

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Andrej Hasilik
Abteilung für biochemische Endokrinologie
Leiter: Prof. Dr. Jan Koolman
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg,
Standort Marburg

**Identifizierung und Analyse von Ecdysteroid
synthetisierenden Zellen mithilfe eines hämolytischen Plaque-
Assays**

Inaugural Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
H a u k e D u c k w i t z
aus Hamburg

Marburg
2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg am 8.12.2005

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. J. Koolman
Korreferent: Prof. Dr. K. Voigt

Inhaltverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Abkürzungen | 6 |
| 2. Zusammenfassung | 7 |
| 3. Einleitung | 8 |
| 3.1 Ecdysteroide _____ | 8 |
| 3.1.1. Bildungsorte in Insekten..... | 10 |
| 3.1.2. Biologische Aktivität in Insekten | 11 |
| 3.2. Die Ringdrüse _____ | 13 |
| 3.3. Regulation der Ecdysteroidsekretion <i>in vivo</i> _____ | 14 |
| 3.4. Der reverse hämolytische Plaque-Assay _____ | 15 |
| 3.5 Das Komplementsystem _____ | 15 |
| 3.6. Ziel der Dissertation _____ | 19 |
| 4.1. Larvenzucht _____ | 20 |
| 4.2. Chemikalien _____ | 20 |
| 4.3. Antiseren _____ | 22 |
| 4.4. Lösungen _____ | 23 |
| 4.5. Geräte _____ | 24 |
| 4.6. Präparation der Ringdrüsen _____ | 24 |
| 4.7. Vereinzelung der Zellen _____ | 25 |
| 4.7.1. Gewebeauflösung mit Trypsin | 25 |
| 4.7.2. Gewebeauflösung mit Kollagenase | 25 |
| 4.8. Der reverse hämolytische Plaque-Assay (RHPA) _____ | 26 |
| 4.8.1. Coating der Erythrozyten..... | 26 |
| 4.8.2. Bau der Cunningham-Kammern..... | 26 |
| 4.8.3. Durchführung des hämolytischen Plaque-Assays..... | 26 |
| 4.8.4. Fixierung und Färbung | 27 |
| 4.9. Hämolytischer Plaque-Assay mit verschiedenen Antikörpern _____ | 27 |
| 4.10. Hämolytischer Plaque-Assay mit ganzen Ringdrüsen _____ | 27 |
| 4.11. Sequentieller hämolytischer Plaque-Assay mit ganzen Ringdrüsen _____ | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 4.12. Hämolytischer Plaque-Assay mit Pflanzensamen | 28 |
| 4.13. Wirkung von Forskolin auf die Sekretion der Ringdrüsenzellen | 28 |
| 4.14. Wirkung von Isobutylmethylxanthin (IBMX) auf die Sekretion der Ringdrüsenzellen | 29 |
| 4.15. Kontrollexperimente | 30 |
| 4.15.1. Verwendung von Medium 199 anstelle von Antiserum | 30 |
| 4.15.2. Verwendung von Medium 199 anstelle von Komplement | 30 |
| 4.15.3. Durchführung des hämolytischen Plaque-Assays mit ungecoateten Erythrozyten..... | 30 |
| 4.15.4. Verwendung von anderen Geweben / keinem Gewebe anstelle von Ringdrüsenzellen | 30 |
| 4.15.5. Durchführung des hämolytischen Plaque-Assays mit Zellen aus Ringdrüsen von Larven früherer Larvenstadien..... | 31 |
| 5. Ergebnisse..... | 32 |
| 5.1. Reverser hämolytischer Plaque-Assay mit verschiedenen Antikörpern | 32 |
| 5.2. Reverser hämolytischer Plaque-Assay mit Ringdrüsenzellen bei Zelltrennung mit Trypsin oder Kollagenase | 33 |
| 5.3. Reverser hämolytischer Plaque-Assay unter Verwendung des DBL-1-Antikörpers und Zellen der Ringdrüse von <i>Calliphora vicina</i>. | 33 |
| 5.4. Reverser hämolytischer Plaque-Assay mit ganzen Ringdrüsen | 35 |
| 5.5. Sequentieller reverser hämolytischer Plaque-Assay mit ganzen Ringdrüsen | 35 |
| 5.6. Reverser hämolytischer Plaque-Assay mit Pflanzensamen | 36 |
| 5.7. Wirkung von Forskolin auf die Sekretion der Ringdrüsenzellen | 36 |
| 5.8. Wirkung von Isobutylmethylxanthin (IBMX) auf die Sekretion der Ringdrüsenzellen | 36 |
| 5.9. Kontrollexperimente | 38 |
| 3.9.1. Verwendung von Medium 199 anstelle von Antiserum | 38 |
| 3.9.2. Verwendung von Medium 199 anstelle von Komplement | 38 |
| 3.9.3. Verwendung von anderen Geweben / keinem Gewebe anstelle von Ringdrüsenzellen | 39 |
| 3.9.4. Durchführung des reversen hämolytischen Plaque-Assays mit ungecoateten Erythrozyten | 39 |
| 3.9.5. Durchführung des reversen hämolytischen Plaque-Assays mit Zellen aus Ringdrüsen von Larven früherer Larvenstadien | 40 |
| 6. Diskussion..... | 41 |
| 6.1. Vorbemerkung | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2. Larvenzucht und Präparation | 41 |
| 6.3. Vereinzelung der Zellen | 42 |
| 6.4. Der reverse hämolytische Plaque-Assay | 42 |
| 6.5. Kontrolluntersuchungen | 44 |
| 6.6. Wirkung von Forskolin | 46 |
| 6.7. Photographische Dokumentation und Auswertung | 47 |
| 6.8. Praktikabilität | 47 |
| 6.9. Erkenntnisgewinn | 48 |
| 6.10. Ausblick | 48 |
| 7. Literaturverzeichnis | 51 |
| 8. Anhang | 61 |
| 8.1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 61 |
| 8.1.1 Abbildungen | 61 |
| 8.1.2 Tabellen | 61 |
| 8.2. Lebenslauf | 62 |
| 8.3. Akademische Lehrer | 63 |
| 8.4. Danksagung | 64 |
| 8.5. Ehrenwörtliche Erklärung | 65 |

1. Abkürzungen

| | |
|------------------|---|
| BSA | Bovine serum albumin (Rinderserum-Albumin) |
| <i>C. vicina</i> | <i>Calliphora vicina</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDNH | Egg development neurosecretory hormone |
| IBMX | Isobutylmethylxanthin |
| LIRP | <i>Locusta migratoria</i> -insuline-related-peptide |
| MIH | Molt-inhibiting hormone |
| PFC-Assay | Plaque-forming-cell-Assay |
| PTSH | prothorakostatisches Hormon |
| PTTH | prothorakotropes Hormon |
| RHPA | Reverser hämolytischer Plaque-Assay |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

2. Zusammenfassung

Ecdysteroide spielen eine entscheidende Rolle in der hormonellen Regulation der Entwicklung von Arthropoden. Sie werden von einer spezialisierten Hormondrüse, der so genannten Prothorakaldrüse, sezerniert. Neben diese Drüse ist aber auch eine Vielzahl anderer Gewebe wie z.B. Oozyten, Epidermis oder abdominelle Gewebe beschrieben, die

Ecdysteroide enthalten und ggf. auch sezernieren. Bisher wurde eine Ecdysteroide Sekretion eines Gewebes durch den Nachweis der Ecdysteroide in der Inkubationslösung mithilfe von Antikörpern gezeigt.

Wir beschreiben erstmals eine zytologische Methode zum Nachweis Ecdysteroide sezernierender Zellen. Der reverse hämolytische Plaque-Assay ist eine Methode zur Analyse der Hormonsekretion einzelner Zellen und wird in der Endokrinologie vor allem zur Darstellung der Sekretion von Peptidhormonen einzelner Zellen eingesetzt. Nur eine Publikation beschreibt den Einsatz der Methode zum Nachweis von Steroidhormon (Testosteron).

Im Rahmen der Arbeit wurde die Methode des reversen hämolytischen Plaque-Assays nach ausführlicher Auswertung der Literatur im Labor etabliert. Nach Präparation der Ringdrüse von Schmeißfliegen (*Calliphora vicina*) und Separation der Zellen wurden diese mit Protein-A beladenen Schafserythrozyten gemischt.

In einer Cunningham-Kammer erfolgte die Inkubation mit oder ohne spezifischen Ecdysteroide-Antikörpern. Wir konnten zeigen, dass der Nachweis der Ecdysteroide Sekretion einzelner Zellen durch Ausbildung eines Hämolysehofes möglich ist und fotografisch dokumentiert werden kann. Es ergeben sich eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten des reversen hämolytische Plaque-Assays zur Untersuchung der Lokalisation und Regulation der Ecdysteroide Sekretion in Insekten.

3. Einleitung

3.1 Ecdysteroide

Als Ecdysteroide werden polyhydroxylierte Steroide bezeichnet, die eine A/B-Ring-cis(5 β)-Verbindung, ein 7-en-6-on-Chromophor im B-Ring und eine 14 α -Hydroxy-Gruppe enthalten(LAFONT & HORN, 1989). Ihr Name leitet sich von dem Ecdyson (2 β ,3 β ,14 α ,22R,25-Pentahydroxy-5 β -cholest-7-en-6-on) ab, das 1954 von BUTENANDT & KARLSON aus Larven des Seidenspinners (*Bombyx mori*) isoliert wurde. Nach der Kristallisation und Strukturanalyse des Ecdysons (KARLSON et al., 1965; HUBER & HOPPE, 1965) wurden bis heute mehr als 250 Ecdysteroide (LAFONT & WILSON, 1996) aus Insekten isoliert. Die Entdeckung von Ecdysteroiden in Pflanzen (GALBRAITH & HORN, 1966; NAKANISHI et al., 1966) führte zur Einführung des Begriffs der Phytoecdysteroide. Ecdysteroide zeigen eine große chemische Vielfalt (Tab. 3.1.). Sie unterscheiden sich in der Anzahl der C-Atome, der Anzahl und der Stereochemie von Hydroxyl-Gruppen, im Vorkommen von Keto-Gruppen, in der Stereochemie am C-5 und in der Konjugation von Alkoholgruppen mit polaren und unpolaren Substituenten (LAFONT, 1997).

| Chemische Vielfalt der Ecdysteroide | |
|--|---|
| Anzahl der C-Atome | 19, 21, 24, 27, 28, 29 |
| Anzahl / Stereochemie der Hydroxyl-Gruppen | Positionen 1, 2, 3, 5, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 |
| Vorkommen von Keto-Gruppen | Positionen 3, 6, 12, 17, 20, 22 |
| Stereochemie am C-5 | α / β |
| Polare Substituenten | Phosphate, Sulfate, Zucker |
| Unpolare Substituenten | Acetate, Glykolate, Fettsäureester, Benzoate, Cinnamate, Coumarate |

Tab. 3.1: Chemische Vielfalt der Ecdysteroide

Die Biosynthese der Ecdysteroide ist bis heute noch nicht endgültig entschlüsselt worden. Die Untersuchung des Syntheseweges wird vor allem dadurch erschwert, dass in Insekten nur eine geringe Menge der Hormone produziert wird und damit Zwischenprodukte nicht akkumulieren (REES, 1995). Zudem arbeiten nur wenige

Labors auf der Welt an dieser Problematik (Gilbert et al., 1996). Als Synthesorte sind beim Tabakschwärmer (*Manduca sexta*) die Prothorakaldrüse (CHANG et al., 1974; REES, 1985; REDFERN, 1989), die Epidermis (DELBECQUE et al., 1990) und das Abdomen (SAKURAI et al., 1991), beschrieben, bei Heuschrecken (*Locusta migratoria*) auch das Follikelepithel (GOLZENÉ et al., 1978, ZHU et al., 1983) und bei Krebsen das Y-Organ (LACHAISE, 1990).

Die Synthese der Ecdysteroide erfolgt mit wenigen Ausnahmen aus Cholesterol. Es stellt einen essentiellen Nahrungsbestandteil der Insekten dar, da diese nicht alle zur Cholesterolbiosynthese notwendigen Enzymsysteme besitzen. Carnivore Insekten nehmen Cholesterol direkt mit der Nahrung auf, während phytophage das in Pflanzen enthaltene β -Sitosterol und ähnliche Phytosterole zu Cholesterol dealkylieren.

Als erster Syntheseschritt in der Biosynthese des Ecdysons aus Cholesterol erfolgt die stereospezifische Entfernung des 7β -Wasserstoffs, so dass 7-Dehydrocholesterol entsteht. Diese Reaktion erfolgt in den Prothorakaldrüsen und ist Cytochrom P-450-abhängig.

Untersuchungsgegenstand der aktuellen Forschung sind die Syntheseschritte zwischen dieser Reaktion und den letzten drei Hydroxylierungen. Für diese "Black-Box" (HORN, 1979) sind verschiedene Hypothesen formuliert worden, die jedoch bisher durch Experimente nicht untermauert werden konnten. Es ist wahrscheinlich, dass die Ausbildung der AB-cis-Ringbindung früh erfolgt und dass 2,22,25-Trideoxyecdyson ein Zwischenprodukt der Synthese darstellt (GÄDE et al., 1997).

Gesicherte Ergebnisse liegen über die nachfolgenden ebenfalls Cytochrom P-450-abhängigen Hydroxylierungen vor, die wahrscheinlich in festgelegter Reihenfolge an C-25, C-22 und C-2 stattfinden. Endprodukt dieser Reaktionen ist 3-Dehydroecdyson.

Dieses wird von der Prothorakaldrüse in proteingebundener Form sezerniert und in der Hämolymphe von einer Ketoreduktase zu Ecdyson reduziert. Die 20-Monooxygenase (mitochondrial oder mikrosomal) führt in den Zielgeweben schließlich zur Bildung des 20-Hydroxyecdysons. (GILBERT, 1996). Die Hormon-bildenden Drüsen lassen ein Gemisch aus Ecdyson, 3-Dehydroecdyson und 2-Desoxyecdyson entstehen, das ein speziesspezifisches Profil zeigt.

Ecdysteroide werden besonders im Fettkörper, den Malpighischen Gefäßen, dem Darm und dem Ovar metabolisiert. Gewebe- und speziesspezifischen sowie stadienabhängigen Reaktionen führen erst zur Aktivierung und dann zur Inaktivierung der Ecdysteroide. Auch die Bildung von Speicherformen des Hormons wird beobachtet (GÄDE, 1997).

An diesen Reaktionen sind sehr viele verschiedene Enzyme beteiligt. Es kommt zur Hydroxylierung (C-20, C-26), Oxidation (C-2, C-3, C-26), Reduktion (C-3), Seitenketten-Abspaltung (C-20, C-22) und zur Konjugierung (C-2, C-3, C-22, C-25, C-26) der Ecdysteroide. Häufigste Metabolisierungswege sind die 20-Hydroxylierung, die 26-Hydroxylierung, die Bildung von Ecdysteroidsäuren sowie die reversible Bildung von 3-Dehydroecdysteroiden (GÄDE et al., 1997). Während die Hydroxylierung an C-20 zur Aktivierung der Ecdysteroide führt, inaktivieren die meisten anderen Metabolisierungsreaktionen diese. Die Speicherung findet vor allem in Form polarer und apolarer Konjugate wie z.B. Ecdysteroid-22-Fett-Acyl-ester (GRAN & LAFONT, 1994) statt.

Die Exkretion der Ecdysteroide erfolgt durch den Darm oder die Malpighischen Gefäße der Insekten.

3.1.1. Bildungsorte von Ecdysteroiden in Insekten

Hauptbildungsort der Ecdysteroide ist die Prothorakaldrüse, die bei höheren Fliegen (Diptera) einen Teil der Ringdrüse darstellt. Untersuchungen von DAI und GILBERT (1991) zeigten, dass die Drüsen von Larven im frühen Migrationsstadium die höchste basale Ecdysteroidsynthese zeigen. Diese nimmt jedoch nach der Verpuppung dramatisch ab und ist 48 Stunden nach der Verpuppung nicht mehr nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zur Degeneration der Prothorakaldrüsenzellen durch Apoptose, die bis zur Entwicklung des adulten Tieres vollständig abgeschlossen ist. Trotzdem wurden auch in adulten Tieren signifikante Ecdysteroidtiter nachgewiesen, so dass die Existenz von weiteren Ecdysteroid synthetisierenden Geweben außerhalb der Prothorakaldrüse postuliert wurde (GILBERT et al., 1996). In Experimenten fanden sich bisher Hinweise auf eine Synthese von Ecdysteroiden in den oben genannten Geweben Epidermis, Follikelepithel und im Abdomen von *Manduca sexta* sowie in den Y-Organen von *Crustacea*, die den Prothorakaldrüsen der Insekten entsprechen.

3.1.2. Biologische Aktivität in Insekten

Ecdysterioide haben in Insekten eine Bedeutung bei der Kontrolle von Häutung, Wachstum und Reproduktion. Es besteht eine zeitliche Korrelation zwischen Häutungen und signifikanten Anstiegen der Ecdysteroidkonzentration in der Hämolymphe. Hierbei findet sich ein steiler Anstieg zu Beginn jeder larvalen Häutung, ein Konzentrationsmaximum vor der Apolyse und ein Absinken auf niedrige oder nicht nachweisbare Titer bei der Ecdysis. Es besteht eine zirkadiane Rhythmik der Ecdysteroidsekretion, deren Rhythmusgeber in der Prothorakaldrüse vermutet wird (GÄDE et al., 1997).

Bei Schmetterlingen (Lepidopteren) finden sich im letzten Larvenstadium zwei Ecdysteroid-gipfel. Der früher auftretende kleine Gipfel geht mit einer Verhaltensänderung der Larven einher. Sie beenden die Nahrungsaufnahme und suchen nach einem geeigneten Platz für die Verpuppung (Migrationsstadium). Zusätzlich findet die Umstellung der larvalen zur pupalen Synthese in der larvalen Epidermis statt. Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson treten zu diesem Zeitpunkt im Verhältnis von 1:1 auf. Der später auftretende zweite Ecdysongipfel ist wesentlich höher und steht im Zusammenhang mit der Larven-Puppen-Häutung. Hier treten Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson im Verhältnis 1:5 auf.

In diesen Entwicklungsphasen hat das Vorhandensein oder Fehlen eines zweiten Insektenhormons, des Juvenilhormons, eine große Bedeutung für den regelhaften Ablauf der Entwicklungsschritte (RIDDIFORD et al., 2000).

Ein nach der Verpuppung auftretender dritter hoher und breiter Ecdysonkonzentrationsgipfel geht mit der Entwicklung der adulten Form einher. Im adulten Tier treten Ecdysterioide in Assoziation mit der Reproduktion in höheren Konzentrationen in der Hämolymphe auf. Hierbei bestehen große Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies. Es erfolgt meist eine Aufnahme und Speicherung der Ecdysterioide als Konjugate in reifenden Eiern. Diese Konjugate werden in der Embryogenese freigesetzt und steuern die Embryonalentwicklung. (GÄDE et al., 1997).

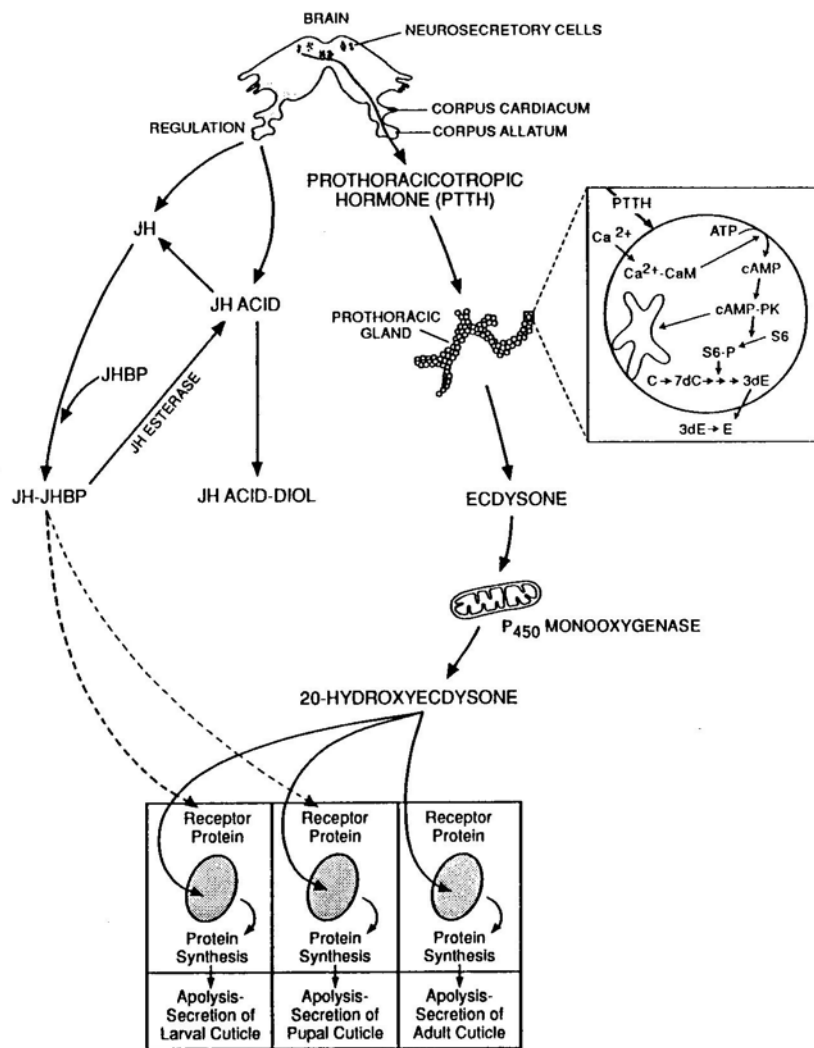


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der endokrinen Kontrolle der Metamorphose (aus GILBERT, 1999)

3.2. Die Ringdrüse

Die Ringdrüse, auch als Ringkomplex bezeichnet (MEURANT 1993), wurde erstmals 1864 von WEISMANN (Weismannscher Ring) beschrieben. Sie besteht aus Zellen der *Corpora allata*, der *Corpora cardiaca* und der Prothorakaldrüsen, die bei vielen Insekten getrennte Drüsen darstellen, bei Dipteren jedoch zu einer Drüse (einem Drüsenkomplex) verschmolzen sind.

Die Ringdrüse liegt kranial den *Lobi optici* des Gehirns an und umschließt allseitig die Aorta. Der dorsale Teil wird von den verschmolzenen *Corpora allata*, der ventrale von den ebenfalls verschmolzenen *Corpora cardiaca* gebildet. Die lateralen, von Tracheen begleiteten Drüsenbänder formen die Prothorakaldrüsen (GERSCH 1964).

Diese stellen den Hauptteil der Ringdrüse dar. Die Ecdysteroid produzierenden Zellen sind morphologisch durch einen großen ovalen Kern, viele cytoplasmatische Lipidvakuolen und Invaginationen der peripheren Plasmamembran gekennzeichnet. Die Zellen der *Corpora allata* haben einen kleineren Kern, eine kleinere Kern-Plasma-Relation und ein elektronendicht färbendes Cytoplasma. Multiple cytoplasmatische neurosekretorische Granula, ein runder Kern und ein prominenter Nukleolus sind die morphologischen Charakteristika der Zellen der *Corpora cardiaca*, die in einem engen Kontakt zu den Prothorakaldrüsenzellen stehen (MEURANT 1993).

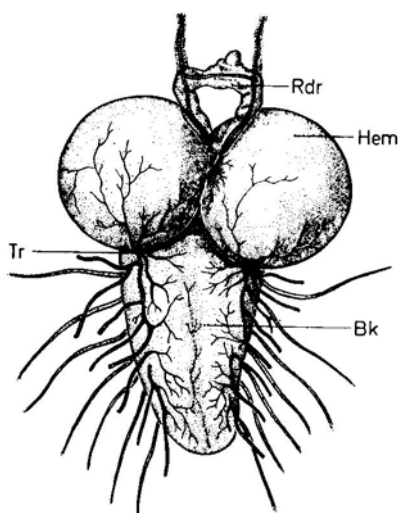


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der anatomischen Lage der Ringdrüse (Rdr) von *Calliphora vicina* (Tr: Trachee, Bk: Bauchganglienketten, Hem: Gehirnhemisphäre) (aus GERSCH, 1964)

3.3. Regulation der Ecdysteroidsekretion *in vivo*

Die Sekretion der Ecdysteroide wird in Insekten durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und gesteuert, von denen erst ein Teil gut untersucht ist. Es werden ecdysiotrope (v.a. PTTH) und inhibierende Faktoren unterschieden.

Das prothorakotrope Hormon (PTTH) wird in zwei Paaren dorsolateraler neurosekretorischer Zellen im Gehirn gebildet, in die *Corpora allata* transportiert und dort in die Hämolymphe freigesetzt.

Man unterscheidet große PTTHs, durch Disulfidbrücken verbundene Dimere mit einem Molekulargewicht von 22-29 kDa, und kleine PTTHs (4-7 kDa). In *Bombyx mori* hat nur das große PTTH (PTTH-B) eine prothorakotrope Wirkung, während das kleine (PTTH-S) nicht aktiv ist und daher Bombyxin genannt wird (GÄDE et al., 1997).

Als weitere ecdysiotrope Neuropeptide wurden Lom-IRP, Lyd-TE und EDNH identifiziert. Während die physiologische Wirkung des LIRP (*Locusta migratoria*-insuline-related-peptide) noch ungeklärt ist, führt Lyd-TE *in vitro* zur Stimulierung der Ecdysteroidsynthese der Testes larvaler und pupaler Insekten sowie der Ovarien und des abdominellen Integuments bei *G. bimaculatus* (WAGNER et al., 1997). EDNH (Egg development neurosecretory hormone) führt zur Ovarreifung bei Dipteren und wurde auch in Thorax und Abdomen von *Aedes aegypti* nachgewiesen.

Neben regulatorischen Neuropeptiden führt auch die direkte Innervation der Prothorakaldrüsen zur Beeinflussung der Ecdysonproduktion. Koinkubation mit dem ZNS hat veränderte Sekretionsschemata zur Folge, die abhängig vom Larvenstadium sind. Die Regulation der Steroidbiosynthese in Insekten durch das ZNS zeichnet sich also durch eine hohe Plastizität aus.

Als inhibierender Faktor wurde das so genannte prothorakostatische Hormon (PTSH) identifiziert, das ein Hexapeptid ist und dem Neb-TMOF entspricht (HUA und KOOLMAN, 1995). Es führt zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels bei *C. vicina*. Bei Crustacean inhibiert ein molt-inhibiting Hormone (MIH) genanntes Neuropeptid die Produktion von Ecdysteroiden (SAIDI et al, 1994). Hierbei ist ebenfalls ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels nachzuweisen.

Demgegenüber wirkt cAMP bei Lepidopteren stimulierend auf die Steroidogenese. Außerdem gibt es Hinweise auf eine Abhängigkeit der Ecdysteroidbiosynthese vom Calcium-Spiegel.

Als Arbeitshypothese für den Wirkungsmechanismus des PTTH wird postuliert, dass die Bindung von PTTH an Membranrezeptoren der Drüsenzellen zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle und damit zu einer Erhöhung des Calcium-Einstroms führt. Die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Protein-Kinase führt in der Folge zur Aktivierung eines geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Ecdysteroidbiosynthese, das wahrscheinlich erst in einen Syntheseschritt nach der Bildung von 7-Dehydrocholesterol eingreift.

Über Einflüsse vom Juvenilhormon und die Existenz von Rückkopplungsmechanismen gibt es ebenfalls Spekulationen. (GÄDE et al., 1997). Es gilt mittlerweile als gesichert, dass Juvenilhormon die Ecdysteroidogenese in den Prothorakaldrüsen abhängig vom Entwicklungsstadium der Larve sowohl stimulieren als auch inhibieren kann (GILBERT et al., 1996). Die Existenz eines negativen Feedback-Mechanismus der Ecdysteroiden auf ihre Biosynthese wurde 1989 von SAKURAI und WILLIAMS bei *Manduca*-Larven gezeigt. Der Mechanismus wird für eine direkte Suppression (short loop) gehalten. (GILBERT et al., 1996). JIANG und KOOLMAN (1999) konnten einen negativen Feedback-Mechanismus auch bei *Calliphora vicina* nachweisen.

3.4. Der reverse hämolytische Plaque-Assay

Der reverse hämolytische Plaque-Assay ist eine Technik zum Nachweis der Hormonsekretion einzelner Zellen. Er stellt eine Weiterentwicklung des hämolytischen Plaque-Assays dar, einer immunologischen Methode, die dem Nachweis der Immunglobulinsekretion einzelner B-Lymphozyten dient (CUNNINGHAM, 1968). JERNE (1974) und GRONOWITZ (1976) haben den Test weiterentwickelt. Bei der ursprünglichen Methode werden Rindern Schafserythrozyten injiziert. Es reichern sich Antikörper produzierende B-Zellen in der Milz des Rindes an. Eine Suspension von Milzgewebe wird einige Tage später mit einer Mischung von Schafserythrozyten und komplementhaltigem Serum von Meerschweinchen in eine Kammer auf einem Objektträger gegeben. Die Antikörper binden an die

Schafserythrozyten in der unmittelbaren Umgebung der sie sezernierenden B-Zellen. In der Folge führen die Komplementfaktoren zu einer Lyse aller Erythrozyten, die Antikörper gebunden haben. Der dabei entstehende Lysehof um die B-Zellen wird hämolytischer Plaque genannt. Dieser Test erlaubt die Identifizierung und Quantifizierung der B-Zellen, die Antikörper gegen die Schafserythrozyten bilden (LEFTKOVITS, 1997).

MOLINARO entwickelte 1981 auf der Grundlage dieses Plaque-forming-cell-Assays (PFC-Assay) den reversen hämolytischen Plaque-Assay (RHPA). Er coatete Schafserythrozyten mithilfe von Chromchlorid mit Protein A, einem IgG bindenden Protein, das auf der Membran von Staphylokokken der Antikörperbindung dient. Das auf der Erythrozytenmembran gebundene Protein A erlaubt die Bindung von IgG-Antikörpern durch Erythrozyten. Dies machte sich MOLIMARO zunutze, indem er Antikörper gegen ein Hormon (Prolaktin) an die Erythrozyten band und einen Zellrasen aus Hormon sezernierenden Zellen und mit dem entsprechenden Antikörper beladenden Erythrozyten mit komplementhaltigem Serum inkubierte. Die Lyse der Erythrozyten, die Hormon gebunden haben, führt zur Bildung eines hämolytischen Plaques um diejenigen Zellen, die das entsprechende Hormon sezernieren.

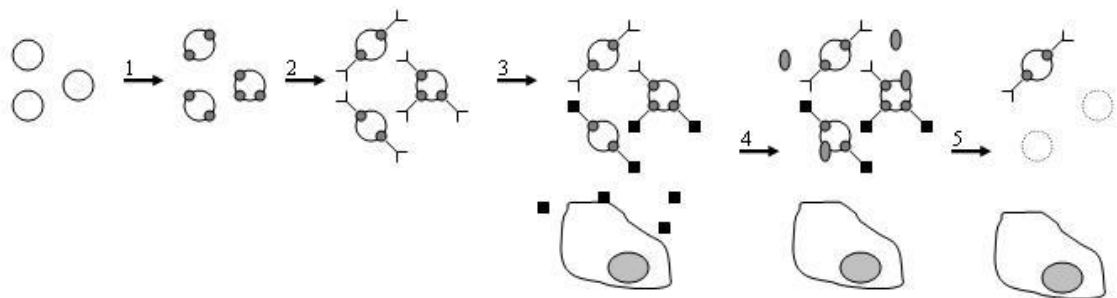


Abb. 3-3: Schematische Darstellung des reversen hämolytischen Plaque-Assays (1: Bindung von Protein A; 2: Bindung des spezifischen Antikörpers; 3: Bindung des sezernierten Antigens; 4: Bindung von Komplement; 5: Lyse der Erythrozyten, die Antigen gebunden haben)

Die übrigen Zellen werden bei dieser Nachweismethode nicht zerstört, so dass NEILL bereits 1983 die Kombination des Assays mit weiteren Methoden (z.B. Immunzytochemie) vorschlug. Der ebenfalls von NEILL (1983) beschriebene sequentielle hämolytische Plaque-Assay dient der Untersuchung verschiedener

Sekretogene auf dieselben Zellen. Bei dieser Modifikation werden nur die sekretorischen Zellen in der Cunningham-Kammer angeklebt und diese für jeden Test mit einem neuen Gemisch aus Erythrozyten, Antikörpern und Komplement inkubiert.

Die ersten Anwendungen des hämolytischen Plaque-Assays erfolgten durch NEILL et al. (1983) zur Identifizierung einzelner Prolaktin sezernierender Zellen in einem Gemisch humaner hypophysärer Zellen und zur Untersuchung des Einflusses von TRH und Dopamin auf die Sekretionsmenge. Der Assay fand eine schnelle Verbreitung in der Bearbeitung endokrinologischer Fragestellungen, wobei im Mittelpunkt der Forschungstätigkeiten vor allem Peptidhormone der Hypophyse wie Prolaktin (SMITH et al., 1986) und das Wachstumshormon (HOLL et al., 1988) sowie die Parathormonsekretion aus Zellen der Nebenschilddrüse (RITCHIE et al., 1992) standen. Zum Nachweis der Sekretion von Steroidhormonen mithilfe des reversen hämolytischen Plaque-Assays existiert bisher nur eine Arbeit von PINO et al. (1992), die die Testosteron-Sekretion von einzelnen Leydig-Zellen der Ratte untersucht haben. Im Verlauf der neunziger Jahre wurde der hämolytische Plaque-Assay mit einer Vielzahl von Methoden wie der Immunzytochemie (PORTER et al., 1995), der *In situ*-Hybridisation (WISE et al., 1993) und Patch-Clamp-Techniken (FELIX et al., 1993) kombiniert. Eine aktuelle und ausführliche Übersicht über die Anwendungsmöglichkeiten des reversen hämolytischen Plaque-Assays findet sich bei BOOCKFOR et al. (2004).

3.5 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr des menschlichen Organismus. Es besteht aus 9 verschiedenen Plasmafaktoren (sog. Komplementfaktoren C1 – C9). Sie liegen, ähnlich dem Blutgerinnungssystem, als inaktive Proenzyme oder Zymogene vor und aktivieren sich in einer bestimmten Reihenfolge überwiegend enzymatisch gegenseitig (sog. Komplementkaskade). Ihre Aktivität wird durch weitere (mindestens 11) so genannte Regulatorproteine beeinflusst. Die Komplementfaktoren werden in Darmepithelien, Makrophagen und Hepatozyten synthetisiert. Sie beeinflussen in aktivierter Form verschiedene andere Komponenten der unspezifischen Abwehr und führen in Form des Membranangriffskomplexes (C5-

C9) letztendlich zur Perforation der Außenwände von Bakterien oder immunogenen körpereigenen Zellen.

Bei ihrer Aktivierung werden die Komplementfaktoren in verschieden große Bruchstücke gespalten. Die größeren Bruchstücke (mit „b“ bezeichnet) binden an Zellmembranen und führen zur Aktivierung der nächsten Komponente der Komplementkaskade. Die kleinen Bruchstücke (mit „a“ bezeichnet) haben eine chemotaktische und permeabilitätssteigernde Wirkung, aktivieren Granulozyten und Makrophagen und verursachen Entzündungsreaktionen.

Die Aktivierung der Komplementkaskade kann auf zwei Wegen geschehen. Im so genannten klassischen Weg führen mit Immunglobulinen (üblicherweise IgG) opsonierte Erreger oder Körperzellen (Antigen-Antikörper-Komplexe) zu einer Aktivierung des Faktors C1, der die Komplementkaskade in Gang setzt. Beim so genannten alternativen Weg wird der Faktor C3 auch durch nichtopsonierte Erreger aktiviert. Diese Bindung führt nun zu einer Opsonisierung des Antigens und damit zu einer Verstärkung oder sogar erst Ermöglichung der Phagozytose. Mastzellen, basophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten werden außerdem durch die aktivierten Komplementfaktoren C3a, C4a und C5a aktiviert.

Am Ende der Komplementkaskade wird der so genannte Membranangriffskomplex (oder zytolytische Komplex) aus den Faktoren C5-C9 gebildet, der eine Pore in der Zellmembran bildet. Diese Perforation der Außenwand führt zur Zerstörung der Zellstruktur, die durch Lysozym verstärkt wird (Weiss et al., 1993).

Im Rahmen des reversen hämolytischen Plaque-Assays erfolgt die Aktivierung der Komplementkaskade auf dem klassischen Weg durch die an der Erythrozytenwand gebundenen IgG-Antikörper. Der Membranangriffskomplex führt dann in der Folge zur Lyse der Antikörper tragenden Erythrozyten.

3.6. Ziel der Dissertation

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob der reverse hämolytische Plaque-Assay auch zum Nachweis Ecdysteroid sezernierender Zellen geeignet ist.

Die bisherigen Untersuchungen der Ecdysteroidsekretion sind nur mit ganzen Drüsen durchgeführt worden. Außerdem ist der Nachweis der Sekretion von Ecdysteroiden aus anderen Zellen der Insekten bisher noch nicht direkt erbracht worden. Der reverse hämolytische Plaque-Assay bietet nach Etablierung somit eine Vielzahl von Möglichkeiten weiterer Untersuchungen der Sekretionsorte sowie der Regulation der Sekretion von Ecdysteroiden in verschiedenen Spezies.

In der Arbeit soll der reverse hämolytische Plaque-Assay nach Sichtung der aktuellen Literatur etabliert sowie seine Anwendbarkeit für den Nachweis einer Ecdysteroidsekretion durch Visualisierung der Plaquebildung gezeigt werden. Als Untersuchungsgewebe werden Zellen der Ringdrüse von Schmeißfliegen (*Calliphora vicina*) genutzt, mit denen in unserem Labor eine große Erfahrung besteht.

Kontrolluntersuchungen dienen dem Nachweis der Spezifität der erhaltenen Ergebnisse. Perspektiven für weitere Versuche mithilfe des reversen hämolytischen Plaque-Assays sollen erarbeitet und bewertet werden.

4. Methoden

4.1. Larvenzucht

Schmeißfliegen der Art *Calliphora vicina* (R.D.) wurden bei 23°C und 50%iger Luftfeuchtigkeit in einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und mit Hefe, Zucker und Wasser ernährt. Die Eiablage erfolgte in rohes Schweinehackfleisch. Nach dem Schlüpfen wurden die Larven durch Zugabe von weiterem rohen Schweinehackfleisch gezüchtet. Ihr Entwicklungsalter wurde in Tagen nach Eiablage ausgedrückt (BUDD et al., 1993).

Zu Beginn des Migrationsstadiums, am 6. Tag nach der Eiablage, wurden die Larven mit Leitungswasser gewaschen und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Unter diesen Temperaturen sistierte die weitere Entwicklung der Larven. Die Entnahme der benötigten Larven aus dem Kühlschrank erfolgte ca. 12 Stunden vor Präparationsbeginn.

4.2. Chemikalien

| Chemikalien | Firmen/ Best.Nr. |
|--|------------------------------------|
| Komplementhaltiges Serum vom Meerschweinchen | Sigma S 1639 |
| Toluidinblau | Serva 36693 |
| Protein A | Sigma P 8143 (entspricht P3838) |
| Poly-L-Lysin | Sigma P 8920 |
| Rinderserumalbumin (BSA) 5% | Sigma A 7888 |
| Glutaraldehyd 25% | Sigma G 6257 |
| Chromium-chlorid-Hexahydrat 99% | Merck 102487 |

| Chemikalien | Firma/Best.Nr. |
|----------------------------|-----------------------|
| Medium 199 | Sigma M 5017 |
| Trypsin aus Rinderpankreas | Sigma T 2271 |
| Schafserythrozyten | Behring ORAW31 |
| Kollagenase, Typ II | Calbiochem Lot B18817 |
| Forskolin | Calbiochem Lot B25974 |
| 3-Isobutyl-1-Methylxanthin | Calbiochem Lot B22073 |
| Dimethylsulfoxid | Sigma D8779 |

Tab. 4-1: Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen von der Fa. Merck, Darmstadt und waren von p.a.-Qualität.

4.3. Antiseren

Alle verwendeten Antikörper entstammen eigener Produktion (REUM et al., 1979, 1981, 1982, 1989).

| Antiserum | Blutung vom | Antigen | Spezifität | Kommentare |
|-----------|-------------|-----------------------------|---------------------|----------------|
| DUL-1 | Gepoolt | Ecdyson-oxim-BSA | E = 1; 3DE = 3,8 | ² |
| DUL-2 | 29.11.79 | Ecdyson-oxim-BSA | E = 2-deoxyE | ^{2,3} |
| DUL-3 | 07.01.81 | Ecdyson-oxim-BSA | | ² |
| DBL-1 | 10.09.80 | 20-Hydroxy-Ecdyson-oxim-BSA | E = 1; 3DE = 17 | ^{1,2} |
| DBL-2 | 08.10.80 | 20-Hydroxy-Ecdyson-oxim-BSA | E = 1; 20E = 1,3 | ^{1,2} |
| White | 04.06.82 | Ecdyson-oxim-Thyroglobulin | | |
| Black | 04.06.82 | Ecdyson-oxim-Thyroglobulin | | ² |

¹ bindet 2-Succinyl-Derivat von 20E, das an Peroxydase gebunden ist

² bindet tritiiertes 2-Desoxyecdysone

³ bindet E und 25-Desoxyecdysone gleich gut

Tab. 4-2: Antiseren

4.4. Lösungen

| Name | Konzentration | Herstellung |
|---|--|--|
| Chromchlorid-hexahydrat-Salzlösung | 0,1 % (1mg/ml) $\text{CrCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in Saline, pH 5.0 | 50 mg Chromchloridhexahydrat in 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung |
| Chromchlorid-hexahydrat-Fixierungslösung | 0,01 % (0,1 mg/ml) | Mischung von Chromchlorid-hexahydratlösung mit 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:9 |
| Protein A- Lsg. in Saline | 0,5 mg/ml gefroren aufbewahrt | 1 mg Protein A in 2ml 0,9%iger NaCl-Lösung |
| Medium 199 mit BSA | Medium 199 + BSA 0,1 % | 100 mg BSA in 100 ml Medium 199 |
| Poly-L-Lysin in dest. Wasser | 1 mg / ml | 1 mg Poly-L-Lysin in 1 ml destilliertem Wasser |
| <i>Calliphora</i> -Ringer (KÄUSER et al., 1988) | 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,82 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0,58 mM Na_2HPO_4 , 0,34 mM KH_2PO_4 , 25mM Glucose (pH 6,8 bei 25°C) | |
| Medium M-199 | | Inhalt eines Fläschchens Medium M-199 in destilliertem Wasser lösen, 2,2 g Natriumhydrogencarbonat hinzugeben, pH mit konz. HCl bzw. NaOH bei 7,3 einstellen, auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen |
| Glutaraldehyd zur Fixierung | 2 % in Medium 199 | 4 ml Glutaraldehyd + 46 ml Medium 199 |
| Toluidinblau - Lsg. | | ca. 0,01 mg Toluidinblau in 1 ml Saline (0,9%ige NaCl-Lösung) |
| Forskolin-Lsg. | $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ | 10 mg Forskolin in 6,09 ml DMSO |

| Name | Konzentration | Herstellung |
|-----------------------------|----------------------|---|
| Isobutylmethyl-xanthin-Lsg. | 4×10^{-2} M | 8,9 mg Forskolin in 1 ml DMSO |
| Antiserum-Lösung | | 10 μ l antikörperhaltiges Serum in 500 μ l Medium-199 |
| Komplement-Lösung | | 10 μ l komplementhaltiges Serum in 500 μ l Medium-199 |

Tab. 4-3: Lösungen

4.5. Geräte

| | |
|---------------------------------------|---|
| Analysenwaage Sartorius 1217 | Sartorius AG, Göttingen |
| Heizofen: Heraeus T 5042 | Heraeus GmbH, Hanau |
| Pipetten: Gilson Pipetman div. Größen | Gilson International Deutschland, Bad Camberg |
| Zentrifuge: Heraeus Megafuge 2.0R | Heraeus GmbH, Hanau |

4.6. Präparation der Ringdrüsen

Die Larven wurden auf klassische Weise mithilfe von Insektennadeln auf einer dunklen Wachsgrundlage aufgespannt und mit einem Längsschnitt eröffnet. Nach Zugabe von *Calliphora*-Ringer erfolgte die Entfernung von Anteilen des Fettkörpers in der Flüssigkeit mit dem Ziel, das Gehirn darzustellen. Die Ringdrüsen wurden an den von den Hirnlobuli nach kranial verlaufenden Tracheen aufgesucht und mit diesen zusammen entfernt. Anhangsgewebe wurden sorgfältig abpräpariert. Nach Abschluss der Präparation wurden die Ringdrüsen mithilfe einer Eppendorf-Pipette in 500 μ l Medium 199 eingebracht.

4.7. Vereinzelnung der Zellen

4.7.1. Gewebeauflösung mit Trypsin

Das Gewebe wurde 2 Stunden lang bei 37°C im Wasserbad mit Trypsinlösung (1 mg / ml Medium-199) inkubiert und dabei alle 30 min durch wiederholte Aspiration mit einer Mikroliter-Pipette mechanisch belastet. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte eine 10- minütige Zentrifugation bei 2000 rpm, Abgießen des Überstandes und einmaliges Waschen in Medium 199 (RITCHIE et al., 1992).

4.7.2. Gewebeauflösung mit Kollagenase

Das Gewebe wurde 45 min lang bei 37°C im Wasserbad mit Kollagenase-Lösung (3 mg/ml Medium 199) inkubiert und dabei alle 15 Minuten durch wiederholtes Aspirieren mit einer Mikroliter-Pipette mechanisch belastet. Im Anschluss erfolgte eine 10- minütige Zentrifugation der Zellen in einer Kühlzentrifuge bei 2000 rpm, Abgießen des Überstandes und einmaliges Waschen in Medium 199 (TAYLOR et al., 1992).

4.8. Der reverse hämolytische Plaque-Assay (RHPA)

4.8.1. Coating der Erythrozyten

Nach Zentrifugation der Erythrozyten und dem Abgießen des Überstandes aus Konservierungsmittel wurden die Erythrozyten einmal in 0,15 M NaCl-Lösung gewaschen. Es folgte die 1-stündige Inkubation mit Chromchloridhexahydrat-Fixierungslösung und Protein-A-Lösung im Mengenverhältnis 1:10:1 (Erythrozyten: Chromchloridhexahydrat-lösung : Protein-A-Lösung) zur Fixierung des Immunglobulin-bindenden Proteins auf der Erythrozytenoberfläche. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Erythrozyten einmal mit 0,15 M NaCl-Lösung und dreimal mit Medium 199 gewaschen (NEILL et al., 1987).

Die gecoateten Erythrozyten wurden bei 2-8°C als 10%ige Lösung in Medium 199 aufbewahrt und in den folgenden 3 Tagen verwendet.

4.8.2. Bau der Cunningham-Kammern

Die Objektträger wurden mit techn. Ethanol sorgfältig von Lipiden gereinigt. Nach dem Aufbringen zweier Streifen doppelseitigen Klebebandes (ca. 12 x 2 mm) zentral an den langen Seiten eines Objektträgers wurden 20 µl Poly-L-Lysin-Lösung als „Klebstoff“ für Proteine zwischen den Klebestreifen aufgebracht und gleichmäßig auf der späteren Fläche der Kammer verteilt. Nach 5-10 Minuten wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet. Die Kammer wurde bei getrocknetem Objektträger mit einem Deckglas verschlossen (LEONG et al., 1985). Die entstehenden Kammern hatten ein Volumen von 40-60 µl.

4.8.3. Durchführung des hämolytischen Plaque-Assays

Die Ringdrüsenzellen wurden in die 10%ige Lösung gecoateter Erythrozyten transferiert. Diese Suspension wurde mithilfe einer Pipette in die Cunningham-Kammern eingebracht. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten in feuchtem Milieu, in der die Zellen mithilfe des Poly-L-Lysins an die Glasoberfläche banden, wurde die Kammer mit Unterstützung durch Sog mit einem Stück Filterpapier mit ca. 100 µl Medium 199 gespült. Die Inkubation mit dem Antiserum erfolgte über eine Stunde

durch die Zugabe von 40 µl Antikörperlösung in die Kammer alle 20 Minuten. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Komplementlösung über zwei Stunden durch Einbringen von 40 µl Serum alle 40 Minuten (LEONG et al., 1985; PINO et al., 1992).

4.8.4. Fixierung und Färbung

Die Fixierung erfolgte im Anschluss an die Inkubation mit Komplementlösung mit eiskalter Glutaraldehydlösung, mit der die Kammer über 10 Minuten inkubiert wurde. Nach Spülung mit 500 µl Medium 199 und vorsichtiger Entfernung des Deckglases wurde das Präparat an der Luft getrocknet. Die Färbung wurde mit Toluidinblaulösung ausgeführt. Nach dem Aufbringen der Lösung auf das Präparat und einer Einwirkzeit von 20 Minuten wurden die Farbreste mit destilliertem Wasser abgespült und das Präparat nach Lufttrocknung unter dem Mikroskop evaluiert (KINEMAN et al., 1996).

4.9. Hämolytischer Plaque-Assay mit verschiedenen Antikörpern

Der hämolytische Plaque-Assay wurde mit Zellen der Larven von *Calliphora vicina* und verschiedenen Antikörpern gegen Ecdysteroide durchgeführt. Verwendet wurden die Antiseren Black, White, DBL 1, DUL 1, DBL 2, DUL 2, DUL 3, die unter gleichen Bedingungen eingesetzt wurden. Als Kontrolle diente jeweils die Inkubation der Cunningham-Kammern mit Medium-199 anstelle der Lösungen der Antiseren.

4.10. Hämolytischer Plaque-Assay mit ganzen Ringdrüsen

Der hämolytische Plaque-Assay wurde mit ganzen Ringdrüsen durchgeführt. Eine Auftrennung in einzelne Zellen mithilfe von Kollagenase oder Trypsin erfolgte nicht. Zum Einbringen der ganzen Ringdrüsen war es notwendig, die Cunningham-Kammern erst nach Aufbringen der Lösung aus Ringdrüsen und Schafserythrozyten mit einem Deckglas zu verschließen. Die Inkubation von bereits geschlossenen Kammern durch Diffusion war aufgrund des großen Volumens der ganzen Ringdrüsen nicht möglich. Es ergaben sich keine weiteren Änderungen im Versuchsablauf.

4.11. Sequentieller hämolytischer Plaque-Assay mit ganzen Ringdrüsen

Es wurden Ringdrüsen von Larven von *Calliphora vicina* am 6. Tag nach Eiablage präpariert und in Medium 199 gelagert. Nach Reinigung der Objektträger mit Ethanol wurden auf diese je 20 µl Poly-L-Lysinlösung aufgetragen und die Objektträger nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten mit destilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet. Nach dem Bau einer Cunningham-Kammer wurde diese mit den Ringdrüsen in *Calliphora*-Ringer inkubiert und nach 30 Minuten mit 100µl Medium 199 gespült. 20 µl der 30 %igen Lösung von gecoateten Schafserythrozyten wurden mit der Antikörperlösung und der Komplementlösung gemischt. Die Kammer wurde alle 20 Minuten mit 40 µl dieses Gemisches bei Raumtemperatur inkubiert und nach 60 Minuten unter dem Mikroskop evaluiert.

4.12. Hämolytischer Plaque-Assay mit Pflanzensamen

Phytoecdysteroide sind Ecdysteroide, die in Pflanzen nachgewiesen werden können. Sie treten in besonders hohen Konzentrationen in Pflanzensamen auf. Daher sollte die Möglichkeit des Nachweises von Ecdysteroiden in Pflanzensamen untersucht werden. Pflanzensamen von *Xenophyllum tenax* und *Chenopodium album* (dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Prof. Laurence Dinan, Department of Biological Sciences, University of Exeter) wurden sehr fein gemörsert und mit der Lösung von gecoateten Schafserythrozyten gemischt. Die Kammern wurden mit dieser Mischung über 30 Minuten inkubiert. Der weitere Verlauf des reversen hämolytischen Plaque-Assays wurde beibehalten.

4.13. Wirkung von Forskolin auf die Sekretion der Ringdrüsenzellen

Das verwendete Antiserum wurde im Unterschied zu den Vorversuchen nicht im Verhältnis von 1:50, sondern von 1:37,5 mit Medium 199 gemischt. Die Inkubation der Cunningham-Kammern erfolgte mit 30 µl dieser Lösung sowie mit 10 µl der Forskolinlösung in unterschiedlicher Verdünnung (1:1, 1:10 und 1:100). Der weitere Ablauf des reversen hämolytischen Plaque-Assays wurde beibehalten.

4.14. Wirkung von Isobutylmethylxanthin (IBMX) auf die Sekretion der Ringdrüsenzellen

Das verwendete Antikörperserum wurde im Verhältnis von 1:37,5 mit Medium 199 gemischt. Die Inkubation der Cunningham-Kammern erfolgte mit 30 µl dieser Lösung sowie mit 10 µl der Isobutylxanthinlösung in unterschiedlicher Verdünnung (1:10 und 1:100). Der weitere Ablauf des reversen hämolytischen Plaque-Assays wurde beibehalten.

4.15. Kontrollexperimente

4.15.1. Verwendung von Medium 199 anstelle von Antiserum

Der hämolytische Plaque-Assay wurde auf die oben beschriebene Art durchgeführt. Es erfolgte lediglich die Inkubation der Kammer mit Medium 199 anstelle von Antiserumlösung.

4.15.2. Verwendung von Medium 199 anstelle von Komplement

Anstelle der zweistündigen Inkubation mit Komplementlösung wurde die Cunningham-Kammer mit Medium 199 inkubiert. Es ergaben sich keine weiteren Änderungen im Versuchsablauf (NEILL et al., 1983; PINO et al., 1992).

4.15.3. Durchführung des hämolytischen Plaque-Assays mit ungecoateten Erythrozyten

Die Schafserythrozyten wurden lediglich dreimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung und einmal mit Medium 199 gewaschen und ohne Coating mit Protein A im hämolytischen Plaque-Assay verwendet.

4.15.4. Verwendung von anderen Geweben / keinem Gewebe anstelle von Ringdrüsenzellen

Es erfolgte die Präparation von Fettkörpergewebe und Teilen der Malpighischen Gefäße. Das gewonnene Gewebe wurde in derselben Art wie die Ringdrüsenzellen mithilfe von Kollagenase in einzelne Zellen aufgetrennt und im reversen hämolytischen Plaque-Assay verwendet.

Außerdem wurde der RHPA ohne Zugabe von Zellen durchgeführt.

4.15.5. Durchführung des hämolytischen Plaque-Assays mit Zellen aus Ringdrüsen von Larven früherer Larvenstadien

Es wurden die Ringdrüsen von Larven bereits am fünften Tag der Eiablage präpariert, mit Kollagenase getrennt und im hämolytischen Plaque-Assay auf die Sekretion von Ecdysteroiden getestet.

5. Ergebnisse

5.1. Reverser hämolytischer Plaque-Assay mit verschiedenen Antikörpern

Bei der Durchführung des reversen hämolytischen Plaque-Assays mit verschiedenen Antiseren gegen Ecdysteroide (DUL-1, DUL-2, DUL-3, DBL-1, DBL-2, White, Black) zeigte sich nur bei der Verwendung des DBL-1-Antiserums eine reproduzierbare Plaquebildung um einen Teil der Ringdrüsenzellen (Abb. 5-1 und 5-2). Plaques, die bei der Verwendung von DBL-2 auftraten, konnten in Folgeversuchen nicht bestätigt werden und mussten daher als nicht reproduzierbare Ergebnisse gewertet werden. In allen Folgeversuchen wurde daraufhin nur Antiserum vom Typ DBL-1 verwendet.



Abb. 5-1: Hämolytischer Plaque-Assay mit Ringdrüsenzellen und DBL-1-Antiserum (5fach vergrößert)

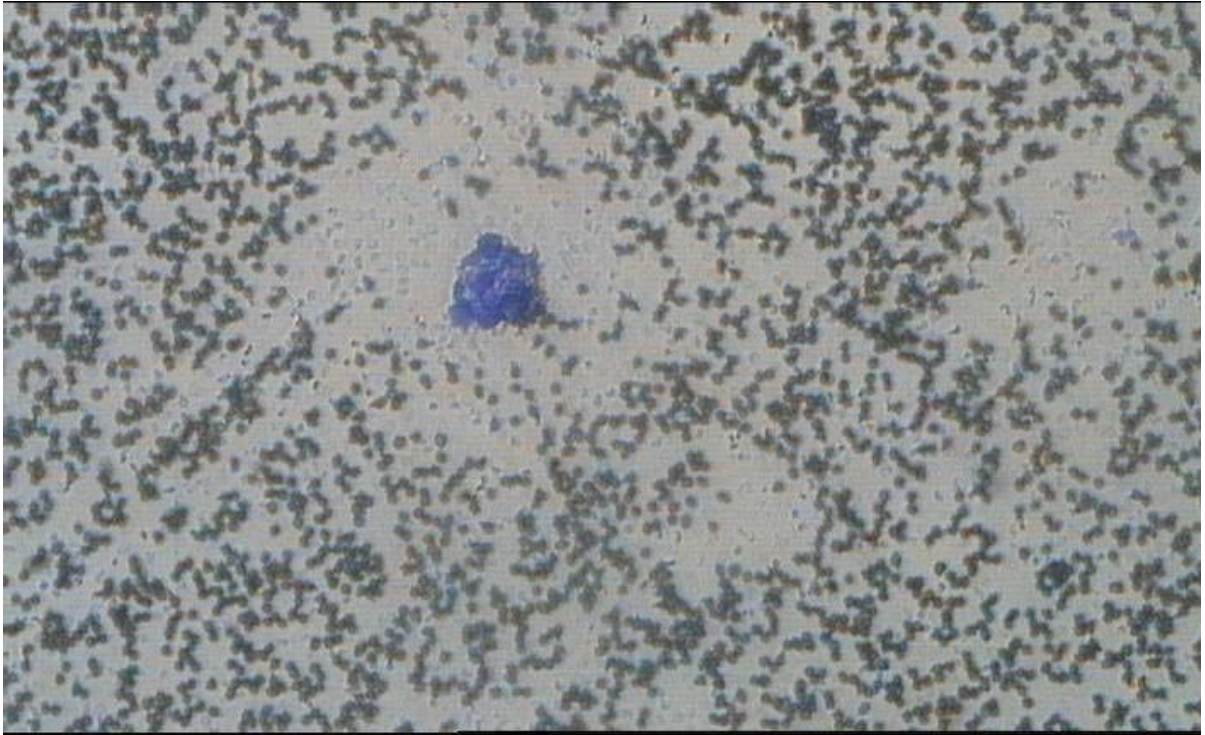


Abb. 5-2: Vergrößerung aus Abbildung 5-1 (16fach vergrößert)

5.2. Reverser hämolytischer Plaque-Assay mit Ringdrüsenzellen bei Zelltrennung mit Trypsin oder Kollagenase

Es zeigte sich bei der Verwendung beider Zelltrennungsmethoden eine befriedigende Auftrennung der *in toto* präparierten Ringdrüsen in einzelne Zellen. Ein Einfluss des verwendeten Enzyms auf die Menge oder die Größe der hämolytischen Plaques konnte nicht nachgewiesen werden. In der Mehrzahl der Versuche wurde Kollagenase zur Zelltrennung verwendet.

5.3. Reverser hämolytischer Plaque-Assay unter Verwendung des DBL-1-Antikörpers und Zellen der Ringdrüse von *Calliphora vicina*.

Es wurde bei 23 (74,2 %) von 31 Versuchen nach der klassischen Vorschrift (LEONG et al., 1985; PINO et al., 1992) eine Plaquebildung beobachtet (Abb. 5-3 und 5-4). In 8 (25,8 %) Versuchen waren keine Plaques nachzuweisen. Der Durchmesser der Plaques betrug zwischen 5 und 10 Erythrozytendurchmessern (36 – 72 μm), die Anzahl der Plaques pro Objektträger zwischen 0 und 6. Die Anzahl und der Durchmesser der

Plaques standen in keiner eindeutigen Korrelation zur Inkubationszeit der Zellen mit Antikörper- oder Komplementlösung.

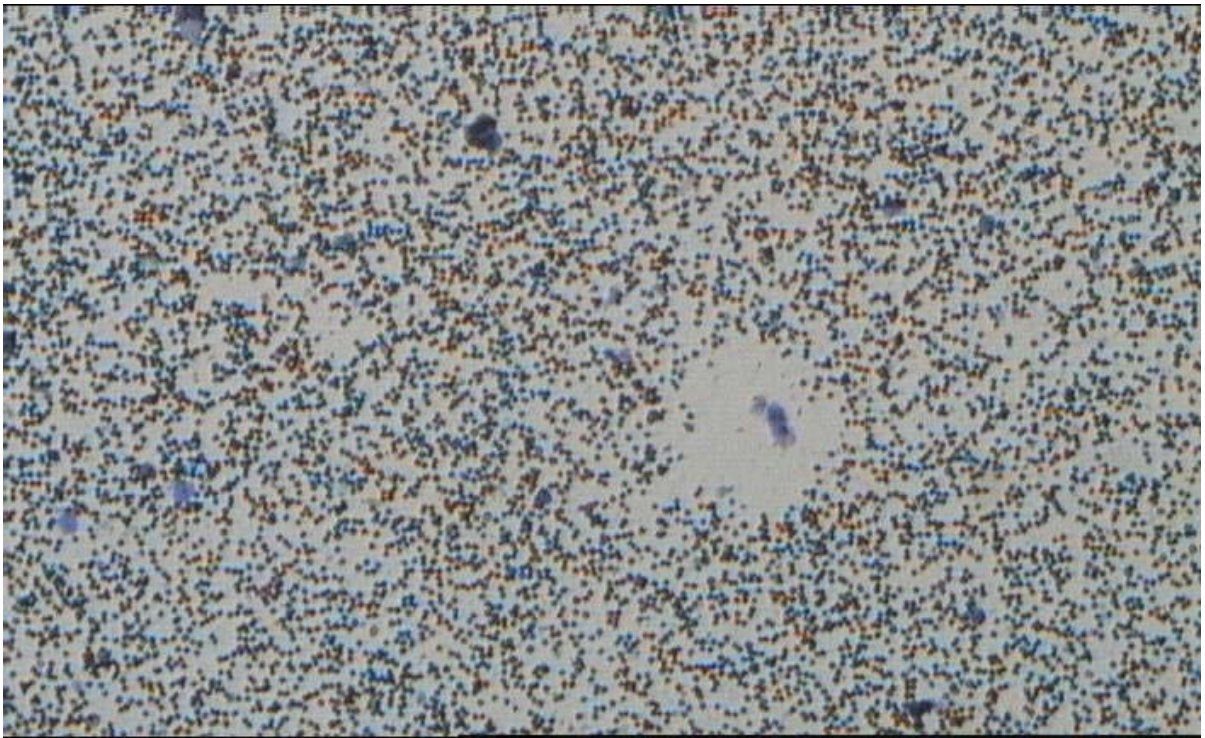


Abb. 5-3: Hämolytischer Plaque-Assay mit DBL-1 Antikörper (10fach vergrößert)

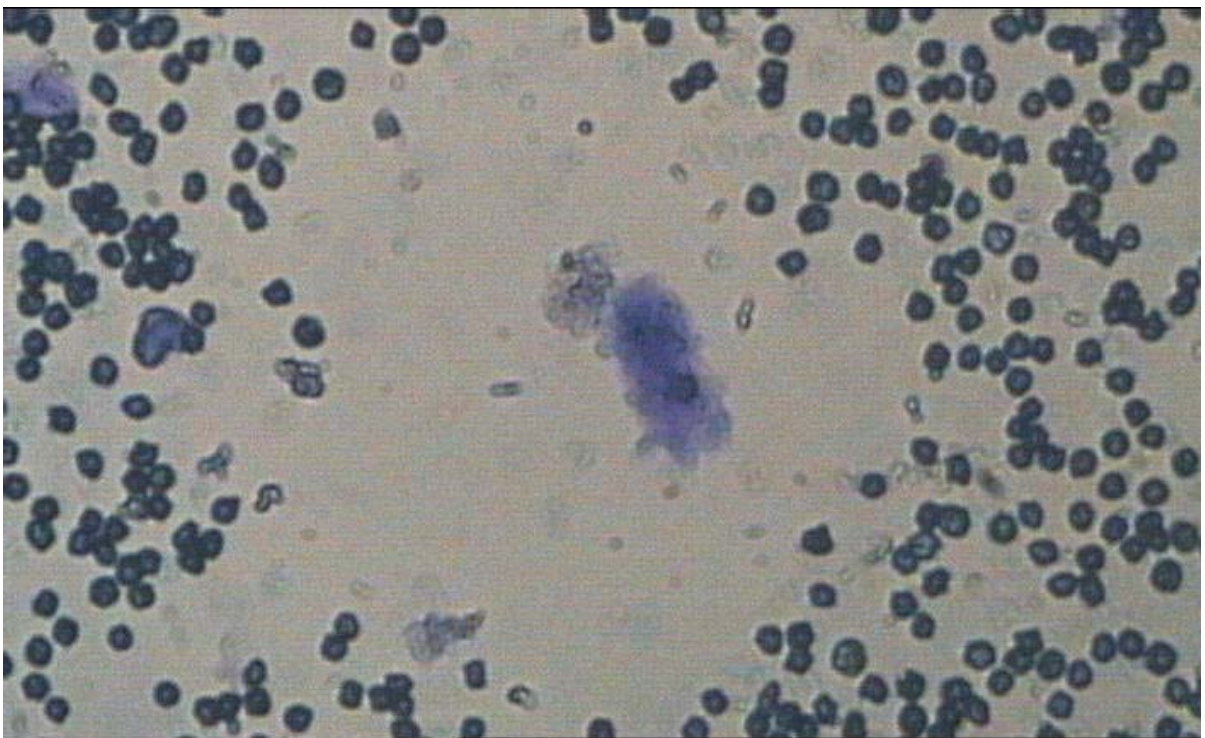


Abb. 5-4: Vergrößerung aus Abbildung 5-3 (40fach vergrößert)

3.4. Reverser hämolytischer Plaque-Assay mit ganzen Ringdrüsen

In keinem Versuch mit ganzen Ringdrüsen konnte eine eindeutige Plaquebildung nachgewiesen werden. Erythrozytenfreie Säume um die Ringdrüsen bestanden schon zu Beginn der Inkubation mit Antiserumlösung, so dass diese nicht als Ergebnis der Inkubation gewertet werden können (Abb. 5-5).

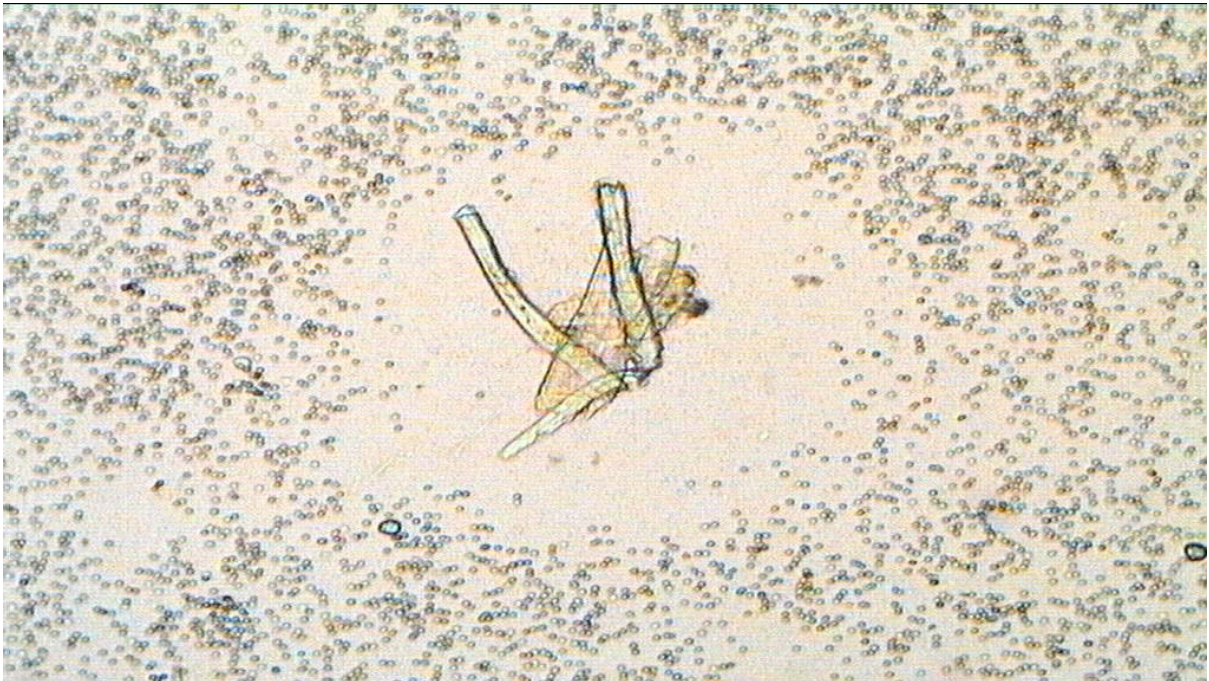


Abb. 5-5: Hämolytischer Plaque-Assay mit ganzer Ringdrüse (5fach vergrößert)

5.5. Sequentieller reverser hämolytischer Plaque-Assay mit ganzen Ringdrüsen

Auch nach Modifikation des Versuchsablaufs im Sinne des von NEILL et al. (1983) beschriebenen sequentiellen hämolytischen Plaque-Assays war unter Verwendung ganzer Ringdrüsen keine Plaquebildung zu beobachten.

5.6. Reverser hämolytischer Plaque-Assay mit Pflanzensamen

Bei der Verwendung von gemörserten Pflanzensamen von *Xenophyllum tenax* und *Chenopodium album* war keine Auswertung der Experimente möglich, da die Erythrozyten bereits bei Inkubation der Cunningham-Kammer mit dem Gemisch aus Schafserythrozyten und Pflanzensamen lysiert wurden. Bei *Xenophyllum tenax* bestand zu Versuchsende noch ein angedeuteter Erythrozytenrasen ohne Hinweise auf Hämolysehöfe, bei *Chenopodium album* war kein Erythrozytenrasen nachweisbar.

5.7. Wirkung von Forskolin auf die Sekretion der Ringdrüsenzellen

Forskolin ist ein natürlich vorkommendes Diterpen, das einen direkten stimulierenden Effekt auf die Adenylat-Cyclase hat und zur Untersuchung cAMP-abhängiger physiologischer Prozesse verwendet wird. Forskolin wirkt außerdem cAMP-unabhängig auf eine Reihe von membranständigen Transportproteinen (LAURENZA et al., 1989). Forskolin wirkt stimulierend auf die Ecdysonsekretion von Zellen der Ringdrüse von *Calliphora vicina*.

Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Zugabe von Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Größe der hämolytischen Plaques um die Ringdrüsenzellen herum. Zudem kam es bei mehreren Versuchen zu einer unspezifischen Lyse der Erythrozyten mit Ausdünnung des Zellrasens. In Kontrollexperimenten mit DMSO, dem für das Forskolin verwendeten Lösungsmittel, zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Hämolyse, die jedoch erst nach Zugabe von Komplementlösung eintrat. Ohne Zugabe von Ringdrüsenzellen kam es zu keiner unspezifischen Hämolyse nach Zugabe von DMSO oder Forskolinlösung.

5.8. Wirkung von Isobutylmethylxanthin (IBMX) auf die Sekretion der Ringdrüsenzellen

IBMX ist ein nicht spezifischer Inhibitor von cAMP- und cGMP-Phosphodiesterasen. Es hat außerdem eine antagonistische Wirkung am Adenosinrezeptor.

Unter Zugabe von IBMX konnte in keinem Versuch eine Plaquebildung festgestellt werden. IBMX zeigte keinen negativen Effekt auf die Ausbildung eines dichten Erythrozytenrasens.

5.9. Kontrollexperimente

3.9.1. Verwendung von Medium 199 anstelle von Antiserum

Bei Verwendung von Medium 199 anstelle der Antiserumlösung kam es in keinem der vier Experimente zu einer Plaquebildung (Abb. 5-6).

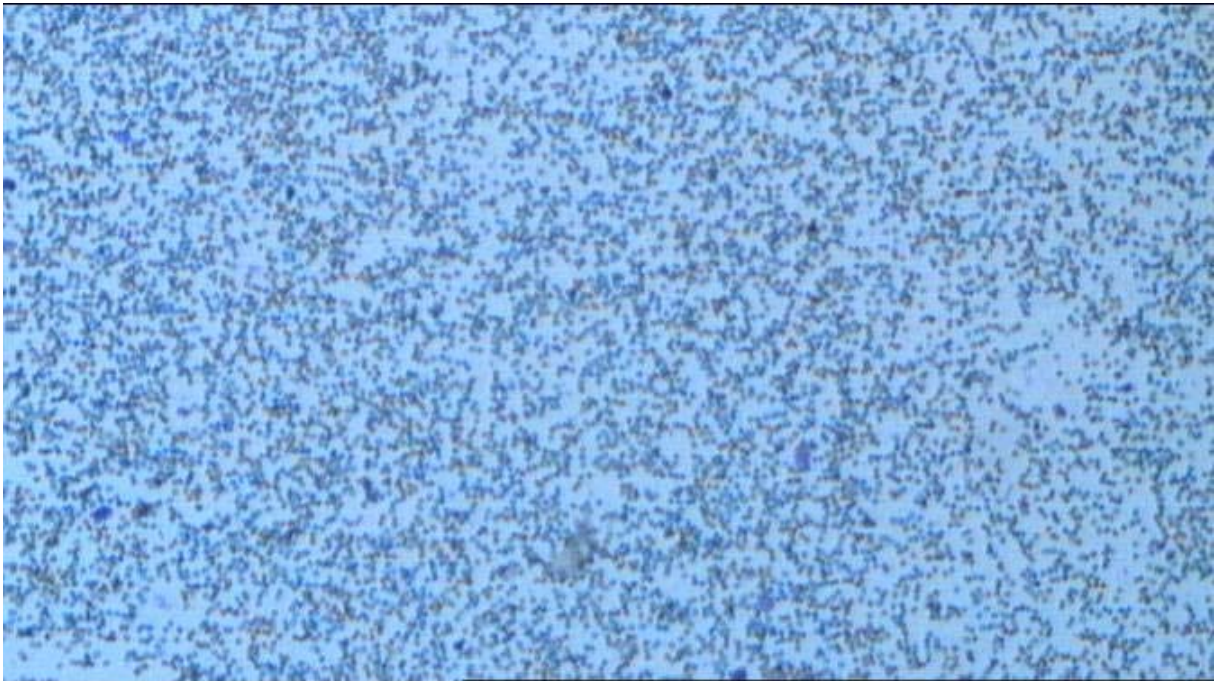


Abb. 5-6: Hämolytischer Plaque-Assay mit Ringdrüsenzellen und Medium 199 statt Antikörperlösung (10fach vergrößert)

5.9.2. Verwendung von Medium 199 anstelle von Komplement

Nach Ersetzen der Komplementlösung durch Medium 199 konnte in keinem Experiment eine Plaquebildung nachgewiesen werden (Abb. 5-7). Im Verlauf wurde die Verwendung von Medium 199 anstelle der Komplementlösung als Kontrolluntersuchung in jedem Experiment verwendet. Eine Plaquebildung ohne Verwendung von Komplementlösung konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

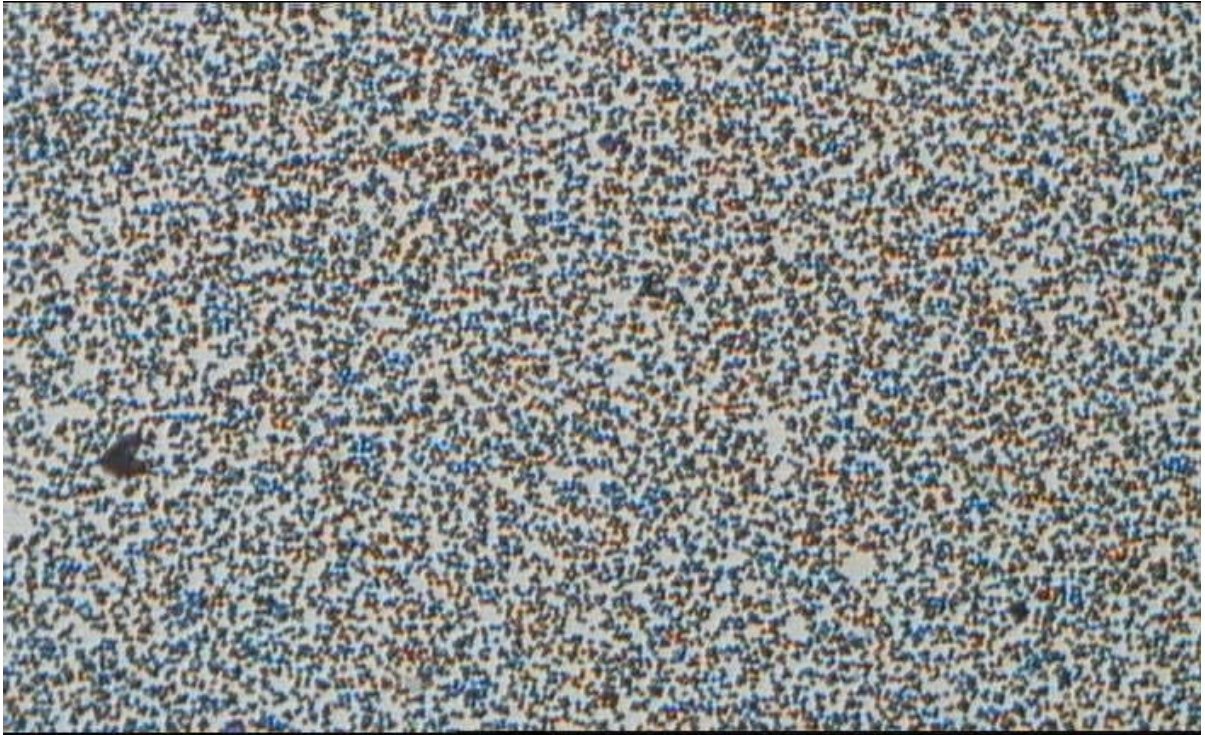


Abb. 5-7: Hämolytischer Plaque-Assay mit Ringdrüsenzellen und Medium 199 statt Komplementlösung (10fach vergrößert)

5.9.3. Verwendung von anderen Geweben / keinem Gewebe anstelle von Ringdrüsenzellen

Sowohl bei Verwendung von Gewebe aus dem Fettkörper oder den Malpighischen Gefäßen der Larven als auch bei der Durchführung des reversen hämolytischen Plaque-Assays ohne Zugabe von Ringdrüsenzellen kam es zu keiner Plaquebildung.

5.9.4. Durchführung des reversen hämolytischen Plaque-Assays mit ungecoateten Erythrozyten

Bei dem Einsatz ungecoateter Erythrozyten kam es in keinem der drei Versuche zu einer Ausbildung hämolytischer Plaques.

5.9.5. Durchführung des reversen hämolytischen Plaque-Assays mit Zellen aus Ringdrüsen von Larven früherer Larvenstadien

Die Untersuchung von Ringdrüsenzellen aus Larven am fünften Tag nach Eiablage führte nicht zum Nachweis von hämolytischen Plaques. Am siebten Tag nach Eiablage konnte bei Ringdrüsenzellen von Larven derselben Zucht eine eindeutige Plaquebildung nachgewiesen werden.

6. Diskussion

6.1. Vorbemerkung

Ziel der Arbeit war es zu zeigen, dass der reverse hämolytische Plaque-Assay zur Nachweis Ecdysteroid sezernierender Zellen geeignet ist.

Auf Grundlage der vorhandenen Literatur wurde die Methode in unserem Labor etabliert. Eine Visualisierung der Ecdysteroidsekretion durch die Bildung hämolytischer Plaques gelang. Es wurde mehrere Kontrollexperimente durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Aspekte der Methode sowie die Ergebnisse der Experimente und Kontrollexperimente kritisch diskutiert und Perspektiven für weitere Untersuchungen aufgezeigt.

6.2. Larvenzucht und Präparation

Die Zucht der Larven von *Calliphora vicina* sowie die Präparation der Ringdrüsen erfolgten unter standardisierten Bedingungen. Trotzdem ist eine Kontamination des verwendeten Zellmaterials mit wenigen Zellen anderer Organe oder des Bindegewebes der Larven nicht völlig auszuschließen. Von größerer Bedeutung für die Versuchsergebnisse scheint zu sein, dass die Larven sich nicht völlig synchron entwickeln. Dadurch kann in einzelnen Versuchen die Phase aktiver Ecdysteroidausschüttung verpasst worden sein. Eine sichere Standardisierung des Entwicklungsalters der Larven ist mit erhöhtem Aufwand möglich, für die Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit jedoch nicht unbedingt notwendig. Die Variabilität der Ergebnisse lässt sich dadurch ausreichend erklären.

Ringdrüsen von Larven des 7. Tages von *Calliphora vicina* sezernieren *in vitro* nachweisbare Mengen von Ecdysteroiden. Die Sekretion zeigt während der ersten 6 Stunden nach Präparation ein lineares Verhalten und nimmt dann kontinuierlich ab (KÄUSER et al., 1988).

Prothorakaldrüsen können mehrere Stunden in Medium 199 inkubiert werden (RICHTER et al., 1997).

KOMIYA et al. (1998) wiesen nach, dass Ringdrüsen von *Pseudaletia separata* in Kultur ein vom verwendeten Medium abhängiges Sekretionsverhalten aufweisen.

Hierbei zeigte sich jedoch eine von den Kulturmedien unabhängige Sekretion in den ersten zwei Stunden nach Präparation. Eine Zugabe von Cholesterol als Substrat der Ecdysonbiosynthese war nicht notwendig. Bei einzelnen Drüsen zeigte sich eine nachweisbare Sekretion bis zu 24 Stunden nach Präparation (KOMIYA et al., 1998). Somit ist auch in unseren Experimenten von einer Ecdysonsekretion der präparierten Drüsen auszugehen.

6.3. Vereinzelung der Zellen

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Vereinzelung von Zellen aus Zellverbänden angegeben. In unseren Untersuchungen erwies sich sowohl die Verwendung von Trypsin als auch von Kollagenase als praktikabel. Ein Einfluss auf die Versuchsergebnisse zeigte sich nicht. In der Literatur werden zur Durchführung des hämolytischen Plaque-Assays ebenfalls beide Methoden verwendet (BURRIS et al., 1992, CAI et al., 1998). Ein Einfluss des verwendeten Enzyms auf das Sekretionsverhalten von einzelnen Zellen der Ringdrüse von *Calliphora vicina* ist bisher nicht untersucht worden.

Die Verwendung von Kollagenase in der Mehrzahl unserer Versuche erfolgte aus Praktikabilitätsgründen sowie zur Verbesserung der Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsergebnisse.

6.4. Der reverse hämolytische Plaque-Assay

In den von uns durchgeführten Experimenten zeigt sich, dass der Nachweis Ecdysteroid produzierender Zellen mithilfe des reversen hämolytischen Plaque-Assays möglich ist. Die Methode des reversen hämolytischen Plaque-Assays ist ausreichend etabliert und gehört zu den etablierten, wenn auch anspruchsvollen, endokrinologischen Untersuchungsmethoden (BOOCKFOR et al., 2004; ESCAMILLA-CHIMAL et al., 2002; KANYICKSKA et al., 2001). Alle Arbeiten beziehen sich auf die ursprünglich von NEILL et al. (1983; 1987) beschriebene Methodik, wobei unterschiedliche Modifikationen der Technik des RHPA entwickelt worden sind. Ein umfangreicher Literaturvergleich (u.a. BURRIS et al., 1992, LEONG et al., 1985, HERRERA et al., 1993) zeigte in allen Arbeiten einen prinzipiell gleichen Ablauf des RHPA. Es wurden lediglich unterschiedliche Waschlösungen (DMEM oder Saline) und unterschiedliche

Inkubationszeiten mit dem Antiserum (1-12 Stunden) und der Komplementlösung (30-120 Minuten) verwendet. Die Zeit der Inkubation mit Komplementfaktoren hat Einfluss auf die Größe und Anzahl der hämolytischen Plaques. Bei längeren Inkubationszeiten (15-22 Stunden) kommt es jedoch zu einer Zunahme einer diffusen Hämolyse der Erythrozyten, die eine Auswertung erschwert (VILA-PORCILE et al., 2000). Die Konzentration der Komplementlösung betrug zwischen 1:100 und 1:30.

In keiner der Arbeiten werden spezifische Begründungen für die Modifikation der Ursprungsanleitung genannt. Diese beruhen auf individuellen Erfahrungen der einzelnen Labors. Die Daten sind jedoch vor allem in Untersuchungen von Peptidhormonen erhoben worden. Zum Nachweis der Sekretion von Steroidhormonen liegt bisher nur eine Arbeit von PINO et al. (1992) vor.

Wir orientierten uns in unseren Versuchen an den am häufigsten angewendeten Modifikationen des Versuchsablaufs.

In mehrfach durchgeführten Versuchen war eine deutliche Plaquebildung zu dokumentieren, die bei verschiedenen Kontrolluntersuchungen nach Modifikation der Versuchsdurchführung nicht auftrat. Die Gesamtzahl der nach Etablierung der Methode durchgeführten Untersuchungen mit 31 ist jedoch zu gering, um genügend Daten zur Feststellung der Sensitivität und Spezifität der Untersuchungsmethode zu erhalten. Hier sind weitere Versuche notwendig. Diese wurde bisher nur bei der Untersuchung von Peptidhormonen überzeugend gezeigt. Bei Verwendung von spezifischen Antiseren ist aber eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität in der Untersuchung von Peptid- und Steroidhormonen sehr wahrscheinlich.

Die Sekretion von Ecdysteroiden aus Zellen der Ringdrüsen von *Calliphora vicina* ist gesichert. JIANG et al. (1999) wiesen bei einzelnen Ringdrüsen von *Calliphora vicina* am sechsten Tag nach Eiablage eine Sekretion von 1317 ± 138 pg Ecdyson in 2 Stunden nach. Bei den von uns verwendeten Antiseren handelt es sich um etablierte Seren, deren Spezifität zum Nachweis von Ecdysteroiden in mehreren unabhängigen Arbeiten nachgewiesen worden ist (REUM et al., 1989).

In unseren Untersuchungen sind bisher nur sehr wenige Zellarten untersucht worden. Der Nachweis einer Ecdysteroidsekretion mittels des RHPA gelang nur bei Zellen der Ringdrüse von *Calliphora vicina*. Somit bleibt die Verwendbarkeit des Assays für die Untersuchung anderer Ecdysteroid produzierender Zellen Gegenstand weiterführender Untersuchungen. In der Literatur ist ein Nachweis der Peptidhormonsekretion mithilfe des RHPA aus den unterschiedlichsten Zelltypen wie z. B. humanen Inselzellen (CHAN

et al., 2002), Zellen der Rattenhypophyse (CAI et al., 1998) oder Leydig-Zellen der Ratte (PINO et al., 1992) beschrieben.

Der Nachweis von hämolytischen Plaques gelang in unseren Versuchen nur mit einem bestimmten Antikörper, dem DBL-1-Antikörper. Somit wurden nach den Vorversuchen die anderen Experimente mit diesem Antikörper durchgeführt, um die grundsätzliche Anwendbarkeit des RHPA zum Nachweis Ecdysteroid sezernierender Zellen zu zeigen. Das Muster der in unserer Versuchsreihe sezernierten Ecdysteroiden wurde nicht untersucht. Die Ursache der fehlenden Plaquebildung bei den anderen untersuchten Antikörpern liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Spezifität der verwendeten Antiseren.

Eine Erklärung für die fehlende Plaquebildung bei Verwendung anderer spezifischer Antikörper könnte aber auch in der fehlenden Bindung dieser Antikörper an die mit Protein A beschichteten Schafserythrozyten oder an einer Beeinflussung der Bindungsfähigkeit dieser Antikörper für Ecdysteroiden durch die Bindung an Protein A liegen. Dies wurde von uns bisher nicht untersucht. HERRERA et al. (1993) berichten über Schwierigkeiten der Durchführung des RHPA bei der Verwendung von Antikörpern, die in größeren Tieren hergestellt worden sind, da sie nur schlecht oder gar nicht an Protein A binden. Daher führte die Gruppe um HERRERA den RHPA unter Verwendung von Protein G (1,0 mg/ml, Sigma) durch, ohne den sonstigen Versuchsablauf zu ändern, und erzielte eine Bildung hämolytischer Plaques mit Antikörpern, die in der Ziege hergestellt worden sind.

Die in unseren Versuchen verwendeten Antikörper wurden in Schafen hergestellt. Somit könnte die Verwendung von Protein G anstelle von Protein A die Verwendung anderer spezifischer Antikörper gegen Ecdysteroiden ermöglichen.

6.5. Kontrolluntersuchungen

Für die Bildung hämolytischer Plaques können auch andere Mechanismen verantwortlich sein. Daher ist in Kontrolluntersuchungen zu untersuchen, ob die verwendeten Chemikalien selbst eine hämolytische Wirkung auf Schafserythrozyten haben und zu einer diffusen Hämolyse führen. Dies war in unseren Experimenten mit Pflanzensamen sowie mit Forskolin der Fall. Auf diese Untersuchungen wird im

Weiteren gesondert Bezug genommen. In allen anderen Kontrollexperimenten kam es zu keiner diffusen Hämolyse.

Eine weitere Möglichkeit für eine unspezifische Hämolyse besteht in einer bakteriellen Besiedelung der Medien. Daher werden in vielen Untersuchungen in der Literatur Antibiotika in die verwendeten Medien gegeben. Eine Plaquebildung durch bakterielle Besiedelung trat in unseren Experimenten nicht auf. Diese sollte unabhängig vom Versuchsablauf auch in den Kontrollexperimenten zu beobachten sein. Die Zeit zwischen der Präparation der Ringdrüsenzellen und der Verwendung des Materials im RHPA war in unseren Versuchen sehr kurz. Bei Modifikation dieser Abläufe sollte eine Zugabe von Antibiotika zu den verwendeten Medien erwogen werden.

Wir untersuchten die Spezifität der Plaquebildung in dem RHPA durch verschiedene Kontrollexperimente, die auch von anderen Autoren verwendet wurden (NEILL et al., 1987; PINO et al., 1992). In keinem der Kontrollexperimente kam es zu einer Plaquebildung. Nachgewiesen wurden die Notwendigkeit von Antiserum und Komplement für die Bildung hämolytischer Plaques. Außerdem führte die Verwendung von anderem Gewebe oder von Ringdrüsen eines früheren Larvenstadiums zu keiner Plaquebildung.

Als ergänzende Kontrolluntersuchungen könnten in weiteren Versuchsreihen der Nachweis der Protein A -Bindung und damit der Antikörperbindung an die Schafserythrozyten z.B. mit radioaktiv markiertem Hormon (NEILL et al., 1987) sowie der Nachweis der Spezifität der Antikörper durch Präinkubation des Antiserums mit homologem Antigen (FELIX et al., 1993; PORTER et al., 1995) durchgeführt werden. Eine Abhängigkeit der Plaquebildung von sekretionsfördernden oder –hemmenden Stoffen zum Nachweis einer tatsächlichen Steroidhormonsekretion *versus* Hormonfreigabe nach Zytolyse (NEILL et al., 1987) wurde von uns bisher nicht untersucht. Die Methode bietet hier ein hilfreiches Untersuchungsinstrument, um diese Frage experimentell anzugehen.

Die von uns durchgeführten Kontrolluntersuchungen sind unserer Ansicht nach jedoch ausreichend, da der reverse hämolytische Plaque-Assay nach mehrfach vorgeschriebenem Ablauf durchgeführt wurde und die Ligandenpezifität des verwendeten Antikörpers DBL-1 bereits hinreichend gezeigt wurde (REUM et al., 1989). Der Einfluss Steroid sekretionsfördernder oder –hemmender Faktoren wird

Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein. Lichtmikroskopische Hinweise auf eine Zytolyse der Ringdrüsenzellen ergaben sich nicht.

Als ein weiteres Kontrollexperiment wäre der Nachweis einer Plaquebildung bei Durchführung des Assays unter Verwendung einer mit ecdysonhaltiger Flüssigkeit gefüllten Kapillare oder eines mit ecdysonhaltiger Lösung getränkten Agar-Agar- oder Polyacrylamidgels denkbar.

6.6. Wirkung von Forskolin

In den durchgeführten Experimenten konnte nach Zugabe von Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen kein Einfluss auf die Größe der hämolytischen Plaques nachgewiesen werden. Es trat jedoch in manchen Versuchsreihen eine unspezifische Hämolyse auf.

Die stimulierende Wirkung von Forskolin auf die Ecdysonsekretion wurde in anderen Arbeiten mit anderen Methodiken unter Verwendung ganzer Ringdrüsen eindeutig belegt. Unklar ist die Beeinflussung dieser Wirkung durch die in unseren Experimenten verwendeten Medien sowie die Wirkungsweise von Forskolin bei der Verwendung einzelner Drüsenzellen. Forskolin beeinflusst die Ionenpermeabilität von menschlichen Erythrozyten (LONDON et al., 1993). GONCALVES et al. (1987) konnten zeigen, dass Forskolin bei Rattenerthrozyten einen antihämolytischen Effekt besitzt. HORVATH et al. (1999) und HOLL et al. (1989) untersuchten jedoch in ihren Arbeiten die Wirkung von Forskolin auf Signaltransduktionssysteme unter Verwendung des reversen hämolytischen Plaque-Assays und berichten nicht von technischen Problemen.

Das in den Versuchen verwendete Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) führt bei intravenöser medizinischer Anwendung in Einzelfällen zu einer intravaskulären Hämolyse, deren Mechanismus bisher nicht gut geklärt worden ist (SWANSON 1985). Ähnliche Effekte könnten in unseren Experimenten eine Rolle spielen.

Bei Verwendung des reversen hämolytischen Plaque-Assays zur Untersuchung der Forskolinwirkung auf die Sekretion von Ecdyson aus Zellen der Ringdrüse sollte eine erneute Testung der Wirkung von Forskolin sowie der verwendeten Lösungsmittel auf die Hämolyse von Schafserythrozyten erfolgen.

Grundsätzlich erscheint der RHPA jedoch eine geeignete Methode zur Untersuchung der Beeinflussung der Ecdysteroidsekretion einzelner Zellen zu sein.

6.7. Fotografische Dokumentation und Auswertung

Die Dokumentation erfolgte als Fotodokumentation mit einem Online-Mikroskop, welches bei standardisierten Einstellungen den Vergleich der Plaquebildung in verschiedenen Versuchsreihen ermöglicht. Der Zusammenhang zwischen Plaquegröße und Sekretionsmenge ist in der Literatur mehrfach gezeigt worden. Hierbei berichten einzelne Autoren jedoch von einer großen Interassay-Variabilität der Plaquegrößen und bewerten nur qualitative Änderungen der Hormonsekretion oder der Anzahl der sezernierenden Zellen (KANDEEL et al., 1997). Üblicherweise verwendete Kriterien zur Feststellung einer Plaquebildung sind ein Hämolysehof, der größer als der doppelte Durchmesser der Erythrozyten ist (NEILL et al., 1983; SMITH et al., 1986).

Die Dokumentation der Plaquebildung in kürzeren zeitlichen Abständen ermöglicht die Beurteilung der Sekretionsdynamik (sequentieller reverser hämolytischer Plaque-Assay nach NEILL et al., 1983). Diese Versuche wurden von uns bisher nur mit ganzen Ringdrüsen durchgeführt und waren nicht auswertbar. Eine Untersuchung der Sekretionsdynamik mit einzelnen Zellen sollte jedoch möglich sein.

Eine Fixation der Präparate ist möglich. In der Literatur wurde mehrfach über die Verwendung des untersuchten Zellmaterials für Folgeversuche wie immunzytochemische Färbungen (CHAN et al., 1998) oder *in-situ*-Hybridisation (SUN et al., 1993) berichtet. Die Versuche wurden von uns noch nicht durchgeführt, ermöglichen jedoch die Beantwortung weiterer Fragestellungen. So könnte untersucht werden, ob alle Ecdysteroid produzierenden Zellen diese auch sezernieren und ob es einen Zusammenhang zwischen gespeicherter und sezernierter Ecdysteroidmenge gibt.

6.8. Praktikabilität

Die Versuchsdauer des reversen hämolytischen Plaque-Assays beträgt (ohne Larvenzucht und Drüsenpräparation) etwa 5 Stunden. Somit handelt es sich bei Vorhandensein des zu untersuchenden Zellmaterials um eine praktikable Methode, die nach Anleitung problemlos von technischen Assistenten durchgeführt werden kann. Die Auswertung ist durch die Fotodokumentation auch zeit- und ortsungebunden möglich. Wichtig ist die sorgfältige Herstellung des Erythrozytenrasens in der Cunningham-Kammer, von der die Güte der Ergebnisse maßgeblich abhängt. Als Geräte können

üblicherweise vorhandene Laborgeräte genutzt werden. Möglichkeiten der Automatisierung des reversen hämolytischen Plaque-Assays sind bisher nicht beschrieben worden. Eine automatische Auswertung durch Bilderkennungsalgorithmen wäre jedoch denkbar.

6.9. Erkenntnisgewinn

Der reverse hämolytische Plaque-Assay ist zum Nachweis Ecdysteroid sezernierender Zellen nutzbar. Er ermöglicht vielfältige Untersuchungen der Sekretion von Ecdysteroiden in verschiedenen Organismen in verschiedenen Stadien der Entwicklung, sowie eine eindeutige Zuordnung der Sekretion zu einzelnen Zelltypen und die Untersuchung von Einflussfaktoren auf Sekretionsmenge und –dynamik.

Die bisherigen Untersuchungsmethoden quantifizierten die Menge des von einer isolierten Drüse sezernierten Hormons oder beschrieben die Menge des innerhalb einer Zelle synthetisierten Hormons oder der spezifischen mRNA. Beide Methoden erlaubten keinen Aufschluss über das Sekretionsverhalten einzelner Zellen. Auch die Wirkung von inhibierenden oder stimulierenden Faktoren wurde bisher nur im Hinblick auf die Gesamtmenge eines von einer Drüse sezernierten Hormons beschrieben, wobei die Bedeutung einzelner Zellen der Drüse unklar blieb.

Außerdem ermöglicht der hämolytische Plaque-Assay die Untersuchung verschiedener Zelltypen in demselben Untersuchungssystem, da jeweils die Sekretion der einzelnen Zelle und nicht lediglich ein Summationseffekt beurteilt werden kann.

6.10. Ausblick

Nach Etablierung der Methode des reversen hämolytischen Plaque-Assays zum Nachweis der Ecdysteroidsekretion einzelner Zellen ergibt sich eine große Zahl von Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung verschiedenster Fragestellungen. Diese sollen im Folgenden skizziert und diskutiert werden.

Mit Hilfe des reversen hämolytischen Plaque-Assays kann die Ecdysteroidsekretion verschiedener Gewebearten untersucht werden.

So ist z. B. die Fähigkeit von Zellen des Nervensystems von Insekten, Ecdysteroide zu synthetisieren, eine kontrovers diskutierte Frage (WARREN et al., 1999).

Ecdysteroide spielen auch in der Reifung der Oocyten eine Rolle. Der direkte Nachweis einer Produktion und Sekretion von Ecdyson in den Ovarien ist bisher jedoch nicht gelungen (SUBRAMONIAM, 2000). Untersuchungen mit temperatursensitiven ecdysteroiddefizienten Mutanten von *Drosophila* haben gezeigt, dass Ecdysteroide wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Oogenese und Fertilität von *Drosophila* besitzen (KOZLOVA et al., 2000). Es konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden, ob die Ecdysteroide von den Follikell- oder Thekazellen synthetisiert und sezerniert oder ob lediglich inaktive Vorstufen des Ecdysons aktiviert werden. Zur Klärung dieser Fragestellung könnte der RHPA eine hilfreiche Untersuchungsmethode sein.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des RHPA ist die Untersuchung parakriner Mechanismen in der Regulation der Sekretion einzelner Drüsenzellen. Durch eine unterschiedlich dichte Verteilung der vereinzelt Zellen in der Cunningham-Kammer könnte der Einfluss der Distanz der einzelnen Zellen voneinander auf die Sekretionsmenge und -dynamik untersucht werden.

Phytoecdysteroide sind Analoga der Insektenhormone, die in einer Vielzahl von Pflanzenspezies auftreten. Bisher sind mehr als 200 verschiedenen Ecdysteroide isoliert worden. Biologisch wirksam sind die Phytoecdysteroide wahrscheinlich als Toxin oder Auslöser einer Nahrungsunverträglichkeit zur Abwehr nicht adaptierter Insekten (DINAN et al, 2001). Eine Toxizität für Säugetiere ist bisher nicht nachgewiesen worden. Insektizide haben eine große gesamtwirtschaftliche Bedeutung. Die Forschung an wirksamen Substanzgruppen, die keine schädigende Wirkung auf den Menschen haben, ist daher weiterhin von grosser Aktualität. Ecdysteroidabkömmlinge stellen eine mögliche Substanzgruppe dar, die diese Voraussetzungen erfüllt. Die genauere Aufklärung von Synthesorten und der Regulation der Ecdysonsekretion könnte neue Wege der Insektenbekämpfung eröffnen.

Unklar ist bisher, wie und in welchen Zellen die Biosynthese und Sekretion der Ecdysteroide in Pflanzen erfolgt (DINAN, 2001). Hierbei könnten Untersuchungen mit dem RHPA ebenfalls hilfreich sein. Die von uns durchgeführten Experimente mit Pflanzensamen zeigen jedoch die methodischen Schwierigkeiten, die mit der Durchführung dieser Experimente einhergehen, da möglicherweise andere Bestandteile

der Samen oder Pflanzenteile eine hämolytische Wirkung zeigen. Untersuchungen an Phytoecdysteroiden führen jedoch möglicherweise zu völlig neuen Ansätzen in der Schädlingsbekämpfung oder eröffnen in der Humanmedizin neue therapeutische Optionen.

Ein weiterer Einsatzort der Beeinflussung der Ecdysteroidsekretion ist die Bekämpfung von Vektoren der Übertragung von Tropenkrankheiten. So führt z. B. Azadirachtin zu schweren Fehlentwicklungen des mittleren Darmabschnitts und beeinflusst damit das Überleben und die Infektionsfähigkeit der Trypanosomen (GONZALES et al., 1999).

Bisher weitgehend unbekannt sind mögliche pharmakologische Wirkungen von Ecdysteroiden. In Einzelpublikationen sind verschiedene Beobachtungen geschildert worden (Ausführliche Übersicht bei LAFONT et al., 2003). So beschrieben z. B. HANAYA et al (1997) eine antiepileptische Wirkung von 20-Hydroxyecdysen auf tonisch-klonische Krämpfe bei Ratten. Ecdysteroiden mit anaboler Wirkung auf Wirbeltiere sind seit mehreren Jahren als Bestandteil verschiedener Nahrungsergänzungsmittel und Phytopharmaka kommerziell erhältlich (LAFONT et al., 2003). Wissenschaftliche Bestätigungen für die propagierten Effekte stehen jedoch meist aus. Besondere Beachtung finden Ecdysteroiden als anabole Dopingmittel vor allem im osteuropäischen Raum (SLÁMA et al., 1995). Aufgrund der Strukturvielfalt vor allem der Phytoecdysteroiden sind die Ergebnisse weitergehender Untersuchungen zu möglichen pharmakologischen Wirkungen abzuwarten. Das Wissen über die Synthese und Sekretion von Ecdysteroiden könnte somit in Zukunft ebenfalls in der Entwicklung und Herstellung neuer Arzneimittel genutzt werden.

Zusammenfassend ergeben sich für den reversen hämolytischen Plaque-Assay eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in der Untersuchung der Ecdysteroidsekretion. In unseren Untersuchungen konnte die Anwendbarkeit des reversen hämolytischen Plaque-Assay zur Bearbeitung dieser Fragestellungen gezeigt werden.

7. Literaturverzeichnis

Adams TS, Li QJ (1998): Ecdysteroidostatin from the house fly, *Musca domestica*. *Arch Insect Biochem Physiol* 38: 166-176

Bollenbacher WE, Agui N, Granger NA, Gilbert LI (1979): *In vitro* activation of insect prothoracic glands by the prothoracicotropic hormone. *Proc Natl Acad Sci* 76: 5148-5152

Boockfor FR, Fidan M (2004): Reverse hemolytic plaque assays: versatility in the study of secretion. *Methods* 33: 273-280

Brown MR, Graf R, Swiderek KM, Fendley D, Stracker TH, Champagne DE, Lea AO (1998): Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. *J Biol Chem* 273: 3967-3971

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

Burris TB, Nguyen DN, Smith SG, Freeman ME (1992): The stimulatory and inhibitory effects of dopamine on prolactin secretion involve different G-proteins. *Endocrinology* 130: 926-932

Buszcak M, Segraves WA (1998): *Drosophila* metamorphosis: The only way is USP?. *Curr Biol* 8: R879-82

Buszcak M, Segraves WA (2000): Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. *Curr Biol* 10: R830-833

Cai A, Bowers RC, Moore JP, Hyde JF (1998): Function of galanin in the anterior pituitary of estrogen-treated fischer 344 rats: autocrine and paracrine regulation of prolactin secretion. *Endocrinology* 139: 2452-2458

Castano JP, Faught WJ, Glavé EE, Russell BS, Frawley LS (1997): Discordance of prolactin gene transcription, mRNA storage, and hormone release in individual mammothrophs. *Am J Physiol* 272 (*Endocrinol Metab* 35): E390-E396

Chan CB, Saleh MC, Purje A, MacPhail RM (2002): Glucose-inducible hypertrophy and suppression of anion efflux in rat beta cells. *Endocrinology* 173: 45-52

Chang KW, Trager W (1974): Biosynthesis of α -ecdysone by prothoracic glands *in vitro*. *Science* 183: 529-532

Cunningham AJ, Szenberg A (1968): Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology* 14: 599-604

Dai JD, Gilbert LI (1991): Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: A cytophysiological analysis of the ring gland. *Dev Biol* 144: 309-326

De Loof A, Dagherman G, Breuer M, Claeys I, Cerstiaens A, Clynen E, Janssen T, Vanden Broeck J (2001): Gonadotropins in insects: an overview. *Arch Insect Biochem Physiol* 47: 129-138

De Loof A, Huybrechts R (1998): "Insects do not have sex hormones": a myth?. *Gen Comp Endocrinol* 111: 245-60

Dinan L (2001): Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57: 325-339

Dinan L, Savechenko T, Whiting P (2001): On the distribution of phytoecdysteroids in plants. *Cell Mol Life Sci* 58: 1121-1132

Eliasson M, Andersson R, Olsson A, Wigzell H, Uhlen M (1989): Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG. *J Immunol* 142: 575-81

Escamilla-Chimal EG, Hiriart M, Sanchez-Soto MC, Fanjul-Moles ML (2002): Serotonin modulation of CHH secretion by isolated cells of the crayfish retina and optic lobe. *Gen Comp Endocrinol* 125: 283-90

Ezzat S, Walpola IA, Ramyar L, Smyth HS, Asa SL (1995): Membrane-anchored expression of transforming growth factor- α in human pituitary adenoma cells. *J Endocrinol Metab* 80: 534-539

Farkas R, Sutakova G (1998): Ultrastructural changes of *Drosophila* larval and prepupal salivary glands cultured *in vitro* with ecdysone. *In Vitro Cell Dev Biol* 34: 813-823

Felix R, Horta J, Cota G (1993): Comparison of lactotrope subtypes of neonatal and adult male rats: plaque assays and patch-clamp studies. *Endocrinol Metab* 28: E121-E127

Gäde G, Hoffmann KH, Spring JH (1997): Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiol Rev* 77: 963-1032

Gersch M (1964): Neuroendokrine Hormondrüsen. In *Vergleichende Endokrinologie der wirbellosen Tiere*, Geest und Portig, Leipzig

Gilbert LI, Rybczynski R, Tobe SS (1999): Endocrine cascade in insect metamorphosis. In *Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cell* (eds. Gilbert LI, Tata JR, Atkinson BG); Academic Press, San Diego

Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT (2002): Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol* 47:883-916

Gonzales MS, Nogueira NF, Mello CB, De Souza W, Schaub GA, Azambuja P, Garcia ES (1999): Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 92: 100-108

Hanaya R, Sasa M, Ishihara K, Akimitsu T, Iida K, Amano T, Serikawa T, Arita K, Kurisu K (1997): Antiepileptic effects of 20-hydroxyecdysone on convulsive seizures in spontaneously epileptic rats. *Jpn J Pharmacol* 74: 331-335

Herrera MF, Grant CS, Maercklein P, Heerden JA, Fitzpatrick LA (1993): Hormone secretion by normal human parathyroid cells *in vitro*: Characterization by the reverse hemolytic plaque assay. *Surgery* 113: 410-418

Holl RW, Thorner MO, Leong DA (1988): Intracellular calcium concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes: effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 122: 2927-2932

Holl RW, Thorner MO, Leong DA (1989): Cytosolic free calcium in normal somatotropes: effects of forskolin and phorbol ester. *Am J Physiol* 256: E375-379

Horvarth KM, Radnai B, Bela TE, Fekete MI, Nagy GM (1999): Inhibition of protein phosphatase 2A (PP2A) mimics suckling-induced sensitization of mammatropes: involvement of a pertussis toxin (PTX) sensitive G-protein and the adenylate cyclase (AC). *Mol Cell Endocrinol* 149: 1-7

Hua YJ, Jiang RJ, Koolman J (1997): Multiple control of ecdysone biosynthesis in blowfly larvae: Interaction of ecdysiotropins and ecdysioistatins. *Arch Insect Biochem Physiol* 35: 125-134

Jerne NK, Henry C, Nordin AA, Fuji H, Koros AMC, Lefkovits I (1974): Plaque forming cells: methodology and theory. *Transplant Rev* 18: 130-191

Jia LG, Canny BJ, Leong DA (1992): Paracrine communication regulates adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology* 130: 534-539

Jiang RJ, Koolman J (1999): Feedback inhibition of ecdysteroids: evidence for a short feedback loop repressing steroidogenesis. *Arch Insect Biol Physiol* 41: 54-59

Kandeel FR, Swerdloff RS (1997): The interaction between β -endorphin and gonadal steroids in regulation of luteinizing hormone (LH) secretion and sex steroid regulation of LH and proopiomelanocortin peptide secretion by individual pituitary cells.

Endocrinology 138: 649-656

Kanyicska B, Sellix MT, Freeman ME (2001): Autocrine regulation of prolactin secretion by endothelins: a permissive role for estradiol. *Endocrine 16: 133-137*

Käuser G, Brandtner HM, Bidmon HJ, Koolman J (1988): Ecdysone synthesis and release by the brain-ring gland complex of blowfly larvae. *J Insect Physiol 34: 563-569*

Kineman RD, Aleppo G, Frohman LA (1996): The tyrosine hydroxylase-human growth hormone (GH) transgenic mouse as a model of hypothalamic GH deficiency: growth reduction in somatotrope numbers despite normal somatotrope function.

Endocrinology 137: 4630-4636

Komiya K, Agui N, Mitsuhashi J (1998): Effect of culture medium on the *in vitro* secretion activity of prothoracic glands from *Pseudaletia separata*. *Arch Insect Biochem Physiol 38: 147-154*

Kozlova T, Thummel CS (2000): Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab 11: 276-280*

Lafont R (1997): Ecdysteroids and Related Molecules in Animals and Plants. *Arch Insect Biochem Physiol 35: 3-20*

Lafont R, Dinan L (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Science 3: 1-30*

Laurenza A, Sutkowski EM, Seamon KB (1989): Forskolin: a specific stimulator of adenyl cyclase or a diterpen with multiple sites of action?. *Trends Pharmacol Sci 10: 442-447*

Leong LA, Lau SK, Sinha YN, Kaiser DL, Thorner MO (1985): Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture: evidence in favor of a mammosomatotrope subpopulation in the rat. *Endocrinology* 116: 1371-1378

Li W, Vedrovà A, Sehnal F (1997): Humoral stimulation of the larval and adult prothoracic glands in *Schistocerca gregaria*. *Arch Insect Biochem Physiol* 36: 85-93

Loeb MJ, De Loof A, Gelman DB, Hakim RS, Kochansky JP, Meola SM, Schoofs L, Steel C, Vafopoulou X, Wagner RM, Woods CW (2001): Testis ecdysiotropin, an insect gonadotropin that induces synthesis of ecdysteroid. *Arch Insect Biochem Physiol* 47:181-188

Lynn DE, Feldlaufer MF, Lusby WR (1987): Isolation and identification of 20-hydroxyecdysone from a lepidopteran continuous cell line. *Arch Insect Biochem Physiol* 5: 71-79

Marks EP (1971): Cultivation of insect endocrine glands *in vitro*. *Curr Top Microbiol Immunol* 55: 75-85

Meurant K, Sernia C (1993): The ultrastructure of the prothoracic gland/corpus allatum/corpus cardiacum ring complex of the Australian sheep blowfly larva *Lucilia cuprina* (Wied.) (Insecta:Diptera). *Insect Biochem Molec Biol* 23: 47-55

Molinaro GA, Eby WC, Molinaro CA (1981): The reverse plaque-forming cell assay; In "*Methods in Enzymology*" (P.M. Conn, ed.), Vol. 73: 326-338, Academic Press, Orlando, Florida

Mouihate A, Verrier D, Lestage J (1996): EGF release by gonadotroph cells: characteristics and effects of LHRH. *Life Sciences* 58: 107-114

Mu X, LeBlanc GA (2002): Environmental antiecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *J Exp Zool* 292: 287-292

Neill JD, Frawley LS (1983): Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 112: 1135-1138

Neill JD, Smith PF, Luque EH, Munoz de Toro M, Nagy G, Mulchahey JJ (1987): Detection and measurement of hormone secretion from individual pituitary cells. *Prog Horm Res* 43: 175-229

Pino AM, Inostroza H, Valladares LE (1992): Detection of testosterone secretion from individual rat leydig cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 41: 167-170

Porter TE, Couger GS, Dean CE, Hagsis BM (1995): Ontogeny of growth hormone (GH)-secreting cells during chicken embryonic development: initial somatotrophs are responsive to GH-releasing hormone. *Endocrinology* 136: 1850-1856

Rees HH (1995): Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function, *Eur J Entomol* 92: 9-39

Reum L, Koolman J (1979): Analysis of ecdysteroids by radioimmunoassay: Comparison of three different antisera. *Insect Biochem* 9: 135-142

Reum L, Haustein D, Koolman J (1981): Immunoabsorption as a means for the purification of low molecular weight compounds: Isolation of ecdysteroids from insects. *Z Naturforsch* 36c: 790-797

Reum L, Käuser G, Enderle U, Koolman J (1982): A steroid-binding protein from insect haemolymph isolated by photoaffinity labelling and immunoabsorption. *Z Naturforsch* 37c: 967-976

Reum L, Koolman J (1989): Radioimmunoassay of ecdysteroids. In *Ecdysone* (J. Koolman, ed.), Thieme Verlag, Stuttgart and New York: 131-143

Richter K, Böhm GA (1997): The molting gland of the cockroach *Periplaneta americana*: Secretory activity and its regulation. *Gen Pharmac* 29: 17-21

Riddiford M, Charbas P, Truman JW (2000): Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam* 60: 1-74

Ritchie CK, Cohn DV, Maercklein PB, Fitzpatrick LA (1992): Individual parathyroid cells exhibit cyclic secretion of parathyroid hormone and chromogranin-A (as measured by a novel sequential hemolytic plaque assay). *Endocrinology* 131: 2638-2642

Saidi B, de Besse N, Webster SG, Sedlmeier D, Lachaise F (1994): Involvement of cAMP and cGMP in the mode of action of molt-inhibiting hormone (MIH) a neuropeptide which inhibits steroidogenesis in a crab. *Mol Cell Endocrinol* 102(1-2): 53-61

Sankaranarayanan S, Simasko SM (1996): A role for a background sodium current in spontaneous action potentials and secretion from rat lactotrophs. *Am J Physiol* 271(*Cell Physiol*): C1927-C1934

Slama K, Lafont R (1995): Insect hormones - ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* 92: 355-377

Smith PF, Luque EH, Neill JD (1986): Detection and measurement of secretion from individual neuroendocrine cells using a reverse hemolytic plaque assay. In "*Methods in Enzymology*" (P.M. Conn, ed.), Vol. 124: 443-465, Academic Press, Orlando, Florida

Spindler KD (1997): Interactions between steroid hormones and the nervous system. *Neurotoxicology* 18: 745-754

Subramoniam T (2000): Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 125: 135-156

Sun F, Ritchie CK, Hassager C, Maercklein P, Fitzpatrick LA (1993): Heterogeneous response to calcium by individual parathyroid cells. *J Clin Invest* 91: 595-601

Swanson BN (1985): Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm* 5: 1-33

Taylor MJ, Clark CL (1992): Basic fibroblast growth factor inhibits basal and stimulated relaxin secretion by cultured porcine luteal cells: Analysis by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 130: 1951-1956

Thummel CS (1996): Flies on steroids - *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet* 12: 306-310

Truman JW, Riddiford LM (2002): Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annu Rev Entomol* 47:467-500

Tsitsimpikou C, Ttsamis GD, Siskos PA, Spyridaki MH, Georgakopoulos CG (2001): Study of excretion of ecdysterone in human urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15. 1796-1801

Vila-Porcile E, Barret A, Corvol P (2000): Secretion of renin-angiotensin system (RAS) components by normal and tumoral lactotropes: a comparative study using reverse hemolytic plaque assay (RHPA) and immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 48: 1691-1704

Wagner RM, Loeb MJ, Kochansky JP, Gelman DB, Lusby WR, Bell RA (1997): Identification and characterization of an ecdysiotropic peptide from brain extracts of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch Insect Biochem Physiol* 34: 175-189

Warren JT, Dai JD, Gilbert LI (1999): Can the insect nervous system synthesize ecdysteroids ?. *Insect Biochem Molec Biol* 29: 571-579

Weiss C, Jelkmann W (1993): Funktionen des Blutes. In „Physiologie des Menschen“ (Schmidt FS, Thews G, ed.) 25. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Wickenhauser C, Lorenzen J, Hillienhof A, Jungheim K, Schmitz B, Hansmann ML, Fischer R (1995): Secretion of cytokines (interleukines -1 α , -3, and -6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) by normal human marrow megakaryocytes. *Blood* 85: 685-691

Wise PM, Scarbrough K, Larson G, Chiu S, Weiland NG, Lloyd JM, Hinkle DA, Cai A (1993): Assessment of gene expression and peptide secretion from individual cells. *Micros Res Tech* 25: 40-45

Yamada S, Sano T, Stefaneanu L, Kovacs K, Aiba T, Sawano S, Shishiba Y (1993): Endocrine and morphological study of a clinically silent somatotroph adenoma of the human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 352-356

8. Anhang

8.1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1.1 Abbildungen

| | |
|---|----|
| Abb. 3-1: Schematische Darstellung der endokrinen Kontrolle der Metamorphose | 12 |
| Abb. 3-2: Schematische Darstellung der anatomischen Lage der Ringdrüse (Rdr) von <i>Calliphora vicina</i> | 13 |
| Abb. 3-3: Schematische Darstellung des reversen hämolytischen Plaque Assays | 16 |
| Abb. 5-1: Hämolytischer Plaque-Assay mit Ringdrüsenzellen und DBL-1-Antiserum | 32 |
| Abb. 5-2: Vergrößerung aus Abbildung 5-1 | 33 |
| Abb. 5-3: Hämolytischer Plaque Assay mit DBL-1 Antiserum | 34 |
| Abb. 5-4: Vergrößerung aus Abbildung 5-3 | 34 |
| Abb. 5-5: Hämolytischer Plaque Assay mit ganzer Ringdrüse | 35 |
| Abb. 5-6: Hämolytischer Plaque-Assay mit Ringdrüsenzellen und Medium 199 statt Antikörperlösung | 38 |
| Abb. 5-7: Hämolytischer Plaque-Assay mit Ringdrüsenzellen und Medium 199 statt Komplementlösung | 39 |

8.1.2 Tabellen

| | |
|---|----|
| Tab. 3-1: Chemische Vielfalt der Ecdysteroide | 8 |
| Tab. 4-1: Chemikalien | 21 |
| Tab. 4-2: Antiseren | 22 |
| Tab. 4-3: Lösungen | 24 |

8.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hauke Duckwitz
Anschrift: Bonner Talweg 176
53129 Bonn
Telefon: 0228/2893246
Geburtsdatum: 30.06.1973
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1979 - 1981 Grundsule Appelhoff in Hamburg
1981 - 1983 Grundsule Gartenstadt in Neumünster
1983 - 1992 Gymnasium Immanuel-Kant-Schule in Neumünster
Mai 1992 Abitur

Zivildienst

1992 – 1993 Zivildienstleistender auf der unfallchirurgischen Station des Friedrich-Ebert-Krankenhauses in Neumünster

Studium

1993-1999 **Studium der Humanmedizin** an der Philipps-Universität Marburg
Oktober 1999 **PJ Innere Medizin** im Klinikum Kassel
Februar 2000 **PJ Chirurgie und Kinderchirurgie** im Universitätskrankenhaus Valencia (Spanien)
Juni 2000 **PJ Kinderheilkunde** im Klinikum Kassel

Staatsexamen

September 1995 Physikum
September 1996 1. Staatsexamen
September 1999 2. Staatsexamen
November 2000 3. Staatsexamen
November 2000 Ärztliche Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

1.12.2000-31.5.2002 **Arzt im Praktikum** in der Kinderklinik des Klinikums Kassel
Seit 1.12.2000 **Assistenzarzt** im Zentrum für Kinderheilkunde des Universitätsklinikums Bonn

8.3. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Bertalanffy, Bien, Daut, Gemsa, Geus,
Gressner, Griss, Hasilik, Happle, Joseph, Kern, Klenk, Klose, Kroll,
Maisch, Moll, Müller, Oertel, Remschmidt, Rothmund, Schäfer, Schüffel,
Seybert, Thomas, Voigt, Weihe, Werner, von Wichert

8.4. Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Jan Koolman für die geduldige Betreuung der Laborarbeit und der Manuskripterstellung sowie für viele einzigartige Lehrveranstaltungen und viele Blicke über den reinen Lehrstoff hinaus.

Prof. L. Dinan, The Departement of Biological Sciences, University of Exeter, für die Bereitstellung der verwendeten Pflanzensamen.

Herrn Peter Möbus für die Hilfe in allen technischen Belangen.

Carsten Rausch für viel Motivation und eine besondere Freundschaft.

Meinen Eltern für den Anstoß zu dieser Arbeit und die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen.

Kim Breuer und Janko Duckwitz für viel Geduld mit dem gestressten Papa und jeden Tag ein neues Glück.

8.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Identifizierung und Analyse von Ecdysteroid synthetisierenden Zellen
mithilfe eines hämolytischen Plaque-Assays**

**im Institut für Physiologische Chemie
unter der Leitung von Prof. Dr. Jan Koolman**

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher in keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Bonn, den