

Experimentelle Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der beiden entwicklungsphysiologisch aktiven Fraktionen des «Gehirnhormons» der Insekten (Aktivationsfaktor I und II) auf die Prothoracaldrüse

Entwicklungsphysiologische Untersuchungen haben gelehrt, dass das sogenannte «Gehirnhormon» der Insekten die Häutungsdrüse (Prothoracaldrüse) stimuliert. Dabei ist neuerdings die Frage mehr offen als früher angenommen wurde, ob das Häutungshormon dort allein produziert und ausgeschüttet wird^{1,2}. Dennoch bleibt die Stimulierung der Prothoracaldrüse auch auf zellulärer Ebene unbestritten. Das ergaben histophysiologisch-cytophotometrische und autoradiographische Befunde mittels ³H-5-Uridin-Inkorporation bei experimentell aktivierten Prothoracaldrüsen³⁻⁵. Die Drüsen wurden meistens durch Gehirn-Implantate bzw. Injektionen von Gehirn-Corpora-cardiaca-Homogenaten stimuliert. Da das Gehirn aber mehrere Neurohormone produziert^{6,7}, blieb offen, auf welchen der bisher bekannten Faktoren die Aktivierung der Prothoracaldrüse zurückzuführen ist. Daher wurde die Wirkung der beiden mittels Gelfiltration

an Sephadex G-100 getrennten und entwicklungsphysiologisch aktiven Faktoren (Aktivationsfaktor I und II⁸) zunächst hinsichtlich ihrer Wirkung auf die RNS-Synthese der Prothoracaldrüse untersucht.

Material und Technik. Als Material wurden die Prothoracaldrüsen von Larven des letzten Stadiums der Schabe *Periplaneta americana* und letztes Raupenstadium der Saat- bzw. Kohleule *Mamestra brassicae* und *Agrotis segetum* verwendet. Für die in-vivo-Versuche erhielten die Larven 18 h vor der Aufarbeitung eine Injektion von 10 μ C ³H-5-Uridin. Die in-vitro-Kultur der Prothoracaldrüsen erfolgte nach GERSCH⁹ (noch unveröffentlicht) in einer Flüssigkeit, die 0,1 ml Zellzüchtungsmedium nach PARKER, 0,0125 ml hitzeinaktivierte Hämolymphe von adulten Schaben, 0,025 ml Riordan-Ringer mit jeweiligem Stimulationsfaktor und schliesslich 20 μ C ³H-5-Uridin enthielt. Die Drüsen, meistens in

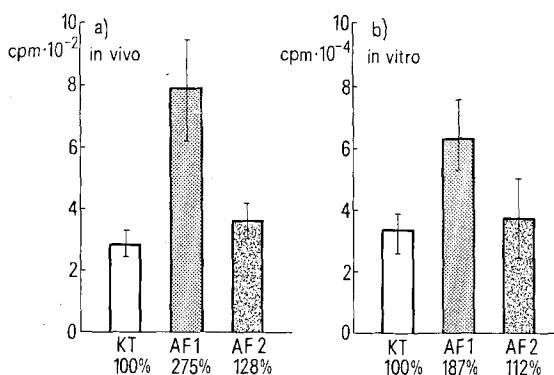


Fig. 1. Einfluss aufgetrennter Aktivationsfaktoren auf die ³H-5-Uridin-Inkorporation in die RNS der Prothoracaldrüsen 5 Tage alter Larven von *Periplaneta americana*. Inkubationszeit: 18 h. a) in vivo, b) in vitro. KT, Kontrollen; AF 1, Aktivationsfaktor I; AF 2, Aktivationsfaktor II.

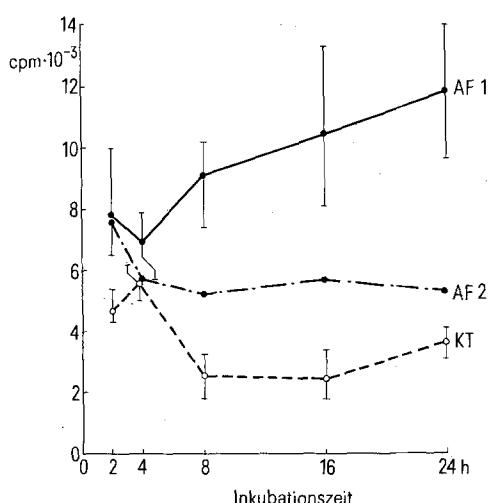


Fig. 2. Zeitlicher Verlauf der in-vitro-Inkorporation von ³H-5-Uridin in die RNS der Prothoracaldrüsen 5 Tage alter Larven von *Periplaneta americana* unter Einfluss aufgetrennter Aktivationsfaktoren. Markierungszeit: 120 min. KT, Kontrollen; AF 1, Aktivationsfaktor I; AF 2, Aktivationsfaktor II.

Inkorporationsrate von ³H-5-Uridin in die rechte und linke Prothoracaldrüse in vitro

1. *Mamestra brassicae* 5. Larvenstadium

Nr. des Experiments	Linke Drüse (Imp/min)	Rechte Drüse (Imp/min)
1	1738	1468
2	610	582
3	684	318
4	1223	928

2. *Agrotis segetum* 5. Larvenstadium

Nr. des Experiments	Linke Drüse (Imp/min)	Rechte Drüse (Imp/min)
1	509	1824
2	2159	1820
3	1252	1857
4	2068	1987
5	953	1256
6	1727	983
7	2462	2079
8	2711	3326

- 1 M. GERSCH und J. STÜRZEBECHER, Experientia 27, 1475 (1971).
- 2 K. NAKANISHI, H. MORIYAMA, T. OKAUCHI, S. FUJIOKA und M. KOREEDA, Science 176, 51 (1972).
- 3 H. OBERLANDER, S. J. BERRY, A. KRISHNAKUMARAN und H. A. SCHNEIDERMAN, J. exp. Zool. 159, 15 (1965).
- 4 S. J. BERRY, A. KRISHNAKUMARAN, H. OBERLANDER und H. A. SCHNEIDERMAN, J. Insect Physiol. 13, 1511 (1967).
- 5 M. GERSCH und J. STÜRZEBECHER, J. Insect Physiol. 16, 1813 (1970).
- 6 M. GERSCH, Sitzungsber. Sächs. Akad. Wissensch. Math.-nat. Kl. 108, Heft 2, 1-33, (1968).
- 7 M. GERSCH, Vergleichende Endokrinologie der wirbellosen Tiere (Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig Kom.-Ges., Leipzig 1964).
- 8 M. GERSCH und J. STÜRZEBECHER, J. Insect Physiol. 14, 87 (1968).
- 9 M. GERSCH, Zool. Jb., Physiol., in press.

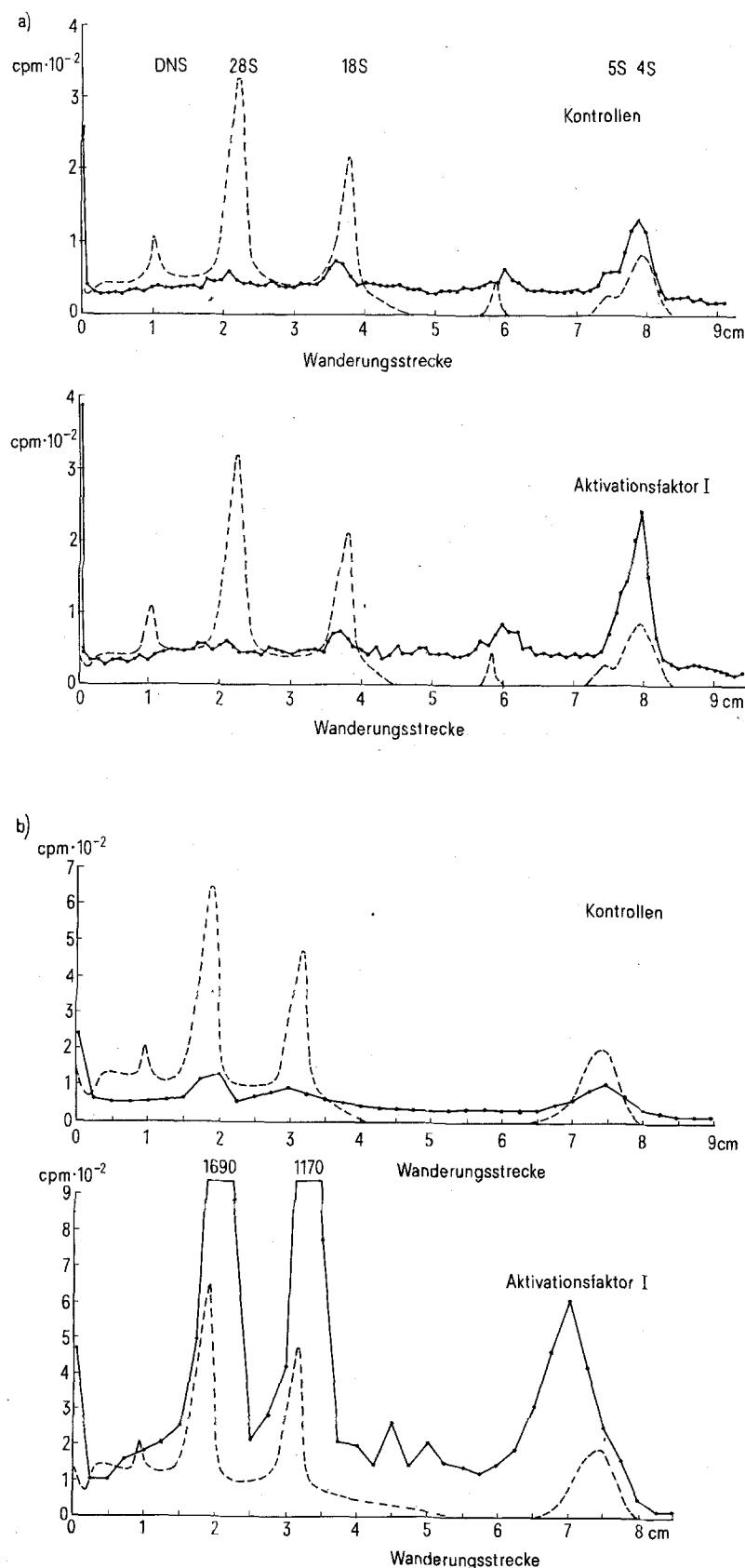


Fig. 3. Polyacrylamid-Gelektrophorese der RNS der Prothoracaldrüsen 5 Tage alter Larven von *Periplaneta americana*, in vitro mit Ringer (Kontrollen) oder mit Aktivationsfaktor I und mit ^3H -5-Uridin inkubiert. a) 2 \times 20 Drüsen, Inkubationszeit 4 h, Markierungszeit 60 min., 2.4/7.2%iges Gel (6/3 cm). b) 20 Drüsen, Inkubationszeit 16 h, Markierungszeit 120 min., 2.4%iges Gel (9 cm). —, Extinktion (560 nm); ●—●, Radioaktivität.

Gruppen zu 10, wurden 16 h in einem abgedeckten und abgedichteten Hohlschliffobjekträger bei 25°C in einem Klimaschrank inkubiert. Die Messung der Radioaktivität in den RNS-Proben wurde im Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard Tri-Carb, Model 3375) vorgenommen. Die Auftrennung der Aktivationsfaktoren aus Homogenaten des Gehirns bzw. der Corpora cardiaca geschah nach den Angaben von GERSCH und STÜRZEBECHER⁹. Die Trennung der RNS mittels Polyacrylamid-Gelektrophorese erfolgte nach BISHOP et al.¹⁰. Die Membranpotentiale wurden an Zellen der Prothoracaldrüse der Wachsmotte *Galleria mellonella* gemessen. Hierzu dienten 3 m KCl-Glaselektroden. Als Messinstrument stand ein Millivoltmeter MV 11 (Clamann und Grahnert) zur Verfügung.

Ergebnisse und Diskussion. Bei In-vivo-Untersuchungen führte die Stimulation durch Aktivationsfaktor I zu einer signifikanten Erhöhung der RNS-Syntheserate der Prothoracaldrüsenzellen von *Periplaneta americana* (Figur 1a). Stimulierung der Prothoracaldrüsen unter in-vitro-Bedingungen erbrachte gleiche Ergebnisse (Figur 1b). Die Steigerung betrug hier zwischen 150 und 235%. Sie war konzentrationsabhängig und variierte etwas. Wahrscheinlich werden durch Aktivationsfaktor I mehrere, zeitlich voneinander getrennte Prozesse beeinflusst. Das zeigen die Ergebnisse von Kurz- und Langzeit-Inkubationen (Figur 2). Zumindest kann zwischen einem frühen Effekt (0–4 h) und einer Langzeitwirkung unterschieden werden.

Weitere Untersuchungen des RNS-Musters der Prothoracaldrüse von *Periplaneta americana* mittels elektrophoretischer Auftrennung in Polyacrylamidgelen ergaben, dass nach Stimulierung durch den Aktivationsfaktor I die Synthese aller RNS-Arten stark erhöht ist. Sehr

frühzeitig tritt dabei eine Stimulierung der sRNS-Synthese auf, während nach längeren Einwirkungszeiten bevorzugt ribosomale RNS-Arten synthetisiert zu werden scheinen. Außerdem sind in den aktivierten Drüsen meist kleinere Aktivitäts-Peaks zwischen 5S und 18S zu beobachten, die zwar nicht weiter charakterisiert werden konnten, unter denen sich aber dem Markierungsverhalten und den Sedimentationswerten zufolge noch niedrigmolekulare messenger-RNS-Arten befinden könnten¹¹ (Figur 3).

Die nichtstimulierten Prothoracaldrüsen von Larven gleichen Stadiums und Alters können bereits starke Schwankungen in der RNS-Syntheserate aufweisen. Am eindeutigsten trat dies in den Prothoracaldrüsen von *Mamestra brassicae* und *Agrotis segetum* in Erscheinung. Es liess sich hier auf Grund der günstigen anatomischen Verhältnisse zeigen, dass die in-vitro-Inkorporationsrate von ³H-5-Uridin und somit wohl auch die Aktivität getrennt von linker und rechter Drüse eines Individuums unterschiedlich gross sein kann⁹ (Tabelle).

Aktivationsfaktor II scheint keinen spezifischen Einfluss auf die RNS-Synthese zu nehmen. Vielmehr ist anzunehmen, dass dieser Faktor in einer noch nicht im einzelnen geklärten Weise die Permeabilität der Zellmembran beeinflusst. Messungen des Membranpotentials einzelner Zellen der Prothoracaldrüse von *Galleria mellonella* ergaben eine klare Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit des Membranpotentials durch Aktivationsfaktor II¹² (Figur 4). Aktivationsfaktor I verändert dagegen das Potential nicht. Die beiden entwicklungsphysiologisch aktiven Fraktionen des sogenannten «Gehirnhormons» der Insekten, Aktivationsfaktor I und II, besitzen offenbar unterschiedliche zelluläre Wirkungsmechanismen. Aktivationsfaktor I bewirkt eine Steuerung der RNS-Synthese. Aktivationsfaktor II scheint über Permeabilitätsbeeinflussung zu wirken.

Summary. 2 prothoracotropical factors (activation factor I and II) have been obtained by gel filtration techniques from brains and corpora cardiaca of the cockroach *Periplaneta americana*. In contrast to activation factor II, activation factor I caused significant influence of RNA synthesis. The RNA pattern of prothoracic glands stimulated by activation factor I as demonstrated by polyacrylamide gel electrophoresis consists of different kinds of RNA. Short time incubation revealed effects on sRNA synthesis, while long time incubation demonstrated predominantly increase of ribosomal RNA synthesis. Measurements of the membrane potential of the prothoracic gland cells of the wax moth *Galleria mellonella* indicated an increase by activation factor II; activation factor I was without any visible effect. Our results demonstrate for the first time that the two activation factors induce different effects at cellular level.

M. GERSCH, R. BRÄUER und H. BIRKENBEIL^{13, 14}

Sektion Biologie, Bereich Tierphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität, Erbertstrasse 1, DDR-69 Jena,
11 August 1972.

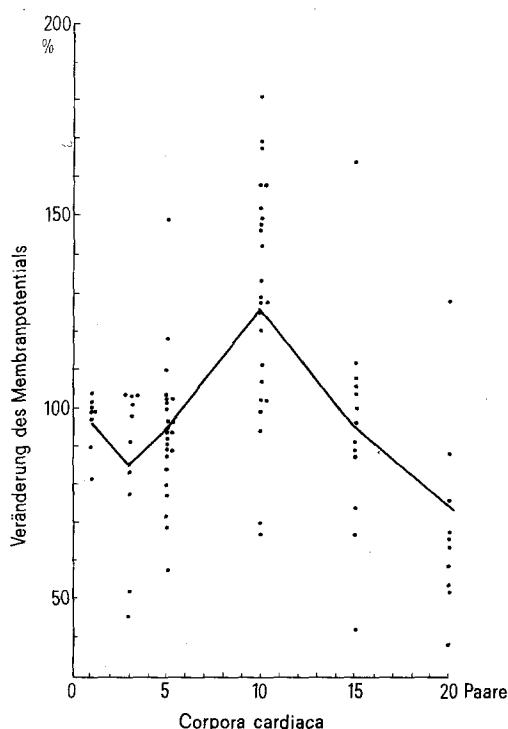


Fig. 4. Zusammengefasste Darstellung der Messergebnisse des Membranpotentials der Prothoracaldrüsenzellen von *Galleria mellonella* nach 30 min Einwirkung des Aktivationsfaktors II. Die Konzentration von Aktivationsfaktor II entspricht der Anzahl von Corpora cardiaca angegeben. Aus den Ergebnissen aller Messungen ergibt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung. (Kontrollmessungen vor Zugabe von AF II = 100%).

¹⁰ D. H. L. BISHOP, J. R. CLAYBROOK und S. SPIEGELMAN, J. molec. Biol. 26, 373 (1967).

¹¹ R. BRÄUER, Zool. Jb., Physiol. 77, in press.

¹² M. GERSCH und H. BIRKENBEIL, Zool. Jb., Physiol. 77, 1 (1973).

¹³ Für technische Unterstützung danken wir Fräulein A. ZINSSER und Frau R. MEISSNER.

¹⁴ Durchgeführt mit Mitteln des Ministeriums für Wissenschaft und Technik und mit Unterstützung durch die Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig.