

**Inhaltsverzeichnis**

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

---

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

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

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