

Die Epidermis von *Tenebrio molitor* L. Puppen als Zielorgan für das Juvenilhormonanalogue 10,11-Epoxy-6,7-*trans*-2,3-*trans*-farnesylpropenyläther

The Epidermis of the Pupae of *Tenebrio molitor* L. as Target Organ for the Juvenile Hormone Analogue 10,11-Epoxy-6,7-*trans*-2,3-*trans*-farnesylpropenylether

PETER SCHMIALEK, MARINA BOROWSKI, ASTRID GEYER, VERENA MIOSGA,
MICHAEL NÜNDEL, ECKHARD ROSENBERG und BURGER ZAPF

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, Freie Universität Berlin

(Z. Naturforsch. 28 c, 173–177 [1973]; eingegangen am 17. November 1972/18. Januar 1973)

Herrn Professor Dr. HEINZ DANNENBERG zum 60. Geburtstag gewidmet

Epidermis, *Tenebrio molitor* L., target organ function, juvenile hormone receptor

In vivo tests give evidence that the epidermis is the target organ for the juvenile hormone of insects. A study of the distribution of injected 10,11-epoxy-6,7-*trans*-2,3-*trans*-farnesylpropenylether and of its metabolic products in epidermis, lymphae, and other organs demonstrated that the unaltered ether accumulates in the epidermis against a concentration gradient and is more slowly metabolised there than in the non-target organs.

Die Corpora allata der Insekten, die das Juvenilhormon (im folgenden mit JH abgekürzt) bilden, beeinflussen, wie Schnürungs-, Exstirpations- und Transplantationsexperimente zeigen, die Morphogenese der Tiere, insbesondere im Bereich der Cutis der Larven und der akzessorischen Drüsen und Ovarien der Imagines^{1–3}. Vergleichbares bewirken neben Insektenextrakten⁴ Substanzen, die nun auch in reiner Form aus Insekten isoliert und synthetisiert wurden^{5–8} und Strukturanalogue dieser Verbindungen^{9–13}. Bei den Puppen von *Tenebrio molitor* L. führt die Applikation ausreichender Dosen der JH-wirksamen Verbindung zum Persistieren der Puppenform¹⁰. Mit niedrigeren Dosen wird erreicht, daß die Cutis des später aus der Puppe schlüpfenden Käfers am Ort der ursprünglichen Substanzwirkung Aussehen und Färbung der Puppencutis aufweist⁵.

Unsere Versuche sollten klären, ob die Puppenepidermis für das Hormon oder seine Derivate auch biochemisch ein Zielorganverhalten zeigt. Das würde bedeuten, daß hormonal wirksame Substanz in ihr im Gegensatz zu den Nichtzielorganen auch gegen einen Konzentrationsgradienten angereichert und langsamer abgebaut wird, wie es bereits für die Oestro-

gene des Säugerorganismus in der klassischen Publikation der Arbeitsgruppe JENSEN nachgewiesen wurde¹⁴. Weiterhin sollte die Ursache für eine mögliche Anreicherung untersucht werden.

Material und Methoden

Die JH-wirksame Verbindung

Als Analogon der JH wurde (2,3-³H-Propenyl)-10,11-Epoxy-6,7-*trans*-2,3-*trans*-farnesylpropenyläther (im Folgenden mit H abgekürzt) eingesetzt. Die JH-Aktivität dieser Substanz ist bereits bekannt¹⁵.

Die Verbindung war mit Tritium markiert. Ihre spezifische Aktivität betrug 28 Ci/mMol.

Über Synthese, Reinigung, Analytik und Markierung der Verbindung wird an anderer Stelle berichtet.

Haltung der Versuchstiere

Die Puppen von *Tenebrio molitor* L. wurden aus Massenzuchten der Larven, die bei 22 °C und etwa 70% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten wurden, alle 8 Stdn. abgesucht und nach dem Geschlecht differenziert.

Präparation der Gewebe

Die Isolierung der drei Körperanteile Epidermis, Lymphe und restliche Organe erfolgte präparativ zwischen 0 und + 4 °C. Die Lymphe wurde, wenn nötig, in Kapillaren abgenommen und von suspendierten Zellen durch Zentrifugation bei 2500 x g über 5 min bei 4 °C befreit. Die weitere Aufarbeitung bis

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. P. SCHMIALEK, D-1000 Berlin 33, Arnimallee 22.

Abkürzungen: H, 10,11-Epoxy-6,7-*trans*-2,3-*trans*-farnesylpropenyläther; A, Abbauprodukte von H; JH, Juvenilhormon.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

zur Erstellung der Meßlösungen erfolgte ebenfalls zwischen 0 und + 4 °C.

Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität der Proben wurden in einem Flüssigscintillationszähler (Packard, Modell Tricarb 3380) in einem Scintillationsgemisch (4 g 2.5-Diphenyloxazol, 50 mg 1.4-Bis[2-[α 5-phenyl]-oxazoly]-benzol, 120 g Naphthalin gelöst in 1 l Dioxan) bestimmt. Die erhaltenen Impulse wurden mit Hilfe einer Kombination eines externen und eines internen Standards in Ci umgerechnet.

Proteinbestimmung

Protein wurde mit eiskalter 10-proz. Trichloressigsäure gefällt. Nach dreimaligem Auswaschen des Niederschlages wurde das Protein nach FOLIN bestimmt¹⁶. Rinderserumalbumin (Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst, Behringwerke Marburg/L.) diente als Standard.

Applikation von Substanz H

Eine adäquate Menge des in Toluol aufbewahrten Äthers wurde unter Eiskühlung in einer Stickstoffatmosphäre eingengt, in wenig Aceton aufgenommen und in soviel Insektenringer (5,55 g NaCl, 0,44 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,22 g KCl auf 1 l H_2O) eingetragen, daß 1 μl X nMole Substanz H enthielt [X wurde in den einzelnen Versuchen je nach Fragestellung variiert] und das Aceton mit Stickstoff bei Eiskühlung abgeblasen. Die Lösung wurde kurz vor jedem Versuch neu angesetzt. Sie enthielt, bei + 4 °C aufbewahrt, nach 3 Tagen noch 95% des unzersetzten H.

1 μl dieser Lösung wurde mit einer Mikroinjektionsspritze (Terumo, Modell MS 01, Nadel N 50 R 12) durch das Lumen einer vorher durch die Cutis geführten Glaskapillare zwischen dem letzten und vorletzten Segment auf der Abdominalseite des Tieres in die Leibeshöhle injiziert. Nach dem Herausziehen der Injektionskanüle entfernten wir die Glaskapillare. Der Injektionsbereich wurde vor der Aufarbeitung des Tieres amputiert.

Wiedergewinnung, Identifizierung und Messung von H und seiner Abbauprodukte aus verschiedenen Körperteilen der Versuchstiere

Die oben beschriebenen Gewebefractionen jedes einzelnen Tieres wurden separat in 1,0 ml Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7, 4) homogenisiert, mit 0,5 ml Methanol gemischt und gegen 1,5 ml Petroläther Sdp. 50-70 °C verteilt. Das Methanol setzt das H aus der Proteinbindung frei, so daß es in die Oberphase gelangt. Die Phasentrennung wurde durch kurzzeitige Zentrifugation bei 800 x g beschleunigt und vervollständigt. Die Trocknung der Unterphase mit Paraffinschnitzeln, die nicht mehr als 1% der Radioaktivität der Gesamphase absorbierten und der Oberphase mit wasserfreiem Na_2SO_4 verbesserten die Ergebnisse der

Aufarbeitung nicht. Die Bande des markierten Äthers wurde nach Dünnschichtchromatographie der Oberphase im System Petroläther Sdp. 50-70 °C/Essigsäure-äthylester = 80 ml/20 ml an Kieselgel (DC-Fertigplatten-Kieselgel F-254 Schichtdicke 0,25 mm, E. Merck, Darmstadt) mit Dioxan eluiert. H hat bei diesen Bedingungen einen R_F von 0,55. Oberhalb dieser Bande fand sich keine Radioaktivität. Der Anteil der nach Chromatographie und Verteilung wiedergewonnenen Radioaktivität betrug 98%. Die Radioaktivität des Eluats unterhalb der Bande des markierten Äthers und die gesamte Unterphase der Verteilung wurden zusammengefaßt als Abbauprodukte bezeichnet (im Folgenden mit A abgekürzt).

Ergebnisse

Die nachstehenden Abb. 1-4 und die Tabn. I-III fassen die erhaltenen Resultate zusammen.

Diskussion

Bereits aus dem Verlauf des Abbaus der injizierten Substanz H im Ganztier läßt sich ersehen, daß es für sie in den Puppen ein Receptorsystem geben muß, das ihren Abbau bei einer Konzentration von etwa 1 nM deutlich verlangsamt (Abb. 1). In den ersten 4 Std. nach Applikation wird H rasch in seine Abbauprodukte umgewandelt. Danach bildet sich die Plateaukonzentration aus, die über 24 Std., unter Berücksichtigung der Streuung der angewandten Nachweismethoden konstant bleibt.

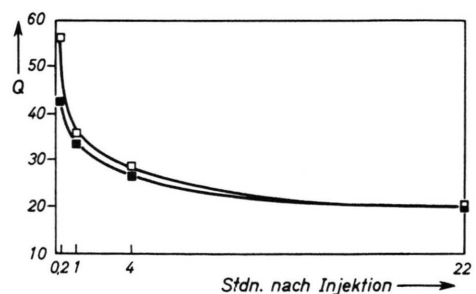


Abb. 1. Abbau von H in Puppen von *Tenebrio molitor* L. in Abhängigkeit von der Zeit und der injizierten Menge an H. 8-16 Stunden alte weibliche Puppen von *Tenebrio molitor* L. H-Konzentration im Tier zum Zeitpunkt der Injektion: —□—□— = 10 nM; —■—■— = 1 nM.

Die Meßwerte geben das Mittel aus Doppelbestimmungen, die an 2-3 verschiedenen Tagen erhalten wurden, wieder. Weitere Einzelheiten siehe Material und Methoden. Ordinate: Anteil von H an der Summe von H und A in % [abgekürzt Q].

Wir müssen analog zu den bei den Oestrogenen erhobenen Befunden¹⁴ annehmen, daß H von einem Receptor gebunden wird, dessen Funktion die Bindung der natürlichen JH von *Tenebrio molitor* ist. Die Struktur dieser Verbindungen aus *Tenebrio molitor* ist nur zum Teil bekannt. Bei diesen Insekten ist nur die Bildung von Farnesol⁵, Farnesal⁵ und Farnesensäure¹⁷ sicher nachgewiesen. 10.11-Epoxyde mit dem Farnesolgerüst besitzen bei *Tenebrio molitor* eine höhere biologische Aktivität als die oben genannten Substanzen⁶. Die Vielfältigkeit und Artspezifität der JH von Insekten¹⁰ kann nach den neuesten Ergebnissen an *Schistocerca gregaria* und *Locusta migratoria migratoides*¹⁸ kaum noch bezweifelt werden.

Da also die endogene Hormonmenge wegen der Unkenntnis weiterer JH von *Tenebrio* nicht bestimmt werden kann, gibt die Plateaukonzentration von etwa 1 nM für H nicht die Konzentration aller receptorgebundenen in der Puppe vorhandenen JH-wirksamen Verbindungen an. Es ist jedoch anzunehmen¹⁹, daß diese Menge auch während des Puppenstadiums von *Tenebrio* sehr viel geringer sein sollte, als bei Larven oder Imagines von *Tenebrio*.

Tab. I zeigt keine Altersabhängigkeit der Größe der Receptorkapazität. Hieraus kann aber nicht gefolgert werden, daß diese natürlicherweise während des ganzen Puppenstadiums konstant bleibt, da die Menge an Receptor durch Neubildung unter dem Einfluß von H gesteuert werden könnte, wie wir es von den Oestrogenreceptoren kennen²⁰.

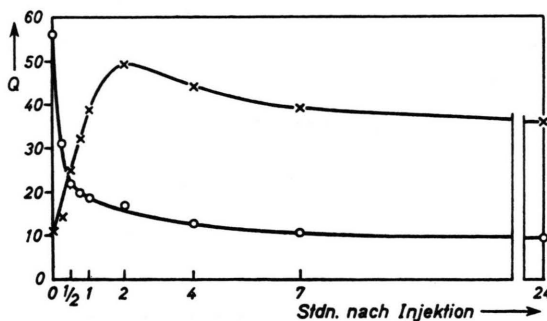


Abb. 2. Verteilung von H und A in Epidermis und Lymphe bzw. restlichen Organen von *Tenebrio molitor* Puppen über die Zeit. 8-16 Stunden alte weibliche Puppen von *Tenebrio molitor* L. H-Konzentration im Tier zur Zeit der Injektion 10 nM. Epidermis (symbolisiert durch —x—x—) und Lymphe bzw. Organe (symbolisiert durch —o—o—) wurden getrennt aufgearbeitet. Die Meßwerte geben das Mittel aus Doppelbestimmungen, die an 2-4 verschiedenen Tagen erhalten wurden, wieder. Weitere Einzelheiten siehe „Material und Methoden“. Ordinate und Abszisse wurden wie bei Abb. 1 bezeichnet.

Die Lokalisation dieses Receptorsystems ist aus dem Verlauf der H-Konzentration über die Zeit in den drei Körperbereichen Epidermis, Lymphe bzw. restliche Organe zu ersehen. Nicht abgebautes H reichert sich im Unterschied zu der Lymphe und den übrigen Organen in der Epidermis an (Abb. 2). Der Anteil von nicht abgebautem H an der Gesamtaktivität verhält sich über die Zeit bei Lymphe und restlichen Organen gleich (Tab. III). Auch hier erreicht die H-Konzentration ein Plateau, das jedoch niedriger als in der Epidermis liegt.

Wir fanden einen rascheren Anstieg des H-Anteils in der Epidermis von weiblichen im Vergleich zu den männlichen Puppen (Tab. II). Auch eine mehrmalige Wiederholung dieser Versuche an verschiedenen Tagen brachte die gleichen Resultate. Eine durch weitere Untersuchungen fundierte Interpretation dieser Ergebnisse bleibt offen.

Tab. I. Zeitliche Verteilung von H und A in Epidermis bzw. Lymphe oder restlichen Organen bei weiblichen Puppen von *Tenebrio molitor* L. in Abhängigkeit vom Puppenalter.

Körper- anteil	Std.n. nach Injek- tion	H/(H + A) · 100 Puppenalter		
		8 Std.	4 Tage	9 Tage
Epidermis	0,5	25,4	27,6	24,5
	7	33,8	39,1	37,3
Lymphe bzw. restliche Organe	0,5	22,6	21,4	24,0
	7	7,8	8,6	7,4

Tab. II. Zeitliche Verteilung von N und A in Epidermis bzw. Lymphe oder restlichen Organen bei 2 Tage alten Puppen von *Tenebrio molitor* L. in Abhängigkeit vom Geschlecht der Tiere.

Körper- anteil	Std.n. nach Injektion	H/(H + A) · 100 Geschlecht	
		männlich	weiblich
Epidermis	0,5	17,5	34,3
	2	42,9	49,7
Lymphe bzw. restliche Organe	0,5	24,5	21,8
	2	14,8	13,7

Tab. III. Zeitliche Verteilung von H und A in Lymphe und restlichen Organen von 2 Tage alten weiblichen Puppen von *Tenebrio molitor* L.

Std.n. nach Injektion	H/(H + A) · 100 Körperanteil	
	Lymphe	restliche Organe
0,5	21,7	22,7
2	10,9	13,7

Für die Plateaubildung sind H-Proteinkomplexe verantwortlich. Sie lassen sich durch Gelchromatographie an Sephadex oder Elektrophorese von H und A abtrennen. Aus angereicherten Präparationen dieser Komplexe ist unverändertes H nach tryptischem Abbau, Hitze- und Methanolinaktivierung wiederzugewinnen. Die Freisetzung des H durch Methanol aus dem isolierten Komplex zeigt, daß fast das gesamte freie H, das in den vorstehend beschriebenen Versuchen erhalten wurde, in diesem Komplex vorliegt. Über Isolierung, Funktion und die physikalisch-chemischen Daten der Receptorproteine von *Tenebrio* wird eingehender an anderer Stelle berichtet.

Die Analyse der erhaltenen Meßwerte bzw. deren graphische Darstellung zeigt im Einzelnen Folgendes:

Die Kurve, die den Anteil von H an der Gesamtaktivität über die Zeit wiedergibt, zerfällt in zwei Abschnitte (Abb. 2). In der Zeit von der Applikation der Substanz bis etwa zur ersten Stunde danach wird sie im Bereich der Epidermis durch einander entgegengerichtete Effekte von Abbau und Transport bestimmt. Hier überwiegt die Wirkung des Transports die des Abbaus.

In den übrigen Organen bzw. der Lymphe wirken beide Effekte gleichsinnig in Richtung auf eine numerische Verkleinerung des Quotienten H/Gesamtaktivität. Die Konzentration des nicht abgebauten H nimmt durch den Transport ab. Der Anteil des abgebauten H nimmt zu.

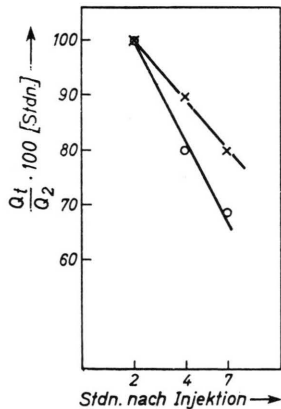


Abb. 3. Abbau von H in der Epidermis bzw. Lymphe oder restlichen Organen von *Tenebrio molitor* L. Puppen über die Zeit. Die Kurve ergab sich aus den Meßwerten der Abb. 2.

$$\text{Ordinate: } \frac{Q_t}{Q_{2\text{Stdn.}}} \cdot 100$$

Bedeutung der Meßpunkte siehe Abb. 2. Abszisse: Stunden nach Injektion, logarithmischer Auftrag.

In der zweiten Zeitphase ist kein Transport mehr zu beobachten. Hier gibt die Kurve den reinen Abbau wieder. Das wird in Abb. 3 graphisch dargestellt, indem der Anteil von H zum Zeitpunkt 2 Std. nach Injektion gleich 100% gesetzt und die Zeitachse logarithmisch verkürzt wird. Es ergeben sich dadurch zwei abfallende Graden, die zeigen, daß der Abbau von H in der Epidermis langsamer erfolgt als in der Lymphe bzw. den restlichen Organen.

Aus der Kurve in Abb. 4 ist weiterhin zu ersehen, wie die Hormonverteilung in Lymphe und Epidermis über die Zeit verläuft. Als Ordinate ist hier der Quotient aus dem prozentualen Anteil von H des jeweiligen Körperbereichs und der Summe der H-Anteile beider Körperbereiche dargestellt. Die Graphik zeigt, daß H von der Lymphe in die Epidermis transportiert wird und dort nach etwa 2 Std. ein Sättigungswert erreicht wird.

Die bevorzugte Anreicherung in der Epidermis hätte auch dadurch zustande kommen können, daß beim Einstich der Injektionskanüle von der Außenseite der Nadel lipophile Substanz sich als Film über die Körperoberfläche ausbreitet²¹ und von dort aus natürlich zuerst in die Epidermis gelangt. Diesem Einwand wurde experimentell dadurch begegnet, daß, wie unter „Material und Methoden“ beschrieben, die Injektionsnadel durch das Lumen einer zuvor in die Körperhöhle eingestochenen Glaskapillare geführt und noch vor dem Herausziehen der Kapillare aus ihr entfernt wurde.

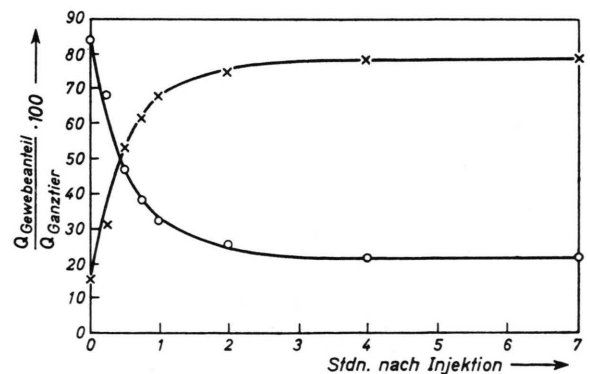


Abb. 4. Transport von H aus der Lymphe zu der Epidermis von *Tenebrio molitor* L. Puppen über die Zeit. Die Kurve ergab sich aus den Meßwerten der Abb. 2. Ordinate: ($Q_{\text{Gewebeanteil}} / Q_{\text{Ganztier}}$) 100.

Bedeutung der Meßpunkte siehe Abb. 2. Abszisse: Stunden nach Injektion.

Für die kritische Diskussion der Auswertung der Meßwerte danken wir Herrn Professor Dr. HIRSCHWALD. Für finanzielle Hilfe danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem interministeriellen Ausschuß für „Umweltchemikalien und Biocide“, Bonn-Bad Godesberg, Deutscher Herrenstraße und der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz.

- ¹ V. B. WIGGLESWORTH, Quart. J. microscop. Sci. **77**, 191 [1934].
- ² V. B. WIGGLESWORTH, Quart. J. microscop. Sci. **79**, 91 [1936].
- ³ V. B. WIGGLESWORTH, The Hormonal Regulation of Growth and Reproduction in Insects in: Advances in Insect Physiology, vol. 2, 248. Eds. J. W. L. BEAMENT, J. E. TREHERNE u. V. B. WIGGLESWORTH, Acad. Press New York, London 1964.
- ⁴ V. B. WIGGLESWORTH, J. Ins. Physiol. **2**, 73 [1958].
- ⁵ P. SCHMIALEK, Addendum V. B. WIGGLESWORTH, Z. Naturforsch. **16b**, 461 [1961].
- ⁶ W. S. BOWERS, M. J. THOMPSON u. E. C. UEBEL, Life Sci. **4**, 2323 [1965].
- ⁷ H. RÖLLER, K. H. DAHM, C. C. SWEETLEY u. B. M. TROST, Angew. Chem. **79**, 190 [1967].
- ⁸ A. S. MEYER, H. A. SCHNEIDERMAN, E. HANZMANN u. J. H. KO, Proc. nat. Acad. Sci. USA **60**, 853 [1968].
- ⁹ P. SCHMIALEK, Deutsches Bundespatent 1140394, 2. 2. 1961.
- ¹⁰ P. SCHMIALEK, Ist das Juvenilhormon der Insekten artunspezifisch? in: Insektenhormone — speziell das Juvenilhormon, S. 33. Colloquium 19. 12. 1967, Berlin. Ed. H. ASMIS. Saladruck Berlin 1971.
- ¹¹ V. B. WIGGLESWORTH, Juvenile Hormone Assays, in: l. c. 10, S. 43.
- ¹² K. SLAMA, Specificity of Juvenile Hormone Analogues in: l. c. 10, S. 55.
- ¹³ W. VOGEL u. E. HORNBERGER, Laboratoriumsversuche mit Juvenilhormon und seinen Derivaten gegen ausgewählte Schädlinge, in: l. c. 10, S. 63.
- ¹⁴ E. V. JENSEN, H. I. JACOBSON, J. W. FLESHER, N. N. SAHA, G. N. GUPTA, S. SMITH, V. COLUCCI, D. SHIPLACOFF, H. G. NEUMANN, E. R. DESOMBRE u. P. JUNGBLUT, Estrogen Receptors in Target Tissues, in: Steroid Dynamics, S. 133, Eds. G. PINCUS, T. HAKAO u. J. W. TAIT, Acad. Press New York 1966.
- ¹⁵ M. S. CHODNEKAR, M. SUCHY, A. PFIFFNER, N. RIGASSI u. U. SCHWIETER, Dtsch. Bundes-Pat. 2102856 vom 27. 1. 1971.
- ¹⁶ F. WOKES u. B. M. STILL, Biochem. J. **36**, 797 [1942].
- ¹⁷ H. EMMERICH, G. DREWS, K. TRAUTMANN u. P. SCHMIALEK, Z. Naturforsch. **20b**, 211 [1965].
- ¹⁸ R. A. JOHNSON, J. Endocrinology **53**, [1972].
- ¹⁹ S. FUKUDA, J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, Sect. IV **6**, 477 [1944].
- ²⁰ J. L. Mc GUIRE u. R. D. LISK, Proc. nat. Acad. Sci. USA **61**, 497 [1968].
- ²¹ C. T. LEWIS, Nature [London] **193**, 904 [1962].