

Hämolympfenproteine und Vitellogenese bei *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea Argasidae)

von

P. A. DIEHL¹

Schweizerisches Tropeninstitut, Basel

Einleitung

In den letzten Jahren sind mehrere Arbeiten erschienen, die auf die Existenz von spezifisch weiblichen Hämolympfenproteinen bei Insekten hinweisen (Literaturzusammenfassungen bei CHEN & LEVENBOOK (1966), LAUFER (1960), TELFER (1965) und WILLIAMS (1965)). Diese «female proteins» treten in verstärkter Masse während der Vitellogenese auf. Sie gelangen durch Mikropinocytose in das Ei und werden als Dotter eingelagert.

Es war interessant zu erfahren, ob bei der Zecke *Ornithodoros moubata*, einem Vertreter der Chelicerata, die gleiche Art der Dotterbildung vorkommt. Erste Hinweise dafür lieferte WIGGLESWORTH (1943), indem er alkalisches Hämatin sowohl in der Hämolymphe wie auch im Ei nachwies. LEES & BEAMENT (1948) zeigten, dass Moleküle von grossem Molekulargewicht wie Oxyhämoglobin via Hämocoel in die Oocyte gelangen können. AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) vermuteten eine Aufnahme von Substanzen aus der Hämolymphe in das Ei mittels Mikropinocytose.

VAN SANDE & KARCHER (1960) unternahmen eine Analyse der Hämolympfenproteine von *Ornithodoros moubata* mit Hilfe der Agargelelektrophorese, ohne jedoch «female proteins» darstellen zu können.

Die Vitellogenese wird durch eine Blutmahlzeit und eine Kopulation ausgelöst. Die Ablage der ersten Eier erfolgt nach etwa 10–15 Tagen (AESCHLIMANN 1968). Die sich entwickelnde Eizelle ist nur durch einen kleinen Stiel von wenigen Zellen (Funiculus) mit dem Ovar verbunden. Sie wird also nicht wie bei Insekten von Follikelzellen umgeben. Die Oocyte ragt in das Hämocoel hinein und wird von Hämolymphe um-

¹ Für seine tatkräftige Mithilfe bei den immunologischen Arbeiten bin ich meinem Freunde N. Weiss zu grossem Dank verpflichtet.

spült. Im Plasma des sich entwickelnden Eies reichern sich peripher, später gleichmässig verteilt, Dotterschollen unterschiedlicher Grösse an. Sie bestehen aus komplexen Hämoglykolipoproteiden. Zwischen den Dotterkugeln finden sich reichlich Glykogen und Lipidtropfen, die hauptsächlich Triglyceride enthalten (DIEHL, in Vorbereitung). Für weitere anatomische und histologische Details des Ovars und der Oocyten wird auf die Arbeiten von WAGNER-JEVSEENKO (1958) und AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) hingewiesen.

Material und Methoden

Die Zecken stammen aus dem Ulanga-District (Tanzania). Sie werden seit mehreren Jahren am Tropeninstitut nach der von GEIGY & HERBIG (1955) beschriebenen Methode gezüchtet.

Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde den Zecken das vierte Beinpaar auf der Höhe der Coxa abgeschnitten und die austretende Flüssigkeit mittels Mikropipetten von 1 μ l Inhalt aufgenommen. Die gewünschte Menge pro Elektrophoreselauf wurde in 0,1 ml gekühlte 4 % Saccharoselösung pipettiert und die Hämocyten bei 3000 r.p.m. abzentrifugiert. Anschliessend erfolgte sofort die Elektrophorese.

Zur Gewinnung der Eiproteine wurden frisch abgelegte Eier in gekühlter 4 % Saccharoselösung homogenisiert und die Zelltrümmer abzentrifugiert.

Die Ei- und Hämolympfenproteine wurden mittels der Polyacrylamidgel-discelektrophorese nach CLARKE (1964) aufgetrennt. Die Färbungen der Proteine, Glykoproteide und eisenhaltigen Proteide erfolgten nach der gleichen Vorschrift. Sudanblack B diente zum Nachweis der Lipoproteide. Die Gele wurden in 3 % Essigsäure während vier Stunden fixiert, über Nacht bei 37°C getrocknet und dann 6–12 Stunden in einer gesättigten Lösung von Sudanblack B in 60 % Alkohol gefärbt. Die während des Trocknens aufgetretene Schrumpfung des Gels verschwand bei der anschliessenden Wässerung.

Zur Messung des relativen Proteingehaltes wurden die mit Amidoschwarz gefärbten Elektrophoresebanden ausgeschnitten und mit 1 n NaOH eluiert. Die Ablesung der Extinktion erfolgte bei 578 nm gegen das Eluierungsmittel.

Wir prüften die antigenischen Eigenschaften der Hämolympfen- und Eiproteine mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenzmethode nach COONS. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Hämolympfenproteine wurde der unfixierte Gelzylinder der Länge nach auf dem Kryostat geschnitten (Dicke 7 μ). Die Weiterbehandlung erfolgte den Vorschriften entsprechend im ersten Schritt mit Antikörpern gegen Eiproteine, im zweiten Schritt mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Mäuseserumproteine (Hersteller Institut Pasteur). Die Auswertung der Resultate geschah mit dem Fluoreszenzmikroskop. Das Polyacrylamid und die Proteinbanden zeigten keine Eigenfluoreszenz.

Antikörper gegen Eiproteine wurden auf die folgende Art hergestellt. Wir injizierten i.p. einer weissen Maus das Homogenisat von je 50 frisch abgelegten Eiern dreimal in Abständen von vier Tagen. Nach zwei Wochen erfolgte eine weitere Boosterinjektion. 15 Tage darauf wurde das Serum gewonnen.

Ergebnisse

1. Hämolympfenproteine

1.1 beim hungrigen, unbegatteten Weibchen

Die Hämolymphe erscheint klar und wenig viskös. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen wird sie in 24 Banden aufgetrennt (Abb. 1A). VAN SANDE & KARCHER (1960) unterschieden mittels Agar-gelelektrophorese 12 Fraktionen.

Die Banden H1–H7 sind schwach vertreten. H6 und H7 sind braun gefärbt. Beides sind eisenhaltige Glyko-lipoproteide.

H8 ist weitaus am stärksten vorhanden und ist ein Glyko-lipoprotein.

H9–H15 sind deutlich vertreten, wobei H12 und H13 Glyko-lipoproteide, H14 und H15 eisenhaltige Glyko-lipoproteide sind. Wie H6 und H7 erscheinen auch H14 und H15 dem blossen Auge als braune Banden.

H16–H23 sind sehr schwach vorhanden und können nicht immer nachgewiesen werden.

Die Bande H24 ist immer deutlich zu erkennen. Sie verbindet sich mit dem als « tracking dye » beigegebenen Bromphenolblau. Ihre elektrophoretische Beweglichkeit ist etwas grösser als die des menschlichen Albumins (Rf-Wert $\approx 1,1$ bezogen auf $Rf_{\text{Albumin}} = 1$).

1.2 beim begatteten, gefütterten Weibchen (11 Tage nach der Kopulation und der Blutmahlzeit)

Diese Weibchen befinden sich in der Phase der stärksten Eireifung. Ihre Hämolymphe ist durch alkalisches Hämatin braun gefärbt (WIGLESWORTH 1943) und wegen des hohen Proteingehaltes sehr viskös.

H6, H7 und H8 haben an Konzentration ausserordentlich zugenommen (Abb. 1B und 2A). H6 und H7, in viel schwächerem Ausmasse auch H14 und H15, sind von blossen Auge als braune Banden sichtbar. Sie verursachen die Braunfärbung der Hämolymphe, denn nach der elektrophoretischen Entfernung der Proteine ist der Hämolympfenüberstand farblos. Das alkalische Hämatin ist offenbar als Hämoprotein an H6 und H7, in kleiner Menge auch an H14 und H15 gebunden. Bei der Schildzecke *Boophilus microplus* scheint das Hämatin ebenfalls an Hämolympfenproteine gekoppelt zu sein (BREMNER 1959).

Die andern Banden erfahren keine sichtbare Veränderung und besitzen etwa die gleichen Konzentrationen wie im Falle 1.1.

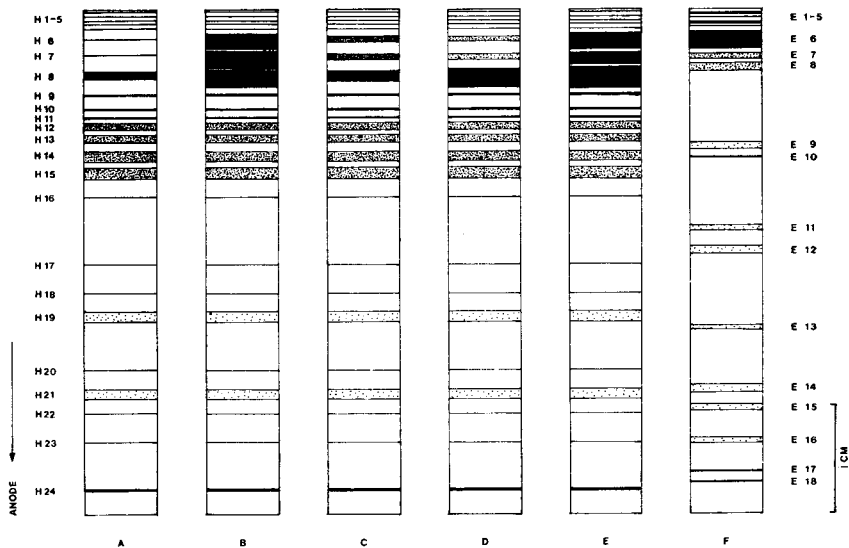


Abb. 1. — Elektrophoresemuster der Hämolympfen- und Eiproteine von *Ornithodoros moubata*. Aufgetragene Mengen: 2 μ l Hämolymphe resp. 5 Eier pro Lauf. Die Front liegt bei H24. Laufzeit: 23 Minuten. Spannung: 400 V. Die verschieden starken Schraffierungen sollen die unterschiedliche Intensität der Banden wiedergeben. A = Hämolymphe von ungefütterten, unbegatteten ♀♀. B = von ♀♀, 11 Tage nach der Fütterung und Kopulation. C = von ♀♀ nach der Eiablage. D = von unbegatteten ♀♀, 11 Tage nach der Fütterung. E = von unbegatteten ♀♀, 11 Wochen nach der Fütterung. F = Eier, die sich in Vitellogenese befinden.

1.3 beim Weibchen nach der Eiablage (ca. drei Wochen nach der Fütterung und der Kopulation)

Die Hämolymphe erscheint viel klarer und weniger viskös als im Falle 1.2.

H6, H7 und H8 sind deutlich weniger konzentriert als in 1.2, jedoch stärker als in 1.1. (Abb. 1C, 2A)

1.4 beim gefütterten, aber unbegatteten Weibchen

Eine meist unvollendete, zeitlich verzögerte Vitellogenese wird immer beobachtet. Eine Eiablage findet jedoch nur selten statt (AESCHLIMANN 1968). Die Verdauung der Blutmahlzeit scheint sehr langsam und nur unvollständig zu geschehen.

1.4.1 11 Tage nach der Fütterung :

Die Banden H6 und H7 sind sehr schwach vorhanden, aber doch stärker als im Falle des unbegatteten, ungefütterten Weibchens (Abb. 1D, 2B). Die Konzentration von H8 jedoch ist etwa gleich hoch wie im Falle von 1.2.

1.4.2 11 Wochen nach der Fütterung :

Die Hämolymphe ist braun gefärbt und viskös. H6 und H8 besitzen ähnliche Konzentrationen wie bei 1.2. (Abb. 1E, 2B), während H7 weniger stark vorhanden ist.

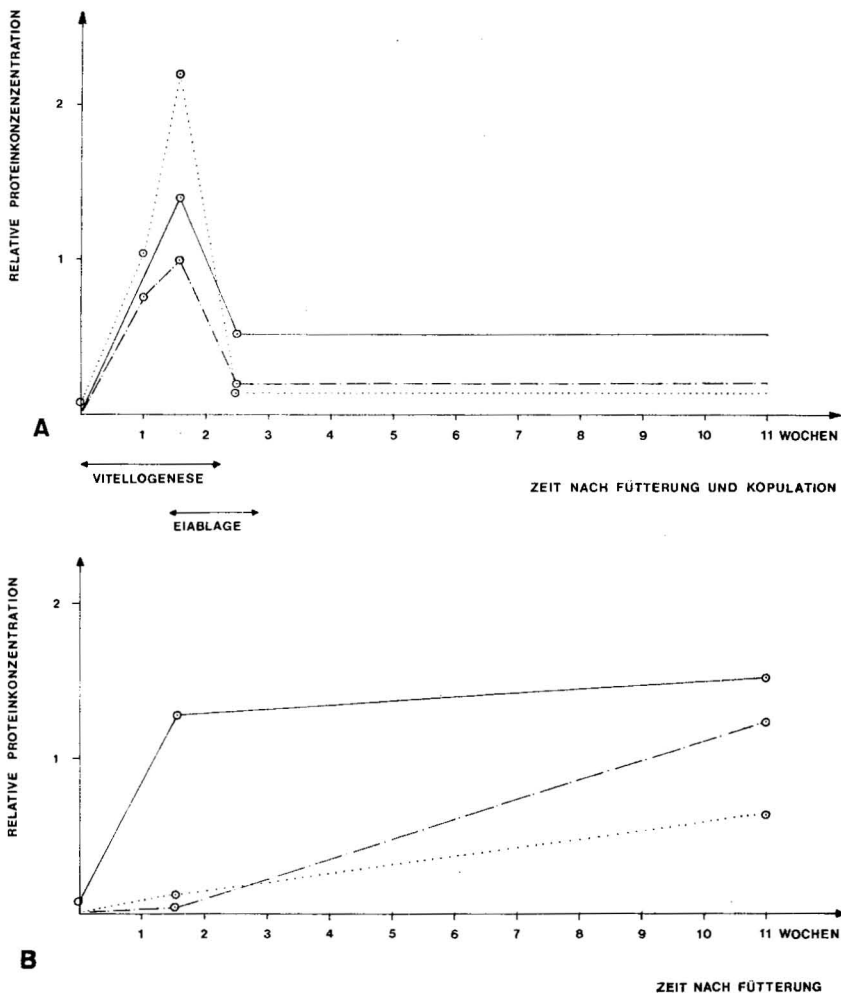


Abb. 2. — Zeitlicher Verlauf der relativen Proteinkonzentrationen von H6 (---), H7 (.....) und H8 (—). — Bei Abb. 2A handelt es sich um gefütterte, kopulierte ♀♀, bei Abb. 2B um gefütterte, aber unkopulierte ♀♀. Die relative Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Extinktion bestimmt.

1.5 beim Männchen

Die Banden H6 und H7 sind äusserst schwach vertreten. Sonst ist das Elektrophoresemuster beim hungrigen Männchen nicht von dem des unbegatteten, ungefütterten Weibchens zu unterscheiden.

In der Phase der Verdauung nimmt die Konzentration von H8 zu und nimmt dann wieder ab. H6 und H7 jedoch bleiben unverändert.

Bei den Banden H6 und H7 handelt es sich um typische « female proteins », die bei den Männchen nur in ganz geringen Mengen vorkommen. Beim gefütterten und kopulierten Weibchen sind sie während der Vitellogenese in hohen, nach der Eiablage in weit geringeren Konzentrationen vorhanden (Abb. 2A). Beim gefütterten, aber unbegatteten Weibchen steigt ihr Spiegel nur langsam an (Abb. 2B). Die Kopulation hat also einen deutlichen Einfluss auf die Bildungsgeschwindigkeit dieser beiden Proteine.

Die Bande H8 ist nicht geschlechtsspezifisch. Ihre Konzentration nimmt während der Verdauung der Blutmahlzeit zu, nachher wieder ab. Die Bildungsgeschwindigkeit in den ersten 10–15 Tagen scheint von einer Kopulation unabhängig zu sein (Abb. 2A und 2B). Vielleicht handelt es sich um ein « Nährprotein », das in Beziehung zur Ernährung der Gewebe steht. Bei Insekten treten möglicherweise solche Proteine auf (CHEN & LEVENBOOK 1966).

Die übrigen Banden scheinen während der Verdauung resp. der Vitellogenese nicht sichtbar beeinflusst zu werden.

2. Eiproteine

Die wasserlöslichen Proteine von Eiern, die sich in der Vitellogenese befinden, werden in 18 Banden aufgetrennt (Abb. 1F).

E1–E3 und E5 sind sehr schwach vorhanden. E3 und E5 sind Glykolipoproteide.

E4 ist stärker vertreten und ist von blossem Auge als braune Bande erkenntlich (alkalisches Hämatin). Färberisch ist es ein eisenhaltiges Glyko-lipoprotein.

E6 ist am weitaus stärksten vorhanden. Beim frisch abgelegten Ei entfallen ca. 94 % aller Eiproteine auf diese Fraktion. Sie entspricht daher dem Reserveprotein der Dotterkugeln. Wie E4 erscheint auch sie dem Auge dunkelbraun wegen ihres Gehaltes an alkalischem Hämatin (WIGGLESWORTH 1943). Sie ist ebenfalls ein eisenhaltiges Glyko-lipoprotein (= Hämoglyko-lipoprotein). Im Ei von *Boophilus microplus* ist das Protohäm auch an das Reserveprotein als Hämoprotein gebunden (BREMNER 1959).

E6 zeigt das gleiche färberische Verhalten und den gleichen Rf-Wert wie H6 (Abb. 1). Bei Mischungen von Hämolymphe mit Eiextrakt lassen sich die beiden Banden auch bei längeren Laufzeiten nicht voneinander trennen.

Die Fraktion E7 ist schwach vertreten. Auch sie enthält wie E4 und E6 alkalisches Hämatin und ist ein eisenhaltiges Glyko-lipoprotein. Sie besitzt den gleichen Rf-Wert und das gleiche färberische Verhalten wie H7.

Die Banden E8 und E9 sind schwach vorhanden. E8 ist ein Glyko-lipoprotein, E9 ein Glykoprotein.

E10–E16 sind sehr schwach, E17 und E18 etwas stärker vertreten. Die Rf-Werte der Frontproteine E18 und H24 sind etwa gleich gross.

3. Immunologische Reaktionen

Die Übereinstimmung der Rf-Werte und des färberischen Verhaltens von H6 und E6 resp. H7 und E7 sind erst Anhaltspunkte für deren Identität. Weitere Hinweise kann die Anwendung von immunologischen Methoden liefern.

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzreaktion (Ausführung siehe bei Material und Methoden) erwiesen sich die erwähnten Banden H6 und E6 resp. H7 und E7 als antigenisch identisch oder doch nahe verwandt.

Die gleiche Methode wurde auch auf Kryostatschnitte von sich entwickelnden Eiern angewendet. Neben den Dotterkugeln war vor allem die periphere Zone zwischen Basalmembran, Eischale und angrenzendem Eicytoplasma stark fluoreszierend. Dies spricht für eine Konzentration der antigenisch wirksamen Eiproteine in dieser Region.

4. Schlussfolgerung

Die oben geschilderten Resultate weisen darauf hin, dass das Ei von *Ornithodoros moubata* die « female proteins » H6 und H7 aus der Hämolymphe aufnimmt und als Dotter speichert.

Dieser Schluss wird gestützt durch die elektronenmikroskopischen Befunde an Eizellen während der Vitellogenese (AESCHLIMANN & HECKER 1967, 1969). Die Oocytenmembran beim ungefütterten und unbegatteten Weibchen erscheint flach und ohne deutliche Oberflächenvergrößerung. Eier, die in Vitellogenese begriffen sind, zeigen jedoch einen ausgeprägten Mikrovillisaum mit Bildung von Pinocytosebläschen, die mit elektroendlichem Material erfüllt sind. Diese scheinen sich zu grösseren Komplexen (multivesiculated bodies) zu vereinigen, evt. zusammen mit ähnlichen aus Dictyosomen und Ergastoplasma stammenden Bläschen. Die « multivesiculated bodies » werden dann unter Auflösung der Membranen zu Dotterkugeln umgewandelt. Bei diesen durch Pinocytose aufgenommenen Substanzen handelt es sich unter anderem wohl auch um die « female proteins » H6 und H7. Die beobachtete starke Fluoreszenz im Bereiche Basallamina-Mikrovillisaum weist ebenfalls darauf hin. Dies könnte einer Oberflächenkonzentration der aufzunehmenden Proteine an den Membranen entsprechen, wie sie auch bei andern Zellen auftritt (BROCKMANN 1964, HOLTER 1965).

Damit scheint der bei gewissen Insekten auftretende Mechanismus der Dotterbildung durch Einlagerung von Hämolympfenproteinen auch bei *Ornithodoros moubata* zu gelten.

Diskussion

Von den Hämolympfenproteinen scheinen nur H6 und H7 in nachweisbaren Mengen in die Eizelle aufgenommen zu werden. Die Natur dieses selektiven Mechanismus bleibt ungeklärt. Doch gibt es Hinweise dafür, dass die sog. « coated vesicles » der Mikropinocytose eine Rolle spielen könnten (FAWCETT 1966). Solche scheinen auch beim Ei von *Ornithodoros moubata* aufzutreten (AESCHLIMANN & HECKER 1969).

Die Rolle von E6 als Reserveprotein des Eies ist klar. Die Funktion der übrigen Eibanden ist jedoch nicht bekannt. Interessant ist, dass E7 trotz hoher Konzentration in der Hämolymphe im sich entwickelnden Ei nur schwach vorhanden ist.

Es ist möglich, dass die Oocyte einen Teil des Reserveproteins selber endogen synthetisiert, da sie reich mit Ribosomen, Dictyosomen, Mitochondrien und einem Endoplasmatischen Reticulum versehen ist (AESCHLIMANN & HECKER 1969).

Résumé

- 1) Pendant la vitellogénèse, deux « female proteins » (H6 et H7) apparaissent en grandes concentrations dans l'hémolymphe d'*Ornithodoros moubata*. Ce sont des hémoglyco-lipoprotéines.
- 2) Parmi les protéines de l'œuf, on trouve deux bandes (E6 et E7) ayant les mêmes mobilités électrophorétiques que H6 et H7. Ce sont aussi des hémoglyco-lipoprotéines.
- 3) H6 et E6, resp. H7 et E7 sont antigéniquement identiques ou du moins très proches l'une de l'autre.
- 4) On suppose que H6 et H7 pénètrent dans l'œuf par micropinocytose. Ces protéines serviront plus tard de protéines de réserve.
- 5) Dans l'hémolymphe de femelles vierges et nourries, les « female proteins » n'atteignent qu'après plusieurs semaines des concentrations comparables à celles trouvées dans l'hémolymphe de femelles gorgées et copulées depuis 10 à 12 jours. Ainsi, la copulation exerce une nette influence sur la vitesse de synthèse de H6 et H7.

Summary

- 1) During yolk formation two female proteins (H6/H7) are found in high concentrations in the hemolymph of *Ornithodoros moubata*; they are hemo-glyco-lipoproteins.
- 2) Amongst the water-soluble egg proteins there are two bands (E6/E7) of the same electrophoretical mobilities as H6 and H7; they

too are hemo-glyco-lipoproteins. E6 formes the reserve protein of the yolk platelets.

- 3) With respect to their antigenic properties, H6/E6 and H7/E7, are either identical or at least very similar.
- 4) It is supposed that H6 and H7 are taken up into the oocyte by micropinocytosis and that they are stored there as yolk.
- 5) The H6- and H7-concentrations are compared in fed, „non-copulated” females and in fed, „copulated” females. It takes several weeks before the level observed during yolk formation in the latter group is reached in the former.

LITERATUR

AESCHLIMANN, A., 1968. *La ponte chez Ornithodoros moubata (Ixodoidea : Argasidae)*. Rev. suisse Zool. **75**, 1033-1039.

AESCHLIMANN, A., & HECKER, H., 1967. *Observations préliminaires sur l'ultrastructure de l'ovocyte en développement chez Ornithodoros moubata, MURRAY (Ixodoidea : Argasidae)*. Acta trop. **24**, 225-243.

— 1969. *Vitellogénèse et formation cuticulaire chez l'œuf d'Ornithodoros moubata, MURRAY (Ixodoidea : Argasidae)*. Acarologia (sous presse).

GRUNDMANN

E. ~~BARGMANN~~, E., 1964. *Allgemeine Cytologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

BREMNER, K. C., 1959. *Studies on « haemixodovin », the pigment in the eggs of the cattle tick Boophilus microplus (Acarina : Ixodidae)*. Aust. J. Biol. Sci. **12**, 263-273.

CLARKE, J. T., 1964. *Simplified « disc » (polyacrylamide gel) electrophoresis*. Ann. N.Y. Acad. Sci. **121**, 428-436.

CHEN, P. S., & LEVENBOOK, L., 1966. *Studies on the haemolymph proteins of the blowfly Phormia regina*. J. Insect Physiol. **12**, 1595-1627.

FAWCETT, DON W., 1966. *The cell. An atlas of fine structure*. W. B. Saunders Company, Philadelphia and London.

GEIGY, R. & HERBIG, A., 1955. *Erreger und Überträger tropischer Krankheiten*. Verlag für Recht und Gesellschaft, Basel.

HOLTER, H., 1965. *Physiologie der Pinocytose bei Amöben*, in *Sekretion und Exkretion*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

LAUFER, H., 1960. *Blood proteins in insect development*. Ann. N.Y. Acad. Sci. **89**, 490-515.

LEES, A. D. & BEAMENT, J. W. L., 1948. *An egg-waxing organ in ticks*. Quart. J. micr. Sci. **89**, 291-333.

TELFER, W. H., 1965. *The mechanism and control of yolk formation*. Ann. Rev. Ent. **10**, 161-184.

VAN SANDE, M. & KARCHER, D., 1960. *Species differentiation of insects by hemolymph electrophoresis*. Science, **131**, 1103-1104.

WAGNER-JEVSEENKO, O., 1958. *Fortpflanzung bei Ornithodoros moubata und genitale Übertragung von Borrelia duttoni*. Acta trop. **15**, 117-168.

WIGGLESWORTH, V. B., 1943. *The fate of hemoglobin in Rhodnius prolixus and other blood-sucking arthropods*. Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, **131**, 313-339.

WILLIAMS, J., 1965. *Chemical constitution and metabolic activities of animal eggs*, in : *The biochemistry of animal development*, Vol. 1, edited by R. Weber, Academic Press, New York and London.