

**„Vorkommen und Charakterisierung von Ecdysiotropinen bei
männlichen Imagines der Mittelmeerfeldgrille
Gryllus bimaculatus DE GEER“**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Seyed Reza Kazemi Nezhad
geb. in Dezful/Iran

Mainz, 2001

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Überblick	1
1.2	Steuerung der Ecdysteroidogenese	5
1.2.1	Ecdysiotropine und Ecdysiostatine	6
1.3	Zielsetzung	9
2.	Material und Methoden	11
2.1	Versuchstiere	11
2.1.1	<i>Gryllus bimaculatus</i> de Geer (Orthoptera: Gryllidae)	11
2.1.2	<i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae)	12
2.2	Chemikalien	13
2.3	Applikation von Azadirachtin	13
2.4	Isolierung und Auftrennung von Ecdysteroiden	14
2.4.1	Extraktion der Ecdysteroide aus Geweben	14
2.4.2	Extraktion der Ecdysteroide aus Hämolymphe	14
2.4.3	Säulenchromatographische Trennung mittels RP-C 18	14
2.5	Quantifizierung und Identifizierung von Ecdysteroiden	15
2.5.1	Radioimmunoassay (RIA)	15
2.5.1.1	Antiserum für den RIA	16
2.5.1.2	Verwendete Lösungen	17
2.5.1.3	Durchführung des RIA	18
2.5.1.4	Auswertung des RIA	18
2.5.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	19
2.5.2.1	RP (Reversed Phase)-HPLC	20
2.5.2.2	NP (Normal Phase)-HPLC	20
2.6	Präparation und <i>in vitro</i> -Inkubation der verschiedenen Gewebe	21
2.6.1	Allgemeine Bemerkungen zu <i>in vitro</i> -Versuchen	21
2.6.2	Herstellung des Präparations- und des <i>in vitro</i> - Inkubationsmediums	21
2.6.3	Präparation der Gewebe	22
2.6.3.1	Oenocyten	22
2.6.3.2	Tergite	23

2.6.3.3	Thorakaler Fettkörper	24
2.6.3.4	Prothorakaldrüse	24
2.6.4	Bioassay und <i>in vitro</i> -Inkubationsversuche	25
2.7	Proteinbiochemische Methoden	26
2.7.1	Konzentrierung von Proteinlösungen mittels Ultrafiltration	26
2.7.2	Molekulargewichtsbestimmung mittels Größen- Ausschlußchromatographie (HP-SEC)	27
2.7.3	Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der extrahierten Faktoren	28
2.7.3.1	Hitze-Behandlung	28
2.7.3.2	Alkylierung mit N-Ethylmaleimid	28
2.7.3.3	Reduzierung durch Dithiothreitol	28
2.7.3.4	Enzymatischer Verdau	29
2.7.4	Vorbereitung und Auftrennung von Proben mittels Elektrophorese	30
2.7.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.7.5	Färbung der Gele	31
2.7.5.1	Coomassie Brilliantblau R-250	32
2.7.6	Western-Blotanalyse	32
2.7.6.1	Semidry-Blotting	32
2.7.7	Detektion von Proteinen auf Membranen	34
2.7.7.1	Markierung von Proteinantigenen mit spezifischen Antikörpern	34
2.7.7.2	Nachweis der Antigen/Antikörper-Komplexe durch Chemolumineszenz	34
2.7.8	Protein/Peptid-Sequenzanalyse	35
2.7.8.1	Suche nach Sequenzübereinstimmungen	36
2.8	Untersuchung zum Wirkungsmechanismus der extrahierten Faktoren	36
2.8.1	Bestimmung des intrazellulären cyclischen Adenosin-3',5'- monophosphats (cAMP) mittels Radiorezeptorassay (RRA)	36
2.8.2	Extraktion des cAMP aus Gewebe	38
2.8.3	Inkubation der Oenocyten mit dbcAMP, Forskolin, 8-Br-cAMP und IBMX	38
2.8.4	Inkubation der Oenocyten mit Ionomycin	38

2.9	Histologische Methoden	38
2.9.1	Indirekter immunohistochemischer Nachweis von Ecdysteroiden	38
2.9.1.1	Durchführung der Immunofluoreszenzmarkierung	40
2.9.2	Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin (HE-Färbung)	41
2.10	Statistische Auswertung der Ergebnisse	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	Darstellung von Sekretionsprofilen ecdysteroidproduzierender Gewebe	42
3.1.1	Sekretionskinetik von Oenocyten, Tergiten und thorakalem Fettkörper	42
3.1.1.1	Oenocyten und Tergite	43
3.1.1.2	Thorakaler Fettkörper	44
3.1.2	Sekretionskinetik der Prothorakaldrüse	45
3.2	Isolierung, Wirkung und Molekulargewichtsbestimmung der biologisch aktiven Faktoren aus Köpfen von Grillen	46
3.2.1	Erstellung einer Eichgeraden zur Molekulargewichtsbestimmung	46
3.2.2	Gruppentest	47
3.2.3	Molekulargewichtsbestimmung der Oenocyten- stimulierenden Faktoren (OSF)	49
3.2.4	<i>In vitro</i> -Stimulation der Tergite	49
3.3	Zeit- und Dosis-Wirkung der die Ecdysteroid- Sekretion-beeinflussenden Faktoren	51
3.4	Identifizierung der sekretierten Ecdysteroide mittels HPLC/RIA-Analyse	53
3.5	Wirkung von Azadirachtin	57
3.5.1	Einfluß von Azadirachtin auf den Hämolymp-Ecdysteroidtiter	57
3.5.2	Einfluß von Azadirachtin auf die OSF-Konzentration	58
3.6	Charakterisierung der biochemischen Natur der Oenocyten-stimulierenden Faktoren	59
3.6.1	Stabilität gegen Hitze-Behandlung	60
3.6.2	Stabilität gegen Alkylierung durch N-Ethylmaleimid (NEM)	61
3.6.3	Stabilität gegen Reduzierung durch Dithiothreitol (DTT)	61
3.6.4	Stabilität gegen Endopeptidase, Exopeptidase	

	und Neuramidase-Spaltung	62
3.7	Western-Blot und Proteinanalyse	64
3.8	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von OSF	67
3.8.1	Effekt von Signalstoffen auf die Ecdysteroidsekretion der Oenocyten	67
3.8.2	Erhöhung des cAMP-Titers in Oenocyten durch Zugabe von OSF <i>in vitro</i>	68
3.8.3	Einfluß von Calcium-Ionen auf die Ecdysteroidsekretion	69
3.9	Immunohistochemischer Nachweis von Ecdysteroiden	71
4.	Diskussion	74
4.1	Die Ecdysteroidsynthese in Geweben außerhalb der Prothorakaldrüse	74
4.2	Die Ecdysteroidproduktion der untersuchten Gewebe	75
4.3	Ecdysteroidsekretion und Kinetik <i>in vitro</i> an Einzelgeweben	79
4.4	Bioassay für die Detektion von Faktoren mit Wirkung auf die Ecdysteroidsekretion	80
4.5	Die quantitativen Bestimmungsmethoden für Ecdysteroide	82
4.6	Nachweis von Ecdysteroiden durch HPLC	83
4.7	Die Wirkungsweise von Azadirachtin	85
4.8	Biochemische Eigenschaften der Oenocytenstimulierenden Faktoren	88
4.9	Molekulargewichtsbestimmung von OSF	92
4.10	Aminosäuresequenzanalyse	94
4.11	Wirkmechanismus von OSF	95
4.11.1	Beteiligung von cAMP als Second Messenger bei der Ecdysteroidsynthese	95
4.11.2	Die Rolle von Calcium auf die Ecdysteroidproduktion in Oenocyten	99
5.	Zusammenfassung	104
6.	Literatur	106

Abkürzungsverzeichnis

20-OH-E	20-Hydroxyecdysone
³ H	Tritium
8-Br-cAMP	8-Brom-cyclisches AMP
ADP	Adenosin-Diphosphat
APS	Ammoniumper(oxidi)sulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
Aza	Azadirachtin
Bis	Methylen-Bisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
C	% „crosslinking“
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DAG	Diacylglycerol
dbcAMP	Dibutyryl-cyclisches AMP
dbEST	Expressed Sequence Tags Database
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
E	Ecdysone
EDNH	Egg Development Neurosecretory Hormone
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay
FCTH	Follicle Cell Tropic Hormone
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
Gs	stimulierendes G-Protein
HE	Hämalaun-Eosin
HPLC	High Pressure (Performance) Liquid Chromatography
HP-SEC	High Performance Size Exclusion Chromatography
IBMX	Isobuthylmethylxanthin
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
MALDI	Matrix-assisted laser desorption and ionization
MIH	Moult Inhibiting Hormone
MS	Massenspektrometrie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEM	N-Ethylmaleimid
NKS	Normalkaninchenserum
NP-HPLC	Normal Phase-HPLC
NSC	neurosekretorische Zelle
OMP	Ovary Maturing Parsin
OSF	Oenocyten-stimulierende Faktoren
p.A.	per Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS + 0,05% Tween 20
PTTH	Prothoracotropes Hormon

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIA	Radioimmunoassay
RP-HPLC	Reversed Phase-HPLC
RRA	Radiorezeptorassay
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
T	Gelkonzentration in %
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Testis Ecdysiotropin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Abkürzungen der Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1. Einleitung

1.1 Überblick

In der Postembryonalentwicklung der Insekten laufen eine Reihe von Metamorphoseschritten ab, die durch ein kompliziertes hierarchisches System von neuronalen und endokrinen Mechanismen gesteuert werden. Bei diesem biologischen Kommunikationssystem werden die Nachrichten in Form von speziellen Substanzen, den Hormonen, verschlüsselt. Hormone sind körpereigene Wirkstoffe, die die Vorgänge des Stoffwechsels, des Wachstums und der Fortpflanzung steuern. Sie werden bei Insekten entweder als Neurosekrete vom Nervensystem gebildet oder entstammen peripheren Hormondrüsen.

Die gängige Vorstellung der Hormonphysiologie der Insekten beruht auf der Annahme, daß die Prothorakaldrüse durch ein übergeordnetes, im Gehirn-Retrocerebralkomplex gebildetes Ecdysiotropin, bekannt als Prothoracotropes Hormon (PTTH), zu Synthese und Sekretion von Häutungshormonen stimuliert wird.

Kopec (1917; 1922) entdeckte erstmals die Neurosekretion, indem er feststellte, daß Neurone Hormone produzieren, die physiologische Prozesse in weiter entfernten Körperregionen kontrollieren. Das war der erste Beweis für eine inkretorische Funktion des tierischen Gehirns. Als „brain hormone“ bezeichnete Kopec (1922) die aus dem Gehirn stammende und die Häutung beschleunigende Substanz der Larven des Schwammspinners, *Lymantria dispar*. Seine Pionierarbeiten gelten als Beginn der Ära der Neuroendokrinologie. Ke identifizierte 1930 im Thorax von *Bomby mori* die Prothorakaldrüsen. Fukuda (1940; 1944) konnte durch Schnürungsexperimente nachweisen, daß die Prothorakaldrüsen des präadulten Seidenspinners das Metamorphosehormon liefern. Es gelang schließlich Williams (1946; 1947) eindeutig festzustellen, daß das Gehirnhormon nicht direkt auf das Wachstums- und Differenzierungsgeschehen einwirkt, sondern als Aktivationshormon die Prothorakaldrüsen zur Sekretion von Häutungshormon anregt. Scharrer (1952) schlug vor, daß die Corpora cardiaca Speicherorgane für die Neurosekrete seien, aus denen sie allmählich in die

Hämolymphe abgegeben werden, um über den Blutweg die Prothorakaldrüse zu stimulieren. Ferner wies Scharrer (1952) auf die weitgehende Übereinstimmung zwischen dem Hypothalamus-Hypophysen-System der Vertebraten und dem Pars intercerebralis-Cardiacum-Allatum-System der Insekten hin.

Butenandt und Karlson (1954) gelang die Isolierung und Charakterisierung des von der Prothorakaldrüse produzierten, häutungsauslösenden Hormons. Mittels Röntgenstrukturanalyse wurde seine Struktur von Huber und Hoppe (1965) aufgeklärt. Die Analyse der Struktur ergab, daß es sich um ein sehr ursprüngliches Steroidhormon handelt, das noch das vollständige Kohlenstoffgerüst des Cholesterins (Abb. 1-1a) besitzt (Karlson et al., 1965). Diese Erkenntnisse eröffneten die Möglichkeit, Metabolismus und Wirkungsweise des Ecdysons (Abb. 1-1b) zu untersuchen. Es handelt sich dabei um ein polyhydroxyliertes C27-Steroid, das die Insekten aus durch die Nahrung aufgenommenem Cholesterin synthetisieren (Grieneisen, 1994). Ecdyson galt lange Zeit als primäres Sekretionsprodukt der Häutungsdrüsen, das in den peripheren Geweben mit Hilfe der Ecdyson-20-Monooxygenase zur aktiven Form, dem 20-Hydroxyecdyson, hydroxyliert wird (Keller & Schmid, 1979; Dübendorfer, 1986; Henrich et al., 1999). Durch verbesserte Trenntechniken wurde jedoch gezeigt, daß Ecdyson nicht das einzige Produkt der Prothorakaldrüsen ist. Bei *Manduca sexta* (Warren et al., 1988), *Bombyx mori* (Kiriishi et al., 1990), *Gryllus bimaculatus* (Oeh et al., 1997, 1998) sowie *Periplaneta americana* (Richter et al., 1999) konnten Vorstufen des Ecdysons, nämlich 3-Dehydroecdyson und 2-Dehydroecdyson als Syntheseprodukte nachgewiesen werden. Als Ecdysteroide bezeichnet man alle Substanzen, die strukturell vom Ecdyson abgeleitet sind und häutungsauslösende Wirkung zeigen (Goodwin et al., 1978). Ferner regulieren Ecdysteroide auch Gene, die z.B. Vorgänge wie die Entwicklung der Imaginalanlagen (Nardi et al., 1985) und des Integuments (Jindra et al., 1996), sowie die Pigmentierung und Sklerotisierung des aus den Imaginalanlagen entstehenden Lepidopterenflügels steuern (Koch & Kaufmann, 1995; Koch et al., 1998).

Neben Arthropoden und einigen Nichtarthropoden (Karlson, 1983) können auch Pflanzen Ecdysteroide synthetisieren. Möglicherweise sind diese in Abwehrstrategien involviert, da die Ecdysteroide den Entwicklungszyklus von manchen pflanzenfressenden Insekten empfindlich stören können (Kubo et al., 1983). Zur Zeit sind mehr als 60 Zooecdysteroide

(Suksamrarn et al., 1996) und über 100 Phytoecdysteroide (Adler & Grebenok, 1995; Sarker et al., 1997) bekannt.

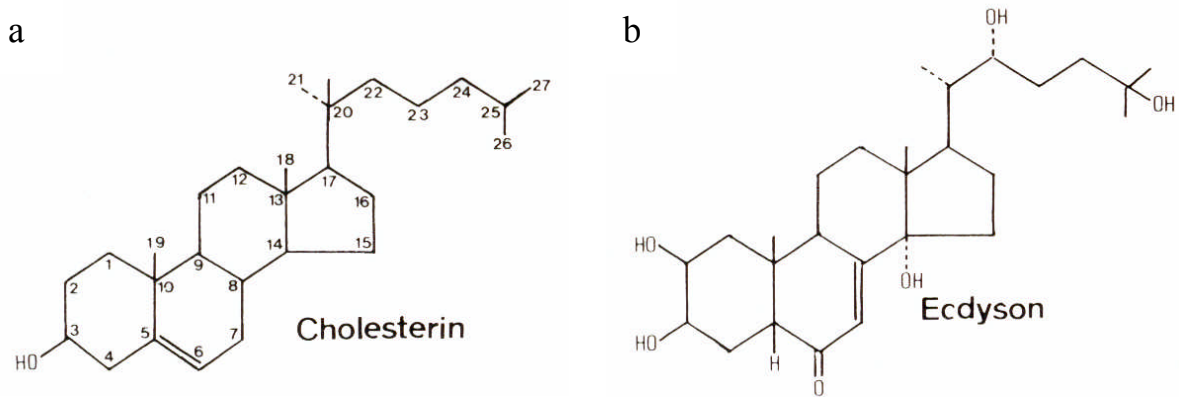


Abb. 1-1: Strukturformeln von a) Cholesterin und b) Ecdyson

Schon kurz nach Isolierung des Ecdysons aus Puppen von *Bombyx mori* (Butenandt & Karlson, 1954), konnten Karlson und Stamm-Menendez (1956) auch in adulten Weibchen der gleichen Art das Ecdyson nachweisen. Eine Entdeckung, die insofern überraschend war, da sich die Imago nicht mehr häutet. Die Ergebnisse blieben jedoch aus zweierlei Gründen für längere Zeit unbeachtet. Erstens beschäftigte man sich hauptsächlich mit der namensgebenden Wirkung des Ecdysons, der Auslösung von Häutungen während der präadulten Insektenentwicklung. Zweitens vertraten viele Autoren die Ansicht, daß das Ecdyson der Imagines aus dem larvalen Stadium stammte und in die adulte Periode mit „hinübergenommen“ wurde. Diese Ansicht kann man vertreten, wenn man die Tatsache bedenkt, daß die untersuchten Seidenspinner (*Bombyx mori*) nur eine kurze Adultentwicklung von 7 bis 10 Tagen durchlaufen. Inzwischen wurde in verschiedenen adulten Insekten mit langer Imaginalphase das Vorkommen von Ecdysteroiden nachgewiesen (u. a. Schlaeger et al., 1974; Romer, 1977; Dorn, 1978; Bownes et al., 1984; Sakurai et al., 1991; Dorn et al., 1994; Riemer & Romer, 1995), obwohl in diesem Lebensabschnitt keine funktionstüchtige Prothorakaldrüse mehr vorhanden war. Mit dem Erreichen des Adultstadiums verlieren die Prothorakaldrüsen ihre Bedeutung als Ecdyson-synthetisierendes Organ und degenerieren vor oder kurz nach der Imaginalhäutung (Ozeki,

1968; Maleville, 1973; Lanzrein, 1975; Smith & Nijhout, 1982; Griffith & Finlayson, 1983; Richter, 1984; Dai & Gilbert, 1997).

Auch bei dem Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit *Gryllus bimaculatus* ist dieses Phänomen zu beobachten. Martau und Romer (1998) konnten durch verschiedene Methoden zeigen, daß die Prothorakaldrüse schon vor Beginn der Imaginalhäutung degeneriert und ihre Sekretionsaktivität einstellt. Obwohl die Drüse in adulten männlichen Grillen nicht mehr existiert, konnten dennoch große Mengen an Ecdysteroiden nachgewiesen werden, die sogar spezifisch periodische Schwankungen zeigten (Shahab & Romer, 1982; Hoffmann & Behrens, 1982). Wenn man bedenkt, daß die Lebenserwartung von *Gryllus*-Imagines ca. 50 Tage beträgt, ist eine „Mitnahme“ von larvalen Ecdysteroiden in die Adultperioide ausgeschlossen. Allgemein ist anerkannt, daß Insekten über ein sehr aktives abbauendes System verfügen (Smith & Bownes, 1985). Die Metabolisierung von Ecdysteroiden wurde auch bei *Gryllus bimaculatus* untersucht (Wildmann & Romer, 1977; Bulenda et al., 1986; Eibes & Romer, 1990). Die Autoren verzeichneten, daß die Ecdysteroide einem raschen Turnover, d. h. einer schnellen und hohen Hydroxylierungsrate des Ecdysons und einem zügigen Abbau des 20-Hydroxyecdysons unterliegen. Die hohe Konzentration an Ecdysteroiden in Imagines von männlichen *Gryllus* kann demnach nicht auf einen Transfer aus dem larvalen Stadium zurückzuführen sein, sondern muß auf einer *de novo* Synthese beruhen.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse müssen also alternative Quellen für die Produktion der Ecdysteroide bei männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus* verantwortlich sein. Untersuchungen von Bressel et al. (1990), Romer und Bressel (1994) sowie Hoffmann und Wagemann (1994) weisen unter anderem auf Oenocyten und Tergite als ecdysteroid-sezernierende Gewebe hin.

Dabei stellt sich die Frage, wie der Hormonhaushalt bei adulten Männchen der Mittelmeerfeldgrille reguliert wird und welche Faktoren die Ecdysteroidsekretion im Adultgewebe stimulieren. Im Rahmen dieser Dissertation soll ihre biochemische Natur sowie ihr Wirkmechanismus geklärt werden. Die Beantwortung dieser Probleme steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

1.2 Steuerung der Ecdysteroidogenese

Das Gehirn der Insekten greift steuernd in die Ecdysteroidbiosynthese ein, indem es stimulierende und hemmende Faktoren bildet.

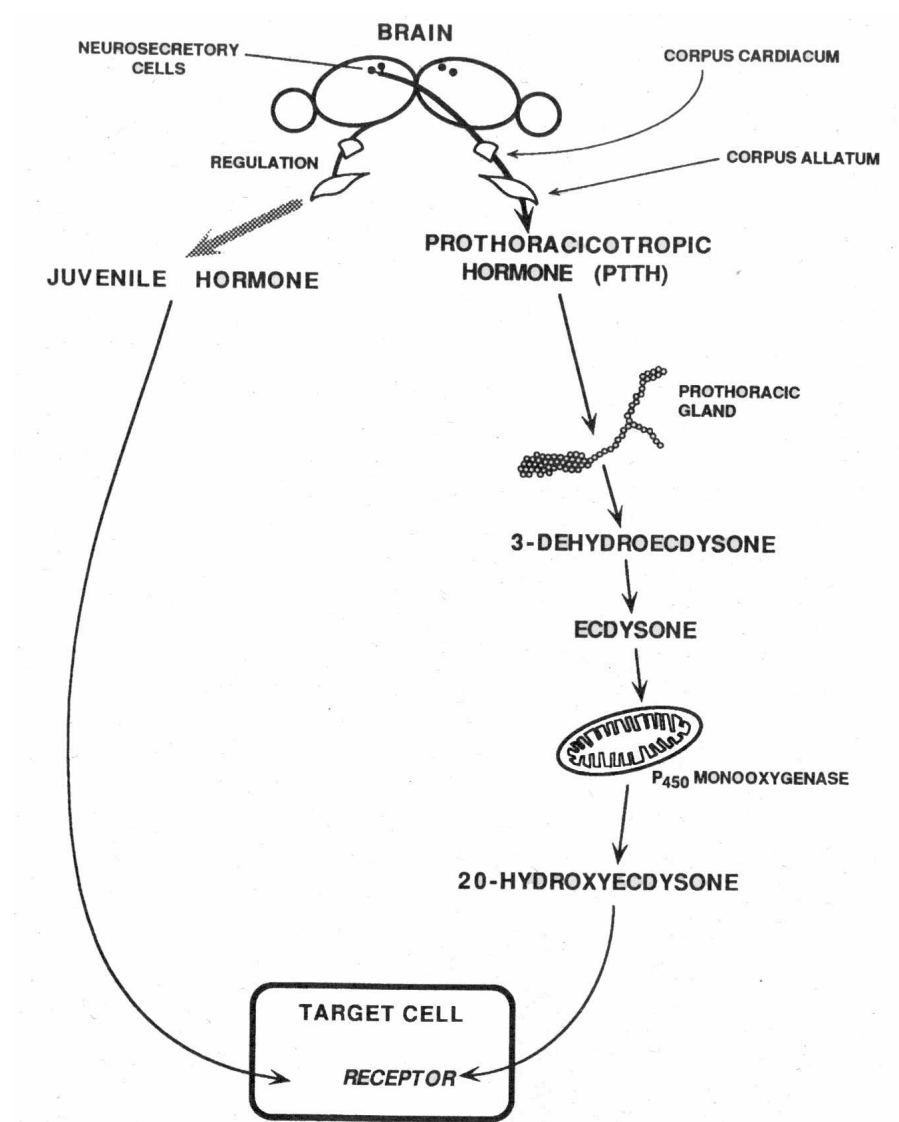


Abb. 1-2: Vereinfachte schematische Darstellung der hormonalen Kontrolle der Metamorphose und Häutung bei Insekten durch Ecdysteroide sowie durch das zu den Isoprenoiden gehörende Juvenilhormon (Henrich et al., 1999).

Die Untersuchungen von steroidogenen Drüsen ergeben den Hinweis, daß die Ecdysteroidsynthese durch ein kompliziertes Zusammenspiel mehrerer Faktoren reguliert wird (Abb. 1-2). Die Anwesenheit eines bestimmten Titers von 20-Hydroxyecdysone in der

Hämolymphe veranlaßt die Epidermiszellen zur Bildung einer neuen Kutikula (Jenkins et al., 1992). Die Konzentration des Häutungshormons 20-OH-Ecdyson wird gemeinsam durch die Synthese, den Metabolismus und die Exkretion der Ecdysteroide beeinflusst (Koolman, 1990). Dabei ist die wichtigste Größe für die Hormonkonzentration in der Hämolymphe die Geschwindigkeit, mit der Ecdyson in der steroidogenen Drüse synthetisiert wird. Diese Geschwindigkeit variiert im Verlauf der Entwicklung stark und sie wird stadienspezifisch reguliert.

Die Ecdysteroidsynthese steht vor allem unter der Kontrolle von Tropinen und Statinen (s. Kap. 1.2.1). Darüber hinaus wird sie noch von weiteren Faktoren beeinflusst. Dazu gehört Juvenilhormon, welches zum Teil direkt auf das ecdysteroidproduzierende Gewebe, zum Teil aber auch über das Gehirn wirken soll (Watson & Bollenbacher, 1988; Sakurai et al., 1989). Auch Hämolymphe-Faktoren können die Aktivität der Drüse modulieren (Gruetzmacher et al., 1984; Gray et al., 1987). Neuronale Steuerungen sind ebenfalls am Regelmechanismus beteiligt (Richter, 1985, 1993a, 1993b). Für *Periplaneta americana* konnte die Aktivität des die Prothorakaldrüsen innervierenden Nerven mit dem Ecdysteroidtiter korreliert werden (Richter & Gersch, 1981).

Eine Reihe von Untersuchungen deutete darauf hin, daß der Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe einerseits durch eine Feedbackregulation über Gehirn, Corpora cardiaca, Corpora allata-Prothorakaldrüse und andererseits durch eine direkte Wirkung auf die Prothorakaldrüse eine wichtige Rolle bei der Ecdyson-Synthese spielt (Watson et al., 1989a). Ecdysteroide stimulieren z.B. die PTTH-Synthese und -Sekretion in *Mamestra brassicae* (Agui & Himura, 1978). In *Rhodnius prolixus* stimulieren Ecdysteroide die PTTH-Synthese, aber nicht seine Sekretion (Vafopoulou & Steel, 1996). Für *Calliphora vicina* scheint zu Beginn der Wanderphase eine positive Feedbackregulation zu existieren. Wenig später wird die Ecdysteroidsynthese durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus gesteuert (Budd et al., 1993; Jiang & Koolman, 1999).

1.2.1 Ecdysiotropine und Ecdysiostatine

Seit den Untersuchungen von Kopec (1922) ist bekannt, daß die Metamorphose der Larven pteryogoter Insekten durch ein Hormon aus dem Gehirn gesteuert wird. Auf Grund seiner biologischen Wirkung auf die Prothorakaldrüse wurde es in den fünfziger Jahren als PTTH

bekannt. In der Folgezeit wurden auch in adulten Insekten Hormone mit ecdysteroid-stimulierender Wirkung entdeckt. Dazu zählen das aus *Locusta migratoria* isolierte Gonadotropin, „Ovary Maturing Parsin“ (Lom-OMP) bzw. „Follicle Cell Tropic Hormone“ (FCTH) (Charlet et al., 1979; Girardie et al., 1995a, 1995b; Girardie & Girardie, 1996), das in Moskitos gefundene „Egg Development Neurosecretory Hormone“ (EDNH) (Hagedorn et al., 1979; Masler et al., 1991a, 1991b) und das in *Lymantria dispar* vorkommende „Testis Ecdysiotropin“ (TE) (Loeb et al., 1988, 1993, 1994, 1998). Trope Faktoren für die Epidermis und das abdominale Integument sind nicht bekannt. Die ecdysteroidogenen Gewebe reagieren auf die regulatorischen Ecdysiotropine mit einem cAMP-Konzentrationsanstieg (Abb. 1-3), jedoch wirkt auch Calcium zusätzlich als Second Messenger und stimuliert die Ecdysteroid-Biosynthese (Smith, 1995).

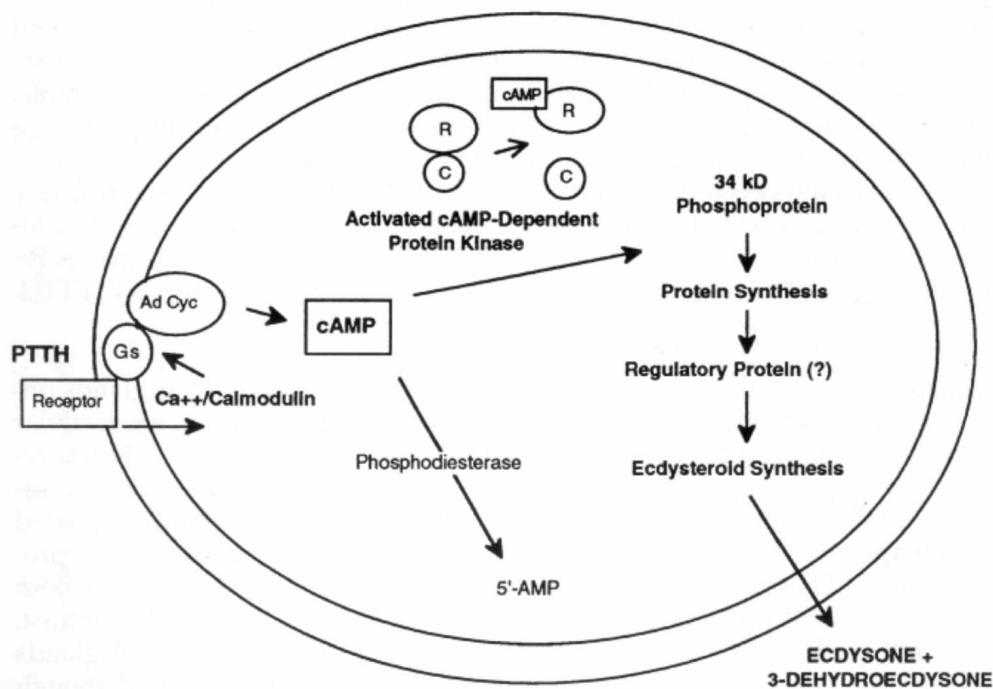


Abb. 1-3: Modell der zellulären Wirkung von PTTH (Smith, 1995).

Abkürzungen: 5'-AMP = 5'-Adenosin-Monophosphat, Ad Cyc = Adenylatzyklase, C = katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase, cAMP = 3'-5'-cyclisches Adenosin-Monophosphat, Gs = stimulierendes G-Protein, PTTH = prothoracotropes Hormon, R = regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase.

Die meisten Untersuchungen zur Chemie und Wirkungsweise der die Ecdysonsynthese-stimulierenden Peptide wurden an den aus den Lepidopteren *Bombyx mori* und *Manduca sexta* isolierten PTTH unternommen (Watson et al., 1989b). Es wurden zwei Molekulargewichtstypen der PTTH in Schmetterlingen gefunden, eine kleinere und eine größere. Obwohl die großen PTTH-Moleküle von *Bombyx* und *Manduca* sich nur in wenigen Aminosäuren voneinander unterscheiden, reicht dies schon für die Ausprägung einer artspezifischen biologischen Aktivität, die in der Sekundär- und Tertiärstruktur des Moleküls begründet ist (persönliche Mitteilung von Prof. Scheller / Würzburg). Auf diese Weise können Prothorakaldrüsen in *Manduca* von beiden PTTH-Formen stimuliert werden (Bollenbacher et al., 1984), während in *Bombyx* nur das große PTTH wirksam ist. Die kleinere Form hingegen ist in einem anderen Seidenspinner, *Samia cynthia ricini* aktiv (Nagasawa et al., 1984) und wurde daher als Bombyxin populär (Mizoguchi, 1994). Auf Grund seiner Sekundärstruktur (Zahl und Lage der Disulfidbrücken) gehört das Bombyxin in die Superfamilie der Insulin/Relaxin-Peptide. Die entsprechende *Bombyx*-PTTH-DNA wurde bereits kloniert und charakterisiert und aus den Genen die vollständige Aminosäuresequenz abgeleitet (Kawakami et al., 1990).

Die Bildung von PTTH findet in neurosekretorischen Zellen von Typ-III im Protocerebrum statt (Agui et al., 1979; Gilbert et al., 1981; Westbrook et al., 1991) und wird über die Neuronenendigungen in den Corpora allata (Neurohämalogane) ausgeschüttet (O'Brien et al., 1988; Gray et al., 1994). Die PTTH-Freigabe wird reguliert durch hormonelle Stimuli, Temperaturreize, proprio- und mechanorezeptive Reize sowie photoperiodische Schwankungen (Bollenbacher & Granger, 1985).

PTTH-ähnliche Peptide wurden auch außerhalb des Gehirns in den großen endokrinen Zellen, die zur perispirakulären Drüse gehören, immunohistochemisch lokalisiert (Zitnan et al., 1994; Zitnan et al., 1996). Hierbei handelt es sich um sogenannte Inkazellen der Epitrachealdrüsen, die Ecdysis-Triggering-Hormone (ETH) produzieren (Horodyski, 1996; Truman, 1996; Klein et al., 1999).

Es gibt zunehmend Berichte über das Vorkommen von Ecdysiostatinen in verschiedenen Insekten, also Faktoren mit inhibitorischer Wirkung auf die Ecdysteroidsynthese. Diese Art von Regulation wurde erstmals in Krebsen bekannt (Brown & Cunningham, 1939). Bereits 1968 zeigten Carlisle und Ellis, daß die Injektion des Gehirn- und Anhangsdrüsen-

Extraktes in die Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* eine Verminderung des Durchmessers der Prothorakaldrüsenzellkerne einleitete. Die Autoren vermuteten, daß ein hemmender Wirkstoff der Ecdysionsynthese auch bei Insekten existierte (Carlisle & Ellis, 1968). Mittlerweile wurden Ecdysiostatine in *Neobellieria bullata* (Bylemans et al., 1994; Hua et al., 1994), *Calliphora vicina* (Hua & Koolman, 1995; Hua et al., 1997), *Gryllus bimaculatus* (Lorenz et al., 1997), *Musca domestica* (Adams & Li, 1998) und *Bombyx mori* (Hua et al., 1999) nachgewiesen.

Die Tropine und Statine als übergeordnete Kontrollsysteme der Ecdysteroid-Biosynthese wirken antagonistisch. Durch ihre Interaktion bestimmen sie Stimulation oder Hemmung der Ecdysteroidsekretion durch die steroidogene Drüse.

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte versucht werden, einen besseren Einblick in die Kontrolle der Ecdysteroidsekretion in männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus* zu erhalten und Faktoren zu identifizieren, die die Hormonsekretion in adulten Geweben anregen. Ferner sollte die Wirkung von Kopfextrakten auf die Prothorakaldrüse der Larven untersucht werden.

Ausgewählt wurden Oenocyten und Tergite von vier aufeinander folgenden Tagen (Tage 9 bis 12 nach der Imaginalhäutung) sowie thorakaler Fettkörper, da innerhalb dieser Periode eine dramatische Veränderung des Ecdysteroidtiters zu verzeichnen war.

Da die Präparation von Gehirnen aufgrund der starken Bestückung mit Muskulatur äußerst schwierig und langwierig ist, wurden zu Isolation der Neuropeptide ganze Köpfe verwendet. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben Hinweise, daß möglicherweise Köpfe aus 11 Tage alten Tieren im Vergleich zu anderen Altersstadien eine höhere Menge an ecdysteroidstimulierenden Faktoren beinhalten. Deshalb sollten diese als Spendertiere für Kopfextrakte herangezogen werden.

Es ist bekannt, daß bestimmte Insektizide wie Azadirachtin zu einer Erhöhung der PTTH-Konzentration im Gehirn führen können. In Anbetracht dieser Tatsache sollte versucht werden, durch Applikation des Wirkstoffes eine Anreicherung von Ecdysiotropinen in *Gryllus bimaculatus* zu erzielen.

Aus den bisher beschriebenen Fakten leiteten sich folgende Ziele ab:

1. Entwicklung eines geeigneten Bioassays, der es erlaubt, Substanzen zu testen, die die Ecdysteroidsekretion positiv beeinflussen. Zur quantitativen Bestimmung von Ecdysteroiden dient der hochempfindliche Radioimmunoassay.
2. Immunohistochemischer Nachweis von Ecdysteroiden.
3. Isolierung und Aufreinigung von Faktoren mittels Gelfiltration und SDS-PAGE, die die Ecdysteroidproduktion im Adultgewebe stimulieren sowie ihre Aminosäuresequenz-Analyse.
4. Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der die Ecdysteroidsynthese beeinflussenden Faktoren durch Inkubation mit spezifischen Substanzen.
5. Identifizierung der Ecdysteroide mittels zweier unterschiedlicher HPLC-Systeme.
6. Untersuchungen zum Wirkmechanismus der ecdysiotropen Faktoren.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Hauptversuchsobjekt diente die männliche Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* de Geer (Abb. 2-1). In zwei Experimenten wurden Larven des fünften Stadiums des Seidenspinners *Bombyx mori* (Abb. 2-2) verwendet.



Abb. 2-1: Adultes Männchen der Mittelmeerfeldgrille, *Gryllus bimaculatus* de Geer

2.1.1 *Gryllus bimaculatus* de Geer (Orthoptera: Gryllidae)

Die Experimente wurden mit unverpaarten männlichen Imagines (9-12 Tage alt) und Tieren des 9. Larvenstadiums, dem letzten Stadium vor der Imaginalhäutung der Mittelmeerfeldgrille durchgeführt. Die Versuchstiere entstammten der abteilungseigenen Tierzucht, die gelegentlich durch die Tiere einer kommerziellen Zuchtanstalt (Fa. Hildner, Weisendorf) aufgestockt wurde.

Die Grillen wurden bei Zimmertemperatur mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 14:10 Stunden, nach Alter getrennt, in durchsichtigen Plastikwannen gehalten. Die Tiere wurden regelmäßig mit Haferflocken, Fischfutter (Tetra Min®) und Milchpulver

gefüttert und erhielten zusätzlich dreimal pro Woche frischen Salat. Die Wasserversorgung erfolgte durch kleine Flaschen, in deren Öffnungen zusammengerolltes und in Wasser getränktes Zellulosepapier gesteckt wurde. Dieses diente den Weibchen gleichzeitig zur Eiablage. Als Behausungs- und Versteckmöglichkeiten wurden Eierstapelkartons angeboten. Die Eier wurden 7 bis 10 Tage in feuchten Glasbehältern bei einer Temperatur von 27° C bis zum Schlüpfen aufbewahrt.

Nach dem Schlüpfen aus dem Ei durchliefen die Larven innerhalb von ca. 33 Tagen neun Stadien bis zur Imaginalhäutung. Das neunte Nymphenstadium dauerte 9 bis 10 Tage. Der Tag der Adulthäutung wurde als Tag 0 bezeichnet.

Die frisch gehäuteten Adulttiere und Nymphen des 9. Stadiums wurden einmal täglich abgesammelt. Die so aus dem Zuchtbehälter entnommenen Tiere wurden in Einmachgläser gesetzt und in einem Brutschrank bei 27° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% weitergehalten. Dadurch war eine genaue Alterbestimmung der Nymphen sowie der Imagines gegeben. Bei der Auswahl der Versuchstiere wurde insbesondere auf Größe, Gewicht (ca. 0,7 g), Ausfärbung, körperliche Unversehrtheit und lebhaftes Verhalten geachtet.

2.1.2 *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)

Ausgangsmaterial der Seidenspinnerzucht waren Eier der Unité Nationale Séricicole (La Lumatière, Frankreich). Sowohl die Eier als auch die Raupen wurden bei Zimmertemperatur und einer Tag/Nachtperiode von 16:8 Stunden gehalten. Nach etwa 10 Tagen wurden die geschlüpften Jungraupen mit einem feinen Pinsel auf Maulbeerblätter umgesetzt. Frische Maulbeerzweige wurden vom Versuchsgelände des Zoologischen Instituts der Universität bezogen und in Wasser gestellt. Da der Futterverbrauch der ausgewachsenen Raupen beträchtlich war, wurden täglich frische Zweige angeboten. Dadurch konnten die Raupen ohne fremde Hilfe auf die frischen Zweige wandern. Nach vier Häutungen, innerhalb von ca. vier Wochen, verpuppten sich die ausgewachsenen Raupen. 12 Tage nach Bildung des Kokkons schlüpfen die weißen und wollig-behaarten Maulbeerspinner.

Verwendet wurden drei Tage alte Raupen des fünften Larvenstadiums, welches ca. 13 Tage lang dauerte.



Abb. 2-2: Seidenspinner, *Bombyx mori* - Raupen des fünften Larvenstadiums

2.2 Chemikalien

Falls nicht anders vermerkt handelt es sich bei den verwendeten Chemikalien um Produkte der Firma Merck (Darmstadt) in p. A. Qualität.

Für die Versuche wurde reinstes zweifachdestilliertes und entionisiertes Wasser (Milli-Q-plus Systeme, Fa. Millipore, Eschborn) verwendet, was im folgenden als ddH₂O bezeichnet wird.

2.3 Applikation von Azadirachtin

Bei dieser Versuchreihe wurden männliche Grillen am Tag der Imaginalhäutung (Tag 0) mit Azadirachtin (Fa. Roth, Karlsruhe) behandelt. Aus Azadirachtin wurde eine 0,1% ige Lösung in 90% Ethanol (1 µg/µl) hergestellt. Den durch CO₂ betäubten Tieren wurde mit einer Hamilton-Spritze 1 µg/g Körpergewicht Azadirachtin-Lösung ins Abdomen injiziert. Kontrolltieren wurde die entsprechende Menge 90% Ethanol gespritzt. Behandelte und Kontrolltiere wurden getrennt von den übrigen Zuchttieren bei 27° C gemäß 2.1.1 gehalten und am Tag 11 nach der Imaginalhäutung präpariert.

2.4 Isolierung und Auftrennung von Ecdysteroiden

2.4.1 Extraktion der Ecdysteroide aus Geweben

Aufgrund ihrer Polarität lassen sich die Ecdysteroide durch 75% Methanol aus dem Gewebe extrahieren. Die einzelnen Gewebe wurden gemäß 2.6 präpariert, mit 200 µl 75% Methanol versetzt und mittels Ultraschall homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 12,000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Extraktion wiederholt. Die gesammelten Überstände wurden direkt auf C 18-Kartuschen geladen, entsprechend ihrer Polarität eluiert, eingengt und für weitere Untersuchungen gemäß 2.5 bei -20° C gelagert.

2.4.2 Extraktion der Ecdysteroide aus Hämolymphe

Den Grillen wurde mit einer starken Nadel an der Coxalmembran eines hinteren Laufbeins eine Wunde zugefügt. 10 µl der austretenden Hämolymphe wurde den Versuchstieren mit Hilfe einer geeichten Glaskapillare (Fa. Hirschmann, Nürtingen) abgenommen. Der Hämolymphe wurden einige Kristalle Phenylthioharnstoff beigegeben, um die Aktivität der Tyrosinase zu hemmen und so ein "Schwarzwerden" der Hämolymphe zu verhindern. Durch Zugabe von 500 µl eiskaltem absoluten Methanol, kräftigem Schütteln mittels Vortex und anschließender Zentrifugation bei 4000 g für 10 min und 4° C wurden die Proteine präzipitiert. Der Überstand wurde durch RP-C 18-Säulen aufgereinigt, die aufgetrennten freien Ecdysteroide einem RIA unterzogen oder zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

2.4.3 Säulenchromatographische Trennung mittels RP-C 18

Die Auftrennung der Ecdysteroide erfolgte nach Lafont et al. (1982).

Um die verschiedenen Ecdysteroidklassen in einem Arbeitsgang voneinander zu trennen, wurden semipräparative SEP-PAK[®] RP-C 18 Säulen (Fa. Waters, Milford, USA) verwendet. Bei diesem Verfahren erfolgte sowohl eine Entsalzung als auch eine

Auftrennung. Nach Äquilibration der Kartusche durch Zugabe von 5 ml 100% Methanol und 10 ml Aqua bidest. wurden anschließend die jeweils in 5 ml Aqua bidest. gelösten Proben mittels einer 10 ml Glasspritze (Fa. Fortuna, Wertheim) mit Luerlok-Fitting über die Säule gedrückt. Die Eluierung der Ecdysteroide erfolgte mit Hilfe eines stufenweisen Wasser/Methanol-Gradienten. Nacheinander wurden folgende Fraktionen eluiert:

- die Wasserphase, die einen Teil der polaren Ecdysteroidkonjugate enthält,
- die 25% Methanolphase mit ihren polaren Ecdysteroidkonjugaten,
- die 60% Methanolphase mit den überwiegend freien Ecdysteroiden, die ohne weitere Aufarbeitungsschritte quantifiziert werden konnten und schließlich
- die 100% Methanolphase, die apolare Fettsäureester enthielt.

Eine Kartusche konnte nach erneuter Konditionierung insgesamt für weitere 5 Proben benutzt werden. Die Durchlaufgeschwindigkeit des Eluats betrug 15 bis 20 Tropfen pro Minute. Die Eluate wurden in Duran[®]-Reagenzgläsern (Fa. Schott, Mainz) aufgefangen, bei 40° C in einem Vakuumkonzentrator (BA-VC 300 H, Fa. Bachofer, Reutlingen) zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde der Rückstand in 200 µl 60% Methanol aufgenommen, ca. 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um die eventuell an den Wänden anhaftenden Ecdysteroide in Lösung zu bringen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -20° C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Es wird darauf aufmerksam gemacht, daß in dieser Arbeit nur die freien Ecdysteroidkomponenten der 60% Methanolphase von Interesse waren.

2.5 Quantifizierung und Identifizierung von Ecdysteroiden

2.5.1 Radioimmunoassay (RIA)

Die bereits durch die RP-C 18-Kartuschen vorgereinigten Proben wurden mit Hilfe eines Radioimmunoassays auf ihren Ecdysteroidgehalt untersucht.

Bei diesem Bestimmungsprinzip konkurrieren unmarkiertes Hormon (Antigen) und radioaktiv markiertes Hormon um eine begrenzte Zahl von Antikörperbindungsstellen in einer vorgegebenen Menge des Antiserums (Abb. 2-3). Dabei bestimmt die

Menge des unmarkierten Antigens, wieviel markiertes Antigen an den Antikörper gebunden wird (Yalow & Berson, 1960).

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete RIA für Ecdysteroide erfordert im Vergleich zu anderen Bestimmungsmethoden weniger Zeit, ist aber dennoch sehr empfindlich, die Nachweisgrenze liegt bei 10^{-9} bis 2×10^{-11} g. Er vereint die hohe Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Verbindungen mit der Spezifität immunologischer Reaktionen. Somit können Ecdysteroidkonzentrationen auch in nur teilweise gereinigten Extrakten bestimmt werden. Die Spezifität des verwendeten Antiserums entscheidet darüber, welche Ecdysteroide mit dem RIA erfaßt werden (Delaage et al., 1982).

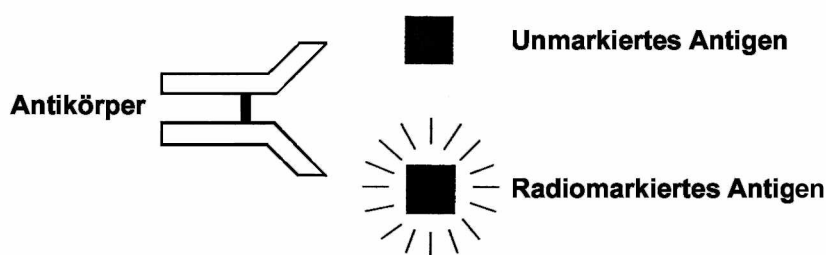


Abb. 2-3: Klassischer RIA. Unmarkiertes Antigen in der Probe konkurriert mit einer bestimmten Menge von radioaktivmarkiertem Antigen um die Bindung an eine begrenzte Antikörpermenge [Verändert nach Kemeny, 1994].

2.5.1.1 Antiserum für den RIA

Das Antiserum wurde nach der Methode von Soumoff et al. (1981) in unserem Labor hergestellt und besitzt eine hohe Sensitivität. Als Immunogen wurde 20-OH-Ecdyson-Hemisuccinat verwendet, das mit der OH-Gruppe am C-Atom 2 verestert und an Thyroglobulin gebunden war. Der Antikörper bindet nicht am unspezifischen Steroidkern, sondern an der Seitenkette, was zur Sicherheit der Ergebnisse beiträgt. Die Kreuzreaktivität zwischen Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson wurde zu 1:2,2 ermittelt (Romer & Bressel, 1994).

2.5.1.2 Verwendete Lösungen

Die quantitative Bestimmung der Ecdysteroide und die im folgenden dargestellte Arbeitsmethode erfolgte nach Borst und O'Connor (1974).

Boratpuffer:

0,1 M Borsäure, 0,1 M Na-tetraborat-10 hydrat und 0,075 M NaCl wurden in 1000 ml ddH₂O gelöst und mit Borsäure auf einen pH-Wert von 8,4 eingestellt.

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung:

Bei Zimmertemperatur wurden 760 g (NH₄)₂SO₄ in 1000 ml ddH₂O gelöst. Während der Aufbewahrung bei 4° C fiel Ammoniumsulfat aus, was vor der Verwendung durch Schütteln resuspendiert werden mußte.

Antiserumansatz:

5 ml Normalkaninchenserum (NKS, Fa. Gibco, Paisley, Schottland)

40 µl spezifisches Antiserum

94 ml Boratpuffer

1 ml Merthiolat (Fa. Fluka, Deisenhofen) als Fungizid

[³H] Ecdysonlösung:

Das verwendete tritiierte Ecdyson (α -[23,24-³H(N)]) stammte von der Firma New England Nuclear (Boston, USA), besaß eine spezifische Aktivität von 53 Ci/mmol und war in einem Methanol-Toluol Gemisch im Verhältnis 1:9 gelöst. Definierte Mengen wurden den in absolutem Methanol aufgenommenen Stammlösungen entnommen, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und mit Boratpuffer auf eine Aktivität zwischen 3500 cpm/100 µl und 4000 cpm/100 µl eingestellt.

2.5.1.3 Durchführung des RIA

- Die in Methanol gelösten Proben und Eichansätze (50 bzw. 100 µl) wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und durch Einstellen in einen Wärmeschrank bei 37° C vollständig zur Trockene eingengt.
- Zugabe von 100 µl ³H-Ecdyson und Aufschütteln mittels Vortex.
- Zugabe von 100 µl des spezifischen Antiserumansatzes zu jedem Testansatz mit Ausnahme bei der Bestimmung der Hintergrundaktivität Zugabe von 100 µl 5% NKS und anschließendem gründlichem Schütteln.
- Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für 3 Stunden.
- Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl kalter Ammoniumsulfatlösung abgebrochen und sofort geschüttelt.
- Fällung durch Inkubation bei 4° C für 30 min.
- Zentrifugation der Proben für 7 min bei 4° C und 12,900 g.
- Absaugen des Überstandes mittels einer Wasserstrahlpumpe und Lösen des Pellets in 25 µl Aqua bidest. und dann erneutes Aufschütteln.
- Zugabe von 1 ml Szintillator (Rotiszint Ecoplus, Fa. Roth, Karlsruhe) und gründliches Aufschütteln.
- Nach einer Abklingzeit von einer Stunde wurde in einem Szintillationszähler (Packard 1900 TR, Meriden, USA) die gebundene Radioaktivität bei einer Meßzeit von 5 min pro Probe gemessen.

2.5.1.4 Auswertung des RIA

Da bestimmte Puffer den Ecdysonnachweis stören, wurde eine methanolische Stammlösung angesetzt, aus der über mehrere Verdünnungsschritte die Standardlösungen mit einer definierten Endkonzentration hergestellt wurde. Doppelansätze von Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson (Fa. Simes, Mailand) der Konzentrationen 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 pg, sowie Nullwerte und Hintergrundaktivität zur Prüfung des Bindungswertes des Antiserums wurden getestet. Die mittels Szintillationszähler ermittelten cpm (counts per minute) wurden grafisch gegen den Gehalt an eingesetztem Ecdyson aufgetragen. Mit Hilfe dieser

Kurve wurde die Konzentration der Ecdyson- und 20-OH-Ecdysonäquivalente in den biologischen Proben bestimmt. Zur Absicherung wurden die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen gebildet. Für Versuchsreihen, die mehr als eine Woche auseinander lagen, wurden neue Eichkurven erstellt. Um eine Überschätzung der im RIA ermittelten Werte zu vermeiden, wurde bewußt der Begriff Äquivalent verwendet.

2.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Ecdysteroidanalytik mittels HPLC bedarf keiner Probenderivatisierung, so daß die Eluate aus der Sep-Pak[®]-Trennung nach Einengung ohne weiteres auf die Säule gebracht werden können. Die Nachweisgrenze lag bei 5 bis 10 ng Substanz. In Kombination mit einem RIA konnten noch geringere Mengen erfaßt werden. Die Qualifizierung der Ecdysteroide erfolgte auf der Basis von Retentionszeiten, die ihreseits von der Position der Hydroxylgruppen abhängig waren.

Die Auftrennung und Identifizierung der Ecdysteroide erfolgte durch eine unterschiedliche Verteilung in der stationären und mobilen Phase des Trennsystems. Sämtliche Laufmittel, speziell für HPLC-Anwendungen, wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen. Vor jedem Lauf wurden die Säulen mit 4 ng/µl eines Cocktails aus Ecdyson und 20-OH-Ecdyson in 60% Methanol geeicht. Darüber hinaus wurden auch die Retentionszeiten für weitere Referenzsubstanzen (Fa. Sigma, Deisenhofen) ermittelt, die im RIA eine Bindung mit dem Antikörper gezeigt haben. Folgende Standards wurden eingesetzt:

- 20,26-Dihydroxyecdyson
- 26-Hydroxyecdyson
- 3-Epi-20-Hydroxyecdyson
- Makisteron A
- 20-Hydroxyecdyson-22-acetat
- 3-Epi-Ecdyson
- 2-Deoxy-20-Hydroxyecdyson
- 2-Deoxyecdyson

Die HPLC-Anlage bestand aus zwei Pumpen (Fa. Bischoff, Leonberg), einen spektrophotometrischen Detektor (LC-UV Pye Unicam, Cambridge, England), einem Schreiber (Fa. Linseis, Selb) und einem Zentralprozessor (Fa. Bischoff).

Beide Säulen wurden in regelmäßigen Abständen nach Angaben der Hersteller regeneriert.

2.5.2.1 RP (Reversed Phase)-HPLC

Die Auftrennungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

Laufmittel:	50% Methanol
Flußrate:	1 ml/min
Säulentemperatur:	22° C
Detektor:	UV-Detektor bei 242 nm
Säulentyp:	Lichrosorb RP 18, 7 µm, 250 x 4,0 mm (Fa. Bischoff)
Fraktiongröße:	0,5 ml

2.5.2.2 NP (Normal Phase)-HPLC

Die Auftrennungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

Laufmittel:	Dichlormethan:Isopropanol:ddH ₂ O (125:35:2)
Flußrate:	1 ml/min
Säulentemperatur:	22° C
Detektor:	UV-Detektor bei 254 nm
Säulentyp:	Lichrospher SI 100, 5 µm, 250 x 4,0 mm (Fa. Bischoff)
Fraktiongröße:	0,5 ml

2.6 Präparation und *in vitro*-Inkubation der verschiedenen Gewebe

2.6.1 Allgemeine Bemerkungen zu *in vitro*-Versuchen

Um zu überprüfen, ob ein Gewebe die Fähigkeit besitzt, Ecdysteroide zu sezernieren, muß man es dem Tier entnehmen und unter annähernd physiologischen Bedingungen inkubieren. Da Insekten durch einen offenen Blutkreislauf gekennzeichnet sind, ist es relativ leicht, diese Voraussetzungen zu schaffen. Dennoch sind die Aussagen von *in vitro* Messungen primär qualitativer Art, da die untersuchten Gewebe aus dem biologischen Regelkreis „Tier“ isoliert wurden. Weiterhin ist zu bedenken, daß *in vitro* Experimente unter anderem an Geweben vorgenommen wurden, deren Funktion aller Voraussicht nach nicht allein im Dienste der Hormonsekretion steht, sondern auch andere Funktionen im biologischen Verband übernimmt.

2.6.2 Herstellung des Präparations- und des *in vitro*-Inkubationsmediums

Für die Präparation wurde Grillen Ringer verwendet: 85 mM NaCl; 6 mM KCl; 3 mM CaCl_2 wurden mit 100 ml entionisiertem und zweifach destilliertem Wasser aufgefüllt, einige Minuten aufgekocht und nach dem Abkühlen 0,3 mM NaHCO_3 zugesetzt, wobei die Osmolarität durch Zugabe einer entsprechenden Menge an Saccharose mit Hilfe eines Osmometers (A 0300, Fa. Knauer, Berlin) auf 480 mOsmol eingestellt wurde.

Als Inkubationsmedium wurde Grace's Insekten Medium ohne Hämolymphe der Firma Gibco eingesetzt. Im Medium waren Aminosäuren, Salze, Vitamine und organische Säuren enthalten. Damit wurde eine optimale Versorgung der Zellen gewährleistet und trug zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfähigkeit bei. Nach Angaben der Hersteller und eigenen Bestimmungen konnten keine RIA-positiven Ecdysteroide in Grace's Medium nachgewiesen werden.

Um ein geeignetes Flüssigkeitsvolumen für die Inkubation zu finden, wurden einige Präparate in unterschiedlichen Volumina (50 µl, 100 µl und 500 µl) Grace's Medium auf ihre Sekretionsfähigkeit getestet. Die während der Inkubation ins Medium abgegebenen Ecdysteroide wurden nach der Aufarbeitung (s. Kap. 2.4) quantitativ

mittels Radioimmunoassay bestimmt. Es stellte sich heraus, daß die inkubierten Präparate in 500 µl Flüssigkeit die größte Menge an Ecdysteroiden sezernierten.

Die Vorbereitung des Inkubationsmediums und die Entnahme der zu inkubierenden bzw. zu untersuchenden Gewebe erfolgte unter nahezu keimfreien Bedingungen in einer Laminar-Flow Sterilbank (Fa. Slee, Mainz). Um das Wachstum von Mikroorganismen während der Inkubation zu unterbinden, wurden die Medien mit Streptomycin (0,12%) und Penicillin (0,1%) versetzt. Anschließend erfolgte eine Sterilfiltration durch einen Partikelfilter der Porengröße 0,45 µm (Fa. Millipore, Eschborn).

Vor dem Gebrauch wurden Glasgefäße, Präparierbesteck, Pipettenspitzen und Eppendorf-Caps einer Hitzesterilisation unterzogen.

2.6.3 Präparation der Gewebe

Die für die Experimente ausgewählten männlichen Grillen wurden in Wasser narkotisiert und ihre Oberfläche mit 70% Ethanol gründlich desinfiziert. Unter einer Sterilbank in einer mit kalter Ringerlösung gefüllten Wachsschale wurden die Tiere mit Stecknadeln fixiert, auseinandergezogen und je nach Bedarf und Fragestellung verschiedene Organe präpariert. Die präparierten Gewebe wurden in einer mit sterilem Grace's Medium gefüllten Schale für 10 min unter leichtem Schwenken gewaschen, um eventuell anhaftende Hämolymphe bzw. gelöste Ecdysteroide zu entfernen.

2.6.3.1 Oenocyten

Die Oenocyten (Abb. 2-4) befinden sich ventrolateral im Abdomen und sind einzeln oder als Cluster in den Fettkörper eingebettet.

Die Tiere wurden in einer Präparierschale auf der Dorsalseite fixiert. Unter dem Binokular und Zuhilfnahme einer Mikroschere wurde das Abdomen lateral von beiden Seiten geöffnet und die Oenocyten als Ganzes vorsichtig herauspräpariert. Anschließend wurden die Oenocyten von Epidermis und Tracheenstämmen befreit und abgeschabt.

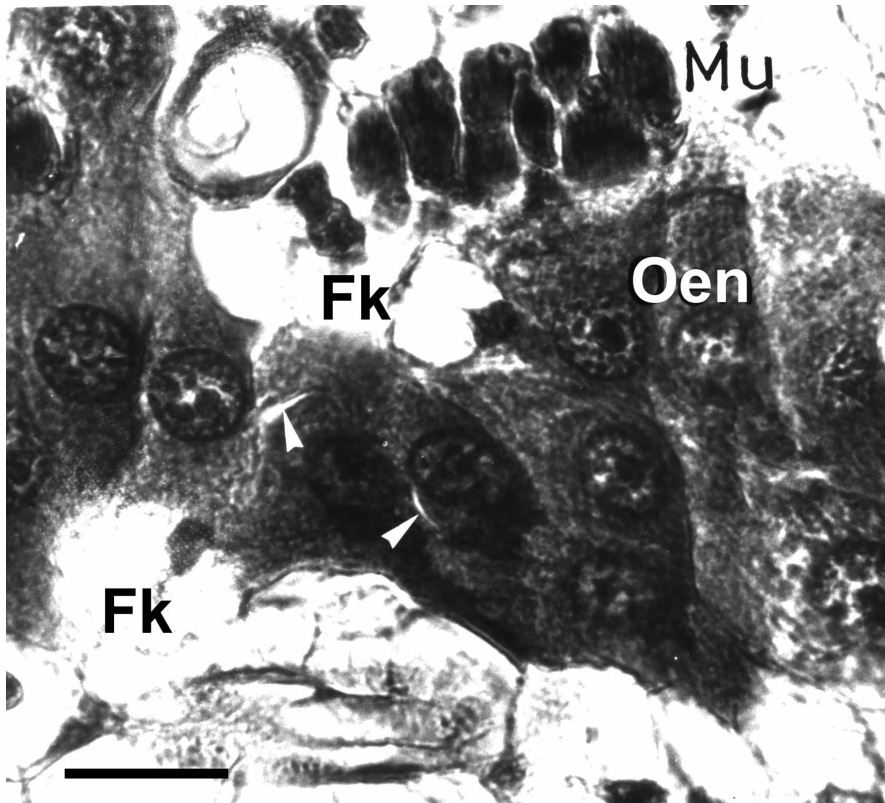


Abb. 2-4: Längsschnitt durch das Abdomen von *Gryllus bimaculatus*. Die Oenocyten liegen in Bündeln im Fettkörper. Die Pfeile weisen auf Clefts.

Oen = Oenocyten, Mu = Muskel, Fk = Fettkörper, Balken = 30 μm (Aufnahme freundlichst überlassen von Prof. Romer)

2.6.3.2 Tergite

Als Tergite im engeren Sinne bezeichnet man die sklerotisierten Abschnitte des dorsalen Außenskeletts. Für Inkubationsexperimente wurden nur abdominale Tergite verwendet. An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß die Tergite eng mit Epidermis, Muskulatur und Herz verwachsen sind. Eine Inkubation der Tergite hat vornehmlich zum Ziel, die Synthesefähigkeit der Epidermis zu testen.

2.6.3.3 Thorakaler Fettkörper

Durch Ausschaben des Thorax wurde den Tieren Fettkörpergewebe entnommen. Dieses Fettkörper weist keine Oenocyten auf.

2.6.3.4 Prothorakaldrüse

Die Untersuchungen wurden an Nymphen vor der Adulthäutung durchgeführt. Im Gegensatz zu den meisten übrigen Insektenordnungen ist die Prothorakaldrüse (Abb. 2-5a & 2-5b) bei *Gryllus bimaculatus* zu einem unpaaren Komplex verschmolzen, der sich netzartig zwischen den Tracheen ausbreitet und mit diesen in Verbindung steht (Beaulaton, 1990; Martau & Romer, 1998). Charakteristisch ist das "tigerfellartige" Aussehen (Joly, 1968). Die Drüse liegt im Halsbereich und ragt mit dem hinteren Anteil in das erste Thoraxsegment hinein. Zur Präparation wurde der Thorax unter dem Binokular von dorsal geöffnet und der Darm zur Seite geklappt. Daraufhin wurde die Drüse mit dem umgebenden Gewebe herauspräpariert. Im nächsten Schritt wurde sie auf einer Glasplatte vom anhängenden Fettkörper, den Speicheldrüsen und den Tracheen befreit.

Vor der Präparation der Prothorakaldrüsen wurden die Tiere einen Tag lang nicht gefüttert, um einer Kontamination durch austretenden Darminhalt vorzubeugen.

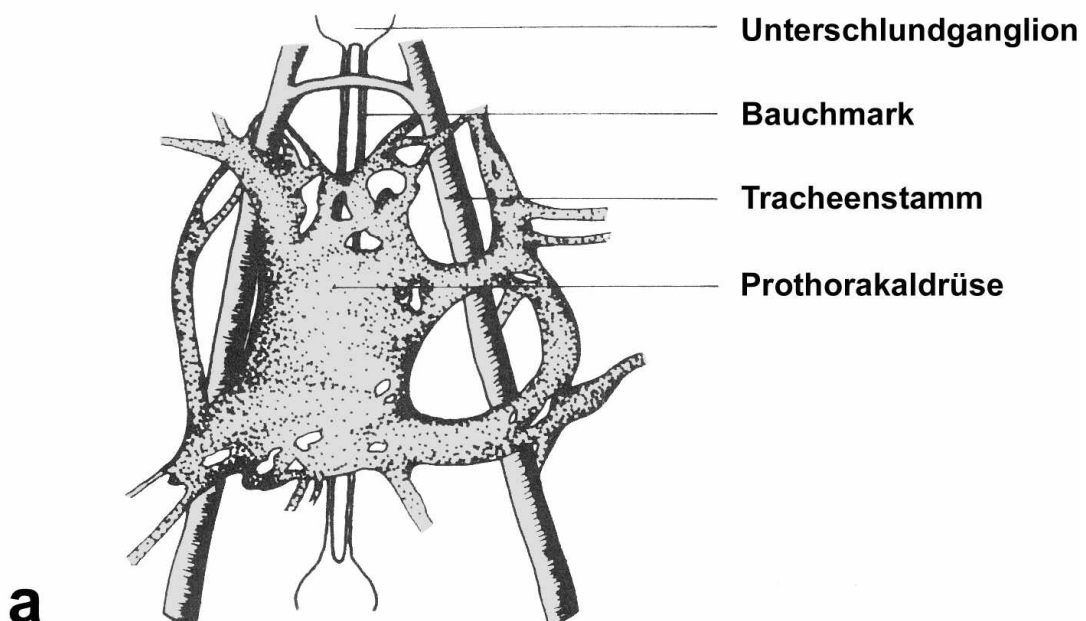


Abb. 2-5a: Prothorakaldrüse von *Gryllus bimaculatus* in situ.

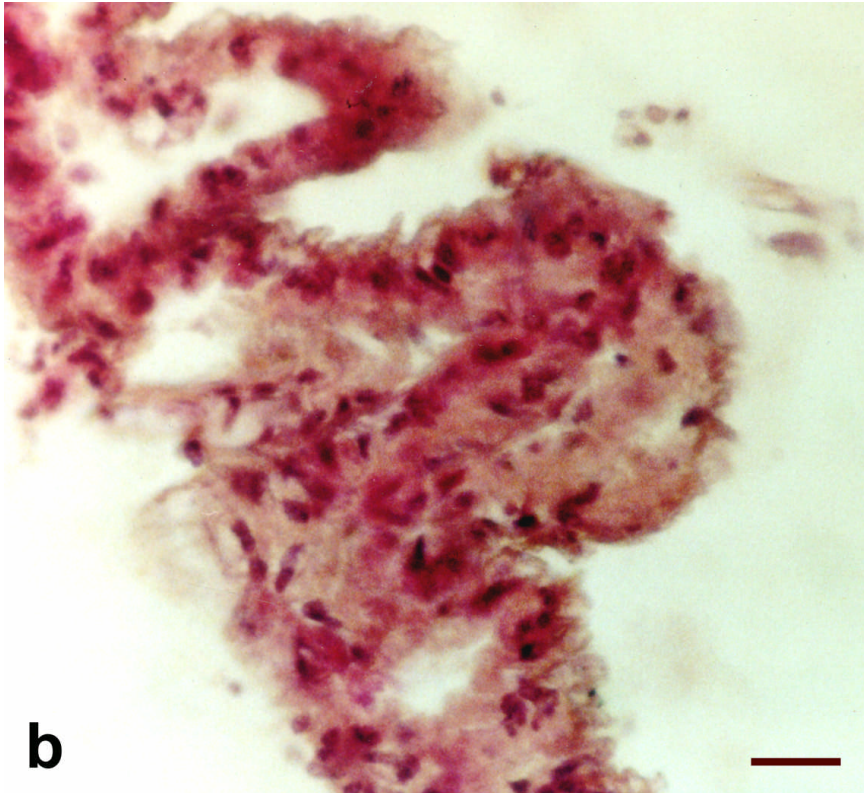


Abb. 2-5b: Schnitt durch die Prothorakaldrüse von *Gryllus bimaculatus* am 4. Tag des letzten Larvenstadiums. HE-Färbung (Balken = 20 µm)

2.6.4 Bioassay und *in vitro*-Inkubationsversuche

Die Gewebe bzw. Organe wurden aus dem Tier herauspräpariert und für definierte Zeiten je nach Fragestellung mit oder ohne Testsubstanzen im Dunkeln und bei Zimmertemperatur unter langsamem Schütteln inkubiert. Zur Bestimmung des Effekts von extrahierten Substanzen auf die Ecdysteroidsekretion wurde zunächst die Sekretionskinetik der präparierten Gewebe ermittelt. Dazu wurden die Gewebe in 500 µl Grace's Medium inkubiert. Während der insgesamt 6 bis 8 Stunden andauernden Inkubation wurde stündlich das Inkubationsmedium durch frisches Medium ersetzt. Das entnommene Medium wurde mit gleichem Volumen absolutem Methanol fixiert, durch Sep-Pak-Kartuschen in die verschiedenen Klassen aufgetrennt und die 60%-Fraktionen einem Radioimmunoassay unterzogen.

Um die biologische Aktivität von Kopfextrakten zu testen, wurden die mittels HP-SEC (s. Kap. 2.7.2) aufgetrennten Fraktionen untersucht. Die Fraktionen wurden in fünf Gruppen unterteilt, durch Vakuumzentrifugation von ihrem Elutionsmittel befreit

und anschließend mit Grace's Medium versetzt. Nach dem Gruppentest wurden die Fraktionen der aktiven Gruppe nochmals einzeln auf ihre stimulierende Wirkung getestet. Bei einigen Inkubationsversuchen mit Tergiten wurde das Gewebe unter dem Binokular in zwei gleiche Hälften geteilt und getrennt in Gegenwart von den zu testenden Substanzen inkubiert. Eine Hälfte diente dabei als Kontrolle, die andere Hälfte als Testgewebe. Nach der Inkubation wurden die Ecdysteroide, die von den Tergiten in das Medium sezerniert wurden, mittels RIA bestimmt. Die Wirkung der Testsubstanz aus HP-SEC wurde als „Aktivationsfaktor“ (Faktor > 1) ausgedrückt. Dieser Faktor wurde ermittelt, indem die Menge des Ecdysteroids, das von der experimentellen Hälfte abgegeben wurde, durch die von der Kontrollhälfte sekretierte Menge dividiert.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Konzentrierung von Proteinlösungen mittels Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration werden Partikel durch Anlegen eines erhöhten hydrostatischen Druckes an einer Ultramembran definierter Porenweite abgetrennt. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Schnelligkeit und dem Erhalt nativer Strukturen während des Konzentrationsprozesses.

Mittels Zentrifugation wurden Proben bis zum einen Endvolumen von 100 µl eingengt. Zuerst wurde in den Probenraum der Konzentratoreinheit, die eine Ausschlußgrenze von 10 kDa hatte (Centricon® Plus-20, Fa. Millipore, Eschborn) ddH₂O eingefüllt, um die Membran zu benetzen. Nach 15 min wurde das Wasser durch Zentrifugation bei 4000 g und 4° C entfernt und die Proben in den Konzentrator eingefüllt. Die Zentrifugation zur Einengung der Probe wurde solange durchgeführt, bis das gewünschte Endvolumen erreicht war. Schließlich wurde der Konzentrator umgedreht in ein neues Zentrifugenröhrchen eingesetzt und das Konzentrat durch Zentrifugation bei 250 g für 1 min entnommen.

2.7.2 Molekulargewichtsbestimmung mittels Größen-Ausschlußchromatographie (HP-SEC)

Das System erlaubt die analytische Trennung von Proben, die weniger als 1 µg Protein enthalten. Die hohe Kapazität der Säule gestattet es auch, präparative Trennungen bis zu 5 mg Protein pro Lauf ohne Überladungseffekte durchzuführen. Als Trennsäulen wurden zwei Styrogel-Proteinsäulen der Firma Waters (Milford, USA) verwendet.

200 Köpfe (ca. 16 g) aus 11 Tage alten adulten männlichen Grillen wurden unter CO₂-Betäubung im Eisbad abgetrennt, in 15 ml Methanol:ddH₂O:Trifluoressigsäure (90:10:0,1; v/v/v) mittels eines Glas-Glas-Homogenisators (Dounce, Fa. Braun, Melsungen) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 12,000 g und 4° C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in konischen Durangläsern (Fa. Schott, Mainz) überführt, durch eine Vakuumkonzentrations-Zentrifuge (Fa. Bachofer, Reutlingen) auf 200 µl reduziert und auf zwei in Tandem geschaltete Protein-Pak 125 Säulen (7,8 mm x 30 cm) geladen. Die Einzelfraktionen wurden in Abständen von 30 Sekunden gesammelt, eingeeengt und schließlich in 200 µl Grace's Insektenmedium aufgenommen. Die Proben wurden nicht eingefroren (persönliche Mitteilung von Dr. Fescemyer, Clemson University) sondern bei 4° C aufbewahrt und spätestens innerhalb einer Woche auf ihre Wirkung im Bioassay gemäß 2.6.4 überprüft. Als Molekulargewichtsmarker stand ein Kit (MW-GF-70) der Firma Sigma zur Verfügung. Die Säule wurde mit Rinderserumalbumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) kalibriert. Das Ausschlußvolumen (V₀) für Dextran-Blau (2000 kDa) betrug 12,5 ml.

Konditionen:

Laufmittel:	Acetonitril:ddH ₂ O:Trifluoressigsäure (40:60:0,1; v/v/v)
Flußrate:	1 ml/min
Temperatur:	4° C
Wellenlänge:	280 nm
Säulentyp:	Diol-gebundenes Silikagel (Trennbereich: 2 bis 80 kDa)

2.7.3 Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der extrahierten Faktoren

Die durch HP-SEC aufgetrennten Fraktionen, die im Bioassay eine Erhöhung der Ecdysteroidsekretion verursachten, wurden gepoolt und auf ihre biochemischen Eigenschaften untersucht. Um zu überprüfen, ob die aus Köpfen von *G. bimaculatus* extrahierten Faktoren nach der Hitzebehandlung bzw. Inkubation mit verschiedenen Substanzen noch weiterhin ihre biologische Aktivität beibehielten, wurden die gepoolten Fraktionen, die in Grace's Medium gelöst waren, noch einmal dem Aktivitätstest unterzogen.

2.7.3.1 Hitze-Behandlung

Die gepoolten Fraktionen wurden bei 100° C für 1 bis 4 min im Wasserbad inkubiert und im Bioassay getestet.

2.7.3.2 Alkylierung mit N-Ethylmaleimid

N-Ethylmaleimid (NEM) wird als Sulfhydryl-Reagenz bezeichnet und zur Untersuchung von Sulfhydrylgruppen eingesetzt. Zur Alkylierung wurden 0,1 mg NEM der Firma Sigma in 50 µl 0,05 M Tris-HCl, pH 7,8 mit 6 M Harnstoff, 1 mM EDTA-2Na und 2% n-Butanol gelöst und mit dem gleichen Anteil der gepoolten HP-SEC-Fraktionen kräftig gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kontrollen enthielten kein NEM.

2.7.3.3 Reduzierung durch Dithiothreitol

Es wurde der Versuch gemacht, die Disulfidbrücken der extrahierten Faktoren durch Dithiothreitol (DTT) zu reduzieren. Zur Reduzierung wurde in dem unter 2.7.3.2 beschriebenen Puffer 0,1 mg DTT gelöst, kräftig mit den gepoolten Fraktionen gemischt und nach 90 min *in vitro* getestet.

2.7.3.4 Enzymatischer Verdau

I. Trypsin

Trypsin aus Rinderpankreas (2750 NF units/mg, Fa. Serva) wurde in 1 mM HCl mit 20 mM CaCl₂ in einer Konzentration von 10 µg/ml gelöst. 10 µl der Enzym-Lösung wurden dann mit 50 µl der aktiven Probe bei 30° C für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert und anschließend für 2 min in kochendem Wasser erhitzt. Enzym und Substrat hatten ein Volumenverhältnis von 1 zu 5.

II. Leucin-Aminopeptidase M

Aminopeptidase aus Schweinenieren (10 units/vial, Fa. Sigma) wurde in 0,1 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 8,1) in einer Konzentration von 1 mg/100 µl gelöst und bei 37°C für 24 Stunden mit der Probe inkubiert und schließlich bei 100° C für 2 min erhitzt. Enzymlösung und Substrat hatten ein Volumenverhältnis von 2,5 zu 1.

III. Carboxypeptidase A

Carboxypeptidase A aus Rinderpankreas (41,2 units/mg, Fa. Sigma) wurde in einer Konzentration von 500 µg/ml in 0,1 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 8,1) mit 10% NaCl gelöst. 50 µl der Enzym-Lösung wurden mit 50 µl Probe bei 37° C für 24 Stunden inkubiert und danach in kochendem Wasser für 2 min erhitzt. Enzymlösung und Substrat hatten ein Volumenverhältnis von 1 zu 1.

IV. Neuramidase

Neuramidase, ein Zucker-spaltendes Enzym, aus Bakterien der Gattung *Clostridium perfringens* (1 unit/vial, Fa. Sigma) wurde in einer Konzentration von 1 µU/ml in 0,1 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,5) gelöst. 1 ml der Enzymlösung wurde dann mit 50 µl der biologisch aktiven Probe bei 37° C für eine Stunde inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch Kochen im Wasserbad für 2 min gestoppt.

2.7.4 Vorbereitung und Auftrennung von Proben mittels Elektrophorese

Die Köpfe von 11 Tage alten adulten männlichen *G. bimaculatus* sowie Köpfe von fünften Larvenstadien von *B. mori* an Tag 3 (erhöhte PTTH-Konzentration, Shirai et al., 1993) wurden unter Narkose abgetrennt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70° C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt.

Je etwa 200 Köpfe der Grillen (ca. 16 g) bzw. der Seidenspinnerraupe (ca. 4 g) wurden in einem vorgekühlten Porzellanmörser pulverisiert. Das Pulver wurde in 15 ml 2% NaCl im Eisbad mittels eines Homogenisators (Potter, Fa. Braun, Melsungen) zerkleinert, für 2 min im Wasserbad bei 100° C erhitzt und danach sofort für 10 min eisgekühlt. Anschließend wurden die Homogenate bei 10000 g und 4° C für 20 min zentrifugiert. Das Volumen des Überstandes wurde gemäß 2.7.1 auf 100 µl reduziert.

2.7.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung erfolgte mit Hilfe des von Laemmli (1970) beschriebenen Gel- und Puffersystems unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Die hierbei verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen.

Acrylamid/Bis-Lösung (30% T, 2,67% C)

Acrylamid: 29,2 g
 Bis-Acrylamid: 0,8 g
 mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen.

SDS-Probenpuffer:

ddH ₂ O	3,8 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,0 ml
Glycerin	1,6 ml
10% Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	3,2 ml
1 M Dithiothreitol (DTT)	0,8 ml
1% (w/v) Bromphenolblau	0,4 ml

Elektrodenpuffer (pH 8,8):

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1% SDS

Verwendet wurde das Mini-Protean® II-System (Fa. Biorad, München) mit einer Geldicke von 1 mm. 12% ige Trenngele mit einem 4% igen Sammelgel wurden folgendermaßen hergestellt:

<i>Reagenzien</i>	<i>12% Trenngel</i>	<i>4% Sammelgel</i>
ddH ₂ O	3,35 ml	3,0 ml
Acrylamid-Bis	4,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris-HCl (pH8,8)	2,5 ml	-----
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-----	1,25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	100 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Die Proben wurden im Verhältnis von 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 100° C für 4 min denaturiert, anschließend für 3 min bei 10000 g zentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Als Markerproteine wurden die Standards SDS-7 Dalton-Mark VII-L und SDS-6H Standards der Firma Sigma verwendet. Die Elektrophorese fand bei 200 Volt statt, bis die Bromphenolblau-Front (700 Da) nach ca. 50 min das untere Gelende erreichte.

2.7.5 Färbung der Gele

Alle Färbe- und Entfärbeschritte wurden auf einem Gelschüttler (KS 10, Fa. Bühler, Tübingen) bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.7.5.1 Coomassie Brilliantblau R-250

Färbefixierlösung: 0,2% Coomassie Blau in 45% Methanol, 10% Essigsäure

Entfärbelösung: 5% Methanol, 10% Essigsäure

Die Gele wurden für ca. 90 min in Färbelösung inkubiert, in Entfärbelösung bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes differenziert, dokumentiert und anschließend in 7% Essigsäure bei 4° C aufbewahrt.

2.7.6 Western-Blotanalyse

Bei dieser Methode werden elektrophoretisch getrennte Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Membran übertragen (Burnette, 1981). Der Nachweis der gewünschten Proteine erfolgt durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern, deren Bindung anschließend durch ein geeignetes Nachweissystem sichtbar gemacht wird. Antikörper können auf diese Weise auf ihre Eignung überprüft werden.

2.7.6.1 Semidry-Blotting

Das hier beschriebene Protokoll bezieht sich auf das diskontinuierliche Puffersystem nach Kyhse-Andersen, (1984).

Anodenpuffer I:

300 mM Tris-HCl, pH 10,4

20% Methanol (v/v)

Anodenpuffer II:

25 mM Tris-HCl, pH 10,4

20% Methanol (v/v)

Kathodenpuffer:

25mM Tris-HCl, pH 9,4

40 mM DL-Norleucin (Fa. Sigma, Deisenhofen)

PBS (pH, 7,4):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

Ponceau S Färbelösung:

0,2% Ponceau S

3% Trichloressigsäure

3% Sulfosalicylsäure

Die Proben wurden zunächst auf einem Gel aufgetrennt. Der Proteintransfer auf die Protran[®]-Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 µm (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte in einem SD 1-Kammersystem der Firma Cti (Idstein). Zunächst wurden 16 Blottingpapiere und ein Stück Nitrozellulosemembran entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten. Von den Blottingpapieren wurden kurz vor Gebrauch sechs Stück in Anodenpuffer I, vier in Anodenpuffer II und sechs blasenfrei in Kathodenpuffer eingelegt. Die Transfermembran wurde in Anodenpuffer II eingelegt, das Gel für 5 min in Kathodenpuffer inkubiert. Auf die Anodenplatte wurden nacheinander die Blottingpapiere aus Anodenpuffer I und II aufgelegt und Luftblasen herausgewalzt. Auf die Blottingpapiere wurden die Nitrozellulosemembran, das Gel und zuletzt die Blottingpapiere aus dem Kathodenpuffer aufgelegt und glattgewalzt. Nach dem Auflegen der Kathodenplatte wurde der Proteintransfer bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 45 min. ausgeführt. Im Anschluß wurde die Membran entfernt, mit Ponceau-S-Färbelösung kurz angefärbt, die Markerbanden angezeichnet und mit Waschpuffer PBST (PBS + 0,05% Tween 20) entfärbt.

2.7.7 Detektion von Proteinen auf Membranen

Es wurden zwei spezifische Antikörper gegen prothorakotropes Hormon von *Bombyx mori* von Prof. Mizoguchi, Nagoya University zur Verfügung gestellt, die gemäß Mizoguchi, et al. (1990) hergestellt wurden:

ein affinitätsgereinigter muriner monoklonaler Antikörper (IgG) gegen die 15 Aminosäurereste des N-Terminus von PTTH und ein affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenantiserum gegen ganze Sequenzen rekombinanten PTTHs. Die beiden Antikörper (1mg/ml IgG) wurden im Verhältnis von 1:1000 verdünnt.

Als sekundärer Antikörper wurden Ziege-anti-Maus und Ziege-anti-Kaninchen jeweils gekoppelt mit Peroxidase (Fa. Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:7500 verwendet.

2.7.7.1 Markierung von Proteinantigenen mit spezifischen Antikörpern

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran für 60 min. bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (1% (v/v) Ziegenserum (Fa. Dianova) in PBST-Puffer) inkubiert. Anschließend wurde die so vorbehandelte Membran mit dem in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper in Plastikfolie eingeschweißt und für zwei Stunden auf einem Rotationsbrett inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für je 5 min. in PBST gewaschen und danach für 60 min. bei Raumtemperatur mit dem in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörper-Konjugat inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBST-Puffer erfolgte schließlich die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe.

2.7.7.2 Nachweis der Antigen/Antikörper-Komplexe durch Chemolumineszenz

Die Detektion des Antigens erfolgte hierbei mit Hilfe eines an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpers im Picogrammbereich. Die Anwendung basiert auf der Lichtemission bei der Oxidation von Luminol. Die dazu verwendeten

Reaktionslösungen Nowa[®] A und B wurden als Kits freundlicherweise von der Firma Energene in Regensburg zur Verfügung gestellt.

Gleiche Teile Nowa[®] A und B wurden gemischt, gleichmäßig auf einer Nitrozellulosemembran verteilt, 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert, in Plastikfolie eingewickelt, zum Exponieren bei Rotlicht mit einem Röntgenfilm (Fa. Agfa, Leverkusen) für 3 min. abgedeckt und gemäß Herstellerangaben entwickelt und fixiert.

2.7.8 Protein/Peptid-Sequenzanalyse

Die in diesem Abschnitt eingesetzten Methoden der Protein/Peptid-Sequenzierung und Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) wurden freundlicherweise von Herr Dr. Marcus Macht, Zentrum für Molekulare Medizin der Universität Köln, durchgeführt.

Zur Sequenzierung wurde der teilgereinigte Proteinextrakt aus den Köpfen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Porablot[®]-PVDF-Membran (Fa. Macherey-Nagel, Düren) gemäß 2.7.6.1 geblottet. Zunächst wurde versucht, die Aminosäuresequenzen ausgehend vom N-terminalen Ende zu bestimmen. Der proteolytische Abbau wurde entsprechend der Methode von Eckerskorn und Lottspeich (1989) mit Trypsin oder Endoprotease Glu-C (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die so entstehenden Peptidfragmente wurden mittels HPLC aufgetrennt und nach dem Prinzip des Edman-Abbaus sequenziert. Beim Edman-Abbau werden am Aminoende des Proteins schrittweise einzelne Aminosäuren abgespalten. Die entstandenen Aminosäurederivate wurden chromatographisch aufgetrennt und identifiziert. Proben mit blockiertem N-Terminus wurden MALDI-MS-Messungen unterzogen. Als Matrix wurde 4-Hydroxy-a-cyanozimtsäure (Fa. Sigma, Deisenhofen) verwendet. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV bei einer Reflektorspannung von 26,3 kV. Die Kalibrierung erfolgte extern mit einem Gemisch aus mehreren Peptiden mit Massen zwischen 1045 und 2465 Da.

Die ermittelten Sequenzen wurden in Proteindatenbanken mit bereits bekannten verglichen.

2.7.8.1 Suche nach Sequenzübereinstimmungen

Zur Identifizierung der Proteine wurde das Programm „Mascot“ von Matrix Science (London) verwendet. Zur Datenbanksuche wurden dabei entweder nur die Peptidmassen oder, soweit verfügbar, zusätzliche Informationen aus Tandem-MS-Spektren eingesetzt. Als Modifizierung wurde eine vollständige Cystein-Modifizierung mit Iodacetamid sowie die partielle Oxidation an Methionin berücksichtigt. Wenn in der NCBI-Datenbank kein passendes Protein identifiziert werden konnte, wurde die Suche unter Verwendung der Tandem-MS-Daten in der dbEST-Datenbank (Expressed Sequence Tags Database) wiederholt. Bei längeren Sequenzabschnitten wurde darüberhinaus mit dem Programm MS-Edman von Klauser und Baker (<http://jpsl.ludwig.edu.au/htmlucsf/msedman.htm>) gesucht.

2.8 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der extrahierten Faktoren

Zur Untersuchung der Signaltransduktion von ecdysiotropen Faktoren wurde die Wirkung von verschiedenen Signalsubstanzen überprüft. Dafür wurden folgende Wirkstoffe ausgesucht: Dibutyryl-cyclisches AMP (dbcAMP), 8-Brom-cyclisches AMP (8-Br-cAMP), Forskolin, 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) sowie Ionomycin. Außer 8-Br-cAMP (Fa. Rbi, Natick, USA) wurden alle anderen Substanzen von der Firma Sigma bezogen.

2.8.1 Bestimmung des intrazellulären cyclischen Adenosin-3',5'-monophosphats (cAMP) mittels Radiorezeptorassay (RRA)

Die Methode basiert auf dem von Steiner et al. (1972) beschriebenen Assay für zyklische Nukleotide. Wie in der Abbildung 2-6 gezeigt, konkurrieren hierbei das unmarkierte cAMP des Standards oder der Probe mit dem radioaktiven cAMP-Tracer um die Bindung an einem Protein aus Rindermuskel, welches eine hohe Spezifität und Affinität zum cyclischen AMP aufweist. Die Menge an gebundener Radioaktivität ist

ein Maß für die cAMP-Konzentration in der Probe, die an einer linearen Eichgeraden abgelesen wird (Abb. 2-7).

Für die cAMP-Konzentrationsbestimmung wurde das cyclic AMP [^3H] Assay System (code TRK 432) von der Firma Amersham (Freiburg) verwendet. Nach Angaben des Herstellers waren Kreuzreaktionen mit ATP und cGMP ausgeschlossen. Auch die Aktivität der Phosphodiesterase wurde aufgrund des verwendeten EDTA in dem Assay entscheidend gehemmt. Ohne einen Probenacetylierungsschritt betrug die meßbare Konzentration von cAMP im Assay zwischen 0,2 und 16 pmol pro Röhrchen.

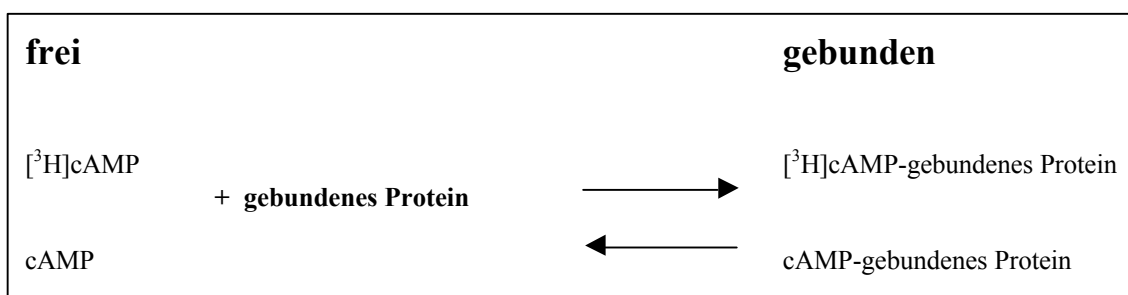


Abb. 2-6: Radiorezeptorassay. Konkurrenz zwischen unmarkierten und markierten (^3H -cAMP) cAMP um die Bindung an einem Protein aus Rindermuskel.

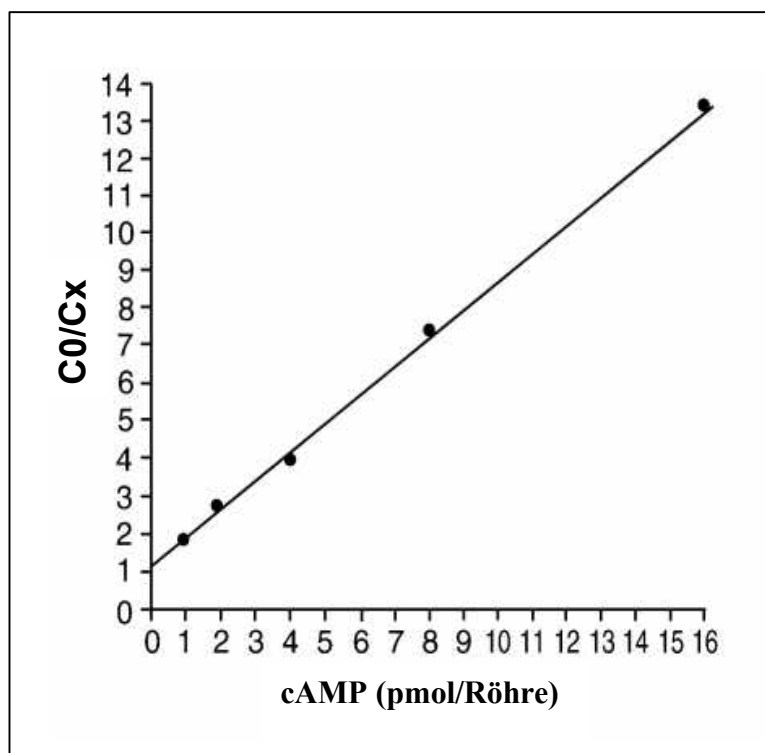


Abb. 2-7: Eine typische cAMP-RRA-Eichkurve nach der Anleitung des Herstellers. Auf der Abszisse ist die Konzentration von cAMP in pmol aufgetragen. Co/Cx auf der Ordinate beschreibt das Verhältnis von gebundener Radioaktivität in Abwesenheit von unmarkiertem cAMP (Co) zur freien Aktivität in Anwesenheit von Standard bzw. unbekanntem unmarkiertem cAMP (Cx).

2.8.2 Extraktion des cAMP aus Gewebe

Nach der Inkubation wurden die Gewebe in Eppendorf-Gefäße mit eisgekühltem Ethanol überführt, homogenisiert und für 5 min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Homogenat wurde bei 2000 g für 15 min. zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Präzipitat mit Ethanol:ddH₂O (2:1) gewaschen und rezentrifugiert. Die Überstände wurden gepoolt und unter Vakuum bei 55° C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in Assaypuffer (0,05 M Tris, 4 mM EDTA, pH 7,5) gelöst und dem cAMP-RRA unterworfen.

2.8.3 Inkubation der Oenocyten mit dbcAMP, Forskolin, 8-Br-cAMP und IBMX

Die Substanzen wurden in Grace's Insektenmedium zu Endkonzentrationen zwischen 10 bis 100 µM gelöst.

2.8.4 Inkubation der Oenocyten mit Ionomycin

Es wurde eine Stammlösung in einer Konzentration von 1 mM Ionomycin (Calcium-Ionophor) in Grace's Medium angesetzt und bei -20° C gelagert. Aus der Stammlösung wurden verschiedene Konzentrationen zwischen 0,01 und 100 µM hergestellt. Nach Angaben der Firma Gibco hatte das Grace's Medium (Inkubationmedium) eine Calcium-Konzentration von 5 mM.

2.9 Histologische Methoden

2.9.1 Indirekter immunohistochemischer Nachweis von Ecdysteroiden

Die immunohistochemische Darstellung einer Antigen-Antikörper-Reaktion in Zellen und Geweben erfordert eine Vorbehandlung des nativen Gewebes, deren Hauptziel die Erhaltung der Antigenstruktur sowie der Zell- und Gewebestrukturen und der

Antigenzugänglichkeit ist. Da die in Zellen und Geweben vorliegenden Antigene durch strukturelle Vielfalt gekennzeichnet sind, müssen die einzelnen Vorbehandlungsverfahren speziell auf das nachzuweisende Antigen abgestimmt sein.

Um Ecdysteroide *in situ* lokalisieren zu können, wurde die indirekte Immunofluoreszenztechnik verwendet. Das Prinzip der Methode basiert auf der Verwendung von zwei Antikörpern, die aufeinander abgestimmt sind (Abb. 2-8). Der primäre Antikörper gerichtet gegen Ecdysteroide stammt vom Kaninchen, gegen den ein sekundärer Antikörper vom Schwein (Fa. Dako, Hamburg) eingesetzt wurde. Dieser sekundäre Antikörper war mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) konjugiert. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines Filters mit einer Anregungswellenlänge von 450 bis 490 nm im Fluoreszenzmikroskop (Leica, Solms) sichtbar gemacht.

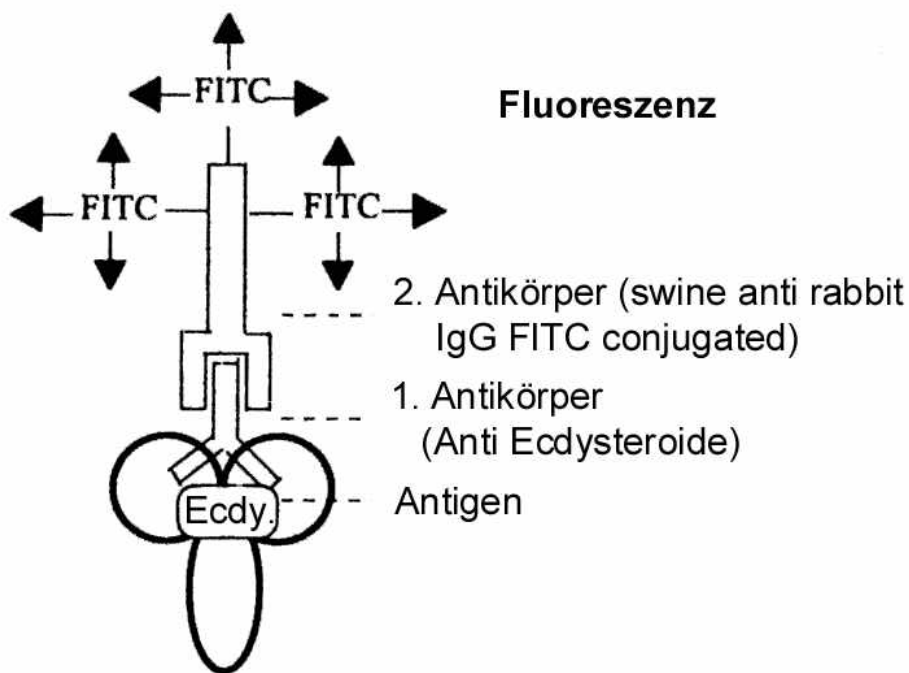


Abb. 2-8: Prinzip der indirekten Immunofluoreszenztechnik

2.9.1.1 Durchführung der Immunofluoreszenzmarkierung

Es wurden sowohl Totalpräparate als auch Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 10 µm untersucht.

- Präparate 2 Stunden mit 4% Paraformaldehyd in 100 mM PBS (pH 7,4) fixieren
- 3 x auswaschen für je 15 min. mit PBS + 1% BSA
- 120 min. Inkubation in PBST (PBS + 0,1% Tween-20) oder PBS + 0,3% Triton X100
- 3 x auswaschen für je 15 min. mit PBS
- 30 min Inkubation mit 1% NaBH₄ in PBS gegen Eigenfluoreszenz
- 3 x auswaschen für je 15 min. in PBS
- Umranden des Objekts mit einem PAP-Pen-Stift
- Inkubation über Nacht bei 4° C mit dem primären Antikörper (1:100 mit PBS verdünnt)
- 3 x auswaschen für je 15 min. in PBS
- 60 min. Inkubation in Schweineserum (Fa. Dako) (1:100 in PBS)
- 3 x auswaschen für je 15 min. in PBS
- Inkubation über Nacht bei 4° C mit dem sekundären Antikörper (1:100 mit PBS verdünnt)
- 3 x auswaschen für je 15 min. in PBS
- Einbetten der Präparate mit Antifading-Mittel (Fa. Molecular Probes, Leiden, Netherlands)
- Versiegelung der Objektträger mit Nagellack
- fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Präparate (Anregungsspektrum 450-490 nm)

Die beschriebenen Arbeitsschritte wurden, soweit nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Testansatz mit primärem Antiserum bzw. ohne Antiserum. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop der Fa. Leica mit aufgesetzter Kamera.

2.9.2 Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin (HE-Färbung)

Die Gefrierschnitte wurden einer HE-Färbung unterzogen. Das Protokoll entspricht der in Romeis (1989) beschriebenen Methode, jedoch ohne Paraffineinbettung.

2.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Ermittlung der Signifikanzen wurde mit dem t-Test nach Student vorgenommen (Zöfel, 1985). Die Aufbereitung der statistischen Daten und die grafische Darstellung der Resultate erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 95 (Microsoft Corporation). Bei den Fehlerbalken handelt es sich um die Standardfehler der Mittelwerte ($\pm$ SEM = Standard Error of the Mean).

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung von Sekretionsprofilen ecdysteroidproduzierender Gewebe

Der Begriff Sekretion bezieht sich in der vorliegenden Arbeit im allgemeinen auf die Abgabe von Ecdysteroiden durch die inkubierten Gewebe oder Organe in das umgebende flüssige Medium. Sie ist nicht automatisch mit einer Synthesefähigkeit in Zusammenhang zu bringen, ebensowenig wie die Diffusion gespeicherter Ecdysteroiden ausgeschlossen werden kann.

3.1.1 Sekretionskinetik von Oenocyten, Tergiten und thorakalem Fettkörper

Um die Wirkung der die Ecdysteroidsekretion beeinflussenden Faktoren aus Kopfhomogenaten zu untersuchen, wurde zuerst der Verlauf des Hormonspiegels von Oenocyten, Tergiten und thorakalem Fettkörper in getrennten Versuchsreihen innerhalb mehrerer Stunden studiert. Dafür wurden Tiere von vier aufeinander folgenden Tagen, dem 9., 10., 11., und 12. Tag nach der Adulthäutung herangezogen, da aus früheren Untersuchungen (Romer & Shahab, 1984) bekannt war, daß deutliche Veränderungen im Ecdysteroidhormontiter an Ganztierextrakten zu verzeichnen sind. Daher wurde versucht, durch *in vitro*-Inkubationen herauszufinden, welche Gewebe definierten Alters sich am besten für die stimulierende Wirkung, der Kopfextrakte eignen.

Ein anderer Grund, der die Erstellung eines Sekretionsprofils zwingend notwendig machte, war die Tatsache, daß die untersuchten Organe bei *G. bimaculatus* nicht paarig angelegt sind und damit einen Vergleich zwischen der linken und rechten Hälfte praktisch unmöglich machen. Nur bei Tergiten ist aufgrund ihrer festen Struktur eine Halbierung in zwei gleiche Teile machbar.

Für die Erstellung des Sekretionsverlaufs wurde der Gehalt an freien Ecdysteroiden bestimmt und der im RIA ermittelte Wert an der Eichkurve für β -Ecdyson abgelesen.

Die dem Zeitpunkt Null zugrunde liegenden Werte basieren auf dem Ecdysteroidgehalt im Gewebe vor Beginn der Inkubation. Die Herstellung der durch RIA zu testenden Extrakte

erfolgte gemäß 2.4.1. Die angegebenen Werte bezeichnen Ecdysteronäquivalente pro Gewebe.

3.1.1.1 Oenocyten und Tergite

Das Sekretionsverhalten und die Menge an freigesetzten Ecdysteroiden wurden innerhalb definierter Zeitpunkte untersucht. Gemäß Abbildung 3-1 und 3-2, ließ sich am 12. Tag nach der Imaginalhäutung eine deutliche Zunahme der Ecdysteroidsekretion erkennen, wobei in den letzten Stunden der Inkubationszeit eine Abnahme der Ecdysteroidäquivalente zu verzeichnen war.

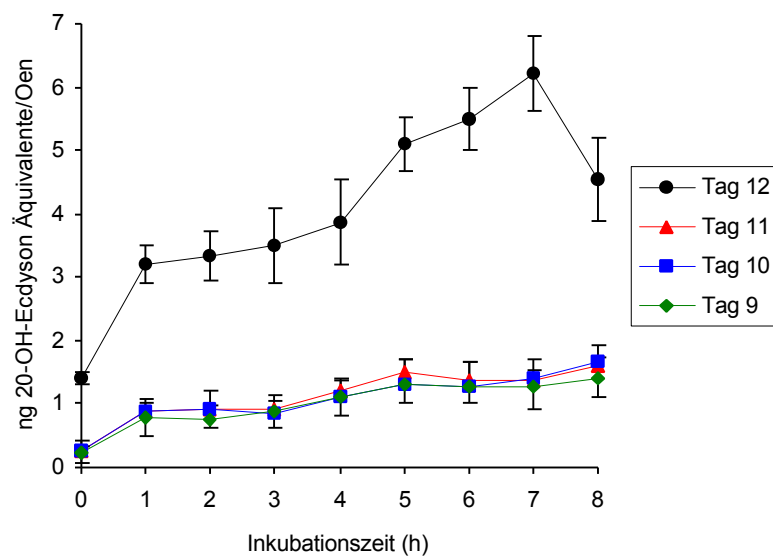


Abb. 3-1: *In vitro*-Sekretionskinetik der Oenocyten von adulten *Gryllus bimaculatus* Männchen an vier aufeinander folgenden Tagen nach der Imaginalhäutung. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von 10 bis 12 RIA-Bestimmungen.

An Tag 9, 10 und 11 wurde eine erheblich geringere Sekretionsaktivität verzeichnet, die einzelnen Werten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$). Dabei stellte sich heraus, daß im Gegensatz zu Oenocyten (Abb. 3-1), die in den ersten drei Stunden eine kontinuierliche Sekretion mit nahezu konstantem Verlauf aufweisen (0,8-0,9 ng), die Tergite von Beginn der Inkubation durch einen ständig steigenden Anstieg der

Sekretionsaktivität gekennzeichnet sind (Abb.3-2). Diese Tatsache ermöglicht einen Vergleich der Sekretionsleistung der Oenocyten innerhalb der ersten 3 Stunden mit und ohne Kopfextrakt.

Sowohl die Menge der in das Inkubationsmedium abgegebenen Ecdysteroide als auch die in Gewebehomogenaten lagen bei Oenocyten viel höher als bei Tergiten.

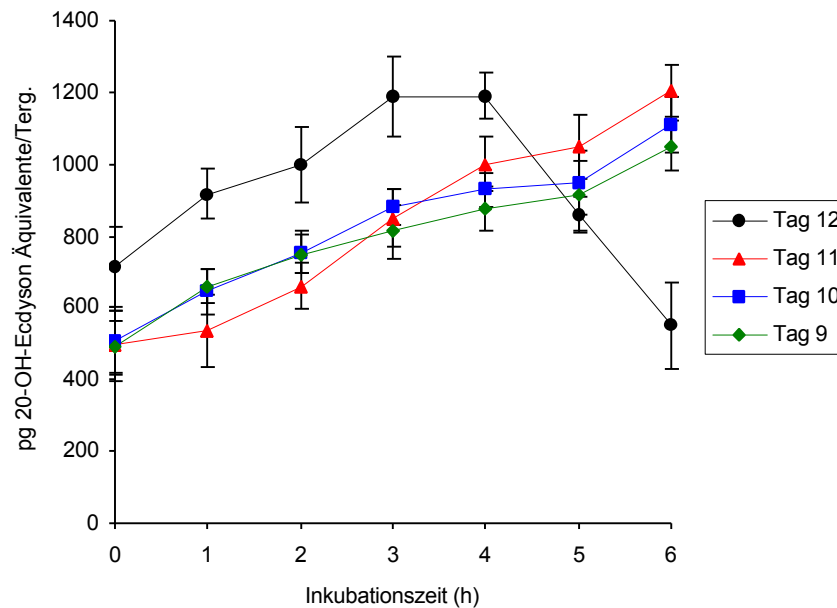


Abb. 3-2: *In vitro*-Sekretionskinetik der Tergite von adulten *Gryllus bimaculatus* Männchen an vier aufeinander folgenden Tagen nach der Imaginalhäutung. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von 6 RIA-Bestimmungen.

3.1.1.2 Thorakaler Fettkörper

Die Oenocyten sind bei *Gryllus* in den ventralen abdominalen Fettkörper eingestreut, so daß Teile des Fettkörpers mit inkubiert wurden. Deshalb wurde auch die Ecdysteroidsekretion von thorakalem Fettgewebe, die keine Oenocyten enthalten im Kontrollversuch untersucht. Abbildung 3-3 zeigt das Profil von 9 und 12 Tage Männchen nach der Imaginalhäutung.

Die Fettkörperzellen waren gekennzeichnet durch eine schwach abnehmende Sekretionsrate von einer bis vier Stunden Inkubationszeit. Danach konnte ein rasches Absinken der Ecdysteroidkonzentration zwischen der 4. und der 5. Stunde beobachtet werden. Bei

Inkubaten aus 9 Tage alten Grillen konnten nach sechs Stunden kaum noch Ecdysteroide mittels RIA nachgewiesen werden.

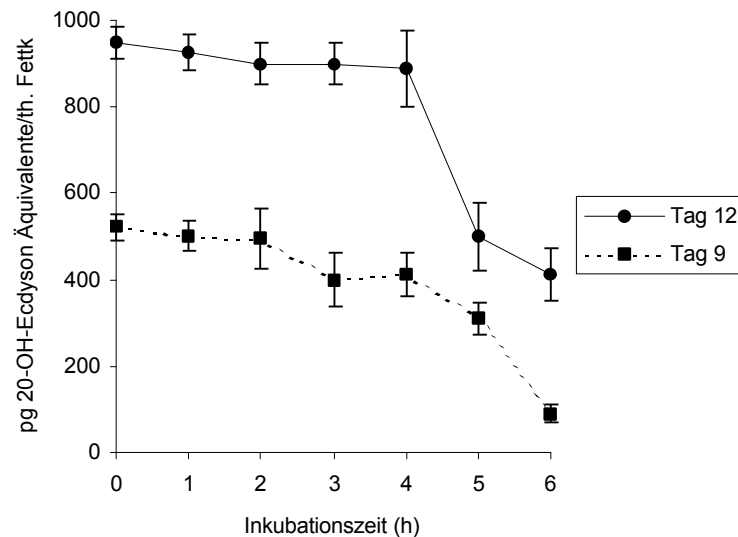


Abb. 3-3: *In vitro*-Sekretionskinetik des thorakalen Fettkörpers von adulten *Gryllus bimaculatus* Männchen an Tag 9 und Tag 12 nach der Imaginalhäutung.
Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von 6 RIA-Bestimmungen.

Aus den hier beschriebenen Ergebnissen für Oenocyten, Tergite und thorakalem Fettkörper geht hervor, daß einerseits das entwickelte *in vitro*-System die Erfassung der Sekretionsdynamik dieser Gewebe erlaubt und andererseits Tag 9 aufgrund seiner geringeren Sekretionsaktivität für den Test der Ecdysynthese-stimulierenden Faktoren besonderes geeignet ist.

3.1.2 Sekretionskinetik der Prothorakaldrüse

Bei den meisten Insekten liegen die Prothorakaldrüsen als paarige Organe im Prothorax. Das ist ein Vorteil für den Aufbau eines *in vitro* Bioassays. Bei *Gryllus* ist es aus anatomischen Gründen nicht möglich, die Drüse in zwei gleiche Hälften zu trennen, da die beiden Drüsenanteile verwachsen sind. Dieses Phänomen führt zu Schwierigkeiten beim Bioassay, da die Tiere physiologisch nicht gleich sind und deswegen auch nicht die gleiche Menge an Ecdysteroiden synthetisieren. Um diese Fehlerquelle möglichst gering zu halten,

wurde besonderes darauf geachtet, daß alle Versuchstiere ein ähnliches Gewicht von ca. 0,38 g besaßen.

Für diese Versuchsreihe wurden die Prothorakaldrüsen aus solchen Grillen herangezogen, die sich im vierten Tag des 9. Larvenstadiums befanden. Martau und Romer (1998) konnten zeigen, daß zu diesem Zeitpunkt eine niedrige Ecdysonkonzentration vorhanden ist.

Aus der Abbildung 3-4 ist zu ersehen, daß die Ecdyson-Synthese nur 3 Stunden linear verläuft. Danach zeigt sich eine Abnahme der Sekretion.

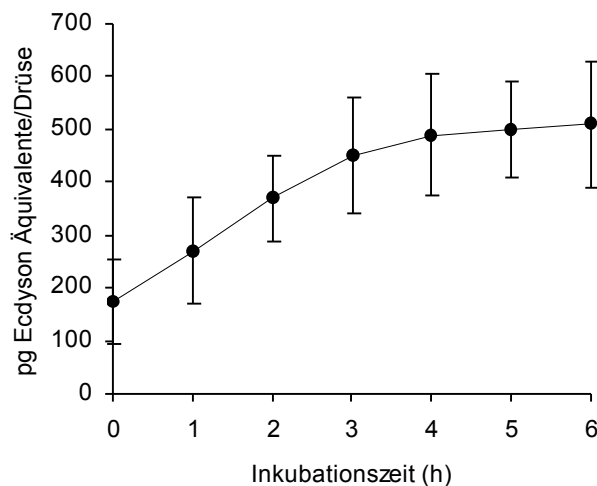


Abb. 3-4: *In vitro*-Sekretionskinetik der Prothorakaldrüse an Tag 4 einer Nymphe von *Gryllus bimaculatus* Männchen.

Die angegebenen Ecdysonäquivalente in pg wurden mit Hilfe einer Eichkurve mit authentischen α -Ecdyson ermittelt. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von 6 RIA-Bestimmungen.

3.2 Isolierung, Wirkung und Molekulargewichtsbestimmung der biologisch aktiven Faktoren aus Köpfen von Grillen

3.2.1 Erstellung einer Eichgeraden zur Molekulargewichtsbestimmung

Für die Kalibrierung der I-125 Trennsäulen standen vier Standardproteine sowie Dextran-Blau zu Verfügung. Abbildung 3-5 zeigt den linearen Zusammenhang zwischen dem gemessenen Elutionsvolumen (V_e : Elutionsvolumen oder normiert auf

V_0 als Ausschlußvolumen, V_e/V_0 charakterisiert den Retentionskoeffizienten) und dem Logarithmus der relativen Molmasse.

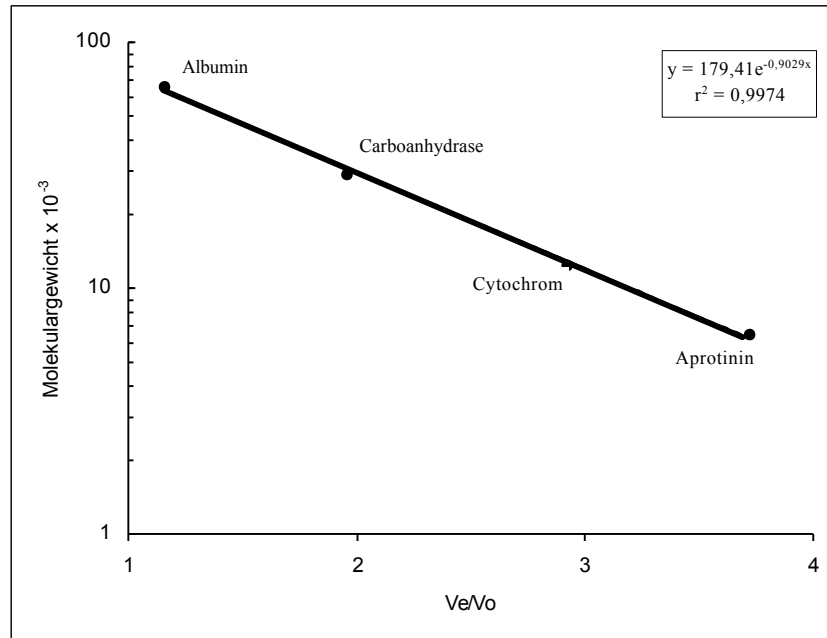


Abb. 3-5: Kalibrierungskurve der I-125 Trennsäulen.

Bei der in der Grafik angegebenen Formel, $y = 179,41e^{-0,9029x}$, handelt es sich um die Regressionsgleichung. Die Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten um $r^2 = 0,9974$. Es wurden Rinderserumalbumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom c (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) als Eichprotein verwendet. Die Retentionskoeffizienten (V_e/V_0) betrugen der Reihe nach 1,16; 1,96; 2,92 und 3,72 ml. Das Ausschlußvolumen (V_0 : void volume) für Dextran-Blau lag bei 12,5 ml.

3.2.2 Gruppentest

Etwa 200 Köpfe von 11 Tage alten adulten männlichen Grillen, mit einem Gesamtgewicht von ca. 16 g wurden gemäß 2.7.2 aufgearbeitet. Im Extrakt waren keine Ecdysteroide vorhanden (Bestimmung durch RIA). Somit konnte eine Beeinträchtigung der Befunde ausgeschlossen werden. Anschließend wurde der Extrakt mittels zwei hintereinander geschalteter Protein-Pak 125 Säulen chromatographiert und das Eluat im 30 Sekundentakt aufgefangen. Von Minuten 14 bis 50 wurden die Proben in fünf Gruppen zu je 15 Fraktionen unterteilt und gepoolt (G1: 14-21; G2: 21,5-28,5; G3: 29-36; G4: 36,5-43,5; G5: 44-50). Jede Gruppe wurde *in vitro* auf ihre Wirkung auf Oenocyten, Tergite, thorakalen Fettkörper und Prothorakaldrüse (PTD) untersucht.

Abbildung 3-6 veranschaulicht die Menge an immunoreaktiven Ecdysteroiden, die mittels RIA ermittelt wurden.

Die Menge an freigegebenen Ecdysteroiden in das Medium betrug bei Kontrollgeweben während einer einstündigen Inkubationszeit zwischen 400 pg bei thorakalem Fettkörper und 1200 pg bei Oenocyten. Die Zugabe der gepoolten HP-SEC Fraktionen zu den Präparaten wie in Abbildung 3-6 gezeigt, führte nur in Gruppe 2 (Fraktion 21,5-28,5) zu einem signifikanten Anstieg der Sekretionsrate. Die stärkste (5fache) Erhöhung der Sekretionsleistung konnte bei den Oenocyten beobachtet werden. Weniger stark reagierten die Tergite auf die Zugabe von Kopfextrakten. Die RIA-Bestimmungen zeigten Werte von ca. 1500 ± 140 pg, die etwa doppelt so hoch im Vergleich zum Kontrollversuch lagen. Beim thorakalen Fettkörper und der Prothorakaldrüse wurde keine Steigerung ihrer Sekretionsaktivität durch Zugabe von HP-SEC Fraktionen festgestellt.

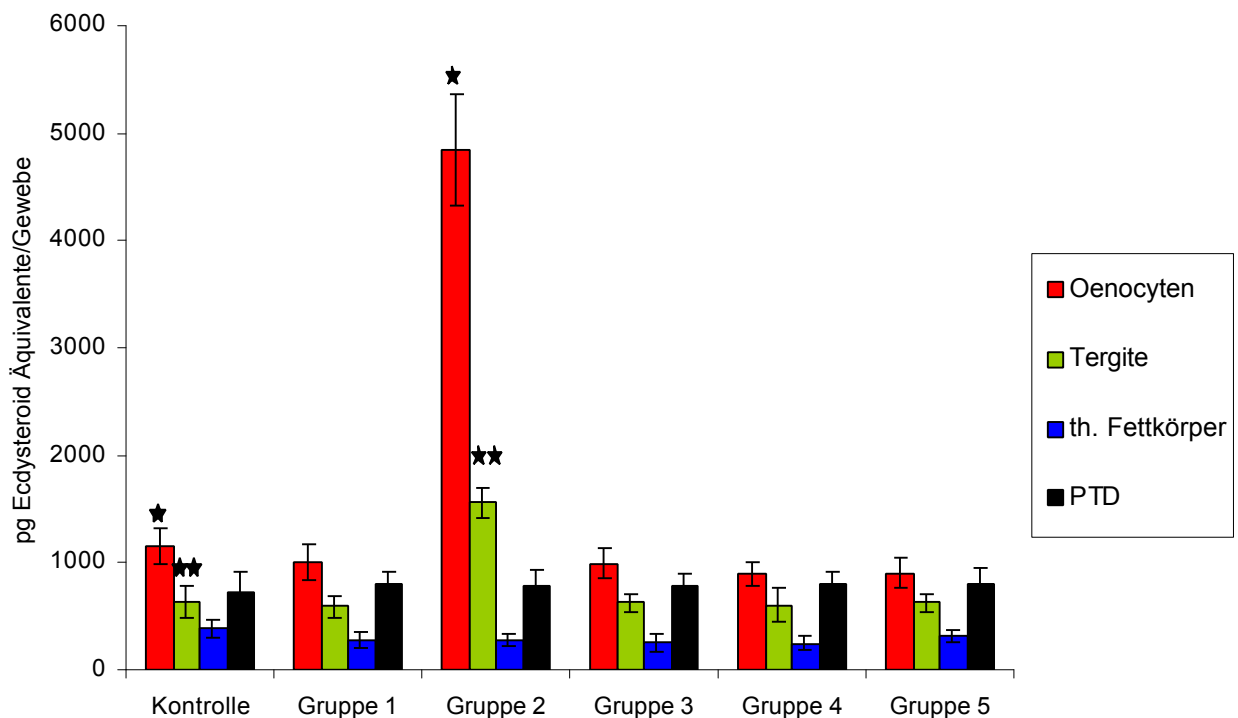


Abb. 3-6: Gruppentest:

Die aus der HP-SEC in 0,5 Minutenabständen gesammelten Fraktionen wurden in fünf Gruppen unterteilt und *in vitro* auf ihre biologische Aktivität (Ecdysteroidsekretion stimulierende Wirkung) untersucht. Von jeder Gruppe wurde die Wirkung auf Oenocyten, Tergite, thorakalen Fettkörper (aus 9 Tage alten männlichen Tieren) und Prothorakaldrüsen (des vierten Tages des 9. Larvenstadiums) auf die Hormonsekretion mittels RIA dokumentiert. Die Gewebe wurden eine Stunde in 500 µl Grace's Medium ohne (Kontrolle) oder mit den zu testenden Fraktionen inkubiert. Der Extrakt stammte aus den Köpfen 11 Tage alter Tiere.

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von 5 RIA-Bestimmungen.

*: $p < 0,01$ (hoch signifikant), **: $p > 0,05$ (nicht signifikant).

3.2.3 Molekulargewichtsbestimmung der Oenocyten-stimulierenden Faktoren (OSF)

Abbildung 3-6 zeigte, daß nur die Gruppe 2 (Fraktion 21,5-28,5) eine Steigerung der Sekretionsleistung, wenn auch in unterschiedlichem Maß, sowohl bei Oenocyten als auch bei Tergiten hervorruft. Die Fraktionen der biologisch aktiven Gruppe 2 wurden nun einzeln auf ihre Ecdysteroidsekretion stimulierende Wirkung getestet. Lediglich die Fraktionen 24,5 bis einschließlich 26,5 stimulierten die Ecdysteroidsynthese bzw. Sekretion in den Oenocyten (Abb. 3-7). Alle anderen Fraktionen der Gruppe 2 hatten keinen Einfluß auf die Ecdysteroidsekretion.

Die Oenocyten der 9 Tage alten adulten Grillen waren gekennzeichnet durch einen geringen Ecdysteroidgehalt (Abb. 3-1). Die Zugabe von 1 µl der biologisch aktiven Proben, entsprechend 0,4 Kopfüquivalenten, bewirkte eine rapide Steigerung der Sekretionsleistung, der den ca. 5fachen Wert der Kontrollversuche erreichte. Mit Hilfe der linearen Regressionanalyse (Abb. 3-5) konnte das Molekulargewicht der aktiven HP-SEC Fraktionen zwischen 26,45 und 30,02 kDa ermittelt werden.

3.2.4 *In vitro*-Stimulation der Tergite

Durch den Gruppentest (Abb. 3-6) ließ sich nicht eindeutig klären, wie sich die Tergite 9 Tage alter *Gryllus* Männchen in Gegenwart von Testsubstanzen verhalten. Es wurde im Vergleich zu den Oenocyten eine relativ geringe Stimulation der Sekretion beobachtet, die statistisch nicht signifikant war ($p > 0,05$). Um dieses Problem zu lösen, wurde versucht, Tergite unter dem Binokular in eine linke und rechte Hälfte zu teilen und sie getrennt in Gegenwart der zu testenden Substanzen zu inkubieren. Eine Hälfte als Kontrolle, die andere Hälfte als Testansatz. Nach der Inkubation wurde das Ecdyson, das von den Tergiten in das Medium abgegeben wurde, mittels RIA bestimmt. Die Wirkung der durch HP-SEC aufgereinigten Testsubstanz wurde als "Aktivationsfaktor" (Faktor > 1 , Abb. 3-8) ausgedrückt. Dieser Faktor wurde ermittelt, indem die Menge des Ecdysteroids, das von der experimentellen Hälfte sezerniert wurde, zu der von der Kontrollhälfte sezernierten Menge in Relation gesetzt. Die Einzelfraktionen 25,5 und 26 konnten als solche identifiziert werden, die stimulierend wirkten.

3. Ergebnisse

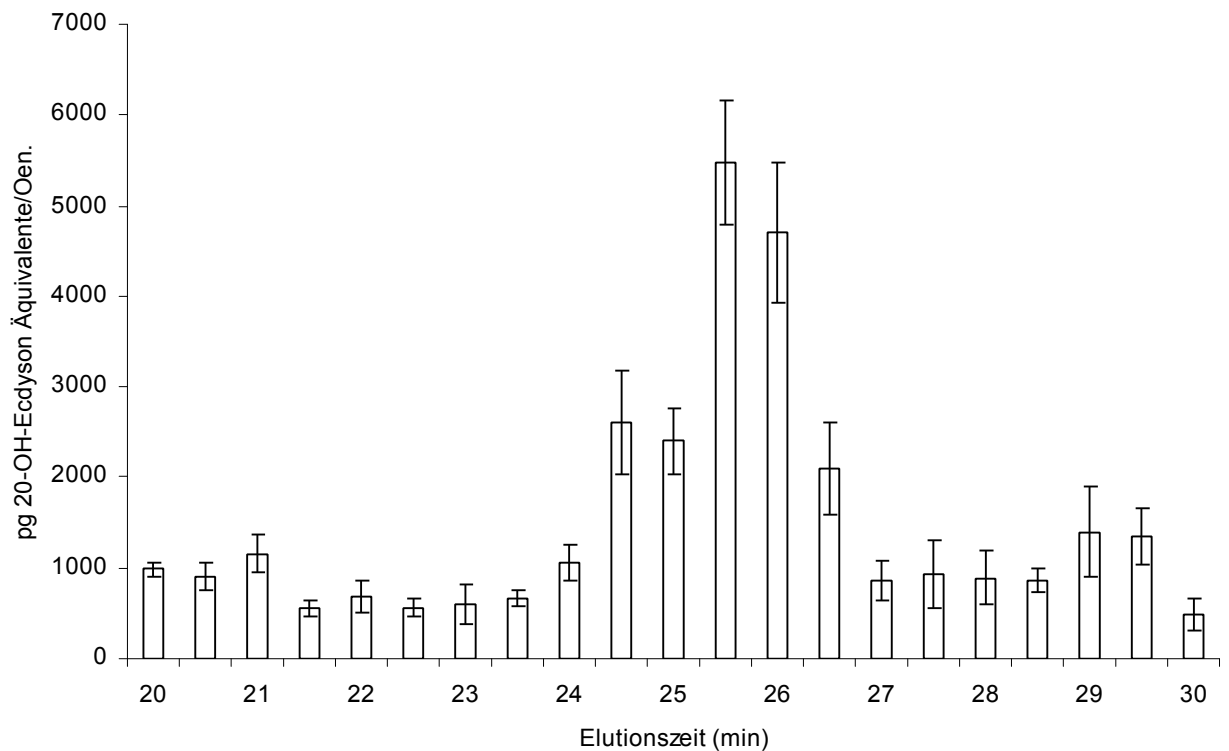


Abb. 3-7: Ecdysiotrope Aktivität der HP-SEC Einzelfractionen auf die Oenocyten 9 Tage alter männlicher Imagines der Mittelmeerfeldgrille.

Durch Inkubationsversuche mit Oenocyten wurde jede Fraktion der Gruppe 2 auf ihre stimulierende Wirkung untersucht. Hierbei ließ sich mittels RIA in 5 Fractionen nach einer Elutionsdauer von 24,5; 25; 25,5; 26; und 26,5 Minuten eine stimulierende Aktivität nachweisen. Das Molekulargewicht der biologisch aktiven Substanzen betrug der Reihe nach 30,02; 29,5; 28,43 (Hauptpeak); 27,4; und 26,45 kDa.

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von je 4 Bestimmungen.

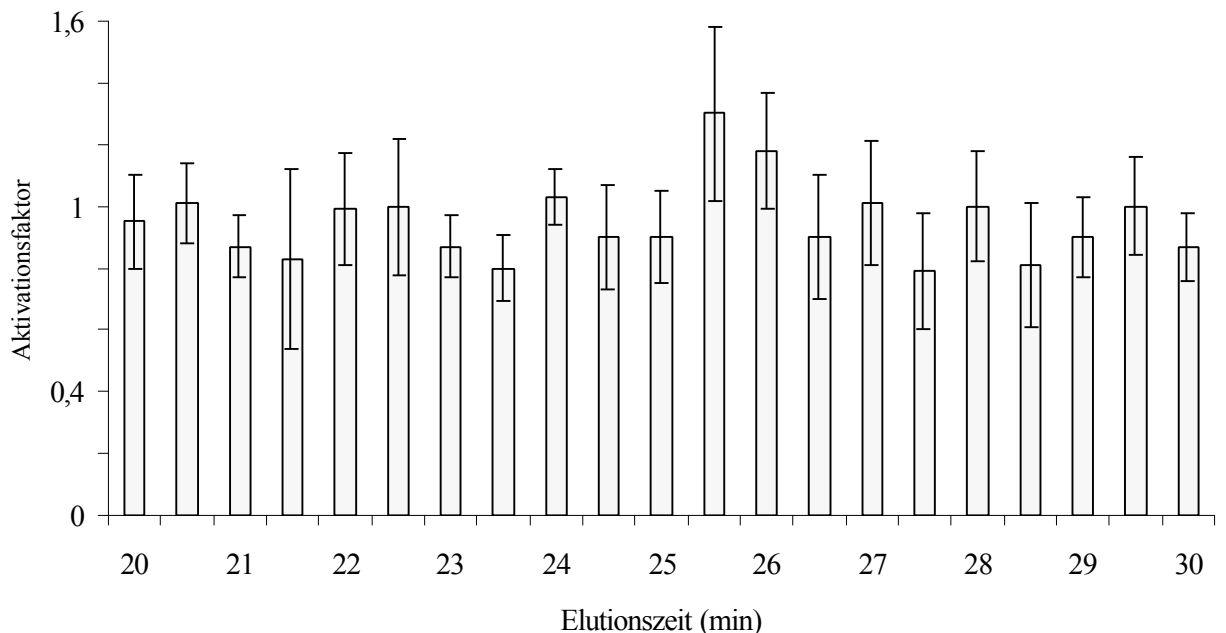


Abb. 3-8: Ecdysiotrope Aktivität der HP-SEC Einzelfractionen auf Tergite von 9 Tage alten männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus*.

Durch Inkubationsversuche mit Tergiten wurde jede Fraktion der Gruppe 2 auf ihre stimulierende Wirkung untersucht. Hierbei ließ sich mittels RIA in 2 Fractionen nach einer Elutionsdauer von 25,5 und 26 Minuten eine aktivierende Wirkung nachweisen. Auf der Abszisse sind die Retentionszeiten in Minuten aufgetragen, die Ordinate zeigt den Aktivationsfaktor (Verhältnis der in das Medium abgegebenen Ecdysteroid-Menge in Gegenwart der Testsubstanz zu der in das Medium abgegebenen Ecdysteroid-Menge durch das Kontrollgewebe).

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von je 4 Bestimmungen.

3.3 Zeit- und Dosis-Wirkung der die Ecdysteroid-Sekretion-beeinflussenden Faktoren

Die Fraktionen 24,5 bis 26,5 wurden im Bioassay als Ecdysteroid-stimulierende Faktoren identifiziert (Abb. 3-7). Diese fünf biologisch aktiven Proben wurden gepoolt und ihr Volumen auf 200 µl eingengt. Für die einzelnen Versuche wurden pro 500 µl Inkubationsmedium 0,5 Kopfüquivalente eingesetzt. Anschließend wurde die Zeit- und Dosis-Abhängigkeit *in vitro* überprüft (Abb. 3-9 & Abb. 3-10).

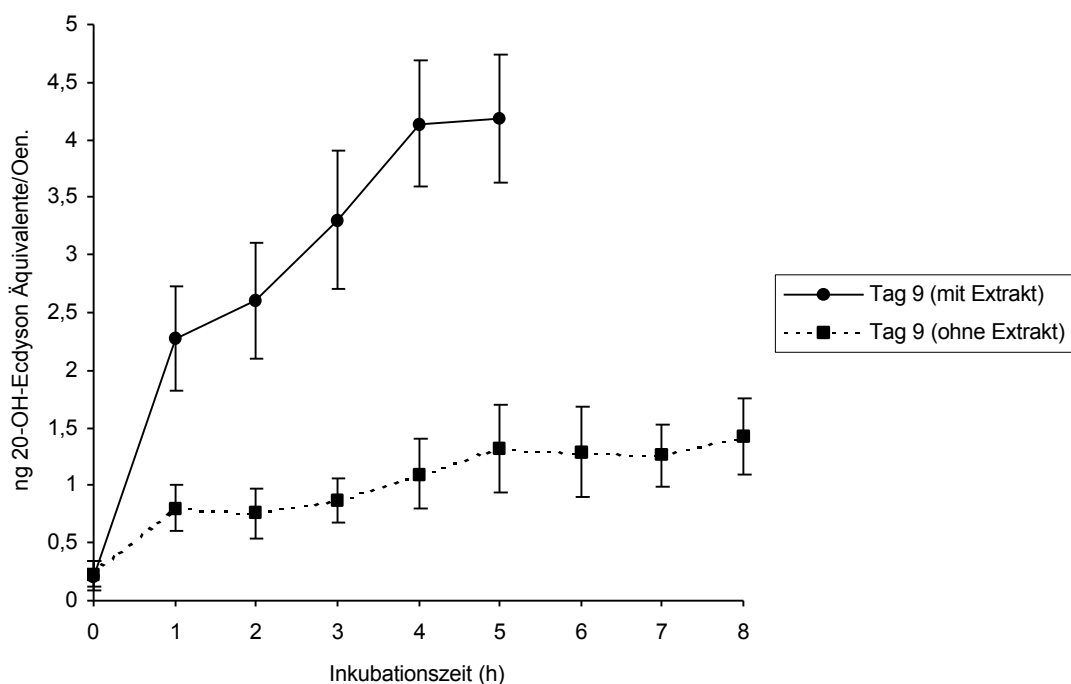


Abb. 3-9: Zeit-Wirkkurve von Ecdysiotropinen:

Die Oenocyten von 9 Tage alten männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus* wurden in Gegenwart von Kopfextrakten (0,5 Kopfüquivalente) in Grace's Medium inkubiert, stündlich 500 µl des Mediums entnommen und mit frischem Medium (Grace's + 0,5 Kopfüquivalente) ersetzt (s. Kap. 2.6.4). Als Kontrolle wurde das Sekretionsprofil der Oenocyten aus 9 Tage alten adulten Tieren verwendet (Abb. 3-1).

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von je 10 Bestimmungen. Insignifikante Unterschiede ($p > 0,05$) ergaben sich nach 0 und 5 Stunden, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) nach 4 Stunden und hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) nach 1, 2 und 3 Stunden Inkubationszeit.

Abbildung 3-9 zeigt, daß die Zugabe von Kopfextrakten bereits nach einer Stunde Inkubationszeit einen rapiden Anstieg der Ecdysteroid-Ausschüttung zu Folge hatte. Das Maximum der mittels RIA gemessenen immunodetektierbaren Ecdysteroiden wurde nach 4

Stunden Inkubationszeit erreicht. Danach gab es keinen signifikanten Ecdysteroid-Zuwachs mehr.

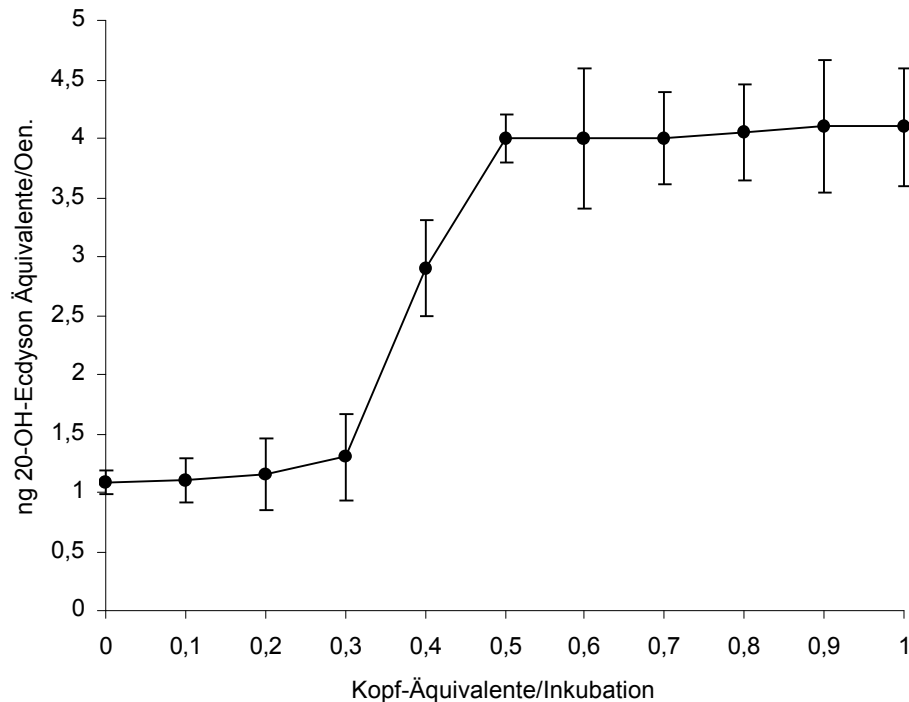


Abb. 3-10: Dosis-Wirkkurve von Ecdysiotropinen:

Die Oenocyten von 9 Tage alten männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus* wurden für 3 Stunden in 500 µl Grace's Medium inkubiert, stündlich wurde der Gehalt an sezernierten Ecdysteroiden mittels RIA bestimmt. Anschließend wurden die Inkubate in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an verdünnten Kopfextrakten (angegeben auf der Abszisse als Kopfäquivalente) für eine weitere Stunde inkubiert. Die Differenz der abgegebenen Ecdysteroid-Menge während der vierten und dritten Stunde der Inkubation wurde auf der Ordinate als 20-OH-Ecdysonäquivalente aufgetragen.

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von je 8 Bestimmungen.

Abbildung 3-10 zeigt die Dosis-Wirkung der extrahierten Faktoren. Die Wirkung des aufgereinigten Extraktes auf die Ecdysteroidsekretion war dosis-abhängig und sehr sensibel. Die maximale Wirkungs-dosis lag bei 0,9 bis 1 Kopfäquivalenten, die halbe effektive Dosis bei etwa 0,35 Kopfäquivalenten pro Inkubation. Die Zugabe weiterer Mengen an Extrakt führte zu keinem weiteren Zuwachs. Aufgrund der Tatsache, daß die Oenocyten in den ersten Stunden der Inkubation nahezu immer die gleiche Menge an Ecdysteroiden in das Medium abgaben (Abb. 3-1), wurde für die Erstellung von Dosiswirk-Kurven nach der dritten Stunde Inkubationszeit unterschiedliche Mengen an verdünnten Kopfextrakten den Inkubaten hinzugefügt und eine weitere (vierte) Stunde inkubiert. Die

Differenz der abgegebenen Ecdysteroide in der vierten Inkubationsstunde, also nach Applikation der Kopfextrakte, und der abgegebenen Ecdysteroide in der dritten Inkubationsstunde (1 Stunde vor der Applikation) wurde als Nannogramm β -Ecdysonäquivalente angegeben, und stellen somit das Maß für die Aktivierung dar (Kelly et al., 1992).

3.4 Identifizierung der sekretierten Ecdysteroide mittels HPLC/RIA-Analyse

Ziel dieser Experimente war, die Sekretionsprodukte der Oenocyten näher zu charakterisieren. Es sollte geklärt werden, wie sich das Ecdysteroid-Spektrum durch Anwesenheit von Oenocyten-stimulierenden Faktoren (OSF) verändert und ob es sich dabei um einen Zuwachs der bereits vorhandenen Ecdysteroide handelt und/oder um eine *de-novo* Synthese oder Metabolisierung von Komponenten.

Die Inkubationsmedien mit und ohne Kopfextrakte aus Versuchsansatz 3.3 (Abb. 3-9) wurden gepoolt, gereinigt (s. Kap. 2.4.3) und einer isokratischen RP-HPLC Analyse unterzogen. Bei einer Trenndauer von 45 Minuten wurde das HPLC-Eluat im 30 Sekundentakt fraktioniert, zur Trockene eingengt und in Methanol aufgenommen. Definierte Volumina dieser Proben wurden mittels RIA auf ihren Gehalt an bindungsfähigen Ecdysteroiden getestet. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten von Ecdysteroidcocktails, die als Referenz-Substanzen dienten. Die entsprechenden Retentionszeiten bzw. UV-Absorptionen wurden unmittelbar vor den eigentlichen Probeläufen aufgezeichnet. Es standen zehn authentische Ecdysteroide (Tabelle 3-1) zur Verfügung.

Substanz	Retentionszeit (min)
20,26-Dihydroxyecdysen	4,8
20-Hydroxyecdysen	7,5
26-Hydroxyecdysen	7,9
3-Epi-20-Hydroxyecdysen	8,5
Makisteron A	11,5
20-Hydroxyecdysen-22-acetat	12,1

Ecdyson	13,8
3-Epi-Ecdyson	16,0
2-Deoxy-20-Hydroxyecdyson	18,9
2-Deoxyecdyson	38,3

Tabelle 3-1: Referenz-Substanzen mit dazugehörigen Retentionszeiten bei RP-HPLC

Vergleicht man die Resultate aus den RP-HPLC-Auftrennungen, so geht daraus hervor, daß bei den mit OSF-behandelten Oenocyteninkubaten gegenüber unbehandelten Präparaten zwei zusätzliche Peaks auftreten, was aus der Abbildung 3-11 ersichtlich wird.

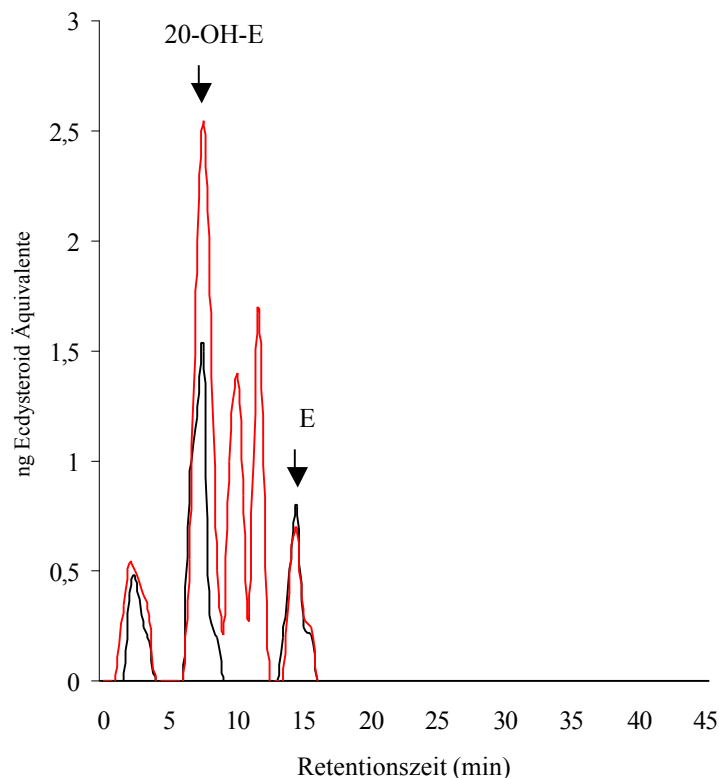


Abb. 3-11: RP-HPLC/RIA-Profil der freien Ecdysteroide aus Oenocyteninkubaten, die mit oder ohne stimulierende Faktoren behandelt wurden.

Auf der Abszisse sind die Retentionszeiten in Minuten (Einzelfraktion 0,5 min), auf der Ordinate die Konzentrationen der zu definierten Zeitpunkten mittels RIA nachgewiesenen Ecdysteroide aufgetragen. Die dargestellten Ergebnisse wurden mit Ausnahme des Ecdysons alle an der 20-OH-Ecdyson Eichkurve abgelesen. Aufgeführt werden nur solche Fraktionen, die eine Bindung mit dem Antikörper aufweisen. Die Pfeile zeigen die Retentionszeit von 20-OH-Ecdyson und Ecdyson.

Nach abnehmender Polarität können die erhaltenen Befunde der Abbildung 3-11 folgendermaßen erläutert werden. Beim ersten Absorptionspeak, der bei beiden Proben vorkommt und eine Elutionszeit von 1,5 bis 3,5 Minuten aufweist, handelt es sich um eine sehr polare Substanz, die aufgrund früherer Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Eibes & Romer, 1990) Ecdysonsäure sein könnte. Die Hauptmenge der Ecdysteroide sowohl der Kontrollproben (1,5 ng) als auch der mit OSF behandelten Oenocytenpräparate (2,55 ng) lag im Bereich der Retentionszeit von 20-OH-Ecdyson. In diesem Bereich zeigte das Absorptionsprotokoll einen Peak bei 7,5 Minuten, der mit der Retentionszeit der Referenzsubstanz übereinstimmt. Es soll nicht ausgeschlossen werden, daß an der Ausprägung des Gesamtpeaks auch 26-OH-Ecdyson mit einer Elutionszeit von 7,9 Minuten beteiligt war. An dieser Stelle soll auf die ähnlichen Retentionszeiten von 20-OH-Ecdyson und 26-OH-Ecdyson hingewiesen werden, deren weitere Auftrennung mit diesem RP-System nicht möglich war. Jedoch ist nach Behrens und Hoffmann (1982) eher vom Vorhandensein des 20-OH-Ecdysons auszugehen.

Bei den mit Kopfextrakten behandelten Oenocyten wurden drei weitere, im RIA aktive Peaks dedektiert, von denen zwei näher beschrieben werden konnten. Der Peak bei 10 Minuten konnte auf Grund fehlender Vergleichssubstanzen nicht identifiziert werden. Beim 11,5-Minuten-Peak handelte es sich möglicherweise um Makisteron A. Bei dem letzten gemeinsamen Peak mit einer Laufzeit von etwa 14 Minuten, der auch eine Bindung mit dem Antiserum eingeht, könnte es sich um Ecdyson handeln.

Zur Bestätigung der Identität eines Hormons mittels HPLC sollte das Eluat aus einem Lauf mit RP-HPLC auf einer zweiten Säule, in der Regel, NP-HPLC rechromatographiert werden (Lafont & Wilson, 1990). Um die Befunde der RP-HPLC/RIA Analyse zu bestätigen, wurden die Proben einem NP-System (Abb. 3-12) unterworfen, im Anschluß daran wurde ebenfalls ein RIA durchgeführt.

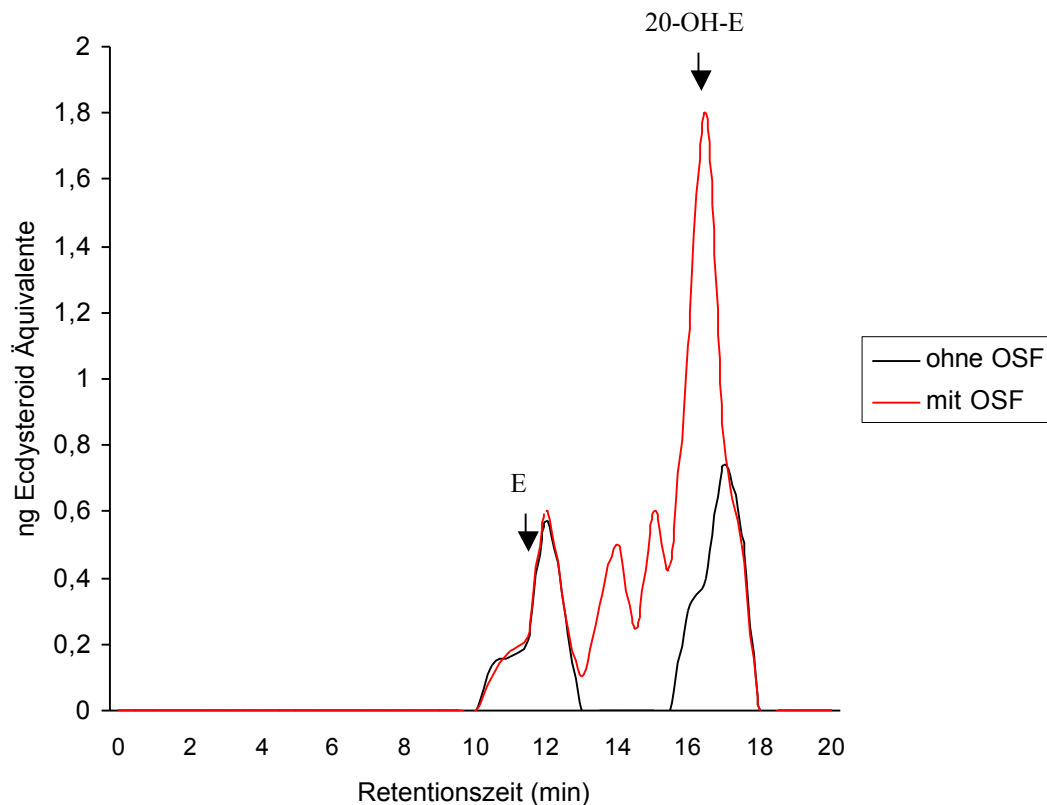


Abb. 3-12: NP-HPLC/RIA-Profil der freien Ecdysteroide aus Oenocyteninkubaten, die mit oder ohne stimulierende Faktoren behandelt wurden.

Auf der Abszisse sind die Retentionszeiten in Minuten (Einzelfraktion 0,5 min), auf der Ordinate die Konzentrationen der zu definierten Zeitpunkten mittels RIA nachgewiesenen Ecdysteroide aufgetragen. Die dargestellten Ergebnisse wurden mit Ausnahme des Ecdysons alle an der 20-OH-Ecdyson Eichkurve abgelesen. Aufgeführt werden nur solche Fraktionen, die eine Bindung mit dem Antikörper aufweisen. Die Pfeile zeigen die Retentionszeit von Ecdyson und 20-OH Ecdyson.

Zunächst wurden die Elutionsspektren für das authentische Ecdyson und 20-OH-Ecdyson, mit 11 und 16,8 Minuten ermittelt. Die Fraktionierung der Proben erfolgte für 20 Minuten in 30 Sekundenabständen. Es ergaben sich vier RIA-aktive Peaks (mit OSF), von denen zwei, mit einer Elutionsdauer von ca. 12 und 16,5-17 Minuten gemeinsam vorkamen (ohne OSF). Bei der ersten RIA-sensitiven Komponente (0,6 ng) handelte es sich um Ecdyson. Bei der zweiten gemeinsamen Komponente, die im Kontrollgewebe mit 0,74 ng Ecdysteroid erheblich niedriger liegt als bei OSF behandeltem Gewebe (1,8 ng), handelt es sich nach Vergleich der Retentionszeiten um 20-OH-Ecdyson bzw. 26-OH-Ecdyson (Retentionszeit = 16 Minuten). Dazwischen

lagen noch zwei weitere RIA-positive Substanzen mit einer Retentionszeit von 14 und 15 Minuten, die nur nach OSF-Stimulation auftraten.

Da Makisteron eine Retentionszeit von etwa 13,5 Minuten aufweist, könnte es sich beim 14 Minuten Maximum um Makisteron handeln. Der 15 Minuten Peak konnte ebenfalls nicht eindeutig identifiziert werden.

Obwohl bei RP- als auch bei NP-Auftrennungen immer die gleiche Menge (1 % des Stammextraktes) auf die Säule aufgetragen wurden, liegt die nachweisbare Menge von Ecdysteroiden nach NP-HPLC-Auftrennung deutlich niedriger als nach der Auftrennung mittels RP-System (Abb. 3-11 & Abb. 3-12). Eine Erhöhung der Konzentration der injizierten Probe führte zur Überladung der HPLC-Säule und damit zu einer unzureichenden Trennung der Substanzen. Die hohe Effizienz des sich an die HPLC-Fraktionierung anschließenden Radioimmunoassays ermöglicht es dennoch, mit ca. 1 % des Stammextraktes zu arbeiten.

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit des verwendeten NP-HPLC-Laufmittels und der daraus resultierenden Veränderungen in der Zusammensetzung (s. Kap. 2.5.2) kann es zu leichten Verschiebungen der Absorptionsmaxima kommen.

Die Identifizierung von Sekretionsprodukten mittels HPLC deutete auf eine Steigerung der Ecdysteroidmenge hin, insbesondere erhöhte sich die Konzentration von 20-Hydroxyecdysen im Vergleich zu Kontrollproben. Als zusätzliche Ecdysteroide, die nur infolge der Zugabe der stimulierenden Faktoren entstanden, könnte Makisteron A auf Grund seiner Retentionszeit in Frage kommen. Der zweite zusätzliche Metabolit konnte aus Mangel an weiteren Vergleichssubstanzen weder mittels RP- noch NP-System näher charakterisiert werden.

3.5 Wirkung von Azadirachtin

3.5.1 Einfluß von Azadirachtin auf den Hämolymphe-Ecdysteroidtiter

Frisch geschlüpften männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus* wurde gemäß Kapitel 2.3 eine definierte Menge von Azadirachtin (Aza) injiziert. Die Tiere überlebten die Dosis

von 1 µg/g Körpergewicht und konnten an Tag 11 nach der Adulthäutung für Experimente herangezogen werden.

Zunächst wurde der Ecdysteroidtiter in der Hämolymphe bestimmt (Abb. 3-13). Die Hämolymphecdysteroidmenge wies bei Kontrolltieren ca. 37 ng pro 10 µl auf und wurde bei Aza-behandelten Tieren auf 9,5 ng/10 µl reduziert. Grillen, die nur mit Lösungsmittel (90% Ethanol) injiziert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zu Kontrolltieren ($p > 0,05$).

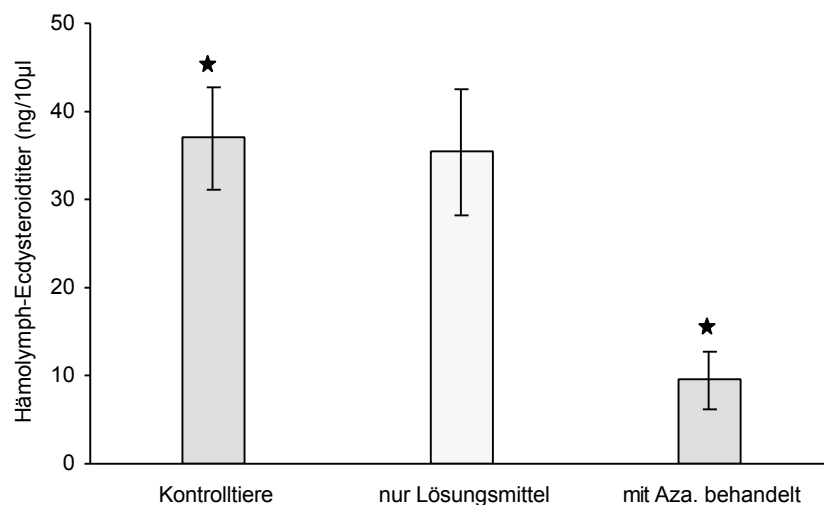


Abb. 3-13: Einfluß von Azadirachtin auf den Hämolymphe-Ecdysteroidtiter von 11 Tage alten männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus*. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von fünf RIA-Bestimmungen. *: $p < 0,05$ (signifikant).

3.5.2 Einfluß von Azadirachtin auf die OSF-Konzentration

In dieser Versuchsreihe wurde der Effekt von Kopfextrakten untersucht, welche aus Aza-behandelten, 11 Tage alten Grillen stammten (s. Kap. 3.5.1). Die Aufarbeitung erfolgte gemäß Kapitel 2.7.2. Es sollte geklärt werden, ob Aza eine Anreicherung bzw. Erhöhung der Konzentration der stimulierenden Faktoren bewirkte. Abbildung 3-14 zeigt, daß die Ecdysteroidsekretion von Oenocyten durch Zugabe von Kopfextrakten (0,4 Kopfüquivalente) Aza-behandelter Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nicht signifikant beeinflusst wurde ($p > 0,05$).

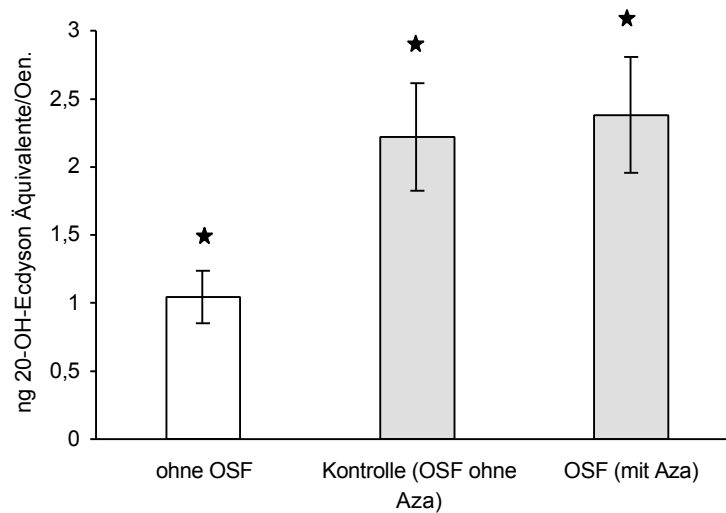


Abb. 3-14: Wirkung von Kopfextrakten aus Azadirachtin-behandelten *Gryllus bimaculatus* auf die Ecdysteroidsekretion.

Die Oenocyten aus 9 Tage alten unbehandelten männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus* wurden eine Stunde ohne Kopfextrakt (ohne OSF), in Gegenwart von Kopfextrakt aus 11 Tage alten Tieren (OSF ohne Aza) und mit Extrakten aus Aza-behandelten Tieren (mit Aza) in 500 µl Medium für eine Stunde inkubiert. Die Menge an abgegebenen Ecdysteroiden wurde mittels RIA ermittelt.

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von vier Bestimmungen. *: $p < 0,05$ (signifikant)

3.6 Charakterisierung der biochemischen Natur der Oenocyten-stimulierenden Faktoren

Um die biochemischen Eigenschaften der stimulierenden Kopfextrakte von *Gryllus bimaculatus* zu untersuchen, wurden die fünf im Bioassay aktiven HP-SEC-Einzelfractionen (s. Kap. 3.2.3) vereinigt, eingengt und in definierten Volumina Grace's Medium aufgenommen. Diese biologisch aktive Probe (s. Kap. 3-3) wurde für die folgenden Untersuchungen verwendet.

3.6.1 Stabilität gegen Hitze-Behandlung

Aliquots der biologisch aktiven Fraktion wurden 1 bis 4 Minuten bei 100 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf ihre stimulierende Wirkung auf Oenocyten getestet.

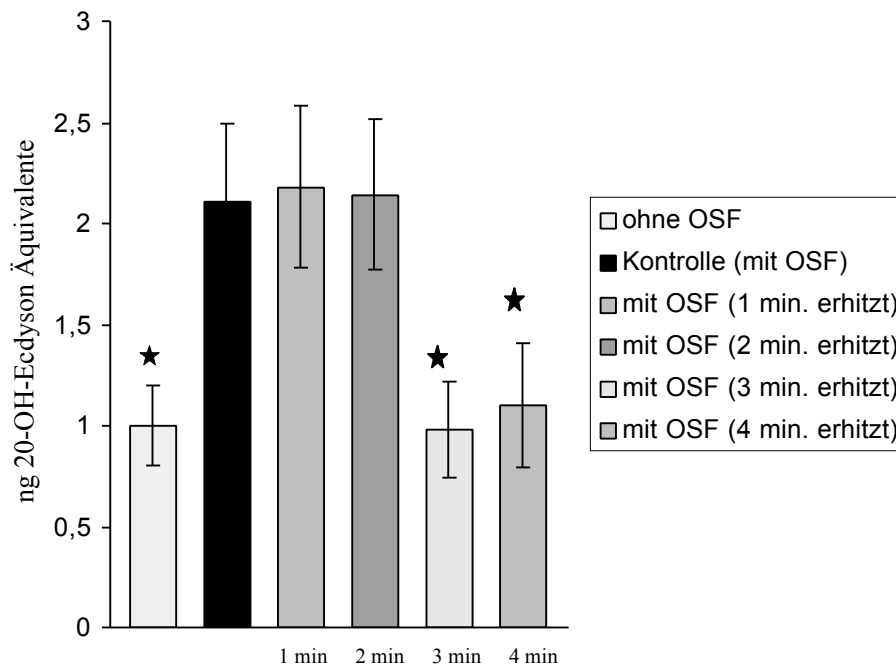


Abb. 3-15: Stabilität des OSF gegen Hitze-Behandlung.

Oenocyten aus 9 Tage alten Imagines von *Gryllus bimaculatus* Männchen wurden eine Stunde in 500 µl Medium ohne oder mit OSF (0,5 Kopfüquivalente) inkubiert. Der Einfluß von Hitzebehandlung (1 bis 4 Minuten) auf die biologische Aktivität wurde untersucht.

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von vier Bestimmungen.

Die mit * markierten Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) vom Kontrollwert.

Abbildung 3-15 zeigt, daß nach 3 Minuten Hitzebehandlung die OSF ihre Wirkung verlieren und die Ecdysteroidsekretion nicht mehr anzuregen vermögen. Offensichtlich kann sich durch Erhitzen erst nach mehr als zwei Minuten die Sekundärstruktur der Moleküle, mindestens der Funktionsbereiche, ändern.

3.6.2 Stabilität gegen Alkylierung durch N-Ethylmaleimid (NEM)

Zu diesem Experiment dienten die unter Kapitel 2.7.3.2 beschriebenen Versuchsansätze.

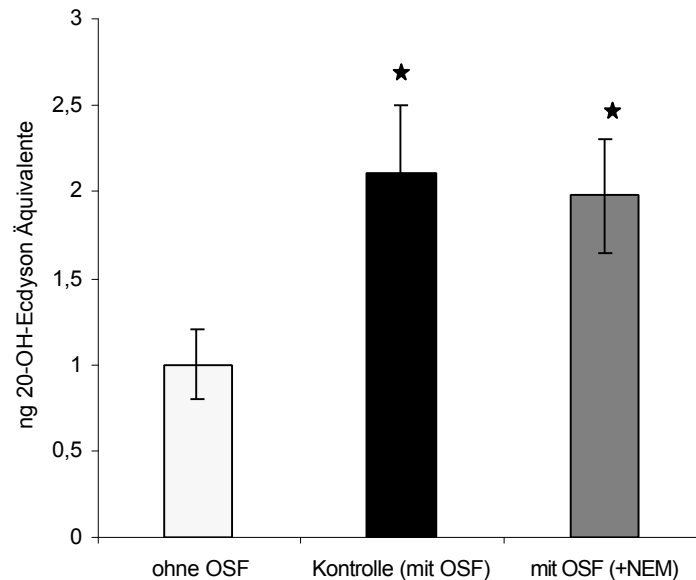


Abb. 3-16: Stabilität des OSF gegen Alkylierung durch N-Ethylmaleimid (NEM). Oenocyten aus 9 Tage alten Imagines von *Gryllus bimaculatus* Männchen wurden eine Stunde in 500 µl Medium ohne oder mit OSF (0,5 Kopfüquivalente) inkubiert. Der Einfluß von NEM auf die biologische Aktivität wurde untersucht. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von vier Bestimmungen. *: $p > 0,05$ (nicht signifikant)

Wie aus Abbildung 3-16 hervorgeht, kann N-Ethylmaleimid als Alkylator der Sulfhydryl-Gruppen die Aktivität von OSF nicht signifikant reduzieren ($p > 0,05$). Daraus wird geschlossen, daß freie SH-Gruppen an der biologischen Aktivität des Ecdysiotropins nicht beteiligt sind, bzw. daß sie nicht vorhanden sind.

3.6.3 Stabilität gegen Reduzierung durch Dithiothreitol (DTT)

Wie in Kapitel 2.7.3.3 beschrieben, wurde nach Behandlung mit DTT versucht, die Disulfidbrücken der ecdysiotropen Faktoren zu reduzieren. Durch Inkubationsversuche wurde die Notwendigkeit intakter Disulfidbrücken (-S-S-) für die stimulierende Wirkung auf Oenocyten nachgewiesen.

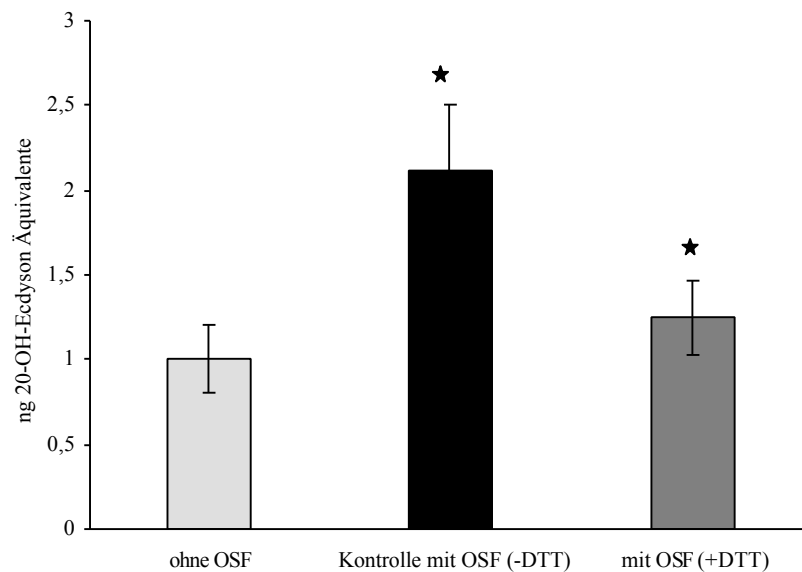


Abb. 3-17: Stabilität des OSF gegen Reduzierung durch DTT.
 Oenocyten aus 9 Tage alten Imagines von *Gryllus bimaculatus* Männchen wurden eine Stunde in 500 µl Medium ohne oder mit OSF (0,5 Kopfüquivalente) inkubiert. Der Einfluß von DTT auf die biologische Aktivität wurde untersucht.
 Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von vier Bestimmungen.
 *: $p < 0,05$ (signifikant)

Abbildung 3-17 zeigt, daß durch Inkubation mit DTT, die ecdysiotrope Wirkung der OSF teilweise verloren ging. Aus diesem Experiment wird geschlossen, daß die Kopfextrakte Disulfidbrücken enthalten, welche für ihre biologische Aktivität verantwortlich sind.

3.6.4 Stabilität gegen Endopeptidase, Exopeptidase und Neuramidase-Spaltung

Zu diesen Untersuchungen dienten die in Kapitel 2.7.3.4 beschriebenen Versuchsansätze. In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung von Enzymen auf die Ecdysteroidsekretion der Oenocyten in Gegenwart von Kopfextrakten untersucht. Es wurden vier Enzyme verwendet, die sehr spezifisch auf ihr Substrat wirken.

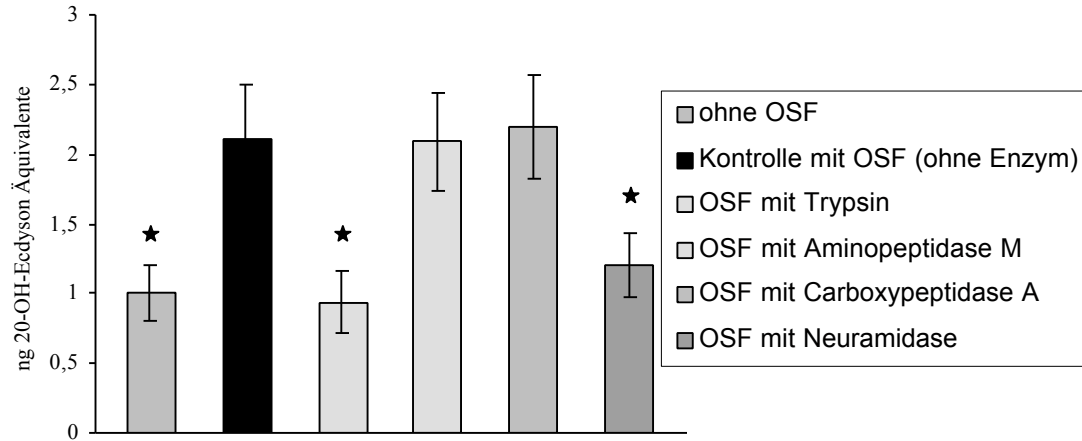


Abb. 3-18: Enzymatischer Verdau der OSF.

Oenocyten aus 9 Tage alten Imagines von *Gryllus bimaculatus* Männchen wurden ohne oder mit OSF (0,5 Kopfüquivalente) in 500 µl Medium inkubiert. Der Einfluß von Trypsin-, Aminopeptidase M-, Carboxypeptidase A- und Neuramidase-Spaltung auf die biologische Aktivität der OSF wurde überprüft.

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von vier Bestimmungen. Die mit * markierten Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) vom Kontrollwert.

Zunächst wurde der Einfluß von Trypsin auf die OSF untersucht. Es stellte sich heraus, daß die behandelten Extrakte ihre biologische Aktivität vollständig verloren haben. Abbildung 3-18 zeigt, daß die Zugabe von Trypsin-behandelten OSF zu den Inkubaten die Ecdysteroidabgabe auf die Ausgangswerte herabsetzte. Damit konnte auf das Vorhandensein von Trypsin-Spaltungsstellen und letztendlich auf die Proteinnatur der extrahierten stimulierenden Faktoren geschlossen werden.

In einem weiteren Versuch wurde der Effekt von Exopeptidasen geprüft. Für diese Experimente wurden zwei verschiedene Enzyme, nämlich Aminopeptidase M und Carboxypeptidase A, mit einer Endkonzentrationen von 2 mU/ml verwendet. Wie aus Abbildung 3-18 hervorgeht, hatten die beiden Exopeptidasen keine Wirkung auf die biologische Aktivität von OSF. Auf Grund dieser Ergebnisse läßt sich vermuten, daß sowohl der N- als auch der C-Terminus des OSF geschützt bzw. blockiert ist.

Die mit Neuramidase behandelten Extrakte (Endkonzentration: 0,75 µU/ml) verloren ebenfalls ihre stimulierende Wirkung, wie aus Abbildung 3-18 ersichtlich wird. Da dieses Enzym Kohlenhydrate spaltet, ist davon auszugehen, daß die Zucker-Kette(n) für die

biologische Aktivität notwendig sind. Somit ist anzunehmen, daß es sich beim OSF um ein Glykoprotein mit einer oder mehreren Zucker-Ketten handelt.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß die Zugabe von NEM, DTT und der hier verwendeten Enzyme zu Oenocyteninkubaten alleine keinen Einfluß auf die Ecdysteroidsekretion hatte. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde die Menge an sekretierten Ecdysteroiden ohne OSF in den Grafiken dargestellt.

3.7 Western-Blot und Proteinanalyse

Teilgereinigte Kopfextrakte aus *G. bimaculatus* wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3-19), anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Antikörper inkubiert, die gegen 22-kDa große PTTH-Moleküle aus *B. mori* gerichtet waren (s. Kap. 2.7.7). Als Kontrolle dienten Kopfhomogenate aus *Bombyx* (Spur 1 und 3 in Abb. 3-20). Es konnte keine Bindung der Antikörper an Proteine der Extrakte aus *Gryllus* (Spur 2 und 4 in Abb. 3-20) im Western-Blot nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, daß es sich bei den Ecdysteroid-stimulierenden Faktoren in *Gryllus bimaculatus* nicht um PTTH-ähnliche Moleküle von *Bombyx mori* handelte.

Es wurde versucht, die Protein-Banden mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 26,5 bis 30 kDa anzusequenzieren (Abb. 3-21), die im Bioassay unter nativen Bedingungen eine Ecdysteroid-stimulierende Wirkung hervorriefen (Abb. 3-7). Die N-terminale Sequenzanalyse sowie die tryptischer Fragmente der geblotteten Proteine zeigte N-terminale Blockierung. Deshalb wurden die Banden im Polyacrylamidgel enzymatisch verdaut und die mittels HPLC aufgetrennten Peptidfragmente für MALDI-MS-Messungen bereitgestellt. Bei fünf von insgesamt sechs „Spots“ aus diesem Bereich konnte keine Homologie zu bereits bekannten Proteinen gefunden werden (Abb. 3-21). Zusätzlich wurden mittels Edman-Abbau drei weitere Proteine eindeutig identifiziert (Banden 1, 2 und 3).

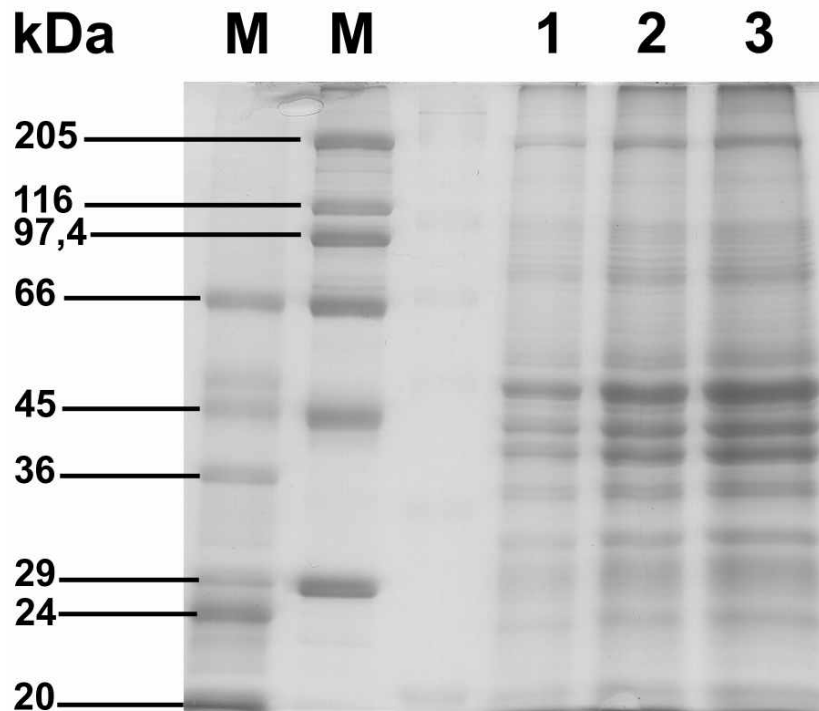


Abb. 3-19: Proteinmuster von teilgereinigten Kopfextrakten aus 11 Tage alten männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus*, aufgetrennt in 12%-igem SDS-Polyacrylamidgel.

Die Spuren 1 bis 3 zeigen die Proteinzusammensetzung des Extrakts, die mit Coomassie Blue sichtbar gemacht wurden. Es wurden unterschiedliche Mengen verwendet.

Spur 1: 100 Kopfüquivalente, Spur 2: 150 Kopfüquivalente, Spur 3: 200 Kopfüquivalente.

In den Spuren M sind verschiedene Referenzproteine (SDS-7 und SDS-6H) zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts mit aufgetrennt worden.

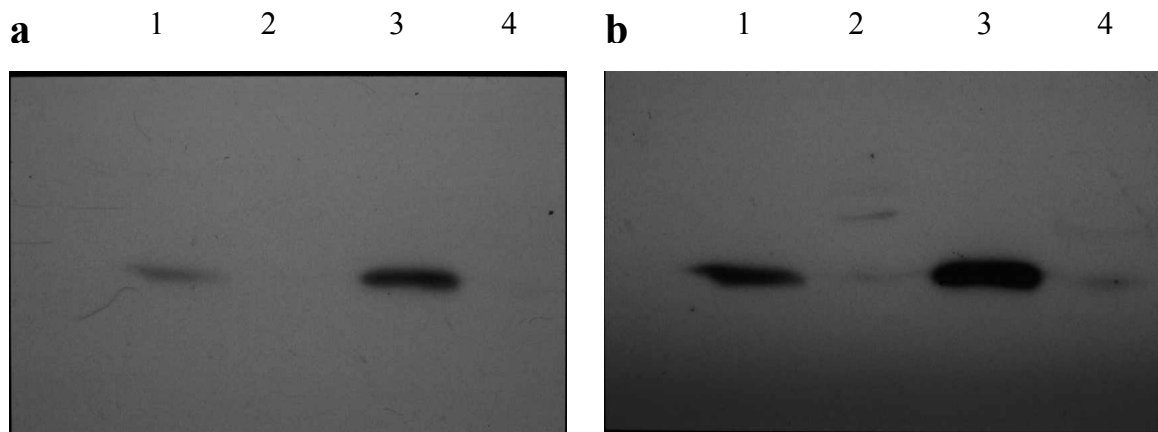


Abb. 3-20: Immunoblot-Analyse von Kopfextrakten aus *Bombyx mori* (L5) und 11 Tage alten männliche Imagines von *Gryllus bimaculatus* mit monoklonalen (a) sowie polyklonalen (b) *Bombyx mori* PTTH-Antikörpern.

a: Der Blot wurde mit einem Antiserum gegen die 15 Aminosäuren langen N-terminalen Sequenzen von *B. mori* PTTH inkubiert. Extrakte aus 40 (Spur 1) und 80 (Spur 3) *Bombyx* Kopfüquivalenten sowie Extrakte aus 40 (Spur 2) und 80 (Spur 4) *Gryllus* Kopfüquivalenten wurden auf ihre Bindungsfähigkeit überprüft.

b: In diesem Fall wurde der Blot mit Antikörpern, die gegen rekombinantes PTTH aus *Bombyx* gerichtet waren, behandelt. Die Proben wurden wie in a aufgetragen.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden über ein Chemolumineszenz-Verfahren detektiert.

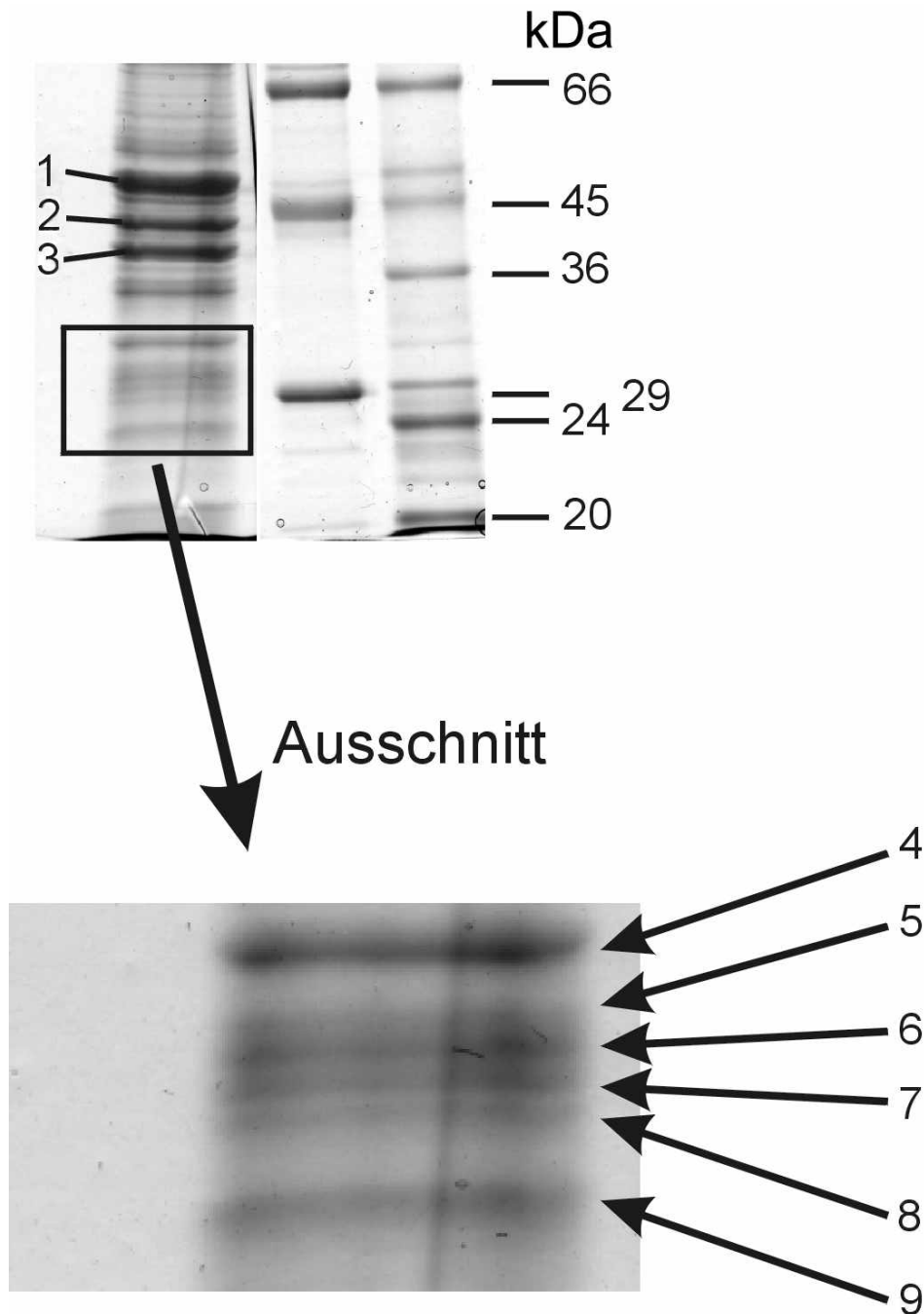


Abb. 3-21: Aminosäuresequenz-Analyse nach SDS-PAGE von Kopfextrakten aus *Gryllus bimaculatus*. Bei den Proteinbanden handelt es sich um die internen Peptidfragmente mit folgender Aminosäuresequenz:

- 1) ATP-Synthase β -Kette: N-terminale Sequenzierung
- 2) Aktin: N-terminale Sequenzierung
- 3) Arginin-Kinase (N-terminal acetyliert): N-terminale Sequenzierung
- 4) FSGQSLKD und FLQKITNYSKQIE: keine Homologie / MALDI-MS
- 5) GGGSS: keine Homologie / MALDI-MS
- 6) 14-3-3-like Protein (N-terminal formylated) / MALDI-MS
- 7) FMNMMM: keine Homologie / MALDI-MS
- 8) PAPAPAA, GQSS und NDIGQVYR: keine Homologie / MALDI-MS
- 9) TSTSSTTS: keine Homologie / MALDI-MS

Die Aminosäuren wurden mit den Einbuchstaben-Symbolen abgekürzt. Die Größen der Molekulargewichtsmarker sind rechts angezeigt.

3.8 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von OSF

3.8.1 Effekt von Signalstoffen auf die Ecdysteroidsekretion der Oenocyten

Um einen möglichen Second Messenger der OSF bei der Ecdysteroidsekretion zu identifizieren, wurden die Oenocyten mit einer Reihe von Pharmaka, die den intrazellulären cAMP-Spiegel beeinflussen, inkubiert. Geprüft wurden 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Forskolin, 8-Brom-cyclisches AMP (Br-cAMP) und Dibutyryl-cyclisches AMP (dbcAMP).

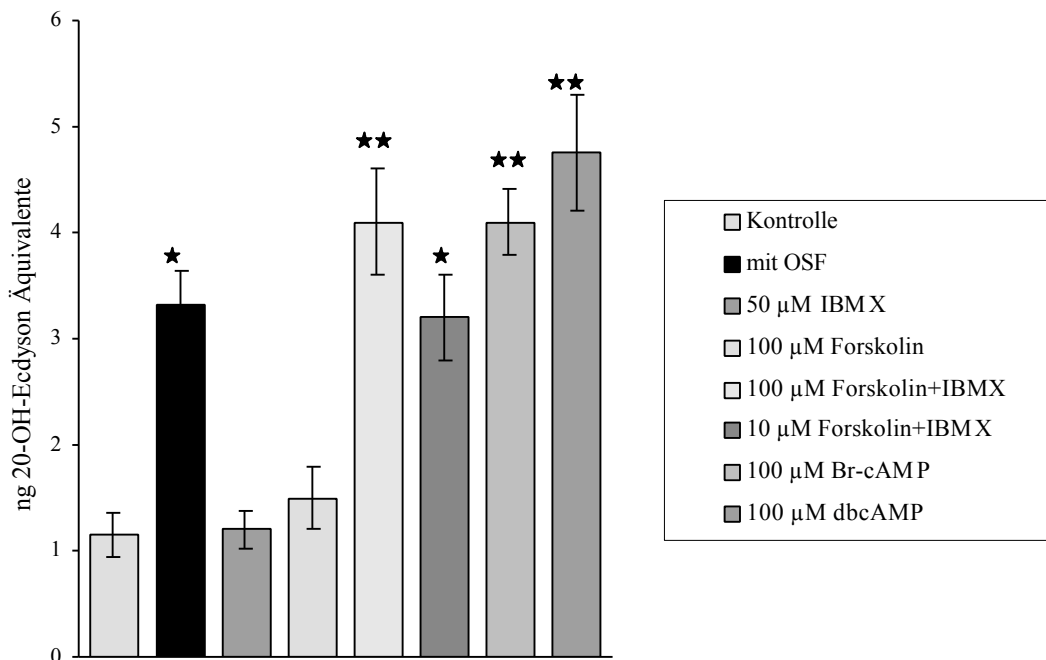


Abb. 3-22: Effekt der Pharmaka auf die Ecdysteroidsekretion.

Oenocyten von 9 Tage alten Männchen der Mittelmeerfeldgrille wurden ohne Zusatzstoffe (Kontrolle) oder mit OSF (0,5 Kopfüquivalente) und in Gegenwart von Pharmaka (ohne OSF) in 500 µl Medium für 3 Stunden inkubiert. Die Menge an sezernierten Ecdysteroiden wurde mittels RIA determiniert. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von vier Bestimmungen. Die mit * markierten Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), die mit ** hoch signifikant ($p < 0,01$) vom Kontrollwert.

Der Abbildung 3-22 ist zu entnehmen, daß die Inkubation von Oenocyten mit 50 µM IBMX (1,2 ng) und 100 µM Forskolin (1,5 ng) zu keiner signifikanten Ecdysteroidabgabe im Vergleich zur Kontrolle (ca. 1,1 ng) führt ($p > 0,05$). Erst die Kombination von beiden

Substanzen brachte eine Erhöhung der Ecdysteroidsekretion. Im ersten Fall wurden den Inkubaten 50 μM IBMX und 100 μM Forskolin zugesetzt (4,1 ng) und dadurch eine vierfache Steigerung im Vergleich zum Kontrollgewebe beobachtet. Im zweiten Fall wurde die Konzentration von Forskolin auf 10 μM reduziert, die Menge an IBMX blieb unverändert. Hierbei liegt nahe eine dosisabhängige Ecdysteroidsekretion anzunehmen, die nur mit der Forskolin-Konzentration in Zusammenhang stand. Es scheint, daß IBMX als Phosphodiesterase-Inhibitor die Wirkung von Forskolin verstärkt. Weiterhin wurde die Wirkung von den membrangängigen cAMP-Analogen 8-Br-cAMP und dbcAMP auf die Oenocyten untersucht. Beide Substanzen erhöhten ebenfalls die Sekretionsleistung um ein Vielfaches. Das Ergebnis dieser Experimente weist darauf hin, daß cAMP als Second Messenger an der Kontrolle der Ecdysteroidbiosynthese beteiligt ist und eine fördernde Wirkung besitzt.

3.8.2 Erhöhung des cAMP-Titers in Oenocyten durch Zugabe von OSF *in vitro*

Um sicherzustellen, daß cAMP der Second Messenger des OSF ist, wurden die Oenocyten in Gegenwart von HP-SEC-gereinigten Kopfextrakten (0,5 Kopfüquivalente) für insgesamt 30 Minuten inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurde die Inkubation unterbrochen, das intrazelluläre cAMP wurde gemäß Kapitel 2.8.2 extrahiert und seine Menge mittels eines empfindlichen cAMP-RRA gemessen.

Wie aus Abbildung 3-23 hervorgeht, kam es bereits nach 10 Minuten Inkubationszeit mit OSF zu einem raschen Anstieg des cAMP-Gehalts von 350 fmol auf etwa 880 fmol, der mit zunehmender Inkubationszeit wieder rückläufig wurde. Die intrazelluläre cAMP-Menge des Kontrollgewebes (ohne OSF) war nahezu konstant und lag zwischen 250 und 300 fmol.

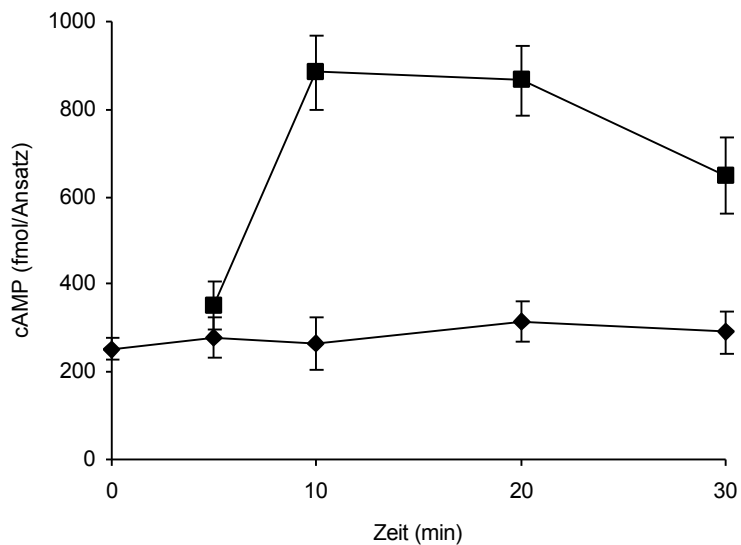


Abb. 3-23: Effekt der OSF auf den intrazellulären cAMP-Gehalt in Abhängigkeit von der Zeit. Oenocyten von 9 Tage alten adulten Männchen wurden ohne OSF (-? -) als Kontrolle oder mit OSF (-! -) für 5, 10, 20 und 30 Minuten inkubiert. Der Gehalt an cAMP wurde mittels RRA bestimmt. Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von sechs Bestimmungen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) ergaben sich nach 10, 20 und 30 Minuten Inkubationszeit.

3.8.3 Einfluß von Calcium-Ionen auf die Ecdysteroidsekretion

In dieser Versuchsreihe wurde die Ecdysteroidsekretion der Oenocyten unter Einfluß von Ionomycin, einem Calcium-Ionophor, der Calcium im Komplex 1:1 bindet und durch Membranen transportiert, untersucht. Dazu wurden die Oenocyten gemäß Kapitel 2.6.2 und 2.8.4 in Grace's Medium mit 5 mM Calcium, entsprechend der Angaben der Hersteller, inkubiert und verschiedene Konzentrationen (10^{-8} bis 10^{-3} M) des Ca^{2+} -Ionophors beigelegt. Die Ansätze wurden für eine Stunde inkubiert und der Ecdysteroidgehalt mittels RIA ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-24 dargestellt.

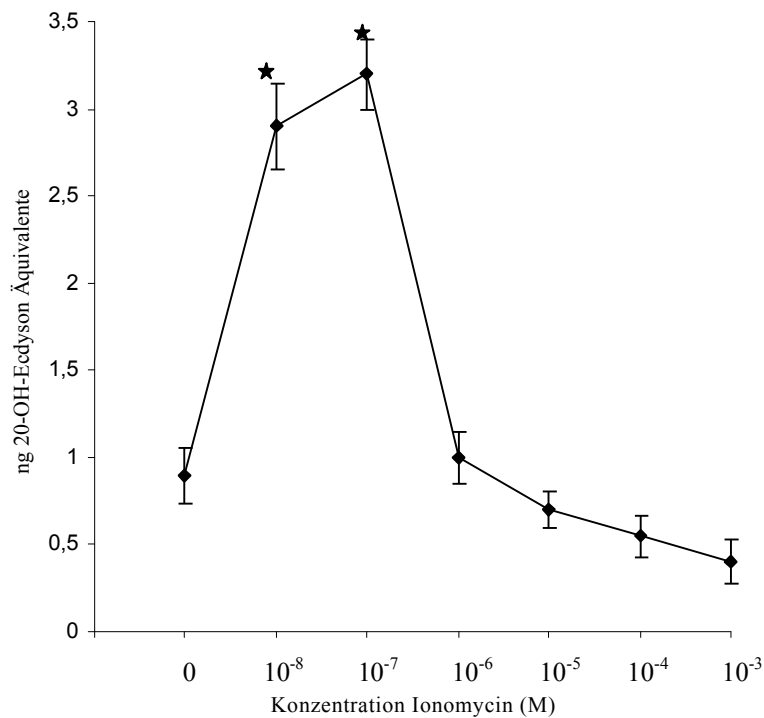


Abb. 3-24: Effekt von Ionomycin auf die Ecdysteroidsekretion.

Oenocyten von 9 Tage alten adulten Männchen wurden ohne (Nullwert) oder mit verschiedenen Konzentrationen von Ionomycin in 500 µl Medium inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Gehalt an abgegebenen Ecdysteroiden mittels RIA bestimmt.

Die vertikalen Balken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (S. E. M.) von sechs Bestimmungen. Die mit * markierten Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) vom Kontrollwert (Nullwert).

Wie Abbildung 3-24 zeigt, konnte Ionomycin, das den Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol bewirkt, bei niedriger Konzentration (10 nM bis 100 nM) die Hormonsekretion stimulieren und somit die Wirkung von OSF nachahmen. Bei höheren Konzentrationen von Ionomycin ($>1 \mu\text{M}$) wurde jedoch eine Hemmung der Ecdysteroidsekretion festgestellt.

3.9 Immunohistochemischer Nachweis von Ecdysteroiden

In dieser Versuchsreihe sollte das Vorkommen von Ecdysteroiden in Oenocyten mittels Fluoreszenzmikroskopie *in situ* sichtbar gemacht und mit Prothorakaldrüsen von *Bombyx mori* als definitive Ecdysteroidquelle (Chino et al., 1974) verglichen werden. Dabei erfolgte die Lokalisierung von Ecdysteroid-immunoreaktiven Substanzen in den Oenocyten und den Prothorakaldrüsen mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenztechnik. Zur Visualisierung wurde ein mit FITC markierter zweiter Antikörper verwendet (s. Kap. 2.9.1).

Weder die Präinkubation mit Ecdysteroiden, noch die Verwendung von Präimmunserum als erstem Antikörper, noch die Versuchsdurchführung ohne primäres Antiserum führten zu einer spezifischen Markierung der Organproben.

Die Oenocyten zeigten eine ausgesprochen intensive Fluoreszenz, d. h. eine stark positive Reaktion im Cytoplasma (Abb. 3-25). Dagegen konnte in den Oenocyten umgebenden Fettkörper sowie der abdominalen Muskulatur (Abb. 3-25a & Abb. 3-25c) kein immunreaktives Material nachgewiesen werden. Es ist darauf hinzuweisen, daß die Drüsenaktivität und die daraus resultierende Fluoreszenzintensität stark von Alter und Entwicklungsstadium der Tiere abhängig war. So wurde beispielsweise bei den untersuchten Prothorakaldrüsen von *B. mori* am dritten Tag des letzten Larvenstadiums eher eine geringere Fluoreszenzmarkierung festgestellt (Abb. 3-26) als bei Oenocyten aus 11 Tage alten *G. bimaculatus*.

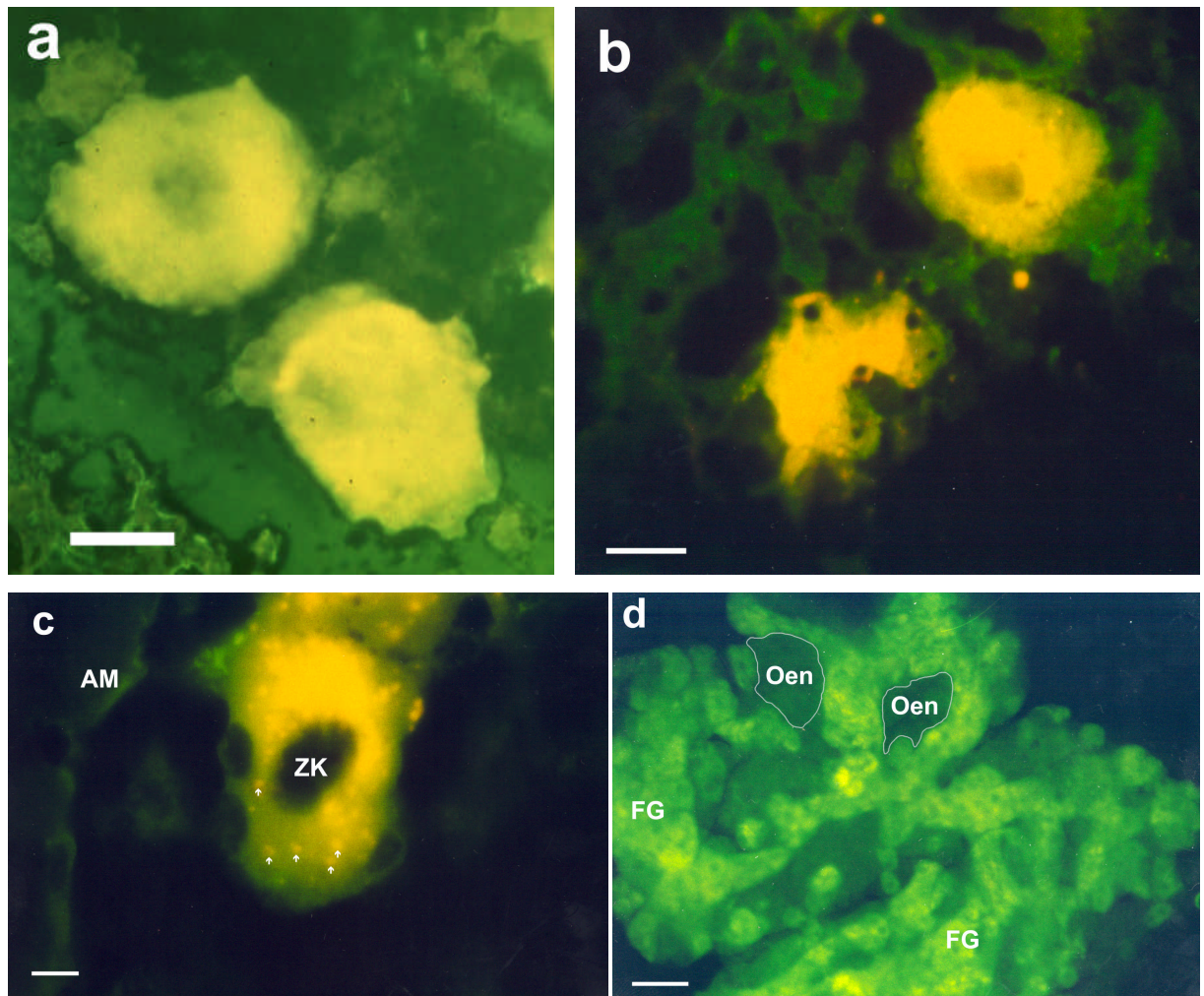


Abb. 3-25: Ecdysteroid-Immunoreaktivität in Oenocyten von 11 Tage alten männlichen Imagines von *Gryllus bimaculatus*.

Positive Immunofluoreszenz in a, b und c sowie negative Immunofluoreszenz in der Kontrolle d.

a: Gefrierschnitte von zwei nebeneinander liegenden Oenocyten.

b: Die linke Zelle in der unteren Bildhälfte wurde durch die Gefrierprozedur deformiert.

c: Totalpräparat - Pfeile deuten auf starke fluoreszierende Bereiche, bei denen es sich wahrscheinlich um Telolysosomen oder Lipofuscingranula handelt. Links ist ein Teil der abdominalen Muskulatur (AM) zu erkennen. Der Zellkern (ZK) ist durch fehlende Fluoreszenz gekennzeichnet.

d: Übersichtsaufnahme von Oenocyten (Oen) umgeben von Fettgewebe (FG).

Die Belichtungszeit betrug für a, b, d 90 und für c 20 Sekunden.

Die Balken in a und b entsprechen 25 µm, in c 10 µm sowie in d 50 µm.

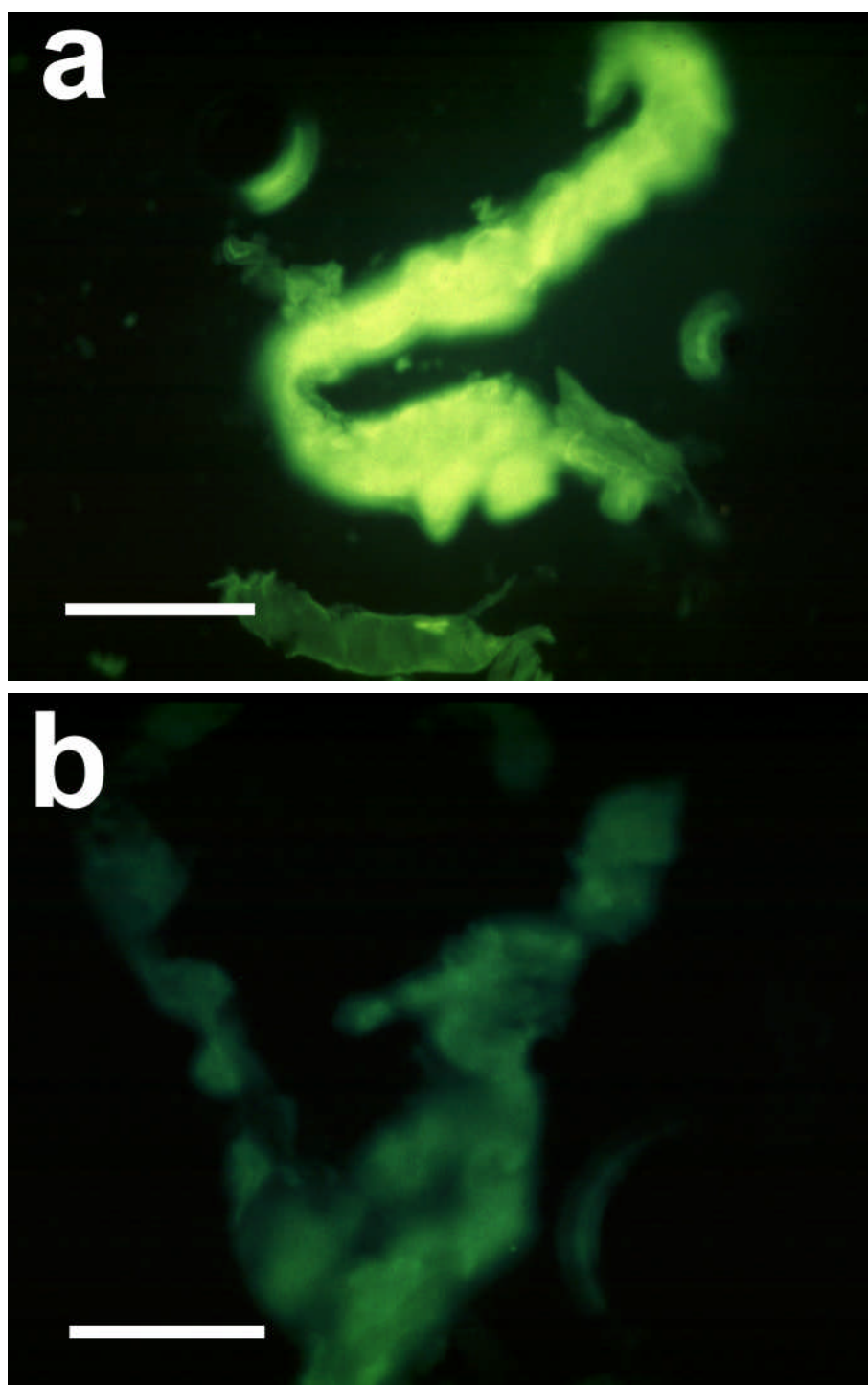


Abb. 3-26: Immunohistochemischer Nachweis für Ecdysteroide in der Prothorakaldrüse des 5. Larvenstadiums von *Bombyx mori*. Die Belichtungszeit betrug in a und b (Kontrolle, ohne ersten Antikörper) 120 Sekunden. Die Balken in a und b entsprechen 50 μm .

4. Diskussion

4.1 Die Ecdysteroidsynthese in Geweben außerhalb der Prothorakaldrüse

Ecdysteroide werden von Insekten in steroidogenen Zellen aus Cholesterin aufgebaut. Als Bildungsort sind in Larven die Prothorakaldrüsen und in Adulten vor allem die Gonaden zu nennen (Koolman, 1990). Neben diesen „klassischen“ Produktionsstätten werden als sogenannte „sekundäre“ Ecdysteroidquellen auch andere Gewebe oder Organe diskutiert, darunter die Oenocyten und die Epidermis (Rees & Isaac, 1985; Redfern, 1989; Delbecque et al., 1990). In wieweit die an einzelnen Insektenarten erhobenen Resultate zur alternativen Ecdysteroidsynthese verallgemeinert werden können, ist umstritten. In Anbetracht der vielen verschiedenen Insektenarten können einzelne Ergebnisse aus Experimenten an einigen wenigen Arten, die phylogenetisch zum Teil sehr weit voneinander entfernt sind, nur mit der notwendigen Vorsicht miteinander verglichen werden.

Die Prothorakaldrüsen sind nicht der einzige Syntheseort von Ecdysteroiden und damit nicht allein für die Häutung der Insekten zuständig. Diese Meinung wurde bereits von Piepho im Jahre 1948 vertreten. Seine Befunde blieben allerdings lange Zeit unbeachtet, da Zweifel an der vollständigen Entfernung der Prothorakaldrüsen bestanden. Chadwick (1955) konnte an isolierten Abdomina von Schaben nachweisen, daß auch in Abwesenheit der Prothorakaldrüse eine Weiterentwicklung und eine Häutung möglich war. Diese Ergebnisse wurden später an *Periplaneta americana* (Gersch, 1978), *Locusta migratoria* (Brehelin & Aubry, 1982) und *Galleria mellonella* (Slama, 1983), deren Prothorakaldrüsen entfernt worden waren, bestätigt. Nicht nur Tiere ohne Prothorakaldrüse, sondern sogar isolierte Abdomina von *Mamestra brassicae* (Gersch & Stürzebecher, 1971), *Tenebrio molitor* (Delbecque et al., 1978), *Dermestes sp.* (Delbecque & Slama, 1980), *Leptinotarsa decemlineata* (de Wilde et al., 1981), *Manduca sexta* (Sakurai et al., 1991) und *Aedes aegypti* (Jenkins et al., 1992) waren in der Lage, sich zu häuten.

Bei Insekten wird neben der Häutung auch die Fortpflanzung durch Ecdysteroide gesteuert (Hagedorn, 1985; Hoffmann et al., 1986). Da Imagines im reproduktionsfähigen Alter jedoch keine funktionstüchtigen Prothorakaldrüsen mehr

besitzen (Richter, 1984; Martau & Romer, 1998), müssen alternative Ecdysteroidquellen existieren, die durch übergeordnete Zentren reguliert werden.

4.2 Die Ecdysteroidproduktion der untersuchten Gewebe

In der vorliegenden Arbeit stand nicht die Synthese von Ecdysteroiden durch Oenocyten und anderen Geweben im Vordergrund, sondern in erster Linie war die Frage nach der Wirkung von übergeordneten Neurohormonen auf die Ecdysteroidsekretion Mittelpunkt des Interesses. Jedoch stellte sich zwangsläufig die Frage, ob es sich bei den in den Geweben detektierten Ecdysteroiden um neusynthetisierte oder gespeicherte Ecdysteroiden handelt.

Die der Arbeit zugrunde liegenden Sekretionskinetik-Analysen (s. Kap. 3.1) sowie die Nullwertbestimmungen deuten auf eine Synthese von Ecdysteroiden durch Oenocyten, Tergite und Prothorakaldrüsen in den ersten Stunden der Inkubation hin. Bei thorakalem Fettkörper scheint dies nur bedingt der Fall zu sein. Im folgenden wird auf die Ergebnisse von anderen Autoren eingegangen.

Oenocyten:

Die Oenocyten der Insekten sind hinsichtlich ihrer Entwicklungsgeschichte Derivate des Ektoderms und als spezialisierte Epidermiszellen zu betrachten (Wigglesworth, 1948; Harmsen & Beckel, 1960). Diese relativ großen Zellen mit einem Durchmesser von mindestens 30 µm wurden bei den meisten Insekten entweder als Cluster oder verstreut im Fettkörper gefunden. Ihre endgültige Lage ist bei den einzelnen Ordnungen sehr unterschiedlich und es war daher schwierig, eindeutige Rückschlüsse auf ihre Funktion zu ziehen. Während der embryonalen Entwicklung entstehen die Oenocyten segmental im Abdomen (Dorn, 1972). Abgesehen von ihrer Bedeutung als Ecdysteroid-produzierendes oder zumindest -sezernierendes Gewebe (s. unten), werden den Oenocyten eine Reihe anderer Aufgaben wie die Bildung von Epicuticularmaterial (Wigglesworth, 1985a), Sklerotisierung (Wigglesworth, 1985b) und eine mögliche Immunabwehrfunktion (Philogène & McFarlane, 1967) zugeschrieben. Bei Studien an *Bombyx mori* konnte in Oenocyten das Protein p260/270 lokalisiert werden, das an Palmitoylierungsvorgängen beteiligt ist (Ueno &

Suzuki, 1997). Nach neusten Untersuchungen spielen die Oenocyten auch eine zentrale Rolle bei der Biosynthese von Hämoproteinen während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila melanogaster* (Ruiz de Mena et al., 1999).

Bereits Koller (1929), Zavrel (1935) und Yokoyama (1936) äußerten die Ansicht, die Oenocyten könnten die Bildungsstätten von Hormonen sein, die die Häutung beeinflussen. Erst Locke (1969) nahm diese Hypothese wieder auf, nachdem sie kaum mehr zur Diskussion stand. Die Ergebnisse seiner Untersuchungen zur Feinstruktur der Oenocyten bei *Calpodes* zeigten gewisse Parallelen zu denen Steroidhormon-produzierenden Zellen der Wirbeltiere. Es folgte eine Reihe von Untersuchungen, die die Ergebnisse von Locke auch bei anderen Insektenarten bestätigten (Bonner-Weir, 1970; Romer, 1972, 1973, 1974, 1975; Rinterknecht & Matz, 1983).

Aufgrund morphometrischer Untersuchungen wurde von Romer (1973) kalkuliert, daß auf der Basis der relativen Gewebemasse Oenocyten nur ein Zehntel so aktiv sein müßten wie die Prothorakaldrüsen, um eine vergleichbare Menge an Ecdysteroiden zu produzieren. Das Cytoplasma der Oenocyten wird besonders vom glatten endoplasmatischen Reticulum beherrscht, zwischen seinen Tubuli liegen viele Vesikel, Mitochondrien mit tubulären Cristae und Cytosomen, die im Verlauf eines Häutungszyklus typischen Veränderungen unterliegen (Romer, 1975). Weitere Hinweise auf eine mögliche Synthese von Ecdysteroiden durch Oenocyten auf ultrastruktureller Ebene lieferten Hintze-Podufal (1975), Dorn & Romer (1976) und Ratcliffe & Gagen (1977).

Romer et al. (1974) zeigten, daß die von *Tenebrio molitor* Larven stammenden Oenocyten *in vitro* die Fähigkeit besaßen, ¹⁴C-Cholesterin in Ecdyson und hauptsächlich 20-OH-Ecdyson umzuwandeln. Inkubierte man Prothorakaldrüsen und Oenocyten zusammen, so wurde das von den Prothorakaldrüsen stammende Ecdyson in den Oenocyten zu 20-OH-Ecdyson hydroxyliert. Delbecque et al. (1978) bestätigten die Ergebnisse von Romer et al. (1974) an isolierten Abdomina von *Tenebrio* Puppen. Agui (1974) zeigte, daß Ecdysteroide als Faktoren für die Beschleunigung des Wachstums der Imaginalscheiben von *Mamestra* durch Zugabe von Oenocyten ersetzt werden konnten. Weitere Indizien für die Synthesefähigkeit legten Ruhland & Romer (1977) vor, indem sie die Oenocyten von *Bombyx*-Larven auf ihre Häutungshormonaktivität mit dem *Calliphora*-Test überprüften und zu

positiven Ergebnissen gelangten. Sie stellten eine stoßweise Aktivität gegen Ende des Larvenstadiums fest.

Die Oenocyten von *Gryllus* liegen im Fettkörper verteilt vor und sind im Gegensatz zu *Bombyx* und *Tenebrio* vom übrigen Gewebe nicht zu isolieren. Hierdurch bedingt wurden die Oenocyten einschließlich Fettkörperanteilen präpariert und aufgearbeitet. Vor ähnlichen präparativen Schwierigkeiten stand auch Handler (1982) bei Untersuchungen an *Drosophila*. Die Oenocyten sind dort ebenfalls von Fettkörper umgeben, wodurch die Zuordnung der sezernierten Ecdysteroide erschwert wird.

Bressel (1989) berichtet von Ecdysteroiden in Oenocyten adulter Männchen von *Gryllus*, in denen er dort erhebliche Hormonmengen nachweisen konnte.

Allerdings liegen auch Berichte vor, die eine Einbeziehung der Oenocyten in die Ecdysteroidsynthese nicht bestätigen, so z.B. bei *Manduca*-Vorpuppen (King, 1972).

Die Frage, ob es sich bei Oenocyten um Speicherorte oder Syntheseorte für die Ecdysteroide handelt, scheint nach unserem heutigen Wissensstand von Art zu Art unterschiedlich zu sein und vom Entwicklungsstadium abzuhängen. Ob es sich hierbei eher um eine allgemein verbreitete Fähigkeit oder um Ausnahmen handelt, müßte, bezogen auf das System an einem breiteren Untersuchungsmaterial geprüft werden. Ein sehr wichtiges Kriterium bei der Suche nach geeigneten Objekten stellt die problemlose Isolation der Oenocyten von umgebendem Gewebe, insbesondere dem Fettgewebe, dar.

Tergite:

Trotz ihrer verhältnismäßig einfachen Präparation wurden die Tergite nur selten als ganzes System im Hinblick auf eine mögliche Syntheseaktivität bei *Gryllus bimaculatus* verwendet. Shahab & Romer (1982), Bressel (1989) und Hoffmann et al. (1992) untersuchten die Tergite auf eine eventuelle Ecdysteroidsekretion. Daß Tergite von *Gryllus* in der Lage sind, Ecdysteroide auch zu metabolisieren, zeigte Eibes 1993.

Die für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Tergite waren sekretorisch aktiv (Abb. 3-2) und zeichneten sich im Gegensatz zu den Oenocyten durch ein unregelmäßiges Sekretionsverhalten mit höheren Streuungen während der Inkubationszeit aus.

Die hier dargestellten Resultate an Oenocyten und Tergiten sind in Einklang mit den Befunden aus Ganztierextrakten, die ebenfalls eine sprunghafte Zunahme und eindeutige Schwankungen des Hormontiters zwischen Tag 9 und Tag 12 nach der Imaginalhäutung zeigten (Romer & Shahab, 1984).

Fettkörper:

Wie bereits erwähnt, findet man die Oenocyten bei *Gryllus bimaculatus* im Neuralsinus lateral vom Bauchmark vermischt mit Fettkörperzellen konzentriert vor. Um die Frage zu klären, aus welchen Gewebeteilen das Ecdyson stammt, wurde die Hormonsekretion von reinem Fettgewebe (ohne Oenocyten) aus dem Thorax untersucht. Die Sekretionsrate des thorakalen Fettkörpers war im Vergleich zu anderen untersuchten Geweben als sehr gering einzustufen, die Sekretionsleistung ging nach anfänglicher Kontinuität relativ zügig gegen Null (Abb. 3-3). Auch die immunohistochemischen Ergebnisse (Abb. 3-25) zeigten im Gegensatz zu den Oenocyten eine negative Fluoreszenz im Fettgewebe.

Der Fettkörper als Hauptorgan des intermediären Stoffwechsels bei Insekten nimmt auch im Ecdysteroidstoffwechsel eine zentrale Stellung ein (Koolman, 1982, 1990). Den Nachweis für das Vorhandensein von freien und konjugierten Ecdysteroiden im Fettkörper adulter Männchen und Weibchen von *Gryllus* erbrachten Hoffmann und Behrens (1982), Bressel (1989), Hoffmann et al. (1992) sowie Hoffmann und Wagemann (1994). Hinweise auf eine längere Speicherung von Ecdysteroiden durch Fettgewebe ergaben sich jedoch nicht (Bulenda et al., 1986). Shahab (1985) wies zwar ebenfalls Ecdysteroide im thorakalen Fettkörper nach, schloß jedoch durch Vergleich mit den Kontrollen nicht auf eine Synthese, sondern auf einen Abbau.

Handler (1982) stellte im Fettkörper-Oenocyten-Gemisch von *Drosophila* eine Ecdysonhydroxylaseaktivität fest. Wildmann und Romer (1977) zeigten, daß der Fettkörper von *Gryllus* in der Lage war, Ecdyson zu 20-Hydroxyecdyson zu konvertieren. Zhu et al. (1983) wiesen im Fettkörper der Schabe *Nauphoeta cinerea* das Vorkommen einer Ecdyson-20-Monooxygenase nach. Die Ecdysonmonooxygenase wirkt außer auf Ecdyson auch auf verschiedene andere Ecdysteroide (Lafont & Koolman, 1984) und katalysiert die Reaktion von Ecdyson zu 20-Hydroxyecdyson (Weirich, 1989). Anhand dieser Befunde ist davon

auszugehen, daß die eigentliche Funktion des Fettkörpers innerhalb des Ecdysteroidstoffwechsels in einer Metabolisierung von freien Ecdysteroiden besteht.

4.3 Ecdysteroidsekretion und Kinetik *in vitro* an Einzelgeweben

Die in Kapitel 3.1 vorgestellten Ergebnisse stellen Vorversuche für weitere Untersuchungen dar, die bei idealen anatomischen Gegebenheiten, d.h. bei der Verwendung von paarig angelegten Geweben entfallen.

Eine geeignete Methode, um dieser Schwierigkeit zu entgehen, scheint die Erstellung einer Sekretionsverlaufs-Kurve während einer bestimmten Inkubationszeit zu sein. Tobe (1977) untersuchte die Corpora allata der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* auf die Synthese von Juvenilhormonen und stellte interessanterweise fest, daß sich die linke und rechte Hälfte der Corpora allata in Bezug auf die Hormonsekretion asymmetrisch verhielten, d.h. sie produzierten signifikant unterschiedliche Mengen von Juvenilhormon. Diese Diskrepanz zwischen der linken und rechten Seite verhinderte somit die Untersuchung von Wirksubstanzen auf die Corpora allata, da hier keine Kontrollhälfte zur Verfügung stand. Als Avruch und Tobe (1978) die beiden Hälften *in vitro* für einigen Stunden zusammen inkubierten, fanden sie überraschend einen konstanten Sekretionsverlauf und somit konnte dieser Bioassay als Kontrolle für weitere Experimente verwendet werden.

Mit Hilfe von Sekretionsprofilanalysen sollte herausgefunden werden, wie sich die untersuchten Gewebe *in vitro* ohne Einfluß von Kopfextrakten verhalten und ob sich die ausgewählten Gewebe für weitere Experimente eignen. Alle vier untersuchten Gewebe waren in der Lage, trotz unterschiedlicher Menge und unterschiedlichem Sekretionsverlauf, Ecdysteroide ins Medium abzugeben (s. Kap. 3-1). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren somit in Einklang mit den Resultaten von Romer und Bressel (1994), Martau und Romer (1998) sowie Ohe et al. (1998). Im Gegensatz zu den Resultaten von Romer und Bressel (1994), zeigten in der vorliegenden Arbeit die Oenocyten (9, 10, 11 Tage alt) eher eine konstant hohe Sekretionsrate. Dieses unterschiedliche Ergebnis steht möglicherweise mit den unterschiedlichen Inkubationszeiten in Zusammenhang. Nach Romer und Bressel (1994) weist das Sekretionsprofil der Oenocyten eine kontinuierliche Abgabe von Ecdysteroiden mit abnehmender Sekretionsleistung im Verlauf der Inkubationsdauer

auf. Dies deutet auf eine Hemmung der Ecdysteroidbiosynthese durch Vorläuferprodukte sowie eine kurze negative Rückkopplungsschleife hin, denn je konzentrierter Ecdyson im Medium ist, desto geringer ist die von den Geweben produzierte Menge an Hormon (Sakurai & Williams, 1989). Dies entspricht den Ergebnissen aus Experimenten mit verschiedenen Insektenspezies (Loeb et al., 1988; Watson et al., 1989a).

Die absolute Menge an gebildeten Ecdysteroiden und somit die gemessene Geschwindigkeit der Steroidgenese unter *in vitro* Bedingungen ist abhängig vom Inkubationsvolumen. Die Untersuchungen von Käuser et al. (1988) und Budd (1992) zeigten, daß Inkubationen von Einzelgeweben nur dann optimal verliefen, wenn ein geeignetes Flüssigkeitsvolumen gewählt wurde. Auch die *in vitro*-Syntheseleistung der Prothorakaldrüsen von *G. bimaculatus* war in hohem Maße abhängig von den Inkubationsbedingungen (Gerstenlauer & Hoffmann, 1995).

In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden einige Präparate jeweils in 50 µl, 100 µl und 500 µl Grace's Medium für definierte Zeiten inkubiert und die Konzentration der abgegebenen Ecdysteroide mit dem RIA bestimmt. Aus diesen Messungen ging hervor, daß die Gewebe in 50 µl Medium weniger Ecdysteroide produzieren als in 100 µl bzw. 500 µl Medium. Eine mögliche Ursache für die Abnahme der Hormonsekretionsleistung könnte der bereits erwähnte Feedbackmechanismus sein. Ein weiterer wichtiger Aspekt bestand darin, eine optimale Sauerstoffversorgung der Gewebe zu gewährleisten. Aus diesem Grunde wurden alle Inkubationen in 500 µl Grace's Medium (Totalentnahme zu definierten Zeitpunkten) durchgeführt.

4.4 Bioassay für die Detektion von Faktoren mit Wirkung auf die Ecdysteroidsekretion

Um die Faktoren mit ecdysteroidstimulierender Wirkung in Kopfextrakten von *Gryllus* zu identifizieren und zu isolieren, wurde ein geeigneter Bioassay aufgebaut, der es erlaubte, Substanzen zu testen, die die Ecdysteroidsekretion positiv beeinflussen. Dieser *in vitro* Bioassay mußte bestimmte Anforderungen erfüllen: er sollte spezifisch sein und empfindlich, in dem er schon auf kleinste Mengen reagiert. Der in dieser Arbeit entwickelte Bioassay basierte auf dem Verlauf der

Sekretionskinetik (Inkubation von Geweben für definierte Zeiten) und auf der Analyse der Ecdysteroide mittels einer Kombination aus RIA und HPLC.

Für eine Spezifität des Bioassays sprach, daß erstens beim Testen von Fraktionen aus der HP-SEC-Auftrennung nur wenige Fraktionen eine stimulierende Wirkung auf die Ecdysteroidsynthese aufweisen (Abb. 3-7 & Abb. 3-8) und daß zweitens angereicherte Fraktionen von Ecdysiotropinen eine sigmoidale Dosis-Wirkkurve (Abb. 3-10) zeigten.

Der Bioassay war semiquantitativ, da eine Aussage über die Höhe der biologischen Aktivität, unter anderem auch von dem verwendeten Antikörper (s. Kap. 2.5.1.1) abhing. Desweiteren ließen sich keine echten Konzentrationangaben der biologisch aktiven Faktoren machen, da die Dosis-Wirkkurve nur in einem sehr schmalen Bereich linear verlief. Im Prinzip ließe sich, wenn die molekulare Struktur des biologisch aktiven Faktors bekannt wäre, auf der Grundlage der Aktivität auch die absolute Menge der ecdysiotropen Faktoren angeben.

Die Empfindlichkeit des Bioassays reichte aus, um die Ecdysteroidsekretionsstimulierenden Faktoren zu identifizieren. Die Befunde der Dosis-Wirkkurve (Abb. 3-10) zeigten, daß lediglich 0,35 Kopfüquivalente die Ecdysteroidsekretion in den Oenocyten verdoppeln konnten. Dabei ist zu beachten, daß die ausgewählten Oenocyten aus 9 Tage alten Tieren sehr geringe Hormonmengen sezernierten (Abb. 3-1) und somit für den Test die notwendige Sensitivität aufwiesen. Studien an den Prothorakaldrüsen von *Manduca sexta* (Bollenbacher et al., 1983) und *Lymantria dispar* (Kelly et al., 1992) zeigten eindeutig, daß steroidogene Drüsen, die eine hohe Hormonkonzentration aufzeigten, keiner Aktivierung durch Ecdysiotropine unterlagen. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß die Oenocyten am Tag 9 für den Test der Ecdysiotropine besonders geeignet waren, da sie einen geringeren endogenen Steroidpool im Vergleich zu anderen Tagen aufwiesen.

Abschließend sollen noch einige kritische Anmerkungen zur Präparation gemacht werden. Vorteilhaft wäre es gewesen, jedes Gewebe in zwei gleichgroße Hälften zu teilen, um eine Hälfte als Kontrolle und die andere Hälfte als Testgewebe zu verwenden. Dieses Vorhaben wurde nach anfänglichen Experimenten jedoch aufgegeben, da durch die komplexen anatomischen Verhältnisse eine gleichmäßige Aufteilung nicht möglich war. Zu bedenken war auch, ob beide Hälften gleichwertig

im Hinblick auf ihre Syntheserate gewesen oder durch etwaige gewebeinterne Verteilungsmuster gestört worden wären. Nur die Tergite wurden aufgrund ihrer festen Form nach der Präparation unter dem Binokular in zwei gleiche Teile halbiert. Beim Einsatz von Geweben aus verschiedenen gleichaltrigen Tieren konnte nicht von gleichen Syntheseraten ausgegangen werden. Dennoch wurde durch das Erstellen von Sekretionskinetiken und durch die große Anzahl an untersuchten Tieren versucht, diese Fehlerquelle so klein wie möglich zu halten.

4.5 Die quantitativen Bestimmungsmethoden für Ecdysteroide

Für die quantitative Bestimmung von Ecdysteroiden wurden im Laufe der Jahre verschiedene Methoden entwickelt, die sich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit und der Art der Substanzen, die sie erfassen, aber auch bezüglich der notwendigen Probenaufbereitung unterscheiden. Dazu zählen Bioassay, Enzymimmunoassay, physiko-chemische Quantifizierungen und der am häufigsten verwendete Radioimmunoassay.

Der erste Bioassay für Häutungshormone wurde bereits im Jahr 1939 entwickelt, lange bevor die Struktur der Hormone bekannt war (Becker & Plagge, 1939). Mit einigen Modifikationen wird er auch heute noch als *Musca*-Test eingesetzt. Als Maß für die Ecdysteroidkonzentration dient der Grad der Verpuppung eines abgeschnürten Abdomens einer Fliegenlarve nach Injektion von Ecdysteroiden. Ähnliche Bioassays für Ecdysteroide wurden auch mit anderen Insekten durchgeführt (Kelly & Fuchs, 1980). Neben diesen *in-vivo*-Bioassays wurden auch *in-vitro*-Bioassays unter Verwendung von Insektenzelllinien (Courgeon, 1972), Imaginalscheiben aus Puppen (Bergamasco & Horn, 1980) oder Riesenchromosomen aus *Drosophila* Speicheldrüsenzellen (Richards 1978) eingesetzt. Bisher wurden ca. 60 Ecdysteroide in verschiedenen Bioassays getestet (Cherbas et al., 1980). Die Spezifität der Bioassays ist jedoch gering, aber ermöglicht zumindest eine Aussage darüber, ob eine Substanz bei Arthropoden überhaupt häutungsaktiv wirkt.

Zur physiko-chemischen Quantifizierung im Anschluß an eine chromatographische Auftrennung werden zum Beispiel die UV-Absorption oder die durch Schwefelsäure induzierte Fluoreszenz der Ecdysteroide ausgenutzt.

Eine weitere, wichtige und zum gegenwärtigen Zeitpunkt am häufigsten benutzte Methode ist der Radioimmunoassay (s. Kap. 2.5.1). Dieser zeichnet sich durch seine leichte Handhabung und zugleich hohe Sensitivität aus (Hoffmann & Hetru, 1983). Allerdings ist die Sensitivität (4×10^{-15} mol = 1,6 pg) von der Spezifität des verwendeten Antikörpers abhängig (Hirn & Delaage, 1980), was zu Folge hat, daß nicht alle Komponenten eines Ecdysteroidgemischs in gleicher Weise gebunden werden (Loeb et al., 1982). Zusätzlich können Kreuzreaktionen mit endogenen Metaboliten und Vorläufern des Ecdysons auftreten (Spindler et al., 1978). Um diese Fehlerquellen einzugrenzen, wird eine Kombination mit chromatographischen Verfahren empfohlen (Hoffmann & Behrens, 1982). Aufgrund der geringen Molekülgröße freier Ecdysteroiden können nur Ecdysteroid/Protein-Konjugate als Immunogen bei der Antikörperherstellung eingesetzt werden. Als Tracer dient ein Isotopen-markiertes Ecdysteroid. Die Trennung der Liganden-Rezeptor-Komplexe (Ecdysteroid-Antikörper) von freien Liganden (Ecdysteroiden) kann mittels verschiedener Verfahren erfolgen (Reum & Koolman, 1989).

Es sei darauf hingewiesen, daß RIA-Werte keine absolute Informationen über den Gehalt eines biologischen Extrakts an einzelnen Ecdysteroiden oder an Gesamtecdysteroiden geben, da einige Antiseren spezifisch auf den Steroidkern, andere mehr auf die Seitenkette reagieren. Somit können die Ergebnisse für die selbe Probe unterschiedlich ausfallen.

Erst seit 1989 steht auch ein Enzymimmunoassay (EIA) zur Verfügung (Porcheron et al., 1989). Beim EIA wird der radioaktive Tracer durch einen Enzymtracer ersetzt. Detektiert wird photometrisch bei 450 nm. Aus der Nachweisgrenze und dem Verlauf der Eichkurven ergibt sich ein Meßbereich von 10-150 pg Ecdysteroid-Äquivalenten pro Probe. Derzeit geht die Entwicklung des EIA zum Festphasen-Immunoassay (Mikrotiterplatten beschichtet mit Antiserum) hin, bei dem die Antikörper an ein Polystyrenbett gebunden sind.

4.6 Nachweis von Ecdysteroiden durch HPLC

In der Ecdysteroidanalytik, die zur Auftrennung und Identifizierung von Ecdysteroidgemischen eingesetzt wird, ist die High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) am weitesten verbreitet. Da die Methode jedoch

gewöhnlicherweise mit Detektoren geringerer Spezifität betrieben wird, erfolgt die Charakterisierung der Ecdysteroide über den Vergleich der Retentionszeiten mit authentischen Referenzsubstanzen. Dabei ist zu beachten, daß einerseits die starke UV-Absorption von Ecdysteroiden (λ_{max} 242 nm, ϵ 10,000-14,000) eine direkte Detektion ermöglicht und andererseits die Interpretation biologischer Proben durch die große Anzahl ähnlicher Retentionszeiten von verschiedenen Metaboliten erschwert wird. Die Reihenfolge, in der Ecdysteroide von der Säule eluiert werden, hängt von ihrer Molekülstruktur (weniger von ihrer Polarität) sowie der Art der stationären und mobilen Phasen ab.

Die HPLC/RIA-Analysen (Abb. 3-11 & Abb. 3-12) der mit OSF behandelten Proben und den dazugehörigen Kontrollen (ohne OSF) zeigten zwei unterschiedliche Ecdysteroidmuster. Dabei wurden zwei zusätzliche, eng nacheinander eluierte, im RIA aktive Peaks, sowohl mittels RP- als auch bei NP-Auftrennung gefunden, die eindeutig nur in Oenocyten nach OSF-Behandlung auftraten. Bei dem ersten zusätzlichen Peak mit einer Retentionszeit von 11,5 (RP) bzw. 14 (NP) Minuten handelt es sich vermutlich um Makisteron A.

Makisteron A (24-Methyl-20-Hydroxyecdysen) ein C_{28} -Ecdysteroidhormon (Abb. 4-1) wurde sowohl aus Pflanzen (Hikino et al., 1976) als auch aus verschiedenen Insektenarten, hauptsächlich Hemipteren, Hymenopteren und Dipteren isoliert (Imai et al., 1968; Kaplanis et al., 1975; Redfern, 1984) und weist einige Besonderheiten auf. Es ist das einzige Hormon mit Häutungsaktivität, das nicht aus Cholesterin, sondern aus Campesterol und Sitosterol synthetisiert wird (Feldlaufer et al., 1995). Daß Makisteron A auch eine biologische Wirkung hat, zeigten Untersuchungen von Kozhanova und Sehnal (1997), die eine Beeinflussung des cytoplasmatischen Wachstums der Oocyten von *Pyrrhocoris apterus* nachweisen konnten.

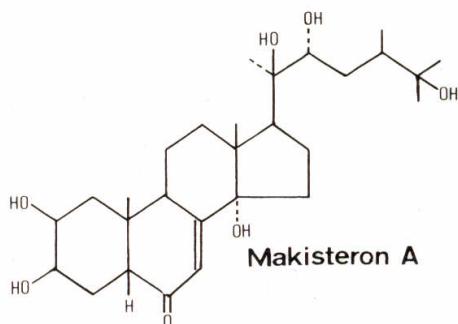


Abb. 4-1: Struktur von Makisteron A.

In der vorliegenden Arbeit konnte Makisteron A oder eine Substanz mit einer dem Makisteron ähnlichen Retentionszeit nach Behandlung der Oenocyten mit Kopffextrakten durch eine Kombination aus HPLC/RIA dedektiert werden, was auf eine *de-novo* Synthese oder/und eine Mobilisierung der gespeicherten Ecdysteroid-konjugate hindeutet. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, müsste durch den Zusatz von radioaktiv markierten Vorläufern und anschließender Identifizierung des Produkts dieser Frage nachgegangen werden. Mit Ausnahme einer einzigen Arbeit fehlen in der Literatur jegliche Anhaltspunkte. Henrich et al. (1987) untersuchten die Ringdrüse von *Drosophila*-Larven nach Zugabe von Gehirnextrakten auf Ecdysteroiden. Sie stellten die Produktion von 20-Deoxy-Makisteron A durch die Ringdrüse fest. In Kontrollgewebe konnte kein 20-Deoxy-Makisteron nachgewiesen werden.

Der zweite zusätzliche Peak mit einer Retentionszeit von 10 (RP) bzw. 15 (NP) Minuten konnte nicht näher identifiziert werden, da eine Referenzsubstanz mit identischer Retentionszeit nicht vorhanden war. Hier bietet sich als geeignete Analysenmethode die Massenspektrometrie an (Wainwright et al., 1997). Mittels dieses Verfahrens kann die Identität von Ecdysteroiden bestätigt werden, die aufgrund ihrer Retentionszeiten nach HPLC-Auftrennung bereits charakterisiert wurden. Massenspektren von Ecdysteroidproben geben Auskunft über die molekulare Struktur der Verbindungen.

Außerdem wurde eine starke Zunahme von 20-OH-Ecdyson nach Stimulation mittels OSF verzeichnet. Die Sekretion von Ecdyson und besonders von 20-OH-Ecdyson durch die Oenocyten gilt als gesichert und wurde in Kapitel 4-2 ausführlich diskutiert.

4.7 Die Wirkungsweise von Azadirachtin

Die Wirkung von Azadirachtin (Abb. 4-2), einem natürlichen Insektenwachstumsregulator aus dem Niem-Baum ist vielfältig und erschwert das Verständnis des Wirkmechanismus. Aza, das aus den Samen und Blättern der Meliaceae *Azadirachta indica* (A. Juss) und *Melia azederach* (Linnaeus) extrahiert wird, ist ein arthropoden-spezifisch wirksames Biozid (Insektizid). Es wurde

erstmals von Butterworth und Morgan (1968) in reiner Form isoliert und beschrieben, später von Zanno et al. (1975) als Tetranotriterpenoid identifiziert.

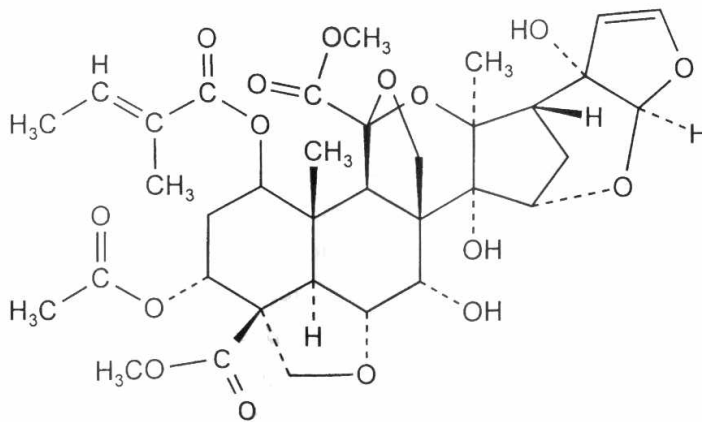


Abb. 4-2: Struktur von Azadirachtin (nach Kraus et al., 1985).

Aza setzt die Fraßaktivität vieler hemi- und holometaboler Insekten herab (Ladd et al., 1978; Trumm & Dorn, 2000), mindert die Fekundität, hemmt das Wachstum und stört die Metamorphose (Butterworth & Morgan, 1971; Steets & Schmutterer, 1975; Schmutterer & Rembold, 1980; Schlüter & Schulz, 1984). Ferner stellen Sieber und Rembold (1983) bei *Locusta migratoria*, Redfern et al. (1981) und Dorn et al. (1986) bei *Oncopeltus fasciatus* fest, daß durch Aza der Ecdysteroidtitel gesenkt wird. Käuser und Koolman (1983) zeigten mit *in vitro*-Tests ein Konkurrieren von Aza mit Ponasteron A um den 20-OH-Ecdyson-Rezeptor bei *Calliphora vicina*. Es gibt zahlreiche Berichte darüber, daß Aza die Imaginalhäutung der Insekten unterdrückt und zu „Dauerlarven“ führt (Übersicht in Jacobson, 1986; Schmutterer, 1995). Eine Stadienverlängerung sowie eine Hemmung und/oder Unterbindung der Ecdysis sind nach Aza-Behandlung für viele Insektenarten beschrieben worden, z.B. für *Heliothis zea* und *Spodoptera frugiperda* (McMillen et al., 1969), *Epilachna varivestis* (Schlüter, 1985), *Ostrinia furnacalis* (Chiu et al., 1984) und *Manduca sexta* (Schlüter et al., 1985). Der Ausfall der Häutung beruht auf einer dosisabhängigen Senkung und zeitlichen Verzögerung des Ecdysteroidtiters (Dorn et al., 1986; Mordue & Blackwell, 1993). Auch die Störungen der Oogenese, die in einem engen Zusammenhang mit einer Aza-beeinflußten, funktionellen Beeinträchtigung der Corpora allata stehen, wurden durch histologische Befunde bestätigt (Schulz & Schlüter, 1982; Schlüter, 1985).

Ferner ist bekannt, daß Aza zu einer Erhöhung der Hormonproduktion in neurosekretorischen Zellen des Gehirns führen kann (Pener et al., 1990; Barnby & Klocke, 1990). Die Beeinflussung der Ecdysteroidsynthese und die Ausprägung der Corpora allata und der Corpora cardiaca durch Aza rührt wahrscheinlich von einer Dysregulation des übergeordneten hormonellen Systems her, da die Entlassung, jedoch nicht die Synthese regulatorischer Neurohormone des Gehirns (i.e. PTTH, Allatotropin und Allatostatine) stark gehemmt werden (Dorn et al., 1987; Sieber & Rembold, 1983; Subrahmanyam & Rembold, 1989; Subrahmanyam et al., 1989). Allerdings gibt es bisher keine Vorstellung darüber, wie die Freisetzung von Neurohormonen an den Axonendigungen der neurosekretorischen Zellen im Neurohämalorgan inhibiert werden könnte. Offensichtlich blockiert Aza die Freisetzung von Neurohormonen aus dem Retro-Cerebralkomplex (Rembold et al., 1989) und hat keinen direkten Einfluß auf die PTTH- und Ecdysonsekretion (Koul et al., 1987; Garcia et al., 1990). Sieber (1982) sowie Subrahmanyam und Rao (1986) berichteten, daß nach Aza-Injektion eine Akkumulation neurosekretorischer Produkte in den medianen neurosekretorischen Zellen auftrat. Ein solcher histologischer Befund wurde mit einer blockierten Ausschüttung von Neurohormonen interpretiert (Highnam, 1976).

Den Wirkmechanismus von Aza erklären Rembold et al. (1987) in einer Hemmung von Transportmechanismen an Zellmembranen. Die Autoren vertreten die Meinung, daß unabhängig von der injizierten Konzentration eine konstante Menge von ca. einem halben µg Aza pro Gramm Körpergewicht im Tier zurückgehalten wird, die fest gebunden vorliegt. Eine Bindung an Rezeptorproteine im Bereich neurosekretorischer Zentren könnte in einer Hemmung der Ausschüttung von Neurohormonen resultieren. Ein Wirkmechanismus dieser Art erklärt die unterschiedlichen Effekte von Aza, die in Abhängigkeit von der Dosis auftreten.

In Anlehnung an die oben genannten Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, durch Applikation von 1 µg Aza pro Gramm Körpergewicht eine Anreicherung des OSF zu erzielen, sowie die Wirkung auf den Ecdysteroid-Spiegel in der Hämolymphe zu untersuchen. Während der Ecdysteroidtiter der Aza-behandelten adulten Tiere stark reduziert war (Abb. 3-13), wurde weder eine Erhöhung noch eine Senkung der Konzentration von OSF festgestellt (Abb. 3-14). Die Dosis-Abhängigkeit von Aza wurde von Rembold (1984) beschrieben.

Bei einer Dosis von 1 µg/g Körpergewicht überlebten die Tiere in den vorliegenden Untersuchungen bis zur Präparation an Tag 11 nach der Imaginalhäutung. Eine höhere Dosis überlebten die Tiere nicht und starben spätestens drei Tage nach der Applikation. Ein Hinweis dafür, daß die injizierte Aza-Dosis in *Gryllus* wirksam war, konnte durch die niedrigeren Ecdysteroidtiter im Vergleich zu Kontrolltieren ($p < 0,05$) gezeigt werden (Abb. 3-13). Dies steht in Einklang mit den Ergebnisse anderer Autoren (s. oben). Die niedrige Ecdysteroid-Konzentration in der Hämolymphe von präadulten Insekten kommt dadurch zustande, daß Aza die Wirkung von PTTH auf die Prothorakaldrüse unterbindet und somit die Ecdysteroidsynthese verhindert. Eine direkte Interaktion zwischen Aza und steroidogenen Drüsen ist eher unwahrscheinlich. Die Inkubation von Prothorakaldrüsen in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an Aza hatte keinen Einfluß auf die Ecdysteroidsekretion ins Medium (Barnby & Klocke, 1990). Auch auf mikroskopischer Ebene konnten keine zytotoxischen Effekte an Prothorakaldrüsen beobachtet werden (Bidmon, 1986).

Eine Erhöhung der Konzentration an OSF kann möglicherweise durch eine höhere Dosis von injiziertem Aza erreicht werden, vorausgesetzt die Tiere überleben dies.

Es soll darauf hingewiesen werden, daß OSF ebenfalls dosisabhängig wirkt (Abb. 3-10). Pener et al. (1990) konnten den erhöhten PTTH-Gehalt im Gehirn erst durch Zugabe von einem Gehirnäquivalent von Tieren, die durch Aza vorbehandelt wurden, nachweisen.

Die Wirkung von Aza ist sehr lange latent (Kubo et al., 1983; Bidmon, 1986). Das würde erklären, daß Aza bei *Gryllus* erst nach dem 11. Tag (Tag der Präparation) zu einer Konzentrationserhöhung an OSF führt.

4.8 Biochemische Eigenschaften der Oenocyten-stimulierenden Faktoren

Von den Ecdysiotropinen (s. Kap. 1.2.1) sind die beiden Formen des prothorakotropen Hormons beim Seidenspinner am besten untersucht (Ishizaki & Suzuki, 1994).

Die Kenntnisse der molekularen Einzelheiten anderer bekannter Ecdysiotropine sind zur Zeit wesentlich weniger erforscht als die der beiden oben genannten PTTHs. In

der Literatur wird meistens nur auf ihre ecdysteroid-stimulierende Wirkung hingewiesen (Charlet et al., 1979; Hagedorn et al., 1979; Masler et al., 1991a). Eine Ausnahme stellt allerdings ein aus *Lymantria dispar* isoliertes Testis Ecdysiotropin dar (Loeb et al., 1988, 1993, 1994, 1998; Wagner et al., 1997). Hierbei handelt es sich um ein kleines Neuropeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 2,3 kDa (entsprechend 21 oder 22 Aminosäureresten), das unter anderem im Protocerebrum und im dazu gehörigen optischen Lobus lokalisiert ist (Meola et al., 1998). Interessant ist die Tatsache, daß das TE des Schwammspinners die Ecdysteroidsynthese und –sekretion in Ovarien von Adulten *Gryllus bimaculatus* drastisch stimuliert (Hoffmann et al., 1994). Das TE wirkt dabei spezifisch und hat keinen Einfluß auf die Prothorakaldrüse.

Die Untersuchungen der biochemischen Natur des PTTHs begann im Jahre 1958 (Kobayashi & Kirimura, 1958) nach der Entdeckung des sogenannten „brain hormone“ durch den polnischen Wissenschaftler Kopec (1922). Erste Experimente zur Biochemie des PTTH führte Kobayashi durch. Er extrahierte PTTH aus *Bombyx*-Puppengehirnen mit organischen Lösungsmitteln wie Methanol (Kobayashi & Kirimura, 1958), Ether und Aceton (Kobayashi et al., 1962). Anschließend prüfte er die Aktivität der gewonnenen Gehirnextrakte in diapausierenden *Bombyx*-Puppen. Eine Injektion des Extrakts mit einer Dosis von ca. 400 Gehirn-Äquivalenten/Puppe konnte die Adultentwicklung hervorrufen. Diese Beobachtung brachte den Autor zu der Annahme, daß es sich beim „brain hormone“ um ein Ether-lösliches Molekül handele, vermutlich um ein unpolares Lipid (Kobayashi & Kirimura, 1958), welches man kurze Zeit später fälschlicherweise für Cholesterol hielt (Kirimura et al., 1962). Es stellte sich heraus, daß der *Bombyx*-Puppenassay durch eine unspezifische Antwort auf einen Extrakt einen falsch-positiven Befund liefern kann (Ishizaki & Ichikawa, 1967), weil die Ergebnisse aus der biologischen Entwicklung der Tiere abgelesen wurden. Die Entwicklung kann aber auch von anderen Faktoren beeinflusst werden, die das Testverfahren unbrauchbar machen. Der Mangel an Spezifität des Assays war die Ursache, die zu dem falschen Ergebnis von Kobayashi führte.

Basierend auf dem Ergebnis, daß ein wäßriger Extrakt aus dem Gehirn von pharaten Adulten des Seidenspinners stimulierend auf die Prothorakaldrüse wirkt, schlugen Ichikawa und Ishizaki (1963) vor, daß es sich beim „brain hormone“ um ein Peptid bzw. ein Protein handeln könnte. Da das Neuropeptid aus dem Gehirn die Wirkung

besitzt, die Ecdysteroidbiosynthese zu stimulieren, wurde das Brain Hormone seiner Funktion entsprechend in „Prothoracicotropic Hormone (PTTH)“ oder „Ecdysiotropic Hormone (ETH)“ umbenannt.

In der Folgezeit führten intensive Studien, besonders von japanischen Forschungsgruppen (Ishizaki & Suzuki, 1992) zur vollständigen Isolierung und Charakterisierung der beiden Formen des PTTH aus *Bombyx mori* (s. Kap. 1.2.1).

Der enzymatische Abbau von PTTH aus bisher bekannten Arten mit Exopeptidasen hat ergeben, daß sowohl der N- als auch der C-Terminus blockiert waren (Ishizaki et al., 1977; Kim et al., 1997). Dies war keineswegs überraschend, da dieser Schutzmechanismus von anderen Neuropeptidhormonen aus Invertebraten bereits bekannt war (Fernlund & Josefsson, 1972; Isobe et al., 1975; Stone et al., 1976).

Es wurde häufig berichtet, daß die prothorakotropen Hormone von *Bombyx mori* (Ishizaki et al., 1977; Nishitsutsuji-Uwo & Nishimura, 1984; Kataoka et al., 1987), *Manduca sexta* (Gibbs & Riddiford, 1977; Kingan, 1981; Bollenbacher, et al., 1985, 1993), *Lymantria dispar* (Thyagaraja et al., 1992; Fescemyer et al., 1995), *Calliphora vicina* (Hua et al., 1997) und *Drosophila melanogaster* (Pak et al., 1992; Kim et al., 1997) wasserlöslich und sehr hitzestabil sind.

Des weiteren sind Disulfidbrücken in der großen sowie der kleinen Form von PTTH beschrieben worden (Ishibashi et al., 1994). Das größere Molekül ist ein Homodimer (Bollenbacher & Granger, 1985; Kawakami et al., 1990; Bollenbacher et al., 1993) die kleinere Form ein heterodimeres Peptid (Nagasawa et al., 1984, 1986; Mizoguchi, 1994). Bombyxin, das kleine *Bombyx*-PTTH, konnte mittels HPLC chromatographisch in drei Peptide getrennt werden. Die komplette Aminosäuresequenz von Bombyxin II wurde bestimmt. Es zeigte sich, daß es aus zwei Peptidketten besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. In der Aminosäuresequenz besteht eine große Homologie mit dem Vertebraten-Insulin (Nagasawa et al., 1986). Andererseits wurde eine 70%ige Homologie des großen PTTH von *Manduca* zum Cellular Retinol Binding Protein (CRBP) und zum Cellular Retinoic Acid Binding Protein (CRABP) beobachtet (Bollenbacher et al., 1993). Daraus ist zu schließen, daß das große und das kleine PTTH nicht miteinander verwandt sind.

Die Molekulargewichte sowie die daraus resultierenden unterschiedlichen Laufeigenschaften bei Gelelektrophorese unter reduzierenden und nicht-

reduzierenden Bedingungen deuteten auf eine Glykosylierung des großen PTTH hin (Kawakami et al., 1990; Kim et al., 1997). PTTH behält seine biologische Aktivität auch dann, wenn es in *E. coli* exprimiert wird, d.h. die Glykosylierung des Moleküls ist nicht unbedingt für seine Ecdysteroid-stimulierende Wirkung notwendig. Dieses wurde sowohl für *Bombyx mori* (Kawakami et al., 1990; Ishizaki & Susuki, 1992) als auch für *Manduca sexta* demonstriert (Gilbert et al., 2000). Kim et al., (1997) berichteten auch von Glykosylierungsstellen am N-Terminus des PTTH von *Drosophila melanogaster*, die ebenfalls nicht für eine biologische Aktivität notwendig waren. Die Tatsache, daß der Verlust von Oligosaccharidketten keinen Einfluß auf die ecdysiotrope Aktivität hatte, war überraschend, da wichtige physikalische Eigenschaften wie Konformationsstabilität, Protease-Resistenz, Ladung und die Fähigkeit, eine bestimmte Menge Wasser zu binden, zum Teil mit einer Glykosylierung des Moleküls verknüpft sind (Cumming, 1991).

Die Experimente mit den OSF aus *Gryllus bimaculatus* (s. Kap. 3.6) deuteten auf ihre Wasserlöslichkeit und einen gewissen Grad an Hitzestabilität hin (Abb. 3-15). Es konnte ferner gezeigt werden, daß die OSF eine bis mehrere Zuckerketten sowie Disulfidbrücken enthalten, die in Gegensatz zum PTTH, für eine biologische Aktivität erforderlich sind (Abb. 3-17 & Abb. 3-18). Die Zuckerkette(n) werden wahrscheinlich für die Bindung an den Rezeptor gebraucht und die Disulfidbrücke(n) für die Stabilisierung der Sekundärstruktur des Moleküls. Das Vorkommen von Disulfidbrücken in OSF ist ein Hinweis auf ihre dimere bzw. polymere Molekülstruktur. Die OSF verloren ihre biologische Aktivität nicht, als sie mit N-Ethylmaleimid behandelt wurden (Abb. 3-16). Das bedeutet, daß freie Sulfhydryl-Gruppen an der ecdysiotropen Aktivität der OSF nicht beteiligt sind, bzw. daß OSF keine Sulfhydryl-Gruppen besitzten.

Weiterhin wurden die ecdysiotropen Faktoren mit Proteasen und Peptidasen behandelt. Die Ergebnisse zeigten, daß die biologische Aktivität weder nach Inkubation mit Carboxypeptidase noch mit Aminopeptidase ausblieb (Abb. 3-18). Dies deutet darauf hin, daß sowohl der N- als auch der C-Terminus gegen den Angriff von Exopeptidasen geschützt sind, was auch durch die versuchte terminale Sequenzanalyse der OSF (s. Kap. 4.10) bestätigt wurde. Die Behandlung mit Proteasen dagegen führte zum Verlust der ecdysiotropen Aktivität.

4.9 Molekulargewichtsbestimmung von OSF

Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode (s. Kap. 2.7.2) zur Extraktion und Bestimmung des Molekulargewichts von biologisch aktiven Faktoren wurden auch von anderen Autoren erfolgreich verwendet (Suzuki, 1986; Masler et al., 1986; Loeb et al., 1987; Gelman et al., 1992; Fescemyer et al., 1995; Kelly et al., 1995, 1996; Wagner et al., 1997). Da die Extraktion von biologisch aktiven Molekülen mittels organischer Lösungsmittel zur Denaturierung von Enzymen und großen Proteinen führt, stellt diese Methode einen Vorteil gegenüber der Verwendung von wässrigen Puffern dar, da hiermit eine Anreicherung der gesuchten Proteine erfolgt. Andererseits besteht die Gefahr, daß in organischen Lösungsmitteln durch eine Umwandlung von Dimeren in Monomere die biologische Aktivität einiger Moleküle verloren geht.

Das Molekulargewicht der OSF konnte zwischen 26,5 und 30 kDa mittels HP-SEC sowie Massenspektrometrie ermittelt werden. Die aktivsten Fraktionen hatten ein Molekulargewicht von ca. 28,4 und 27,4 kDa, und waren außerdem in der Lage die Ecdysteroidsekretion auch in den Tergiten anzuregen (Abb. 3-7 & Abb. 3-8).

Die Größe der Molmasse der OSF entsprach etwa dem des großen PTTH von Lepidopteren.

Im Vergleich zu anderen Insektengruppen konnte gezeigt werden, daß gegen *Bombyx*-PTTH gerichtete Antikörper (Mizoguchi et al., 1990) eine positive immunohistochemische Reaktion in bestimmten Zellen des Nervensystems der Honigbiene *Apis mellifera* und der Taufliege *Drosophila melanogaster* hervorrufen (Zitnan et al., 1993; Simoes et al., 1997). Interessanterweise zeigt die Aminosäuresequenz des *Drosophila*-PTTH (Kim et al., 1997) keinerlei signifikante Homologie zu anderen Peptiden einschließlich der Lepidopteren-PTTH's. Auch die PTTH-Aminosäuresequenzen der Schmetterlinge *Manduca* und *Bombyx* zeigen keine vollständige Homologie zueinander (Muehleisen et al., 1993), dennoch blockiert die Zugabe von *Bombyx* PTTH-Antikörpern (gerichtet gegen den N-Terminus) zu Gehirnextrakten von *Manduca* die ecdysiotrope Aktivität von *Manduca*-PTTH (Rybczynski et al., 1996). Lediglich die biologische Aktivität scheint artspezifisch zu sein, d.h. daß die sogenannten „receptor-binding-regions“ unterschiedlich sind. Auf Grund dieser Beobachtungen sowie einer möglichen Homologie der

Aminosäuresequenz von OSF und PTTH wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung von zwei verschiedenen PTTH-Antikörpern (s. Kap. 2.7.7) an die Kopfextrakte mittels Westernblot überprüft (Abb. 3-20). Es konnte keine Antikörper-Reaktion mit Extrakten von *Gryllus bimaculatus* nachgewiesen werden. Daraus wird geschlossen, daß zumindest keine Homologie zwischen OSF und PTTH am N-Terminus besteht.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein zweiter Wirkstoff mit ecdysiotroper Aktivität gefunden werden. Es mag sein, daß durch die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln eine oder sogar mehrere Faktoren mit biologischer Aktivität in der Methanolfraction präzipitieren. Jedoch konnten andere Autoren, die die gleiche Methode verwendet haben, zwei Formen von PTTH nachweisen. Andererseits ist bekannt, daß für Testis Ecdysiotropin und das Egg Development Neurosecretory Hormone nur eine einzige molekulare Form gefunden wurde (Loeb et al., 1994; Masler et al., 1991b).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß in allen bisher untersuchten Insektenpezies, die sich vornehmlich auf Lepidopteren bezogen, zwei Formen von PTTH gefunden wurden, ein kleines und eine großes Molekül. Biochemische Analysen der PTTH's in den vergangenen Jahren deuten darauf hin, daß es sich um Moleküle unterschiedlicher Größe handelt. Bei den relativ gut untersuchten Schmetterlingen *Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Samia cynthia*, *Polygonia c-aureum*, *Papilio xuthus* and *Mamestra brassicae* besitzen die großen PTTHs ein Molekulargewicht zwischen 22 bis 30 kDa (Ishizaki et al., 1983; Bollenbacher et al., 1984, 1993; Ishizaki & Suzuki, 1984; O'Brien et al., 1986), die kleinen PTTHs zwischen 4 bis 7 kDa (Bollenbacher et al., 1984; Nagasawa et al., 1986; Maruyama et al., 1988; Endo et al., 1990, 1997; Yagi et al., 1995). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch *Lymantria dispar* (13-20 kDa und 3-6 kDa; Masler et al., 1986; Kelly et al., 1992; Fescemyer et al., 1995), der Maiszünsler *Ostrinia nubilalis* (12-29 kDa und 1,5-3,3 kDa; Gelman et al., 1992) und *Calliphora vicina* (16 kDa und 5 kDa; Hua et al., 1997). Die Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* zeigten jedoch abweichende Ergebnisse, nämlich Molekulargewichte von 14-17 kDa für das große PTTH sowie 3-5 kDa für die kleine Form (Pak et al., 1992). Andererseits fanden Kim et al. (1997) nur ein 45 kDa großes Protein mit prothorakotroper Aktivität. Das Auftreten von verschiedenen molekularen Formen des Neuropeptids könnte nach

Watson et al. (1989b) mit der Verteilung von speziellen neurosekretorischen Zellen (NSC) in unterschiedlichen Regionen des Gehirns (Protocerebrum) in Zusammenhang gebracht werden, da deutliche Art-Unterschiede zu beobachten sind. So sind bei *Manduca* (Gibbs & Riddiford, 1977; Agui et al., 1979) und *Galleria* (Muzszynska-Pypel, 1987; Zitnan et al., 1990) nur laterale NSC, bei *Mamestra* nur mediale NSC (Hiruma & Agui, 1977), bei *Aeschna* nur anteriore NSC (Charlet & Schaller, 1976) sowie bei *Megoura* nur mediodorsale NSC (Steel, 1978) an der Herstellung von PTTH beteiligt.

Im übrigen konnten auch außerhalb des Gehirns Faktoren mit PTTH-Aktivität lokalisiert werden. Zu nennen wären z. B. Faktoren aus dem Ventralganglion von *Drosophila melanogaster* (Henrich et al., 1987; Henrich, 1995) und aus den Darm von *Lymantria dispar* (Gelman et al., 1993).

Nach Fescemyer et al. (1995) sind die unterschiedlichen Molekulargewichte der PTTH's auf den unterschiedlichen Glykosylierungsgrad des Moleküls zurückzuführen.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß in *Gryllus*-Imagines weitere Ecdysiotropine vorkommen, die jedoch mit der hier eingesetzten Methodik nicht erfaßt wurden und sich von den Oenocyten-stimulierenden Faktoren unterscheiden.

Die OSF waren nicht in der Lage, die Ecdysteroidsekretion in der Prothorakaldrüse zu fördern (Abb. 3-6). Ferner zeigten die OSF deutlich unterschiedliche biochemische Eigenschaften im Vergleich zu PTTH. Inzwischen sind unabhängig voneinander eine Reihe von Adult-Ecdysiotropinen beschrieben worden (s. Kap. 1.2.1). Der Zusammenhang dieser Hormone mit den PTTH der Larven ist noch nicht bekannt.

4.10 Aminosäuresequenzanalyse

Es wurde versucht, die Protein-Spots mit einem relativen Molekulargewicht von 26,5 bis 30 kDa näher zu identifizieren (Abb. 3-21). Das Sequenzieren erwies sich bei fünf von insgesamt sechs Banden als besonders schwierig. Einerseits waren die N-Termini der fünf Proben blockiert, weshalb eine Sequenzierung nach dem Edman-Abbau nicht ohne weiteres möglich war. Andererseits konnten nach tryptischer Spaltung auf der Membran keine Peptide freigesetzt werden. Das könnte am

hydrophoben Verhalten der Peptide liegen, die sich nicht von der Membran lösen. Deshalb wurde in einem dritten Ansatz versucht, tryptische Fragmente direkt im Gel herzustellen. Mit dieser Methode ist es gelungen, interne Aminosäuresequenzen der Peptidfragmente zu bestimmen.

Bei der Datenbanksuche mit den Sequenzen aus diesem Bereich konnte nur eine einzige Bande eindeutig als das 14-3-3-like Protein identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein Mitglied aus einer Proteinfamilie, die in viele Prozesse, unter anderem in die Regulation des Zellzyklus und der neuronalen Entwicklung eingreift (Fu et al., 2000). Für die fünf anderen Proteine konnten keine Sequenzhomologien zu bereits beschriebenen Proteinen festgestellt werden.

Insgesamt ist die Länge der ermittelten Sequenzen zu gering, um weiterführende Arbeiten mit synthetisierten Oligonukleotiden sinnvoll erscheinen zu lassen. Der zweite Weg, um zu Sequenzinformationen zu gelangen, setzt das Vorhandensein geeigneter Antikörper voraus, um damit eine Suche in einer cDNA-Bank zu ermöglichen.

4.11 Wirkmechanismus von OSF

4.11.1 Beteiligung von cAMP als Second Messenger bei der Ecdysteroidsynthese

Peptidhormone, Prostaglandine, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Neurotransmitter sowie hydrophile Pharmaka können als extrazelluläre Signale auf Zellen durch Interaktion mit Membranrezeptoren wirken. Die Bindung an Rezeptoren führt zur Bildung von intrazellulären Signalen in Form von Second Messengern. Diese niedermolekularen Substanzen, die von Enzymen freigesetzt werden und zu einer Signalverstärkung innerhalb der Zelle führen, aktivieren dann eine Reihe von Kaskaden gekoppelter Reaktionen im Zellinneren, an deren Ende meistens eine Kinase-katalysierte Phosphorylierung spezifischer Proteine steht. Die Phosphorylierung leitet schließlich eine Änderung der Zellfunktion ein.

In der Literatur werden als hydrophile cytosolische Second Messenger cAMP, cGMP, Ca^{2+} , Inositphosphate, Stickoxid-Radikale und als hydrophob membranassoziiert Diacylglycerol, Phosphatidylinosit-Phosphate beschrieben

(Rasmuss, 1983; Williamson & Hansen, 1987; Berridge & Irvine, 1989). Mit Ausnahme von Stickoxid, das bei Insekten als Second Messenger nicht bekannt ist, wurden alle diese Moleküle als Botenstoffe sowohl bei Wirbeltieren als auch bei Wirbellosen identifiziert.

Als der wohl weitverbreitetste Second Messenger gilt das 3'-5'-cyclische Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP). Auch bei der Regulation der Ecdysteroidbiosynthese in Insekten ist die Beteiligung von cAMP unumstritten. Ebenso spielt in Vertebraten das cAMP bei der Signalvermittlung zur Synthese von Steroidhormonen eine bedeutende Rolle (Sala et al., 1979; Schimmer, 1980). Zum Beispiel wird die Wirkung von adrenocortikotropem Hormon (ACTH) auf die Nebennierenrinde und von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) auf die Gonaden, die zur Ausschüttung von Sexualhormonen, Aldosteron, Cortisol und Östrogenen führt, durch cAMP vermittelt (Garren et al., 1965). Verblüffend ähnlich sind die zellulären Regulationsmechanismen der Steroidbiosynthese bei Insekten und Vertebraten (Stocco & Clark, 1996).

In allen bisher untersuchten ecdysteroidogenen Drüsen von Insekten wurde die Beteiligung von cAMP als Second Messenger entweder allein oder neben anderen Signaltransduktionswegen beschrieben (Übersicht in Gilbert et al., 1996).

Die Beteiligung von cAMP als Mediator bei der Wirkung von Hormonen in Insekten ist nicht nur auf die Ecdysteroidproduktion beschränkt. Beispiele von Hormonen, die ihren Einfluß auf die Zielzelle mittels cAMP ausüben, sind das adipokinetische Hormon in *Locusta migratoria* (Ochard & Lange, 1984), der antidiuretische Faktor (Herault & Proux, 1987) und diuretische Faktoren (Rafaeli et al., 1984). Ebenfalls beteiligt ist cAMP an der Regulation der Juvenilhormon-Synthese (Meller et al., 1985; Tobe, 1990). Aber auch außerhalb des Hormongeschehens greift cAMP als Regulator in Stoffwechselprozesse ein. Die Wirkung des Oktopamins (Catecholamin-Transmitter) kann durch cAMP oder seine Analogen verdoppelt werden. Dies wurde an den Licht-Organen der Feuerfliege *Photinus pyralis* (Kadir & Knowles, 1991) und für den Lipidmetabolismus von Tsetsefliegen *Glossina morsitans* gezeigt (Pimley, 1985).

Als weiteres wichtiges Signalmolekül bei Insekten gilt das cGMP. Bemerkenswert ist, daß cGMP 10- bis 100-fach effektiver als cAMP ist (Truman & Levine, 1982; Ewer et al., 1994). Andererseits wird die Stimulation von Prothorakaldrüsen durch

PTTH und die daraus resultierende Ecdysteroidsynthese bei dem gleichen Versuchstier nur durch cAMP übermittelt. Zyklisches GMP scheint hingegen in diesem Zusammenhang keine Rolle als Second Messenger zu spielen, denn PTTH führt weder zu einer intrazellulären cGMP-Konzentrationserhöhung, noch fördern cGMP oder dessen Analoga die Ecdysteroidsynthese (Smith, 1993).

Als weiteres noch bekanntes Second Messenger-System in Insekten dienen Inositol-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Ihre Beteiligung wurde nachgewiesen bei der Wirkung von Hydroxytryptamin auf die Einleitung der Speichelbildung in *Calliphora*-Speicheldrüsen (Berridge, 1981), von cardioakzeleratorischen Peptiden auf den Herzschlag von *Manduca sexta* (Tublitz & Trombley, 1987), von Proctolin bei der Auslösung muskulärer Kontraktionen in *Locusta migratoria*-Ovarien (Lange, 1988), von Juvenilhormon bei der Ovar-Eröffnung von *Rhodnius prolixus* (Sevala & Davey, 1989) und der Stimulierung der Proteinsynthese in akzessorischen Drüsen weiblicher *Drosophila* (Yamamoto et al., 1988). Ferner konnte man nach Behandlung von *Bombyx*-Prothorakaldrüsen mit einem noch nicht näher identifizierten Cerebral-Faktor die IP₃-Spiegel vervielfachen (Dedos et al., 1998). In *Lymantria dispar* wird DAG neben cAMP als Second Messenger bei der Wirkung von Testesecdysiotropin postuliert (Loeb et al., 1993).

Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (s. Kap. 3.8), ist davon auszugehen, daß die extrazellulären Signalstoffe der Gehirn-Oenocyten-Achse über die Bildung von cAMP wirken. Um diese Befunde etwas deutlicher hervorzuheben, wird im folgenden auf die Untersuchungsergebnisse eingegangen, die in dieser Hinsicht von Bedeutung sind.

Von allen Ecdysiotropinen wurde der zelluläre Wirkungsmechanismus des großen PTTH am besten untersucht (Henrich et al., 1999). Aus Untersuchungen an Prothorakaldrüsen von *Manduca sexta* ist bekannt, daß in Gegenwart von extrazellulärem Ca²⁺ und PTTH in der Zellmembran cAMP erzeugt wird. Wenn anstatt des Neuropeptids PTTH Pharmaka eingesetzt werden, die die Konzentration von cAMP oder der Calcium-Ionen erhöhen, dann steigt die Ecdysteroidsekretion dosisabhängig (Smith et al., 1984, 1985).

Das postulierte Modell der Stimulierung der Ecdysteroidsynthese durch PTTH geht von einer Bindung des Hormons an Membranrezeptoren aus. Dadurch wird die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht, welche das Calcium/Calmodulin-

abhängige Enzym Adenylat-Cyclase aktiviert, um aus ATP cAMP herzustellen (Meller et al., 1988; Smith et al., 1993; Kulesza et al., 1994; Song & Gilbert, 1995). Ein erhöhter cAMP-Spiegel in der steroidogenen Zelle stimuliert seinerseits über cAMP-abhängige Proteinkinasen (A-Kinasen) die Erhöhung der Synthese von regulatorischen Proteinen, die die Geschwindigkeit der Ecdysteroidbiosynthese bestimmen (Rountree et al., 1992; Rybczynski & Gilbert, 1995). Einige der endogenen A-Kinase-Substrate wurden identifiziert, unter anderem das ribosomale Regulatorprotein S6, das nach PTTH-Bindung phosphoryliert wird (Song & Gilbert, 1997). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, daß das IBMX, ein Phosphodiesterase-Inhibitor, den cAMP-Spiegel in solchen *Manduca*-Prothorakaldrüsen erhöhen kann, die mit kleinem PTTH, aber nicht mit großem PTTH behandelt wurden (Watson et al., 1993). Dies deutet darauf hin, daß die Wirkmechanismen des kleinen und des großen PTTH nicht vollkommen identisch sind.

Auch für andere, in zellulärer Hinsicht weniger gut untersuchte Ecdysiotropine wurde cAMP als möglicher Second Messenger bei der Regulation der Ecdysteroidproduktion in Betracht gezogen. Unter anderem bei den Egg Developing Neurohormonen in *Aedes aegypti*-Ovarien (Shapiro, 1983) und bei Testis Ecdysiotropin in *Lymantria dispar* (Loeb et al., 1993).

Zusätzlich zum Wirkmechanismus von Ecdysiotropinen wurde auch ein Wirkungsmodell für Ecdysiostatine, also zur Inhibierung der Ecdysteroidsynthese durch das Moulting Inhibiting Hormone (MIH) in Y-Organen (vergleichbar mit der Prothorakaldrüse) von *Cancer antennarius* postuliert (Mattson & Spaziani, 1987). Nach dieser Hypothese führt ein Anstieg der cAMP-Konzentration, der durch einen MIH-Rezeptor-Komplex zustande kommt, zur Aktivierung einer Proteinkinase, die die Hemmung der Ecdysteroidsynthese durch Carrier-Proteine und/oder P-450-Enzyme vermittelt (Lachaise et al., 1993; Bylemans et al., 1994). Das Vorkommen von Ecdysiostatinen, die zunächst von verschiedenen Krebsarten bekannt waren, gilt inzwischen auch bei Insekten als gesichert (s. Kap. 1.2.1).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, daß der Wirkmechanismus von ecdysiotropen Faktoren als extrazelluläre Signale in *Gryllus*-Oenocyten im Vergleich zu Schmettlings ähnlich ist. Die Stimulierung der Ecdysteroidsekretion in Oenocyten durch OSF konnte durch Signalstoff-Pharmaka, die alle den endogenen cAMP-Spiegel erhöhen, *in vitro* nachgeahmt werden (Abb. 3-22). Es konnte gezeigt

werden, daß IBMX die Wirkung von Forskolin unterstützt, und zwar dosisabhängig. Forskolin allein war nicht in der Lage, die Sekretion zu stimulieren, sondern nur in Kombination mit IBMX. Der Grund dafür liegt nach Ansicht von Smith und Pasquarello (1989) daran, daß IBMX den raschen Abbau von neu gebildetem cAMP verhindert. Andererseits erhöhte OSF die Ecdysteroidsekretion ohne Zusatz von IBMX, was darauf hindeutet, daß die Stimulation der Hormonsekretion über eine Aktivierung der Phosphodiesterase verläuft.

Forskolin ist ein natürlich vorkommendes Diterpen aus der Pflanze *Coleus forskohlii*. Es bindet an den aktivierten Komplex der katalytischen Untereinheit der Adenylatzyklase und an das Gs-Protein. Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase und erhöht dadurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration (Laurenza et al., 1989). IBMX wird als Inhibitor der cAMP-Phosphodiesterase angesehen. Eine Hemmung dieses Enzyms führt ebenfalls zu einem Anstieg des cAMP-Gehalts im Gewebe (Kalderon et al., 1980). Als cAMP-Analoga, die dem Botenstoff eines nachgeschalteten Schrittes gleichen, konnten sowohl dbcAMP als auch Br-cAMP die Ecdysteroidsekretion in Oenocyten positiv beeinflussen (Abb. 3-22). Zyklische Nukleotide sind in der Lage, ohne besondere Transportvorrichtung direkt durch die Zellmembran in die Zelle zu gelangen und brauchen für ihre stimulierende Wirkung möglicherweise kein Calcium aus dem extrazellulären Raum.

Außerdem konnte der intrazelluläre cAMP-Gehalt von Oenocyten durch eine Inkubation mit OSF erhöht werden (Abb.3-23). Typisch war hierbei die rapide Steigerung der cAMP-Synthese innerhalb weniger Minuten nach Behandlung mit Kopfextrakten (Dedos & Fugo, 1999). Damit diese Reaktionskette nicht endlos weitergeht, wird cAMP relativ schnell wieder abgebaut (Smith et al., 1993, 1996).

Die hier vorgetragenen Befunde weisen darauf hin, daß cAMP als Second Messenger an der Steuerung der Ecdysteroidsynthese beteiligt ist, ohne jedoch die Mitwirkung anderer wichtiger Signalstoffe wie cGMP, IP₃ und DAG auszuschließen.

4.11.2 Die Rolle von Calcium auf die Ecdysteroidproduktion in Oenocyten

Calcium wird bei vielen Prozessen als Second Messenger genutzt, beispielsweise bei der Muskelkontraktion, der Erregungsübertragung an Synapsen, der Zellteilung und -differenzierung sowie der Ausschüttung von Hormonen. Calcium ist für diese

Aufgaben besonders geeignet, da seine Konzentration in der Zelle niedrig (10^{-7} M) gehalten werden muß, um die Bildung von für die Zelle tödlichen Dosen von Calciumphosphat und -oxalat zu verhindern. Deshalb kommt der kurzzeitigen, lokalen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration ein Signalcharakter zu. Diese Funktion des Calciums ist universell, das heißt, sie ist in Prokaryonten bis hin zu vielzelligen Eukaryonten nachweisbar (Clapham, 1995).

Die lokale Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kann auf verschiedene Weise erfolgen:

1. durch rezeptorvermittelte Freisetzung von Inosit-1,4,5,-Trisphosphat aus Phosphatidylinositol-4,5,-Bisphosphat, die zur Leerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher führt (Berridge, 1993a; Putney & Bird, 1994);
2. wahrscheinlich durch die zyklische ADP-Ribose induzierte Öffnung der Ryanodinrezeptor-Calciumkanäle, die ebenfalls zur Leerung der intrazellulären Speicher führt; allerdings wurde dieser Mechanismus bei der Steroidogenese nicht gefunden (Berridge, 1993b; Sitsapesan et al., 1995);
3. durch kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom durch die Plasmamembran (Berridge, 1995).

Die Wirkung vieler Hormone, vor allem in steroidproduzierendem Gewebe wird entscheidend durch den Calcium-Spiegel beeinflusst (Moger, 1983; Blackmore & Exton, 1985).

Die Stimulation der Ecdysteroidsynthese in der Prothorakaldrüse von Insekten ist ebenfalls Calcium-abhängig (Smith et al., 1996). Diese Autoren konnten eindeutig an der Prothorakaldrüse von *Manduca sexta* zeigen, daß PTTH seine Wirkung nur in Anwesenheit von Calcium voll entfalten kann. In Abwesenheit von extrazellulärem Calcium unterbleibt eine Erhöhung des cAMP-Spiegels und damit die Stimulation der Ecdysteroidsynthese. Zyklische AMP-Analoga wie dbcAMP und Forskolin steigern die Ecdysteroidsynthese auch ohne das Vorhandensein von extrazellulärem Calcium. Dies läßt die Vermutung zu, daß einerseits, eine PTTH-Bindung zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt und somit eine Akkumulation von cAMP zur Folge hat (Smith & Gilbert, 1989) und daß andererseits die Stimulation der Ecdysteroidsekretion nicht unbedingt mit einem Einstrom von

Ca^{2+} -Ionen ins Cytoplasma in Zusammenhang steht, d.h. die Freisetzung von Calcium aus einem intrazellulären Speicher erfolgen kann (Berridge, 1987).

Untersuchungen an Prothorakaldrüsen der Schmetterlinge *Bombyx mori* und *Galleria mellonella* zeigten ähnliche Resultate bezüglich der Abhängigkeit der Ecdysteroidsynthese von extrazellulären Calcium-Ionen. Dies wurde durch Beobachtungen bestätigt, in dem die Wirkung von PTTH auf die Prothorakaldrüse entweder in calciumfreiem Medium oder in calciumhaltigem Medium in Gegenwart der Ca^{2+} -Kanalblocker Lanthanum oder Verapamil untersucht wurde. Dagegen konnte durch Inkubation mit dem Calcium-Ionophor A23187 die Ecdysteroidsekretion gefördert werden (Birkenbeil, 1996; Gu et al., 1998). Außerdem ist darauf hinzuweisen, daß der fördernde Einfluß von A23187 auch bei anderen Hormonsystemen bekannt ist, z.B. bei der Stimulation der Cortison- (Lymangrover & Keku, 1984) oder der Aldosteronproduktion (Foster et al., 1981) in der Nebennierenrinde sowie der ovariellen Progesteronsynthese (Veldhuis & Klase, 1982) bei Säugern.

Wie bereits erwähnt, werden nach der Bindung des Neuropeptids PTTH an die Prothorakaldrüse Ca^{2+} -Kanäle von Typ L (long lasting) geöffnet (Girgenrath & Smith, 1996) wodurch es zu einem Ca^{2+} -Einstrom ins Cytoplasma kommt. Der resultierende Calcium/Calmodulin-Komplex regt die Adenylatzyklase an (Smith & Sedlmeier, 1990). Die Arbeiten von Watson et al. (1993) und Hayes et al. (1995) an *Manduca* Prothorakaldrüsen zeigten, daß eine Calcium-Konzentration größer als 100 μM für eine optimale Ecdysteroidsynthese bzw. -sekretion benötigt wird. Interessanterweise geht die Synthese aber nicht auf Null zurück, wenn keine Calcium-Ionen in der Inkubationslösung mehr vorhanden sind, d. h. die basale Ecdysteroidproduktion scheint von extrazellulärem Ca^{2+} unabhängig zu sein, kann aber dadurch um ein Vielfaches erhöht werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die Gewebe selbst Vorräte an Ca^{2+} haben, die mobilisiert werden können, wenn die plasmatische Ca^{2+} -Konzentration zu niedrig ist.

Die Beteiligung von Calcium an der Regulation der Ecdysteroidsynthese in Crustaceen, wurde von Mattson und Spaziani (1986a & 1986b) gezeigt. Nach ihrem Modell für *Cancer antennarius* wirkt Calcium stimulierend auf die Ecdysteroidsynthese, indem es durch eine Aktivierung der Phosphodiesterase den cAMP-Spiegel senkt und somit die Wirkung von MIH außer Kraft setzt. Im

Gegensatz zu Insekten scheint bei Krebsen der Einstrom von Calcium ins Cytoplasma aus den intrazellulären Speichern und nicht über die Plasmamembran zu erfolgen.

Ionomycin bindet an die Ca^{2+} -Ionen und transportiert diese aktiv durch die biologische Membran. Isoliert wurde dieses Antibiotikum aus *Streptomyces conglobatus* (Liu & Hermann, 1978).

Um festzustellen, ob Calcium nun von der extrazellulären Seite her auf die Ecdysteroidsekretion von Oenocyten Einfluß nimmt oder nicht, wurde durch das Ionophor ein Ca^{2+} -Influx ins Cytoplasma induziert (s. Kap. 3.8.3). Während für eine optimale Synthese und Stimulation der Sekretion von Ecdysteroiden eine bestimmte Menge an Calcium-Ionen im extrazellulären Bereich notwendig ist, scheinen zu hohe intrazelluläre Calcium-Konzentrationen die Ecdysteroidsekretion zu hemmen. Dies wird aus den Ergebnissen gefolgert, wonach ein durch Ionomycin eingeleiteter hoher intrazellulärer Gehalt an Calcium die Sekretion inhibiert (Abb. 3-24). Diese konzentrationsabhängige Stimulation der Ecdysteroidsekretion durch Calcium-Ionen wurde sowohl in der Prothorakaldrüse von *Manduca sexta* (Hayes et al., 1995; Birkenbeil, 1998) als auch in der von *Bombyx mori* (Gu et al., 1998) beobachtet.

Während Konzentrationen von 10^{-8} und 10^{-7} M Ionomycin im Inkubationsmedium für eine optimale Ecdysteroidsekretion von Oenocyten sorgten, wurde die Sekretion bei einer Konzentration von 10^{-6} M stark verringert (Abb. 3-24). Im Gegensatz dazu konnte für die Prothorakaldrüsen von *Manduca* und *Bombyx* gezeigt werden, daß die Sekretion erst ab einer Konzentration von 10^{-6} M Ionomycin einsetzt. Dies läßt vermuten, daß die Oenocyten wesentlich sensibler auf intrazelluläre Veränderungen der Calcium-Konzentration reagieren als Prothorakaldrüsen.

Die gewonnenen Ergebnisse der Versuche zu den Second Messenger-Systemen (s. Kap. 3.8) lassen sich zu folgendem Modell zusammenfassen:

Als extrazellulärer Signalstoff bindet der Oenocyten-stimulierende Faktor an Membranrezeptoren von Oenocyten, worauf eine Erhöhung des Calcium-Spiegels in der Zelle erfolgt. Dies geschieht entweder, 1. Durch einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum oder 2. weniger wahrscheinlicher durch eine IP₃-induzierte Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Da in der vorliegenden Arbeit nicht

untersucht wurde, wie sich Oenocyten in calciumfreiem Medium in Gegenwart von OSF verhalten, kann der letztere Weg nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Für den ersten Weg gilt:

- I.) Die Bindung von OSF an membranständige Rezeptoren stimuliert über G-Proteine eine Adenylat-Cyclase, welche die Konzentration von endogenem cAMP erhöht. Zugleich hemmt OSF die Aktivität der cAMP-Phosphodiesterase. Ein erhöhter cAMP-Spiegel aktiviert dann cAMP-abhängige Proteinkinasen,

für den 2. würde,

- II.) das bei der IP_3 -Entstehung ebenfalls gebildete DAG zusammen mit Calcium eine Proteinkinase, aktivieren.

Als weiterer gemeinsamer Schritt erfolgt eine Regulation der Ecdysteroidproduktion über die Beeinflussung der RNA- und Protein-Synthese (Gilbert et al., 1997).

Am Ende dieser komplexen Kette von Vorgängen erfolgt die Bildung von Ecdysteroiden oder deren Vorstufen aus Cholesterin.

Viele Aspekte der Regulation der Ecdysteroidsynthese sind noch nicht zufriedenstellend geklärt, so zum Beispiel die Rolle von Calcium in der Signalübertragungskette. Die Frage, warum Calcium eine unterschiedliche Funktion hinsichtlich der Konzentration bei der Ecdysteroidsynthese ausübt, kann zur Zeit nicht beantwortet werden. Zur Klärung sind weitere Experimente erforderlich, wobei besonders auf die Beziehung zwischen der Calciumkonzentration und der Synthese von Ecdysteroiden zu achten sein wird.

Die hier vorgetragenen Untersuchungen zum Wirkmechanismen von OSF haben sich größtenteils auf cAMP und teilweise auf die Bedeutung von Calcium für die Ecdysteroidsekretion beschränkt. Grundsätzlich ist es ebenso notwendig zu prüfen, ob weitere Botenstoffe an der Stimulation der Ecdysteroidsekretion in Oenocyten beteiligt sind.

5. Zusammenfassung

Das Vorkommen von Häutungshormonen in adulten Insekten, insbesondere solcher, die eine lange Imaginalphase durchlaufen, wirft die Frage nach der Regulation der Ecdysteroidsynthese außerhalb der Prothorakaldrüse auf. Unter diesem Gesichtspunkt kann *Gryllus bimaculatus* mit einem ausgesprochen langen Adultstadium und rapiden zeitlichen Veränderungen des Ecdysontiters als ein geeignetes Versuchsobjekt angesehen werden.

Der vorliegenden Dissertation liegt die Arbeitshypothese zugrunde, daß die Ecdysteroid-Synthese bzw. -Sekretion von Adultgeweben in männlichen Imagines der Mittelmeerfeldgrille durch Neuropeptide hormonell reguliert wird. Als Quelle für die Ecdysteroidsynthese wurde auf Grund immunohistochemischer Befunde sowie der Ergebnisse von Sekretionsprofil-Analysen unter anderem die Oenocyten in Betracht gezogen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein *in vitro* Bioassay entwickelt, der es ermöglichte, die Wirkung von extrahierten Substanzen auf die Hormonsynthese mittels RIA/HPLC zu bestimmen. Aus Köpfen adulter *G. bimaculatus* ließen sich durch HP-SEC Faktoren isolieren, die die Ecdysteroidsekretion in Oenocyten und Tergiten stimulierten, die aber keinen Einfluß auf die Hormonsekretion von Fettgewebe sowie der Prothorakaldrüsen hatten. Die Wirkung des aufgereinigten Extraktes in Oenocyten war zeit- und dosisabhängig. Die ecdysiotropen Faktoren besaßen ein Molekulargewicht zwischen 26,5 und 30 kDa. Die Größe der Molmasse der ecdysiotropen Faktoren entsprach somit bei adulten männlichen Grillen etwa dem des Neurohormons PTTH bei Lepidopteren. Dennoch zeigten Antikörper, die gegen PTTH von *Bombyx mori* gerichtet waren im Western-Blot keine Bindung an *Gryllus bimaculatus* Kopfextrakte. Die Sekretionsprodukte von Oenocyten, die mit Ecdysiotropinen behandelt waren, wurden durch RP- und NP-HPLC identifiziert. Es konnten zwei zusätzliche Peaks neben einem deutlichen Anstieg von 20-Hydroxyecdysen nachgewiesen werden. Auf Grund identischer Retentionszeiten mit Referenzsubstanzen handelt es sich bei einem Peak vermutlich um Makisteron A.

Obwohl die Applikation von Azadirachtin in *G. bimaculatus* zu einer Senkung des Hämolymphe-Ecdysteroidgehalts führte, konnte keine Anreicherung von Ecdysiotropinen erzielt werden.

Die die Ecdysteroidsekretion-beeinflussenden Faktoren waren resistent gegen Kochen und Alkylierung aber nicht stabil gegen Reduzierung durch DTT und Behandlung mit Neuramidase. Damit konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein von Disulfidbrücken und Oligosaccharidketten für die biologische Aktivität notwendig ist.

Die Aminosäuresequenz-Analyse und der enzymatische Verdau der stimulierenden Faktoren durch Exopeptidasen wiesen auf geschützte N- und C-Termini hin. Ferner wurden einige interne Peptidfragmente von fünf Proteinbanden sequenziert, die keine Homologie zu bereits bekannten regulatorischen Neuropeptiden zeigten. Als einziges bekanntes Protein aus diesem Bereich konnte das „14-3-3-like Protein“ mit Hilfe MALDI-MS identifiziert werden.

Die Stimulierung der Ecdysteroidsekretion in Oenocyten von *G. bimaculatus* durch Oenocyten-stimulierende Faktoren (OSF) aus Kopfextrakten konnte mittels Signalstoff-Effektoren *in vitro* nachgeahmt werden. Außerdem wurde mit Hilfe eines RRA nachgewiesen, daß der intrazelluläre cAMP-Spiegel von Oenocyten durch OSF erhöht wird. Daraus kann geschlossen werden, daß cAMP als „Second Messenger“ an der Wirkung der OSF beteiligt ist. Calcium-Ionen schienen für die Ecdysteroidsekretion notwendig zu sein. Allerdings führte eine artifizielle Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch das Ionophor Ionomycin (über 10^{-6} Mol hinaus) zu einer Hemmung der Sekretion. Schließlich wird ein Modell zur Erklärung des Wirkmechanismus von OSF in *Gryllus bimaculatus* postuliert und diskutiert.

6. Literatur

- Adams, T. S., & Li, O. J. (1998). Ecdysteroidostatin from the house fly, *Musca domestica*. Arch. Insect Biochem. Physiol. **38**, 166-176.
- Adler, J. H., & Grebenok, R. J. (1995). Biosynthesis and distribution of insect-molting hormones in plants. Lipids **30**, 257-262.
- Agui, N. (1974). Joint action of prothoracic glands and oenocytes on the cultivated wing discs of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. in vitro. Appl. Ent. Zool. **9**, 256-260.
- Agui, N., & Himura, K. (1978). In vitro activation of neurosecretory brain cells in *Mamestra brassicae* by β -ecdysone. Gen. Comp. Endocrinol. **33**, 467-472.
- Agui, N., Granger, N. A., Gilbert, L. I., & Bollenbacher, W. E. (1979). Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: *In vitro* assay of a single neurosecretory cell. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**, 5694-5698.
- Avruch, L. I., & Tobe, S. S. (1978). Juvenile hormone biosynthesis by the corpora allata of the male desert locust, *Schistocerca gregaria*, during sexual maturation. Can. J. Zool. **56**, 2097-2102.
- Barnby, M. A., & Klocke, J. A. (1990). Effects of azadirachtin on levels of ecdysteroids and prothoracicotropic hormone-like activity in *Heliothis virescens* (Fabr.) larvae. J. Insect Physiol. **36**, 125-131.
- Beaulaton, J. (1990). Anatomy, histology, ultrastructure, and functions of the prothoracic (or ecdysial) glands in insects. **In**: Morphogenetic Hormones of Arthropodes, Vol. **1**, 2. Embryonic and postembryonic sources, ed. by Gupta, A. P., Rutgers University Press, New Brunswick and London. pp. 343-435.
- Becker, E., & Plagge, E. (1939). Über das Pupariumbildung auslösende Hormon der Fliegen. Biol. Zbl. **59**, 326-341.
- Behrens, W., & Hoffmann, K. H. (1982). Function of ecdysteroids in adult insects. Acta endocrinol. **96**, 31-32.
- Bergamasco, R., & Horn, D. H. S. (1980). The biological activities of ecdysteroids and ecdysteroid analogues. Develop. Endocrinol. **7**, 299-324.
- Berridge, M. J. (1981). Phosphatidyl inositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. Mol. Cell. Endocrinol. **34**, 115-121.
- Berridge, M. J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. Annu. Rev. Biochem. **56**, 159-193.
- Berridge, M. J. (1993a). Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature **361**, 315-325.

- Berridge, M. J. (1993b). A tale of two messengers. *Nature* **365**, 388-389.
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**, 197-205.
- Bidmon, H. J. (1986). Ultrastrukturelle Veränderungen der Prothoraxdrüsen unbehandelter und mit Azadirachtin behandelter *Manduca sexta*-Larven (Lepidoptera: Sphingidae). *Entomol. Gener.* **12**, 1-17.
- Birkenbeil, H. (1996). Involvement of calcium in prothoracicotropic stimulation of ecdysone synthesis in *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **33**, 39-52.
- Birkenbeil, H. (1998). Intracellular calcium in prothoracic glands of *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **44**, 279-286.
- Blackmore, P. F., & Exton, J. H. (1985). Mechanismus involved in the action of calcium-dependent hormones. *Methods Enzymol.* **109**, 550-558.
- Bollenbacher, W. E., & Granger, N. A. (1985). Endocrinology of the prothoracicotropic hormone. **In:** Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Vol. 7, ed. by Kerkut, G. A., & Gilbert, L. I., Pergamon Press, NY. pp. 109-151.
- Bollenbacher, W. E., Gray, R. S., Muehleisen, D. P., Regan, S. A., & Westbrook, A. L. (1993). The biology of the prothoracicotropic hormone peptidergic neurons in an insect. *Amr. Zool.* **33**, 316-323.
- Bollenbacher, W. E., Katahira, E. J., O'Brien, M. A., Gilbert, L. I., Thomas, M. K., Agui, N., & Baumhover, A. H. (1984). Insect prothoracicotropic hormone: evidence for two molecular forms. *Science* **224**, 1243-1245.
- Bollenbacher, W. E., O'Brien, M. A., Katahira, E. J., & Gilbert, L. I. (1983). A kinetic analysis of the action of the insect prothoracicotropic hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* **32**, 27-46.
- Bonner-Weir, S. (1970). Control of moulting in an insect. *Nature* **228**, 580-581.
- Borst, D. W., & O'Connor, J. D. (1974). Trace analysis of ecdysones by gas-liquid chromatography, radioimmunoassay and bioassay. *Steroids* **24**, 637-656.
- Bownes, M., Dübendorfer, A., & Smith, T. (1984). Ecdysteroids in adult males and females of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **30**, 823-830.
- Brehelin, M., & Aubry, R. (1982). Correlative and experimental studies on blood ecdysteroids levels and integumental events in last instar larvae of *Locusta migratoria* (Insecta): Results and critical evaluations. *Bull. Soc. Zool. France* **107**, 21-32.
- Bressel, H. U. (1989). Das Vorkommen von Ecdysteroiden bei männlichen Imagines der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* De Geer. Dissertation Mainz.

- Bressel, H. U., Shahab, N. & Romer, F. (1990). Ecdysteroids secretion by several tissues in adult males of *Gryllus bimaculatus*. *Invertebr. Reprod.* **18**, 106-107.
- Brown, F. A., & Cunningham, O. (1939). Influence of the sinus gland of crustaceans on normal viability and ecdysis. *Biol. Bull.* **77**, 104-114.
- Budd, E. (1992). Kontrolle der Ecdyson-Produktion in cyclorrhaphen Dipteren-Larven: Untersuchung eines komplexen humoral-neuronalen Regulations-systems. Dissertation Marburg.
- Budd, E., Käuser, G., & Koolman, J. (1993). On the control of ecdysone biosynthesis by the central nervous system of blowfly larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **23**, 181-197.
- Bulenda, D., Stecher, A., Freunek, M., & Hoffmann, K. H. (1986). Ecdysone metabolism in adult crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Insect Biochem.* **16**, 83-90.
- Burnette, W. H. (1981). Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Butenandt, A., & Karlson, P. (1954), Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Z. Naturforsch.* **9b**, 389-391.
- Butterworth, J. H., & Morgan, F. D. (1968). Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *J. chem. Soc. Chem. Commun.* **1**, 23-24.
- Butterworth, J. H., & Morgan, F. D. (1971). Investigation of Locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*. *J. Insect Physiol.* **17**, 969-977.
- Bylemans, D., Borovsky, D., Hunt, D. F., Shabanowitz, J., Grauwels, L., & De-Loof, A. (1994). Sequencing and characterization of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) from the ovaries of the grey fleshfly, *Neobellieria* (Sarcophaga) *bullata*. *Regul. Pept.* **50**, 61-72.
- Carlisle, D. B., & Ellis, P. E. (1968). Hormonal inhibition of the prothoracic gland by the brain in locusts. *Nature* **220**, 706-707.
- Chadwick, L. E. (1955). Molting of roaches without prothoracic glands. *Science* **121**, 435.
- Charlet, M., & Schaller, F. (1976). Blocage de l' exuviation chez la larve d' *Aeschna cyanea* (insecta Odonate) après électrocoagulation d'un centre neurosécréteur du protocérèbron antérieur. *C. R. Acad. Sci.* **283**, 1539-1541.
- Charlet, M., Goltzene, F., & Hoffmann, J. A. (1979). Experimental evidence for a neuroendocrine control of ecdysone biosynthesis in adult females of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* **25**, 463-466.

- Cherbas, L., Yonge, C. D., Cherbas, P., & Williams, C. M. (1980). The morphological response of *Kc-H* cells to ecdysteroids: hormonal specificity. *Wilhelm Roux' Arch.* **189**, 1-15.
- Chino, H., Sakurai, S., Ohtaki, T., Ikekawa, M., Miyazaki, H., Ishabashi, M., & Abuki, H. (1974). Biosynthesis of a-ecdysone by prothoracic glands *in vitro*. *Science* **183**, 529-530.
- Chiu, S. F., Zhang, X., Liu, S. K., & Huang, D. P. (1984). Growth-disruptive effects of azadirachtin on the Larvae of the asiatic cornborer. *Acta Ent. Sinica* **27**, 439-447.
- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268.
- Courgeon, A. (1972). Effects of a- and β -ecdysone on in vitro diploid cell multiplication in *Drosophila melanogaster*. *Nat. New Biol.* **238**, 250-251.
- Cumming, D. A. (1991). Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology* **1**, 115-130.
- Dai, J. D., & Gilbert, L. I. (1997). Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 69-78.
- de Wilde, J., Hsiao, T., & Hsiao, C. (1981). The regulation of metamorphic moults in the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say. **In**: Progress in Ecdysone Research, ed. by Hoffmann, J. A. Elsevier/North-Holland Amsterdam. pp. 83-98.
- Dedos, S. G., & Fugo, H. (1999). Interactions between Ca^{2+} and cAMP in ecdysteroid secretion from the prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **154**, 63-70.
- Dedos, S. G., Fugo, H., & Kataoka, H. (1998). A new cerebral factor stimulates IP_3 levels in the prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 7767-774.
- Delaage, M. A., Hirn, M. H., & De Reggi, M. L. (1982). Radioimmunoassay of ecdysteroids. *Immunochem. Tech.* **84**, 350-358.
- Delbecque, J. P., & Slama, K. (1980). Ecdysteroid titres during autonomous metamorphosis in a Dermestid beetle. *Z. Naturforsch.* **35c**, 1066-1080.
- Delbecque, J. P., Delachambre, J., Hirn, M., & de Reggi, M. (1978). Abdominal production of ecdysterone and pupal-adult development in *Tenebrio molitor* (Insecta: Coleoptera). *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**, 436-444.
- Delbecque, J. P., Weidner, K., & Hoffmann, K. H. (1990). Alternative sites for ecdysteroid production in insects. *Invertebr. Reprod. Dev.* **18**, 29-42.

- Dorn, A. (1972). Die endokrinen Drüsen in Embryo von *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera): Morphogenese, Funktionsaufnahme, Beeinflussung des Gewebewachstum und Beziehungen zu den embryonalen Häutungen. Z. Morphol. Tiere **74**, 52-104.
- Dorn, A. (1978). Ecdysone synthesis in castrated imagines of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera). Gen. Comp. Endocrinol. **34**, 106.
- Dorn, A., & Romer, F. (1976). Structure and function of prothoracic glands and oenocytes in embryos and last larval instars of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera). Cell Tiss. Res. **171**, 331-350.
- Dorn, A., Binder, I., Romer, F., & Wigand, C. (1994). Distribution and significance of ecdysteroids in the female and male milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. J. Insect Physiol. **40**, 225-233.
- Dorn, A., Rademacher, J. M., & Sehn, E. (1986). Effects of azadirachtin on the moulting cycle, endocrine system, and ovaries in last-instar larvae of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. J. Insect Physiol. **32**, 231-238.
- Dorn, A., Rademacher, J. M., & Sehn, E. (1987). Effects of azadirachtin on reproductive organs and fertility in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. Proc. 3rd Int. Neem Conf. pp. 273-288. Nairobi, Kenya.
- Dübendorfer, A. (1986): Ecdysone 20-hydroxylation and conjugate formation by *Drosophila melanogaster* cell lines. Insect Biochem. **16**, 645-651.
- Eckerskorn, C. H., & Lottspeich, F. (1989). Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. Chromatographia **28**, 92-94.
- Eibes, G. (1993). Metabolismus und Exkretion von ³H-Ecdyson bei männlichen Imagines der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* De Geer. Dissertation Mainz.
- Eibes, G., & Romer, F. (1990). Verweildauer, Metabolismus und Exkretion von ³H-Ecdyson bei adulten männlichen von *Gryllus bimaculatus*. Verh. Dtsch. Zool. Ges. **83**, 449-450.
- Endo, K., Fujimoto, Y., Kondo, M., Yamanaka, A., Watanabe, M., Weihua, K., & Kumagai, K. (1997). Stage-dependent changes of the prothoracicotropic hormone (PTTH) activity of brain extracts and of the PTTH sensitivity of the prothoracic glands in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, before and during winter and aestival pupal diapause. Zool. Science (Tokyo) **14**, 127-133.
- Endo, K., Fujimoto, Y., Masaki, T., & Kumagai, K. (1990). Stage-dependent changes in the activity of the prothoracicotropic hormone (PTTH) in the brain of the Asian comma butterfly, *Polygonia c-aureum* L. Zool. Science (Tokyo) **7**, 697-704.

- Ewer, J., De-Vente, J., & Truman, J. W. (1994). Neuropeptide induction of cyclic GMP increases in the insect CNS: resolution at the level of single identifiable neurons. *J. Neurosci.* **14**, 7704-7712.
- Feldlaufer, M. F., Weirich, G. F., Imberski, R. B., & Svoboda, J. A. (1995). Ecdysteroid production in *Drosophila melanogaster* reared on defined diets. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 709-712.
- Fernlund, P., & Josefsson, L. (1972). Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* **177**, 173-175.
- Fescemyer, H. W., Masler, E. P., Kelly, T., & Lusby, W. R. (1995). Influence of development and prothoracicotropic hormone on the ecdysteroids produced in vitro by the prothoracic glands of female gypsy moth (*Lymantria dispar*) pupae and pharate adults. *J. Insect Physiol.* **41**, 489-500.
- Foster, R., Lobo, M. V., Rasmussen, H., & Marusic, E. T. (1981). Calcium: its role in the mechanism of action of angiotensin II and potassium in aldosterone production. *Endocrinology* **109**, 2196-2201.
- Fu, H., Subramanian, R. R., & Masters, S. C. (2000). 14-3-3 Proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 617-647.
- Fukuda, S. (1940). Hormonal control of moulting and pupation in the silkworm. *Proc. Imp. Acad.* **16**, 417-420.
- Fukuda, S. (1944). The hormonal mechanism of larval moulting and metamorphosis in the silkworm. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo Sect. IV* (**6**), 477-537.
- Garcia, E. S., Luz, N., Azambuju, P., & Rembold, H. (1990). Azadirachtin depresses the release of prothoracicotropic hormone in *Rhodnius prolixus* larvae: evidence from head transplantations. *J. Insect Physiol.* **36**, 679-682.
- Garren, L. D., Ney, R. L., & Davis, W. W. (1965). Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by adrenocorticotrophic hormone in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **53**, 1443-1450.
- Gelman, D. B., Thyagaraja, B. S., & Bell, R. A. (1993). Ecdysiotropic activity in the Lepidopteran hindgut – an update. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 25-32.
- Gelman, D. B., Thyagaraja, B. S., Kelly, T. J., Masler, E. P., Bell, R. A., & Borkovec, A. B. (1992). Prothoracicotropic hormone levels in brains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: diapause vs the non-diapause state. *J. Insect Physiol.* **38**, 383-395.
- Gersch, M. (1978). Die klassische Vorstellung der hormonalen Steuerung der Insektenentwicklung im Lichte neuer experimenteller Tatsachen: Produktion von Häutungshormon außerhalb der Prothorakaldrüse. *Zool. Jb. Physiol.* **82**, 171-184.

- Gersch, M., & Stürzebecher, J. (1971). Über eine Synthese von Ecdyson ^3H und Ecdysteron ^3H aus Cholesterin ^3H in geschnürten Abdomina von *Mamestra brassicae* Raupen. *Experientia* **27**, 1475-1476.
- Gerstenlauer, B., & Hoffmann, K. H. (1995). Ecdysteroid release and ecdysteroid titer during larval-adult development of the Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). *Eur. J. Entomol.* **92**, 81-92.
- Gibbs, D., & Riddiford, L. M. (1977). Prothoracicotropic hormone in *Manduca sexta*: localization by a larval assay. *J. Exp. Biol.* **66**, 255.
- Gilbert, L. I., Bollenbacher, W. E., Agui, N., Granger, N. A., Sedlak, B. J., Gibbs, D., & Buys, C. M. (1981). The prothoracicotropes: source of the prothoracicotropic hormone. *Amer. Zool.* **21**, 641-653.
- Gilbert, L. I., Rybczynski, R., & Tobe, S. S. (1996). Endocrine cascade in insect metamorphosis, ed. by Gilbert, L. I., Tata, J. R., & Atkinson, B. G. **In:** *Metamorphosis: Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. Academic Press, San Diego, California. pp. 59-107.
- Gilbert, L. I., Rybczynski, R., Song, Q., Mizoguchi, A., Morreale, R., Smith, W. A., Matubayashi, H., Shionoya, M., Nagata, S., & Kataoka, H. (2000). Dynamic regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenesis: *Manduca sexta* recombinant prothoracicotropic hormone and brain extracts have identical effects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 1079-1089.
- Gilbert, L. I., Song, Q., & Rybczynski, R. (1997). Control of ecdysteroidogenesis: activation and inhibition of prothoracic gland activity. *Invert. Neurosci.* **3**, 205-216.
- Girardie, J., & Girardie, A. (1996). Lom-OMP, a putative ecdysiotropic factor for the ovary in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* **42**, 215-221.
- Girardie, J., Geoffre, S., & Girardie, A. (1995b). Arguments for an ecdysiotropic activity of the ovary maturing parsin of *Locusta migratoria* (Lom-OMP). **In:** *Proceedings of the First International Conference on Insects: Chemical, Physiological and Environmental Aspects, Ladek Zdroj', Poland*, p. 11.
- Girardie, J., Girardie, A., Van-Dorsselaer, A., Sorokine, O., Geoffre, S., Hospital, M., & Precigoux, G. (1995a). Chemical synthesis of a 7 kDa insect gonadotropic neurohormone. *J. Pept. Sci.* **1**, 311-318.
- Girgenrath, S., & Smith, W. A. (1996). Investigation of presumptive mobilization pathways for calcium in the steroidogenic action of big prothoracicotropic hormone. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 455-463.
- Goodwin, T. W., Horn, D. H. S., Karlson, P., Koolman, J., Nakanishi, K., Robbins, W. E., Siddal, J. B., & Takemoto, T. (1978). Ecdysteroids: a new generic term for steroids with moulting hormone activity. *Nature* **272**, 122.

- Gray, R. S., Meola, R. W., & Holman, G. M. (1987). Fat body stimulation of ecdysone synthesis in *Heliothis zea*. *J. Insect Physiol.* **33**, 325-331.
- Gray, R. S., Muehleisen, D. P., Katahira, E. J., & Bollenbacher, W. E. (1994). The prothoracicotropic hormone (PTTH) of the commercial silkworm, *Bombyx mori*, in the CNS of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Peptides*. **15**, 777-782.
- Grieneisen, M. L. (1994). Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and Crustaceans. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, 115-132.
- Griffith, A. C., & Finlayson, L. H. (1983). Ultrastructural changes in, and involution of, the ecdysial gland neuron at metamorphosis in *Agrotis*, *Spodoptera* and *Manduca* (Lepidoptera). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **12**, 225-233.
- Gruetzmacher, M. C., Gilbert, L. I., & Bollenbacher, W. E. (1984). Indirect stimulation of the prothoracic gland of *Manduca sexta* by Juvenile hormone: evidence for a fat body stimulatory factor. *J. Insect Physiol.* **30**, 771-778.
- Gu, S. H., Chow, Y. S., & O'Reilly, D. R. (1998). Role of calcium in the stimulation of ecdysteroidogenesis by recombinant prothoracicotropic hormone in the prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 861-867.
- Hagedorn, H. H. (1985). The role of ecdysteroids in reproduction. **In:** *Comp. Insect Physiol. Biol. & Pharma.*, Vol. **8**, ed. by Kerkut, G. A., & Gilbert, L. I., Pergamon Press, Oxford. pp. 205-261.
- Hagedorn, H. H., Shapiro, J. P., & Hanaoka, K. (1979). Ovarian ecdysone secretion is controlled by a brain hormone in an adult mosquito. *Nature* **282**, 92-94.
- Handler, A. (1982). Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **93**, 73-82.
- Harmsen, R., & Beckel, W. E. (1960). The intraovular development of the subspiracular glands in *Hyalophora cecropia* (L.) (Lepidoptera: Saturnidae). *Canad. J. Zool.* **38**, 883-893.
- Hayes, G. C., Muehleisen, D. P., Bollenbacher, W. E., & Watson, R. D. (1995). Stimulation of ecdysteroidogenesis by small prothoracicotropic hormone: role of calcium. *Mol. Cell. Endocrinol.* **115**, 105-112.
- Henrich, V. C. (1995). Comparison of ecdysteroid production in *Drosophila* and *Manduca*: pharmacology and cross-species neural reactivity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **30**, 239-254.
- Henrich, V. C., Pak, M. D., & Gilbert, L. I. (1987). Neural factors that stimulate ecdysteroid synthesis by the larval ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. B* **157**, 543-549.

- Henrich, V. C., Rybczynski, R., & Gilbert, L. I. (1999): Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: mechanisms and models in insect development. *Vitam. Horm.* **55**, 73-125.
- Herault, J. P. E., & Proux, J. P. (1987). Cyclic AMP: the second messenger of an antidiuretic hormone from the glandular lobes of the migratory locust corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* **33**, 487-495.
- Highnam, K. C. (1976). Neurosecretory activity in locusts. *Acrida* **5**, 6-24.
- Hikino, H., Mohri, K., Okuyama, T., Takemoto, T., & Yen, K. Y. (1976). Phytoecdysones from *Diplazium donianum*. *Steroids* **28**, 649-654.
- Hintze-Podufal, C. H. (1975). Veränderungen der Oenocyten und ihre Funktion während der Metamorphose bei Schwärmern und Zahnspinnern. *Wilhelm Roux' Archiv* **178**, 51-69.
- Hirn, M. H., & Delaage, M. A. (1980). Radioimmunological approaches to the quantification of ecdysteroids. *Develop. Endocrinol.* **7**, 69-82.
- Hiruma, K., & Agui, N. (1977). Relationship between histological changes and functions of the neurosecretory cells in the brain of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. *Appl. Ent. Zool.* **12**, 42-49.
- Hoffmann, J. A., & Hetru, C. (1983). Ecdysone. *Inverteb. Endocrinol.* **1**, 65-88.
- Hoffmann, J. A., Lagueux, M., Hetru, C., Kappler, C., Goltzene, F., Lafont, R., & Thiebold, J. (1986). Role of ecdysteroids in reproduction of insects: a critical analysis. **In:** *Advances in Invertebrate Reproduction Vol. 4*, ed by Porchet, M., Elsevier, Amsterdam. pp. 9-21.
- Hoffmann, K. H., & Behrens, W. (1982). Free ecdysteroids in adult male crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Physiol. Entomol.* **7**, 269-279.
- Hoffmann, K. H., & Wagemann, M. (1994). Age dependency and tissue distribution of ecdysteroids in adult male crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **109A**, 293-302.
- Hoffmann, K. H., Lenz, M., Loeb, M. J., Wagner, R. M., & Kochansky, J. P. (1994). Testis ecdysiotropin from *Lymantria dispar* stimulates ecdysteroid synthesis in adult *Gryllus bimaculatus*. **XI** Ecdysone Workshop, Ceske Budejovice, pp. 69. Czech Academy of Sciences, Prague.
- Hoffmann, K. H., Weidner, K., & Seidel, M. (1992). Sites of ecdysteroid biosynthesis in female adults of *Gryllus bimaculatus* (Ensifera, Gryllidae). *J. Comp. Physiol. B* **162**, 731-739.
- Horodyski, F. M. (1996). Neuroendocrine control of insect ecdysis by eclosion hormone. *J. Insect Physiol.* **42**, 917-924.

- Hua, Y. J., & Koolman, J. (1995). An ecdysiostatin from flies. *Regul. Pept.* **57**, 263-271.
- Hua, Y. J., Bylemans, D., De-Loof, A., & Koolman, J. (1994). Inhibition of ecdysone biosynthesis in flies by a hexapeptide isolated from vitellogenic ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol.* **104**, 1-4.
- Hua, Y. J., Jiang, R. J., & Koolman, J. (1997). Multiple control of ecdysone biosynthesis in blowfly larvae: Interaction of ecdysiotropins and ecdysiostatins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **35**, 125-134.
- Hua, Y. J., Tanaka, Y., Nakamura, K., Sakakibara, M., Nagata, S., & Kataoka, H. (1999). Identification of a Prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **274**, 31169-31173.
- Huber, R., & Hoppe, W. (1965). Zur Chemie des Ecdysons VII. Die Kristall- und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode. *Chem. Ber.* **98**, 2403-2424.
- Ichikawa, M., & Ishizaki, H. (1963). Protein nature of the brain hormone of insects. *Nature* **198**, 308.
- Imai, S., Hori, M., Fujioka, S., Murata, E., Goto, M., & Nakanishi, K. (1968). Isolation of four new phytoecdysones, makisterone A, B, C and D and the structure of makisterone A, a C-28 steroid. *Tetrahedron Lett.* 3883-3886.
- Ishibashi, J., Kataoka, H., Isogai, A., & Mizoguchi, A. (1994). Assignment of disulfide bond location in prothoracicotrophic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: A homodimeric protein. *Biochemistry* **33**, 5912-5919.
- Ishizaki, H., & Ichikawa, M. (1967). Purification of the brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biol. Bull.* **133**, 355-368.
- Ishizaki, H., & Suzuki, A. (1984). Prothoracicotrophic hormone of *Bombyx mori*. In: Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate hormones, ed by Hoffmann, J. & Porchet, M., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 63-77.
- Ishizaki, H., & Suzuki, A. (1992). Brain secretory peptides of the silkworm *Bombyx mori*: Prothoracicotrophic hormone and bombyxin. *Prog. Brain Res.* **92**, 1-14.
- Ishizaki, H., & Suzuki, A. (1994). The brain secretory peptides that control moulting and metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 301-310.
- Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujishita, M., Suzuki, A., & Nagasawa, H. (1983). Species specificity of the insect prothoracicotrophic hormone (PTTH): the presence of *Bombyx*- and *Samia*-specific PTTHs in the brain of *Bombyx mori*. *Develop. Grow. & Diff.* **25**, 593-600.

- Ishizaki, H., Suzuki, A., Isogai, A., Naggasawa, H., & Tamura, S. (1977). Enzymatic and chemical inactivation of partially purified prothoracicotropic (brain) hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. **23**, 1219-1222.
- Isobe, M., Hasegawa, K., & Goto, T. (1975). Further characterization of the silkworm diapause hormone A. J. Insect Physiol. **21**, 1917-1920.
- Jacobson, M. (1986). The Neem Tree: natural resistance par excellence. Am. Chem. Soc. **296**, 220-232.
- Jenkins, S. P., Brown, M. R., Lea, A. O. (1992). Inactive prothoracic glands in larvae and pupae of *Aedes aegypti*: ecdysteroid release by tissues in the thorax and abdomen. Insect Biochem. Mol. Biol. **22**, 553-559.
- Jiang, R. J., & Koolman, J. (1999). Feedback inhibition of ecdysteroids: Evidence for a short feedback loop repressing steroidogenesis. Arch. Insect Biochem. Physiol. **41**, 54-59.
- Jindra, M., Malone, F., Hiruma, K., & Riddiford, L. M. (1996). Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Dev. Biol. **180**, 258-272.
- Joly, P. (1968). Endocrinologie des Insectes (Grassé, P.-P., ed), Masson et C^{ie}, Paris.
- Kadir, H. A., & Knowles, C. O. (1991). Octopaminergic action of the carbodiimide metabolite of diafenthiuron. Pesticide Biochem. Physiol. **39**, 261-269.
- Kalderon, A. E., Dobbs, J. W., & Greenberg, M. L. (1980). Localization of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase (cAMP-PDEase) activity in isolated bovine thyroid plasma membranes. Histochemistry **65**, 277-289.
- Kaplanis, J. N., Dutky, S. R., Robbins, W. E., Thompson, M. J., Lindquist, E. L., Horn, D. H. S., & Galbraith, M. N. (1975). Makisterone A: a 28-carbon hexahydroxy moulting hormone from the embryo of the milkweed bug. Science **190**, 681-682.
- Karlson, P., & Stamm-Menendez, M. D. (1956). Notiz über den Nachweis von Metamorphose-Hormon in den Imagines von *Bombyx mori*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie **306**, 109-111.
- Karlson, P., Hoffmeister, H., Hummel, H., Hocks P., Spiteller G. (1965). Zur Chemie des Ecdysons. VI. Reaktion des Ecdysonmoleküls. Chem. Ber. **98**, 2394-2402.
- Karlson, P. (1983). Why are so many hormones steroids? (8. Butenandt-Vorlesung). Hoppe-Seyler 's Z. Physiol. Chem. **362**, 1067-1087.
- Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Tamura, S., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y., Suzuki, C., Ishizaki, H., & Suzuki, A. (1987). Isolation and partial characterization of a prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Agricul. Biol. Chem. **51**, 1067-1076.

- Käuser, G., & Koolman, J. (1983). Ecdysteroid receptors in tissues of the blowfly, *Calliphora vicina*. Abstract **III**. Int. Symp. Tübingen/Germany. Invert. Reprod. 22-27.
- Käuser, G., Brandtner, H. M., Bidmon, H. J., & Koolman, J. (1988). Ecdysone synthesis and release by the brain-ring gland complex of blowfly larvae. *J. Insect Physiol.* **34**, 563-569.
- Kawakami, A., Kataoka, H., Oka, T., Mizoguchi, A., Kawakami, K. M., Adachi, T., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A. & Ishizaki, H. (1990). Molecular cloning of the *Bombyx* prothoracicotropic hormone. *Science* **247**, 1333-1335.
- Ke, O. (1930). Morphological variation of the prothoracic gland in the domestic and the wild silkworm. *Bull. Sci. Fac. Terkult., Kjusu Imp. Uni.* **4**, 12-21.
- Keller, R., & Schmid, E. (1979). In vitro secretion of ecdysteroids by Y-organs and lack of secretion of mandibular organs of the crayfish following moltinduction. *J. comp. Physiol.* **130**, 347-353.
- Kelly, T. J., & Fuchs, M. S. (1980). In vivo induction of ovarian development in decapitated *Aedes atropalpus* by physiological levels of 20-hydroxyecdysone. *J. Exp. Zool.* **213**, 25-32.
- Kelly, T. J., Kingan, T. G., Masler, C. A., & Robinson, C. H. (1996). Analysis of the ecdysiotropic activity in larval brains of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **42**, 873-880.
- Kelly, T. J., Masler, E. P., Thyagaraja, B. S., Bell, R. A., & Imberski, R. B. (1992). Development of an in vitro assay for prothoracicotropic hormone of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) following studies on identification, titers and synthesis of ecdysteroids in last-instar females. *J. Comp. Physiol. B* **162**, 581-587.
- Kelly, T. J., Thyagaraja, B. S., Bell, R. A., & Masler, E. P. (1995). A novel low molecular weight ecdysiotropin in post-diapause, pre-hatch eggs of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera:Lymantriidae). *Reg. Pept.* **57**, 253-261.
- Kemeny, D. M. (1994). ELISA: Anwendung des enzyme linked immunosorbent assay im biologisch/medizinischen Labor. Gustav Fischer Verlag. pp. 16-17.
- Kim, A. J., Cha, G. H., Kim, K., Gilbert, L. I., & Lee, C. C. (1997). Purification and characterization of the prothoracicotropic hormone of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1130-1135.
- King, D. S. (1972). Metabolism of a-ecdysone and possible immediate precursors by insects in vivo and in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**, 221-227.
- Kingan, T. G. (1981). Purification of prothoracicotropic hormone from the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *Life Sciences* **28**, 2585-2594.

- Kiriishi, S., Rountree, D. B., Sakurai, S., & Gilbert, L. I. (1990). Prothoracic gland synthesis of 3-dehydroecdysone and its hemolymph 3 β -reductase mediated conversion to ecdysone in representative insects. *Experientia* **46**, 716-721.
- Kirimura, J., Saito, M., & Kobayashi, M. (1962). Steroid hormone in an insect, *Bombyx mori*. *Nature* **195**, 729-730.
- Klein, C., Kallenborn, H. G., & Radlicki, C. (1999). The Inka cell and its associated cells: ultrastructure of the epitracheal glands in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *J. Insect Physiol.* **45**, 65-73.
- Kobayashi, M., & Kirimura, J. (1958). The brain hormone in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Nature* **181**, 1217.
- Kobayashi, M., Kirimura, J., & Saito, M. (1962). The brain hormone in an insect. *Mushi*. **36**, 85.
- Koch, P. B., & Kaufmann, N. (1995). Pattern specific melanin synthesis and DOPA decarboxylase activity in a butterfly wing of *Precis coenia* Huebner. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 73-82.
- Koch, P. B., Keys, D. N., Rocheleau, T., Aronstein, K., Blackburn, M., Carroll, S. B. & Constant, R. H. (1998). Regulation of dopa decarboxylase expression during colour pattern formation in wild-type and melanic tiger swallowtail butterflies. *Development* **125**, 2303-2313.
- Koller, G. (1929). Die innere Sekretion bei Wirbellosen Tieren. *Biol. Rev.* **4**, 269-306.
- Koolman, J. (1982). Ecdysone metabolism. *Insect Biochem.* **12**, 225-250.
- Koolman, J. (1990). Ecdysteroids. *Zool. Sci.* **7**, 563-580.
- Kopec, S. (1917). Experiments on metamorphosis of insects. *Bull. Intern. Acad. Cracovie B.* 57-60.
- Kopec, S. (1922). Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull.* **42**, 323-342.
- Koul, O., Amanai, K., & Ohtaki, T. (1987). Effect of azadirachtin on the endocrine events of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **33**, 103-108.
- Kozhanova, N. I., & Sehnal, F. (1997). Makisterone A stimulates the cytoplasmic growth in the last instar larvae of the linden bug *Pyrrhocoris apterus* L. *Tsitologiya* **39**, 789-793.
- Kraus, W., Bokel, M., Klenk, A., Pöhl, H. (1985). The structure of Azadirachtin and 22,23-Dihydro-23 β -Methoxy-azadirachtin. *Tetrahedron Letters* **26**, 6435-6438.

- Kubo, I., Klocke, J. A., & Asano, S. (1983). Effects of ingested phytoecdysteroids on the growth and development of two lepidopterous larvae. *J. Insect Physiol.* **29**, 307-316.
- Kulesza, P., Lee, C. Y., & Watson, R. D. (1994). Protein synthesis and ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*): stimulation by big prothoracicotropic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93**, 448-458.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209.
- Lachaise, F., Le Roux, A., Huber, M., & Lafont, R. (1993). The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control. *J. Crustacean Biol.* **13**, 198-234.
- Ladd, T. L., Jacobson, M., & Buriff, C. R. (1978). Japanese beetles: extracts from neem tree seeds as feeding deterrents. *J. Econ. Entomol.* **71**, 810-813.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafont, R., & Koolman, J. (1984). II. 3 Ecdysone metabolism. **In:** Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones, ed. by Hoffmann, J. A., & Porchet, M., Springer-Verlag. pp. 196-226.
- Lafont, R., & Wilson, I. D. (1990). Advances in ecdysteroid high performance liquid chromatography. **In:** Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones, ed. by McCaffery, A. R., & Wilson, I. D., Plenum Press New York. pp. 79-94
- Lafont, R., Pennetier, J.-L., & Andrianjafintrimo, M. (1982). Sample processing for high-performance liquid chromatography of ecdysteroids. *J. Chromatogr.* **236**, 137-149.
- Lange, A. B. (1988). Inositol phospholipid hydrolysis may mediate the action of proctolin on insect visceral muscle. *Arch. Insect Physiol.* **9**, 201-210.
- Lanzrein, B. (1975). Programming, induction, or prevention of the breakdown of the prothoracic gland in the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *J. insect Physiol.* **21**, 367-389.
- Laurenza, A., Sutkowski, E. M., & Seamon, K. B. (1989). Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 442-447.
- Liu, C., Hermann, T. E. (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* **253**, 5892-5894.

- Locke, M. (1969). The ultrastructure of the oenocytes in the molt/intermolt cycle of an insect. *Tissue Cell* **1**, 103-154.
- Loeb, M. J., Brandt, E. P., Woods, C. W., & Bell, R. A. (1988). Secretion of ecdysteroid by sheaths of testes of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and its regulation by testis ecdysiotropin. *J. Exp. Zool.* **248**, 94-100.
- Loeb, M. J., Brandt, E. P., Woods, C. W., & Borkovec, A. B. (1987). An ecdysiotropic factor from brains of *Heliothis virescens* induces testes to produce immunodetectable ecdysteroid in vitro. *J. Exp. Zool.* **243**, 275-282.
- Loeb, M. J., Gelman, D. B., & Bell, R. A. (1993). Second messengers mediating the effects of testis ecdysiotropin in testes of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **23**, 13-28.
- Loeb, M. J., Kochansky, J., Wagner, R. M., & Woods, C. W. (1998). Structure-function analysis of *Lymantria* testis ecdysiotropin: a search for the active core. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **38**, 11-18.
- Loeb, M. J., Wagner, R. M., Gelman, D. B., Kochansky, J. P., Lusby, W. R., Woods, C. W., & Rao, K. R. (1994). Testis ecdysiotropin: sequence and mode of action. **In:** *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*, ed. by Menn, J. J., CRC Press, Boca Raton. pp. 277-280.
- Loeb, M. J., Woods, C. W., Brandt, E. P., & Borkovec, A. B. (1982). Larval testes of the tobacco budworm: A new source of insect ecdysteroids. *Science* **218**, 896-898.
- Lorenz, J. I., Lorenz, M. W., & Hoffmann, K. H. (1997). Factors regulating juvenile hormone and ecdysteroid biosynthesis in *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). *Eur. J. Entomol.* **94**, 369-379.
- Lymangrover, J. R., & Keku, E. (1984). Varying the duration of A23187 administration alters its effect on adrenal steroidogenesis. *Life Sci.* **23**, 371-377.
- Maleville, A. (1973). Degenerescence de la glande prothoracique de l'Orthoptere Gryllide *Acheta domestica*. *Acad. Sci. Paris* **277 D**, 1803-1804.
- Martau, T., & Romer, F. (1998). Degeneration of moulting glands in male crickets. *J. Insect Physiol.* **44**, 981-989.
- Maruyama, K., Hietter, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., & Ishizaki, H. (1988). Isolation and primary structure of bombyxin-IV, a novel molecular species of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Agricul. Biol. Chem.* **52**, 3035-3041.
- Masler, E. P., Kelly, T. J., Kochansky, J. P., Woods, C. W., & Borkovec, A. B. (1991a). Prothoracicotropic hormone-like activity in the embryonated eggs of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.). **In:** *Insect Neuropeptides; Chemistry, Biology and Action*, ed. by Menn, J. J., pp. 124-132.

- Masler, E. P., Kelly, T. J., Kochansky, J. P., Woods, C. W., & Borkovec, A. B. (1991b). Egg development neurosecretory hormone activity in the mosquito *Aedes aegypti*. ACS (American Chemical Society), Washington D. C.; No. **453**.
- Masler, E. P., Kelly, T. J., Thyaragaja, B. S., Woods, C. W., Bell, R. A., & Borkovec, A. B. (1986). Discovery and partial characterization of prothoracicotropic hormones of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **In**: Insect neurochemistry and neurophysiology, ed. by Borkovec, A. B., & Gelman, D. B., Humana, Clifton, NJ. pp. 331-334.
- Mattson, M. P., & Spaziani, E. (1986a). Regulation of Y-organ ecdysteroidogenesis by molt-inhibiting hormone in crabs: involvement of cyclic AMP-mediated protein synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**, 414-423.
- Mattson, M. P., & Spaziani, E. (1986b). Regulation of crab Y-organ steroidogenesis in vitro: evidence that ecdysteroid production increases through activation of cAMP-phosphodiesterase by calcium-calmodulin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **48**, 135-151.
- Mattson, M. P., & Spaziani, E. (1987). Demonstration of protein kinase C activity in crustacean Y-organs, and partial definition of its role in regulation of ecdysteroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **49**, 159-171.
- McMillen, W. W., Bowman, M. C., Burton, R. L., Starks, K. I., & Wiseman, B. R. (1969). Extract of china beery leaf as a feeding deterrent and growth retardant for larvae of the corn earworm and fall armyworm. *J. Econ. Entomol.* **62**, 708-710.
- Meller, V. H., Aucoin, R. R., Tobe, S. S., & Feyereisen, R. (1985). Evidence for an inhibiting role of cyclic AMP in the control of juvenile hormone biosynthesis by cockroach corpora allata. *Mol. Cell. Endocrinol.* **43**, 155-163.
- Meller, V. H., Combest, W. L., Smith, W. A., & Gilbert, L. I. (1988). A calmodulin-sensitive adenylate cyclase in the prothoracic glands of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **59**, 67-76.
- Meola, S. M., Loeb, M., Kochansky, J. P., Wagner, R., Beetham, P., Wright, M. S., Mouneimne, Y., & Pendleton, M. W. (1998). Immunocytochemical localization of testis ecdysiotropin in the pupa of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Mol. Neurosci.* **9**, 197-210.
- Mizoguchi, A. (1994). Distribution and function of bombyxin. **In**: Perspectives in Comparative Endocrinology, ed. by Davey, K. G., Peter, R. E., & Tobe, S. S., National Research Council of Canada, Ottawa. pp. 215-219.
- Mizoguchi, A., Oka, T., Kataoka, H., Nagasawa, H., Suzuki, A., & Ishizaki, H. (1990). Immunohistochemical localization of prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of *Bombyx mori*. *Develop. Growth & Differ.* **32**, 591-598.

- Moger, W. H. (1983). Effects of the calcium-channel blockers cobalt, verapamil, and D600 on Leydig cell steroidogenesis. *Biol. Reprod.* **28**, 528-535.
- Mordue, A. J., & Blackwell, A. (1993). Review – Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* **39**, 903-924.
- Muehleisen, D. P., Gray, R. S., Katahira, E. J., Thomas, M. K., & Bollenbacher, W. E. (1993). Immunoaffinity purification of the neuropeptide prothoracicotropic hormone from *Manduca sexta*. *Peptides* **14**, 531-541.
- Muszynska-Pytel, M. (1987). Some aspects of activity regulation of *Galleria mellonella* PTTH cells. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **5**, 211-224.
- Nagasawa, H., Kataoka, H., & Isogai, A. (1984). Amino terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone: homology with insulin. *Science* **226**, 1344-1345.
- Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., & Ishizaki, H. (1986). Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **83**, 5840-5843.
- Nardi, J. B., Hardt, T. A., Magee-Adams, S. M., & Osterbur, D. L. (1985). Morphogenesis in wing imaginal discs: its relationship to changes in the extracellular matrix. *Tissue Cell* **17**, 473-90.
- Nishitsutsuji-Uwo, J., & Nishimura, M. S. (1984). Partial purification and properties of prothoracicotropic hormone (PTTH) from developing adult brains of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **14**, 127-133.
- O'Brien, M. A., Granger, N. A., Agui, N., Gilbert, L. I., & Bollenbacher, W. E. (1986). Prothoracicotropic hormone in the developing brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: relative amounts of two molecular forms. *J. Insect Physiol.* **32**, 719-725.
- O'Brien, M. A., Katahira, E. J., Flanagan, T. R., Arnold, L. W., Haughton, G., & Bollenbacher, W. E. (1988). A monoclonal antibody to the insect prothoracicotropic hormone. *J. Neurosci.* **8**, 3247-3257.
- Oeh, U., Lorenz, M. W., & Hoffmann, K. H. (1997). Ecdysteroid biosyntheses of prothoracic glands from *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* **11**, 555-558.
- Ohe, U., Lorenz, M. W., & Hoffmann, K. H. (1998). Ecdysteroid release by the prothoracic gland of *Gryllus bimaculatus* (Ensifera: Gryllidae) during larval-adult development. *J. Insect Physiol.* **44**, 941-946.
- Orchard, I., & Lange, A. B. (1984). Cyclic AMP in locust fat body: correlation with octopamine and adipokinetic hormones during flight. *J. Insect Physiol.* **30**, 901-912.

- Ozeki, K. (1968). Experimental studies on the regression of the ventral glands of the earwig, *Anisolabis maritima*, during metamorphosis. Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo **18**, 199-219.
- Pak, M. D., Chung, K. W., Lee, C. C., Kim, K., Namkoong, Y., & Koolman, J. (1992). Evidence for multiple forms of the prothoracicotropic hormone in *Drosophila melanogaster* and indication of a new function. J. Insect Physiol. **38**, 167-176.
- Pener, M. P., Rountree, D. B., Bishoff, S. T., & Gilbert, L. I. (1990). Molt inhibition by azadirachtin; effects on prothoracicotropic hormone, prothoracic glands and ecdysteroid titers in *Manduca sexta* pupae. **In**: Insect neurochemistry and neurophysiology, ed. by Borkovec, A. B., & Masler, P., Human Press, Clifton, New Jersey. pp. 365-368.
- Philogene, B. J. R., & McFarlane, J. E. (1967). The formation of the cuticle in the house cricket, *Acheta domesticus* (L.) and the role of the oenocytes. Canad. J. Zool. **45**, 181-190.
- Piepho, H. (1948). Zur Frage der Bildungsorgane des Häutungswirkstoffs bei Schmetterlingen. Naturwiss. **35**, 94-95.
- Pimley, R. W. (1985). Cyclic AMP and calcium mediate the regulation of fat cell activity by octopamine and peptide hormones in *Glossina morsitans*. Insect Biochem. **15**, 293-299.
- Porcheron, P., Moriniere, M., Grassi, J., & Pradelles, P. (1989). Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. Insect Biochem. **19**, 117-122.
- Putney, J. W., & Bird, G. (1994). Calcium mobilization by inositol phosphates and other intracellular messengers. TEM **5**, 256-260.
- Rafaeli, A., Pines, M., Stern, P. S., & Applebaum, S. W. (1984). Locust diuretic hormone-stimulated synthesis and excretion of cyclic-AMP: a novel Malpighian tubule bioassay. Gen. Comp. Endocrinol. **54**, 35-42.
- Rasmuss, H. (1983). Pathways of amplitude and modulation in the calcium messenger system. Mol. Biol. **4**, 1-8.
- Ratcliffe, N. A., & Gagen, S. J. (1977). Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. Tiss. Cell **9**, 73-85.
- Redfern, C. P. F. (1984). Evidence for the presence of makisterone A in *Drosophila* larvae and the secretion of 20-deoxymakisterone A by the ring gland. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**, 5643-5647.
- Redfern, C. P. F. (1989). Ecdysiosynthetic tissues. **In**: Ecdysone: from chemistry to mode of action. Georg Thieme Verlag, ed. by Koolman, J., pp. 182-187.

- Redfern, R. E., Kelly, T. J., & Hayes, D. K. (1981). Comparison of ecdysteroid concentration in and growth regulating factors on 5th-stage *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) treated with four insect growth regulators. *Develop. Endocrinol.* **15**, 415-420.
- Rees, H. H., & Isaac, R. E. (1985). Biosynthesis and metabolism of ecdysteroids and methods of isolation and identification of the free and conjugated compounds. *Methods Enzymol.* **111**, 377-410.
- Rembold, H. (1984). Secondary plant products in insect control, with special reference to the azadirachtins. *Advan. Invertebr. Reprod.* **3**, 481-491.
- Rembold, H., Müller, T., & Uhl, M. (1987). Effect of azadirachtin on hormone titers during the gonotrophic cycle of *Locusta migratoria*. *Proc. 3. Int. Neem Conf.* pp. 203-268. Nairobi, Kenya.
- Rembold, H., Subrahmanyam, B., & Müller, T. (1989). Corpus cardiacum – a target for azadirachtin. *Experientia* **45**, 361-363.
- Reum, L., & Koolman, J. (1989). Radioimmunoassay of ecdysteroids. **In:** Ecdysone: from chemistry to mode of action, ed. by. Koolman, J., Thieme-Verlag, Stuttgart. pp. 131-143.
- Richards, G. (1978). The relative biological activities of α - and β -ecdysone and their 3- dehydro derivatives in the chromosome puffing assay. *J. Insect Physiol.* **24**, 329-335.
- Richter, K. (1984). Die Prothorakaldrüse im Imaginalstadium von *Periplaneta americana*. *Zool. Jb. Physiol.* **88**, 433-440.
- Richter, K. (1985). Physiological investigation on the role of the innervation in the regulation of the prothoracic gland in *Periplaneta americana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2**, 319-329.
- Richter, K. (1993a). Brain factors control the activity of prothoracic gland nerves in the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **39**, 701-707.
- Richter, K. (1993b). Further physiological evidence for nervous regulation of the prothoracic gland in the coackroach, *Periplaneta americana*. *Zool. Jb. Physiol.* **97**, 31-46.
- Richter, K., & Gersch, M. (1981). Die elektrophysiologische Aktivität der *Nervi corporis cardiaci* I und II von *Periplaneta americana* in Beziehung zum Häutungszyklus. *Zool. Jb. Physiol.* **85**, 412-425.
- Richter, K., Böhm, G. A., & Leubert, F. (1999). 3-dehydroecdysone secretion by the molting gland of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **41**, 107-116.
- Riemer, S., & Romer, F. (1995). Ecdysteroide in adulten männlichen Schaben der Art *Blaptica dubia*. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* **10**, 691-694.

- Rinterknecht, E., & Matz, G. (1983). Oenocyte differentiation correlated with the formation of ectodermal coating in the embryo of a cockroach. *Tissue Cell* **15**, 375-390.
- Romeis, B. (1989). *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg Verlag.
- Romer, F. (1972). Histologie, Histochemie, Polyploidie und Feinstruktur der Oenocyten von *Gryllus bimaculatus* (Saltatoria). *Cytobiologie* **6**, 195-213.
- Romer, F. (1973). Feinstrukturelle Merkmale der Oenocyten pterygoter Insekten. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* **66**, 65-70.
- Romer, F. (1974). Ultrastructural changes of the oenocytes of *Gryllus bimaculatus* DEG (Saltatoria, Insecta) during the moulting cycle. *Cell Tiss. Res.* **151**, 27-46.
- Romer, F. (1975). Morphologie und Ultrastruktur der larvalen Oenocyten von *Tenebrio molitor* L. (Insecta, Coleoptera) bei larve, Puppe und Imago. *Z. Morphol. Tiere* **80**, 1-40.
- Romer, F. (1977). Geschlechtsspezifische Unterschiede im Häutungshormon-Titer bei adulten Grillen. *Naturwiss.* **66**, 471.
- Romer, F., & Bressel, H. U. (1994). Secretion and metabolism of ecdysteroids by oenocyte-fat body complexes (OEFC) in adult males of *Gryllus bimaculatus* DEG (Insecta). *Z. Naturforsch.* **49c**, 871-880.
- Romer, F., & Shahab, N. (1984). Ecdysteroids in adult males of *Gryllus bimaculatus* and *Blaptica dubia*. **XVII**. International Congress of Entomology Hamburg, 251.
- Romer, F., Emmerich, H., & Nowock, J. (1974). Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor* in vitro. *J. Insect Physiol.* **20**, 1975-1987.
- Rountree, D. B., Combest, W. L. & Gilbert, L. I. (1992). Prothoracicotropic hormone regulates the phosphorylation of a specific protein in the prothoracic glands of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**, 353-362.
- Ruhland, U., & Romer, F. (1977). Nachweis von häutungsaktiven Stoffen in isolierten Prothorakaldrüsen und Oenocyten bei *Bombyx mori* während des 5. Larvenstadiums. *Wilhelm Roux' Archiv* **181**, 123-134.
- Ruiz de Mena, I., Fernandez-Moreno, M. A., Bornstein, B., Kaguni, L. S., & Garesse, R. (1999). Structure and regulated expression of the d-aminolevulinate synthase gene from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **274**, 37321-37328.

- Rybczynski, R., & Gilbert, L. I. (1995). Prothoracicotropic hormone elicits a rapid, developmentally specific synthesis of β tubulin in an insect endocrine gland. *Develop. Biol.* **169**, 15-28.
- Rybczynski, R., Mizoguchi, A., & Gilbert, L. I. (1996). *Bombyx* and *Manduca* prothoracicotropic hormones: an immunologic test for relatedness. *Gen. Comp. Endocrinol.* **102**, 247-254.
- Sakurai, S., & Williams, C. M. (1989). Short-loop negative and positive feedback on ecdysone secretion by prothoracic gland in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**, 204-216.
- Sakurai, S., Okuda, M., & Ohtaki, T. (1989). Juvenile hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotropic hormone in prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**, 222-230.
- Sakurai, S., Warren, J. T., & Gilbert, L. I. (1991). Ecdysteroid synthesis and molting by the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, in the absence of prothoracic glands. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **18**, 13-36.
- Sala, G. B., Dufau, M. L., & Catt, K. J. (1979). Gonadotropin action in isolated ovarian luteal cells. The intermediate role of adenosine 3', 5'-monophosphate in hormonal stimulation of progesterone synthesis. *J. Biol. Chem.* **254**, 2077-2083.
- Sarker, S. D., Girault, J. P., Lafont, R., & Dinan, L. N. (1997). Ecdysteroid xylosides from *Limnathes douglasii*. *Phytochem.* **44**, 513-521.
- Scharrer, B. (1952). Neurosecretion XI. The effects of nerve secretion on the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insect *Leucophaea maderae*. *Biol. Bull.* **102**, 261-272.
- Schimmer, B. P. (1980). Cyclic nucleotides in hormonal regulation of adrenocortical function. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **13**, 181-214.
- Schlaeger, D. A., Fuchs, M. S., & Kang, S. H. (1974). Ecdysone mediated stimulation of dopa decarboxylase activity and its relationship to ovarian development in *Aedes aegypti*. *J. Cell Biol.* **61**, 454-465.
- Schlüter, U. (1985). Occurrence of weight gain reduction and inhibition of metamorphosis and storage protein formation in last larval instars of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis*, after injection of azadirachtin. *Entomol. Exp. Appl.* **39**, 191-195.
- Schlüter, U., & Schulz, W. D. (1984). Structural damages caused by neem in *Epilachna varivestis*. A summary of histological and ultrastructural data. In: *Natural pesticides of the Neem Tree and other tropical plants*, ed. by Schmutterer, H., & Asher, K., GTZ-Verlag, Eschborn. pp. 227-235.

- Schlüter, U., Bidmon, H. J., & Grewe, S. (1985). Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Insect Physiol. **31**, 773-777.
- Schmutterer, H. (Ed.) (1995). The Neem Tree. VCH, Weinheim.
- Schmutterer, H., & Rembold, H. (1980). Zur Wirkung einiger Reinfractionen aus Samen von *Azadirachta indica* auf Frassaktivität und Metamorphose von *Epilachna varivestis* (Col. Coccinellidae). Ztschr. angew. Entomol. **89**, 179-188.
- Schulz, W. D., & Schlüter, U. (1982). Histopathologisches Screening von Geweben des mexikanischen Bohnenkafers (*Epilachna varivestis* Muls.) nach Behandlung mit Extrakten des Neem-Baums (*Azadirachta indica* A. Juss). Verh. Dtsch. Zool. Ges. **75**, 330.
- Sevala, V. L., & Davey, K. G. (1989). Action of juvenile hormone on the follicle cells of *Rhodnius prolixus*: evidence for a novel regulatory mechanism involving protein kinase C. Experientia **45**, 355-356.
- Shahab, N. (1985). Vorkommen von Ecdysteroiden und Verlauf des Titers bei Imagines von *Gryllus bimaculatus* De Geer. Dissertation Mainz.
- Shahab, N., & Romer, F. (1982). Ecdysteroids in adult crickets. Acta Endocrinol. Suppl. **264**, 30-31.
- Shapiro, J. P. (1983). Ovarian cyclic AMP and response to a brain hormone from the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem. **13**, 273-279.
- Shirai, Y., Aizono, Y., Iwasaki, T., Yanagida, A., Mori, H., Sumida, M., & Matsubara, F. (1993). Prothoracicotropic hormone is released five times in the 5th-larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. **39**, 83-88.
- Sieber, K. P. (1982). Untersuchungen über die Wirkung des Azadirachtins auf die Entwicklung und ihre Steuerung bei *Locusta migratoria*. Dissertation München.
- Sieber, K. P., & Rembold, H. (1983). The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in *Locusta migratoria*. J. Insect Physiol. **29**, 523-527.
- Simoës, P., Boleli, I. C., & Hartfelder, K. (1997). Occurrence of a prothoracicotropic hormone-like peptide in the developing nervous system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Apidologie **28**, 399-409.
- Sitsapesan, R., McGarry, S. J. & Williams, A. J. (1995). Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca²⁺ release. Trends Pharmacol. Sci. **16**, 386-391.
- Slama, K. (1983). Illusive functions of the prothoracic gland in *Galleria*. Acta Ent. Bohemoslov. **80**, 161-176.

- Smith, T., & Bownes, M. (1985). Metabolism of 20-hydroxyecdysone in adult *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* **15**, 749-754.
- Smith, W. A. (1993). Second messengers and the action of prothoracicotropic hormone in *Manduca sexta*. *Amer. Zool.* **33**, 330-339.
- Smith, W. A. (1995). Regulation and consequences of cellular changes in the prothoracic glands of *Manduca sexta* during the last larval instar. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **30**, 271-293.
- Smith, W. A., & Nijhout, H. F. (1982). Ultrastructural changes accompanying secretion and cell death in the molting glands of an insect (*Oncopeltus*). *Tissue Cell* **14**, 243-252.
- Smith, W. A., & Pasquarello, T. J. (1989). Developmental changes in phosphodiesterase activity and hormonal response in the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **63**, 239-246.
- Smith, W. A., & Sedlmeier, D. (1990). Neurohormonal control of ecdysone production: comparison of insects and crustaceans. *Invertebr. Rep. Dev.* **18**, 77-89.
- Smith, W. A., Gilbert, L. I. (1989). Early events in peptide-stimulated ecdysteroid secretion by the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *J. Exp. Zool.* **252**, 264-270.
- Smith, W. A., Gilbert, L. I., & Bollenbacher, W. E. (1984). The role of cyclic AMP in the regulation of ecdysone synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **37**, 285-294.
- Smith, W. A., Gilbert, L. I., & Bollenbacher, W. E. (1985). Calcium cyclic AMP interactions in prothoracicotropic hormone stimulation of ecdysone synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **39**, 71-78.
- Smith, W. A., Varghese, A. H., & Lou, K. J. (1993). Developmental changes in cyclic AMP-dependent protein kinase associated with increased secretory capacity of *Manduca sexta* prothoracic glands. *Mol. Cell. Endocrinol.* **90**, 187-195.
- Smith, W. A., Varghese, A. H., Healy, M. S., & Lou, K. J. (1996). Cyclic AMP is a requisite messenger in the action of big PTTH in the prothoracic glands of pupal *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 161-170.
- Song, Q., & Gilbert, L. I. (1995). Multiple phosphorylation of ribosomal protein S6 and specific protein synthesis are required for prothoracicotropic hormone-stimulated ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 591-602.
- Song, Q., & Gilbert, L. I. (1997). Molecular cloning, developmental expression, and phosphorylation of ribosomal protein S6 in the endocrine gland responsible for insect molting. *J. Biol. Chem.* **272**, 4429-4435.

- Soumoff, C., Horn, D. H. S., & O'Connor, J. D. (1981). Production of a new antiserum to arthropod moulting hormone and comparison with two other antisera. *J. Steroid Biochem.* **14**, 429-435.
- Spindler, K. D., Beckers, C. H., Görschel-Stewart, U., & Emmerich, H. (1978). A radioimmunoassay for arthropod moulting hormones, introducing a novel method of immunogen coupling. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **359**, 1269-1275.
- Steel, C. G. H. (1978). Some functions of identified neurosecretory cells in the brain of the aphid, *Megoura viciae*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **34**, 219-228.
- Steets, R., & Schmutterer, H. (1975). Einfluß von Azadirachtin auf die Lebensdauer und das Reproduktionsvermögen von *Epilachna varivestis* Muls. *Zeitschr. Pfl. Krankh. Pfl.-Schutz* **82**, 176-179.
- Steiner, A. L., Pagliara, A. S., Chase, L. R., & Kipnis, D. M. (1972). Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J. Biol. Chem.* **247**, 1114-1120.
- Stocco, D. M., & Clark, B. J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr-Rev.* **17**, 221-244.
- Stone, J. V., Mordue, W., Batley, K. E., & Morris, H. R. (1976). Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* **263**, 207-211.
- Subrahmanyam, B., & Rao, P. J. (1986). Azadirachtin effects on *Schistocerca gregaria* forskal during ovarian development. *Current Science* **55**, 534-538.
- Subrahmanyam, B., & Rembold, H. (1989). Effect of azadirachtin A on neuroendocrine activity in *Locusta migratoria*. *Cell Tissue Res.* **256**, 513-517.
- Subrahmanyam, B., Müller, T., & Rembold, H. (1989). Inhibition of turnover of neurosecretion by azadirachtin in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* **35**, 493-500.
- Suksamrarn, A., Charoensuk, S., & Yingyongnarongkul, B. E. (1996). Synthesis and biological activity of 3-deoxyecdysteroid analogues. *Tetrahedron Lett.* **52**, 10673-10684.
- Suzuki, A. (1986). Chemistry of prothoracicotrophic hormones in *Bombyx mori*. *Shokubutsu Boeki* **40**, 224-229.
- Thyagaraja, B. S., Kelly, T. J., Masler, E. P., Gelman, D. B., Bell, R. A., & Imberski, R. B. (1992). Kopec revisited - neuroendocrine regulation of metamorphosis in the gypsy moth (*Lymantria dispar*): development of a larval in vivo assay for prothoracicotrophic hormone. *J. Insect Physiol.* **38**, 925-938.

- Tobe, S. S. (1977). Asymmetry in hormone biosynthesis by insect endocrine glands. *Can. J. Zool.* **55**, 1509-1514.
- Tobe, S. S. (1990). Role of intracellular messengers in the regulation of juvenile hormone biosynthesis in the cockroach, *Diploptera punctata*. *Prog. Clin. Biol. Res.* **342**, 174-179.
- Truman, J. W. (1996). Ecdysis control sheds another layer. *Science* **271**, 40-41.
- Truman, J. W., & Levine, R. B. (1982). The action of peptides and cyclic nucleotides on the nervous system of an insect. *Fed. Proc.* **41**, 2929-2939.
- Trumm, P., & Dorn, A. (2000). Effects of azadirachtin on the regulation of midgut peristalsis by the stomatogastric nervous system in *Locusta migratoria*. *Phytoparasitica* **28**, 7-26.
- Tublitz, N., & Trombley, P. Q. (1987). Peptide action on insect cardiac muscle is mediated by inositol triphosphate (IP₃). *Neurosci.* **13**, 235-241.
- Ueno, K., & Suzuki, Y. (1997). p260/270 expressed in embryonic abdominal leg cells of *Bombyx mori* can transfer palmitate to peptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 13519-13526.
- Vafopoulou, X., & Steel, C. G. H. (1996). Circadian regulation of a daily rhythm of release of prothoracicotropic hormone from the brain retrocerebral complex of *Rhodnius prolixus* (hemiptera) during larval-adult development. *Gen. Comp. Endocrinol.* **102**, 123-129.
- Veldhuis, J. D., & Klase, P. A. (1982). Mechanisms by which calcium ions regulate the steroidogenic actions of luteinizing hormone in isolated ovarian cells in vitro. *Endocrinology* **111**, 1-6.
- Wagner, R. M., Loeb, M. J., Kochansky, J. P., Gelman, D. B., Lusby, W. R., & Bell, R. A. (1997). Identification and characterization of an ecdysiotropic peptide from brain extracts of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **34**, 175-189.
- Wainwright, G., Prescott, M. C., Lomas, L. O., Webster, S. G., & Rees, H. H. (1997). Development of a new high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method for the analysis of ecdysteroids in biological extracts. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **35**, 21-31.
- Warren, J. T., Sakurai, S., Rountree, D. B., Gilbert, L. I., Lee, S.-S., & Nakanishi, K. (1988). Regulation of the ecdysteroid titer of *Manduca sexta*: Reappraisal of the role of the prothoracic glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 958-962.
- Watson, R. D., & Bollenbacher, W. E. (1988). Juvenile hormone regulates the steroidogenic competence of *Manduca sexta* prothoracic glands. *Mol. Cell Endocrinol.* **57**, 251-259.

- Watson, R. D., Spaziani, E., & Bollenbacher, W. E. (1989b). Regulation of ecdysone synthesis in insects and crustaceans: a comparison. **In:** Ecdysone – from chemistry to mode of action, ed. by Koolman, J., Georg Thieme Verlag, pp. 188-203.
- Watson, R. D., Thomas, M. K., & Bollenbacher, W. E. (1989a). Regulation of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J. Exp. Zool.* **252**, 255-263.
- Watson, R. D., Yeh, W. E., Muehleisen, D. P., Watson, C. J., & Bollenbacher, W. E. (1993). Stimulation of ecdysteroidogenesis by small prothoracicotropic hormone: Role of cyclic AMP. *Mol. Cell. Endocrinol.* **92**, 221-228.
- Weirich, G. F. (1989). Enzymes involved in ecdysone metabolism. **In:** Ecdysone from Chemistry to Mode of Action, ed. by Koolman, J., Thieme-Verlag Stuttgart. pp. 39-64.
- Westbrook, A. L., Haire, M. E., Kier, W. M., & Bollenbacher, W. E. (1991). Three-dimensional architecture of identified cerebral neurosecretory cells in an insect. *J. Morphol.* **208**, 161-174.
- Wigglesworth, V. B. (1948). The structure and deposition of the cuticle in the adult mealworm *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). *Quart. J. Mic. Sci.* **89**, 197-217.
- Wigglesworth, V. B. (1985a). The transfer of lipid in insects from the epidermal cells to the cuticle. *Tissue Cell* **17**, 249-265.
- Wigglesworth, V. B. (1985b). Sclerotin and lipid in the waterproofing of the insect cuticle. *Tissue Cell* **17**, 227-248.
- Wildmann, H., & Romer, F. (1977). Metabolism of ^3H -a-ecdysone in *Gryllus bimaculatus* during the eighth larval instar. *J. Insect Physiol.* **23**, 343-349.
- Williams, C. M. (1946). Physiology of insect diapause: I. The role of the brain in the production and termination of pupal dormancy in the giant silkworm, *Platysamia cecropia*. *Biol. Bull.* **93**, 234-243.
- Williams, C. M. (1947). Physiology of insect diapause: II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm, *platysamia cecropia*. *Biol. Bull.* **93**, 89-98.
- Williamson, J. R., & Hansen, C. A. (1987). Signalling system in stimulus-response coupling. **In:** Biochemical actions of hormones, ed. by Litwick, G., Acad. Press, New York. pp. 29-80.
- Yagi, Y., Ishibashi, J., Nagata, K., Kataoka, H., Suzuki, A., Mizoguchi, A., & Ishizaki, H. (1995). The brain neurosecretory cells of the moth *Samia cynthia ricini*: immunohistochemical localization and developmental changes of the *Samia* homologues of the *Bombyx* prothoracicotropic hormone and bombyxin. *Develop. Grow. & Diff.* **37**, 505-515.

- Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* **39**, 1157-1175.
- Yamamoto, M., Chadarevian, A., & Peppegrinni, M. (1988). Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C. *Science* **239**, 916-917.
- Yokoyama, T. (1936). Histological observations on a nonmoulting strain of silkworm. *Proc. Roy. Entomol. Soc. London* **11 A**, 35-44.
- Zanno, P. R., Miura, I., Nakanishi, K., & Elder, D. L. (1975). Structure of the insect phagorepellent azadirachtin. Applications of PRFT/CWD carbon-13 nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1975-1977.
- Zavrel, J. (1935). Endokrine Hautdrüsen von *Syndiamesa branicki*. *Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk (Brno)* **213**, 1-18.
- Zhu, X. X., Gfeller, H., & Lanzrein, B. (1983). Ecdysteroid during oogenesis in the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. *J. Insect Physiol.* **29**, 225-235.
- Zitnan, D., Kingan, T. G., Hermesman, J. L., & Adams, M. E. (1996). Identification of Ecdysis-Triggering hormone from an epitracheal endocrine system. *Science* **271**, 88-89.
- Zitnan, D., Sehna, F., & Beckage, N. E. (1994). Novel neurosecretory pathways and endocrine cells that may regulate activity of the prothoracic gland in moths. *Proc. XI. Ecdysone Workshop, Budejovice, Czech Republic.* p. 131.
- Zitnan, D., Sehna, F., & Bryant, P. J. (1993). Neurons producing specific neuropeptides in the central nervous system of normal and pupariation-delayed *Drosophila*. *Develop. Biol.* **156**, 117-135.
- Zitnan, D., Sehna, F., Mizoguchi, A., Ishizaki, H., Nagasawa, H., & Suzuki, A. (1990). Developmental changes in the bombyxin- and insulin-like immunoreactive neurosecretory system in the wax moth, *Galleria mellonella*. *Develop. Grow. & Diff.* **32**, 637-645.
- Zöfel, P. (1985). *Statistik in der Praxis*. Fischer Verlag, Stuttgart.