

Biochemie der Kastenentstehung bei der Honigbiene

H. Rembold (Max-Planck-Institut für Biochemie, München, Deutschland)

Die Honigbiene (*Apis mellifica* L.) bildet zwei weibliche Kasten: die Bienenkönigin als Geschlechtstier und die Arbeiterinnen. Beide Kasten besitzen das gleiche Erbgut: die frisch geschlüpfte weibliche Bienenlarve ist nach allem, was wir heute wissen, noch völlig bipotent. Erst während einer sensiblen Phase von 2-3 Tagen wird entschieden, ob sie sich zur Königin oder zur Arbeiterin entwickelt. Diese Entscheidung wird allerdings im Bienenstock dadurch vorweggenommen, dass sich aus Eiern, die in Arbeiterinnenzellen abgelegt wurden, nur Arbeiterinnen entwickeln. Ganz entsprechend wachsen in Königinnen-(oder Weisel-)Zellen nur Königinnen heran. Wir werden aber später sehen, dass dieser so eindeutige Unterschied nichts anderes als eine Orientierungshilfe für die Brutpflegenden Ammenbienen darstellt: sie sorgen nämlich dafür, dass nur die in den Weiselzellen heranwachsenden Larven eine Nahrung erhalten, welche sie zu Königinnen determiniert.

Morphologische Kastenunterschiede

Schon ein äusserer Vergleich der beiden Kasten zeigt, wie tief durch die Determination in die weitere Entwicklung der Larve zur Imago eingegriffen wird. Der Körper der erwachsenen Königin ist um mehr als ein Drittel länger als der der Arbeiterin. Der Pollensammelapparat ist nur bei der Arbeiterin ausgebildet. Die Kopfform und vor allem die Mandibeln sind bei den beiden Kasten verschieden. Besonders stark sind die Unterschiede naturgemäss bei den Gonaden: Eierstöcke und Samenblase sind bei der Arbeiterin fast ganz verkümmert. Auch die Drüsen zeigen starke Unterschiede: von den exkretorischen Kopfdrüsen ist die Futtersaftdrüse bei der Arbeiterin - und hier besonders bei der Brutamme - mächtig entwickelt, bei der Königin nur als Anlage vorhanden; auch die Wachs- und die abdominalen Duftdrüsen sind nur bei der Arbeiterkaste entwickelt - was ja auch funktionell sinnvoll ist. Im endokrinen Drüsensystem zeigt das Volumen und auch der histologische Bau der Corpora allata grosse Unterschiede: das Wachstum dieser Drüse bleibt während der Imaginalentwicklung der Arbeiterin deutlich gegenüber dem der Königin zurück. Die Corpora cardiaca sind bei der adulten Königin etwa dreimal grösser als bei der Arbeiterin.

Biochemische Kastenunterschiede

Zu diesen morphologischen und histologischen Unterschieden tritt eine Differenzierung des Stoffwechsels, die an drei von uns untersuchten Beispielen verdeutlicht werden soll.

1. Einfluss auf den Energiestoffwechsel¹. Seit den Untersuchungen von Melampy und Willis (1939)² ist bekannt, dass die Königin in allen Stadien der Imaginalentwicklung einen höheren spezifischen Sauerstoffverbrauch hat als die Arbeiterin. Eine dreitägige Königinnenlarve veratmet beispielsweise $4\ 700 \pm 1\ 290\ \mu\text{l}$ Sauerstoff pro Gramm Tier und Stunde, während der entsprechende Wert bei der Arbeiterin mit $2\ 200 \pm 228\ \mu\text{l}$ nur etwa halb so hoch ist. Die biochemische Ursache für diesen drastischen Unterschied fanden wir bei einer vergleichenden Analyse der Mitochondrien aus beiden Kasten. In diesen submikroskopisch kleinen Zellpartikeln läuft unter anderem der Hauptteil der Zellatmung ab, wobei der aus der Nahrung stammende Wasserstoff in einer Energiekaskade mit dem Sauerstoff der Atemluft verbrannt wird. Aus diesem noch nicht in allen Einzelheiten bekannten Prozess gewinnt der Organismus den grössten Teil der zur Aufrechterhaltung der Lebensvorgänge benötigten Energie.

Ein Vergleich der in den beiden Kasten vorhandenen Mitochondrien zeigt bei allen Entwicklungsstadien einen krassen Unterschied: schon die dreitägige, gerade determinierte Königinnenlarve enthält etwa fünfmal mehr Mitochondrien als die gleichaltrige Arbeiterinnenlarve! Zu dem quantitativen kommt noch ein starker qualitativer Unterschied: bei gleichen Mengen veratmen Mitochondrien aus Königinnen die angebotenen Substrate wesentlich stärker als es die Zellpartikel aus Arbeiterinnen vermögen. Den Grund dafür fanden wir bei einem spektroskopischen Vergleich: Mitochondrien aus Arbeiterinnenlarven enthalten zwei wichtige Komponenten der Atmungskette (Cytochrom c und Cytochrom-Oxydase) in geringerer Menge als die Mitochondrien der Königinnenlarven - ihre Atmung ist also gedrosselt! Erst während der späteren Puppenentwicklung erhalten auch sie ihre volle Leistungsfähigkeit.

2. Einfluss auf den Kohlenhydratstoffwechsel³. Bereits während der Imaginalentwicklung bekommt die Honigbiene einen beträchtlichen Teil ihrer Nahrung als Invertzucker angeboten. Eine vergleichende Analyse der Zucker abbauenden Enzyme in beiden Kasten brachte keine auffallenden Unterschiede. Sie zeigen in beiden Fällen einen Aktivitätsverlauf,

der bei den sich verschieden rasch entwickelnden Kasten nicht vom Alter, sondern vom Entwicklungszustand der Tiere abhängt. Auffallend ist eine sprunghafte Aktivitätszunahme der Fructose-diphosphat-aldolase am Ende der Fressperiode, deren Wert innerhalb weniger Stunden bei beiden Kasten auf das über Fünffzigfache ansteigt! Alle anderen glykolytischen Enzyme folgen dagegen einem gleichbleibenden oder während der weiteren Entwicklung abfallenden Verlauf. Das Determinationsgeschehen greift offenbar nicht in die Steuerung der Enzymsynthese ein: der regulierende Eingriff erfolgt vielmehr auf dem Substratniveau! Eine Bestimmung des Glykogengehalts in den verschiedenen Entwicklungsstadien beider Kasten zeigt, dass die Synthese dieses Reservestoffs in der Königin drastisch verringert ist, ohne dass sich Zwischenstufen des Kohlenhydratstoffwechsels anreichern. Im Gegensatz zur Arbeiterin, die während der Larvenentwicklung einen hohen Glykogenspeicher anlegt, baut schon die dreitägige Königinnenlarve ihren noch vorhandenen Glykogenspeicher sehr rasch ab und hält ihn im Verlauf der weiteren Entwicklung auf einem niedrigen Niveau. Da auch keine auffälligen Fett- oder Proteinspeicher gebildet werden, vermögen wir im Augenblick noch nicht zu sagen, in welcher Form bei der Königin die für die Puppenentwicklung benötigten Reservestoffe angelegt werden.

3. Einfluss auf die Proteinbiosynthese. Unser drittes Beispiel führt uns an die Frage einer direkten Beeinflussung der genetischen Information heran: wird im Verlauf der Determination nicht nur die Steuerung der Morphogenese beeinflusst, sondern in einigen Fällen direkt die Ablesung der genetischen Information bei der Synthese ganz bestimmter Eiweissstoffe? Wir haben diese Frage mit Hilfe der Isotopentechnik untersucht: Königinnenlarven wurden kurzzeitig mit der Aminosäure Phenylalanin gefüttert, welche mit radioaktivem Wasserstoff etikettiert war, entsprechende Arbeiterinnenlarven mit der gleichen Aminosäure, die aber mit radioaktivem Kohlenstoff markiert war. Beide Isotope lassen sich nebeneinander sehr einfach quantitativ bestimmen. Eine vergleichende Analyse der Haemolymphproteine zeigte neben einem weitgehend gleichförmigen Bild, dass eine bestimmte Eiweissfraktion nur in der Königin, eine andere nur in der Arbeiterin synthetisiert wird. Letztere konnten wir inzwischen weitgehend reinigen und wir sind dabei, mit Hilfe der immunologischen Technik dieses Protein vollends als reines Arbeiterinnenspezifisches Antigen in die Hand zu bekommen. Für unsere Betrachtung ergibt sich aber schon jetzt folgende bedeutsame Tatsache: im

Verlauf des Determinationsgeschehens wird nicht nur in die - quantitative - Steuerung biochemischer Abläufe eingegriffen, sondern auch die - qualitative - Auswertung der im Erbgut gespeicherten Information in einigen wenigen Fällen beeinflusst.

Der Determinationsstoff⁴

Brutschrankversuche zeigen, dass für den Determinationseffekt nur die Nahrung der jungen Larve entscheidend ist. Dabei spielen weder die Menge noch zum Beispiel der Wassergehalt der angebotenen Nahrung eine wesentliche Rolle. Auch bei der Aufzucht der weiblichen Bienenlarven auf überreichlichen Mengen Arbeiterinnenfuttersaft entstehen nur Arbeiterinnen! Es ist auch nicht entscheidend, dass die Larven einen ihrem Alter entsprechenden Futtersaft erhalten. Es genügt, sie mit einem aus Zellen dreitägiger Larven entnommenen Weiselzellenfuttersaft aufzuziehen, um Königinnen zu erhalten. Bei diesen Brutschrankversuchen entstehen neben den reinen Kasten auch Zwischenformen. Solche Tiere besitzen zum Teil die Merkmale einer Königin - zum Beispiel einen kurzen Rüssel und stark entwickelte Ovarien - und zum Teil die einer Arbeiterin - wie die Form der Mandibeln und der Sammelbeine.

Es ist uns im Verlauf der letzten Jahre gelungen, aus der Nahrung der Königinnenlarve - dem Weiselzellenfuttersaft - den für die Determination verantwortlichen Stoff hoch anzureichern. Der dabei eingeschlagene Weg sei kurz skizziert. Weiselfutter lässt sich in seine Komponenten Protein, Lipid, Heterocyclusen und Dialysat zerlegen und auch wieder regenerieren, ohne dass die biologische Aktivität zerstört wird. Aus dem Dialysat lässt sich eine determinierende Fraktion entfernen, deren Fehlen zur Folge hat, dass nun auch mit Weiselfutter nur noch Arbeiterinnen entstehen. Diesen modifizierten Futtersaft verwenden wir als Grundfutter im Aufzuchtversuch. Eine diesem Grundfutter zugesetzte Fraktion ist biologisch aktiv, wenn im Aufzuchtversuch Königinnen und Zwischenformen neben Arbeiterinnen entstehen. Mit diesem - sehr zeitraubenden und natürlich vom Bienenjahr abhängigen - biologischen Test erhielten wir bei der Aufarbeitung von insgesamt 5 kg Weiselzellenfuttersaft 450 mg einer biologisch hochaktiven Fraktion. Der darin enthaltene Determinationsstoff ist zwar chemisch sehr stark eingeeengt, aber noch nicht rein genug, um schon Aussagen über die Stoffklasse machen zu können, von der er sich herleitet. Er ist auch bei hoher Anreicherung selbst

bei vorsichtiger Behandlung aussergewöhnlich labil, eine Eigenheit, die sich schon bei der Lagerung des Weiselfutters in einer kontinuierlichen Abnahme der biologischen Aktivität zeigt.

Die Funktion der Ammenbienen⁵

Mit dem Nachweis einer Substanz, welche für die Entstehung der beiden Bienenkasten verantwortlich ist, erhebt sich die Frage nach ihrer kontrollierten Synthese durch die Ammenbienen. Wie lässt es sich verstehen, dass ein Bienenvolk sich bei Bedarf innerhalb kurzer Zeit auf die Produktion von Königinnen umstellen kann?

Eine Vielzahl vergleichender Analysen hat gezeigt, dass die Nahrung der Arbeiterinnen- und der Königinnenlarven praktisch die gleiche Zusammensetzung hat⁶. Neben dem Determinationsstoff wurde als einziger Unterschied eine zehnfach höhere Konzentration von Pantothersäure, Biopterin und Neopterin im Weiselfutter nachgewiesen. Alle drei Verbindungen spielen beim Determinationsgeschehen keine Rolle. Sie haben aber als Cofaktoren eine wichtige Stoffwechselfunktion. Pantothersäure als Bestandteil des Coenzym A, hydriertes Biopterin als Cofaktor verschiedener mischfunktioneller Oxygenasen. Histoautoradiographische Untersuchungen zeigen einen erhöhten Einbau der markierten Pterine in stark stoffwechselaktive Gewebe (Imaginalscheiben, Muskulatur)⁷. Da sich Pantothersäure und Biopterin schon in geringen Konzentrationen mikrobiologisch bestimmen lassen, konnten wir sie als Leitsubstanzen für den Nachweis der Futtersaftbildung in der Ammenbiene verwenden.

Arbeitsbienen haben vier im Kopf und im vorderen Thorax gelegene Drüsen mit äusserer Sekretion, von denen bei der Amme die Pharynxdrüse besonders aktiv ist. Nach Verfütterung wird markiertes Biopterin deutlich in diese Drüse und auch in die Mandibeldrüse eingebaut. Der Biopterin gehalt der Mandibeldrüse hängt von der Pflegefunktion ab und ist bei Weiselammen mehr als zweihundertfach höher als bei Bienen, welche Arbeiterinnenbrut füttern. Ganz entsprechende Verhältnisse findet man für die Pantothersäure. In den anderen Drüsen ist die Konzentration dieser beiden Leitsubstanzen dagegen nicht verändert. Andererseits liessen sich die für Bienenfuttersäfte charakteristischen Stoffe nur in der Pharynxdrüse nachweisen. Diese Ergebnisse zeigen sehr überzeugend, dass bei der Bildung des Weiselzellenfuttersaftes zwei Drüsen zusammenwirken: Die Pharynxdrüse produziert das Grundfutter, welches mit dem Arbeiterinnen-

futter identisch ist, während die für Weiselfutter typischen Bestandteile, wozu man wohl auch den Determinationsstoff zählen muss, aus der Mandibeldrüse stammen. Mit dem einfachen Mechanismus einer Aktivierung der Mandibeldrüse unter der Wirkung eines Pheromons können sich die brutpflegenden Bienen bei Bedarf sehr rasch auf die Produktion von Weiselfutter umstellen. Welche Rolle die drei Leitsubstanzen in der Mandibeldrüse spielen, ist noch unbekannt. Man kann aber vermuten, dass sie in einer Beziehung zur Biosynthese des Determinationsstoffs stehen.

Theorie der Kastenbildung

Überblicken wir das bisher Gesagte, dann stehen einem sicher bald chemisch definierten trophogenen Determinationsstoff eine Vielzahl morphologischer und biochemischer Folgereaktionen gegenüber, die - ausgehend von einer sensiblen Phase - im Verlauf der Imaginalentwicklung zur Entstehung der beiden weiblichen Kasten führen. Diese sind bei grossen Unterschieden im Körperbau an ihre sozialen Funktionen gut angepasst - man denke nur an den Pollensammelapparat bei der Arbeiterin oder an die mächtig entwickelten Gonaden bei der Königin. Eine vergleichende biochemische Analyse zeigt uns schon an wenigen Beispielen, wie tief das Determinationsgeschehen auch in den Energiestoffwechsel, in die Steuerung der Stoffwechselwege und in die Verwertung genetischer Information eingreift. Wenn wir vergleichbare Abläufe beim Säuger suchen, dann drängt sich uns ein Vergleich mit der Wirkung des Thyroxins auf: auch hier der starke Einfluss auf die Morphogenese einerseits und auf den Stoffwechsel andererseits. Erwartungsgemäss ist dieses Hormon aber bei der Honigbiene selbst in Konzentrationen von 0,1mg pro g Futtersaft im Aufzuchtversuch wirkungslos.

Wir können als Arbeitshypothese annehmen, dass der Determinationsstoff die Aufgabe hat, ein in zu geringer Menge produziertes Hormon zu ergänzen, welches - ähnlich wie beim Säuger das Thyroxin - bei der Honigbiene eine morphogenetische und eine Stoffwechselwirkung entfaltet. Diese Hypothese stützt sich nicht zuletzt auf die Beobachtung, dass die Entwicklung der endokrinen Drüsen bei beiden Kasten sehr unterschiedlich ist.

Wir können wohl kaum annehmen, dass die Phylogenie der sozialen Insekten losgelöst von der Entwicklung der solitären Insekten verlaufen ist. Die angedeutete Arbeitshypothese schliesst dann aber die Forderung ein, dass die Insekten ganz allgemein ein morphogenetisch wirkendes

Hormon enthalten müssen, welches bei der Honigbiene den Determinationsstoff des Weiselfutters zu ersetzen vermag.

Diese Forderung konnten wir bestätigen. Es wurden 1.000 Seidenspinner in der gleichen Weise wie beim Weiselfutter üblich aufgearbeitet. Die biologische Aktivität fand sich an der zu erwartenden Stelle und führt im Aufzuchtversuch zur Entstehung von Bienenköniginnen, Zwischenformen und Arbeiterinnen. Soweit die Genauigkeit des biologischen Tests eine quantitative Aussage zulässt, kann man sagen, dass sich aus 1.000 Faltern soviel Determinationsstoff gewinnen lässt, wie in etwa 1 kg Weiselfutter enthalten ist. Die Aktivität findet sich in gleicher Stärke in den männlichen wie in den weiblichen Tieren. Das chemische Verhalten spricht dafür, dass der aus dem Seidenspinner angereicherte Determinationsstoff eine zumindest ähnliche wenn nicht sogar identische Struktur wie der aus Weiselfutter hat. Wir sind dabei, durch die Aufarbeitung und Untersuchung möglichst verschiedener Insekten diesen Befund zu verallgemeinern.

Das bisher gewonnene Ergebnis darf als eine starke Stütze für die diskutierte Theorie betrachtet werden, dass die Kastenbildung ihren Ursprung in einer zu geringen Hormonproduktion während einer sensiblen Entwicklungsphase hat. Sind nach Ablauf dieser Periode die Weichen für die weitere Entwicklung erst einmal gestellt, dann wird durch eine Normalisierung der Hormonproduktion auch der Stoffwechsel normalisiert. Der weitere Ablauf der Morphogenese aber ist irreversibel festgelegt.

Danksagung

Die beschriebenen Untersuchungen waren nur möglich dank der fortwährenden Unterstützung durch meinen Lehrer, Herrn Prof. A. Butenandt, und durch Herrn Dr. K. A. Forster, Firma H. Mack, Nachf. Einen wesentlichen Anteil haben ferner meine Mitarbeiter Dr. G. Hanser, welche die biologischen Tests durchführte, Dr. Ch. Czoppelt, der die extramitochondrialen Enzyme, Dr. M. Osanai, der die Mitochondrien und Dipl.-Chem. H. Graf, der die Haemolymphproteine untersuchte. Die Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die A.v.Humboldt-Stiftung unterstützt.

Summary

Biochemistry of Caste Formation in the Honey Bee

Female bee larvae are bipotent and can be determined to

queens within the first three days of larval development. The adult castes (queens and workers) differ from each other in many morphological and metabolic properties. Especially significant biochemical differences were found in energy and in carbohydrate metabolism. The quantity of the mitochondria in the queen is more than 2-fold higher than that of the worker throughout the developmental stages. The worker larvae contain quantitatively less cytochrome c and cytochrome oxidase than the queen larvae. Glycogen is accumulated only in the worker during larval development. Other differences are found in protein biosynthesis: apparently genes are activated or blocked under the action of a trophogenic factor contained in Royal Jelly. This chemical labile determining substance has been partially purified from queen food. It could also be demonstrated in extracts from male and female silkworms. From the data presented a working hypothesis is proposed: caste formation is explained as a consequence of hormonal deficiency in a certain stage of imaginal development. The function of the determining substance which may be identical with the deficient hormone, is to repair this deficiency. In this case sexually mature females develop, under hormonal deficiency workers are formed. One can conclude from this theory that a hormone with morphogenetic and metabolic activity is present in all insects, as has been proved with the silkworm. It will be the task of future experiments to test this generalization by the demonstration of determining activity in a series of other non social insects.

Literatur

1. M. Osanai u. H. Rembold, Biochim. Biophys. Acta 162, (1968) 22.
2. R. M. Melampy u. E. R. Willis, Physiol. Zool. 12, (1939) 302.
3. Ch. Czoppelt u. H. Rembold, Z. Physiol. Chem. 348, (1967) 1229.
4. H. Rembold u. G. Hanser, Z. Physiol. Chem. 339, (1964) 251; Uebersicht: H. Rembold, Vitamines, Hormones, 23, (1965) 359. -, Umschau Wiss. Technik 1967, 454; -, Allgem. Deutsche Imkerz. 2, (1968) 75.
5. G. Hanser u. H. Rembold, Z. Naturforschg. 19b, (1964) 938.
6. H. Rembold, loc. cit. 4.
7. G. Hanser u. H. Rembold, Z. Naturforschg. 23b, (1968) 666.