

Zur Biochemie von Imidacloprid

The biochemistry of imidacloprid

J. Abbink

1. Einführung

In der Praxis wird von der überwiegenden Zahl der Anwender von Insektiziden ein rascher Wirkungseintritt erwartet. Sieht man von einigen wenigen Strukturklassen insektizider Entwicklungsinhibitoren ab, so wirken die weit aus meisten Insektizide rasch durch Angriff am Insekten-Nervensystem.

Die Zellen des Nervensystems (Neurone) bestehen aus einem Zellkörper (Perikaryon) mit Axon (Neurit) und Dendriten. Die Axone und Dendriten verzweigen sich und bilden zum einen zwecks intensiver Informationsübertragung viele Kontaktstellen zu anderen Neuronen, zum anderen bilden vor allem Axone in der Peripherie häufig Kontaktstellen zu Muskelfasern. Diese Übertragungsstellen zwischen den Einzelstrukturen verschiedener Neuronen einerseits und zwischen Axonen und Muskelfasern andererseits werden Synapsen genannt. Im allgemeinen handelt es sich um sogenannte „chemische“ Synapsen, deren Funktionsprinzip darin besteht, daß die Informationsübertragung von einem Neuron auf ein anderes Neuron oder eine Muskelfaser mit Hilfe einer chemischen Substanz, Transmitter genannt, erfolgt. Dieser Transmitter ist innerhalb des präsynaptischen Endes eines Neurons in sog. „Pools“ gespeichert (Abb. 1).

Beim Eintreffen eines Aktionspotentials am präsynaptischen Ende wird der Transmitter aus diesen Pools freigesetzt und bewirkt an der postsynaptischen Membran bzw. durch Bindung an die dort befindlichen Rezeptoren letztlich eine spezifische Veränderung der Leitfähigkeit der postsynaptischen Membran für bestimmte Ionen, erzeugt also eine postsynaptische Potentialänderung. Allen prä- und postsynaptischen Effekten liegen nämlich Permeabilitätsänderungen der neuralen Membran zugrunde.

Die semipermeable Membran einer ruhenden Zelle ist infolge einer spezifischen Ionenverteilung zwischen Intra- und Extrazellulärraum polarisiert. Das entsprechende Ruhepotential beträgt je nach Zelltyp bis zu -60 mV. Die für die Polarisation verantwortlichen Ionen sind im wesentlichen Na^+ , K^+ , Cl^- und unter Umständen Ca^{2+} . Durch die oben erwähnten chemischen Transmitterreize kann die Ionenleitfähigkeit bzw. Permeabilität der Membran so verändert werden, daß ein rascher kurzfristiger Austausch bestimmter Ionen durch die Membran stattfinden kann, was eine Abnahme des elektrischen Potentials zur Folge hat. Die Membran wird depolarisiert. Je nach Art und Ort der Entstehung wird diese geringe Depolarisation als Vorpotential, Lokalantwort oder auch als excitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet.

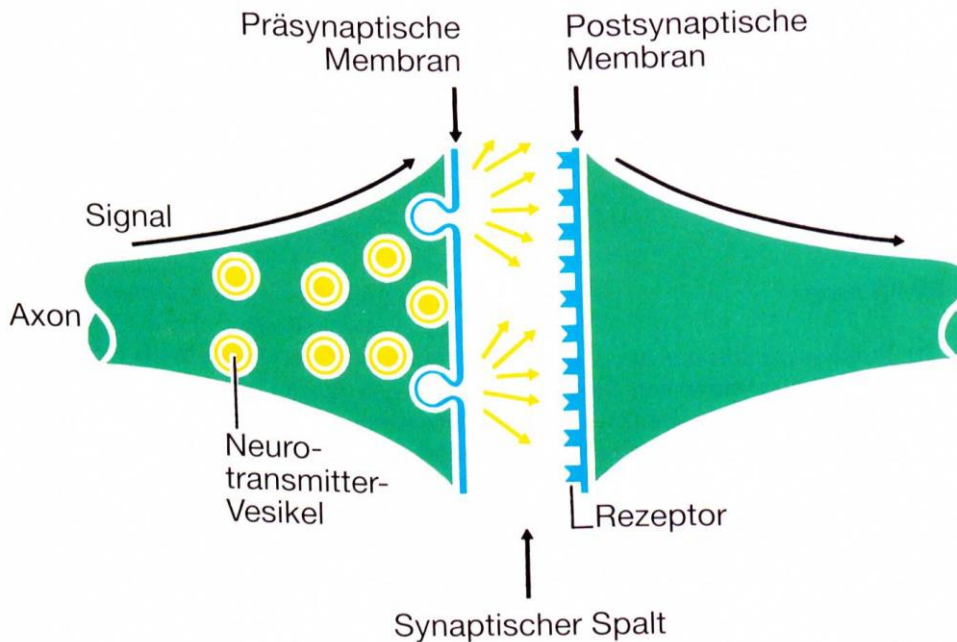


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Synapse

Falls die Reizstärke nur gering war, wird die Zellmembran rasch wieder auf den ursprünglichen Wert repolarisiert. Falls jedoch die Zellmembran durch den Reiz sehr stark depolarisiert wird, wird eine Schwelle überschritten, wobei es zu einem lawinenartigen, dem Alles-oder-nichts-Gesetz gehorchenden Einstrom bestimmter Ionen in die Zelle kommt. Diese mit sehr großer Geschwindigkeit verlaufende Depolarisation führt sogar zu einer Umkehrung des Potentials. Anschließend wird die Zellmembran wieder so repolarisiert, daß das Ruhepotential wieder erreicht wird. Der schnelle Teil der De- und Repolarisation wird als Spitzenpotential, der Gesamtverlauf (EPSP und Spitzenpotential) als Aktionspotential bezeichnet.

Innerhalb des Insekten-Gesamtnervensystems werden zahlreiche unterschiedliche Transmitter verwendet (Abb. 2).

Acetylcholin	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
γ -Aminobuttersäure (GABA)	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
Glutamat	$\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$
Serotonin	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}$
Proctolin	Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr
Oktopamin	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}_3$

Abb. 2: Strukturen der in Insekten nachgewiesenen Neurotransmitter

von denen die am besten untersuchten Acetylcholin, GABA (Gamma-Aminobuttersäure), Glutaminsäure, Serotonin, Proctolin und Oktopamin sind.

Die Dendriten üben durch ihre verschiedenen erregenden (excitatorischen) oder hemmenden (inhibitorischen) postsynaptischen Rezeptoren eine Steuer- bzw. Modulator-Funktion auf die nachfolgende Nervenzelle aus. Aufgrund dieser Prinzipien der synaptischen Signalübertragung bieten sich folgende Angriffspunkte für insektizide Angriffsziele (Targets) an:

1. Induktion oder Hemmung der präsynaptischen Transmitterausschüttung
2. Beeinflussung der postsynaptischen Rezeptoren (Gepner et al., 1978)
3. Beeinflussung der Konzentration von Neurotransmittern wie zum Beispiel durch Hemmung des meist hydrolytischen Abbaus oder präsynaptischen Resynthese.

Im Falle des Acetylcholins ist dies durch Phosphorsäureester (wie Paraoxon) und Carbamate verwirklicht. Diese Substanzen führen zu einer Hemmung des im synaptischen Spalt lokalisierten Enzyms Acetylcholinesterase und verhindern damit den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin. Die Folge ist eine längere Verweildauer dieses Neurotransmitters im synaptischen Spalt, die letztlich zu einer postsynaptischen Übererregung führt.

Chlorierte Kohlenwasserstoffe und Pyrethroide (wie Cyfluthrin) induzieren die präsynaptische Transmitterausschüttung (Targetprinzip 1). Durch eine Verzögerung des Schließens axonaler Na⁺-Kanäle ist das Membranpotential über längere Zeit überschwellig. Als direkte Folge werden viele Spitzenpoten-

tiale ausgelöst. Dieses Phänomen wird deshalb „repetitive Spiking“ genannt. Viele Aktionspotentiale führen zu einer größeren Transmitterausschüttung und damit zu einer postsynaptischen Übererregung.

Bis vor ungefähr 10 Jahren war die Hemmung der Acetylcholinesterase neben den Effekten der Pyrethroide und den chlorierten Kohlenwasserstoffen das einzige insektizide Target, dessen Wirkungsprinzip auf einer Beeinflussung der synaptischen Signalübertragung beruht.

Das neuartige Insektizid Imidacloprid und seine Analogen haben jedoch gezeigt, daß auch eine Beeinflussung der postsynaptischen Rezeptoren zu einer hervorragenden insektiziden Wirkung führt (Targetprinzip 2).

Wenn ein ausgeschütteter Neurotransmitter postsynaptisch einen Effekt haben soll, dann muß dieser Transmitter an die in die postsynaptische Membran eingelagerten Rezeptoren binden. Substanzen wie Imidacloprid und Imidacloprid-Derivate verhindern zum Beispiel die Acetylcholin-Bindung an bestimmte Acetylcholin-Rezeptoren, indem sie selber an solche Rezeptoren binden.

Acetylcholin-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung im Zentralnervensystem der Insekten. Wie bei Warmblütern werden diese Acetylcholin-Rezeptoren bei Insekten in zwei Subklassen unterteilt: nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren und muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (Sattelle, 1980). Die nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor-Subklasse ist bei Insekten viel häufiger vertreten als die muskarinerge Subklasse (Breer und Sattelle, 1987). Die spezifischen pharmakologischen Unterschiede zwischen nikotiner-

gen und muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren in Insekten einerseits und Warmblütern andererseits können jedoch als Grundlage für die Entwicklung neuartiger spezifischer Insektizide dienen.

Bereits 1984 wurde in unseren Laboratorien eine neue Substanzklasse mit großer Bindungsaffinität zum nikotiner-gen Acetylcholin-Rezeptor in Insekten gefunden. Ein potenter Vertreter dieser Substanzklasse, der sog. Nitroguanidine, ist Imidacloprid (NTN 33893).

2. Material und Methoden

2.1. Insektenmaterial

Adulte *Stomoxys calcitrans* wurden freundlicherweise von Dr. Stendel (VT-F) zur Verfügung gestellt.

2.2. Herstellung des Fliegenkopf-Homogenats

2.2.1. Aussortieren von Fliegenköpfen

Alle Experimente sind durchgeführt worden mit einer Roh-Membran-Fraktion, aufgereinigt aus Fliegenköpfen. Die Fliegen wurden routinemäßig nach Erhalt bei -30°C eingefroren. Nach Trennung der Fliegen von dem Nährboden wurden sie in einen Erlenmeyer-Kolben überführt. Anschließend wurden die Fliegenköpfe vom Körper getrennt, indem unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit einem Glasstäbchen kräftig gerührt wurde. Wenn der Stickstoff verdampft war, wurden die Köpfe von den übrigen Körperteilen durch Sieben getrennt. Die restlichen Körperteile wurden dann mit der Pinzette aussortiert. Das Aussortieren geschah auf einer auf Trockeneis liegenden „Nunc“-Platte.

2.2.2. Herstellung der Roh-Membran-Fraktion zum Nachweis der nikotiner-gen Acetylcholin-Rezeptor-Bindungsaffinität

Die Fliegenköpfe wurden im Puffer im Ultra Turax homogenisiert (1 g Köpfe auf 20 ml Homogenisations-Puffer [50 mM TRIS/HCl pH 7,4, 320 mM Saccharose]). Das Homogenat wurde zentrifugiert ($1200 \times g$, 10 min, 4°C), filtriert und bis zur Versuchsdurchführung in Portionen von 250 ml eingefroren. Innerhalb einer Woche wurde kein Bindungsverlust beobachtet.

2.3. Filter-Bindungs-Experimente

2.3.1. Prinzip der Filter-Bindungs-Experimente

Rezeptor-Bindungs-Experimente wurden meistens mit radioaktiv markierten Liganden durchgeführt. Bei diesen Liganden handelte es sich fast ausschließlich um sehr wirksame Antagonisten. Bei nikotiner-gen Acetylcholin-Rezeptor-Bindungs-Experimenten wurde häufig ein modifiziertes Toxin, das N-[propionyl- ^3H] propionylierte alpha-Bungarotoxin, eingesetzt. Dieses Toxin wurde aus einer Giftnatter, der Südchinesischen Vielbindenbungar (*Bungarus multicinctus*), gewonnen. Bei muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor-Bindungs-Experimenten fand meistens QNB (1-Quinuclidinyl [phenyl]-4- ^3H] benzilate) Verwendung (Lummis und Sattelle, 1985).

Die Bindungsaffinität einer Substanz an bestimmte Rezeptoren in einer Roh-Membran-Fraktion wurde in sog. Verdrängungsexperimenten mit radioaktiv markierten Liganden bestimmt.

Hierzu wurde ein Aliquot des gewonnenen Homogenats in Gegenwart von radioaktiv markierten Liganden inkubiert. Nach einer gewissen Zeit wurde die Inkubation gestoppt, indem das Inkubat Vakuum-filtrierte wurde. Hierdurch wurde der gebundene vom nicht gebundenen, radioaktiv markierten Liganden getrennt. Diese Gesamt-Radioaktivität, gebunden am filtrierten Homogenat, ist ein Maß für die maximale Anzahl vorhandener Rezeptoren und wird deshalb maximale Bindung genannt. Erfolgt nun diese Inkubation zusätzlich mit einer nicht radioaktiv markierten Substanz (wie Imidacloprid), dann wird bei einer ausreichenden Bindungsaffinität dieser nicht radioaktiv markierten Substanz ein Teil der im Homogenat anwesenden Rezeptoren mit dieser Substanz belegt. Dadurch wird ein weniger radioaktiv markierter Ligand am Homogenat gebunden werden können bzw. der radioaktiv markierte Ligand wird durch die nicht radioaktiv markierte Substanz vom Rezeptor verdrängt, wodurch die Gesamt-Radioaktivität, gebunden an filtriertem Homogenat, sinken wird. Üblicherweise wird auch bei hoher Konzentration einer nicht radioaktiv markierten Substanz (z. B. Nikotin beim nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor-Bindungs-Experiment oder Atropin beim muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor-Bindungs-Experiment) eine gewisse Rest-Radioaktivität am Homogenat gebunden. Diese Restbindung wird unspezifische Bindung genannt, die Differenz zwischen maximaler Bindung und unspezifischer Bindung wird spezifische Bindung genannt. Als Maß für die Bindungsaffinität einer nicht radioaktiv markierten Substanz wird die Konzentration ermittelt, die notwendig ist,

die spezifische Bindung des radioaktiv markierten Liganden am Rezeptor um 50% zu reduzieren. Dieser Wert wird IC_{50} genannt und üblicherweise nach Vermessen der am Filter gebundenen Radioaktivität mit einem Mikro-Computer (HP 9000, Series 200) mit nicht-linearer Regressionsanalyse (LOGIT-Verfahren) ermittelt. Proteinkonzentrationen wurden mit Coomassie-Blue bestimmt.

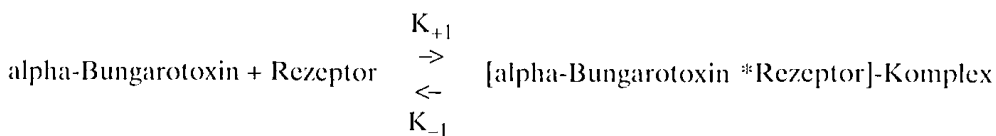
2.3.2. Filter-Bindungs-Experimente mit nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren

Homogenat-Aliquots (250 ml) wurden mit 700 ml Inkubations-Puffer (50 mM TRIS/HCl pH 7,4, 160 mM NaCl, 2 mg/ml Rinderserumalbumin) und Nikotin (Endkonzentration 0,001 bis 1000 mM) oder Imidacloprid bzw. Imidacloprid-Derivaten bzw. -Analoge (Endkonzentration 0,1 bis 100 mM) verdünnt. Das Kontroll-Experiment zwecks Bestimmung der Maximal-Bindung enthielt keinen Zusatz. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 1000 mM Nikotin bestimmt. Alle Bestimmungen wurden zweifach durchgeführt. Nach einer Vorinkubation von 30 min bei 26 °C wurden 50 ml einer radioaktiv markierten alpha-Bungarotoxin-Lösung zugegeben. Nach einer Folge-Inkubation von 15 min wurde die Inkubation mit 3 ml eiskaltem Inkubations-Puffer abgestoppt. Anschließend wurde das Inkubat über ein mit Inkubations-Puffer unter Zusatz von 1% PROSIL 28 befeuchtetes Glasfaser-Filter (Whatman CF/B) abgesaugt. Das Filter wurde 2 x mit Inkubations-Puffer gewaschen und in Zählfläschchen mit 10 ml Scintillator-Filtercount (Packard) zwecks Messung der Radioaktivität überführt.

3. Ergebnisse

3.1. Biochemische Eigenschaften von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren aus Köpfen von *Stomoxys calcitrans*

Die spezifische Bindung von radioaktiv markiertem alpha-Bungarotoxin ist linear proportional zu der Menge Fliegenkopf-Homogenat bis zu 800 mg Protein pro Testansatz. Diese spezifische Bindung ist außerdem sättigbar. Eine maximale spezifische Bindung wird erreicht bei Konzentrationen größer als 4 nM. Außerdem wird diese maximale spezifische Bindung nach einer Inkubation von 20 Minuten erreicht. Aus allen kinetischen Bindungsdaten können weiter folgende biochemische Kennzahlen des nikotinergen Acetylcholin-Rezeptors abgeleitet werden (Lunt, 1985): die Dissoziations-Konstante (K_d) $3,98 \pm 0,44$ nM (laut einer Scatchard-Analyse); die maximale Anzahl der alpha-Bungarotoxin-Bindungsstellen ($360,3 \pm 25,9$ fmol/mg Protein). Ausgehend von folgendem einfachem Modell der alpha-Bungarotoxin-Rezeptor-Interaktion:



kann aus K_{+1} ($[3,07 \pm 0,17] \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und K_{-1} ($[1,14 \pm 0,07] \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$) bei einer alpha-Bungarotoxin-Konzentration von 1,25 nM auch K_d berechnet werden (K_{-1}/K_{+1}). Die auf diese Weise errechnete Dissoziations-Konstante beträgt $3,71 \pm 0,07$ nM und weicht damit stati-

stisch nicht von dem Wert aus der Scatchard-Analyse ab. Der Hill-Koeffizient beträgt ungefähr 0,9. Die Halbwert-Zeit des alpha-Bungarotoxin*-Rezeptor-Komplexes beträgt 1 Minute ($\ln 2/K_{-1}$).

3.2. Pharmakologische Eigenschaften von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren aus Köpfen von *Stomoxys calcitrans*

Nikotin und alpha-Bungarotoxin haben eine sehr große Bindungsaffinität an nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren. Diese Verbindungen zeigen deshalb eine hervorragende Bindung an solche Rezeptoren. Der IC_{50} -Wert von Nikotin beträgt bis zu $3,2 \times 10^{-8}$ M (Abb. 3), was einer Inhibitions-Konstante K_i von $2,4 \times 10^{-8}$ M entspricht. Im Schnitt beträgt dieser IC_{50} -Wert $8,6 \times 10^{-8}$ M. Aufgrund der Tatsache, daß bei solchen Experimenten mit biologischem Material gearbeitet wird, muß mit einer Streuung von bis zu einem Faktor 3 gerechnet werden. Das alpha-Bungarotoxin ist mit einem IC_{50} -Wert von 10^{-11} M bis 10^{-10} M, dem Nikotin sogar um 2 bis 3 Zehnerpotenzen überlegen. Die maßgeblichen Acetylcholin-Rezeptor-Effektoren Nereistoxin und Cartap zeigen eine kaum nachweisbare Bindung an diesen Rezeptor. SKI 071 (2-[Nitromethylen]-tetrahydro-1,3-thiazin) ist unter diesen Bedingungen nahezu wirkungs-

los. Mit Acetylcholin läßt sich jedoch kein alpha-Bungarotoxin vom Rezeptor verdrängen. Dieses zunächst überraschende Ergebnis ist aber verständlich, wenn man bedenkt, daß die Anwesenheit von Acetylcholinesterase im Homogenat zu einem raschen Abbau des Acetylcholins und damit zu der inaktiven Verbindung Cholin führt. Bindungs-Experimente mit Acetylcholin in Anwesenheit eines Acetylcholin-Inhibitors wie Paraoxon haben wir aufgrund des hohen Risikos, das solche Experimente mit sich bringen, nicht durchgeführt.

3.3. Bindung von Imidacloprid an nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren

Imidacloprid zeigt eine sehr gute Bindung an nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (Abb. 4). Mit einem IC_{50} -Wert von $2,9 \times 10^{-6}$ M bindet diese Verbindung nur um einen Faktor 10 schlechter als Nikotin.

Anfangs wurden Imidacloprid und andere Nitromethylen-Derivate auch noch am muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor getestet. Eine Bindung wurde jedoch niemals beobachtet.

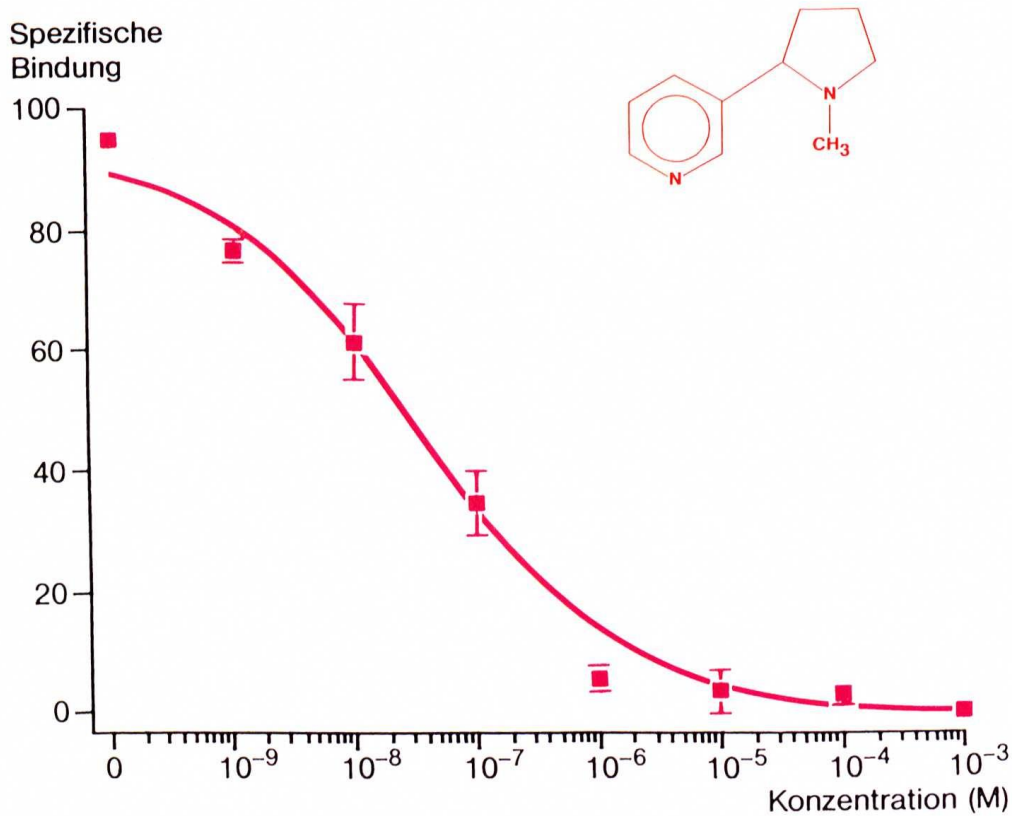


Abb. 3: Bindungsaffinitäten von Nikotin am nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor

4. Diskussion

Das Zentralnervensystem des Gemeinen Wadenstechers *Stomoxys calcitrans* ist eine reichhaltige Quelle für die Isolation von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren. Mit Hilfe einfacher Methoden kann in kurzer Zeit eine große Menge Homogenat hergestellt werden, das sich zur Überprüfung und Optimierung der Bindungsaffinität potentieller Wirkstoffmoleküle verwenden läßt.

Die biochemischen Versuchsergebnisse haben eindeutig gezeigt, daß alpha-Bungarotoxin mit hoher Affinität an diesen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren bindet. Denaturierung der Proteine führt zu einem Bindungsverlust. Weiter sind die Grundkriterien für die Bindung von radioaktiv markierten Liganden (alpha-Bungarotoxin) an einen physiologischen Rezeptor (nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor) erfüllt: Die alpha-Bungarotoxin-Bindung ist sättig-

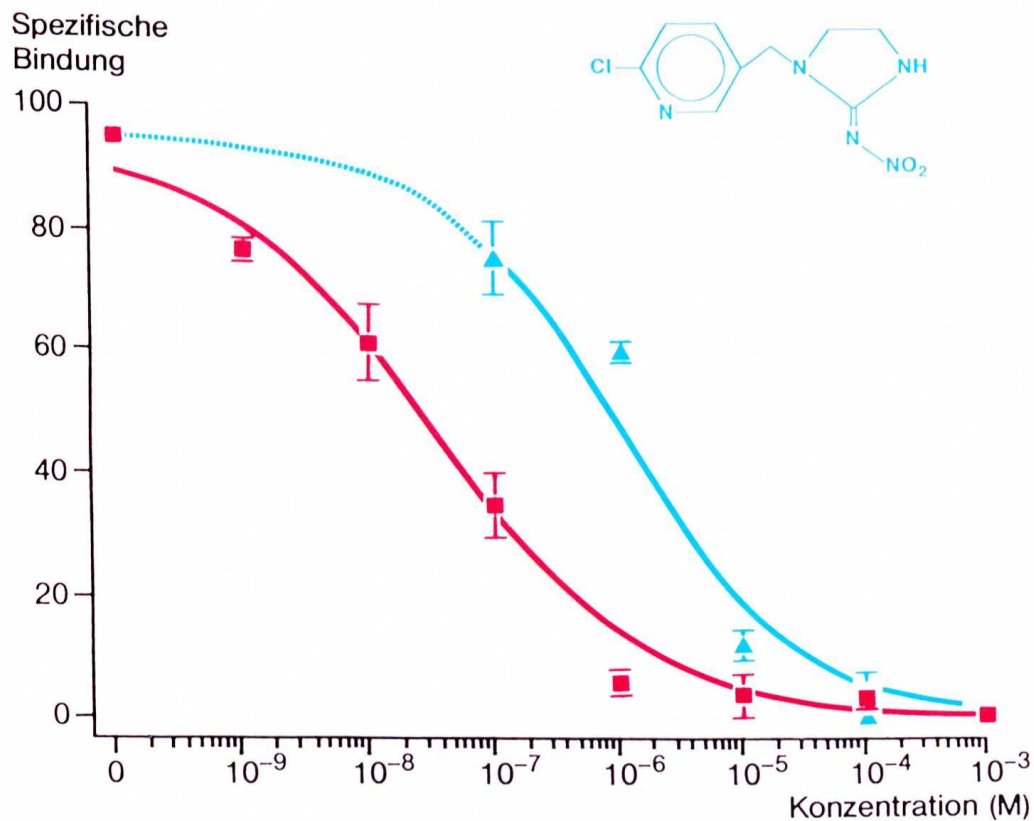


Abb. 4: Bindungsaffinitäten von Nikotin und Imidacloprid am nikotineren Acetylcholin-Rezeptor

bar, wie bei einer Interaktion mit diskreten Bindungsstellen erwartet werden kann; die Dissoziations-Konstante (K_d) in Höhe von $3,71 \pm 0,07$ nM bis $3,98 \pm 0,44$ nM und ein Hill-Koeffizient von fast 1 belegen die hohe Affinität von alpha-Bungarotoxin an eine einzige spezifische Rezeptor-Gruppe.

Das biochemische Target der Nitromethylene und des Nitroguanidins Imidacloprid ist der nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor. Die biochemische Wir-

kung dieser Präparate ist in vielen Laboratorien untersucht worden (Soloway et al., 1978; Schröder und Flattum, 1984; Sattelle et al., 1989; Benson, 1989; Bai et al., 1991) und bestätigt die vorliegenden Untersuchungen. Allerdings gibt es viele Imidacloprid-Analoga, die biochemisch viel wirksamer sind als das Imidacloprid. Für eine hervorragende biologische Wirkung reicht aber eine hervorragende biochemische Wirkung allein nicht aus. Neben einer direkten

guten Wirkung am Target bedingen viele zusätzliche Parameter wie Penetration, Verteilung und Metabolismus, ob eine Verbindung biologisch gut wirksam ist. Es kann z. B. passieren, daß erst ein Metabolisierungsschritt zur aktiven Verbindung führt. Die Ausgangssubstanz kann sogar biochemisch inaktiv sein. So wird die biochemisch inaktive Verbindung Chlordimeform erst im Insekt zu N-Desmethylehlordemiform aktiviert. Diese letztere Substanz ist dann der biochemisch aktive Oktopamin-Agonist. Der umgekehrte Fall ist jedoch auch denkbar: Biochemisch hochwirksame Präparate werden bei der Metabolisierung inaktiviert. Biochemische Test-Methoden sollen keinesfalls überbewertet werden, aber können, wie im Falle des Imidacloprid und Analogen eindrucksvoll bewiesen, schnell und zuverlässig Aussagen treffen, welche Veränderungen am Molekül möglich sind, um eine biochemische und damit evtl. auch eine biologische Wirkung zu steigern. Imidacloprid ist das erste hochwirksame Insektizid, dessen Wirkungsprinzip auf einer fast vollständigen und nahezu irreversiblen Blockierung von postsynaptischen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren im Zentralnervensystem des Schadinsektes *Stomoxys calcitrans* beruht. Die toxikologischen Befunde haben außerdem gezeigt, daß vermutlich aufgrund pharmakologischer Unterschiede zwischen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren in Insekten und Warmblütern es möglich ist, chemisch neuartige insektizide „knock-down“-Effektoren mit geringer Warmblütertoxizität und hoher insektizider Potenz zu konzipieren und zu realisieren. Die biochemischen Untersuchungen am Imidacloprid und an Imidacloprid-

Analogen sollen aber auch belegen, daß zur Erfassung und Beurteilung neuraler wie postsynaptischer Wirkungen ein leistungsfähiges System zur Verfügung steht.

5. Zusammenfassung

Imidacloprid ist ein Vertreter der Stoffgruppe der Nitroguanidine. Viele Vertreter dieser Verbindungsklasse, und Imidacloprid insbesondere, haben eine ausgezeichnete insektizide Wirkung.

Diese hohe Wirksamkeit wird realisiert durch eine Bindung von Imidacloprid an den nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor im Insekten-Nervensystem, wobei die chemische Signalübertragung gestört wird.

Hierzu sind Methoden zur Isolierung von nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren aus Köpfen von *Stomoxys calcitrans* und der Nachweis von einer evtl. vorhandenen Bindungsaffinität einer Substanz an solche Rezeptoren entwickelt worden.

Die neurophysiologischen Eigenschaften der nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren von *Stomoxys calcitrans*, die u. a. die Bindung von Imidacloprid beinhalten, werden ausführlich beschrieben.

Imidacloprid ist das erste hochwirksame Insektizid, dessen Wirkungsprinzip auf einer fast vollständigen und nahezu irreversiblen Blockierung von postsynaptischen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren im Zentralnervensystem des Schadinsektes *Stomoxys calcitrans* beruht.

Summary

The biochemistry of imidacloprid

Imidacloprid belongs to the group of nitroguanidines. Many representatives of this class of compounds, and imidacloprid in particular, have an excellent insecticidal action.

This high activity is brought about by binding of imidacloprid to the nicotinic acetylcholine receptor in the insect's nervous system, which interferes with chemical signal transmission.

Methods for isolating nicotinic acetylcholine receptors from the heads of *Stomoxys calcitrans* and for measuring the binding affinity, if any, of a substance on such receptors have been developed. The neurophysiological properties of the nicotinic acetylcholine receptors of *Stomoxys calcitrans*, which include the binding of imidacloprid, are described in detail.

Imidacloprid is the first highly effective insecticide whose mode of action has been found to derive from almost complete and virtually irreversible blockage of postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system of the insect pest *Stomoxys calcitrans*.

Résumé

Biochimie de l'imidacloprid

L'imidacloprid appartient au groupe des nitroguanidines. De nombreuses substances de cette classe de composés, et l'imidacloprid en particulier, ont une excellente action insecticide.

Cette haute efficacité est atteinte par liaison de l'imidacloprid au récepteur

nicotinique de l'acétylcholine dans le système nerveux des insectes, ce qui perturbe le transfert chimique des signaux. Dans ce domaine, des méthodes ont été mises au point pour isoler de têtes de *Stomoxys calcitrans* des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine et prouver une éventuelle affinité de liaison d'une substance avec de tels récepteurs.

Les propriétés neurophysiologiques des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine de *Stomoxys calcitrans* qui comprennent entre autres la liaison de l'imidacloprid sont décrites en détail.

L'imidacloprid est le premier insecticide très efficace dont le principe d'action repose sur un blocage presque complet et pratiquement irréversible des récepteurs nicotiniques postsynaptiques de l'acétylcholine dans le système nerveux central du ravageur *Stomoxys calcitrans*.

Resumen

Sobre la bioquímica del imidacloprid

Imidacloprid es un representante del grupo de sustancias de las nitroguanidinas. Muchos representantes de esta clase, y especialmente el imidacloprid, poseen un excelente efecto insecticida. Esta alta eficacia se debe a la unión del imidacloprid al receptor nicotínico de la acetilcolina en el sistema nervioso de los insectos, lo que interfiere con la transmisión química de señales.

Para ello se desarrollaron métodos para el aislamiento de receptores nicotínicos de acetilcolina de las cabezas de *Stomoxys calcitrans* y para la comprobación de una posible afinidad de unión de una sustancia a estos receptores.

Se describe detalladamente el perfil neurofisiológico de los receptores nico-

tinérgicos de acetilcolina de *Stomoxys calcitrans*, el cual abarca, entre otros, la unión del imidacloprid.

El imidacloprid es el primer insecticida de alta eficacia cuyo principio de acción se basa en un bloqueo casi total y prácticamente irreversible de los receptores nicotinérgicos postsinápticos de la acetilcolina en el sistema nervioso central de la plaga *Stomoxys calcitrans*.

6. Literatur

Bai, D., Lummis, S.C.R., Leicht, W., Breer, H., und Sattelle, D.B. (1991):
Actions of imidacloprid and related nitromethylenes on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. Submitted to Pestic Science, in Druck.

Benson, J.A. (1989):
Insect nicotinic acetylcholin receptors as targets for insecticides.
In: BCPC Monograph No 43 Progress and Prospects in Insect Control, ed McFarlane, N.R. British Crop Protection Council, Farnham, England, 59-70.

Breer, H., und Sattelle, D.B. (1987):
Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors.
J. Insect Physiol. **33**, 771-790.

Gepner, J.L., Hall, L.M., und Sattelle, D.B. (1978):
Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action.
Nature **276**, 188-190.

Lummis, S.C.R., und Sattelle, D.B. (1985):
Binding of N-[propionyl-³H]propionylated alpha-Bungarotoxin and L-[benzyllic-4,4'-³H] quinuclidinyl benzilate to CNS extracts of the cockroach *Periplaneta americana*.
Comp. Biochem. Physiol., 75-83.

Lunt, G.G. (1985):
Analysis of Neurochemical Data.
In: Neurochemical Techniques in Insect Research, 296-316.

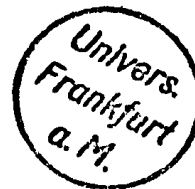
Sattelle, D.B. (1980):
Acetylcholine receptors of insects.
Adv. Insect Physiol. **15**, 215-315.

Sattelle, D.B., Buckingham, S.D., Wafford, K.A., Sherby, S.M., Bakry, N.M., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., und May, T. E. (1989):
Actions of the insecticide 2(nitromethylene)tetrahydro-1,3-thiazine in insect and vertebrate nicotinic acetylcholine receptors.
Proc. R. Soc. Lond. B237, 501-514.

Schröder, M.E., und Flattum, R.F. (1984):
The mode of action and neurotoxic properties of the nitromethylene heterocycle insecticides.
Pestic. Biochem. Physiol. **22**, 148-160.

Soloway, S.B., Henry, A.C., Kollmeyer, W.D., Padgett, W.M., Powell, J.E., Roman, S.A., Tieman, C.H., Corey, R.A., und Horne, C.A. (1978):
Nitromethylene insecticides.
In: Advances in Pesticide Science, Part 2, H. Geissbühler, G. T. Brooks and P. C. Kearney (Eds.), Oxford: Pergamon Press, 206-217.

Manuskript-Eingang: 14. 9. 1991



Drs. J. Abbink
Bayer AG
Pharma Forschung und Entwicklung
Pharma-Forschungszentrum
5600 Wuppertal-Elberfeld, Bayerwerk