

Juvenilhormonwirksame Verbindungen

I. Juvenilhormonwirkungen bei *Tenebrio molitor* L. in Abhängigkeit von der Konzentration der hormonalen Substanz

MECHTHILD ROSE, JUTTA WESTERMANN, HEINZ TRAUTMANN und PETER SCHMIALEK

Physiol. Chem. Institut der Freien Universität Berlin (Abteilung: Prof. Dr. Dr. E. SCHÜTTE)

und

JÜRGEN KLAUSKE

Physiologisches Institut der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. O. H. GAUER)

(Z. Naturforsch. 23 b, 1245—1248 [1968]; eingegangen am 2. Mai 1968)

Es wird ein neues Bewertungsschema für die nach Einwirkung von Juvenilhormon-wirksamen Verbindungen aus *Tenebrio-Molitor*-Puppen entstehenden Morphen angegeben, das die Aufstellung von Regressionsgraden aus der Dosis/Wirkungs-Beziehung gestattet.

Die sich aus diesen Regressionsgraden ergebenden Aussagen über die Wirkungsstärke der getesteten Verbindungen werden diskutiert.

Hormonhaltige Extrakte abgestufter Konzentration wurden von WIGGLESWORTH¹ in die Cutis frisch geschlüpfter Puppen von *Tenebrio molitor* eingepfropft und an der Stärke und Ausdehnung der Cutanreaktion des später schlüpfenden Käfers die Aktivität der Extrakte abgeschätzt.

SCHMIALEK² benutzte den gleichen Test und versuchte, die Stärke der Cutisreaktion zu quantifizieren. Bei der Beurteilung der Wirkung aktiverer Substanzen, die selbst nach lokaler Applikation zu einer völligen Metamorphosehemmung führten, versagte diese Methode³. KARLON und NACHTIGALL⁴ ersetzten die von WIGGLESWORTH¹ benutzte Verimpfung der Substanzen durch die subcuticuläre Injektion in *Tenebrio molitor*-Puppen und definierten diejenige Konzentration in mg der Testsubstanz, die bei etwa 50% der Tiere eine positive Cutanreaktion ergab als eine *Tenebrio*-Einheit [T.U.]. Den gleichen Test benutzten RÖLLER und BJERKE⁵ bei der Isolierung einer Juvenilhormon-wirksamen Substanz aus *Hyalophora cecropia*-Imagines.

Diese Bewertungsart verlangt, daß man die minimalste zur Erzielung einer Cutisreaktion benötigte Konzentration der Testsubstanz über eine Verdünnungsreihe bestimmt. Die so ermittelten Aktivitäten von Juvenilhormon [J.H.]-Analoge variieren über 6

und mehr Zehnerpotenzen. Der Arbeitsaufwand für den Test ist also sehr groß. Wir haben daher versucht, auch stärkere J.H.-Effekte, die sich in der Ausbildung von Zwischenformen manifestieren, für die Aktivitätsbewertung der getesteten Substanzen zu verwenden.

Nachstehend wird über die erhaltenen Ergebnisse berichtet.

Material und Methoden

Die auf ihre J.H.-Aktivität zu untersuchenden Substanzen wurden nach WIGGLESWORTH¹ an 2—24 Stdn. alten *Tenebrio molitor*-Puppen [der Hauptanteil der Tiere schlüpfte etwa 7 Stdn. vor der Punktion] getestet.

Das Lösungsmittel war Paraffinum liquidum DAB 6 Merck, die eingesetzten Verbindungen 4 Isomere des racemischen 10.11-Epoxy-7-äthyl-3.11-dimethyl-10.11-trans-trideca-2,6-dien-carbonsäuremethylesters und zwar die 2-cis, 6-trans-Verbindung, 2-trans, 6-cis-Verbindung, 2-trans, 6-trans-Verbindung und die 2-cis, 6-cis-Verbindung.

Sie wurden durch Dr. PFIFFNER und Dr. SCHWITTERS von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, synthetisiert und uns freundlicherweise für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Wir verwendeten 10 verschiedene Testkonzentrationen, und pro Konzentration jeweils 100 Testtiere.

Die punktierten Puppen wurden in perforierten Blechschachteln [80·75·15 mm]*, die mit Zellstoff aus-

¹ V. B. WIGGLESWORTH, J. Insect Physiol. 2, 73 [1958].

² P. SCHMIALEK, Z. Naturforsch. 16 b, 461 [1961].

³ P. SCHMIALEK, Z. Naturforsch. 18 b, 516 [1963].

⁴ P. KARLSON u. M. NACHTIGALL, J. Insect Physiol. 7, 210 [1961].

⁵ H. RÖLLER, J. S. BJERKE u. M. H. McSHAN, J. Insect Physiol. 11, 1185 [1965].

* Hersteller: Firma von Eicken, Hamburg, Ausführung: Dark Flake.

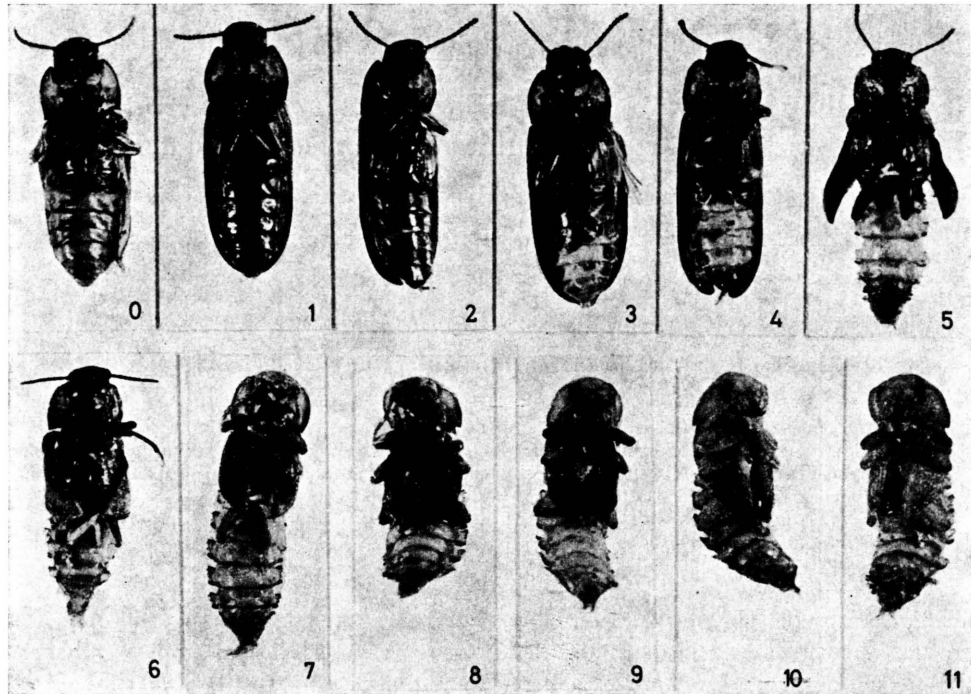


Abb. 1. Unter dem Einfluß von Juvenilhormon-wirksamen Verbindungen entstandene Morphen der Puppen-Käfer-Häutung von *Tenebrio molitor* L. Die Ziffern neben den Abbildungen entsprechen den numerischen Werten der morphogenetischen Wirkung einer J.H.-aktiven Substanz auf die Puppen-Käfer-Häutung bei *Tenebrio molitor* L.

gelegt waren, bei 25 °C und etwa 65% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten und 2 Tage nach dem Schlüpfen der Kontrollgruppe nach ihrem äußeren Aspekt klassifiziert [Abb. 1]. Zur Feststellung für die schließlich generell verwendete Abgrenzung der Morphen wurde zuerst untersucht, ob und welcher mathematische Zusammenhang zwischen der Verteilung der entstehenden Morphen und der applizierten Konzentration besteht. Dazu wurden die einzelnen Morphen empirisch so bewertet und gegeneinander abgegrenzt, daß der Wert des Bruchs

$$\frac{[B_m \cdot n_m]}{n_m}$$

[m = Ziffer der Morphe, n_m = Anzahl der entstandenen Individuen dieser Morphe, B_m = Bewertung dieser Morphe], proportional der Konzentration wurde. Dies ließ sich erreichen, wenn die Bewertungen die Gleichung $B_m = a^m - 1$ erfüllten [a = eine substanzabhängige Konstante].

Das bedeutet, daß unsere willkürliche qualitative Einteilung der Morphen eine quantitativ-logarithmische ist. Dieser logarithmische Zusammenhang erlaubt die Aufstellung einer linearen Regression im halblogarithmischen Achsenkreuz.

Für jede getestete Substanzkonzentration wurde durch Interpolation — in wenigen Grenzfällen durch

Extrapolation — diejenige Morphe ermittelt, die bei 50% der Tiere entstanden war [M_{50}].

Diese M_{50} -Werte wurden gegen $\log G/\text{Vol}$ aufgetragen und die Regressionsgrade für die jeweilige Substanz bestimmt. Die Graden für die vier oben aufgeführten Isomeren zeigt Abb. 2. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist an der Doppelbestimmung bei der Konzentration von $10^{-3} [\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}]$ J.H.-wirksamer Substanz abzuschätzen.

Diskussion

Die 4 getesteten Verbindungen unterscheiden sich chemisch nur durch die *cis-trans*-Isomerie der Doppelbindungen. Ihre hormonale Wirksamkeit bei gleicher Konzentration ist unterschiedlich. Es differieren aber auch die Steigungen der Regressionsgraden, d. h. das Ausmaß der Wirkungszunahme mit der Konzentration. Über die Ursache, insbesondere für das letztere Phänomen, können wir nur spekulieren.

Wechselnde Steilheiten der Regressionsgraden [morphogenetische Wirkung/ $\log$ Dosis] finden sich auch bei anderen Hormonen, z. B. einigen Progesteronabkömmlingen⁶.

Die aus derartigen unterschiedlichen Steigungen der Regressionsgraden sich ergebenden Konsequenzen sind:

⁶ G. K. SUCHOWSKY u. K. JUNKMANN, *Endocrinology* **68**, 341 [1961].

Der Vergleich der Wirksamkeit zweier Substanzen auf Grund des Verhältnisses der zur Erzielung eines bestimmten morphogenetischen Erfolgs, z.B. einer positiven Cutanreaktion, benötigten Substanzmengen erlaubt keinen Schluß auf die Konzentration der beiden Verbindungen, die für die Erzielung einer anderen, gleicherweise J.H.-abhängigen Morphenausbildung – z.B. Induktion von Zwischenformen – benötigt werden.

Hier kann sich das Verhältnis der Wirkungsstärke zweier Verbindungen sogar umkehren, wie es am Beispiel der 2-*cis*, 6-*trans*- und der 2-*trans*, 6-*cis*- bzw. *all-trans*-Verbindungen zu sehen ist [vgl. Abb. 2].

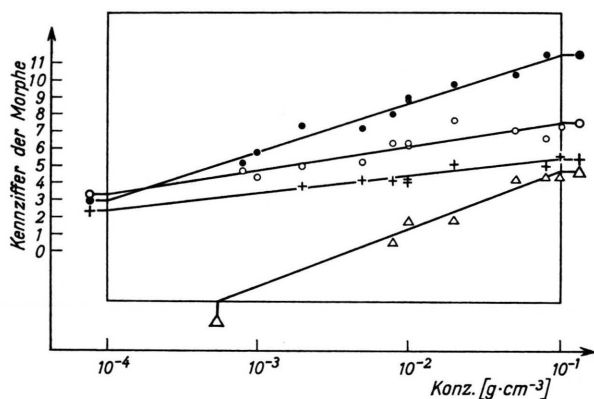


Abb. 2. Dosis-Wirkungsbeziehung von vier Isomeren des rac. 10.11-Epoxy-7-äthyl-3.11-dimethyl-10.11-*trans*-trideca-2.6-dien-carbonsäure-methylesters bei *Tenebrio molitor*-Puppen. Die Meßpunkte für die vier Isomeren werden wie folgt symbolisiert: * = 2 *cis*, 6 *trans*, + = 2 *trans*, 6 *cis*, O = 2 *trans*, 6 *trans*, Δ = 2 *cis*, 6 *cis*, und die entsprechenden Regressionsgrade mit den gleichen Symbolen gekennzeichnet.

Vergleichbare Überschneidungen der Regressionsgraden finden sich auch in der Publikation von SUCHOWSKY und JUNKMANN⁶. Weitere Konsequenzen ergeben sich für alle Aussagen über die hormonale Wirksamkeit der Fraktionen einer Gewebeaufarbeitung, da auch hier alle bisher gebräuchlichen Testbewertungen für das J.H. auf dem minimalsten Substanzbedarf zum Hervorbringen der Cutisreaktion beruhen. Zum Beispiel können in den sogenannten inaktiven Fraktionen der Ausgangsschritte einer Aufarbeitung hormonwirksame Substanzen enthalten sein, deren Dosiswirkungsbeziehung sehr steil verläuft und die deswegen in der untersuchten starken Verdünnung in der Cutanreaktion nicht erfaßt werden können, obwohl sie in höheren Konzentrationen stärker aktiv sein könnte als eine Verbindung,

die infolge einer weniger steilen Dosis-Wirkungsbeziehung – über die Cutanreaktion nachgewiesen – als die aktivere imponiert. Diese Überlegungen zeigen auch, daß wir aus der hohen Aktivität einer insekteneignen Verbindung im Cutantest nicht die Aussage ableiten dürfen, daß es sich hierbei um das aktivste Juvenilhormon handle.

Nach folgenden Juvenilhormon-abhängigen Veränderungen gegenüber den Kontrollen wurden die Morphen der Puppen-Käfer-Häutung von *Tenebrio molitor* L. klassifiziert:

- Morphe 0: Normaler Käfer. Die Punktionsstellen zeigen keine Änderung der Pigmentierung gegenüber der umgebenden Käfercutis.
- Morphe 1: Normaler Käfer. Mindestens eine der Punktionsstellen ist gegenüber der umgebenden Käfercutis aufgehell.
- Morphe 2: Normaler Käfer. An einer der Punktionsstellen ist die Käfercutis durch die Puppencuticula ersetzt.
- Morphe 3: In der weiteren Umgebung von mindestens einer der 6 Punktionsstellen ist die Käfercutis durch eine Puppencuticula ersetzt.
- Morphe 4: Die Puppencuticula bedeckt fast die ganze Unterseite des Abdomens des geschlüpften Käfers.
- Morphe 5: Das Abdomen zeigt puppalen Charakter, ist aber gestreckt, die Flügeldecken sind verkürzt. Ansonsten ist der Thorax dem einem normalen Käfers entsprechend ausgebildet.
- Morphe 6: Das Abdomen zeigt puppalen Charakter, der Gesamtkörper ist noch gestreckt, die Flügeldecken stärker geschrumpft als bei Morphe 5.
- Morphe 7: Das Abdomen zeigt puppalen Charakter, die Flügeldecken entsprechen in ihrer Ausdehnung etwa den puppalen Flügelanlagen, die Antennen sind verkümmert, die Kopfkapsel nicht mehr vom Thorax abgesetzt, die Extremitäten kaum noch beweglich, die Pigmentierung nur noch an den Extremitäten und den Flügelanlagen ausgeprägt.
- Morphe 8: Gegenüber Morphe 7 ist die Pigmentierung weiter zurückgegangen, die Extremitätenausbildung geht kaum über die bei normalen Puppen sichtbaren Anlagen hinaus, die Antennen sind weiter geschrumpft und der Gesamtkörper ist nach dorsal gewölbt.
- Morphe 9: Unterscheidet sich von einer normalen Puppe des 2.–3. Entwicklungstages nur durch eine geringe Pigmentierung an Extremitäten und Flügelanlagen.