

# Copyright ©

---

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Aus dem Institut für Meereskunde an der Universität Kiel

## Eine bakterielle Inaktivierung des Steroidhormons Ecdysteron

VON DIETER ADELUNG, MARGARETHE SPINDLER-BARTH UND KLAUS-DIETER SPINDLER

**Zusammenfassung:** Aus einer wäßrigen Lösung des Crustaceenhäutungshormons Ecdysteron wurden Bakterien in Reinkultur isoliert, die das Hormon abzubauen vermögen. Die mögliche Bedeutung der bakteriellen Inaktivierung des Ecdysterons wird diskutiert.

**The microbial inactivation of the steroid hormone ecdysterone (summary):** A bacterium which is able to degrade the crustacean molting hormone ecdysterone was isolated from an aqueous solution of the hormone. The possible significance of this inactivation by bacteria is discussed.

### Einleitung

Ecdysteron ist das wichtigste Häutungshormon der meisten Arthropoden. Es löst nicht nur die Häutungen aus, sondern greift mehrfach steuernd in den Häutungsprozeß ein. Dementsprechend ist der Hormontiter während des Häutungsprozesses bei Krebsen und Insekten nicht konstant, sondern steigt und fällt mehrere Male. Ein solcher Wechsel ist nur möglich, wenn das Hormon schnell ausgeschüttet und ebenso schnell wieder inaktiviert wird.

Wie sich gezeigt hat, erfolgt die Inaktivierung des Hormons sowohl katabolisch als auch durch einfache Ausscheidung des aktiven Hormons. Dies erfordert aber zumindest in begrenzten Biotopen, daß das aktive Hormon, das bei decapoden Krebsen auch als Pheromon dienen kann (KITTRIDGE und TAKAHASHI, 1972) nach einiger Zeit im Wasser inaktiviert wird.

Da das Ecdysteron ein relativ stabiles Molekül ist, zerfällt es normalerweise im Außenmedium nicht von allein, sondern muß abgebaut werden. Für einen solchen Abbau kommen beispielsweise Bakterien in Frage.

Daß grundsätzlich Bakterien in der Lage sind Steroide anzugreifen, ist schon längere Zeit bekannt (vgl. MARSHEK, 1971). Bei den bisher untersuchten Fällen bakterieller Transformation von Steroiden handelt es sich um Oxidations- und Reduktionsprozesse an verschiedenen Steroidkörpern mit keiner oder nur kleiner Seitenkette. Eine bakterielle Inaktivierung des Steroids Ecdysteron, das eine lange Seitenkette besitzt, ist unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben.

### Material und Methoden

#### A. Isolierung und Anzuchtbedingungen für das Bakterium

Das Bakterium wurde auf einem Hefe-Extrakt-Nährboden (7 g Hefeextrakt, 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 10 mg  $\text{FeCl}_3$ , 20 g Agar pro Liter A. dest.) bei 27° C angezüchtet und anschließend bei 4° C aufbewahrt. Zur Anzucht in Flüssigkultur wurde das gleiche Nährmedium ohne Agar verwendet und bei 27° C auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 120 U/min (entspricht einem Sauerstoffübergang von 62 mM  $\text{O}_2/\text{l} \cdot \text{h}$ ) inkubiert.

#### B. Abbauprobversuche

Für die Abbauprobversuche wurden die Bakterien der Flüssigkultur nach ca. 11 Stunden abzentrifugiert und mit Saline gewaschen. Die Bakterien wurden in einer Ecdysteron-

lösung der Konzentration 250 ng/ml aufgenommen und unter den gleichen Bedingungen wie bei A inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation zentrifugierten wir die Bakterien ab und untersuchten den Überstand im Musca-Test (ADELUNG und KARLSON, 1969) auf seine Hormonaktivität hin.

### Ergebnisse

Bei Arbeiten mit dem Häutungshormon Ecdysteron zeigten einige verschieden konzentrierte Lösungen von Ecdysteron in demineralisiertem Wasser nach ca. 1 Monat Aufbewahrung bei 5 bis 10° C unter nicht sterilen Bedingungen keine, oder nur noch sehr geringe Häutungshormonaktivität. Da die vorher klare Lösung trüb geworden war, konnten Bakterien bei der Inaktivierung eine Rolle gespielt haben, was folgender Vorversuch zeigte: 30 verpuppungsbereiten Fliegenmaden der Art *Musca domestica*, die wie Kontrollversuche zeigen, mindestens 1 ng Ecdysteron pro Tier enthalten, wurden 10 ng Ecdysteron pro Tier (in 3 µl gelöst) injiziert. Nach 6 Stunden Inkubationsdauer wurde aus den Fliegenmaden Ecdysteron extrahiert und im biologischen Test (ADELUNG und KARLSON, 1969) quantitativ bestimmt. Der Extrakt wies jedoch keinerlei Hormonaktivität auf. Eine Kontrolleextraktion mit unbehandelten Fliegenmaden des gleichen physiologischen Stadiums wies dagegen die volle erwartete Häutungshormonaktivität auf.

Aus der inaktiven Lösung konnten 4 Bakterienstämme isoliert werden, von denen einer Ecdysteron inaktiviert. Der wirksame Stamm baute Ecdysteron bei 27° C und in einer Konzentration von 10<sup>8</sup> Bakterien/ml in einer Stunde ab (s. Tabelle 1).

Tabelle 1  
Zeitlicher Verlauf der Ecdysteroninaktivierung

Inkubationszeit (in min)	Verpuppungsrate im Musca-Test (in %)
0 (Kontrollen)	70—85
15	79
30	71
60	0
120	0
180	0

Bietet man den Bakterien unter ansonsten gleichen Bedingungen gleichzeitig Ecdysteron und Nährlösung an, enthält die Lösung nach 180 min noch die volle biologische Aktivität. Ecdysteron wird von den Bakterien also nur in Ermangelung anderer Kohlenstoffquellen als Nahrung gebraucht.

Erste Versuche zur Charakterisierung des wirksamen Stammes haben ergeben, daß es sich um ein gram-negatives stäbchenförmiges Bakterium handelt, das eine Kapsel besitzt und keine Sporen bildet.

Um zu prüfen, ob die Bakterien als Parasiten bei Insekten die hormonale Häutungsregulation stören, wurden 30, bzw. 26 verpuppungsreifen Fliegenmaden entweder 2 µl demineralisiertes Wasser oder 2 µl einer konzentrierten wäßrigen Suspension von Bakterien (aus Agarkultur) oder 2 µl einer gleich konzentrierten Suspension abgetöteter Bakterien injiziert und 24 Stunden danach der Verpuppungsgrad der Maden bestimmt. In Tabelle 2 ist das Ergebnis zusammengefaßt.

Tabelle 2

Injektion pro Tier	tote Testtiere	verpuppte Maden	unverpuppte Maden	Versuchstiere total	Verpuppung in % der gesamten Tiere
2 $\mu$ l demin. H <sub>2</sub> O . . . . .	2	10	18	30	33,3
2 $\mu$ l konz. leb. Bakt.-suspens.	1	10	19	30	33,3
2 $\mu$ l konz. Suspension toter Bakt. . . . .	3	4	20	27	14,8

In den drei Versuchsgruppen treten keine signifikanten Unterschiede auf. Die geringere Verpuppungsrate bei Injektion abgetöteter Bakterien ist wahrscheinlich auf ein Freiwerden toxischer Substanzen beim Zerfall der Bakterien zurückzuführen. Bakterien aus Flüssigkulturen erwiesen sich als hochtoxisch für die Fliegenmaden. Dieser Versuch zeigt, daß die Bakterien keine Rolle als Parasiten bei den Fliegenmaden spielen können.

Eine andere biologische Bedeutung der Bakterien könnte darin bestehen, daß sie in dem Außenmedium vorkommen, in dem sich die Insekten aufhalten und das von ihnen ausgeschiedene Häutungshormon inaktivieren. Orientierende Vorversuche hierzu verliefen aber negativ. Dies kann den Grund darin haben, daß in dem von uns getesteten Außenmedium keine wirksamen Bakterien vorhanden waren, oder aber, daß die Bakterien, wie der zweite Versuch gezeigt hatte, anderes vorhandenes organisches Material dem Hormon als Kohlenstoffquelle vorgezogen haben.

#### Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, ist eine bakterielle Inaktivierung des Häutungshormons Ecdysteron möglich. Im vorliegenden Fall erfolgt die Inaktivierung durch ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium, das bisher noch nicht näher identifiziert wurde. Dieses Bakterium greift das Ecdysteron nur dann an, wenn keine andere Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Daher ist es unwahrscheinlich, daß diese Bakterien eine ökologische Bedeutung beim Abbau des aktiven, von Arthropoden ausgeschiedenen Häutungshormons haben. Sie spielen auch keine Rolle als Endoparasiten z. B. von Insektenlarven, um deren körpereigenes Häutungshormon abzubauen.

Aus vergleichend-biochemischer Sicht könnten die bakterielle Inaktivierung des Ecdysterons und die dabei entstehenden Zwischenprodukte von Interesse sein. U. U. lassen sich von diesem einfacher zu handhabenden System Rückschlüsse auf den Abbau-mechanismus des Häutungshormons der Arthropoden ziehen. Zwar liegen bereits erste Befunde über den enzymatischen Inaktivierungsprozeß des Häutungshormons bei Insekten vor (KARLSON und BODE, 1969; KARLSON et al., 1972; HEINRICH und HOFFMEISTER, 1970), jedoch ist der Weg bis zur vollständigen Klärung noch weit. Darüberhinaus ist es denkbar, daß bei anderen Arthropodengruppen etwas andere Wege beim Abbau beschritten werden. Daher dürfte eine weitere Untersuchung und nähere Identifizierung der Bakterien interessant sein.

### Literatur

- ADELUNG D. und KARLSON, P. (1969): Eine verbesserte, sehr empfindliche Methode zur biologischen Auswertung des Insektenhormones Ecdyson. *J. Insect Physiol.* 15, 1301—1307.
- HEINRICH, G. und HOFFMEISTER, H. (1970): Bildung von Hormonglykosiden als Inaktivierungsmechanismus bei *Calliphora erythrocephala*. *Z. Naturforsch.* 25 b, 358—361.
- KARLSON, P. und BODE, C. (1969): Die Inaktivierung des Ecdysons bei der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* MEIGEN. *J. Insect Physiol.* 15, 111—118.
- KARLSON, P., BUGANY, H., DÖPP, H. und HOYER, G.-A. (1972): 3-Dehydroecdyson, ein Stoffwechselprodukt des Ecdysons bei der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* MEIGEN. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 353, 1610—1614.
- KITTREDGE, J. S. und TAKAHASHI, F. T. (1972): The evolution of sex pheromone communication in the Arthropoda. *J. theor. Biol.* 35, 467—471.
- MARSHEK, J. (1971): Current trends in the microbiological transformation of steroids. 51—103, in: *Progress in Industrial Microbiology*, Band 10 (Herausgeber D. J. D. HOCKENHULL), London 1971.