

Ein Receptorprotein für das Juvenilhormonanalogue 10.11-Epoxy-6.7-*trans*-2.3-*trans*-farnesylpropenyläther aus den Epidermiszellen der Puppen von *Tenebrio molitor* L.

A Receptor Protein for the Juvenile Hormone Analogue 10,11-Epoxy-6,7-*trans*-2,3-*trans*-farnesylpropenylether from the Epidermis Cells of the Pupae of *Tenebrio molitor* L.

Peter Schmialek, Marina Borowski, Astrid Geyer, Verena Miosga, Michael Nündel,
Eckehard Rosenberg und Burger Zapf

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, Freie Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **28 c**, 453–456 [1973]; eingegangen am 19. März 1973)

Herrn Professor Dr. Dr. E. Schütte zum 65. Geburtstag gewidmet

Juvenile hormone, receptor protein, *Tenebrio molitor*

A receptor protein was isolated from the epidermis cells of the pupae of *Tenebrio molitor* L. The affinity constant of the complex of this receptor protein and a juvenile hormone analogue was found to be $4.4 \cdot 10^{10}$ l/mole. Its molecular weight is about $3.5 \cdot 10^5$. The isoelectric point is 4.4.

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem H wurden die Epidermiszellen der Puppen von *Tenebrio molitor* L. als eines der Zielorgane für dieses Juvenilhormonanalogue erkannt¹. Dabei erhielten wir erste Hinweise, daß für dieses Zielorganverhalten ein oder mehrere Receptorproteine verantwortlich sind. Da die molare Konzentration des Receptors im Tier etwa bei 10^{-10} Mol/l liegt, konnte sein Weg im Aufarbeitungsgang zunächst nur mit Hilfe der Bindung an vorher injiziertes radioaktives H verfolgt werden. Nach Lokalisation des Receptors in den Trennungsgängen konnte dann auch der so vorgereinigte Receptor mit der entsprechenden H-Menge inkubiert und so die Versuche *in vitro* durchgeführt werden. Es ergab sich in jedem Fall das gleiche Ergebnis wie bei den *in vivo* durchgeführten Versuchen, so daß die Voraussetzungen für die Ermittlung der Affinitätskonstanten gegeben waren.

Im folgenden berichten wir über die Isolierung und einige physikalisch-chemische Daten eines Receptorproteins.

Material und Methoden

Über die Daten von H, die Haltung der Versuchstiere, die Präparation der Epidermiszellen, die Mes-

Sonderdruckanforderung an Professor Dr. P. Schmialek, Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, D-1000 Berlin 33, Arnimallee 22.

Abkürzungen: H, 10.11-Epoxy-6.7-*trans*-2.3-*trans*-farnesylpropenyläther; R-H, Receptor-Hormon-Komplex.

sung der Radioaktivität, die Proteinbestimmung, die Lösung und Applikation von H und schließlich die quantitative Wiedergewinnung von H und seinen Abbauprodukten wurde bereits berichtet¹. Alle Aufarbeitungen und Bestimmungen wurden bei $+4^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Reagenzien

Tris-[hydroxymethyl]aminomethan p. a., Firma Merck, Darmstadt; Äthylendiamintetraessigsäure p. a., Firma Merck, Darmstadt; KCl, HCl und NaOH p. a., Firma Merck, Darmstadt; Harnstoff p. a., Firma Merck, Darmstadt; Ampholine pH 3–10, Firma LKB Produkter AB, Schweden; Sephadex G 200 fine, Pharmacia, Schweden; Sepharose 6 B, Pharmacia, Schweden; Triton X-100, Firma Serva, Heidelberg.

Verwendete Puffer

I: 50 mM Tris; 0,1 mM EDTA; 0,15 M KCl. Der pH-Wert wurde mit HCl bei 22°C auf 7,4 eingestellt.

II: 50 mM Tris; 0,1 mM EDTA; 0,4 M KCl; 1 Vol.% Triton X-100. Der pH-Wert wurde mit HCl bei 22°C auf 7,4 eingestellt.

III: 1% Ampholine pH 3–10.

IV: 1% Ampholine pH 3–10; 1 Vol.% Triton X-100.

V: 50 mM Tris; 0,1 mM EDTA; 0,4 M KCl; 6 M Harnstoff. Der pH-Wert wurde mit HCl bei 22°C auf 7,4 eingestellt.



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.

Isolierung des Receptors

Von ca. 20 Puppen wird die Cutis vom Körperrest getrennt und durch mehrfaches Waschen mit Puffer I von anhaftender Lymphe befreit. Die Cutis wird in einem eingeschliffenen Potter mit ca. 2–3 ml Puffer II bei 1200 U/min gepottert. Das Homogenat wird bei $5000 \times g$ 10 min zentrifugiert und der Überstand mit der gleichen Menge gequollenem Sephadex G 100 fine vermischt. Das Gemisch wird durch Zentrifugation getrennt und der Überstand auf eine 12 cm lange Säule gegeben, die mit Sephadex G 200 fine in Puffer II gefüllt ist. Die Front wird durch Dextran-Blue 2000 angezeigt. Bei einer Laufgeschwindigkeit von 3 ml/Stde. und einer Fraktionsgröße von 1 ml enthält die zweite und dritte Fraktion nach der Front das gesamte Receptorprotein. Nach Gefriertrocknung und anschließender 30-minütiger Inkubation mit der entsprechenden Hormonmenge kann der Komplex für die nachstehenden Untersuchungen eingesetzt werden.

Der isoelektrische Punkt

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde nach B. J. Radola durchgeführt². Als Gel wurde Sephadex G 100 superfine verwendet, von dem 3,5 g in 55 ml Puffer III die geeignete Konsistenz ergaben. Bei einer angelegten Spannung von 575 V pro 20 cm und einer Gelschichtdicke von 1 mm ergab sich eine Stromstärke von 5–10 mA. Als Referenzprotein wurde Rinderhämoglobin zugesetzt, das nach 15–20 Stdn. seinen isoelektrischen Punkt erreichte und dadurch das Ende des Laufs anzeigte. Der pH-Wert wurde direkt auf der Platte mit einer Aufsatzelektrode der Firma Ingold [Typ LOT 403-15-MB-6003] bestimmt. Die Proben wurden entweder mit einer Blutzuckerpipette strichförmig aufgetragen oder gleichmäßig unter das Gel gemischt. Eine weitere Bestimmung wurde mit Puffer IV durchgeführt, um Aggregationseinflüsse auf den isoelektrischen Punkt des R-H auszuschließen.

Das Molekulargewicht

Das Molekulargewicht des R-H wurde durch Gelchromatographie des vorgereinigten Homogenats an Sephadex G 200 fine und Sepharose 6 B in Puffer II bestimmt. Die Füllhöhe der Säulen betrug 45 cm, der innere Durchmesser 1,2 cm. Die Laufgeschwindigkeit wurde auf 2 ml/Stde. eingestellt. Als Referenzprotein wurde Rinderserumalbumin [reinst, Firma Behringwerke] eingesetzt.

Es wurden außerdem mehrere Chromatographien an Sephadex G 200 fine in Puffer V durchgeführt, um eventuelle Desaggregationen sichtbar zu machen.

Die Affinitätskonstante

Die Affinitätskonstante des R-H wurde nach T. Erdos *et al.*³ mit Hilfe der graphischen Auswertung nach G. Scatchard⁴ bestimmt. Die Trennung des freien vom proteingebundenen H erfolgte durch Gel-filtration.

Als Gel wurde Sephadex G 200 fine in Puffer II eingesetzt. Die Füllhöhe betrug 10 cm, der innere Säulendurchmesser 1,2 cm. Die Laufgeschwindigkeit wurde auf 6 ml/Stde. eingestellt. Das Inkubationsvolumen war 0,5 ml, die Inkubationszeit 30 min. Die eingesetzte H-Menge variierte zwischen 10^{-13} und 10^{-14} Mol im Inkubationsvolumen.

Ergebnisse

Die nachstehenden Abbn. 1–4 und die Tabn. I und II fassen die erhaltenen Resultate zusammen.

Tab. I. Differenzierung in freies und gebundenes Hormon für die Auftragung im Scatchard-Plot in Abhängigkeit von der eingesetzten Hormonmenge.

An-satz Nr.	Hormon [dpm]			gebunden frei	gebundenes H in 10^{-11} mol/l
	gebunden	frei	gesamt		
1	838	755	1593	1,11	2,72
2	1220	2067	3287	0,59	3,96
3	1417	4967	6384	0,28	4,60

Tab. II. Lage des iso-elektrischen Punktes bei Variation der Versuchsbedingungen.

An-satz Nr.	eingesetzte Probe	Auftragungsart	Puf-fer	Radio-aktivitäts-Maximum bei pH
1	Homogenat	strichförmig im Neutralen	IV	4,55
2	Homogenat	strichförmig im Basischen	IV	4,35
3	isolierter R-H-Komplex	untergemischt	III	4,30
4	isolierter R-H-Komplex	strichförmig im Basischen	III	4,30

Diskussion

Die ungefähre Größe des Molekulargewichts des R-H wurde in Vorversuchen durch Trennung an Sepharose 4 B festgestellt. Mit den beiden geeignet erscheinenden Gelen Sephadex G 200 und Sepharose 6 B wurde das Molekulargewicht dann genauer er-

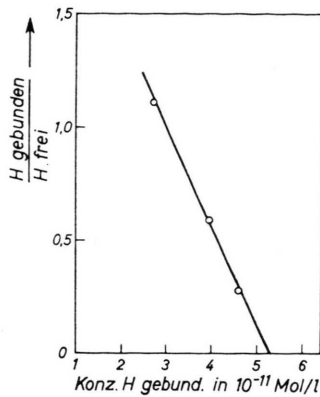


Abb. 1. Auftrag nach Scatchard⁴ für die Bindungsstellen 1. Ordnung. Ordinate: Quotient aus gebundenem und freiem Hormon, erhalten durch Sephadex-Gelchromatographie. Abszisse: Molare Konzentration des gebundenen Hormons. Weitere Parameter siehe Material und Methoden. Die Affinitätskonstante ergibt sich aus dem Anstieg der Geraden zu $4,4 \cdot 10^{10}$ l/Mol. Die maximale Kapazität der eingesetzten Rezeptormenge ergibt sich aus dem Abszissenabschnitt zu $5,26 \cdot 10^{-11}$ Mol/l.

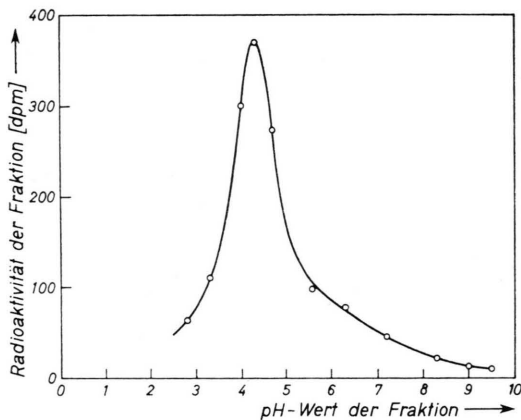


Abb. 2. Verteilung der Radioaktivität in den Fraktionen nach 20-stdg. iso-elektrischer Fokussierung. Ordinate: Radioaktivität der Fraktionen in dpm. Abszisse: pH-Wert der Fraktionen. Die Abb. 2 zeigt das Ergebnis des 3. Ansatzes in Tab. II. Weitere Einzelheiten siehe Material und Methoden sowie Tab. II. Der isoelektrische Punkt liegt in diesem Ansatz bei pH 4,3, im Mittel der Bestimmungen bei pH 4,4.

mittelt. Die genaue Lage des Peaks wurde durch die Radioaktivität von R-H in den Fraktionen erhalten. Da die Trenngrenzen der verwendeten Gele bekannt waren, konnte durch logarithmische Einteilung des Gesamteluats das Molgewicht von R-H aufgrund seiner Lage bestimmt werden. Die Front wurde durch Dextran-Blue-2000, der Start durch die hohe Radioaktivität von nicht gebundenem H und seinen Abbauprodukten angezeigt. Das Referenzprotein Albumin hat ebenfalls eine gewisse Bindungsaffinität zu H

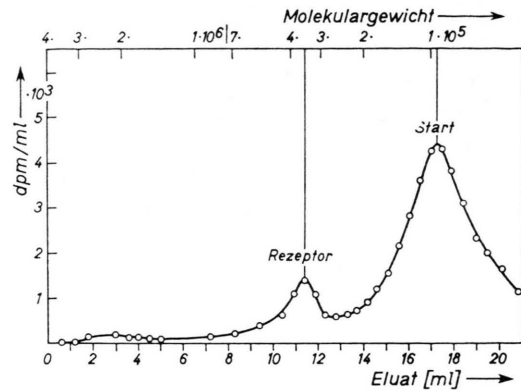


Abb. 3. Elutionsdiagramm einer Sepharosesäule zur Ermittlung des Molekulargewichts des R-H-Komplexes. Ordinate: Radioaktivität pro ml Fraktion in dpm. Abszisse: Eluat in ml. Bei den Trenngrenzen der Sepharose 6 B von 10^5 bis $4 \cdot 10^6$ ergibt sich nach logarithmischer Einteilung der Abszisse ein Molekulargewicht von rund $3,5 \cdot 10^5$.

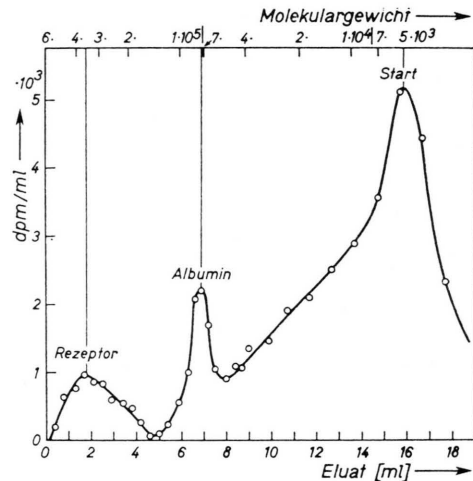


Abb. 4. Elutionsdiagramm einer Sephadexsäule zur Ermittlung des Molekulargewichts des R-H-Komplexes. Ordinate und Abszisse wie Abb. 3. Bei den Trenngrenzen des Sephadex G 200 fine von $5 \cdot 10^3$ bis $6 \cdot 10^5$ ergibt sich für den R-H-Komplex ein Molekulargewicht von $3,6 \cdot 10^5$, für das Referenzprotein Albumin ein Molekulargewicht von $7,4 \cdot 10^4$.

und konnte deshalb auch durch die Radioaktivität des Komplexes festgelegt werden. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse spricht, daß sich die Molekulargewichte von R-H auf beiden Gelen nur um etwa 3% unterscheiden, obwohl aufgrund der Trenngrenzen der R-H Peak einmal in der Nähe der Front [Sephadex G 200 fine] und einmal in der Nähe des Starts [Sepharose 6 B] zu finden ist. Ebenso wie der aus Kalbsuterus gewonnene 8S Cytosol Rezeptor für Oestradiol, dessen Molgewicht von Puca et al. mit

236 000 angegeben wird⁵, hat das hier untersuchte Protein ein sehr hohes Molgewicht. Dieses hätte durch Aggregation mit Begleitproteinen des Homogenats oder durch Aggregation von Untereinheiten des eigentlichen Receptors hervorgerufen werden können. Der Einsatz von 6 M Harnstoff bzw. 1% Triton X-100 im Homogenat- und Säulenpuffer ergab im Vergleich zu Puffer I das gleiche Molekulargewicht. Eine Aggregation ist damit auszuschließen. Es liegt also ein unter den Aufarbeitungsbedingungen einheitlicher Receptor vor. Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, bei der Ermittlung der Affinitätskonstanten aus der Auftragung nach Scatchard⁴ die maximale Bindungskapazität der eingesetzten Receptormenge zu ermitteln. Dieser Wert ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse. Die eingesetzte Präparationsmenge von 100 mg Cutis, die die Menge an vorhandenem Receptor bestimmt, kann $2,6 \cdot 10^{-14}$ Mol H im Komplex binden. Unter der Annahme, daß pro Receptormolekül ein Molekül H mit der erwähnten hohen Affinität gebunden wird, und unter Berücksichtigung der eingesetzten Gewebemenge sowie einer 30-proz. Extraktion des Receptors³ läßt sich errechnen, daß die Konzentration des Receptors in der Epidermis von *Tenebrio molitor* L. Puppen $8,7 \cdot 10^{-10}$ Mol/l Ge-

webe beträgt. Die natürliche Konzentration im Gesamttier ist bei einem 20-proz. Anteil der Cutis am Gesamtgewicht dann $1,7 \cdot 10^{-10}$ Mol/l.

Die hohe spez. Radioaktivität des von uns synthetisierten Juvenilhormonanalogs gestattete es, die eingesetzte Konzentration im Bereich von 10^{-10} Mol/l zu halten. Dadurch liegen die Meßpunkte bei der Auftragung nach Scatchard⁴ im linken linearen Bereich der Kurve, der die spezifischen Bindungsstellen angibt. Erst die hohe Affinitätskonstante von $4,4 \cdot 10^{10}$ l/Mol des untersuchten Hormon-Proteinkomplexes und die quantitative Reisolierung von H aus dieser Proteinbindung¹ erlaubten es, dieses Protein als Receptor zu bezeichnen und gegenüber unspezifisch bindenden Proteinen abzugrenzen.

Ebenso wie bei der Chromatographie an Sephadexgelen fanden wir auch bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes des R-H keinen Hinweis für eine Aggregationsbildung. Der über Sephadexchromatographie gereinigte R-H ließ sich durch isoelektrische Focussierung nicht in mehrere Banden aufspalten.

Für finanzielle Hilfe danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem interministeriellen Ausschuß für „Umweltchemikalien und Biocide“, Bonn-Bad Godesberg, Deutschherrenstraße.

¹ P. Schmialek, M. Borowski, A. Geyer, V. Miosga, M. Nündel, E. Rosenberg u. B. Zapf, Z. Naturforsch. **28c**, 453 [1973].

² B. J. Radola, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **194**, 335 [1969].

³ T. Erdos, R. Bessada u. J. Fries, FEBS Letters **5**, 161 [1969].

⁴ G. Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, 660 [1949].

⁵ G. A. Puca, E. Nola, V. Sica u. F. Bresciani, Advances in the Biosciences, d. G. Raspe, **7**, 97 [1971].