

Untersuchungen über die Struktur und biochemische Wirkung von Ecdysteron

H. HOFFMEISTER, H. F. GRÜTZMACHER UND K. DÜNNEBEIL *

I. Med. Universitätsklinik, Hamburg, und Chemisches Staatsinstitut, Hamburg

(Z. Naturforschg. 22 b, 66–70 [1967]; eingegangen am 3. August 1966)

Ecdysteron ist ein neues Steroidhormon der Insekten. Die chemische Struktur ist aus dem spektroskopischen und chemischen Verhalten der Substanz abzuleiten: Ecdysteron ist danach ein $2\beta,3\beta,14\alpha,20\alpha_F,22\beta_F,25$ -Hexahydroxy- 5β -cholesten-(7)-on-(6). Die biochemische Wirkung von Ecdysteron ist der des Ecdysons sehr ähnlich.

Entwicklung und Metamorphose der Insekten unterliegen hormoneller Steuerung. Die Steuerung geschieht durch eine Hierarchie innersekretorisch tätiger Organe; die Hormone dieser Organe sind bisher nur z. T. bekannt¹:

Im Gehirn der Insekten finden sich neurosekretorische Zellen. Neuere Ergebnisse von GERSCH und Mitarbb.² zeigen, daß es sich bei den Neurosekreten um Proteine oder Peptide handelt. Damit liegt morphologisch und stofflich der Vergleich der neurosekretorischen Zellen mit der Hypophyse bei Vertebraten nahe. Die Neurosekrete beeinflussen sowohl die Hormonproduktion der Prothorakaldrüse als auch der Corpora allata.

Die Hormone der Corpora allata und der Prothoraxdrüse bestimmen die Art der Häutungen in der Insektenentwicklung. Dabei bedingt die gleichzeitige Ausschüttung der Hormone beider Drüsen eine Häutung zur nächstgrößeren Larve. Werden dagegen allein die Hormone der Prothoraxdrüse sezerniert, führt die Häutung zur Puppe.

Trotz vieler Anstrengungen ist über die chemische Natur des oder der Hormone der Corpora allata wenig bekannt¹. Aus natürlichem Material konnte die Aktivität nur angereichert werden³. Ein aus Farnesylsäure mit Salzsäure erhaltenes Umbauprodukt hat nach neueren Untersuchungen von WILLIAMS starke Juvenilhormon-Aktivität⁴.

Als erstes Hormon der Prothoraxdrüse wurde das Ecdyson rein dargestellt⁵. In jüngster Zeit wurde die Struktur dieses Steroidhormons aufgeklärt^{6,7}. Ecdyson ist ein $2\beta,3\beta,14\alpha,22\beta_F,25$ -Pentahydroxy- 5β -cholesten-(7)-on-(6). Kürzlich gelang die Synthese der Substanz^{8,9}. Das synthetische Hormon stimmt in den physikalischen Daten mit dem natürlichen Stoff überein, im Calliphoratest war das Syntheseprodukt halb so wirksam ($0,02 \mu\text{g} = 1$ Calliphoraeinheit)^{**}.

Ecdysteron ist ein weiteres Häutungshormon, das von uns jetzt aus Seidenspinnerpuppen gewonnen wurde^{10,11}.

Eigenschaften

Ecdysteron ist im Calliphoratest wirksamer als Ecdyson¹¹. Da wir Ecdyson im Kot von Insekten nachweisen konnten, Ecdysteron aber nicht¹², könnte es sich beim Ecdyson um ein desaktiviertes Ausscheidungsprodukt des Ecdysterons handeln. Vielleicht produziert die Prothoraxdrüse aber auch mehrere Hormone nebeneinander.

Chemisch verhält sich Ecdysteron sehr ähnlich wie Ecdyson. Das Hormon löst sich leicht in Wasser und kann aus wäßrigem Tetrahydrofuran oder aus Methanol/Essigester in farblosen Prismen erhalten werden; Schmp. 234° . Im Gegensatz zu Ecdyson kristallisiert Ecdysteron ohne Kristallwasser aus

* Teil der Dissertation von K. DÜNNEBEIL.

¹ M. GERSCH, Vergleichende Endokrinologie der wirbellosen Tiere, Acad. Verlagsgesellschaft, Leipzig 1964.

² M. GERSCH, F. FISCHER, H. UNGER u. H. KOCH, Z. Naturforschg. 15 b, 319 [1960].

³ A. S. MEYER u. H. A. AX, Analyt. Biochem. [New York] 11, 290 [1965].

⁴ I. H. LAW, C. YUAN, C. M. WILLIAMS, Proc. nat. Acad. Sci. 55, 576 [1966].

⁵ A. BUTENANDT u. P. KARLSON, Z. Naturforschg. 9 b, 389 [1954].

⁶ P. KARLSON, H. HOFFMEISTER, H. HUMMEL, P. HOCKS u. G. SPITELLER, Chem. Ber. 98, 2394 [1965].

⁷ R. HUBER u. W. HOPPE, Chem. Ber. 98, 2403 [1965].

⁸ I. B. SIDDALL, J. P. MARSHALL, A. BOWERS, A. D. CROSS, J. A. EDWARDS u. J. H. FRIED, J. Amer. chem. Soc. 88, 380 [1966].

⁹ I. B. SIDDALL, A. D. CROSS, J. H. FRIED, J. Amer. chem. Soc. 88, 862 [1966].

¹⁰ H. HOFFMEISTER, Angew. Chem. 78, 269 [1966].

¹¹ H. HOFFMEISTER, Z. Naturforschg. 21 b, 335 [1966].

** Wir danken Dr. J. F. FRIED, Fa. Syntex, Palo Alto/Calif., für die Zusendung einer Menge des synthetischen Hormons.

¹² H. HOFFMEISTER, C. RUFER u. H. AMMON, Z. Naturforschg. 20 b, 130 [1965].

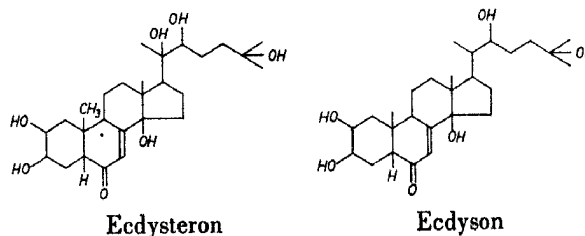
wäßrigen Lösungen. Die Substanz verliert bei Säure- oder Basenbehandlung sofort die biologische Aktivität; ein Teil der Aktivität geht auch bei der Chromatographie an Al_2O_3 und Kieselgel verloren. Mit Vanillin/Schwefelsäurereagenz gibt Ecdysteron eine typische Farbreaktion: Beim Besprühen erscheint ein rosa Fleck; die Farbe ändert sich beim Erhitzen in türkis. Über eine Sephadex-G-10-Säule läßt sich das Hormon mit Wasser als Lösungsmittel gut von Verunreinigungen abtrennen. Die Substanz erscheint als scharfe Zone nach 40 – 50% des Säulen- volumens.

Struktur und spektroskopische Daten

Das Mol.-Gew. von Ecdysteron beträgt 480. In einem neuerdings aufgenommenen Massenspektrum¹³ zeigte das über eine Sephadex-Säule gereinigte und anschließend dialysierte Hormon diesen Molekülionpeak. Ecdysteron hat danach die Summenformel $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$.

Die Struktur des Ecdysterons ergibt sich beim Vergleich der spektroskopischen und chemischen Be-

funde mit denen des Ecdysons. Ecdysteron unterscheidet sich vom Ecdyson durch eine weitere Hydroxylgruppe, die in der Seitenkette an C-20 lokalisiert ist:



Ob die Ringverknüpfung der Ringe A/B und C/D sowie die sterische Anordnung der Hydroxylgruppen mit denen beim Ecdyson übereinstimmen, kann noch nicht gesagt werden. Die Ähnlichkeit der IR-Spektren beider Hormone spricht dafür (Abb. 1).

Andererseits erscheinen die Protonen an C-2, C-3 und C-22 im NMR-Spektrum des Ecdysterons verschoben gegenüber den entsprechenden Ecdysonsignalen (Abb. 2, vgl. dazu l. c.¹⁴).

Neben diesen nicht sehr charakteristischen Verschiebungen sind zwei auffällige Veränderungen zu

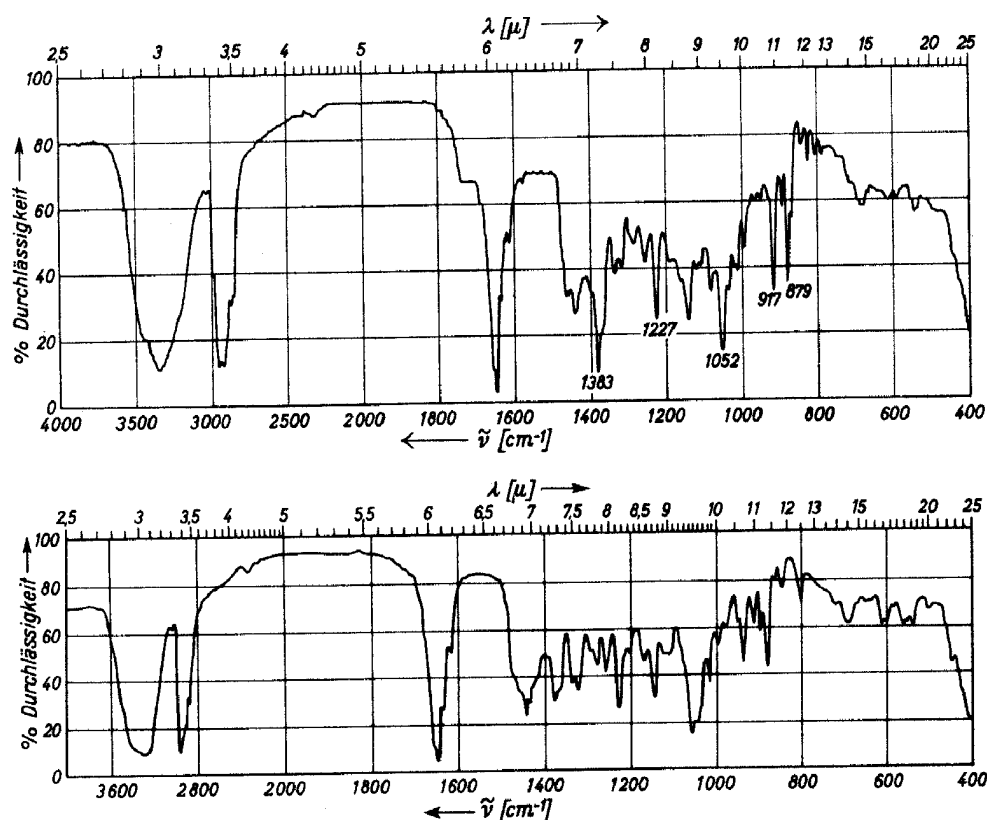
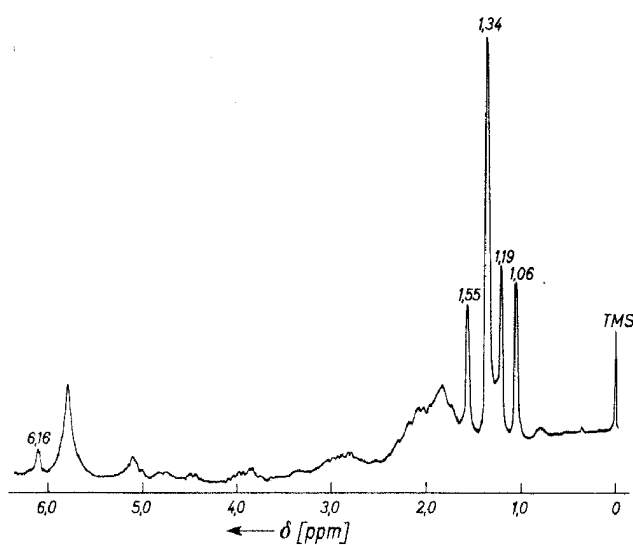


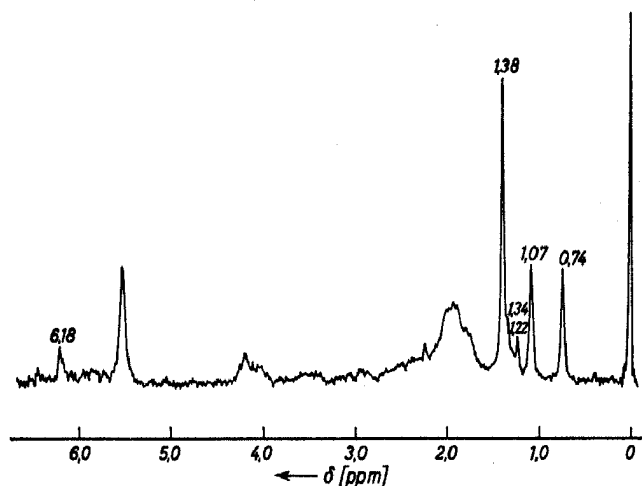
Abb. 1. IR-Spektren des Ecdysterons (A) und Ecdysons (B) in KBr mit IR-Licht getempert.

¹³ H. HOFFMEISTER u. H. F. GRÜTZMACHER, *Tetrahedron Letters* **33**, 4017 [1966].

¹⁴ H. HOFFMEISTER, C. RUFER, H. H. KELLER, H. SCHAIRER u. P. KARLSON, *Chem. Ber.* **98**, 2361 [1965].



(A)



(B)

Abb. 2. NMR-Spektren des Ecdysterons (A) und Ecdysons (B), aufgenommen in Deuteropyridin, in einem Varian-100-Spektrograph.

sehen: Das Dublett der C-21-Methylgruppe des Ecdysons fehlt im Ecdysteronspektrum; dafür erscheint ein scharfes Signal von drei Protonen bei 1,55 ppm. Die Verschiebung des Signals und Umwandlung vom Dublett in ein Singulett ist nur vereinbar mit dem Eintritt einer OH-Gruppe an C-20. Gleiches Verhalten zeigten von uns untersuchte Modells-substanzen¹³. Weiter findet man bei den Vergleichssubstanzen eine Verschiebung des C-18-Methylsignals um 0,4 ppm, wenn an C-Atom 20 eine OH-Gruppe eingeführt wird. Während dies Signal im Ecdysonspektrum mit 0,74 ppm einen von Substituenten unbeeinflussten Wert zeigt, liegt das entsprechende Signal des Ecdysterons auch um etwa 0,4 ppm verschoben bei 1,19 ppm.

Der starke Einfluß der OH-Gruppe an C-20 auf die C-18-Methylgruppe scheint bedingt zu sein durch eine intramolekulare Fixierung der Seitenkette über Wasserstoffbrücken. Nach Zusatz von Deuteriumoxyd zu dem in Deuteropyridin gelösten Hormon verschiebt sich das Signal der C-18-Methylgruppe erheblich; es erscheint bei 0,90 ppm. Auch die Signale der beiden Methylgruppen an C-25 sowie der C-19-Methylgruppe werden geringfügig verschoben (1,38 ppm gegenüber 1,34 sowie 1,00 ppm gegenüber 1,06). Das Signal des Protons an C-7 ist aufgespalten mit einer kleinen Kopplungskonstante von 2,5 Hz und liegt bei 6,16 ppm.

Weitere Beweise für die Stellung der zusätzlichen Hydroxylgruppe im Ecdysteron ergeben sich aus dem Massenspektrum.

Neben dem sehr schwachen Molekülionpeak finden sich die Peaks einer vierfachen Wasserabspaltung (462, 444, 426, 408). Da im Falle des Ecdysons nur drei Wassermoleküle abgespalten werden,

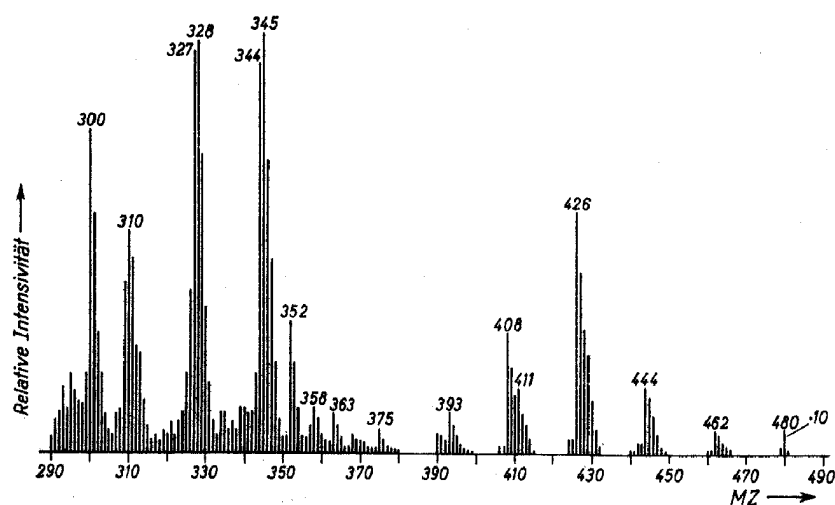
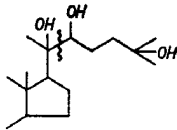


Abb. 3. Massenspektrum des Ecdysterons (Atlas CH-4-Gerät).

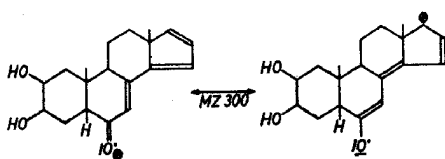
muß die zusätzliche Hydroxylgruppe des Ecdysterons leicht eliminierbar sein. Das geht auch aus der mehr als zehnfach geringeren Intensität des Molekülionpeaks beim Ecdysteron im Vergleich zu Ecdyson hervor. Der Hauptpeak in den Massenspektren beider Hormone hat die Massenzahl 99; daneben findet sich in fast gleicher Höhe die MZ 81. Diese Ionen entstehen in beiden Fällen durch Spaltung der Seitenkette zwischen C-20/C-22 und Abspaltung der OH-Gruppe an C-25.



Die identische Spaltung beider Moleküle beweist, daß Ecdysteron und Ecdyson ab C-20 die gleiche Seitenkette besitzen.

Der hier abgebildete obere Massenbereich des Ecdysteronspektrums zeigt erhebliche Abweichungen vom Ecdysonspektrum. Charakteristisch für das Ecdyson ist der Peak 330, der im Ecdysteronspektrum fehlt. Das Ion MZ 330 entsteht über ein Ion MZ 348 durch Verlust der Seitenkette ab C-22, Wanderung eines H-Atoms und H₂O-Abspaltung. Da die zusätzliche OH-Gruppe in diesem Teil des Ecdysterons enthalten sein muß, würden bei einem analogen Zerfall Peaks mit den MZ 364 und 346 auftreten. Das Ecdysteronspektrum zeigt aber Peaks mit den MZ 363, 345 und 328. Daraus ist zu schließen, daß hier die Spaltung der C-20/C-22-Bindung ohne Wanderung eines H-Atoms abläuft. Dies Verhalten ist erklärlich, wenn die sechste OH-Gruppe des Ecdysterons an C-20 lokalisiert ist; die bei der Spaltung auftretende positive Ladung an C-20 wird durch Mesomerie mit der Hydroxylgruppe stabilisiert.

Die Stellung der sechsten Hydroxylgruppe im Ecdysteron wird weiter gesichert durch den Peak MZ 300, der mit ähnlicher Intensität in den Spektren beider Hormone auftritt. Für dieses Ion kann angenommen werden, daß es durch Verlust der vollständigen Seitenkette an C-17 sowie Abspaltung eines H₂O-Moleküls und eines H-Atoms entstanden ist:



Da beide Hormone bis C-19 und ab C-22 offensichtlich gleich sind, kommt für die Stellung der OH-Gruppe nur C-20 in Frage.

Biochemische Wirkung

Ecdyson löst in Riesenchromosomen der Dipteren die Bildung einer Reihe spezifischer „Puffs“ aus¹⁵. Ecdysteron aktiviert in ähnlichen Konzentrationen, soweit bisher untersucht, die gleichen Puffs wie Ecdyson¹⁶. Schon etwa zwei Stdn. nach Hormoninjektion kann man als zeitlich früheste Wirkung der Hormone das Auftreten von zwei charakteristischen Puffs beobachten¹⁷; die Puffs werden auch gebildet bei einer Hemmung der Proteinbiosynthese¹⁸. Es wird diskutiert, daß die Hormon-spezifischen Puffs verschiedene Messenger-RNS-Moleküle synthetisieren. Einer der Messenger soll die Information zur Synthese von Dopa-Decarboxylase tragen¹⁹. Die Dopadecarboxylase-Aktivität wird durch Ecdysongaben gesteigert. Wir haben Ecdysteron in Kopf-verpuppte Calliphora-Larven injiziert und zu verschiedenen Zeiten nach Injektion den Anstieg der Dopadecarboxylase bestimmt. Die Enzymaktivität wurde an der Umwandlung von radioaktivem Dopa in Dopamin gemessen²⁰. In Tab. 1 sind die Ergebnisse wiedergegeben:

Zeit nach Injektion von Ecdysteron [Stdn.]	gebildetes Dopamin [%]
0	3
0,5	3
1	3
2	8
4	12
6	15
12	21
24	27

Tab. 1. Umwandlung von 2-¹⁴C-Dopa im Dopamin. Jedes Tier erhielt 24 Stdn. nach Kopfverpuppung 20 CE Ecdysteron. Je Versuch wurden 10 Tiere in der Kälte in 0,66-m. Phosphatpuffer mit 0,1% Mercaptoäthanol homogenisiert und 30 min bei 4000 U/min zentrifugiert. 1 ml Überstand wurde mit 0,66-m. Phosphatpuffer und 1 mg Dopa, spez. Aktivität 0,1 mC/mMol, 3 Stdn. inkubiert. Das Inkubationsgemisch wurde mit Methanol abgestoppt, zentrifugiert; der Überstand wurde nach Vacuumtrocknung auf Kieselgel-Dünnschichtplatten im System Butanol 5/Propionsäure 1/Wasser 2 chromatographiert und die Radioaktivität mit einem Berthold-Dünnschichtchromatographie-Scanner gemessen.

¹⁵ U. CLEVER, *Chromosoma* **12**, 607 [1961].

¹⁶ U. CLEVER, private Mitteilung.

¹⁷ U. CLEVER, Symposium on Fundamental Cancer Research 1965, The University of Texas.

¹⁸ U. CLEVER, *Brookhaven Symposia in Biology* **18**, 242 [1965].

¹⁹ P. KARLSON, *Umschau* **1963**, 595.

²⁰ P. KARLSON u. C. E. SEKERIS, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **63**, 489 [1962].

Alle Kopf-verpuppten Tiere enthielten schon eine geringe Menge Dopa-Decarboxylase. Der Aktivitätsanstieg ist ab 4 Stdn. nach Injektion zu erkennen. 24 Stdn. nach Ecdysterongabe werden unter unse-

ren Versuchsbedingungen 27% des vorhandenen Dopa in Dopamin umgewandelt.

Fräulein K. SANDER danken wir für ihre Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

Tierexperimentelle Untersuchungen mit α -Methyl-Dopa- ^{14}C unter besonderer Berücksichtigung der optischen Isomeren

II. Mitt.: Verteilung in den Organen

B. DUHM, W. MAUL, H. MEDENWALD, K. PATZSCHKE und L. A. WEGNER

Isotopenlaboratorium der Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld

und

K. SCHLOSSMANN

Institut für Pharmakologie der Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld

(Z. Naturforsch. 22 b, 70—84 [1967]; eingegangen am 23. Juli 1966)

Es wurde die Verteilung der Aktivität in der Ratte nach oraler und intravenöser Applikation (50 mg/kg) von DL- α -Methyl-Dopa sowie seiner optischen Isomeren untersucht. Nach intravenöser Applikation werden sowohl die D-Form als auch die L-Form schnell ($T_{1/2} < 1$ h) und mit unterschiedlicher Geschwindigkeit eliminiert. Nach oraler Applikation des Racemats steigt daher der Aktivitätsgehalt im Tier ohne Magen-Darmtrakt 1 bis 2 h post appl. — trotz einer insgesamt resorbierten Menge von rund 25% — nur auf etwa 10% der applizierten Aktivität an. Etwa ab 10 h post appl. läuft die Elimination des Racemats wesentlich langsamer und für die einzelnen Organe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab; 2 d post appl. ist der Aktivitätsgehalt im Tier ohne Magen-Darmtrakt, der überwiegend auf Metaboliten des L- α -Methyl-Dopa zurückzuführen sein dürfte, für beide Applikationsarten unter 1% abgesunken.

Nach intravenöser Applikation von L- α -Methyl-Dopa befinden sich in den meisten Organen höhere Aktivitätskonzentrationen als nach Gabe der D-Form, besonders ausgeprägt im Gehirn, Nebennierenmark und Muskel sowie in der Niere; 24 h nach Applikation der L-Form enthält das Nebennierenmark wesentlich höhere Aktivitätskonzentrationen als alle anderen gemessenen Organe.

Ergänzend zu den radioaktiven Messungen wurde gleichzeitig in einigen Versuchen für bestimmte Organe der Gehalt an unveränderter Substanz mit Hilfe eines fluorometrischen Verfahrens bestimmt, und zwar nach intravenöser Applikation von 5 und 50 mg/kg der optischen Isomeren. Entsprechend der insgesamt geringen Metabolisierung enthalten z. B. das Serum und die Niere bis zu etwa 2 h post appl. überwiegend unverändertes α -Methyl-Dopa. Andererseits bestehen jedoch Hinweise, daß die in anderen Organen z. B. im Gehirn, im Muskel und in der Leber vorhandene Aktivität nach Gabe der L-Form möglicherweise bereits zu dieser Zeit in erheblichem Maße auf Metaboliten zurückzuführen ist. Die im Plasma im Bereich 2 bis 180 min nach Applikation beobachteten Substanzkonzentrationen lassen sich durch ein Modell mit zwei Verteilungsräumen beschreiben und ergeben auf diesem Wege Hinweise, daß die renale Clearance für L-AMD und D-AMD gleich ist und in der Größenordnung der Inulin-Clearance liegt.

Die ganztier-autoradiographischen Untersuchungen nach Applikation des Racemats sowie der optischen Isomeren geben die Verteilung der Substanz bzw. ihrer Metaboliten im Tierkörper in situ wieder und lassen differenzierte Aktivitätsverteilungen in einzelnen Organen sichtbar werden. Diese zeigen sich besonders ausgeprägt im Gehirn, in der Nebenniere, der Haut und der Niere.

In der ersten Mitteilung berichteten wir über Untersuchungen mit radioaktiv markiertem α -Methyl-Dopa^{*1}, und zwar über Synthese, Resorption, Ausscheidung und Metabolismus. Im folgenden wird die Verteilung der Substanz bzw. ihrer Metaboliten

in den Organen beschrieben. Hierzu verwendeten wir die Ergebnisse der radioaktiven Meßtechnik, der Ganztier-Autoradiographie und einer fluorometrischen Bestimmung des Gehaltes an unveränderter Substanz in den Organen der Ratte.

* α -Methyl-Dopa = AMD. L- α -Methyl-Dopa = L-AMD = L(-)-3-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-2-methylalanin = Presinol (eingetragenes Warenzeichen der Farbenfabriken

Bayer AG). D- α -Methyl-Dopa = D-AMD, DL- α -Methyl-Dopa = DL-AMD.

¹ B. DUHM, W. MAUL, H. MEDENWALD, K. PATZSCHKE u. L. A. WEGNER, Z. Naturforsch. 20 b, 434 [1965].