Der Ecdysontiter während der Insektenentwicklung, VI¹

Untersuchungen über die Verteilung des Ecdysons in verschiedenen Geweben von *Calliphora erythrocephala* und über seine biologische Halbwertszeit

Studies on the distribution of ecdysone in different tissues of *Calliphora erythrocephala* and its biological half life

ELI SHAAAYA *

Institut für Physiologische Chemie, Universität Marburg, Deutschland

Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, USA

(Z. Naturforschg. **24 b**, 718—721 [1969]; eingegangen am 20. Dezember 1968)

Herrn Prof. Dr. P. KARLSON zum 50. Geburtstag gewidmet

The distribution of ecdysone before and during puparium formation has been determined in various tissues of *Calliphora*. The hormone level in the blood remains relatively constant from 20 hours before pupation to 5 hours after pupation. Ecdysone first appears in the integument 8—5 hours before pupation reaching a maximum of 27.5% of the total hormone content in the body 5 hours after pupation. The titer in the fat body is low until 5 hours after pupation when it rises sharply to 48% of the total body content.

Exogenous ecdysone injected into isolated abdomens is rapidly inactivated. The activity declines exponentially with a half-life of about 3 hours.

Die postembryonale Entwicklung der Insekten wird durch verschiedene Hormone gesteuert. Besondere Bedeutung hat hierbei das Prothorakaldrüsen-Hormon Ecdyson, welches die Häutungen auslöst. In einer früheren Mitteilung dieser Reihe wurde über den Ecdysontiter im Verlauf der Entwicklung von *Calliphora* berichtet: dabei wurden ganze Tiere (Larven bzw. Puppen) extrahiert. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Gesamtmenge des Ecdysons auf verschiedene Gewebe verteilt. Dabei ergab sich, daß der Fettkörper zu bestimmten Zeiten erhebliche Ecdysonmengen zu speichern vermag. Da dies vermutlich mit der Inaktivierung des Ecdysons zusammenhängt, wurde in einem weiteren Versuch die biologische Halbwertszeit des Ecdysons bestimmt.

Material und Methoden

Insekten

Die Larven von *Calliphora erythrocephala* Meig. wurden bei 24 °C und 45% relativer Feuchtigkeit auf Schweineleber gezüchtet. Unter diesen Bedingungen tritt nach acht Tagen die Verpuppung ein.

Um die Kultur zu synchronisieren, wurden die Eier in 2- bis 4-Stdn.-Intervallen gesammelt. Nur solche Larven, die 20 bis 24 Stdn. nach der Oviposition schlüpften, wurden in frische Kulturschalen übertragen und nach bestimmter Zeit für die Versuche verwandt.

Präparation verschiedener Gewebe

Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde das Integument im hinteren Teil der Tiere mit einer Schere eingeschnitten, und die Tiere wurden über einem eiskühlten Sammelgefäß vorsichtig gequetscht. Zur Entfernung der Hämolymphe wurde die Tiere zweimal 10 bis 15 Min. in eiskalter Ringer-Lösung (25 ml/15 g Tiere) gewaschen. Hämolymphe und Waschflüssigkeit wurden für die Hormonextraktion vereinigt. Aus den gewaschenen Tieren wurde nach Aufschneiden der Leibeshöhle der Fettkörper herausgenommen und von den Malpighi-Gefäßen freipräpariert. Das Integument wurde von allen Geweben außer Epidermis und anhaftender Muskulatur befreit. Die Epidermis bleibt bei dieser Behandlung unverletzt, wie sich im mikroskopischen Bild nachweisen läßt.

* Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung.

¹ P. KARLSON u. C. BODE, J. Insect. Physiol. **15**, 111 [1969].

Präparation isolierter Abdomen

Erwachsene Larven von *Calliphora erythrocephala* wurden vorsichtig in lauwarmem Wasser gewaschen und zur Ausschaltung des neuroendokrinen Systems im Bereich des 3. oder 4. Segments geschnürt. Durch diesen Eingriff wird eine Wechselwirkung zwischen dem endokrinen System und dem Abdomen des Versuchstieres unterbunden. Unmittelbar danach wurden 2 CE (0,03 µg) Ecdyson **, gelöst in 10 µl Insekten-Ringer-Lösung, in die Leibeshöhle der geschnürten Larven injiziert. Alle Injektionen wurden mit einer standardisierten Mikrometerspritze durchgeführt. Die so behandelten Larven wurden bei Zimmertemperatur auf einer Parafilmunterlage inkubiert. Tiere, die Hämolymphe verloren hatten, wurden nicht weiter verarbeitet. Um auch das möglicherweise über die exkretorischen Organe ausgeschiedene aktive Hormon zu erfassen, wurde der Parafilm sorgfältig mit demselben Extraktionsmedium gewaschen, das später für die Extraktion der behandelten Tiere verwandt wurde.

Extraktion und Bestimmung des Ecdysons

Das Hormon wurde nach der von KARLSON und SHAAYA² beschriebenen Methode extrahiert und im *Calliphora*-Test quantitativ bestimmt.

Ergebnisse

a) Die Verteilung des Ecdysons in Hämolymphe, Fettkörper und Integument

Die Hormonkonzentration in den untersuchten Geweben ist vom Entwicklungszustand abhängig (vgl. Abb. 1). 25–30 Stdn. vor der Pupariumbildung ist noch kein Ecdyson nachzuweisen; dies deckt sich mit früheren Befunden³ am Ganztier. Das Ecdyson erscheint in der Hämolymphe 15–20 Stdn. vor der Pupariumbildung (ca. 1 CE/g Tier). Der Spiegel steigt zum Zeitpunkt der Pupariumbildung bis auf 2 CE/g Tier. Dieser Befund erklärt sich wohl aus der Transportfunktion der Hämolymphe. Im Integument erscheint das Ecdyson erst später; 5 bis 8 Stdn. vor der Pupariumbildung lassen sich ca.

Abb. 1. Ecdysontiter im Integument, Hämolymphe und Fettkörper der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala*. ●—● Hämolymphe, ○—○ Integument, ○—○ Fettkörper.

0,25 CE/g Tier nachweisen. und im 5 Stdn. alten Puparium erreicht die Konzentration Werte von 1,9 CE/g Tier. Die Konzentration im Fettkörper folgt zunächst der Hämolymphe-Konzentration. Im Fettkörper bleibt der Hormonspiegel bis zum Beginn der Pupariumbildung mit 0,5–1,5 CE/g Tier relativ niedrig. 5 Stdn. nach der Pupariumbildung dagegen steigt der Ecdysongehalt rasch auf 3,3 CE/g Tier.

Die prozentuale Verteilung des insgesamt vorhandenen Hormons auf die verschiedenen Gewebe geht aus Tab. 1 hervor. Zum frühesten untersuchten Zeitpunkt ist das Ecdyson zu ²/₃ in der Hämolymphe, mit zunehmendem Alter verteilt es sich in stärkerem Maße auf die Organe. Das Integument — das als wichtigstes Erfolgsorgan angesehen wird — nimmt etwa 20% des Ecdysons auf. Das entspricht einer deutlichen Anreicherung, da das Integument weniger als 10% vom Gesamtgewicht des Tieres ausmacht. — Im Fettkörper findet man ebenfalls eine gewisse Anreicherung, besonders bei den späteren Stadien: 5 Stdn. nach der Pupariumbildung enthält der Fettkörper 48% des insgesamt vorhandenen Hormons!

Die schnelle Akkumulation des Ecdysons im Fettkörper kurz vor Abfall des Gesamthormontiters³ läßt vermuten, daß dieses Gewebe eine wichtige Rolle beim Inaktivierungsprozeß des Ecdysons spielt. Es wurde deshalb versucht, eine solche Inaktivierung direkt nachzuweisen.

** Bei dem hier verwandten *Calliphora*-Stamm (Charlottes-ville) liegt die *Calliphora*-Einheit etwas höher (0,015 µg) als bei KARLSON u. BODE¹ (1 CE = 0,01 µg Ecdyson, zitiert nach P. KARLSON, Naturwissenschaften 53, 445 [1966]).

² P. KARLSON u. E. SHAAYA, J. Insect. Physiol. 10, 797 [1964].

³ E. SHAAYA u. P. KARLSON, J. Insect. Physiol. 11, 65 [1965].

b) Die Inaktivierungs-Geschwindigkeit des Ecdysons im isolierten *Calliphora*-Abdomen

Um Störungen durch die endogene Hormonproduktion auszuschalten, wurden diese Versuche am abgeschnürten *Calliphora*-Abdomen ausgeführt. Von der injizierten Dosis ($0,03 \mu\text{g}$ Ecdyson) waren nach 2,5 Std. 41–56%, nach 7,5 Std. 74–100% inaktiviert.

In Abb. 2 ist der Abfall der Ecdyson-Aktivität (% der injizierten Dosis) in halblogarithmischem Maßstab aufgetragen. Man erkennt daraus, daß der Abfall der Aktivität exponentiell erfolgt. Die durchschnittliche Halbwertszeit für die Inaktivierung injizierten Ecdysons in isolierten Abdomen ergibt sich aus diesen Versuchen zu etwa 3 Stunden.

Abb. 2. Die Inaktivierung von Ecdyson in isolierten *Calliphora*-Abdomen, ausgedrückt in % des zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion wiedergefundenen Hormons (halblogarithmische Darstellung). Jeder Wert ist ein Mittelwert aus drei Bestimmungen. 1. ○ ····· Tiere 54–42 Std. vor der Pupariumbildung. 2. × —× Tiere 20–15 Std. vor der Pupariumbildung. 3. ······ Tiere 1–5 Std. vor der Pupariumbildung.

KARLSON und BODE¹ hatten in ähnlichen Versuchen gefunden, daß die Halbwertszeit bei intakten Larven etwa 1 Stde. beträgt. Bei geschnürten Tieren ergab sich eine wesentlich langsamere Inaktivierung. Der Unterschied ist wahrscheinlich methodisch bedingt: KARLSON und BODE hatten die Tiere nach der Schnürung 24 bis 48 Std. beobachtet, wie dies beim *Calliphora*-Test geschieht, um Spontan-Verpuppung auszuschließen. Damit dürften jedoch erhebliche physiologische Schäden verbunden sein, von denen offenbar auch das Enzymsystem der Ecdyson-Inaktivierung betroffen ist. In den hier beschriebenen Versuchen kamen die Tiere gleich nach der Schnürung zur Injektion. Die gefundene Halbwertszeit kommt der im intakten Tier schon recht nahe.

Bei jüngeren Tieren (54–42 Std. vor der Pupariumbildung geschnürt) findet man einen etwas

schnelleren Abbau (gestrichelte Linie und nicht ausgefüllte Kreise). Der Unterschied ist zwar wegen der geringen Zahl der Experimente nicht statistisch gesichert. Es darf jedoch angenommen werden, daß er reell ist und mit der zu dieser Zeit höheren Aktivität des Inaktivierungssystems zusammenhängt.

Diskussion

Die in Abb. 1 dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, daß die Ecdyson-Konzentration in der Hämolymphe bis zur Pupariumbildung (Stadium der weißen Vorpuppe) langsam und stetig ansteigt und danach etwas abfällt. Vermutlich hat die Ringdrüse zu diesem Zeitpunkt ihre Produktion vermindert oder ganz eingestellt. Im Integument (Epidermis + Cuticula) findet man bei 15–20 Std. vor der Pupariumbildung stehenden Tieren noch kein Ecdyson, obwohl der Hämolympf Spiegel schon eine erhebliche Höhe erreicht hat. Ab etwa 8 Std. vor der Pupariumbildung steigt die Konzentration in der Epidermis erst langsam, dann immer schneller an. Zu dieser Zeit dürften die ersten Induktionen für die Pupariumbildung erfolgen. BECKER und PLAGGE⁴ hatten bei ihren Zuchten die kritische Periode der Schnürung mit 14 Std. vor der Verpuppung ermittelt; dies deckt sich gut mit dem hier dargestellten Befund vom Auftreten des Ecdysons in der Hämolymphe ca. 15 Std. vor der Pupariumbildung.

Am interessantesten ist der Verlauf der Ecdysonkonzentration im Fettkörper. Er geht zunächst weitgehend mit der Hämolympfkonzentration parallel. Zum Teil kann das methodische Gründe haben; es ist nicht leicht, den Fettkörper von Resten der Hämolymphe freizuwaschen. Sicher ist es auch ein Ausdruck der Tatsache, daß Hämolympfflüssigkeit und Fettkörper in intensivem Stoffaustausch stehen und keine erhebliche Permeabilitätsschranke zwischen ihnen existiert. Allerdings weichen nach der Pupariumbildung die Konzentrationen voneinander ab; der Fettkörper speichert Ecdyson, während die Hämolympfkonzentration fällt. Dies kommt besonders deutlich in der Darstellung der Tab. 1 zum Ausdruck, in der die prozentuale Verteilung des insgesamt vorhandenen Ecdysons auf die drei untersuchten Organe dargestellt ist.

⁴ E. BECKER u. E. PLAGGE, Biol. Zbl. 59, 326 [1939].

Alter der Tiere	% der gesamten Hormonmenge		
	Hämo- lymphe	Fett- körper	Integu- ment
15–20 Stdn. vor der Pupariumbildung	68,8	31,2	0
5–8 Stdn. vor der Pupariumbildung	50,0	28,7	21,3
2–5 Stdn. vor der Pupariumbildung	56,2	30,0	13,8
0 Stdn. (weiße Vorpuppe)	46,2	36,3	17,5
5 Std. nach der Pupariumbildung	24,5	48,0	27,5

Tab. 1. Die prozentuale Verteilung des Ecdysons in Integument, Hämolymphe und Fettkörper vor und nach der Pupariumbildung. Jeder Wert ist ein Mittelwert aus drei Bestimmungen.

Eine ähnliche Anreicherung des Ecdysons im Fettkörper haben schon KARLSON et al.⁵ beobachtet. In diesen Versuchen war radioaktiv markiertes Ecdyson verwendet worden. Die Autoren haben die Möglichkeit diskutiert, daß die Radioaktivität im Fettkörper z. T. auf Inaktivierungsprodukte des Ecdysons zurückgeführt sei. Für die hier ermittelte Verteilung gilt dies sicher nicht, da die gesamte biologische Aktivität gemessen wurde. Andererseits ist diese Interpretation z. T. richtig: KARLSON et al.⁵ fanden 4 Stdn. nach Injektion im Fettkörper etwa doppelt soviel, 7 Stdn. danach dreimal soviel Radioaktivität wie in der Epidermis. Aus den oben beschriebenen Untersuchungen ergibt sich an vergleichbaren Tieren (5–8 Stdn. vor der Pupariumbildung) für die Ver-

teilung der biologischen Aktivität zwischen Fettkörper und Epidermis ein Verhältnis von etwa 3:2.

Die Vermutung von KARLSON et al.⁵ und SHAAYA⁶, daß der Fettkörper das wichtigste Organ für die Ecdyson-Inaktivierung ist, wurde inzwischen auch von KARLSON und BODE¹ bestätigt.

In eigenen Versuchen wurde die Inaktivierungsrate an geschnürten *Calliphora*-Larven untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß für den Inaktivierungsprozeß im Fettkörper die Beteiligung des neuroendokrinen Systems nicht erforderlich ist. Sowohl in jungen Abdomen mit geringem endogenen Hormontiter als auch in älteren Tieren mit sehr hohem endogenen Ecdysongehalt³ tritt ein rascher, exponentieller Abfall der biologischen Aktivität ein; die Halbwertszeit beträgt etwa 3 Stunden.

Der Fettkörper dient jedoch nicht nur der Inaktivierung, er ist offenbar auch Erfolgsorgan des Ecdysons. Ecdyson stimuliert die Proteinbiosynthese im Fettkörper⁷, es wirkt auch auf die isolierten Zellkerne des Fettkörpers ein⁸. Möglicherweise hängt mit den hier stimulierten Vorgängen die Anreicherung des Ecdysons im Fettkörper *nach* der Pupariumbildung zusammen.

Prof. P. KARLSON danke ich für die Diskussion der Ergebnisse und seine Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts, Prof. D. BODENSTEIN für die Unterstützung dieser Arbeit, Dr. G. WEIRICH für Beratung, Frau N. DILLARD für zuverlässige technische Assistenz. Diese Arbeit wurde von der U.S. National Science Foundation (grant GB-4847 X) finanziell unterstützt.

⁵ P. KARLSON, C. SEKERIS u. R. MAURER, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **336**, 100 [1964].

⁶ E. SHAAYA, Amer. Zool. **7**, 756 [1967].

⁷ R. ARKING u. E. SHAAYA, J. Insect. Physiol. **15**, 287 [1969].

⁸ C. SEKERIS, F. CONGOTE u. P. KARLSON, Exptl. Cell Res., im Druck.