

luencent, comme nous l'avons démontré chez les amphibiens (SALVATORELLI, 1963, 1965), l'activité érythropoïétique des animaux à sang froid, soit de l'état de maturation des gonades qui peuvent jouer un rôle très important dans le renouvellement des globules rouges des poissons.

BIBLIOGRAPHIE

- COCQUIO, G. 1929. *Il sangue, gli organi ematopoietici ed il tessuto reticolo endoteliale nella Anguilla*. Riv. Biol. 11: 7-32.
- DRZEWINA, A. 1912. *Contribution à l'étude des leucocytes granuleux dans le sang des Poissons*. Arch. Anat. Micr. 13: 319-408.
- JOLLY, J. 1923. *Traité technique d'hématologie*. Paris, Maloine.
- LAGUESSE, E. 1890. *Recherches sur le développement de la rate chez les Poissons*. Journ. Anat. Physiol. 26: 345-353.
- MARCUZZI, G. 1946. *Sulla presenza di attività emopoietica nella gonade dei Teleostei*. Boll. Soc. It. Biol. Sper., 22: 1-3.
- POLICARD, G. 1923. C.R. Soc. Biol. (1902) (cité par JOLLY in *Traité technique d'hématologie*, Paris, Maloine).
- SALVATORELLI, G. 1963. *Osservazioni sopra l'ematopoiesi nel Bufo vulgaris*. Rend. Accad. Sci. Bologna, serie 10, 10: 1-10.
- 1965. *Osservazioni sopra l'ematopoiesi nel Bufo vulgaris*. Rend. Accad. Sci. Bologna, serie 12, 1: 212-226.
- STOLZ, R. 1928. *Ematopoiesi normale e sperimentale nei pesci Teleostei*. Haematologica, 9: 43-75.

N^o 54. **A. Spiro-Kern** und **P. S. Chen**. — Über die Proteasen der Stechmücke *Culex pipiens*¹. (Mit 3 Textabbildungen)

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich.

Bei Insekten wurden Verdauungsenzyme mit proteolytischer Aktivität sowohl im alkalischen (pH 8) als auch im sauren (pH 3) Bereich festgestellt (für Literaturangaben siehe WALDNER-STIEFELMEIER 1967 und CHEN 1971). Möglicherweise werden bei verschiedenen Insektenarten je nach der Ernährungsbedingung Proteasen mit unterschiedlichen pH-Optima gebildet.

Genauere Untersuchungen über die Proteasen bei der Stechmücke *Culex pipiens* fehlen. Im Rahmen unserer früheren Arbeiten über die der Autogenie bzw.

¹ Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und die Karl Hescheler-Stiftung.

Anautogenie zugrundeliegende Stoffwechselphysiologie berichtete BRIEGEL (1969) dass beim *C. p. fatigans*-Weibchen die Hälfte des Mitteldarminhalts nach einer Blutmahlzeit bereits innerhalb des ersten Tages abgebaut wird. Dies deutet auf eine Stimulation der Proteasenaktivität durch die Blutaufnahme hin. Ähnliche Ergebnisse erhielten FISK und SHAMBAUGH (1952) sowie SHAMBAUGH (1954) bei *Aedes aegypti*. Welche Proteinasen für die Verdauung der Bluteiweisse verantwortlich sind, wurde jedoch nicht näher analysiert.

Von Interesse ist ferner die Veränderung des Enzymmusters im Laufe der Ontogenese. Bei *Drosophila melanogaster* stellt WALDNER-STIEFELMEIER (1967) fest, dass die Protease, die ein pH-Optimum von 8,3 aufweist, in ihrer Aktivität während des Larvalwachstums rasch zunimmt. Diese fällt kurz vor der Verpuppung ab und bleibt auf einem sehr niedrigen Niveau während der Puppenentwicklung. Es stellt sich nun die Frage, ob ein ähnliches Verhalten bei *Culex pipiens* vorkommt.

Im folgenden beschränken wir uns nur auf das wesentliche Ergebnis; Einzelheiten der vorliegenden Untersuchung sollen in einer späteren Veröffentlichung berichtet werden.

MATERIAL UND METHODE

Als Untersuchungsmaterial dienten Tiere des autogenen Stammes *Culex pipiens pipiens* und des anautogenen Stammes *C. p. fatigans*. Beide Stämme werden seit 1956 in unserem Institut durch Bruder-Schwester-Kreuzungen gehalten. Die Larven wurden in Gläsern mit Wasser und durch tägliche Fütterung mit pulverisiertem Hundekuchen bei 25° C aufgezogen. Die adulten Mücken wurden mit Zuckerwasser gefüttert. Die anautogenen Weibchen benötigen eine Blutmahlzeit für die Eiablage, wofür wir ein Huhn jeweils für ca. 2 Stunden im Zuchtkäfig exponieren. Genauere Angaben über die Zuchtbedingungen befinden sich in CHEN (1958) und CHEN und BRIEGEL (1965).

Für die Enzymanalyse wurden Mitteldärme aus frischen Larven und Imagines in gekühlter Ringerlösung herausseziert, homogenisiert und zentrifugiert. Homogenate aus ganzen Larven, Puppen und Adulten verschiedenen Alters dienten als Enzymproben für die Untersuchung des ontogenetischen Musters. Zur Bestimmung der gesamten proteolytischen Aktivität wurde Azocasein als Substrat nach der Methode von CHARNEY und TOMARELLI (1947) gebraucht. Zur Identifizierung der einzelnen Enzymkomponenten verwendeten wir die folgenden synthetischen Substrate: p-Toluensulfonyl-L-argininmethylester. HCl für Trypsin (SIEGELMAN et al. 1962), Tyrosinaethylester. HCl für Chymotrypsin (SCHWERT und TAKENAKA 1955), L-Leucyl- β -naphthylamin.HCl für Leucinaminopeptidase (BERNT und BERGMAYER 1962), Carbobenzoxycyl-L-phenylalanin für Carboxypeptidase A (DE VILLEZ 1965) und Hippuryl-L-arginin für Carboxypeptidase B (FOLK et al. 1960).

Für die elektrophoretische Auftrennung der Enzymproteine im Darmhomogenat benützten wir ein 15% iges Polyacrylamidgel nach dem Verfahren von REISFELD et al. (1962).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Veränderungen der Enzymaktivität während der Entwicklung

In Übereinstimmung mit dem Befund von WALDNER-STIEFELMEIER (1967) bei *Drosophila* fanden wir Trypsin, Leucinaminopeptidase und Carboxypeptidase A in allen Stadien der Stechmücken, während Carboxypeptidase B fehlt. Allerdings deutet unsere elektrophoretische Beobachtung darauf hin, dass das Chymotrypsin möglicherweise vorhanden ist (siehe unten). Tatsächlich erwies unser neuerer Versuch mittels N-Glutaryl-L-phenylalanin-p-nitroanilid nach ERLANGER et al. (1966), dass zumindest die Mückenlarven chymotryptische Aktivität besitzen. Ein Vergleich der Enzymaktivität zwischen Mitteldarm und Ganztier ergab, dass der Anteil im Darm ca. 95% für Trypsin, 78% für Leucinaminopeptidase und 62% für Carboxypeptidase A beträgt.

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, deckt sich der Aktivitätsverlauf der drei Enzyme während der Ontogenese weitgehend mit denjenigen der Gesamtproteasen. Die anfängliche Zunahme der proteolytischen Tätigkeit ist wohl der intensiven Nahrungsaufnahme in den ersten 10 Larventagen zuzuschreiben. Vor der Verpuppung fressen die Larven merklich weniger. Dies mag zum Teil für den Abfall der Enzymaktivität verantwortlich sein. Zudem fand CHEN (1958), dass bei *Culex pipiens* das larvale Wachstum vor der Verpuppung besonders intensiv ist. Da in der vorliegenden Darstellung der Proteingehalt der Enzymprobe als Bezugsgrösse gewählt wurde, ist ein Teil dieses Absinkens sicher durch eine Verdünnung mit unspezifischen Eiweissen bedingt.

Die proteolytische Aktivität in den Puppen ist im Vergleich zu derjenigen in den Larven recht gering (siehe Abb. 1). Allerdings sind unsere Messwerte nicht so niedrig wie sie WALDNER-STIEFELMEIER (1967) bei *Drosophila* fand. Sie liegen sogar höher als bei zuckergefütterten Imagines, scheinen aber am allgemeinen Umbau während der Metamorphose nicht beteiligt zu sein. Nach SNODGRASS (1959) ist der Abbau der larvalen Strukturen bei *Culex* viel geringer als bei anderen höheren Dipteren. Wird eine Puppe von *Drosophila* geöffnet, so findet sich im Innern infolge eines intensiven Abbaus der larvalen Gewebe eine weiche, cremartige Masse. Das Innere einer Stechmückenpuppe hingegen ist so sauber wie dasjenige der Larve oder Imago, und die Organe scheinen intakt zu sein. Die Umwälzungen der Metamorphose betreffen vor allem den Verdauungskanal, dessen Epithelzellen zudem ins Darmlumen und nicht in die Körperhöhle abgegeben werden. Eine ausgeprägte allgemeine Histolyse wäre bei einer Stechmücken-

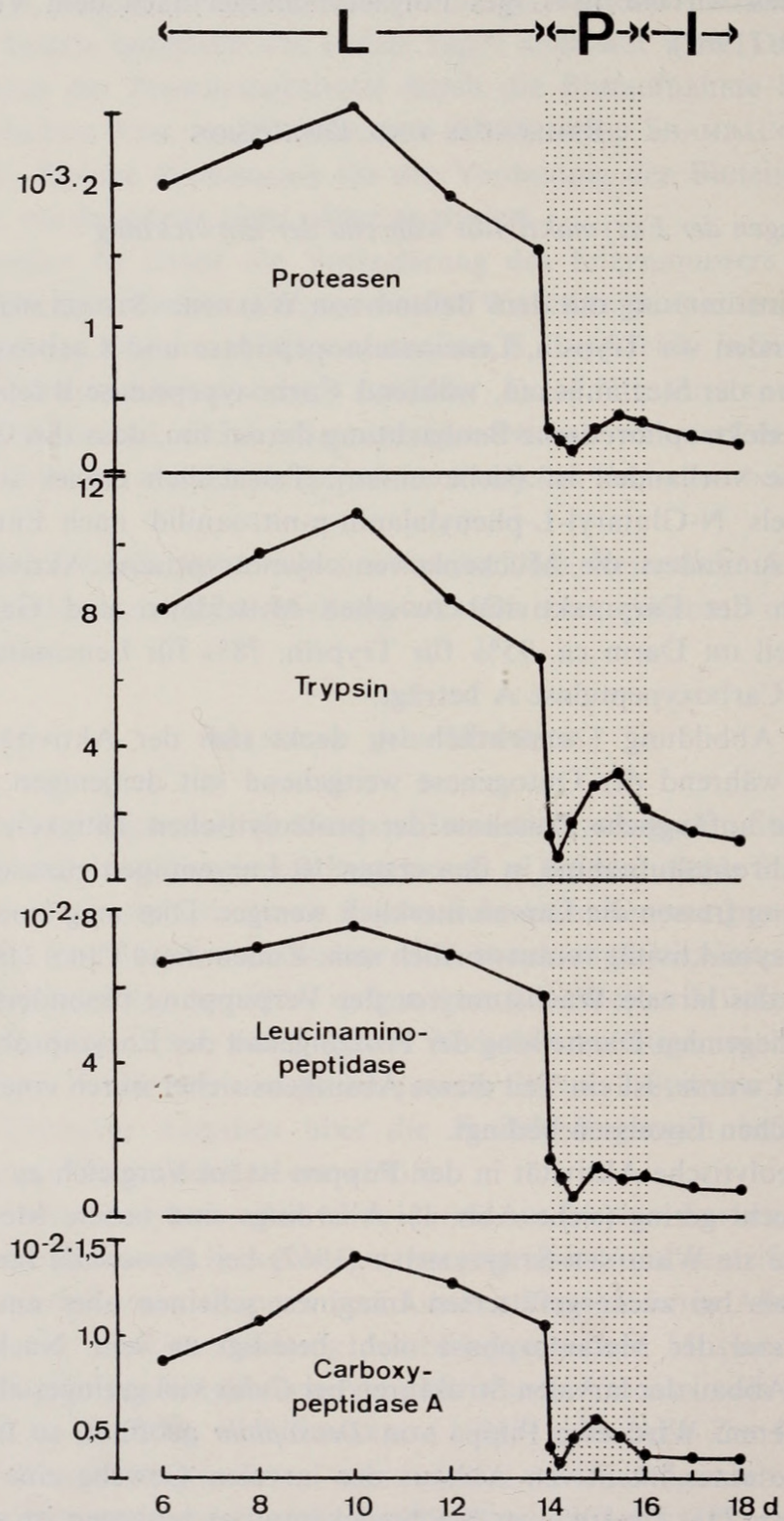


ABB. 1.

Proteolytische Aktivitäten während der Entwicklung von *C. p. pipiens*.

Ordinate: Enzymaktivität C (μ Mol/min/mg Protein).

Abszisse: Alter in Tagen (d) nach dem Schlüpfen aus den Eiern.

Gruppe auch undenkbar, da dieses Stadium, nicht wie sonst bei Insekten üblich, ein „Ruhestadium“ darstellt, sondern ein recht aktives Leben erlaubt.

2. Einfluss der Blutaufnahme

Nach unserer Feststellung liegen die Aktivitätswerte bei zuckergefütterten Imagines ausserordentlich tief (Abb. 2). Erhalten die Tiere aber eine Blutmahlzeit,

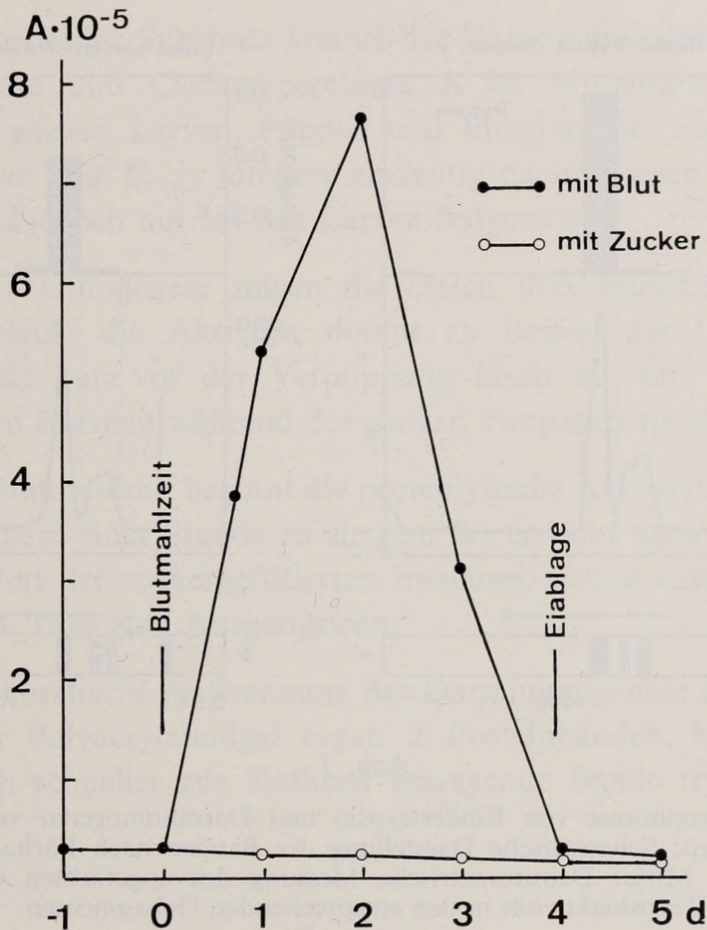


ABB. 2.

Wirkung der Blutmahlzeiten auf zuckergefütterte Weibchen von *C. p. fatigans*.

Ordinate: Enzymaktivität im Mitteldarm in $\mu\text{Mol/min}/\mu\text{g}$ Protein.

Abszisse: Tage nach der Blutaufnahme.

so beginnt die proteolytische Tätigkeit schon nach einer Stunde zu steigen und erreicht nach 48 Stunden ihr Maximum, nämlich das 30 fache des Wertes vor der Blutaufnahme. Den grössten Anstieg zeigt das Trypsin. Die Aktivität sinkt dann sehr rasch wieder ab, und gelangt am 4. Tag schon zum Ausgangswert. Die gleiche Beobachtung machten THOMSEN und MØLLER (1962) bei *Calliphora* und HOSBACH et al. (1972) bei *Drosophila*, wenn sie die Imagines mit Fleisch und Zuckerwasser bzw. die Larven mit Casein und Zucker fütterten. Alle diese Befunde zeigen

deutlich, dass nicht Futteraufnahme allgemein die Ausschüttung der Protease stimuliert, sondern dass im besonderen eiweisshaltiges Futter dazu benötigt wird (siehe Diskussion in CHEN 1971, S. 36—37).

3. Elektrophoretische Auftrennung des Larventrypsins

Die elektrophoretische Auftrennung des Darmhomogenats der Mückenlarve im 7,5% igen Polyacrylamidgel ergab mindestens 13 Proteinbanden, die jedoch

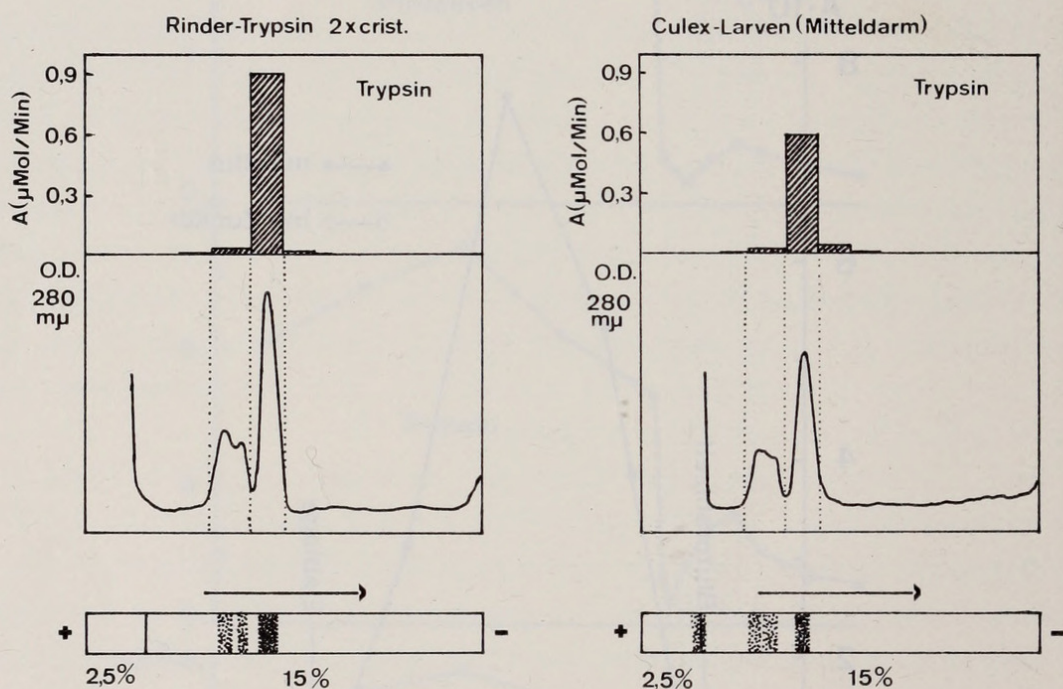


ABB. 3.

Polyacrylamid-Elektrophorese von Rindertrypsin und Darmhomogenat von 8-tägigen *C. pipiens*-Larven. Unten: Schematische Darstellung der Banden nach Färbung des Gelstreifens mit Amidoschwarz. Mitte: Densitometrische Messung des ungefärbten Gelstreifens. Oben: Trypsinaktivität in den entsprechenden Gelsegmenten.

keine Trypsinaktivität aufwiesen. Wurde ein 15%iges Gel nach dem Verfahren von REISFELD et al. (1962) verwendet, so liessen sich nur 2 Banden nachweisen, die beim pH 4,5 zur Kathode wanderten. Dies beruht darauf, dass Eiweisse, deren Molekulargewicht über 30.000 liegt, nicht mehr in das Gel eindringen können. Wie Abbildung 3 zeigt, konnten bei densitometrischer Aufzeichnung der ungefärbten Gele bei 280 nm 2 deutliche Absorptionsmaxima festgestellt werden, die sich mit den amidoschwarzgefärbten Banden deckten. Unser Versuch mit reinem Rindertrypsin ergab ebenfalls 2 Banden, die sich jedoch etwas schneller zur Kathode bewegten als diejenigen der *Culex*larven, was auf die unterschiedliche Proteinstruktur hindeutet.

Die Extraktion der Proteinkomponenten aus diesen Gelregionen und die anschliessende Enzymanalyse bewiesen, dass nur die stärkere, weiter gewanderte

Bande tryptische Aktivität besitzt. Die schwächere Doppelbande erwies sich hingegen als negativ. Da ihre elektrophoretische Beweglichkeit derjenigen des Chymotrypsins entspricht, sind wir daran, sie auf eine allfällige Chymotrypsinaktivität zu prüfen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Mittels synthetischer Substrate konnte das Vorkommen von Trypsin, Leucin-aminopeptidase und Carboxypeptidase A im Mitteldarm und in Homogenaten aus ganzen Larven, Puppen und Imagines der Stechmücken *Culex pipiens pipiens* und *C. p. fatigans* eindeutig nachgewiesen werden. Chymotrypsin wurde jedoch nur bei den Larven festgestellt.
2. Während der Ontogenese zeigen die ersten drei Enzyme einen ähnlichen Aktivitätsverlauf: die Aktivität nimmt zu Beginn der Larvenentwicklung stark zu, sinkt kurz vor der Verpuppung rasch ab, und bleibt auf einem sehr niedrigen Niveau während der ganzen Puppenentwicklung.
3. Nach einer Blutmahlzeit beginnt die proteolytische Aktivität der Adultmücken bereits innerhalb einer Stunde zu steigen. Sie erreicht nach 48 Stunden einen 30 fachen Wert der zuckergefütterten Imagines, nimmt rasch wieder ab, und gelangt am 4. Tage zum Ausgangswert.
4. Die elektrophoretische Auftrennung der Darmhomogenate aus Mückenlarven im 15%igen Polyacrylamidgel ergab 2 Proteinbanden, bei denen nur die stärkere, sich schneller zur Kathode bewegende Bande tryptische Aktivität aufwies.

SUMMARY

1. By means of synthetic substrates the occurrence of trypsin, leucineamino-peptidase and carboxypeptidase A in the midgut and the homogenates of whole larvae, pupae, and adults of the mosquitoes *Culex pipiens pipiens* and *C. p. fatigans* has been identified. Chymotrypsin was found, however, only in the larvae.
2. During ontogenesis the first 3 enzymes show a similar pattern of changes in their activity: it rises rapidly in the early larval life, falls off shortly prior to pupation and remains at a very low level during the whole pupal development.
3. After the uptake of a blood meal the proteolytic activity in the adult mosquitoes begins to increase already within one hour. It reaches after 48 hours

a maximum which amounts to 30 times the value of the sugar-fed individual and drops again to the level before blood ingestion on the fourth day.

4. Electrophoretic separation of the homogenate from larval midgut in 15% polyacrylamide gel gave 2 protein bands, of which only the stronger, faster cathodal band showed tryptic activity.

RÉSUMÉ

1. Au moyen de substrats synthétiques, la présence de trypsine, de leucineaminopeptidase et de carboxypeptidase A dans l'intestin moyen et dans les homogénats de larves entières, de nymphes et d'imagos des moustiques *Culex pipiens pipiens* et *C. p. fatigans* a été clairement démontrée. La chymotripsine n'a toutefois été trouvée que dans les larves.
2. Durant l'ontogenèse, les 3 premiers enzymes ont un mode d'activité similaire: elle augmente fortement au début de la vie larvaire, s'abaisse peu avant la nymphose et reste stationnaire à un niveau très bas durant tout le développement de la nymphe.
3. Après l'absorption de sang, l'activité protéolytique commence à augmenter dans l'heure qui suit chez les moustiques adultes. Après 48 heures, elle atteint un maximum équivalent 30 fois celle des imagos nourris avec du sucre et diminue rapidement pour retrouver son état primaire au cours du quatrième jour.
4. La séparation électrophorétique des homogénats intestinaux de larves dans du gel de polyacrylamide a donné 2 bandes de protéines, dont seule la bande plus forte se déplaçant plus rapidement vers la cathode, montrait une activité tryptique.

LITERATUR

- BERNT, E. und H. U. BERGMAYER. 1962. *Colorimetrische Bestimmung der Leucinaminopeptidase im Serum*. In „Methoden der enzymatischen Analyse“ (H. U. Bergmeyer), S. 833-835. Verlag Chemie, GmbH, Weinheim.
- BRIEGEL, H. 1969. *Untersuchungen zum Aminosäuren- und Proteinstoffwechsel während der autogenen und anautogenen Eireifung von Culex pipiens*. J. Insect Physiol. 15: 1137-1166.
- CHARNEY, J. and R. M. TOMARELLI. 1947. *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*. J. biol. Chem. 171: 501-505.
- CHEN, P. S. 1958. *Studies on the protein metabolism of Culex pipiens L. I. Metabolic changes of free amino acids during larval and pupal development*. J. Insect Physiol. 2: 38-51.

- CHEN, P. S. 1971. *Biochemical Aspects of Insect Development*. Karger, Basel.
- and H. BRIEGEL. 1965. *Studies on the protein metabolism of Culex pipiens L. V. Changes in free amino acids and peptides during embryonic development*. Comp. Biochem. Physiol. 14: 463-473.
- ERLANGER, B. F., F. EDEL and A. G. COOPER. 1966. *The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates*. Arch. Biochem. Biophys. 115: 206-210.
- FISK, F. W. and G. F. SHAMBAUGH. 1952. *Protease activity in adult Aedes aegypti mosquitoes as related to feeding*. Ohio J. Sci. 52: 80-88.
- FOLK, J. E., K. A. PIEZ, W. R. CARROLL and J. A. GLADNER. 1960. *Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterization of the porcine enzyme*. J. biol. Chem. 235: 2272-2279.
- HOSBACH, H. A., A. H. EGG und E. KUBLI. 1972. *Einfluss der Futterzusammensetzung auf Verdauungsenzym-Aktivitäten bei Drosophila-Larven*. Rev. suisse Zool. (im Druck).
- REISFELD, R. A., U. J. LEWIS and D. E. WILLIAMS. 1962. *Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels*. Nature 195: 281-283.
- SCHWERT, G. and Y. TAKENAKA. 1955. *A spectrometric determination of trypsin and chymotrypsin*. Biochim. biophys. Acta 16: 570-575.
- SHAMBAUGH, G. F. 1954. *Protease stimulation by food in adult Aedes aegypti L.* Ohio J. Sci. 54: 151-160.
- SIEGELMANN, A. M., A. S. CARLSON and T. ROBERTSON. 1962. *Investigation of serum trypsin and related substances*. Arch. Biochem. Biophys. 97: 159-163.
- SNODGRASS, R. E. 1959. *The anatomical life of the mosquito*. Smithsonian Misc. Collect. Vol. 139, No. 8.
- THOMSEN, E. and J. MØLLER. 1963. *Influence of neurosecretory cells and of corpus allatum on intestinal protease activity in the adult Calliphora erythrocephala Meig.* J. exp. Biol. 40: 301-321.
- VILLEZ, E. J. DE. 1965. *Isolation of the proteolytic digestive enzymes from the gastric juice of the crayfish Orconectes virilis (Hagen)*. Comp. Biochem. Physiol. 14: 577-586.
- WALDNER-STIEFELMEIER, R. D. 1967. *Untersuchungen über die Proteasen im Wildtyp und in den Letalmutanten (lme und ltr) von Drosophila melanogaster*. Z. vergl. Physiol. 56: 268-289.



Spiro-Kern, A and Chen, P. S. 1972. "Über die Proteasen der Stechmücke *Culex pipiens*." *Revue suisse de zoologie* 79, 1151–1159.

<https://doi.org/10.5962/bhl.part.97161>.

View This Item Online: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/138635>

DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.part.97161>

Permalink: <https://www.biodiversitylibrary.org/partpdf/97161>

Holding Institution

American Museum of Natural History Library

Sponsored by

BHL-SIL-FEDLINK

Copyright & Reuse

Copyright Status: Public domain. The BHL considers that this work is no longer under copyright protection.

Rights Holder: Muséum d'histoire naturelle - Ville de Genève

This document was created from content at the **Biodiversity Heritage Library**, the world's largest open access digital library for biodiversity literature and archives. Visit BHL at <https://www.biodiversitylibrary.org>.