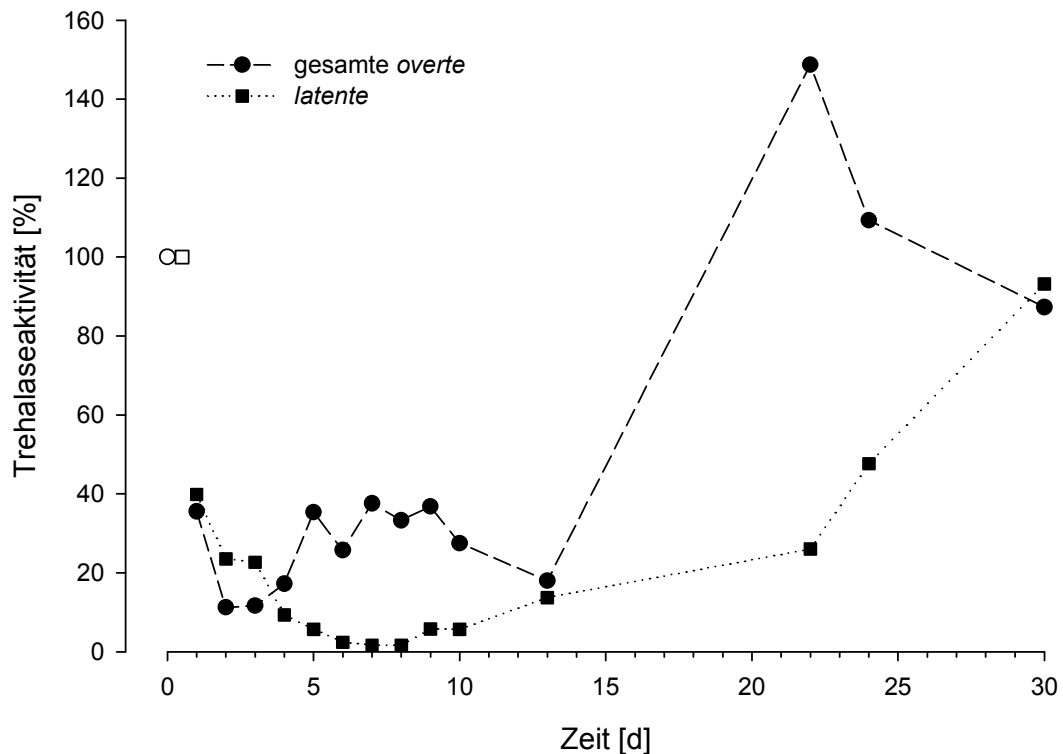


Abbildung 30. Langzeitwirkung von Trehazolin auf die Aktivitäten der gesamten *overten* und der *latenten* Trehalase in der Flugmuskulatur von *Locusta*.

Diese Abbildung beruht auf Werten aus Tabelle 12. Die *overt* und die *latente* Trehalaseaktivität der Kontrollen (Ringertiere, offene Symbole) wurden gleich 100% gesetzt und die *overten* und *latent* Aktivitäten der Trehazolintiere darauf bezogen.

3.4 Effekte von Flug auf die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Heuschrecken, denen Trehazolin injiziert worden war

Es ist seit langen bekannt, dass Wanderheuschrecken bei Flugbeginn sehr viel mehr Trehalose oxidieren als im Ruhezustand (siehe Einleitung). Dies erfordert eine zeitweise stark erhöhte Aktivität der Trehalase der Flugmuskulatur. Da beim Flug die Trehalosekonzentration in der Hämolymphe abnimmt, kann die Aktivierung der Trehalase nicht durch eine einfache Erhöhung des Hämolymphezuckers Trehalose bewerkstelligt werden. Einige Untersuchungen weisen vielmehr darauf hin, dass bei Flugbeginn die Trehalase der Flugmuskulatur aktiviert wird und dass am

Aktivierungsmechanismus bislang nicht identifizierte Änderungen der Membranstruktur beteiligt sind. Unsere Arbeitshypothese postuliert konkreter eine Translokation Trehalase-haltiger Vesikel vom Inneren der Zelle in die Außenmembran der Muskelzellen, wobei das aktive Zentrum der Trehalase mit dem Substrat Trehalose im extrazellulären Raum in Kontakt gebracht wird (in vivo *overt* Trehalase). Dasselbe gilt natürlich auch für den Trehalaseinhibitor Trehazolin, der nach unserer Hypothese nur in vivo *overt* Trehalase hemmen kann. Wenn unsere Hypothese korrekt ist, so müssten bei fliegenden Heuschrecken, denen Trehazolin injiziert worden war, mehr Trehalasemoleküle von Trehazolin inaktiviert werden als bei ruhenden Insekten. Der Verlust an Aktivität sollte bei der *latenten* Form besonders ausgeprägt sein, da die *latente* Form quantitativ dominiert und gemäß unserer Hypothese in fliegenden Heuschrecken durch Translokation vermehrt dem Inhibitor ausgesetzt ist und somit gehemmt werden kann. Um den Sachverhalt zu prüfen, wurden die folgenden Experimente gemacht. Dabei wurde in jedem Experiment die Hälfte der Tiere mit Ringerlösung, die andere Hälfte mit Trehazolinlösung injiziert. Jeweils die Hälfte der Tiere beider Untergruppen ruhte während der gesamten Zeit nach der Injektion, die andere Hälfte flog jeweils zweimal 5 Minuten lang. Variiert wurden die Wirkdauer und die Dosis des Trehazolins, so dass die folgenden drei Kombinationen resultierten: 10µg Trehazolin und 30 Minuten bzw. 16 Stunden Wirkdauer, sowie 20µg Trehazolin und 50 Minuten Wirkdauer (siehe Tabelle 13 bis Tabelle 15 und Abbildung 31 bis Abbildung 36). Nach der letzten Flugphase wurden die Tiere getötet, die rechten Halbthoraces gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert und fraktioniert. Die Trehalaseaktivitäten wurden mit dem zweistufigen Trehalasetest bestimmt. Die *latente* und die gesamte Aktivität wurden berechnet wie unter 2.4.2 beschrieben.

Tabelle 13. Wirkung von Trehazolin (10µg, 30 Minuten Wirkdauer) sowie Flug und Ruhe auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta.

Ringertiere (= Kontrollen) erhielten eine Injektion von 5µl Insektenringer.

Trehazolintiere erhielten eine Injektion von 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer).

Die Flugtiere flogen von Minute 10 bis Minute 15 und von Minute 25 bis Minute 30. Die Ruhetiere ruhten 30 Minuten in Plastikschrälen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=8). Statistische Analyse: siehe Tabelle 33 im Anhang.

Trehalase- fraktionen	Ringer		10µg Trehazolin	
	Ruhe	Flug	Ruhe	Flug
gesamte overte	1,982 ± 0,15	2,798 ± 0,27	1,411 ± 0,18	0,340 ± 0,06
lösliche overte	0,543 ± 0,05	1,145 ± 0,13	0,509 ± 0,07	0,305 ± 0,03
gebundene overte	1,438 ± 0,14	1,653 ± 0,17	0,462 ± 0,18	0,148 ± 0,06
gesamte gebundene	4,158 ± 0,37	4,234 ± 0,25	3,511 ± 0,64	1,802 ± 0,28
latente	2,719 ± 0,39	2,581 ± 0,31	3,048 ± 0,51	1,654 ± 0,30
Gesamtaktivität	4,701 ± 0,39	5,379 ± 0,25	4,020 ± 0,70	2,108 ± 0,30

Bei den Ringertieren, die innerhalb von 30 Minuten nach der Injektion des Ringers zweimal 5 Minuten flogen, war die gesamte *overte* und die lösliche *overte* Trehalase gegenüber den Ruhetieren erhöht (siehe Tabelle 14 und Abbildung 31).

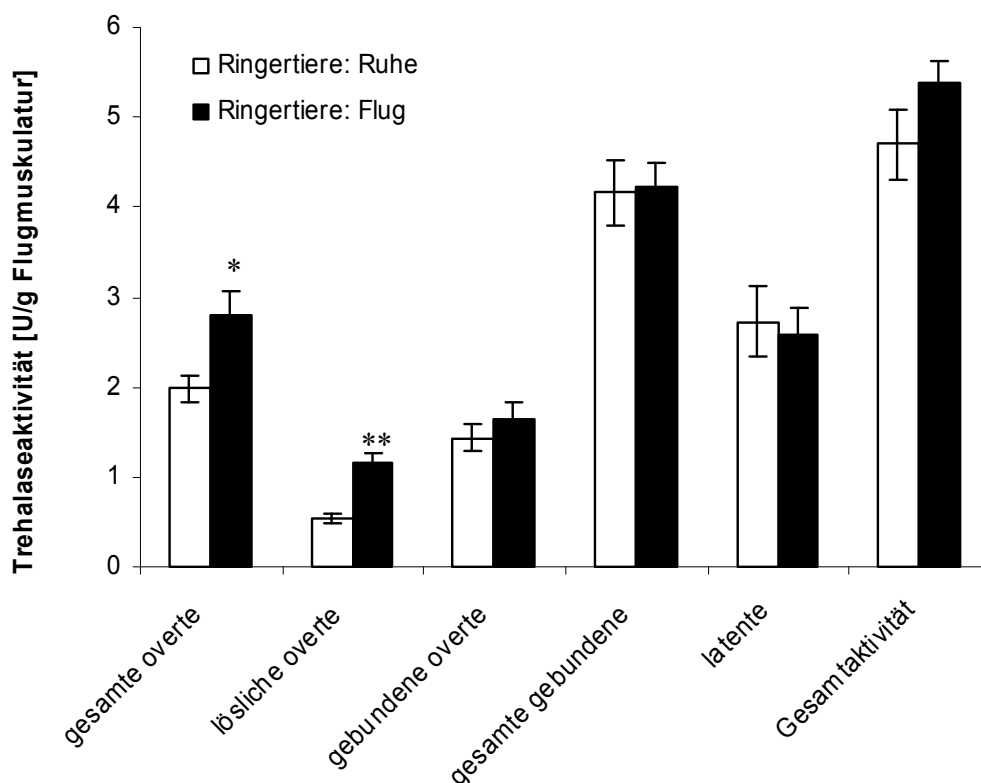


Abbildung 31. Wirkung von Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* bei mit Ringer injizierten Kontrolltieren.

Die Ringertiere wurden mit 5µl Insektenringer injiziert. Das Experiment dauerte 30 Minuten. Die Fluginsekten flogen von Minute 10 bis Minute 15 und von Minute 25 bis Minute 30, die Ruhetiere ruhten 30 Minuten in Plastikschräbchen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=8).

Injektion von 10µg Trehazolin hatte in Ruhetieren während 30 Minuten Wirkdauer relativ geringe Effekte auf die Aktivitäten der Trehalase in den Gewebefraktionen wie der Vergleich mit den Ruhetieren, die mit Ringer injiziert worden waren, zeigt (siehe Tabelle 14). Die Situation ist deutlich anders beim Vergleich der Trehazolin-Ruhetiere mit den Trehazolin-Fluginsekten. Bei den Fluginsekten ist die Trehalaseaktivität in allen Fraktionen (mit Ausnahme der gebundenen *overten*, die eine hohe Streuung zeigt) signifikant oder hochsignifikant erniedrigt (siehe Abbildung 32 und Tabelle 33).

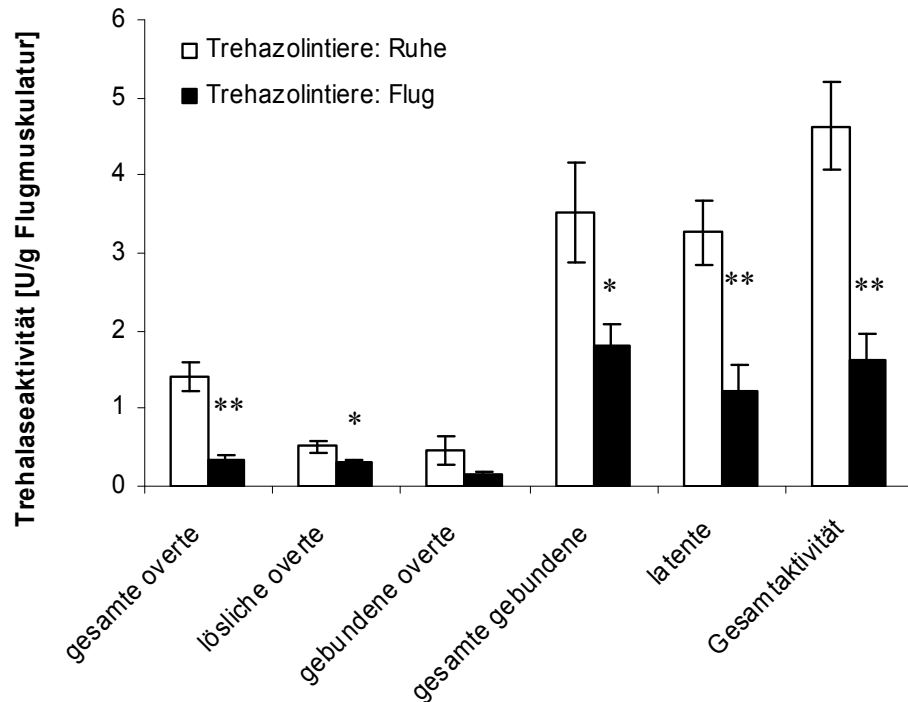


Abbildung 32. Wirkung von Trehazolin (10µg, 30 Minuten Wirkdauer) und Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta*.

Die Trehazolintiere wurden mit 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) injiziert. Die Fluginsekten flogen von 10min bis 15min und von 25min bis 30min, die Ruhetiere ruhten 30 Minuten in Plastikschälchen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=8).

Dieses Experiment ist nicht klar zu deuten. Die Ergebnisse könnten darauf beruhen, dass durch den Flug mehr *overte* Trehalase entsteht, die folglich (nach unserer Arbeitshypothese) von Trehazolin gehemmt werden kann. Dafür würde auch der Befund sprechen, dass der Flug in dieser Versuchsserie bei den Ringertieren zu einer erhöhten *overten* Trehalaseaktivität führte. Gleichwohl ist nicht auszuschließen, dass durch die kräftigen Muskelbewegungen beim Flug die Hämolymphe und damit das Trehazolin besser im Muskel verteilt wurde und so die Hemmung verstärkte. Es wurden daher zwei weitere Experimente durchgeführt, in denen (1) die Wirkdauer des Trehazolins bei gleicher Dosis erheblich, und zwar auf 16 Stunden, verlängert wurde und (2) die Dosis des Trehazolins auf 20µg verdoppelt und die Wirkzeit geringfügig auf 50 Minuten verlängert wurde.

Nach 16 Stunden Wirkdauer zeigte das Trehazolin bei Ruhetieren deutliche Effekte auf die Trehalaseaktivitäten; sie waren in allen Fraktionen gegenüber den Ringerkontrollen signifikant erniedrigt (siehe Tabelle 14, sowie Abbildung 33 und Abbildung 34). Aber auch zwischen den mit Trehazolin injizierten Ruhe- und Flugtieren gab es signifikante Unterschiede. Bei den Flugtieren waren die gesamt gebundene, die *latente* und die gesamte Aktivität signifikant vermindert (siehe Tabelle 14 und Abbildung 34). Man kann voraussetzen, dass sich innerhalb von 15 Stunden Wirkzeit der Inhibitor gleichmäßig im Körper verteilt hatte, so dass dieses Ergebnis auf eine spezifische Wirkung der Flugaktivität hindeutet, die mit einer durch Flug induzierten transienten Vermehrung der *overten* Trehalase (z.B. durch Translokation) vereinbar ist.

Tabelle 14. Wirkung von Trehazolin (10µg, 16 Stunden Wirkdauer) und Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta.

Ringertiere (= Kontrolle) erhielten eine Injektion von 5µl Insektenringer.

Trehazolintiere erhielten eine Injektion von 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer).

Die Fluchtiere flogen von 15 Stunden Minute 30 bis Minute 35 sowie von 15 Stunden Minute 55 bis Minute 60. Die Ruhetiere ruhten 16 Stunden in Plastischälchen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=6). Statistische Analyse siehe Tabelle 34 im Anhang.

Trehalase- fraktionen	Ringer		10µg Trehazolin	
	Ruhe	Flug	Ruhe	Flug
gesamte overte	1,100 ± 0,20	1,030 ± 0,12	0,218 ± 0,04	0,189 ± 0,03
lösliche overte	0,210 ± 0,03	0,240 ± 0,02	0,061 ± 0,02	0,063 ± 0,03
gebundene overte	0,746 ± 0,08	0,850 ± 0,10	0,250 ± 0,06	0,159 ± 0,02
gesamte gebundene	5,465 ± 0,28	4,540 ± 0,64	1,735 ± 0,15	0,996 ± 0,12
latente	4,719 ± 0,24	3,690 ± 0,76	1,485 ± 0,17	0,837 ± 0,14
Gesamtaktivität	5,675 ± 0,26	4,780 ± 0,63	1,796 ± 0,15	1,059 ± 0,13

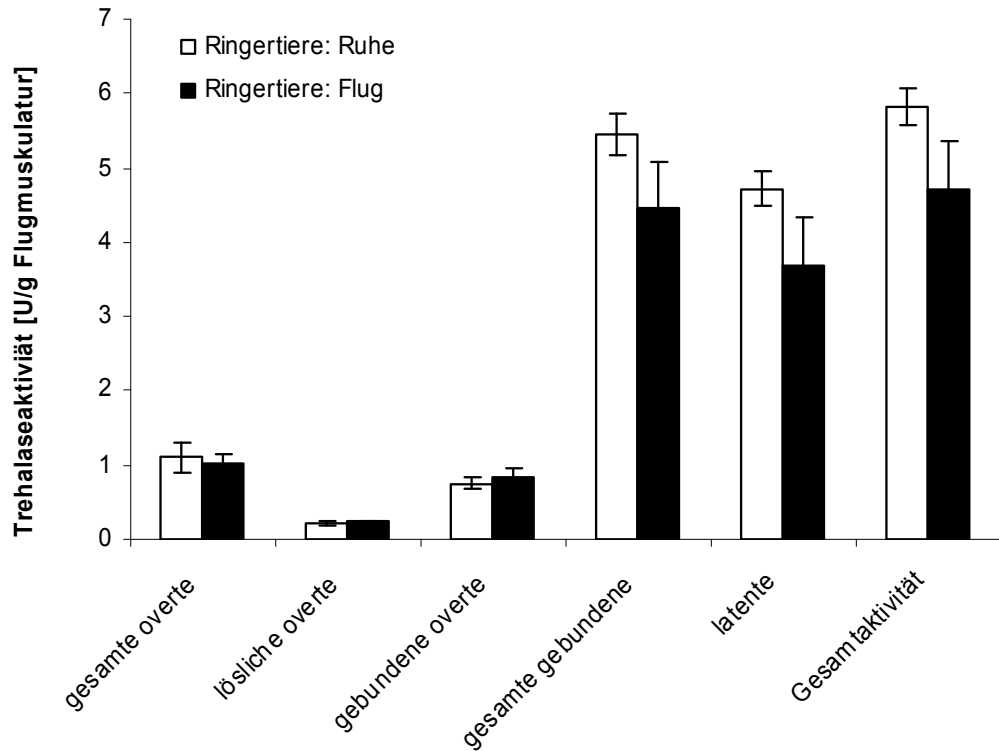


Abbildung 33. Wirkung von Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* bei mit Ringer injizierten Kontrolltieren.

Die Tiere wurden mit 5 μ l Insektenringer injiziert (= Ringertiere). Das Experiment dauerte 16 Stunden. Die Fluginsekten flogen von 15 Stunden Minute 30 bis Minute 35 und 15 Stunden Minute 55 bis Minute 60, die Ruhetiere ruhten 16 Stunden in Plastikschälchen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] $\pm$ SEM (n=6).

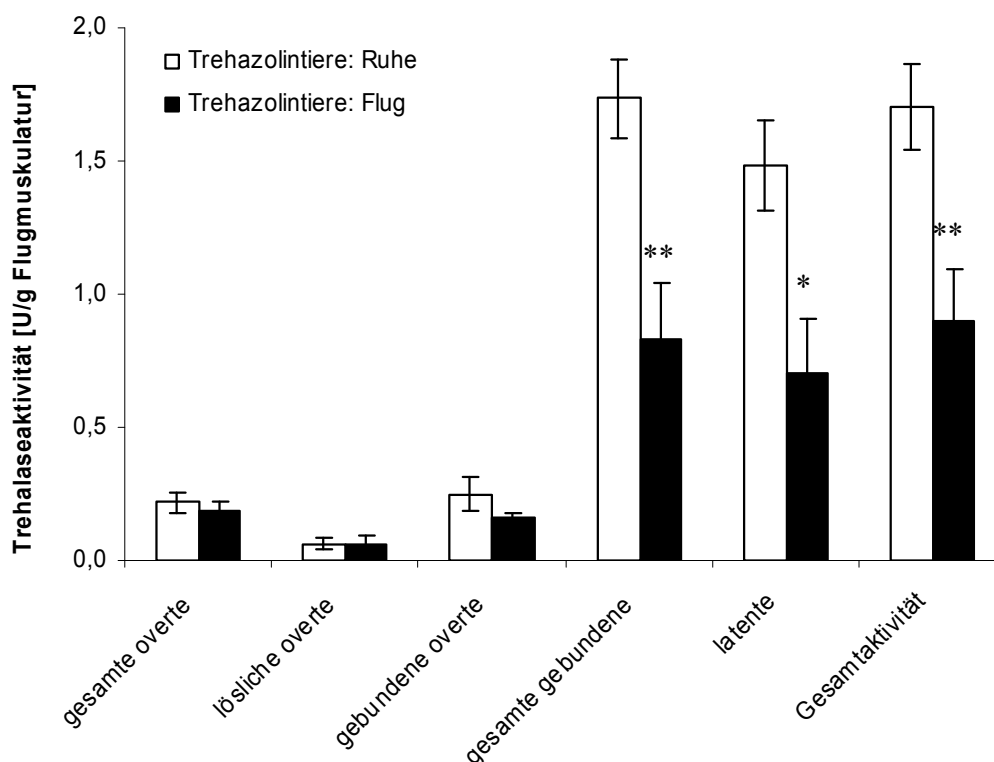


Abbildung 34. Wirkung von Trehazolin (10 μ g, 16 Stunden Wirkdauer) und Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta*.

Die Fluginsekten flogen von 15 Stunden Minute 30 bis Minute 35 und 15 Stunden Minute 55 bis Minute 60, die Ruhetiere ruhten 16 Stunden in Plastikschrälen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] $\pm$ SEM (n=6).

Das 50-Minuten Experiment zeigte bei den Ringertieren (wie beim 30-Minuten Experiment) das Phänomen der signifikant bzw. hochsignifikant erhöhten Aktivitäten an *gesamt overter* und *löslicher overter* Trehalase bei den Fluginsekten. Beim 16-Stunden Versuch fehlte dieser Effekt.

Die Wirkung von 20 μ g Trehazolin ist nach 50 Minuten bei den Ruhetieren deutlich zu sehen (siehe Tabelle 15), aber ebenso die hochsignifikante Verminderung der *gesamt gebundenen* sowie der *latenten* und *gesamten* Trehalaseaktivität bei den Fluginsekten im Vergleich zu den Trehazolin-Ruhetieren (Abbildung 36). Die Aktivität der Flugmuskulatur verstärkt also auch unter diesen Bedingungen die Inhibitorwirkung des Trehazolins, die ja nach unserer Hypothese die zumindest zeitweise Anwesenheit des Enzyms in der Außenmembran der Muskelzellen voraussetzt.

Tabelle 15. Wirkung von Trehazolin (20µg, 50 Minuten Wirkdauer) und Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta.

Ringertiere (= Kontrollen) erhielten eine Injektion von 5µl Insektenringer.

Trehazolintiere erhielten eine Injektion von 20µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer).

Die Flugtiere flogen von Minute 20 bis Minute 25 und von Minute 45 bis Minute 50. Die Ruhetiere ruhten 50 Minuten in Plastischälchen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 35 Anhang.

Trehalase- fraktionen	Ringer		20µg Trehazolin	
	Ruhe	Flug	Ruhe	Flug
<i>gesamte overte</i>	1,982 ± 0,15	2,798 ± 0,27	0,360 ± 0,02	0,447 ± 0,02
<i>lösliche overte</i>	0,543 ± 0,05	1,145 ± 0,13	0,177 ± 0,01	0,208 ± 0,02
<i>gebundene overte</i>	1,438 ± 0,14	1,653 ± 0,17	0,183 ± 0,03	0,239 ± 0,03
<i>gesamte gebundene</i>	4,158 ± 0,37	4,234 ± 0,25	2,268 ± 0,024	1,353 ± 0,10
<i>latente</i>	2,719 ± 0,39	2,581 ± 0,31	2,085 ± 0,25	1,114 ± 0,10
Gesamtaktivität	4,701 ± 0,39	5,379 ± 0,25	2,445 ± 0,24	1,561 ± 0,09

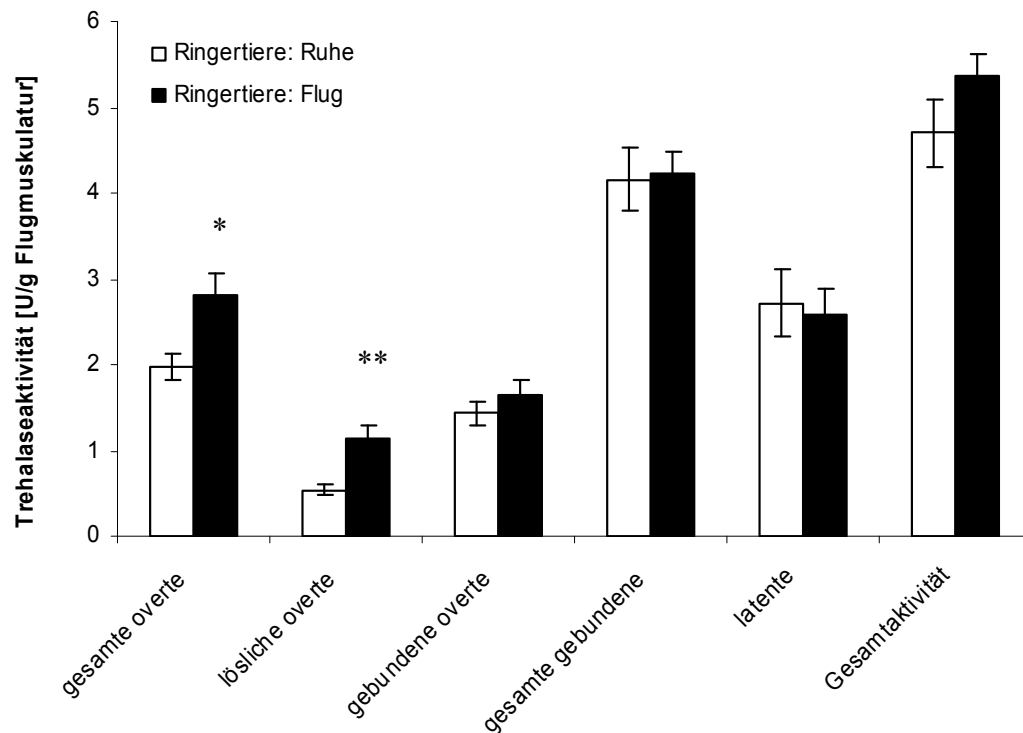


Abbildung 35. Wirkung von Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* bei mit Ringer injizierten Kontrolltieren.

Die Ringertiere wurden mit 5 µl Insektenringer injiziert. Das Experiment dauerte 50 Minuten. Die Fluginsekten flogen von Minute 20 bis Minute 25 und von Minute 45 bis Minute 50 min, die Ruhetiere ruhten 50 Minuten in Plastischälchen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=5).

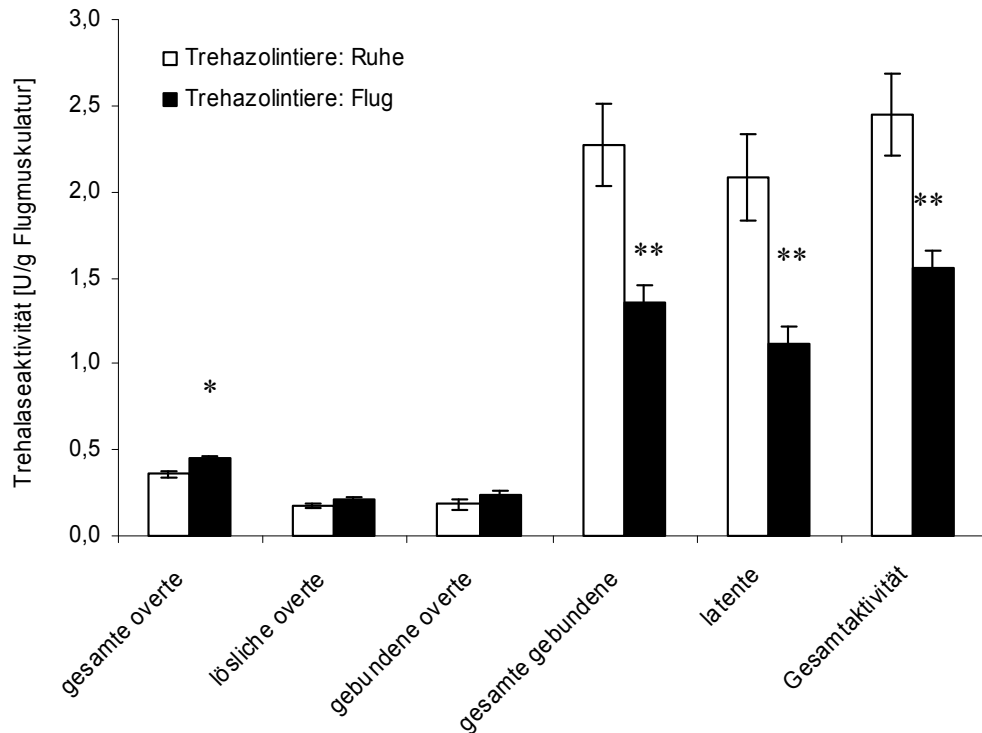


Abbildung 36. Wirkung von Trehazolin (20µg, Wirkdauer 50 Minuten) und Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta*.

Die Fluginsekten flogen von Minute 20 bis Minute 25 und von Minute 45 bis Minute 50, die Ruhetiere ruhten 50 Minuten in Plastikschrälen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=5).

3.5 Effekte von Insulin auf die Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass Trehazolin insbesondere die Aktivität der *latenten* Form der Trehalase in der Flugmuskulatur stark vermindert, wenn die Tiere zum Flug angeregt werden. Die Ergebnisse waren mit der Hypothese vereinbar, dass Flug eine Translokation von *latenter* Trehalase, die sich in der Zelle befindet, an die Außenmembran der Zelle bewirkt, wo das Enzym vom Inhibitor erreicht werden kann. Da Trehalase an Membranen gebunden ist, könnte die Translokation als Transport von Vesikeln, an deren Membran Trehalase gebunden ist, verstanden werden. Aus diesem Grunde haben wir Versuche mit Insulin durchgeführt, um zu prüfen, ob und wie Insulin die Verteilung der Trehalaseaktivitäten in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* beeinflusst. Insulin löst in Muskulatur und

Fettgewebe von Säugern eine Translokation von Vesikeln aus, deren Membran den Glucosetransporter-4 (GLUT-4) enthält. Die Vesikel werden dabei vom Cytoplasma in die Außenmembran der Zellen transportiert.

Wortmannin hemmt diese Vesikeltranslokation. Es sollte daher auch geprüft werden, ob und gegebenenfalls welche Effekte Wortmannin sowie Insulin plus Wortmannin auf die Verteilung der Trehalaseaktivität in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* haben. Diese Experimente sollen sowohl an ruhenden Heuschrecken als auch an Heuschrecken durchgeführt werden, die kurze Flüge durchführen (siehe 3.6).

3.5.1 Wirkung verschiedener Insulindosen auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von *Locusta*

Je 6 *Locusta*, denen 3 Stunden zuvor der Kopf abgeschnürt und entfernt worden war, wurden mit 5µg, 500ng, 50ng, 25ng oder 5ng Insulin (in 5µl Insektenringer) plus jeweils 20µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) injiziert (= Trehazolin-Insulintiere). Die Substanzen wurden in einer Injektion von 10µl verabreicht. Kontrollen (ebenfalls ohne Kopf) wurden nur mit 5µg Insulin (in 10µl Insektenringer = Insulintiere) oder mit 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer = Trehazolintiere) injiziert. Die Trehalaseaktivitäten wurden in der Flugmuskulatur der gewaschenen Halbthoraces der rechten Seite mit dem zweistufigen Trehalasetest (siehe 2.4.2) gemessen.

Die Trehalaseaktivitäten der nur mit 5µg Insulin (ohne Trehazolin) injizierten Tiere waren nach 30 Minuten nicht signifikant von Kontrollwerten (Injektion mit Insektenringer) aus anderen Versuchsserien verschieden (Tabelle 16 und Abbildung 37).

Wurde nur 20µg Trehazolin, aber kein Insulin injiziert, so waren die *overten* Formen der Trehalase in ihrer Aktivität nach 30 Minuten Wirkdauer deutlich vermindert. Es ist allerdings auffällig, dass für die gebundene *overt* Aktivität eine höhere Aktivität gemessen wurde (0,45U/g) als in den übrigen Proben von mit Trehazolin injizierten Tieren. Der Wert weicht zudem deutlich von der Differenz der Aktivitäten der Fraktion 1 und 2 ($0,156 - 0,015 = 0,141$) ab, der er bei optimaler Versuchsdurchführung entsprechen sollte. Es scheint, dass bei dieser Gruppe von

Muskelproben beim Resuspendieren der sedimentierten gebundenen Trehalase Membranstrukturen zerstört wurden, so dass der Anteil der gebundenen *overten* Trehalase artifiziell zu hoch sein könnte und damit der Anteil der *latenten* Trehalase mit 2,678U/g entsprechend zu niedrig. Würde man, wie eben berechnet, die gebundene Trehalase als 0,141 ansetzen, so ergäbe sich für die *latente* Trehalase nach 30 Minuten Trehazolinwirkung eine Aktivität von 2,987U/g (anstelle von 2,678U/g wie in der Tabelle aufgeführt). Die Ergebnisse würden jedoch durch diese Korrektur nicht wesentlich verändert, da ein ähnliches Problem auch bei der Versuchsserie 5µg Insulin plus 20µg Trehazolin besteht (hier würde sich für die gebundene *overt* Trehalase 0,017 statt 0,154 ergeben und für die *latente* 0,764 statt 0,627, siehe Tabelle 16). Die Unterschiede sind so gering, dass sie die Ergebnisse letztlich nicht beeinflussen.

Die gleichzeitige Injektion von 20µg Trehazolin plus 5µg Insulin führte im Vergleich zu den nur mit Trehazolin injizierten Tieren zu einer starken Inhibition der gesamten gebundenen Trehalase, und diese beruhte auf dem Verlust an *latenter* Trehalaseaktivität (siehe Tabelle 16 und Abbildung 37). Die Injektion von 5µg Insulin hatte also bei Anwesenheit von Trehazolin auf die Aktivität der *latenten* Trehalase einen starken Effekt, und die Verminderung der Insulindosis führte zu einer abgeschwächten Wirkung. Dieses Experiment zeigt also, dass Trehazolin ein gutes Mittel ist, um Effekte von Insulin auf die Verteilung der Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur sichtbar zu machen.

Die geringste *latente* Aktivität wurde nach der Injektion von Trehazolin plus 5µg Insulin gemessen. Mit sinkender Insulindosis stieg die Aktivität der *latenten* Trehalase wieder an, der Effekt von Insulin war aber bis herunter zu einer Dosis von 50ng Insulin pro Tier statistisch signifikant (Abbildung 38). Bei 5µg Insulin waren nur noch 17% der Ausgangsaktivität (Effekt hochsignifikant **), bei 500ng 38,9% (**) und bei 50ng noch 48,4% der Ausgangsaktivität (signifikant *) zu messen (Abbildung 38).

Tabelle 16. Effekte verschiedener Insulindosen auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta (ohne Kopf).

Den Tieren wurde der Kopf abgeschnürt und entfernt. Drei Stunden später wurden sie mit folgenden Substanzen injiziert.

1. Insulintiere: Injektion von 5µg Insulin (in 10µl Insektenringer)
2. Trehazolintiere: Injektion von 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)
3. Trehazolin-Insulintiere: Injektion von 5µg, 500ng, 50ng, 25ng oder 5ng Insulin (in 5µl Insektenringer) + 20µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer). Die Substanzen wurden in einer Injektion verabreicht.

Die Wirkdauer der Substanzen betrug 30 Minuten. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 36 im Anhang.

Trehalaseform	5µg Insulin kein Trehazolin	kein Insulin 20µg Trehazolin	5µg Insulin plus 20µg Trehazolin	500ng Insulin plus 20µg Trehazolin
gesamte overte	1,306 ± 0,21	0,156 ± 0,04	0,113 ± 0,03	0,235 ± 0,04
lösliche overte	0,129 ± 0,04	0,015 ± 0,01	0,096 ± 0,05	0,024 ± 0,01
gebundene overte	0,824 ± 0,05	0,450 ± 0,04	0,154 ± 0,03	0,225 ± 0,05
gesamte gebundene	4,504 ± 0,20	3,128 ± 0,30	0,781 ± 0,12	1,657 ± 0,20
latente	3,679 ± 0,17	2,678 ± 0,27	0,627 ± 0,11	1,432 ± 0,19
Gesamtaktivität	4,633 ± 0,21	3,143 ± 0,30	0,876 ± 0,14	1,681 ± 0,20

	50ng Insulin plus 20µg Trehazolin	25ng Insulin plus 20µg Trehazolin	5ng Insulin plus 20µg Trehazolin
gesamte overte	0,136 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,144 ± 0,01
lösliche overte	0,004 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,033 ± 0,02
gebundene overte	0,198 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,189 ± 0,02
gesamte gebundene	1,977 ± 0,19	2,68 ± 0,19	3,484 ± 0,21
latente	1,779 ± 0,17	2,67 ± 0,20	3,295 ± 0,20
Gesamtaktivität	1,982 ± 0,19	2,69 ± 0,20	3,517 ± 0,21

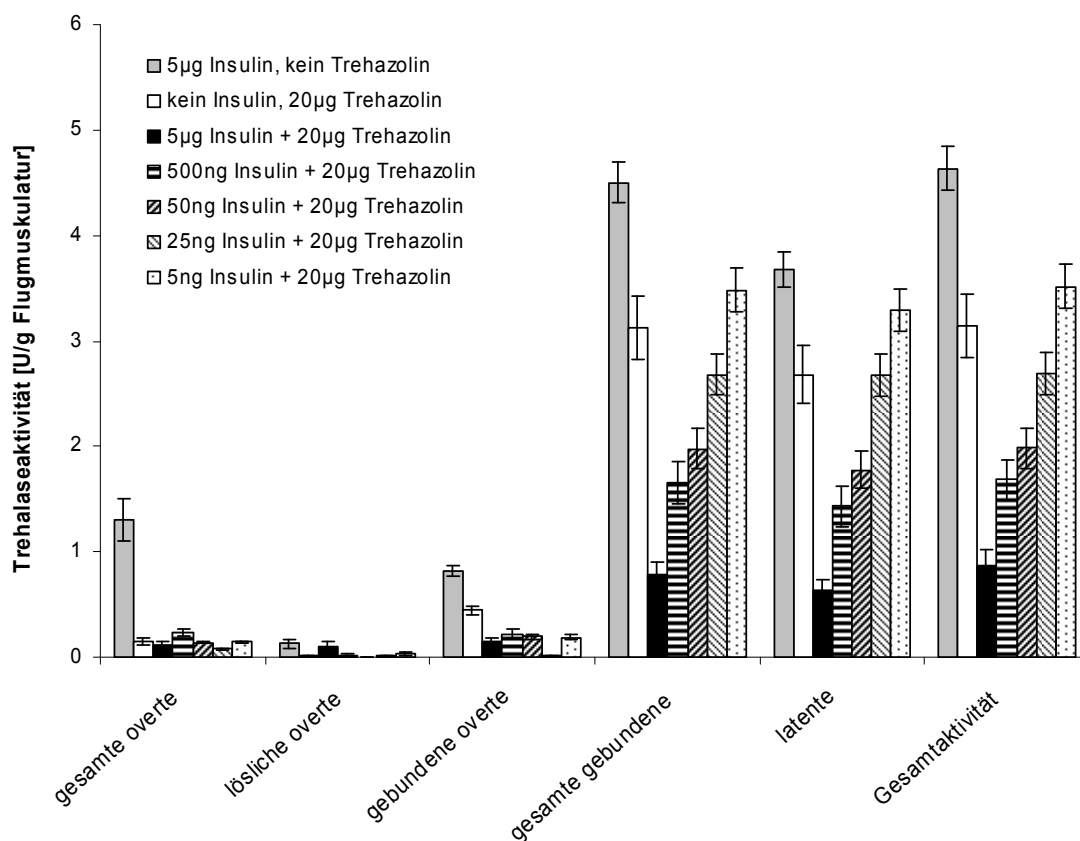


Abbildung 37. Wirkung von Insulin, Trehazolin sowie Insulin plus Trehazolin (Wirkdauer jeweils 30 Minuten) auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta (ohne Kopf).

Den Tieren wurde der Kopf abgeschnürt und entfernt. Drei Stunden später wurden sie mit folgenden Substanzen injiziert.

Säule 1: 5µg Insulin (in 10µl Insektenringer), ohne Trehazolin

Säule 2: ohne Insulin ,20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Säule 3: 5µg Insulin plus 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Säule 4: 500ng Insulin plus 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Säule 5: 50ng Insulin plus 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Säule 6: 25ng Insulin plus 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Säule 7: 5ng Insulin plus 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Gezeigt sind die Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=5).

Statistische Analyse siehe Abbildung 38 und Abbildung 39, sowie Tabelle 36 im Anhang.

Allgemein ist festzuhalten, dass nach der Injektion von Insulin plus Trehazolin die Aktivitäten der *overten* Trehalase gering waren. Dies ist auf die hemmende Wirkung des Trehazolins auf die *overt* Trehalase zurückzuführen, die dem Inhibitor nach unserer Hypothese direkt zugänglich sein sollte. Es ist daher nicht überraschend, dass Effekte unterschiedlicher Dosen von Insulin bei den *overten* Trehalaseformen nicht klar zu erkennen waren, selbst wenn Insulin die Überführung von Trehalase in die *overt* Form stimulierte. Denn die neu in der Plasmamembran erscheinende *overt* Trehalase würde schnell durch die Wirkung des Trehazolins gehemmt und wäre damit nicht mehr nachweisbar. Bei der *latenten* Trehalase ist die Situation jedoch deutlich anders. Die *latenten* Aktivitäten von Tieren, die mit Insulin plus Trehazolin injiziert worden waren, waren deutlich kleiner als bei Tieren, die nur mit Insulin oder nur mit Trehazolin injiziert worden waren. Dass die Injektion von 5µg Insulin allein keinen Effekt auf die Verteilung der Trehalaseaktivität auf die verschiedenen Formen hatte, ist zunächst überraschend, kann aber dadurch erklärt werden, dass Insulin in Insekten eine Wirkdauer unter 30 Minuten hat (siehe Diskussion). Insgesamt wäre das Experiment also wie folgt deutbar: Insulin stimuliert eine rasche Umwandlung von *latenter* in *overt* Trehalase. Dies geschieht durch Stimulation der Translokation trehalasehaltiger Vesikel (*latente* Trehalase) und deren Verschmelzung mit der Außenmembran, so dass *overt* Trehalase vermehrt entsteht. Die *overt* Trehalase wird jedoch durch Trehazolin gehemmt und somit nicht mehr nachweisbar. Insgesamt führt der Prozess zu einer Verminderung der *latenten* Trehalaseaktivität.

Der besseren Übersichtlichkeit wegen wird in Abbildung 37A ein Ausschnitt aus Abbildung 37 gezeigt, in dem die gesamten gebundenen, die *latenten* und gesamten Trehalaseaktivitäten der Flugmuskulatur in Abhängigkeit von der Insulindosis dargestellt sind.

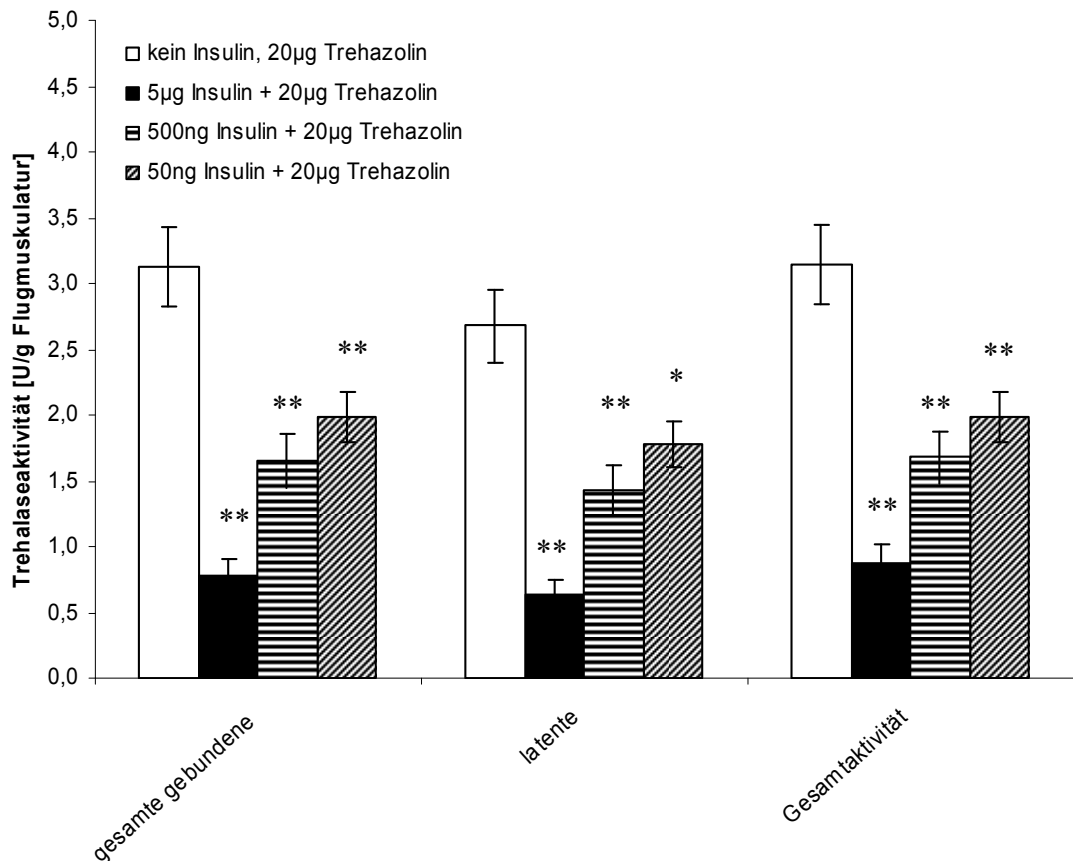


Abbildung 37A. Wirkung von Trehazolin sowie Insulin plus Trehazolin (Wirkdauer jeweils 30 Minuten) auf die Aktivitäten von Trehalaseformen in der Flugmuskulatur von *Locusta* (ohne Kopf).

Säule 1: kein Insulin, 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Säule 2: 5µg Insulin plus 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Säule 3: 500ng Insulin plus 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Säule 4: 50ng Insulin plus 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer)

Für Details siehe Abbildung 37 und Tabelle 16. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich mit den Werten nach Injektion von 20µg Trehazolin (ohne Insulin).

In Tabelle 17 ist die *latente* Trehalaseaktivität in Abhängigkeit von der Injektion von Insulin (ohne Trehazolin), Trehazolin (ohne Insulin) und Insulin (von 5µg bis 5ng) plus Trehazolin dargestellt. Dabei wurde in der ersten Spalte die Aktivität der *latenten* Trehalase der Insulintiere (ohne Trehazolininjektion) gleich 100% gesetzt und die mittleren Aktivitäten der *latenten* Trehalase der übrigen Versuchsgruppen prozentual darauf bezogen. In der zweiten Spalte dieser Tabelle wurde die *latente* Trehalaseaktivität der Tiere, die nur 20µg Trehazolin erhalten hatten, als Bezugsgröße (=100%) gewählt.

Tabelle 17. Wirkung von Insulin, Trehazolin sowie Insulin+Trehazolin auf die Aktivitäten der *latenten* Trehalase der Flugmuskulatur von kopflosen Locusta (in % bezogen auf die Werte nach Injektion von 5µg Insulin bzw. 20µg Trehazolin).

Details zur Versuchsdurchführung siehe Tabelle 16. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [%]. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich mit den Werten nach Injektion von 20µg Trehazolin (ohne Insulin).

injizierte Substanz	<i>latente</i> Trehalaseaktivität [%] bezogen auf	
	5µg Insulin	20µg Trehazolin
5µg Insulin, ohne Trehazolin	100,0*	137,4*
20µg Trehazolin, ohne Insulin	72,8	100
5µg Insulin + 20µg Trehazolin	17,0**	23,4**
500ng Insulin + 20µg Trehazolin	38,9**	53,5**
50ng Insulin + 20µg Trehazolin	48,4*	66,4*
25ng Insulin + 20µg Trehazolin	72,6	99,8
5ng Insulin + 20µg Trehazolin	89,6	99,8

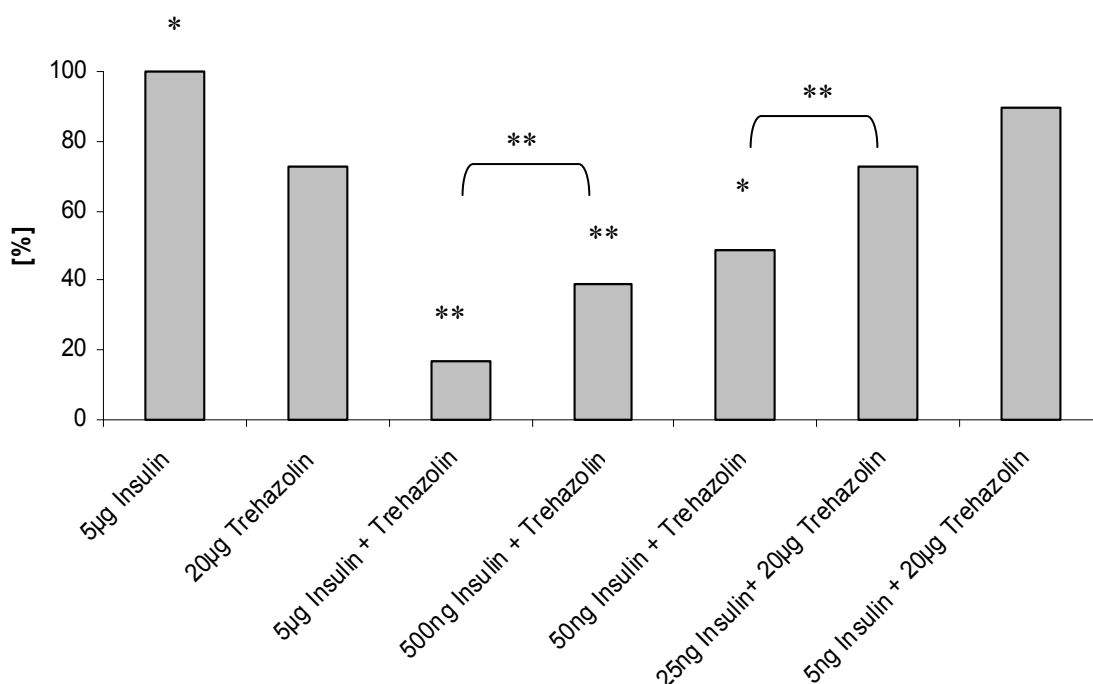


Abbildung 38. Wirkung von Insulin, Trehazolin sowie Insulin+Trehazolin auf die Aktivitäten der *latent* Trehalase der Flugmuskulatur von *Locusta* (ohne Kopf).

Details zur Versuchsdurchführung siehe Tabelle 16. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivität [%]. Die Signifikanzangaben $*=p<0,05$; $**=p<0,01$ beziehen sich auf die Kontrollen, die mit 20µg Trehazolin injiziert worden waren (siehe Tabelle 17).

3.5.2 Insulin in intakten Heuschrecken und solchen ohne Kopf

Nun ist auch interessant zu prüfen, welchen Effekt die Entfernung des Kopfes auf die Insulinwirkung hat und wie schnell diese einsetzt. Zu diesem Zweck wurden 5 intakte Tiere mit 20µg Trehazolin plus 5µg Insulin injiziert, und die Trehalaseaktivitäten ihrer Flugmuskulatur wurden nach 30 Minuten gemessen. Zwanzig Tieren wurden die Köpfe entfernt, und sie wurden 3 Stunden später wie die intakten Tiere mit 20µg Trehazolin plus 5µg Insulin injiziert. Diese Tiere wurden in Gruppen zu je 5 Tieren nach 5, 10, 20 oder 30 Minuten getötet und ebenfalls analysiert (Tabelle 18 und Abbildung 39).

Heuschrecken mit und ohne Kopf, in denen Insulin plus Trehazolin 30 Minuten wirkten, unterschieden sich hochsignifikant in ihren Trehalaseaktivitäten. Die gesamt gebundenen, latenten und gesamten Aktivitäten der Trehalase in den intakten Tieren waren deutlich höher als in den Tieren, die keine Köpfe mehr besaßen. Tiere ohne Kopf, die schon 20 Minuten nach der Injektion getötet wurden, hatten ebenfalls geringere Trehalaseaktivitäten. Interessanterweise waren nach 5 Minuten Einwirkzeit

die Werte für die Tiere ohne Kopf sehr ähnlich denen von intakten Heuschrecken nach 30 Minuten (Tabelle 18 und Abbildung 39). Diese Befunde sind nicht einfach zu deuten. Zur stärkeren Wirkung des Insulins in Tieren ohne Kopf könnten folgende Faktoren beitragen. (1) Die Konzentration an Insulin und Trehazolin ist in Tieren ohne Kopf höher, da das Verteilungsvolumen des Kopfes wegfällt. (2) In den Tieren ohne Kopf ist der Fluss der Hämolymphe behindert, so dass die Inaktivierung bzw. Ausscheidung von Wirksubstanzen (z.B. Trehazolin und/oder Insulin) verzögert ist, was wiederum zu stärkerer Wirkung beitragen könnte. (3) Das Gehirn könnte auf die Inhibitoren von Insulin mit der Freisetzung von Hormonen reagieren, die als Gegenspieler des Insulins wirken könnten. Wenn vom Gehirn Insulinantagonisten sezerniert werden so würden diese nach unseren Ergebnissen recht schnell wirken (d.h. innerhalb von einigen Minuten).

Tabelle 18. Effekte verschiedener Wirkzeiten von 5µg Insulin plus 20µg Trehazolin auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von intakten Heuschrecken und solchen, denen der Kopf entfernt worden war.

Alle Tiere erhielten in einer Injektion 5µg Insulin (in 5µl Ringer) + 20µg Trehazolin (in 5µl Ringer). Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 38 im Anhang.

Trehalasefraktion	Trehalaseaktivität [U/g bei 30°C] und Wirkdauer				
	mit Kopf	ohne Kopf			
	30 Minuten	5 Minuten	10 Minuten	20 Minuten	30 Minuten
gesamte overte	0,225 ± 0,02	0,123 ± 0,03*	0,104 ± 0,02**	0,144 ± 0,04	0,113 ± 0,03
lösliche overte	0,041 ± 0,01	0,024 ± 0,02	0,070 ± 0,02	0,041 ± 0,02	0,096 ± 0,05
gebundene overte	0,197 ± 0,03	0,149 ± 0,03	0,178 ± 0,01	0,180 ± 0,04	0,154 ± 0,03
gesamte gebundene	2,078 ± 0,35	2,100 ± 0,16	1,661 ± 0,19	1,325 ± 0,14*	0,781 ± 0,12*
latente	1,881 ± 0,28	1,951 ± 0,15	1,483 ± 0,18	1,144 ± 0,17*	0,627 ± 0,11**
Gesamtaktivität	2,119 ± 0,33	2,124 ± 0,17	1,731 ± 0,20	1,366 ± 0,14*	0,781 ± 0,12**

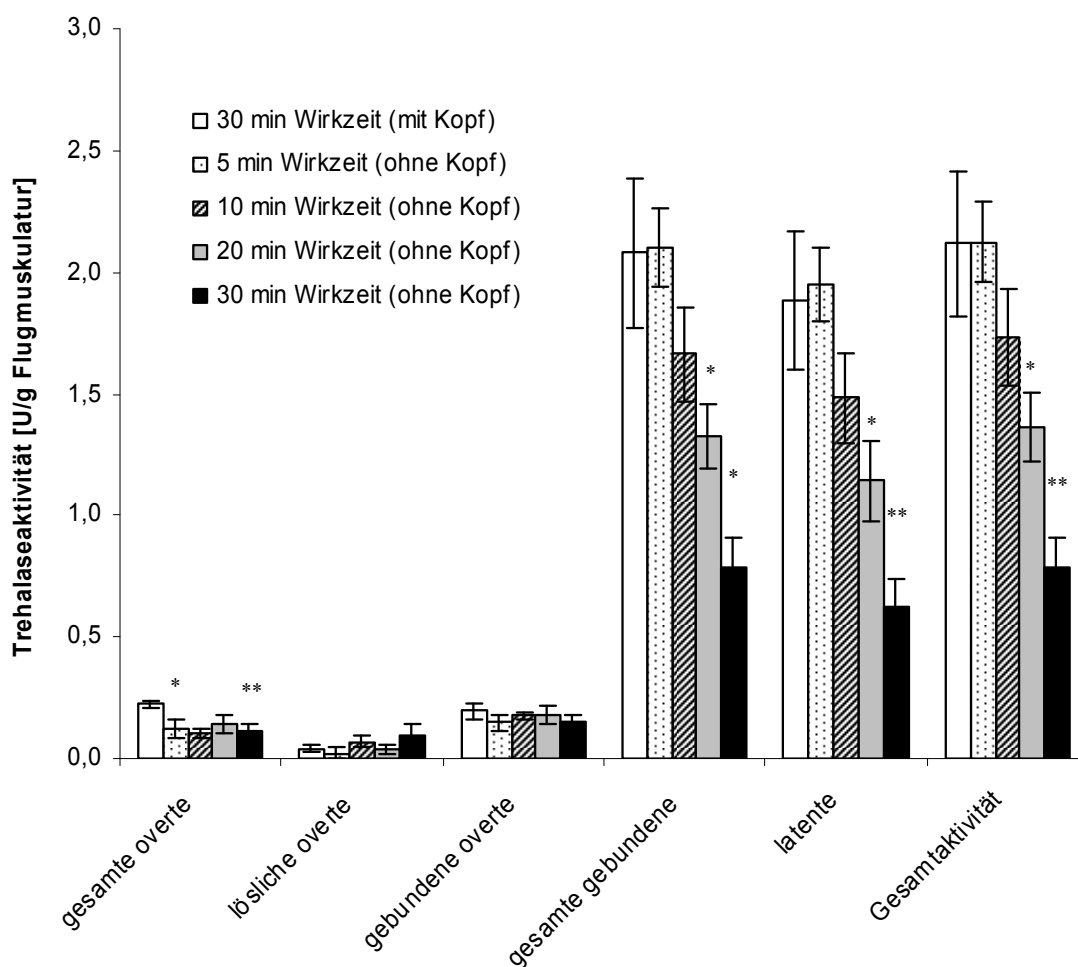


Abbildung 39. Effekte verschiedener Wirkzeiten von 5µg Insulin plus 20µg Trehazolin auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von intakten Heuschrecken und solchen denen der Kopf entfernt worden war.

Alle Tiere erhielten in einer Injektion (in insgesamt 10µl Ringer) 5µg Insulin + 20µg Trehazolin. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 38 im Anhang.

Insuline sind im gesamten Tierreich gefunden worden, auch bei Insekten und speziell bei *Locusta* (Übersicht bei Wu und Brown 2006). Die typische Insulinstruktur ist stets hochgradig konserviert (siehe Diskussion). Falls dies auch für die Funktionen gilt, so könnte man annehmen, dass Säugerinsulin auch in der Skelettmuskulatur von Insekten, in unserem Fall in der Flugmuskulatur, eine Vesikeltranslokation vom Zellinneren in die Außenmembran auslösen kann. Unsere Hypothese, dass die *latente* Trehalase der Flugmuskulatur von *Locusta* an Vesikel

gebunden und translozierbar ist, ist mit den Ergebnissen der Insulinexperimente vereinbar (siehe Diskussion).

Wortmannin ist ein Inhibitor der (insulinindizierten) Vesikeltranslokation. Es war daher interessant zu prüfen, welche Effekte Wortmannin allein und in Kombination mit Insulin auf die Verteilung der Trehalaseaktivitäten in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* haben würde. Weiterhin wurden Experimente mit zusätzlicher Flugaktivität geplant.

3.6 Effekte von Flug und Trehazolin in Kombination mit Wortmannin oder Insulin auf die Hämolymphezucker sowie die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von *Locusta*

3.6.1 Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Wortmannin

Die Heuschrecken für diesen Versuch wurden ca. eine Stunde vor Versuchsbeginn mit Leitungswasser aus einer Pipette (ad libitum) getränkt, um die spätere Hämolymphentnahme zu erleichtern. Für diese Versuche wurden intakte Tiere verwandt (keine Entfernung des Kopfes).

Nach einer einstündigen Ruhephase in kleinen Plastikschälchen wurden alle Tiere mit 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) injiziert. Genau 45 Minuten später wurden die als Trehazolintiere bezeichneten Tiere mit 5µl DMSO-Ringer (1 Teil DMSO und 4 Teile Insektenringer) und die als Trehazolin-Wortmannin-Tiere bezeichneten Tiere mit 0,4mM Wortmannin (in 5µl DMSO-Ringer) injiziert. Sowohl die Trehazolin- als auch die Trehazolin-Wortmannin-Tiere wurden jeweils in Flug- und Ruhetiere unterteilt. Die Ruhetiere saßen während der 60-minütigen Trehazolinwirkzeit in kleinen Plastikschälchen. Die Fluchtiere ruhten 55 Minuten in den Plastikschälchen und flogen dann für 5 Minuten. Die höhere Anzahl der Ruhetiere kam durch die Flugunlust der Fluchtiere zustande. Einige der Heuschrecken, die zum Fliegen vorgesehen waren, waren nicht zum Fliegen zu stimulieren und konnten daher nicht berücksichtigt werden. Nach 60 Minuten wurde den Tieren Hämolymphe wie unter 2.3.1 beschrieben entnommen, aufbereitet und für die Zuckermessung aufbewahrt. Die Tiere wurden schnell getötet und die rechten

Halbthoraces gewaschen. Die Flugmuskulatur wurde präpariert, homogenisiert, fraktioniert, und mit dem zweistufigen Trehalasetest wurden die Trehalaseaktivitäten bestimmt.

In der Hämolymphe der Heuschrecken bewirkte Trehazolin plus Wortmannin weder bei Ruhe- noch bei Flugtieren signifikante Veränderungen der Glucose- oder Trehalosekonzentrationen im Vergleich zu den mit Trehazolin plus DMSO-Ringer injizierten Tieren. Bei den Glucosekonzentrationen ist allerdings eine Tendenz zu geringeren Werten bei den Trehazolin-Wortmannin-Tieren sichtbar, die Streuung der Werte ist allerdings hoch (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19. Effekte von Trehazolin (10µg, 60 Minuten Wirkdauer) sowie Trehazolin (60 Minuten) plus Wortmannin (15 Minuten Wirkdauer) auf die Trehalose- und Glucosekonzentrationen [mM] in der Hämolymphe von Locusta (Ruhe- und Flugtiere).

Trehazolintiere erhielten eine Injektion von 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) und 45 Minuten später 5µl DMSO-Ringer (4 Teile Insektenringer + 1 Teil DMSO)

Trehazolin-Wortmannin-Tiere erhielten eine Injektion von 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) und 45 Minuten später 0,4mM Wortmannin (in 5µl DMSO-Ringer)

Die Wirkdauer von Trehazolin betrug 60 Minuten, die von Wortmannin und DMSO-Ringer 15 Minuten. Flugtiere: 55 Minuten Ruhe dann Flug von Minute 55 bis 60. Ruhetiere: 60 Minuten Ruhe in Plastikschälchen. Gezeigt sind Mittelwerte der Glucose- und Trehalosekonzentration [mM] ± SEM; Ruhe (n=9), Flug (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 39 im Anhang.

	Trehalose [mM]	Glucose [mM]
Trehazolin-Ruhetiere	56,4 ± 4,4	0,163 ± 0,05
Trehazolin-Flugtiere	60,9 ± 4,0	0,179 ± 0,03
Trehazolin-Wortmannin-Ruhetiere	48,3 ± 5,0	0,075 ± 0,04
Trehazolin-Wortmannin-Flugtiere	50,1 ± 6,1	0,046 ± 0,01

Aus dieser Versuchsserie, in der wie zuvor schon die Wirkungen von Trehazolin und Flugaktivität sowie zusätzlich die Effekte von Wortmannin auf die Trehalaseaktivitäten in den Gewebefractionen der Flugmuskulatur analysiert wurden, ergaben sich interessante Ergebnisse und Hinweise. Zunächst bestätigen die Befunde an den nur mit Trehazolin und DMSO-Ringer injizierten Tieren, dass Flugaktivität (direkt vor der Tötung der Tiere) die *overt*e Aktivität (bei Anwesenheit von Trehazolin) relativ wenig beeinflusst. Dieser Effekt ist aber nur scheinbar, da das

Ergebnisse

vorhandene Trehazolin *overte* Aktivität, sobald sie entsteht, schnell hemmen dürfte und damit unsichtbar (nicht nachweisbar) machen würde. Die gesamt gebundene Aktivität, die quantitativ am bedeutsamsten ist, nahm hingegen um 38,8% signifikant ab. Nach unserer Hypothese bedeutet dieses Ergebnis also, dass *latente* Trehalase in *overte* umgewandelt worden ist, da Trehazolin nur *overte* Trehalase erreichen kann. Die Umwandlung von *latenter* in *overte* Trehalase spiegelt sich dann im Verlust an *latenter* Aktivität wider (siehe Tabelle 20 und Abbildung 40. Legende siehe S. 98).

Tabelle 20. Effekte von Trehazolin (10µg, 60 Minuten Wirkdauer) sowie Trehazolin (60 Minuten) plus Wortmannin (15 Minuten Wirkdauer) auf die Aktivität der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta (Ruhe- und Flugtiere).

Es handelt sich um dieselben Tiere wie in Tabelle 19 (siehe dort). Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM; Ruhe (n=9), Flug (n=5). Statistische Analyse siehe Tabelle 40 im Anhang.

Trehalasefraktion	Trehazolin-Tiere		Trehazolin-Wortmannin-Tiere	
	Ruhe (n=9)	Flug (n=5)	Ruhe (n=9)	Flug (n=5)
gesamte <i>overte</i>	0,107 ± 0,03	0,256 ± 0,05	0,103 ± 0,05	0,153 ± 0,03
lösliche <i>overte</i>	0,036 ± 0,01	0,069 ± 0,03	0,042 ± 0,05	0,093 ± 0,02
gebundene <i>overte</i>	0,285 ± 0,04	0,144 ± 0,05	0,158 ± 0,10	0,165 ± 0,06
gesamte gebundene	1,730 ± 0,15	1,047 ± 0,16	2,066 ± 0,51	1,103 ± 0,14
<i>latente</i>	1,445 ± 0,13	0,903 ± 0,15	1,908 ± 0,50	0,938 ± 0,14
Gesamtaktivität	1,766 ± 0,16	1,116 ± 0,18	2,108 ± 0,56	1,191 ± 0,14

A Trehalasefraktion	Trehazolin-Tiere		Trehazolin-Wortmannin-Tiere	
	Ruhe (n=9)	Flug (n=5)	Ruhe (n=9)	Flug (n=5)
gesamte <i>overte</i>	0,107 ± 0,03	0,256 ± 0,05	0,103 ± 0,05	0,153 ± 0,03
lösliche <i>overte</i>	0,036 ± 0,01	0,069 ± 0,03	0,042 ± 0,05	0,093 ± 0,02
gebundene <i>overte</i>	0,070 ± 0,02	0,187 ± 0,06	0,060 ± 0,02	0,060 ± 0,02
gesamte gebundene	1,730 ± 0,15	1,047 ± 0,16	2,066 ± 0,16	1,103 ± 0,14
<i>latente</i>	1,660 ± 0,15	0,861 ± 0,16	2,006 ± 0,17	1,043 ± 0,13
Gesamtaktivität	1,766 ± 0,15	1,117 ± 0,16	2,108 ± 0,17	1,196 ± 0,15

Da allen Tieren dieser Serie Trehazolin injiziert worden war, sind die Trehalaseaktivitäten sämtlicher Fraktionen gegenüber unbehandelten Tieren reduziert. Der Effekt des kurzen Fluges ist gleichwohl deutlich, besonders auf die Fraktion 4 (gesamt gebundene Trehalase), die die *latente* Trehalase enthält, sowie auf die *latente* und gesamte Aktivität, die sämtlich signifikant erniedrigt waren (siehe Tabelle 20 und Abbildung 40. Legende siehe S. 98

). Wortmannin erhöhte bei den Ruhetieren tendenziell die Aktivitäten in Fraktion 4 bzw. die *latente* und gesamte Trehalaseaktivität. Gemäß unserer Arbeitshypothese würde dies bedeuten, dass Wortmannin die *latente* Trehalase stabilisiert. Der Effekt des Wortmannins ist jedoch nicht sehr deutlich.

Abbildung 40. Effekte von Trehazolin (10µg, 60 Minuten Wirkdauer) und Trehazolin (60 Minuten) plus Wortmannin (15 Minuten Wirkdauer) auf die Aktivität der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta (Ruhe- und Fluginsekten).

Trehazolintiere erhielten eine Injektion von 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) und 5µl DMSO-Ringer (4 Teile Insektenringer + 1 Teil DMSO)

Trehazolin-Wortmannin-Tiere erhielten eine Injektion von 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) und 0,4mM Wortmannin (in 5µl DMSO-Ringer)

Die Wirkdauer vom Trehazolin betrug 60 Minuten, von Wortmannin und DMSO-Ringer 15 Minuten. Fluginsekten: 55 Minuten Ruhe dann Flug von Minute 55 bis 60. Ruhetiere: Ruhe 60 Minuten in Plastikschräbchen. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM; Ruhe (n=9), Flug (n=5).

Abbildung 40A. Diese Abbildung stellt dasselbe Experiment wie Abbildung 40 dar, aber mit etwas anderer Auswertung der Messergebnisse. Die Aktivitäten der gebundenen *overten* Trehalase wurden in dieser Auswertung nicht gemessen, sondern als Differenzen der Aktivitäten von gesamt *overten* und löslicher *overten* Aktivitäten (Fraktion 1 – Fraktion 2) berechnet.

Ergebnisse

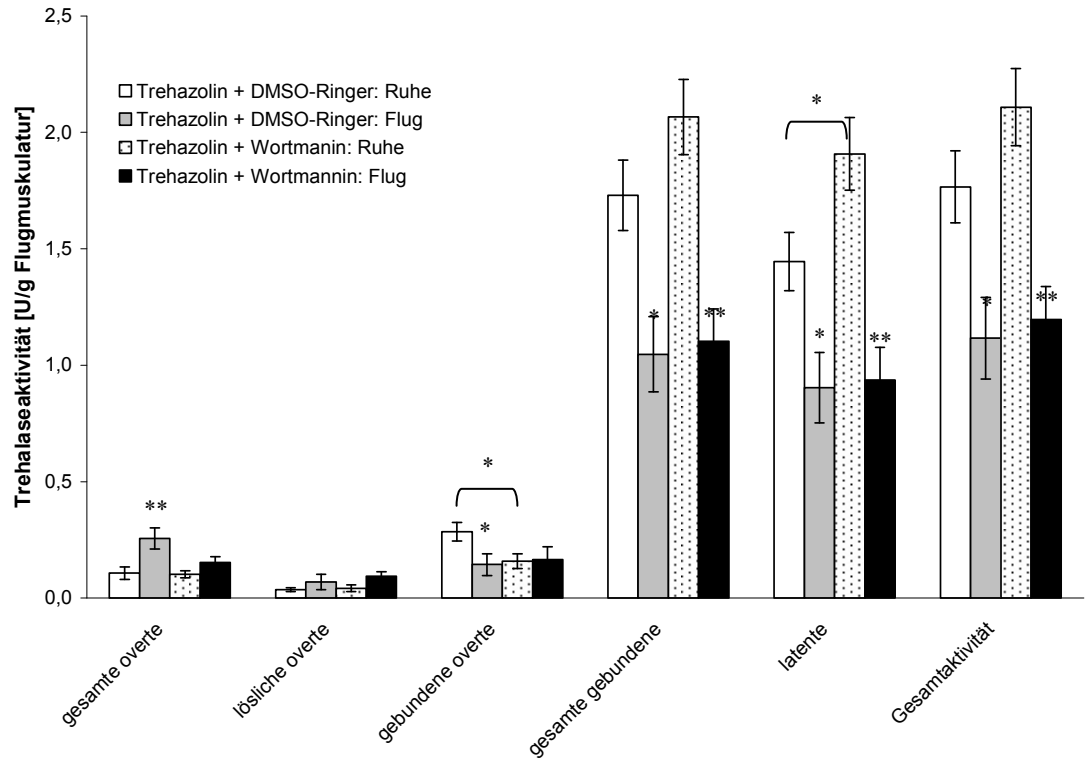


Abbildung 40. Legende siehe S. 98

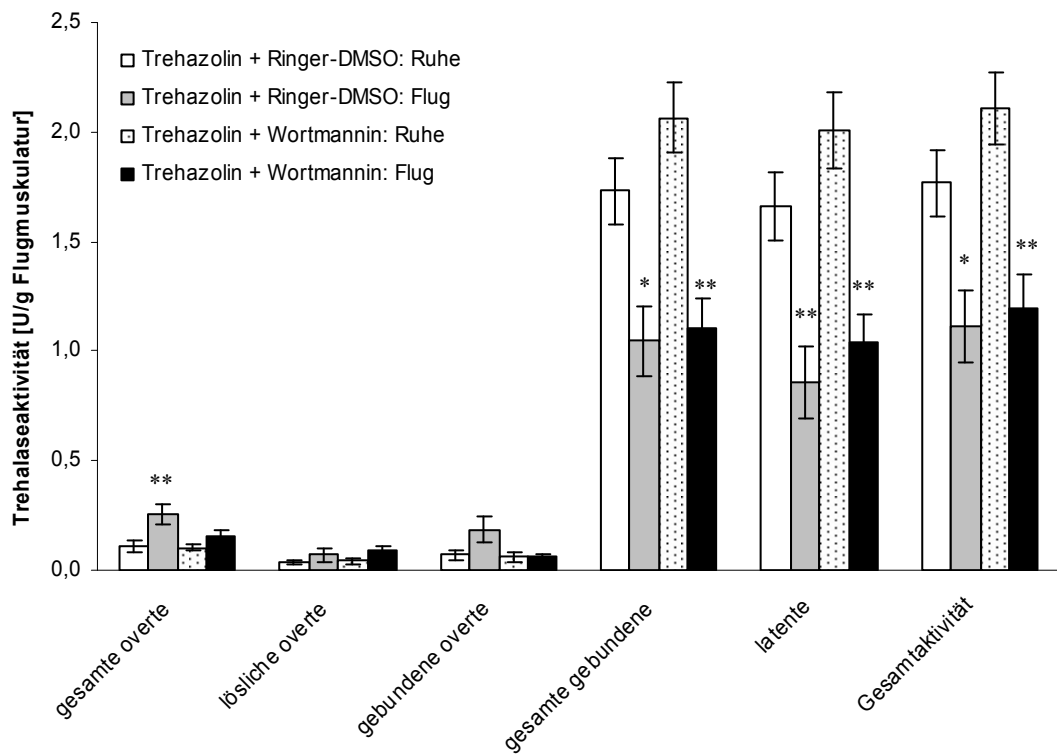


Abbildung 40A. Legende siehe Seite 98

Zudem gibt es ein methodisches Problem, das bei manchen Versuchen auftauchte. Es besteht darin, dass die Aktivität in Fraktion 3 (= gebundene *overte* Trehalase) in einigen Fällen deutlich von der Differenz der Aktivitäten der Fraktion 1 und 2 abwich. Bei sorgfältiger und vorsichtiger Homogenisation und Resuspension sollte die Aktivitätsdifferenz F1-F2 (gesamte *overte* – lösliche *overte*) dem Wert in F3 (gebundene *overte*) entsprechen. Da dieses Kriterium hier nicht befriedigend erfüllt war, wurden die Messwerte auf zwei Weisen ausgewertet. In Tabelle 20 wurde die Aktivität der gebundenen Trehalase wie gemessen verwendet (entspricht der üblichen Vorgehensweise). In Tabelle 20A wurde für die Aktivitäten der gebundenen *overten* Trehalase nicht die in Fraktion 3 gemessenen Werte verwendet, sondern jeweils die Differenz von gesamter *overter* und löslicher *overter* Trehalase (Fraktion 1 – Fraktion 2). Die Ergebnisse beider Auswertverfahren sind in Abbildung 40. Legende siehe S. 98

und Abbildung 40. Legende siehe S. 98

A graphisch dargestellt. Man sieht, dass die Ergebnisse sehr ähnlich sind und beide eine stabilisierende Wirkung des Wortmannins auf die *latente* Trehalase zeigen. Allerdings ist nur bei der ersten (üblichen) Auswertmethode der Wortmannineffekt auf die *latente* Trehalaseaktivität bei Ruhetieren auf dem 5% Niveau signifikant ($p=0,03$), während im zweiten Fall die Signifikanz verfehlt wurde ($p=0,15$).

Bei Flugtieren wurden durch die Flugaktivität alle Fraktionen mit *latenter* Trehalaseaktivität, d.h. die gesamte gebundene, die *latente* und die gesamte Trehalaseaktivität wie üblich reduziert. Wortmannin hatte also keinen signifikanten Effekt (siehe Abbildung 40. Legende siehe S. 98

und Abbildung 40. Legende siehe S. 98

A). Dieses Ergebnis könnte ein wichtiger Hinweis sein, dass bei Flugaktivität die postulierte Trehalasetranslokation nicht über einen Wortmannin-sensitiven Signalweg gesteuert wird.

Wortmannin verstärkt die Differenzen zwischen Ruhe- und Flugtieren in den Trehalaseformen, die *latente* Trehalase enthalten, d.h. bei der gesamten gebundenen sowie der *latenten* und gesamten Aktivität. Der verstärkte Effekt wird nicht durch die Flugaktivität hervorgerufen, sondern durch erhöhte Trehalaseaktivitäten der mit Wortmannin plus Trehazolin injizierten Ruhetiere (siehe Abbildung 40. Legende siehe S. 98

, Säulen 3 und 4, sowie p-Werte in Tabelle 40). Entsprechend sind auch die Differenzen zwischen Trehazolin-Wortmannin- Ruhetieren und Trehazolin-Flugtieren (*latente* Trehalaseaktivität: -55,6%) signifikant verschieden. Interessant ist dabei der Befund, dass Wortmannin, von dem bekannt ist, dass es Vesikeltranslokation (in der Insulinsignalkette) hemmt, bei Ruhetieren die *latente* Form der Trehalase stabilisiert (+24,2%). Dieser Befund ist daher gut mit unserer Arbeitshypothese vereinbar, dass die Aktivierung der Trehalase auf einer Translokation trehalasehaltiger Vesikel beruhen könnte. Insulin fördert Vesikeltranslokation, Wortmannin hingegen hemmt sie. Derselbe Zusammenhang gibt für Umwandlung von *latenter* in *overt* Trehalase, die durch Insulin gefördert und durch Wortmannin gehemmt wird (siehe 3.5.1, 3.6.2 und Diskussion).

3.6.2 Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Insulin

Sowohl Flugaktivität (bei intakten Tieren) als auch Insulin (bei Tieren ohne Kopf) führten zu einer Verminderung der *latenten* Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur von *Locusta*, und diese Verluste an *latenter* Aktivität konnten fixiert werden, sofern Trehazolin in der Hämolymphe vorhanden war. Es war daher interessant zu prüfen, welche Effekte eine Kombination von Flug und Insulin haben würden. Da Insulin in geköpften Insekten besser wirkt, wurden allen Heuschrecken dieser Versuchsserie die Köpfe abgeschnürt und entfernt. Dann wurden die Tiere für 3 Stunden in kleine Plastikschälchen gesetzt. Nach dieser „Ruhephase“ erhielten die Tiere eine Injektion von 20µg Trehazolin oder von 20µg Trehazolin plus Insulin. Die Substanzen wurden stets in einer einzigen Injektion verabreicht (siehe Tabelle 21).

Die injizierten Tiere wurden in Ruhe- und Flugtiere unterteilt. Die Ruhetiere saßen für 30 Minuten in kleinen Plastikschälchen, die Flugtiere für 25 Minuten mit anschließendem Flug von 5 Minuten. Nach jeweils 30 Minuten wurden die Tiere getötet, die rechten Halbthoraces (Injektionsseite) gewaschen, die Flugmuskulatur präpariert, homogenisiert und fraktioniert. Die Trehalaseaktivität wurde mit dem zweistufigen Trehalasetest gemessen. Die *latente* und die *gesamte* Aktivität wurden berechnet, wie unter 2.4.2 beschrieben.

Die meisten der Tiere ohne Kopf „flogen“ überraschend gut, d.h. sie bewegten beim stationären Flug (siehe Abbildung 24) wie intakte Tiere ihre Flügel. Dieses

Verhalten zeigt eindrucksvoll, dass die neuronale Steuerung der Flugmuskeln in den Ganglien des Thorax lokalisiert ist.

Die *latenten* Trehalaseaktivitäten der Trehazolin-Flugtiere waren im Vergleich zu den Trehazolin-Ruhetieren hochsignifikant erniedrigt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die durch Flug induzierte Verminderung der *latenten* Trehalase nicht durch das Gehirn vermittelt wird. Bei den Trehazolin-Insulin-Tieren waren signifikante Unterschiede zwischen Ruhe- und Flugtieren weder in der gesamten gebundenen noch der *latenten* Aktivität vorhanden (Abbildung 41). Die Ursache hierfür ist offenbar, dass die *latente* Trehalase bei den Trehazolin-Insulin-Ruhetieren durch die Wirkung des Insulins vermindert war, so dass die Flugaktivität nur einen geringen zusätzlichen Effekt hatte. Dem entspricht auch die Beobachtung, dass die *latente* Trehalaseaktivität bei den Trehazolin-Insulin-Ruhetieren signifikant geringer war als bei den Trehazolin-Ruhetieren. Die Beobachtung ist mit der Hypothese vereinbar, dass Insulin ohne Flugaktivität in der Flugmuskulatur zu einer Translokation von *latenter* in *overt* Trehalase führt.

Tabelle 21. Effekte von Trehazolin und von Trehazolin plus Insulin auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta (Ruhe- und Flugtiere ohne Kopf).

In einer Injektion (Wirkdauer 30 Minuten) erhielten die Tiere folgende Substanzen

1. Trehazolintiere wurden injiziert mit 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer).
2. Trehazolin-Insulin-Tiere wurden injiziert mit 20µg Trehazolin plus 500ng Insulin (in 10µl Insektenringer).

Ruhetiere: 30 Minuten Ruhe in Plastikschrallen Flugtiere: Flug von Minute 25 bis 30.

Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (Trehazolintiere: n=5, Trehazolin-Insulin-Tiere: n= 8). Statistische Analyse siehe Anhang Tabelle 41.

Trehalasefraktion	Trehalaseaktivität [U/g Flugmuskulatur bei 30°C]			
	Trehazolin		Trehazolin + Insulin	
	Ruhe	Flug	Ruhe	Flug
<i>gesamte overte</i>	0,445 ± 0,16	0,215 ± 0,02	0,107 ± 0,01	0,098 ± 0,02
<i>lösliche overte</i>	0,017 ± 0,01	0,017 ± 0,01	0,018 ± 0,01	0,006 ± 0,00
<i>gebundene overte</i>	0,345 ± 0,10	0,153 ± 0,03	0,109 ± 0,03	0,116 ± 0,01
<i>gesamte gebundene</i>	3,124 ± 0,33	1,382 ± 0,18	2,129 ± 0,20	1,757 ± 0,23
<i>latente</i>	2,779 ± 0,24	1,229 ± 0,17	2,020 ± 0,20	1,641 ± 0,23
Gesamtaktivität	3,142 ± 0,33	1,398 ± 0,17	2,147 ± 0,20	1,763 ± 0,22

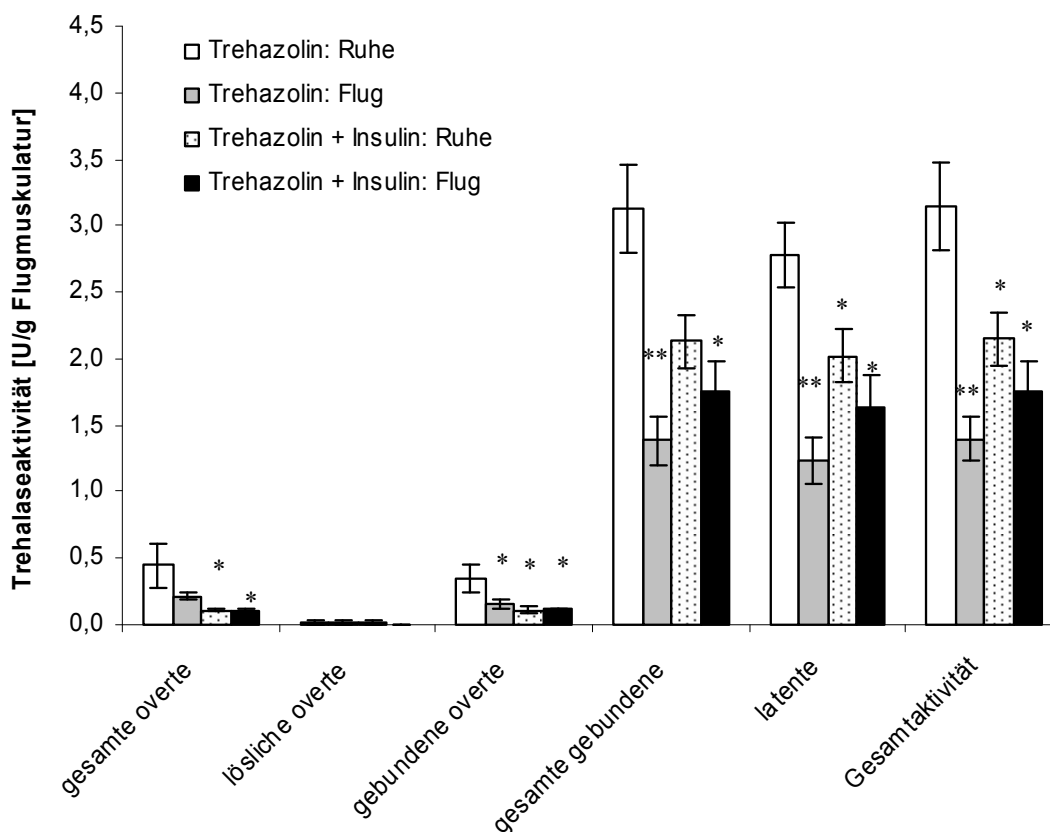


Abbildung 41. Effekte von Insulin sowie Ruhe und Flug auf die Aktivitäten der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von Locusta (ohne Kopf) bei Anwesenheit von Trehazolin.

Den Tieren wurde der Kopf abgeschnürt und entfernt. Drei Stunden später wurden sie in einer Injektion (Volumen 10µl, Wirkdauer 30 Minuten) mit folgenden Substanzen injiziert: Trehazolintiere erhielten eine Injektion von 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer). Trehazolin-Insulin-Tiere erhielten eine Injektion von 20µg Trehazolin (in 10µl Insektenringer) plus 500ng Insulin.

Ruhetiere: 30 Minuten Ruhe in Plastikschrälen. Flugtiere: Flug von Minute 25 bis Minute 30. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] ± SEM (Trehazolin: n=5, Trehazolin-Insulin: n=8). Die Signifikanzzeichen beziehen sich auf den Vergleich mit Trehazolin-Ruhetieren, weitere statistische Analyse siehe Anhang Tabelle 41.

3.7 Wirkung von Trehazolin auf die Trehalaseaktivitäten in verschiedenen Organen von *Locusta*

Für diese Versuchsserie wurden zur Analyse von Flug- und Sprungmuskulatur sowie des Darmes und Gehirns Tiere mit 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) und Kontrollen mit 5µl Insektenringer injiziert. Bei der Wahl der Dosis von Trehazolin und der Einwirkzeit schien wichtig, eine zu starke Hemmung von (eventuell vorhandener) *latenter* Trehalase in den Geweben zu vermeiden. Alle Tiere wurden 2 Stunden nach der Injektion getötet. Die Behandlung der Proben wich vom üblichen Verfahren ab. Anders als bei der üblichen Aufarbeitung der Flugmuskulatur wurden die Organe (Flug- und Sprungmuskulatur, Darm und Gehirn) nicht sofort aufgearbeitet, sondern die Thoraces, Sprungbeine und Därme wurden zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Tiefkühler bei -20°C bis zur Präparation aufbewahrt. Für die Gewinnung von Gehirnhomogenaten wurden jeweils 3 Organe zusammen aufgearbeitet, um ausreichend Material zu haben. Nach dem Auftauen wurden die Organe sofort homogenisiert. Die Homogenate wurden über Nacht bei 4°C gegen Ringer dialysiert, um überschüssiges Trehazolin zu entfernen. Am nächsten Tag wurden die Homogenate fraktioniert und mit dem zweistufigen Trehalasetest die Trehalaseaktivität bestimmt. Die Aktivitäten der Trehalase in den Fraktionen der Ringertiere und der Trehazolintiere sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Als Ergebnis ist zunächst festzuhalten, dass die mehrstündige Dialyse der Gewebekomogenate offenbar die Aktivität der Trehalase nicht merklich beeinträchtigt. Bei der Flugmuskulatur der Kontrolltiere waren nämlich die Trehalaseaktivitäten in allen Fraktionen nach Dialyse gegen Ringerlösung nicht signifikant verändert worden. Dies zeigt, dass die Trehalase der Flugmuskulatur recht stabil ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies auch für die Trehalaseaktivität der übrigen Organe gilt. Das Experiment zeigt allerdings deutliche Unterschiede in der Quantität der Trehalaseaktivität der vier Organe.

Die Flugmuskulatur hatte mit großem Abstand die höchste Gesamtaktivität, gefolgt vom Darm, der Sprungmuskulatur und dem Gehirn. In der Flugmuskulatur war die *latente* Trehalaseaktivität unzweifelhaft nachweisbar, da hier die Trehalaseaktivität in Fraktion 3 nach Detergensbehandlung (d.h. in Fraktion 4) sehr stark erhöht war (siehe Tabelle 23). Der Aktivierungsfaktor durch Detergens betrug

10,7 (gesamte gebundene Trehalase dividiert durch gebundene *overte* Trehalase = Fraktion 4 / Fraktion 3). Zudem war der Anteil der *latenten* Trehalase an der gesamten Trehalaseaktivität mit 82% im Mittel sehr hoch.

Die Flugmuskulatur weicht damit deutlich von allen anderen Organen ab. Hinweise auf die Existenz *latenter* Trehalase gibt es auch für die Sprungmuskulatur. Hier zeigte die Fraktion 3 (Sediment) eine (gebundene) *overte* Trehalaseaktivität, die durch Detergens im Mittel um den Faktor 3,3 aktiviert werden konnte. Zudem ist der Anteil der „*latenten*“ Trehalase an der gesamten Aktivität mit 48,5% relativ hoch.

Der Darm hatte mit 1,77U/g eine relativ hohe Trehalaseaktivität, jedoch lag davon der größte Teil mit 1,41U/g, d.h. 80%, als *overte* Form vor, und war als solche überwiegend löslich. Die Trehalase der Sedimentfraktion (Fraktion 3) konnte durch Detergens um den Faktor 3,2 aktiviert werden. Der Anteil der *latenten* Trehalase an der Gesamtaktivität war mit 19% jedoch relativ gering. Es ist möglich, dass die *latente* Aktivität des Darms glatten Muskelzellen des Darms entstammt, während die *overte* Trehalase den eigentlichen Darmzellen zuzuordnen ist.

Die Ergebnisse der Messungen der Trehalase in Fraktionen von Gehirngewebe sind schwer zu deuten. Das Gehirn hatte Trehalaseaktivität, jedoch war bei den Ringertieren (Kontrollen) kein sicherer Hinweis auf die Existenz *latenter* Trehalase zu finden. Es bedarf weiterer Analyse, um diese Frage zu beantworten.

Durch Trehazolin wurde in allen untersuchten Organen Trehalase statistisch signifikant gehemmt.

Tabelle 22. Aktivität der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flug- und Sprungmuskulatur, Darm und Gehirn von Locusta.

Ringertiere waren mit 5µl Insektenringer injiziert worden.

Trehazolintiere waren mit 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) injiziert worden.

Die Wirkdauer betrug 2 Stunden. Die Organe wurden präpariert, die Gewebe sofort homogenisiert und die Homogenate dialysiert, um überschüssiges Trehazolin zu entfernen (siehe Text). Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] in den Fraktionen der Organe ± SEM. Es wurden jeweils die Werte von Ringer- und Trehazolintieren desselben Gewebes verglichen. Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen (Ringertiere) an: * bedeutet $p < 0,05$ (= signifikant), ** bedeutet $p < 0,01$ (= hochsignifikant). Statistische Analyse siehe Tabelle 42 im Anhang.

Trehalasefraktion	Flugmuskulatur		Sprungmuskulatur	
	Ringer (n=9)	Trehazolin (n=9)	Ringer (n=6)	Trehazolin (n=6)
gesamte overte	0,754 ± 0,08	0,195 ± 0,04**	0,415 ± 0,04	0,161 ± 0,01**
lösliche overte	0,401 ± 0,07	0,065 ± 0,02**	0,288 ± 0,05	0,135 ± 0,02*
gebundene overte	0,352 ± 0,04	0,132 ± 0,04**	0,207 ± 0,02	0,047 ± 0,02**
gesamte gebundene	3,784 ± 0,21	3,005 ± 0,21*	0,674 ± 0,08	0,380 ± 0,04**
latente	3,432 ± 0,17	2,873 ± 0,18**	0,467 ± 0,05	0,333 ± 0,05
Gesamtaktivität	4,186 ± 0,22	3,070 ± 0,21**	0,962 ± 0,16	0,515 ± 0,06**

Trehalasefraktion	Darm		Gehirn	
	Ringer (n=9)	Trehazolin (n=9)	Ringer (n=7)	Trehazolin (n=7)
gesamte overte	1,408 ± 0,18	0,284 ± 0,04**	0,566 ± 0,04	0,024 ± 0,00**
lösliche overte	1,275 ± 0,20	0,300 ± 0,05**	0,300 ± 0,04	0,020 ± 0,00**
gebundene overte	0,155 ± 0,05	0,032 ± 0,01	0,490 ± 0,08	0,009 ± 0,00
gesamte gebundene	0,492 ± 0,08	0,236 ± 0,06*	0,495 ± 0,03	0,072 ± 0,01**
latente	0,337 ± 0,05	0,204 ± 0,06	0,005 ± 0,03	0,063 ± 0,00**
Gesamtaktivität	1,767 ± 0,16	0,536 ± 0,08**	0,795 ± 0,06	0,092 ± 0,00**

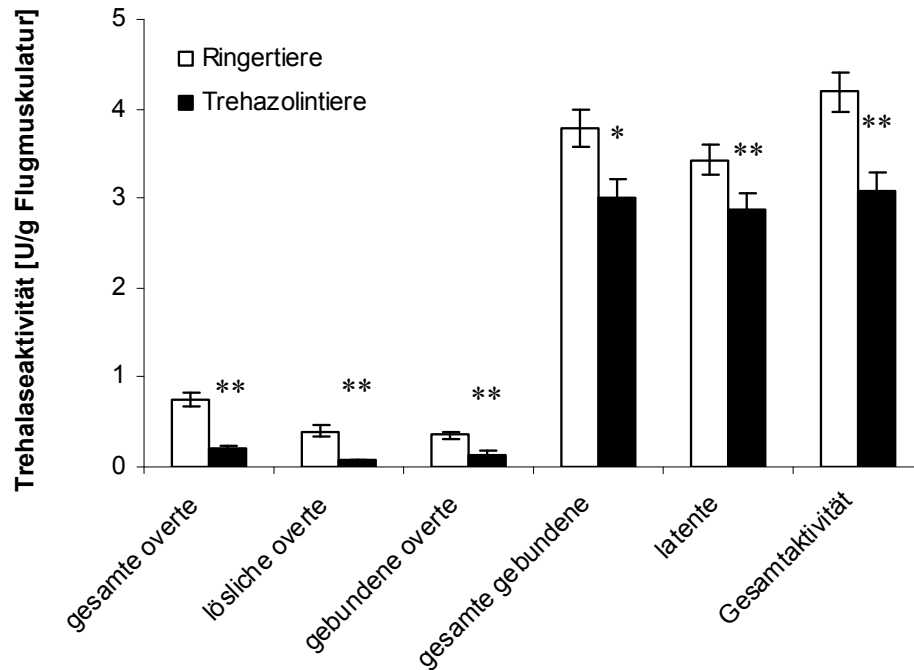


Abbildung 42. Aktivität der Trehalaseformen in den Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta*.

Ringertieren war 5µl Insektenringer injiziert worden.

Trehazolintieren war 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) injiziert worden.

Die Wirkdauer betrug 2 Stunden (siehe Tabelle 22). Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] in den Fraktionen der Flugmuskulatur ± SEM (n=9). Statistische Analyse siehe Tabelle 42 im Anhang.

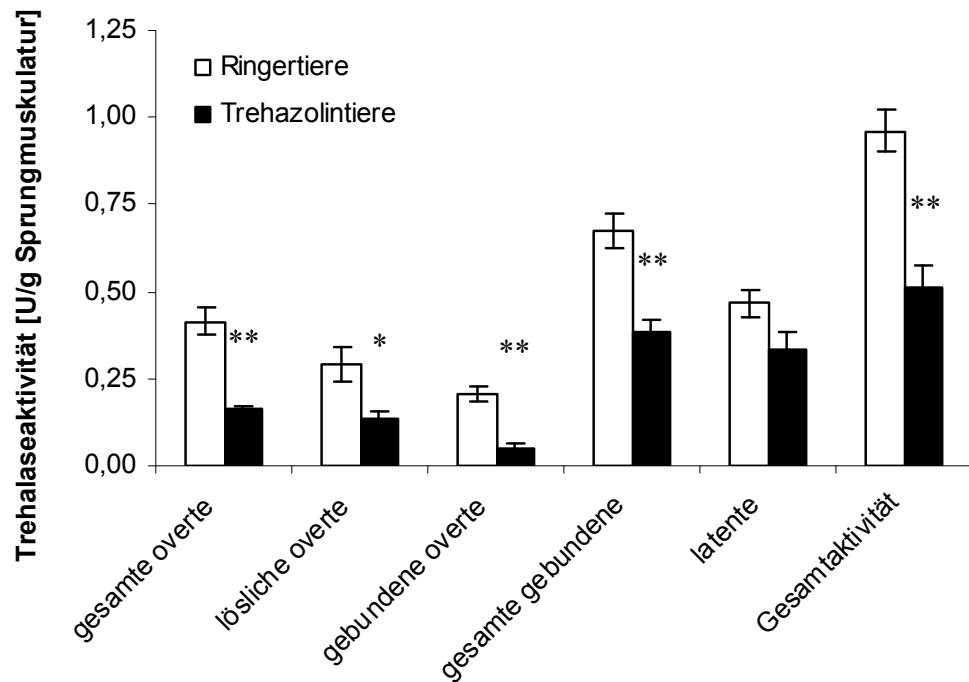


Abbildung 43. Aktivität der Trehalaseformen in den Fraktionen der Sprungmuskulatur von *Locusta*..

Ringertieren war 5µl Insektenringer injiziert worden.

Trehazolintieren war 10µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) injiziert worden.

Die Wirkdauer betrug 2 Stunden (siehe Tabelle 22). Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten [U/g bei 30°C] in den Fraktionen der Sprungmuskulatur ± SEM (n=6). Statistische Analyse siehe Tabelle 42 im Anhang.

Ergebnisse

Tabelle 23. Aktivierung von gebundener Trehalaseaktivität durch Detergenz, ausgedrückt als Quotienten aus gesamter gebundener und gebundener *overter* Trehalaseaktivität in Organen von *Locusta*. Details zur Versuchsdurchführung und Darstellung : siehe Tabelle 22 und Text.

	Flugmuskulatur		Sprungmuskulatur	
	Ringer	Trehazolin	Ringer	Trehazolin
gesamte gebundene	3,784 ± 0,21	3,005 ± 0,21**	0,674 ± 0,08	0,380 ± 0,04**
gebundene <i>overte</i>	0,352 ± 0,04	0,132 ± 0,04*	0,207 ± 0,02	0,047 ± 0,02**
Verhältnis	10,8 ± 1,3*	22,8 ± 3,2**	3,3 ± 0,57	8,1 ± 1,3**

	Darm		Gehirn	
	Ringer	Trehazolin	Ringer	Trehazolin
gesamte gebundene	0,492 ± 0,08	0,236 ± 0,06*	0,495 ± 0,03	0,072 ± 0,01**
gebundene <i>overte</i>	0,155 ± 0,05	0,032 ± 0,01*	0,490 ± 0,08	0,009 ± 0,00**
Verhältnis	3,2 ± 0,45	7,4 ± 1,1*	1,01 ± 0,50	8,0 ± 1,2*

4 Diskussion

Es ist schon lange bekannt, dass die Trehalaseaktivität, d.h. die Hydrolyse von Trehalose in zwei Moleküle Glucose, in der Flugmuskulatur von Wanderheuschrecken und anderen Insekten mit synchroner Muskulatur reguliert sein muss (siehe Einleitung 1.4). Der Mechanismus der Aktivitätsregulation ist jedoch unbekannt.

In Fraktionen der Flugmuskulatur von Wanderheuschrecken existieren zwei Formen der Trehalase, die sich durch die Zugänglichkeit für ihr Substrat (Trehalose) unterscheiden. Die *overte* Form der Trehalase ist für Trehalose erreichbar, die *latente* Trehalaseform hingegen nicht. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Arbeitshypothese entwickelt, nach der die Regulation der Trehalaseaktivität durch eine reversible Translokation von Enzymmolekülen erfolgt („Vesikelhypothese“). Die Hypothese postuliert, dass in vivo das aktive Zentrum des *overten* (= aktiven) Enzyms zum Zelläußeren hin orientiert ist und mit dem Substrat in der Hämolymphe in Kontakt kommt. Die Aktivitätskontrolle beruht danach also nicht auf einer Aktivierung der Enzymmoleküle, sondern geschieht über die Zugänglichkeit des Substrats zum Enzym (siehe Abbildung 1). Trehazolin ist ein festbindendes Substratanalogon, durch welches das aktive Zentrum des Enzyms langfristig blockiert wird. Unter der Voraussetzung, dass weder Trehalose noch Trehazolin intakte Flugmuskelfmembranen durchdringen kann, ist nur die *overte* Trehalase vom Substrat oder Inhibitor erreichbar. Die Arbeitshypothese sagt voraus, dass bei kurzer Einwirkzeit nur (in vivo) *overte* Trehalase gehemmt werden kann, bei längerer Einwirkzeit jedoch auch zunehmend die *latente* Form. Die Konsequenzen der Inhibitorwirkung unter diesen idealisierten Bedingungen sind in Abbildung 47A und 47B für kurze und längere Wirkzeiten schematisch dargestellt.

Im Folgenden soll insbesondere diskutiert werden, ob die Ergebnisse der Experimente mit der Arbeitshypothese vereinbar sind bzw. diese stützen oder schwächen.

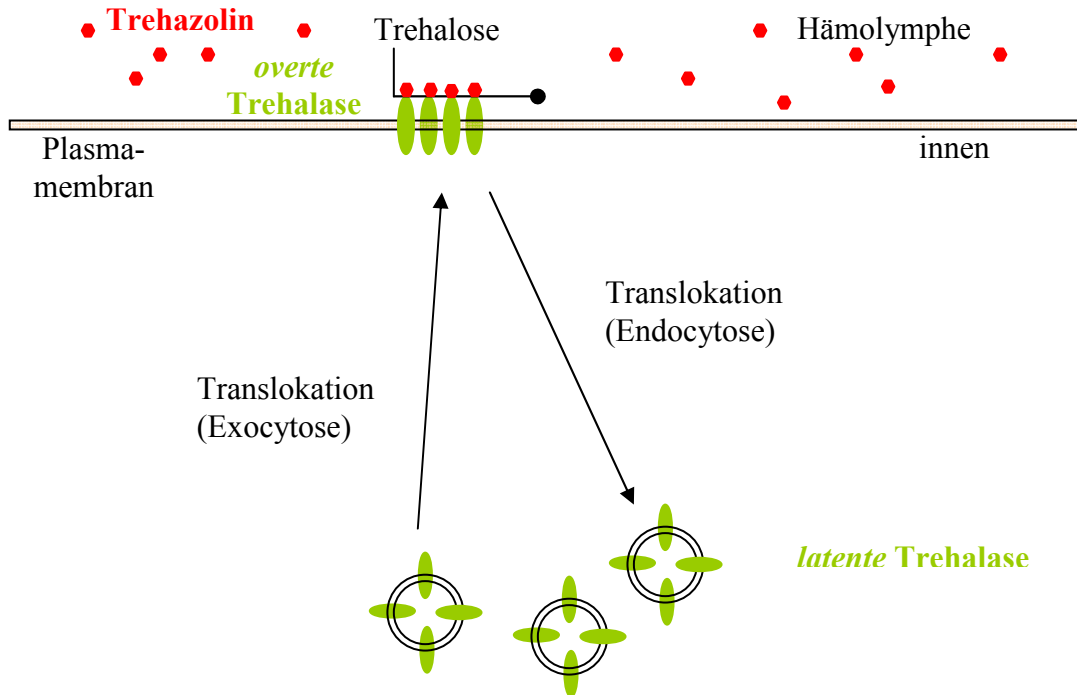


Abbildung 44A. In die Hämolymphe injiziertes Trehazolin hemmt bei kurzer Einwirkzeit überwiegend die *overt* Trehalaseaktivität.

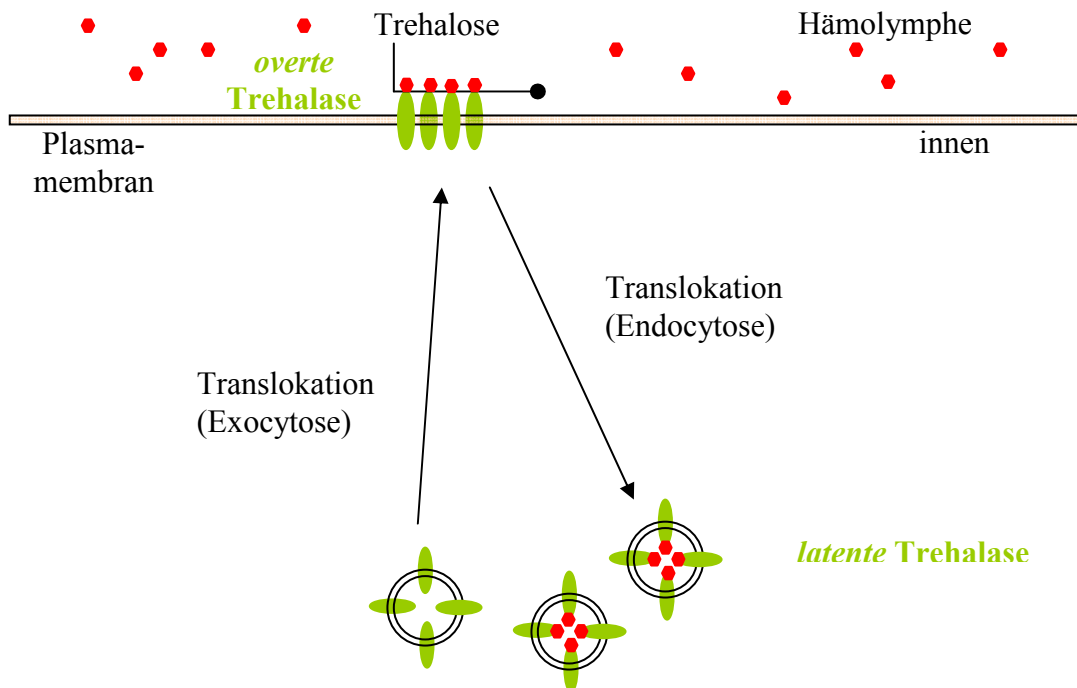


Abbildung 44B. Injiziertes Trehazolin hemmt bei längerer Einwirkzeit neben der *overt* auch die *latente* Trehalase, sofern der Vesikeltransport in der Flugmuskulatur weiterhin stattfindet.

4.1 Effekte verschiedener Trehazolindosen auf Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von *Locusta*

Mit allen Dosen von Trehazolin (10µg, 20µg und 40µg pro Tier) wurde innerhalb von 24 Stunden ein deutlicher Abfall der Glucosekonzentration erreicht (Tabelle 7). Die Werte schwankten jedoch individuell stark. Die Konzentration an Gesamtkohlenhydrat in der Hämolymphe, die die Trehalosekonzentration widerspiegelt, schwankte ebenfalls erheblich. Trehalose zeigte allerdings die Tendenz nach Trehazolininjektion zu steigen. Eine Abhängigkeit von der Dosis war in beiden Fällen nicht deutlich, da offenbar schon die geringste Dosis eine starke Wirkung hatte.

Die Wirkung von Trehazolin auf die Aktivitäten der Trehalase war hingegen dosisabhängig. Dies war besonders deutlich für die Formen, die *latente* Trehalase enthielten (Abbildung 26).

Beide Ergebnisse zusammen sind mit der Vesikelhypothese vereinbar, nach der ja nur die (in vivo) *overt*e Form Glucose liefert. Wenn aus der Zelle in die Plasmamembran translozierte Trehalase beim Übergang von der *latent*en in die *overt*e Form dauerhaft durch Trehazolin inaktiviert würde, so ist bei allen Dosen ein Abfall des Glucosespiegels zu erwarten. Der Anstieg der Hämolymphtrehalosekonzentration zeigt an, dass auch bei Anwesenheit von Trehazolin von den Versuchstieren weiterhin Trehalose synthetisiert wurde. Der starke dosisabhängige Abfall der gesamten gebundenen und *latent*en Trehalase, sowie der Gesamtaktivität könnte darauf hindeuten, dass bei höherer Konzentration des Inhibitors die Translokationsrate der Trehalase erhöht wurde. Diese Vermutung zu prüfen, würde jedoch erfordern, die Geschwindigkeiten der Translokation in beide Richtungen zu messen. Solche Analysen sind aufwendig und hätten den Rahmen der Arbeit gesprengt.

4.2 Hämolymphezucker und Flugmuskeltrehalase in Wanderheuschrecken nach Fütterung mit Trehazolin

In allen uns bekannten Berichten über die Wirkung von Trehalaseinhibitoren, wie Trehazolin oder das häufig verwendete Validoxylamin A (VAA), wurden die

Inhibitoren den Insekten per Injektion in die Hämolymphe verabreicht. Untersucht wurden unter anderem

Seidenspinner (*Bombyx mori*, VAA) von Kono et al. (1993),

Schaben (*Periplaneta*, VAA) von Kono et al. (1994),

Schmetterlingslarven (*Mamestra*, VAA) von Kono et al. (1995),

verschiedene Fliegenarten (u.a. *Musca* und *Calliphora*, VAA) von Takahashi et al. (1995) sowie Heuschrecken (*Locusta*, VAA) von Tanaka et al. (1998).

Es ist jedoch interessant zu wissen, ob Trehalaseinhibitoren auch oral appliziert, d.h. verfüttert werden können, und ob sie danach im Körper ähnliche Wirkungen wie nach Injektion hervorbringen. Wenn dies der Fall wäre, so könnte man zum Beispiel bei Experimenten den Stress, der durch die Injektion bei den Tieren ausgelöst wird, vermeiden. Es ist berichtet worden, dass Injektion von Substanzen unspezifische Stoffwechseleffekte haben kann, insbesondere Veränderungen in Blutzuckerspiegeln. Solche Stresseffekte sind bei verschiedenen Insekten beobachtet worden, z.B. bei Seidenspinnern (Wyatt 1961), Schaben (Matthews und Downer 1974) und auch Heuschrecken (Moreau et al. 1982).

Zudem würde eine Wirkung nach oraler Gabe prinzipiell die Möglichkeit eröffnen, Trehalaseinhibitoren als selektive Fraßgifte zu nutzen, die bei Wirbeltieren wenig toxisch sein sollten.

Die Heuschrecken nahmen nach einer Nacht ohne Futter, in der sie einzeln ohne Futter und Wasser gehalten worden waren, die angebotene Trehazolinlösung (50µg in 5µl Leitungswasser) bereitwillig an und natürlich ebenso Leitungswasser (für die Kontrollen). Der Entzug von Wasser und Futter ist dabei nicht entscheidend, da Heuschrecken sich fast immer bereitwillig mit Pipetten tränken lassen.

Durch die Behandlung der Tiere scheint ausgeschlossen, dass Trehazolin anders als durch die Wand des Verdauungstraktes in die Hämolymphe und an die Organe gelangt sein könnte. Eine kritische Aktion ist sicherlich das Herausziehen des am Kopf hängenden Darmes bei der Tötung der Tiere (siehe 2.3.2). Aber es ist sehr unwahrscheinlich, dass aus dem Rektum Darminhalt mit Trehazolin ausgetreten sein könnte und die Trehalase der Flugmuskulatur gehemmt haben könnte, da die Halbthoraces sofort nach der Präparation sorgfältig gewaschen wurden. Für die Zuckerspiegel der Hämolymphe konnte diese Gefahr nicht entstehen, da die

Hämolymphproben vor der Entfernung des Darmtraktes von den intakten Tieren gewonnen wurden.

Die Glucosekonzentration in den mit Trehazolin gefütterten Tieren war erniedrigt, die Trehalosekonzentration signifikant erhöht. Dieses Ergebnis entspricht qualitativ den Effekten injizierten Trehazolins. Dasselbe gilt für die Trehalaseaktivitäten in den Gewebefractionen der Flugmuskulatur, insbesondere für die *overt* und die gesamte Trehalaseaktivität, die hochsignifikant erniedrigt waren. Der Vergleich der Effekte von injiziertem und gefüttertem Trehazolin zeigte, dass die Wirkung von oral applizierten 50µg Trehazolin geringer ist als die von 20µg bzw. 40µg Trehazolin injiziertem Trehazolin (siehe Abbildung 27 im Vergleich zu Abbildung 28, sowie Tabelle 24). Besonders wichtig ist dabei der Befund, dass oral aufgenommene 50µg Trehazolin die *latente* Form der Flugmuskeltrehalase, wenn überhaupt, dann nur geringfügig (nicht signifikant) inhibierte. Das spricht dafür, dass die *latente* Trehalase durch intakte Membranen gut vom Inhibitor abgeschirmt war, was mit einer Lokalisation dieser Trehalaseform in intrazellulären Vesikel gut vereinbar wäre.

Es ist anzunehmen, dass oral aufgenommenes Trehazolin von *Locusta* zu einem erheblichen Teil ausgeschieden oder inaktiviert wird. Genaue Angaben würden aber eine Methode erfordern, Trehazolin quantitativ nachzuweisen. An der Entwicklung eines solchen Verfahrens wird zurzeit in unserer Arbeitsgruppe gearbeitet, um das Stoffwechselschicksal von Trehalaseinhibitoren in Insekten besser verfolgen zu können.

Die Effekte der Fütterung von 50µg Trehazolin sind insgesamt quantitativ geringer als nach Injektion von 20µg, 40µg oder 50µg Trehazolin. Alle Tiere überlebten die Fütterung und verhielten sich weitgehend normal, während sich nach Injektion von 50µg Trehazolin die Heuschrecken kaum oder nur sehr träge bewegten, nichts oder nur wenig fraßen (allerdings Wasser aus Pipetten aufnehmen) und innerhalb von 24 Stunden die Hälfte der Tiere starben (siehe Wegener et al. 2003). Auch die mit 20µg Trehazolin injizierten Heuschrecken waren deutlich träger als Kontrollen. Die mit 50µg Trehazolin gefütterten *Locusta* hingegen zeigten keine auffälligen Verhaltensänderungen. Insgesamt entsprachen die Effekte der Fütterung von 50µg Trehazolin denen deutlich geringerer injizierter Dosen von Trehazolin (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24. Trehalaseaktivitäten [%] in Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta* nach Injektion verschiedener Trehazolidosen oder Fütterung mit 50µg Trehazolin im Vergleich zu Kontrolltieren, deren Aktivitäten jeweils gleich 100% gesetzt wurden.

Trehazolintiere wurden injiziert mit 10µg, 20µg oder 40µg Trehazolin (in 5µl Insektenringer) oder gefüttert mit 50µg Trehazolin (in 5µl Leitungswasser). Nach 24 Stunden Einwirkzeit wurden die Tiere wie üblich getötet und zur Messung der Trehalaseaktivitäten aufgearbeitet. Gezeigt sind Mittelwerte der Trehalaseaktivitäten in Prozent im Vergleich zu den Kontrollen (Injektion n=6, Fütterung n=5). Die orale Aufnahme von 50µg Trehazolin entspricht in der Wirkung der Injektion von etwas mehr als 10µg des Inhibitors.

Trehalasefraktion	Injektion mit			Fütterung mit
	10µg Trehazolin	20µg Trehazolin	40µg Trehazolin	50µg Trehazolin
gesamte overte	11,6%	5,3%	1,7%	18,5%
lösliche overte	26,9%	3,5%	30,7%	36,0%
gebundene overte	27,8%	16,6%	7,0%	15,6%
gesamte gebundene	77,4%	25,1%	6,2%	60,8%
latente	92,7%	27,7%	6,1%	79,6%
Gesamtaktivität	74,4%	23,8%	7,7%	59,7%

Die Ergebnisse der Fütterungsversuche zeigen an, dass Trehazolin in intakten Heuschrecken aus dem Lumen des Verdauungstraktes in die Hämolymphe und mit dieser an die Organe der Insekten gelangt. Auf welche Art Trehazolin die Darmwand durchdringt, ist nicht bekannt. Es ist unwahrscheinlich, dass Trehazolin dabei intakte Zellmembranen durchdringt da die Substanz so hydrophil ist, dass für Transmembrantransport ein Transporter notwendig wäre. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit könnte ein Transporter für Trehalose vermutlich auch kompetitive Trehalaseinhibitoren transportieren. Ein Transporter für Trehalose ist jedoch für *Locusta* nicht bekannt, so dass diese Möglichkeit mit großer Wahrscheinlichkeit ausscheidet.

Denkbar ist, dass Trehazolin zwischen den Darmzellen permeiert oder dass der Darm durch die Inhibition der darmeigenen Trehalase geschädigt und damit durchlässiger wird.

Das Experiment lässt auch eine Aussage zu über die Menge des über den Verdauungstrakt in den Körper aufgenommen Trehazolins (siehe Tabelle 24). Diese Aussage beruht allerdings auf indirekter Evidenz, da es bislang nicht möglich war, die die Konzentration aktiven Trehazolins in der Hämolymphe zu messen.

Da die Heuschrecken Trehazolinlösung aus Pipetten quantitativ aufnehmen, besteht die Möglichkeit, die Substanz oral zu verabreichen und damit bei Experimenten, in denen dies kritisch ist, den Injektionsstress zu vermeiden. Diese Art der Applikation kann für manche Experimente nützlich sein, insbesondere, wenn Metabolite analysiert werden sollen, deren Stoffwechsel durch Stress beeinflusst wird. Um die orale Gabe von Trehalaseinhibitoren für Experimente optimal nutzen zu können, wäre es jedoch nötig zu prüfen, ob die Dosen auf diese Weise so sicher zu quantifizieren sind wie bei Injektionen.

Die Frage, ob Trehalaseinhibitoren als Insektizide eingesetzt werden können, muss wohl negativ beantwortet werden, da diese Substanzen sehr teuer sind und derzeit nur in mg-Mengen (Validoxylamin A) oder gar nicht (Trehazolin) kommerziell angeboten werden. Validoxylamin ist zudem recht labil, es wird bei -20°C gelagert und verliert bei Temperaturen oberhalb von 0°C an Aktivität (eigene erste Beobachtungen).

4.3 Langzeiteffekte von Trehazolin auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von Locusta

Effekte von Trehalaseinhibitoren wie Validoxylamin A und Trehazolin sind von mehreren Autoren beschrieben worden (Übersicht und Zitate in Wegener et al. 2003). Jedoch ist relativ wenig über die Wirkung auf Trehalase als das Zielmolekül dieser Inhibitoren in den Versuchstieren bekannt und Informationen über Langzeiteffekte auf die verschiedenen Trehalaseformen fehlten völlig.

Die Injektion von 20µg Trehazolin hatte starke Auswirkungen auf das Verhalten der Heuschrecken und auf die Aktivität der Trehalase. Die Tiere zeigten nur geringe Aktivität und nahmen weniger Futter als gewöhnlich. Dies ist vermutlich darauf

zurückzuführen, dass die „vergifteten“ Tiere die aufgenommenen Kohlenhydrate nicht normal verwerten konnten, da die Hemmung der Trehalaseaktivität die Produktion von Glucose aus Trehalose blockiert, die lebensnotwendig zu sein scheint (Wegener et al. 2003). Hemmung der Trehalase verhindert jedoch nicht die Synthese von Trehalose aus Glucose, wie von Kono et al. (1995) mit markierter Glucose in Schmetterlingslarven (*Mamestra*) gezeigt wurde. Auch meine Befunde (siehe 3.1 und 4.1) deuten auf diese Tatsache hin. In unserem Labor wurde beobachtet, dass mit Trehazolin vergiftete *Locusta* ihren Stoffwechsel auf erhöhte Fettverbrennung umschalten (unveröffentlicht).

Die Aktivitäten sämtlicher Trehalaseformen in der Flugmuskulatur von *Locusta* zeigten keine Alterungseffekte in den 30 Tagen des Experiments. Die Veränderungen der Trehalaseaktivitäten der Flugmuskulatur der mit Trehazolin injizierten *Locusta* müssen also dem Trehalaseinhibitor zugeschrieben werden. Diese Veränderungen waren dramatisch, lang andauernd und zeigten einen Verlauf, der Hinweise auf eine Beziehung zwischen der *overten* und der *latenten* Form der Trehalaseaktivität gibt.

Der zeitliche Verlauf der gesamten Trehalaseaktivität nach der Injektion des Trehalaseinhibitors folgte einer einfachen und typischen Kurve, in der einem sehr steilen Abfall eine längere Phase minimaler Aktivität folgt. Zwischen den Tagen 4 und 10 war die gesamte Aktivität der Trehalase zwischen 82% bis maximal 93% gehemmt. Anschließend kehrte die Aktivität langsam zum Kontrollwert zurück.

Allerdings ist die gesamte Trehalaseaktivität kein einfacher Parameter, sondern die Summe aus *overter* und *latenter* Trehalaseaktivität. Werden diese beiden Komponenten einzeln dargestellt (siehe Abbildung 29 und 30), so wird deutlich, dass sie verschiedenen Zeitverläufen folgen und die scheinbar einfache Kurve der Gesamtaktivität vermutlich eine dynamische Beziehung zwischen den Komponenten verbirgt. Die *overt* Trehalaseaktivität erreichte sehr schnell ein frühes Minimum, stieg dann jedoch auf ein vorübergehendes plateauartiges Maximum (zwischen Tag 5 und 9), während die *latente* Trehalaseaktivität ein korrespondierendes Minimum erreichte. Dies deutet an, dass die vorübergehend erhöhte *overt* Trehalaseaktivität zu Lasten der *latenten* Trehalase geht und dass deshalb die latente Trehalase als Vorläufer oder Speicherform der *overten* Trehalaseaktivität interpretiert werden könnte. *Latente* Trehalase hatte offenbar zunächst keinen Kontakt mit dem Inhibitor, wurde dann jedoch (im Sinne unserer Hypothese) in die *overt* Trehalase umgewandelt und blockiert.

Wir deuten also *overt*e Trehalase als Trehalaseform, die für den Inhibitor in der Hämolymphe zugänglich ist, wohingegen die *latente* Form durch Membranstrukturen vor dem Trehalaseinhibitor geschützt wird. Trehalaseinhibitoren wie Validoxylamin A und Trehazolin sind der Trehalose strukturell sehr ähnlich und wirken als kompetitive Inhibitoren mit ungewöhnlich hoher Affinität für Trehalase, weil sie vermutlich den Übergangszustand der Trehalose während der Katalyse imitieren (Ando et al. 1995). In unserem Labor wurde gezeigt, dass Trehalase aus der Flugmuskulatur von *Locusta* ein membrangebundenes Glykoprotein ist (Schlöder, Müller, Wegener unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Tatsache ist bedeutsam, da die Flugmuskulatur und andere Organe von *Locusta* offenbar keinen Transporter für Trehalose und strukturell ähnliche Trehalaseinhibitoren besitzen und diese damit sehr wahrscheinlich nicht ins Zellinnere gelangen können. Zuckerreste von Glykoproteinen die an die Plasmamembran gebunden sind, zeigen stets zum extrazellulären Raum. Dies deutet darauf hin, dass die durch Trehazolin hemmbare Trehalase so in der Plasmamembran orientiert ist, dass ihr aktives Zentrum mit der Hämolymphe Kontakt hat, wo sowohl Substrat als auch Inhibitor vorhanden sind. Die Ergebnisse dieses Experiments wären also mit der Hypothese, dass die Kontrolle der Trehalaseaktivität durch Translokation erfolgt, vereinbar.

Eine interessante Frage, deren Beantwortung allerdings den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte, ist die nach dem Mechanismus der Regeneration der Trehalaseaktivität in der zweiten Hälfte des Experiments. Möglich wären Abdissoziation des Inhibitors von der Trehalase und dessen Ausscheidung (bzw. Inaktivierung) und/oder Neusynthese des Enzyms. Leider ist noch nicht bekannt wie lange nach Injektion das Trehazolin in der Hämolymphe aktiv bleibt. Diese Information würde helfen, die Ergebnisse besser zu deuten. Es ist durchaus möglich, dass durch Trehazolin vergiftete Trehalase nur durch Neusynthese regeneriert werden kann. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung geschützt, dass mit Trehazolin versetzte (gehemmte) Trehalase nicht durch Dialyse reaktiviert werden konnte (siehe Tabelle 5).

4.4 Effekte von Flug auf die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Heuschrecken, denen Trehazolin injiziert worden war

Alle drei Experimente, in denen Dosis und Wirkdauer von Trehazolin variiert worden waren (10µg Trehazolin, 30 Minuten und 16 Stunden Wirkzeit; 20µg Trehazolin und 50 Minuten Wirkzeit) zeigten, dass zweimal 5 Minuten Flug zu signifikanten Änderungen der Trehalaseaktivität in manchen Fraktionen der Flugmuskulatur führte. Am deutlichsten und auffälligsten war die durch Flug bewirkte Verringerung der *latenten* Trehalaseaktivität, die in allen drei Versuchen auftrat. Wie schon im Ergebnisteil diskutiert wurde, ist dieser Befund mit der Translokationshypothese (reversibler Vesikeltransport) vereinbar. Er ist jedoch kein Beweis für einen Vesikeltransport, da das Ergebnis auch anders gedeutet werden kann. So könnte eine durch Flug bedingte höhere Dynamik des Hämolympflusses mehr Inhibitor an das aktive Zentrum der Trehalase spülen, so dass eine stärkere Hemmung der Trehalase resultieren könnte, ohne dass das Enzym seine zelluläre Position verändert hätte. Sehr wahrscheinlich ist diese Deutung aus zwei Gründen allerdings nicht. (1) Sie vermag nicht zu erklären, an welche Strukturen die (in vivo) *latente* Trehalase gebunden sein könnte, die ja den Hauptteil der gesamten Trehalaseaktivität ausmacht, aber im ruhenden Muskel vom Inhibitor auch bei langer Wirkdauer schlechter erreicht wird als im arbeitenden Muskel. (2) Es ist schon früher in unserer Arbeitsgruppe gezeigt worden, dass in der Flugmuskulatur von Heuschrecken, die 5 Minuten geflogen waren und erst danach eine Injektion von Trehazolin erhielten, nach 6 Stunden Einwirkzeit des Inhibitors die Gesamtaktivität der Trehalase (d.h. *overt* plus *latente*) viel stärker reduziert war als in Tieren, denen ebenfalls Trehazolin injiziert worden war, die aber nicht zuvor geflogen waren (Schlöder 1998).

Eine weitere Deutungsmöglichkeit ist noch unwahrscheinlicher. Sie beruht auf der Annahme, dass Muskelkontraktionen die Permeabilität der Zellmembranen für Trehalose, und damit auch für Trehazolin, erhöhen würde, und so die verstärkte Hemmung einer intrazellulären Form der Trehalase bewirken könnte. Dies ist deshalb unwahrscheinlich, weil bisher kein Membrantransport für Trehalose in *Locusta* nachgewiesen wurde und Trehalase ein Glykoprotein ist, also Domänen besitzt, die zum Zelläußeren oder in das Lumen von zellulären Membransystemen

zeigen. Von einer erhöhten Permeabilität für Trehalose könnte folglich nur Trehalase aktiviert werden, die an intrazelluläre Membranen gebunden ist, wobei aber die Trehalose zwei Membranen durchdringen müsste, um an das Enzym zu gelangen. Ein solcher Mechanismus erscheint sehr kompliziert und physiologisch wenig sinnvoll. Zudem dürfte er große Regulationsprobleme aufwerfen. Eine Methode, die Hemmung der *latenten* Form der Trehalase in der Flugmuskulatur durch Trehazolin unabhängig von Flugaktivität zu verstärken, wäre hier günstig. Injektion von Insulin in Heuschrecken scheint die Hemmung der latenten Trehalase zu verstärken, ohne dass die Tiere geflogen sind (siehe Abschnitte 2.11.2, 3.5.1 und 4.5).

4.5 Effekte von Insulin auf die Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur

4.5.1 Allgemeines zu Insulin und Insulin-ähnlichen Peptiden in Insekten

Insulin hat für die biologische, biomedizinische und klinische Forschung sowie für die Krankenversorgung herausragende Bedeutung. Verlust von physiologischen Insulinwirkungen (Diabetes mellitus) führen zu schweren chronischen Leiden, die einhergehen mit Störungen des Stoffwechsels von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen (Übergewicht, Fettleibigkeit) sowie des Herz-Kreislaufsystems (Infarkte, Störungen der Mikrozirkulation, Retinopathien, Gewebnekrosen), aber auch des Nervensystems (Neuropathien), die die betroffenen Patienten, aber insgesamt auch die Gesellschaft insgesamt erheblich belasten, insbesondere da sie in Ländern ohne Nahrungsmangel in der Form des Diabetes Typ II epidemische Ausmaße annehmen.

Insulin ist essentiell an der Regulation des Blutzuckerspiegels und vieler anderer physiologischer Prozesse beteiligt ist. Absoluter Mangel an Insulin (Diabetes Typ I) führt unbehandelt unweigerlich in kurzer Zeit zum Tode.

Bei Säugetieren wird Insulin in den Langerhans-Inseln des Pankreas (= Bauchspeicheldrüse) von den β -Zellen, welche ca. 70% der Inselzellen ausmachen, produziert. Beim Menschen beträgt die tägliche Ausschüttung ca. 1,5 Milligramm Insulin (Pschyrembel 1998; Mutschler et al. 2001). Der Hauptgegenspieler des Insulins, das Glucagon, wird in den α -Zellen der Bauchspeicheldrüse produziert.

Insulin wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) als inaktives Präpro-Insulin synthetisiert und ins Lumen des ER transportiert. Dieses Vorläufermolekül besitzt neben der A- und der B-Kette zusätzlich eine Signalsequenz und das die A- und B-Kette verbindende C-Peptid. Durch Abspaltung der Signalsequenz und Ausbildung von Disulfidbrücken entsteht Proinsulin. Wird das C-Peptid herausgeschnitten, so resultiert die aktive Form des Insulins, welche beim Menschen und anderen Säugern aus der A-Kette (21 Aminosäuren) und der B-Kette (30 Aminosäuren) besteht, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Zusätzlich existiert eine weitere Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette. Insulin wird bis zur Sekretion in Vesikeln in den β -Zellen gespeichert.

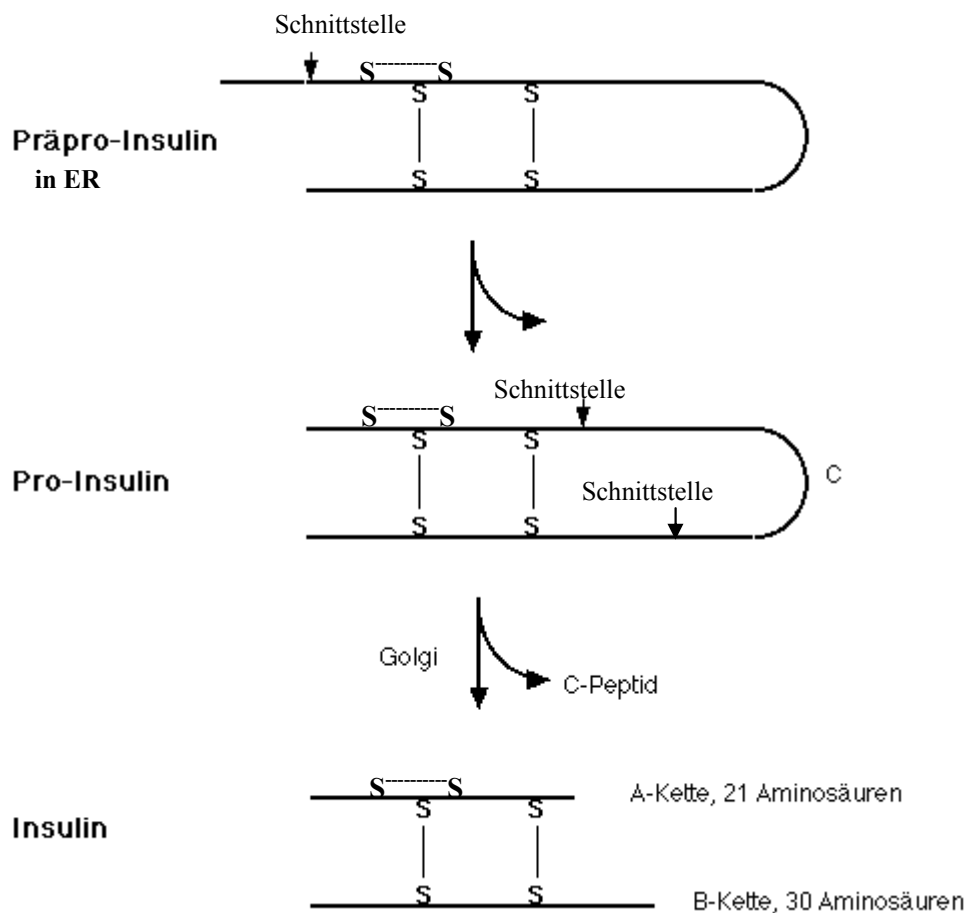


Abbildung 45. Entstehung des Insulins aus Präpro-Insulin im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat der β -Zellen des endokrinen Pankreas. Die kleinen Pfeile zeigen die Schnittstellen an.

(Quelle: <http://ntbiouser.unibe.ch/Trachsel/teaching/Hormone/insulin.gif>)

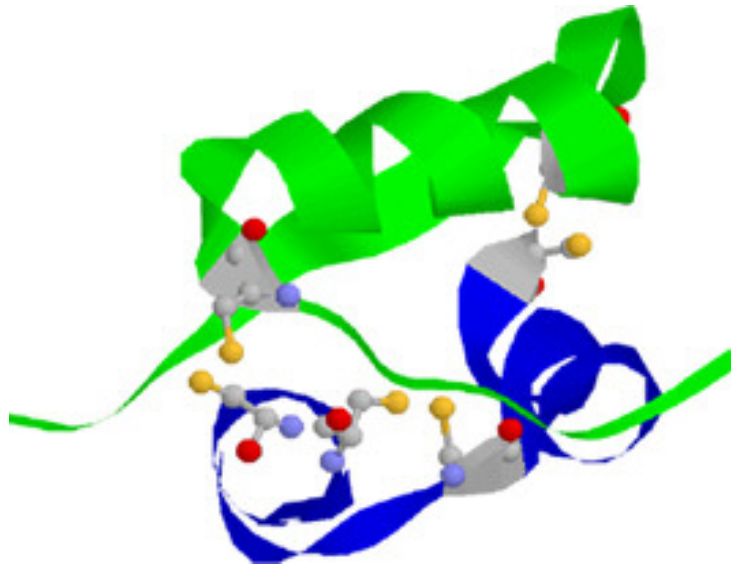


Abbildung 46. Raumstruktur von Insulin. Die Abbildung zeigt die A-Kette (blau) und die B-Kette (grün), die über Disulfidbrücken (gelb) miteinander verbunden sind. Zusätzlich ist die innerhalb der A-Kette gelegene Disulfidbrücke (gelb) zu erkennen. Die an der Disulfidbrückenbindung beteiligten Cysteine sind grau, die funktionellen Gruppen in rot (Sauerstoff) und hellblau (Stickstoff) dargestellt. (Quelle: Protein Data Bank, bearbeitet mit Rasmol)

Die Bedeutung des Insulins für die biologische Erkenntnis ist immens. Dies kann man auch daran ermessen, dass für die Erforschung mehrere Nobelpreise vergeben wurden. 1923 erhielten Banting und McLeod den Preis für die Entdeckung und Isolierung des antidiabetischen Wirkprinzips, 1958 ging der Preis an Sanger für die Aufklärung der Aminosäuresequenz und 1977 an Yalow für den Radioimmunassay zum Nachweis von Insulin.

4.5.2 Insuline in Insekten

In Insekten gibt es insulinähnliche Peptide (ILPs = insulin-like peptides), von denen viele strukturell sehr große Ähnlichkeit mit Säugerinsulinen aufweisen (siehe Wu und Brown 2006). Insbesondere ist die Lage der Disulfidbrücken hoch konserviert, so dass die Raumstrukturen sehr ähnlich sein dürften wie aus Abbildung 47 zu ersehen ist, in der die Primärstrukturen und die Lage der Disulfidbrücken der Insuline von Rind und Mensch, sowie von Locusta-insulin-related peptide (LIRP) dargestellt sind.

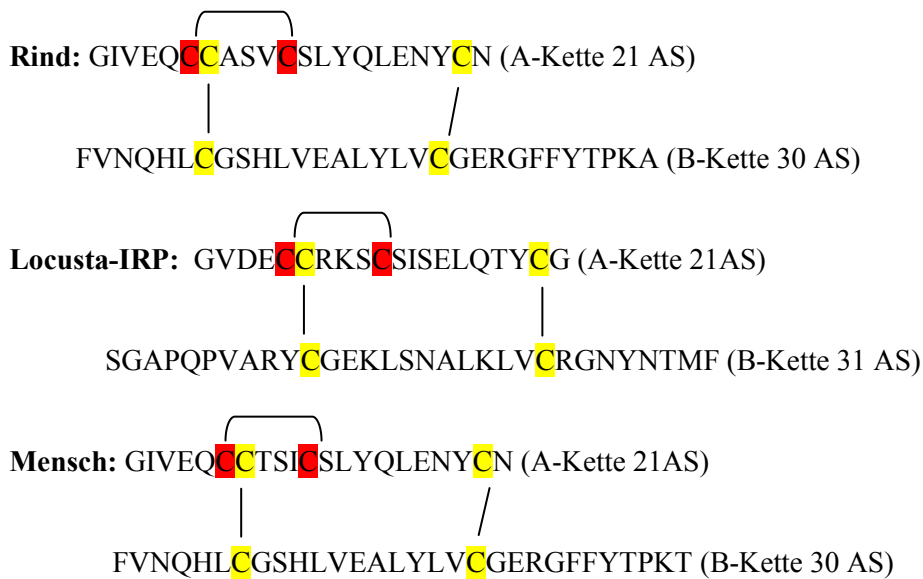


Abbildung 47. Vergleich der Strukturen von Locusta-IRP (= *Locusta*-insulin-related-peptide = LIRP) mit Insulin vom Rind und vom Menschen. Zwischen den rot markierten Cysteinen sind Disulfidbrücken innerhalb der A-Kette ausgebildet, zwischen den gelb markierten Cysteinen sind Disulfidbrücken zwischen der A- und der B-Kette ausgebildet.

Das erste bei Insekten entdeckte ILP (= insulin-like peptide) stammte aus *Bombyx mori* und wurde als Bombyxin oder kleines Prothorakothropes Hormon (PTTH II) bezeichnet (Übersicht bei Ishizaki 2004). Mit molekularbiologischen Methoden wurden in den letzten Jahren zahlreiche weitere ILPs entdeckt, deren physiologische Wirkungen jedoch noch weitgehend unbekannt sind (siehe unten). Heute ordnet man Insulin einer großen Familie von Peptiden zu, zu denen auch die ILPs und die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (= Insulin-like growth factors, IGFs) gehören.

Das zweite der entdeckten ILPs stammte aus *Locusta migratoria* und wurde als locust-insulin-related peptide (LIRP) bezeichnet (Lagueux et al. 1990; Hetru et al. 1991). Das Gen für LIRP produziert zwei verschiedene Transkripte, von denen eines im Gehirn (also als Neurohormon) und das andere in allen Geweben (Wachstumsfaktor?) exprimiert wird (Kromer-Metzger und Lagueux 1994). Die Synthese im Gehirn erfolgt in neurosekretorischen Zellen der Pars intercerebralis (Goltzené et al. 1992), deren Axone zu den Corpora cardiaca laufen, wo das LIRP gespeichert wird.

Die Synthese und Struktur von LIRP ähnelt der von Säugerinsulinen. Es wird aus einem 145 AS Vorläufer gebildet und besteht aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren und einer B-Kette mit 31 Aminosäuren. Die Positionen (A-A, A-B, A-B) der Disulfidbrücken sind wie bei allen Insulinen sehr stark konserviert und entsprechen dem Säugerschema (siehe Abbildung 47).

4.5.3 Wirkung von Insulin in Insekten

Durch die Entwicklung gentechnischer Methoden hat die Insulinforschung bei Insekten erheblichen Aufschwung erfahren. Unter den Insekten ist *Drosophila* als Studienobjekt besonders populär (Wu und Brown 2006). Bei *Drosophila* haben ILPs (hier auch DILPs genannt) äußerst vielfältige Wirkungen, besonders auf Wachstum, Entwicklung, Fruchtbarkeit und Lebensalter. Bislang ist sehr wenig über die Stoffwechselwirkungen bekannt, die uns besonders interessieren. Ich will mich im Folgenden auf die Diskussion der Stoffwechselaspekte und die zugehörigen Signalwege beschränken. Es ist bislang nicht möglich, ein einheitliches Bild der physiologischen Funktionen der Insulin-ähnlichen Peptide für Insekten zu entwerfen, da sehr viele ILPs existieren und ihre Wirkungen von der Spezies und dem Entwicklungsstadium abhängen. Es wird jedoch deutlich, dass ILPs bei Insekten Stoffwechseleffekte haben können, die den Insulinwirkungen bei Säugern entgegengesetzt sind. So wird Insulin in Säugern als wichtigstes (von manchen Autoren gar als einziges) Speicherhormon charakterisiert, das die Aufnahme von Blutglucose in die Gewebe und die Speicherung von Glykogen fördert, aber auf den Abbau von Fetten eine hemmende (antilipolytische) Wirkung hat, ebenso auf den Abbau von Proteinen. Bei Insekten dagegen ist die Mobilisierung von Reserven durch ILPs beschrieben worden. Das Bombyx-ILP (Bombyxin II) zum Beispiel hatte nach Injektion in Seidenraupen (deren Kopf abgeschnürt war) die Wirkung, den Kohlenhydratspeicher Trehalose zu vermindern und die Aktivität des Enzyms Trehalase zu vermehren (Satake et al. 1997). Der Abbau von Glykogen und die Glykogenphosphorylase im Fettkörper wurden ebenfalls stimuliert. Die Autoren vermuteten, dass die Bombyxin-(Insulin-) Wirkung nicht auf Proteinebene, sondern an der Genexpression angreift. In den adulten Tieren jedoch hatte das Bombyxin II keine Stoffwechselwirkung (Satake et al. 1999). Die gentechnische Ausschaltung von ILP-produzierenden Zellen im Gehirn von *Drosophila* (Larven) führte dagegen

zu einer Erhöhung von Trehalose und Glucose in der Hämolymphe (Rulifson et al. 2002, Broughton et al. 2005), was für einen Insulin-ähnlichen Effekt von DILP spricht.

Diese Beispiele zeigen, dass es zurzeit weder möglich ist, die Ergebnisse an Säugetieren, noch die an anderen Insekten ohne weiteres auf *Locusta* zu übertragen. Letzteres gilt insbesondere für *Drosophila*, da deren Trehalase, anders als in Heuschrecken, an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist.

Eine besondere Schwierigkeit, die Ergebnisse der Injektionen von Wirkstoffen in die Hämolymphe zu deuten, besteht darin, dass die injizierten Substanzen gegenläufige Reaktionen im Körper auslösen können, so dass die Effekte der injizierten Wirkstoffe überdeckt werden. Das scheint auch für Insulin und ähnliche Peptide zu gelten. So konnten Loughton und Orchard (1981) nach Injektion von Extrakten des Drüsenlappens der Corpora cardiaca von *Locusta* nur dann einen Anstieg im Kohlenhydratgehalt der Hämolymphe nachweisen, wenn sie den Tieren 3 bis 4 Stunden zuvor den Kopf abgeschnürt hatten. Dies weist auf mindestens einen hypoglykämischen Faktor aus dem Kopf hin, der als Reaktion auf die Injektion von Corpora cardiaca-Extrakt und/oder die dadurch ausgelöste Hyperglykämie freigesetzt wurde.

In einer späteren Arbeit an Schaben und Heuschrecken zeigten Barrett und Loughton (1987), dass Rinderinsulin (Injektion von wenigen Nanogramm) den Kohlenhydratgehalt der Hämolymphe in „geschnürten“ (neck-ligated) *Locusta* schnell (in 10 Minuten) und deutlich erniedrigt (ca. -50%). Der Effekt war mit „ungeschnürten“ Heuschrecken nicht nachweisbar. Einen ähnlichen Effekt hatten schon zuvor Moreau et al. (1982) beschrieben, die allerdings ungeschnürte Tiere verwendeten (Injektion von 4µg Insulin).

Die akute Wirkung von Insulin auf die Trehalaseaktivität von Wanderheuschrecken ist bislang nur von Schlöder (1998) untersucht worden, der (ebenfalls bei ungeschnürten Tieren) mit großen Insulindosen (12,5µg) eine signifikante Erhöhung der *overten* Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur nach 10 Minuten beobachtete. Der Effekt des Insulins war nach 30 Minuten nicht mehr nachweisbar.

Unsere Experimente mit Insulin plus Trehazolin zeigen sehr schön den Wert des Inhibitors, da mit ihm offenbar auch Trehalase erfasst werden konnte, die in vivo nach Translokation nur kurzfristig in *overter* Form vorlag. Wir vermuten, dass

Insulin die Translokation von trehalasehaltigen Vesikeln in die Plasmamembran kurzfristig stimuliert, vermutlich aber den Rücktransport nicht beeinflusst, so dass der Insulineffekt letztlich zu Lasten der *latenten* Trehalase geht und als Verlust dieser Aktivitätsform nachweisbar wird. Auch bei der Insulinwirkung in Muskel- und Fettgewebe von Säugern wird eine basale reversible Translokation von GLUT-4 vermutet, wobei die Richtung vom Plasma in die Membran durch das Hormon stimuliert wird (Ishiki und Klip 2005).

Als wichtiges Ergebnis ist festzuhalten, dass durch Insulin unabhängig von Flugaktivität offenbar eine Umwandlung von *latenter* in *overt*e Trehalase stimuliert werden kann, die mit einer Vesikeltranslokation erklärbar wäre (siehe letzten Absatz). Bei den Versuchen war Insulin bis herunter zu einer Dosis von ca. 50ng pro Tier wirksam. Es gibt aber Hinweise, dass nach Entfernung des Darmtraktes Insulin in noch geringeren Dosen wirksam sein könnte (Schumann 2007, persönliche Mitteilung). Ob Zellen des Darmtraktes von *Locusta* einen Antagonisten des Insulins produzieren oder Insulin schnell inaktivieren ist nicht bekannt. Diese Frage könnte durch Experimente beantwortet werden, bei denen isolierte Halbthoraces mit Insulin plus Trehalaseinhibitor superfundiert werden.

Ein Problem bei der Bewertung der Insulin-Wirkung bei *Locusta* liegt darin, dass kein authentisches LIRP verfügbar war, sondern ein strukturell sehr ähnliches Molekül genutzt werden musste. In einem solchen Fall kommt der Affinität der Wirksubstanz zu den Zielstrukturen besondere Bedeutung zu. Nach Loughton und Tobe (1969) entspricht das mittlere Hämolympfvolumen von *Locusta* 21% des Körpergewichts. Wenn man das Hämolympfvolumen unserer Tiere mit 300μl pro *Locusta* und die Molekulare Masse von Insulin mit 5,8kDa ansetzt, so ergibt sich nach Injektion von 5μg Insulin eine maximale Hämolympfkonzentration von ca. 3×10^{-6} M, bei Injektion von 50ng von ca. 3×10^{-8} M.

Das Ergebnis des Insulin-Experiments kann die Translokationshypothese („Vesikelhypothese“) unserer Arbeitsgruppe stützen. Zusätzlich lassen die (bisher) bekannten Insulinwirkungen in Säugetieren Hypothesen zum Regulationsmechanismus der Trehalase zu. In der Zellmembran von Säugermuskeln verursacht die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor die Translokation von Glucosetransportern (GLUT-4) in die Plasmamembran, so dass Glucose verstärkt in die Muskulatur aufgenommen werden kann. Auch in der Flugmuskulatur von *Locusta* wäre solch ein Mechanismus denkbar. Da die Tiere im Anfangsstadium des

Fluges vor allem Kohlenhydrate verwerten und wie gezeigt, die *overt* Trehalaseaktivität ansteigt, die *latente* Aktivität hingegen erniedrigt ist, könnte durch Hydrolyse von Trehalose mehr Glucose zur ATP-Gewinnung bereitgestellt werden. Bisher ist noch kein Glucosetransporter in der Flugmuskulatur von *Locusta* bekannt, jedoch wäre seine Existenz zu postulieren, damit die erzeugte Glucose in die Zelle transportiert werden kann.

4.6 Effekte von Flug und Trehazolin in Kombination mit Wortmannin oder Insulin auf die Hämolymphezucker sowie die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von *Locusta*

4.6.1 Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Wortmannin

Wie unter bereits unter 4.5.3 diskutiert wurde, hat Insulin deutliche Effekte auf die *latente* Trehalaseaktivität. Da die Translokation des GLUT-4 in Säugermuskeln durch die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor ausgelöst wird, und die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) maßgeblich an dieser Translokation beteiligt ist, wäre dieser Mechanismus auch in *Locusta* denkbar. Wortmannin, ein selektiver Inhibitor der PI3K (Powis et al. 1994), hemmt diese Translokation (siehe Abbildung 48), indem es sich an die ATP-Bindungsstelle der PI3K anlagert (Walker et al. 2000). Es könnte möglicherweise die Effekte von Insulin abschwächen. Bisher sind Effekte von Wortmannin auf die Flugmuskulatur in *Locusta* nicht bekannt. Sie wurden daher an intakten Flug- und Ruhetieren untersucht.

Während die Injektion von Insulin in Heuschrecken ohne Kopf in deren Flugmuskulatur zum Verlust von *latenter* Trehalaseaktivität führt (sofern Trehazolin vorhanden ist), hat Wortmannin die Tendenz die *latente* Trehalase (in intakten Heuschrecken) zu stabilisieren. Dies weist darauf hin, dass Insulin in der Heuschrecke seine Wirkung auf die Trehalaseaktivität über einen Signalweg erreicht, an dem die PI3-Kinase beteiligt ist. Das Ergebnis ist mit der Vesikelhypothese vereinbar. Es wäre jedoch wünschenswert, ähnliche Versuche mit inkubierten Muskelpräparaten durchzuführen, um Effekte anderer Gewebe auszuschalten.

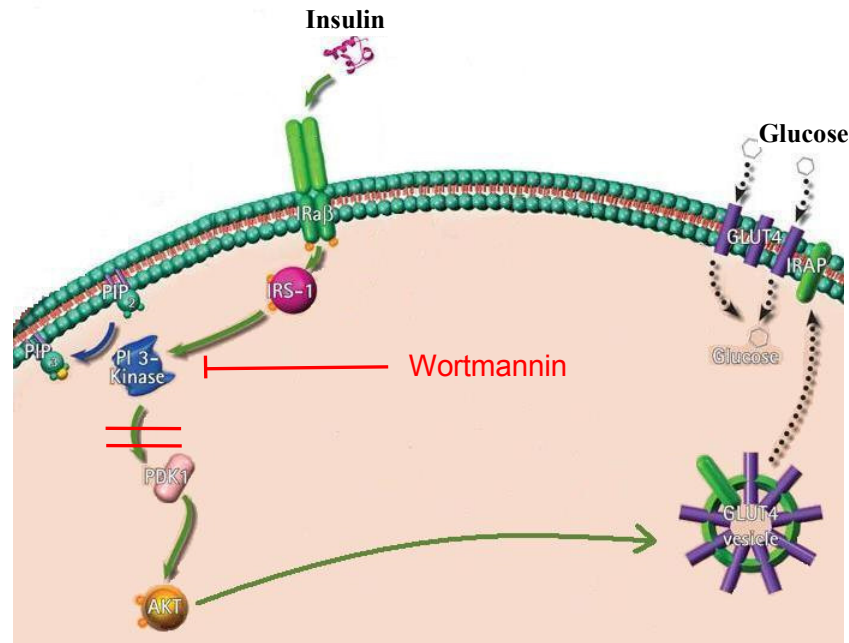


Abbildung 48. Translokation des GLUT-4 in die Zellmembran nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor sowie Hemmung der PI3-Kinase durch Wortmannin (bearbeitet nach Calbiochem®).

4.6.2 Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Insulin

Für die Experimente mit Insulin wurde den Heuschrecken der Kopf entfernt, um zu verhindern, dass Neurohormone vom Gehirn, die dem Insulin entgegenwirken können, in den Körper der Versuchstiere gelangen. Dass Tiere ohne Kopf fliegen können, ist für jemanden, der mit der Physiologie von Insekten nicht vertraut ist, höchst überraschend. Es zeigt zunächst, dass für die koordinierte Bewegung der Flügel nicht das Gehirn verantwortlich sein kann. In der Tat sind die Neuronen, die das Muster der Muskelaktivitäten für den Flug erzeugen (flight motor pattern) in den Thorakalganglien lokalisiert und vom Gehirn weitgehend unabhängig (siehe Burrows 1996). Die notwendige Sauerstoffversorgung der Muskeln ist ebenfalls ohne den Kopf möglich, da Insekten über Stigmen und das Tracheensystem atmen. Die Versorgung mit Flugs substrat erfolgt endogen und über die Hämolymphe und kann wegen des offenen Kreislaufes auch nach Verlust des Kopfes aufrechterhalten werden.

Bei diesen Versuchen wurden Heuschrecken ohne Kopf mit Trehazolin mit und ohne Insulin injiziert und dann ruhen oder ruhen und 5 Minuten fliegen gelassen. Die

Einwirkzeit war stets 30 Minuten, bei Flugtieren wurden die Heuschrecken von Minute 25 bis Minute 30 zum Flug stimuliert.

Die Ergebnisse deuten an, dass Insulin bei Ruhetieren die Translokation von *latenter* Trehalase in die Zellmembran beschleunigt (siehe Abbildung 41). Auf die *latente* Trehalaseaktivität der Fluchttiere hingegen hat das injizierte Insulin keinen signifikanten Effekt, da auch Flug allein eine ähnliche Wirkung hat. Das Experiment zeigt klar, dass die Wirkung von Flug auf die Trehalaseaktivität unabhängig ist vom Gehirn und damit auch unabhängig von Insulin aus dem Gehirn. Es ist eine interessante, aber offene Frage durch welche Signale die Trehalase der Flugmuskulatur bei Beginn eines Fluges aktiviert wird.

4.7 Wirkung von Trehazolin auf die Trehalaseaktivitäten in verschiedenen Organen von Locusta

Es ist gut gesichert, dass in der Flugmuskulatur zwei verschiedene Trehalaseformen, die *overten* und die *latente*, existieren. Trehalase kommt jedoch auch im Darm, Gehirn und der Sprungmuskulatur der Wanderheuschrecken vor. Aus diesem Grund war es interessant zu erfahren, ob alle Gewebetrehalasen durch Trehazolin inhibiert werden und ob es Hinweise auf die Existenz *latenter* Trehalase auch in anderen Organen gibt.

Die Flugmuskulatur muss während Phasen sehr unterschiedlicher Belastung ausreichend mit Substrat versorgt werden. Diese Versorgung erfolgt zum Beispiel in den ersten Minuten eines Fluges durch Glucose, welche nach unserer Hypothese von der *overten* Trehalase der Flugmuskulatur bereitgestellt wird. Ruht eine Heuschrecke, benötigt sie entsprechend weniger Energie, d.h. es muss weniger Glucose erzeugt werden, da diese sonst bis zu toxischen Konzentrationen akkumulieren würde. Die Anpassung an diesen wechselnden Energiebedarf wird durch die Regulation der Trehalaseaktivität gewährleistet. Auch die Trehalase der Sprungmuskulatur könnte wie die Trehalase der Flugmuskulatur reguliert sein, da sie ebenfalls unterschiedlichen Belastungen ausgesetzt ist. Der Anteil von *latenter* Trehalase scheint jedoch in der Sprungmuskulatur (wenn sie dort existiert) wesentlich geringer als in der Flugmuskulatur zu sein.

Beim Darm und Gehirn von *Locusta* handelt es sich um Organe, die im Gegensatz zur Muskulatur vermutlich einen relativ konstanten Energiebedarf besitzen. Im Darm dient die Trehalase sicherlich der Verdauung von Trehalose in der Nahrung. Trehalase kommt jedoch offenbar auch in den Därmen von Insekten vor, die vermutlich keine Trehalose aufnehmen. Es wird vermutet, dass in diesen Fällen die Trehalase im Darmlumen zur Hydrolyse von Trehalose dient, die aus der Hämolymphe in den Darm diffundiert ist. Da in der Hämolymphe die Konzentration sehr hoch ist, würde in den Darm diffundierte Trehalose verloren gehen. Dies könnte durch Hydrolyse von Trehalose und Aufnahme der entstehenden Glucose in den Körper verhindert werden. Aus dieser Glucose könnte dann im Fettkörper wieder Trehalose synthetisiert werden, so dass die Glucosekonzentration in der Hämolymphe gering gehalten würde. Um diese beiden Funktionen zu erfüllen, wäre keine Aktivitätskontrolle der Darmtrehalase notwendig. Der Darm ist kein homogenes Organ. Ein Teil der Trehalase des Darms ist daher wahrscheinlich mit anderen Zellen als dem Darmepithel assoziiert. Es bedürfte einer ausführlichen Analyse der Verhältnisse, die jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit erfolgen konnte.

Die Aktivität der Trehalase im Gehirn ist gering und auch bei diesem Organ ist nicht klar, welchen Zellen die Aktivität zuzuordnen ist. Es ist allerdings für inkubierte Ganglien der Wüstenheuschrecke gezeigt worden, dass Glucose ein viel besseres Substrat ist, als Trehalose (Strang und Clement 1980). Die Frage, ob und wie die Aktivität der Trehalase des Nervengewebes reguliert wird, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

4.8 Ausblick

Die Experimente dieser Arbeit geben Hinweise auf die Wirkung von Trehalaseinhibitoren des Trehazolintyps auf verschiedene Formen der Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur von *Locusta*. Weiterhin sind sie vereinbar mit der Arbeitshypothese, dass die Aktivitätsregulation der Trehalase in der Flugmuskulatur durch reversible Translokation bewirkt wird. Trehalase, die in Vesikeln, mit dem aktiven Zentrum zum Vesikellumen hin orientiert vorliegt, wird als inaktiv (*latent*) angesehen, da sie vom Substrat in der Hämolymphe abgeschirmt ist. Durch Verschmelzen dieser Vesikel (Exocytose) gelangt die Trehalase in die Plasmamembran und ragt hier mit dem aktiven Zentrum in die Hämolymphe, so dass sie ihr Substrat spalten kann. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass Trehalase ein Glykoprotein ist. Weiter kann vermutet werden, dass an der Translokation insulinähnliche Peptide (ILPs) regulierend beteiligt sind. Die Herausforderung ist nun, mit direkteren Methoden, die Vermutung einer weiteren „Insulinfunktion“ und eines neuartigen Mechanismus der reversiblen Aktivitätsregulation zu prüfen und die beteiligten Signalwege für die Kontrolle der Translokation in ruhenden und fliegenden Heuschrecken zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Flugfähige Insekten sind äußerst leistungsfähige Tiere. Ihre Flugmuskulatur ist das Gewebe mit der höchsten ATP-Umsatzrate im Tierreich. Der hohe Energieumsatz ist möglich durch einen vollständig aeroben Stoffwechsel der Flugmuskulatur, der durch die effiziente Sauerstoffversorgung über das Tracheensystem gewährleistet wird. Andererseits haben Insekten einen offenen Blutkreislauf, d.h. ihre Gewebe werden nicht über Kapillaren mit Substraten versorgt, sondern von der Hämolymphe umspült, die daher eine hohe Konzentration an energieliefernden Substraten haben muss. Als schnell verfügbares Substrat nutzen Wanderheuschrecken bei Beginn eines Fluges als Hauptsubstrat Trehalose, die in hoher Konzentration als Hämolymphezucker vorliegt (20 bis 40mal höhere Konzentration als Glucose). Trehalose ist, anders als Glucose, ein nicht-reduzierender Zucker und daher nicht toxisch. Allerdings muss das Disaccharid Trehalose zu Glucose hydrolysiert werden, bevor sie im Zellstoffwechsel verwertet werden kann. Diese Funktion erfüllt die Trehalase (EC 3.2.1.28), ein Enzym, das membrangebunden ist und nach Zellfraktionierung in der Mikrosomenfraktion erscheint. Es ist schon lange offensichtlich, dass die Aktivität der Trehalase regulierbar sein muss und zwar reversibel (eine Eigenschaft, die für Hydrolasen ungewöhnlich ist), der Mechanismus ist allerdings bislang nicht klar, da alle üblichen Typen von Aktivitätsregulation nicht verwirklicht zu sein scheinen. Die meisten Autoren vermuten, dass die Regulation über den Transport des Substrats erfolgt. Ein Trehalasetransporter konnte allerdings bisher in der Flugmuskulatur von *Locusta* nicht nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit stelle ich Experimente vor, die dafür sprechen, dass Trehalase als Ektoenzym aktiv ist (*overt* Form), während eine inaktive Form (*latente* Form) in Vesikeln im Cytoplasma vorliegt und per Exocytose reversibel in die Plasmamembran transloziert werden kann. Für die Testung dieser Arbeitshypothese nutzte ich Trehazolin, einen sehr spezifischen Inhibitor der Trehalase, der äußerst fest und dauerhaft im aktiven Zentrum des Enzyms bindet. Dazu war es nötig, die Flugmuskulatur zu fraktionieren, um die Effekte von Trehazolin auf die verschiedenen Formen der Trehalase (gebunden, löslich, *overt*, *latent*) zu analysieren.

Mit der Arbeitshypothese vereinbar sind die folgenden Befunde

- (1) In die Hämolymphe injiziertes Trehazolin hemmt bevorzugt die *overt*e Trehalase und erst bei höheren Dosen und nach längerer Zeit die *latente* Form.
- (2) Trehazolin wirkt in hoher Dosis (50µg pro Tier) auch nach Verfütterung, allerdings stark abgeschwächt, da nach 24 Stunden ein signifikanter Effekt nur auf die *overt*e, aber nicht auf die *latente* Form sichtbar war.
- (3) In einem Langzeitversuch über 30 Tage führte die einmalige Injektion von 20µg Trehazolin zu einer schnellen Hemmung der *overt*en Trehalase, der eine verzögerte Hemmung der *latent*en Aktivität folgte. Der Zeitverlauf von Hemmung und Erholung spricht für eine Vorläufer-Produkt-Beziehung zwischen *latenter* und *overter* Form.
- (4) Flugaktivität der Tiere führt zu einer starken Verminderung der latenten Aktivität, falls Trehazolin in der Hämolymphe der Tiere vorhanden war.
- (5) Neuropeptide könnten die Translokation fördern. Insulin hat einen entsprechenden Effekt, der aber unabhängig ist von der Flugaktivität.
- (6) Der PI3-Kinasehemmstoff Wortmannin stabilisiert die *latente* Form der Trehalase.

Auch andere Organe als die Flugmuskulatur besitzen Trehalase, aber mit deutlich geringerer Aktivität. In der Sprungmuskulatur könnte auch eine *latente* Form vorhanden sein, für Darm und Gehirn ist das nicht wahrscheinlich.

6 Literatur

- Ando, O., Nakajima, M., Kifune, M., Fang, H., Tanzawa, K. (1995) Trehazolin, a slow, tight-binding inhibitor of silkworm trehalase. *Biochim. Biophys. Acta* 1244: 295-302
- Ando, O., Satake, H., Itoi, K., Sato, A., Nakajima, M., Takahashi, S., Haruyama, H., Ohkuma, J., Kionoshita, I., Enokita, R. (1991) Trehazolin, a new trehalase inhibitor. *J. Antibiot (Tokyo)*: 1165-1168
- Baker, P., Gewecke, M. (1981) The natural flight of the migratory locust *Locusta migratoria*, III. Wing-beat frequency, flight speed and attitude. *J. Comp. Physiol. B* 141: 233-237
- Becker, A., Schlöder, P., Steele, J.E., Wegener, G. (1996) The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52: 433-439
- Beenakkers, A.M. (1969) Carbohydrate and fat as a fuel for insect flight. A comparative study. *J. Insect Physiol.* 15: 353-361
- Beenakkers, A.M., Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, W.J.A. (1984) Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem.* 14: 243-260
- Bethge, P. (2004) Angst vor Schrecken. *Der Spiegel* 50: 200-202
- 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. B* 164: 11-15
- Burrows, M. (1996) The neurobiology of an insect brain, Oxford University Press
- Candy, D.J. (1974) The control of muscle trehalase activity during locust flight. *Biochem. Soc. Trans.* 2: 1107-1109
- Candy, D.J., Becker, A., Wegener, G. (1997) Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B: 497-512
- Caroll, N.V., Longley, R.W., Roe, J.H. (1956) The determination of glycogen in liver and muscle by the use of anthron. *J. Biol. Chem.* 220: 583-593
- Crabtree, B., Newsholme, E. (1975) Comparative aspects of fuel utilization and metabolism by muscle. In: Usherwood P.N.R (ed.) *Insect Muscle*. New York, Academic Press: 405-500
- Downer, R. (1979) Induction of hypertrehalosemia by excitation in *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* 25: 59-63
- Dreywood, R. (1946) Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18: 499

- Elbein, A.D. (1974) The metabolism of alpha,alpha-trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 227-256
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. (2003) New insights in trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R
- Gilby, A.R., Wyatt, S.S., Wyatt, G.R. (1967) Trehalase from the cockroach, *Blaberus discoidalis*: activation, solubilization and properties of the muscle enzyme and some properties of the intestinal enzyme. *Acta Biochim. Polon.* 14: 83-100
- Goltzené, F., Holder, F., Charlet, M., Meister, M., Oka, T. (1992) Immunocytochemical localization of Bombyx-PTTH-like molecules in neurosecretory cells of the brain of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Cell Tissue Res.* 269: 133-140
- Hetru, C., Li, K., Bulet, P., Lagueux, M., Hoffmann, J. (1991) Isolation and structural characterization of an insulin-related molecule, a predominant neuropeptide from *Locusta migratoria*. *Eur. J. Biochem.* 201: 495-499
- Hoyle, G. (1953) Potassium ions and insect nerve muscle. *J. Exp. Biol.* 30: 121-135
- Hunter-Jones, P. (1966) Rearing and breeding locusts in the laboratory. London, Anti-Locust Research Centre, London
- Ishiki, M., Klip, A. (2005) Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations and partners. *Endocrinology* 146: 5071-5078
- Ishizaki, H. (2004) Molecular characterization of the brain secretory peptides, prothoracicotropic hormone (PTTH) and bombyxin of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 80: 195-203
- Jutsum, A.R., Goldsworthy, G.J. (1976) Fuels for flight in *Locusta*. *J. Insect Physiol.* 22: 243-249
- Kammer, A.E., Heinrich, B. (1978) Insect flight metabolism. *Adv. Insect Physiol.* 13: 133-228
- Kono, Y., Takahashi, M., Matsushita, K., Nishina, M., Kameda, Y., Hori, E. (1994) Inhibition of flight in *Periplaneta americana* (Linn.) by a trehalase inhibitor, Validoxylamine A. *J. Insect. Physiol.* 40: 455-461
- Kono, Y., Takeda, S., Kameda, Y., Takahashi, M., Matsushita, K., Nishina, M., Hori, E. (1993) Lethal activity of a trehalase inhibitor, Validoxylamine A, and its influence on the blood sugar level in *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 28: 379-386
- Kono, Y., Takeda, S., Kameda, Y., Takahashi, M., Matsushita, K., Nishina, M., Hori, E. (1995) NMR analysis of the effect of Validoxylamine A, a trehalase inhibitor, on the larvae of the Cabbage Armyworm. *J. Pesticide Sci.* 20: 83-91

- Kono, Y., Tanaka, S., Hasegawa, E., Takahashi, M., Nishina, M., Matsushita, K. (1999) The role of trehalose in lipid mobilization of *Locusta migratoria*: effects of trehalase inhibitor, Validoxylamine A, on flight activity and hemolymph trehalose and lipid concentrations. *Entomological Science* 2: 449-456
- Krogh, A., Weis-Fogh, T. (1951) The respiratory exchange of the desert locust (*Schistocerca gregaria*) before, during and after flight. *J. Exp. Biol.* 28: 344-357
- Kromer-Metzger, E., Lagueux, M. (1994) Expression of the gene encoding an insulin-related peptide in *Locusta* (insecta, orthoptera). *Eur. J. Biochem.* 221: 427-434
- Lagueux, M., Wolff, L., Meister, M., Goltzené, F., Hoffmann, J. (1990) cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (insecta, orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur. J. Biochem.* 187: 249-254
- Loughton, B.G., Orchard, I. (1981) The nature of the hyperglycaemic factor from the glandular lobe of the corpus cardiacum of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 27: 383-385
- Loughton, B.G., Tobe, S.S. (1969) Blood volume in the African migratory locust. *Can. J. Zool.* 47: 1333-1336
- Matthews, J.R., Downer, R.G.H. (1974) Origin of trehalose in stress-induced hyperglycaemia in the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Can. J. Zool.* 52: 1005-1010
- Mentel, T., Duch, C., Stypa, H., Wegener, G., Müller, U., Pflüger, H. (2003) Central modulatory neurons control of fuel selection in flight muscle of migratory locust. *J. Neurosci.* 23: 1109-1113
- Moreau, R., Gourdoux, L., Lequellec, Y., Dutrieu, J. (1982) Endocrine control of hemolymph carbohydrates in *Locusta migratoria*: Comparison between effects of two endogenous hormonal extracts and effects of insulin and glucagon. *Comp. Biochem. Physiol.*: 669-673
- Müller, K. (1991) Die Trehalase aus der Flugmuskulatur der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*. Reinigung, Kinetik und Charakterisierung der Molekülstruktur, Wechselwirkungen mit Modellmembranen. Institut für Zoologie. Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Schäfer-Korting, M. (2001) Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Nakano, M., Sacktor, B. (1984) Renal trehalase: two subsites at the substrate-binding site. *Biochim. Biophys. Acta* 791: 45-49

- Nelius, T. (2003) Untersuchungen zur Regulation der Blutzuckerspiegel der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Neville, A.C., Weis-Fogh, T. (1963) The effect of temperature on locust flight muscle. *J. Exp. Biol.* 40: 111-121
- Pilkis, S.J., Ed. (1990). Fructose,2,6-bisphosphate. Boca Raton, Florida, CRC Press
- Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W., Dodge, J., Grindey, G., Vlahos, C. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.* 54: 2419-2423
- Pschyrembel (1998) Klinisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin
- Roe, J.H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthron reagent. *J. Biol. Chem.* 212: 335-343
- Satake, S., Masumura, M., Ishizaki, H., Nagata, K., Kataoka, H., Suzuki, A., Mizoguchi, A. (1997) Bombyxin, an insulin- related peptide of insects, reduces the major storage of carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 348-357
- Satake, S., Nagata, K., Kataoka, H., Mizoguchi, A. (1999) Bombyxin secretion in the adult silkworm *Bombyx mori*: sex-specificity and its correlation with metabolism. *J. Insect. Physiol.* 45: 939-945
- Schlöder, P. (1998) Untersuchungen zur Regulation der Trehalaseaktivität in der Flugmuskulatur der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*. Dissertation im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Steedman, A. (ed.)(1990) Locust handbook. (3rd edn) Chatham: Natural Resources Institute, vi+204pp
- Strang, R.H.C., Clement, E.M., Rae, R.C. (1978) Some aspects of the carbohydrate metabolism of the thoracic ganglia of the locust *Schistocerca gregaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B: 217-224
- Takahashi, M., Kono, Y., Kurahashi, H., Matsushita, K., Nishina, M., Kameda, Y. (1995) Effect of a trehalase inhibitor, Validoxylamine A, on three species of flies. *Appl. Entomol. Zool.* 30: 231-239
- Tanaka, S., Okuda, T., Hasegawa, E., Kono, Y. (1998) Suppression of oocyte development by a trehalase inhibitor, Validoxylamine A, through inhibition of juvenile hormone biosynthesis and vitellogenesis in the migratory locust, *Locusta migratoria* L. *Entomol. Sci.* 1: 313-320

- Van der Horst, D.J., Van Doorn, J.M., Beenackers, A.M. (1978) Dynamics in the haemolymph trehalase pool during flight of the locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 8: 413-416
- Walker, E., Pacold, M., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P., Wymann, M., Williams, R. (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin and staurosporine. *Mol. Cell.* 6: 909-919
- Wegener, G. (1987) Insect brain metabolism under normoxic and hypoxic conditions. In: *Arthropod brain: its evolution, development, structure and functions*. Gupta, A. P. (ed.) New York, Wiley: 369-397
- Wegener, G. (1990) Elite invertebrate athletes: flight in insects, its metabolic requirements and regulation and its effects on the lifespan. *International perspectives in exercise physiology*. Nazar, K., Terjung, R.L., Kaciuba-Uściłko, H. Budohoski, L. (eds.) Champaign, Illinois, Human Kinetics Books: 83-87
- Wegener, G. (1996) Flying insects: model systems in exercise physiology. *Experientia* 52: 404-412
- Wegener, G., Bolas, N.M., Thomas, A.A.G. (1991) Locust flight metabolism studied in vivo by ^{31}P NMR spectroscopy. *J. Comp. Physiol. B* 161: 247-255
- Wegener, G., Michel, R., Newsholme, E. (1986) Fructose 2,6-bisphosphate as a signal for changing from sugar to lipid oxidation during flight in locusts. *FEBS Letters* 201: 129-132
- Wegener, G., Tschiedel, V., Schlöder, P., Ando, O. (2003) The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *J. Exp. Biol.* 206: 1233-1240
- Weis-Fogh, T. (1952) Fat combustion and metabolic rate of flying locusts (*Schistocerca gregaria* Forskål). *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* 237B: 1-36
- Worm, R.A.A. (1981) Charakterization of trehalase from locust flight muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 10: 53-59
- Wu, Q., Brown, M. (2006) Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 1-24
- Wyatt, G.R. (1961) The biochemistry of insect hemolymph. *Annu. Rev. Entomol.* 6: 75-102
- Wyatt, G.R. (1967) The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol.* 4: 287-360
- Zebe, E.C.C., McShan, W.H. (1959) Trehalase in the thoracic muscles of the woodroach, *Leucophaea maderae*. *J. Cell Comp. Physiol.* 53: 21-29

7 Anhang

Im Anhang finden sich die p-Werte zu den beschriebenen Versuchen.

7.1 Überprüfung des zweistufigen Trehalasetests

Tabelle 25. p-Werte zu Tabelle 4

Trehalasefraktion	Vgl. 10min – 20min	Vgl. 20min – 30min	Vgl. 10min – 30 min
gesamte <i>overt</i> e	0,772	0,522	0,339
lösliche <i>overt</i> e	0,700	0,245	0,147
gebundene <i>overt</i> e	0,425	0,341	0,090
gesamte gebundene	0,509	0,844	0,343
<i>latente</i>	0,553	0,995	0,464
Gesamtaktivität	0,511	0,776	0,320

7.2 Methodenüberprüfung Dialyse

Tabelle 26. p-Werte zu Tabelle 6

	Vgl. 0 Stunden	Vgl. 24 Stunden
Ringer – Maleat	0,8038	0,8158
Maleat – Maleat + TRITON	0,0002**	0,0002**
Ringer – Maleat + TRITON	0,0004**	0,0005**

Tabelle 27. p-Werte zu Tabelle 6

homogenisiert mit	Ringer	Maleat	Maleat + TRITON
Vgl. 0h – 24h	0,642	0,241	0,733

7.3 Effekte verschiedener Trehazolindosen auf Hämolymphezucker und Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von *Locusta*

Tabelle 28. p-Werte zu Tabelle 7

Vergleich	Glucose	Trehalose
Ringer – 10µg Trehazolin	0,0016**	0,1271
Ringer – 20µg Trehazolin	0,0065**	0,1663
Ringer – 40µg Trehazolin	0,0971	0,1318

Tabelle 29. p-Werte zu Tabelle 8

Trehalasefraktion	Vgl. Ringer – 10µg Trehazolin	Vgl. Ringer – 20µg Trehazolin	Vgl. Ringer – 40µg Trehazolin
gesamte <i>overte</i>	0,0005**	0,0004**	0,0004**
lösliche <i>overte</i>	0,0184*	0,0004**	0,0609
gebundene <i>overte</i>	0,0076**	0,019*	0,0029**
gesamte gebundene	0,3845	0,0176*	0,0083**
<i>latente</i>	0,8381	0,0833	0,0327*
gesamte	0,2866	0,0112*	0,0062**

	Vgl. 10µg – 20µg Trehazolin	Vgl. 10µg – 40µg Trehazolin
gesamte <i>overte</i>	0,0655	0,0097**
lösliche <i>overte</i>	0,3550	0,9254
gebundene <i>overte</i>	0,0848	0,0059**
gesamte gebundene	0,0063**	0,0014**
<i>latente</i>	0,0065**	0,0013**
gesamte	0,0019**	0,0006**

7.4 Hämolymphezucker und Flugmuskeltrehalase in Wanderheuschrecken nach Fütterung mit Trehazolin

Tabelle 30. p-Werte zu Tabelle 9

Vgl. Leitungswasser – 50µg Trehazolin	Glucose	Trehalose
	0,112	0,049*

Tabelle 31. p-Werte zu Tabelle 10

Trehalasefraktion	Vergleich: Leitungswasser – 50µg Trehazolin
gesamte <i>overte</i>	0,0065**
lösliche <i>overte</i>	0,0004**
gebundene <i>overte</i>	0,0087**
gesamte gebundene	0,0014**
<i>latente</i>	0,1367
gesamte	0,0008**

7.5 Langzeiteffekte von Trehazolin auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von Locusta

Tabelle 32. p-Werte zu Tabelle 11

	Vgl. 0 und 10 Tage	Vgl. 0 und 20 Tage	Vgl. 0 und 30 Tage
gesamte <i>overte</i>	0,280	0,947	0,809
lösliche <i>overte</i>	0,581	0,006**	0,321
gebundene <i>overte</i>	0,530	0,506	0,335
gesamte gebundene	0,143	0,104	0,817
<i>latente</i>	0,075	0,278	0,978
Gesamtaktivität	0,160	0,071	0,871

7.6 Effekte von Flug auf die Trehalaseaktivitäten in der Flugmuskulatur von Heuschrecken, denen Trehazolin injiziert worden war

Tabelle 33. p-Werte zu Tabelle 13 (30 Minuten Trehazolin Wirkdauer)

Trehalasefraktionen	Ringer: Vgl. Ruhe und Flug	10µg Trehazolin: Vgl. Ruhe und Flug
gesamte <i>overte</i>	0,019*	0,0003**
lösliche <i>overte</i>	0,002**	0,0239*
gebundene <i>overte</i>	0,340	0,1276
gesamte gebundene	0,865	0,0323*
<i>latente</i>	0,784	0,0363*
gesamte	0,165	0,0287*

Tabelle 34. p-Werte zu Tabelle 14 (16 Stunden Trehazolin Wirkdauer)

Trehalasefraktionen	Ringer: Vgl. Ruhe und Flug	10µg Trehazolin: Vgl. Ruhe und Flug
gesamte <i>overte</i>	0,766	0,603
lösliche <i>overte</i>	0,470	0,950
gebundene <i>overte</i>	0,435	0,201
gesamte gebundene	0,223	0,005
<i>latente</i>	0,538	0,018*
gesamte	0,227	0,006**

Tabelle 35. p-Werte zu Tabelle 15 (50 Minuten Trehazolin Wirkdauer)

Trehalasefraktionen	Ringer: Vgl. Ruhe und Flug	20µg Trehazolin: Vgl. Ruhe und Flug
gesamte <i>overte</i>	0,022*	0,0211*
lösliche <i>overte</i>	0,004**	0,1795
gebundene <i>overte</i>	0,340	0,1991
gesamte gebundene	0,865	0,0051**
<i>latente</i>	0,784	0,0047**
gesamte	0,165	0,0066**

7.7 Effekte von Insulin auf die Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur

7.7.1 Wirkung verschiedener Insulindosen auf die Trehalaseaktivität der Flugmuskulatur von *Locusta*

Tabelle 36. p-Werte zu Tabelle 16

Trehalasefraktion	Vergleich 20µg Trehazolin mit Insulin			
	5µg	500ng	50ng	25ng
gesamte <i>overte</i>	0,3753	0,1463	0,6144	0,08047
lösliche <i>overte</i>	0,1347	0,4943	0,2059	0,77773
gebundene <i>overte</i>	1,4E-04 **	0,0055**	0,0003**	0,00007**
gesamte gebundene	2,6E-05**	0,0022**	0,0085**	0,23641
<i>latente</i>	4,1E-05**	0,0038**	0,0196*	0,98705
gesamte	4,3E-05**	0,0022**	0,0082**	0,23618

7.7.2 Wirkung von Insulin in intakten Heuschrecken und solchen ohne Kopf

Tabelle 37. Tiere ohne Kopf: p-Werte zu Tabelle 18

Trehalasefraktion	5'-10'	10'-20'	20'-30'	5'-30'	10'-30'
gesamte <i>overte</i>	0,654	0,382	0,516	0,822	0,823
lösliche <i>overte</i>	0,206	0,367	0,327	0,217	0,667
gebundene <i>overte</i>	0,452	0,270	0,614	0,919	0,490
gesamte gebundene	0,110	0,180	0,015*	0,00006**	0,003**
<i>latente</i>	0,079	0,201	0,017*	0,00004**	0,003**
Gesamtaktivität	0,165	0,161	0,011*	0,00008**	0,002**

Tabelle 38. Vgl. 30 Minuten Insulin mit Kopf (30'K) – Insulintiere ohne Kopf, p-Werte zu Tabelle 18

Trehalasefraktion	30'K-5'	30'K-10'	30'K-20'	30'K-30'
gesamte <i>overte</i>	0,029*	0,002**	0,082	0,013*
lösliche <i>overte</i>	0,553	0,314	1,000	0,327
gebundene <i>overte</i>	0,323	0,617	0,772	0,347
gesamte gebundene	0,946	0,284	0,040*	0,010*
<i>latente</i>	0,825	0,271	0,044*	0,008**
Gesamtaktivität	0,951	0,292	0,039*	0,008**

7.8 Effekte von Flug und Trehazolin in Kombination mit Wortmannin oder Insulin auf die Trehalaseaktivitäten in Fraktionen der Flugmuskulatur von *Locusta*

7.8.1 Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin und Wortmannin

Tabelle 39. p-Werte zu Tabelle 19

Vergleich	p-Werte	
	Glucose	Trehalose
Trehazolin-Ruhetiere und Trehazolin-Flugtiere	0,205	0,471
Wortmannin-Ruhetiere und Wortmannin-Flugtiere	0,249	0,822
Trehazolin-Ruhetiere und Wortmannin-Ruhetiere	0,394	0,248
Trehazolin-Flugtiere und Wortmannin-Flugtiere	0,355	0,162

Tabelle 40. p-Werte zu Tabelle 20

Trehalasefraktion	Vergleich Kontrolle Ruhe- und Flugtiere	Vergleich Wortmannin Ruhe- und Flugtiere
<i>gesamte overte</i>	0,0079**	0,0881
<i>lösliche overte</i>	0,5861	0,0500
<i>gebundene overte</i>	0,0418*	0,9069
<i>gesamte gebundene</i>	0,0106*	0,0011**
<i>latente</i>	0,0140*	0,0004**
<i>gesamte</i>	0,1313	0,0051**

Trehalasefraktion	Vgl. Ruhetiere	Vgl. Flugtiere
<i>gesamte overte</i>	0,8778	0,0725
<i>lösliche overte</i>	0,7301	0,5381
<i>gebundene overte</i>	0,0232*	0,7698
<i>gesamte gebundene</i>	0,1448	0,8000
<i>latente</i>	0,0336*	0,8698
<i>gesamte</i>	0,1092	0,7838

7.9 Effekte von Flug und Trehazolin sowie von Trehazolin plus Insulin

Tabelle 41. p-Werte zu Tabelle 21

Trehalasefraktion	Vergleich Ruhe- und Flugtiere	
	Trehazolintiere	Trehazolin-Insulin-Tiere
gesamte <i>overte</i>	0,0766	0,6054
lösliche <i>overte</i>	0,9427	0,2509
gebundene <i>overte</i>	0,0250*	0,8472
gesamte gebundene	0,0017**	0,2341
<i>latente</i>	0,0007**	0,2228
gesamte	0,0017**	0,2192

Trehalasefraktion	Vergleich Trehazolin und Trehazolin-Insulin-Tiere	
	Ruhetiere	Flugtiere
gesamte <i>overte</i>	0,0479*	0,0008**
lösliche <i>overte</i>	0,9740	0,1998
gebundene <i>overte</i>	0,0126*	0,2019
gesamte gebundene	0,0177*	0,2667
<i>latente</i>	0,0341*	0,2236
gesamte	0,0182*	0,2759

7.10 Wirkung von Trehazolin auf die Trehalaseaktivitäten in verschiedenen Geweben von Locusta

Tabelle 42. p-Werte zu Tabelle 22

Trehalasefraktion	Vergleich Kontrolle mit Trehazolin			
	Flug- muskulatur	Sprung- muskulatur	Darm	Gehirn
gesamte <i>overt</i>	2,17E-05**	0,0003**	0,0002**	0,0023**
lösliche <i>overt</i>	6,75E-04**	0,0242*	0,0012**	0,0002**
gebundene <i>overt</i>	1,99E-03**	0,0003**	0,0561	0,0532
gesamte gebundene	3,75E-02*	0,0016**	0,0134*	0,0044**
<i>latente</i>	1,66E-03**	0,0570	0,0828	0,0023**
gesamte	2,16E-03**	0,0012**	8,53E-07**	0,0003**

Tabelle 43. p-Werte zu Tabelle 23

Quotient: gesamt gebunden / <i>overt</i> gebunden			
Flugmuskulatur	Sprungmuskulatur	Darm	Gehirn
0,005**	0,009**	0,04*	0,0003**