

Juvenilhormonbindende Substanzen mit allosterischen Eigenschaften in den Ovarien von *Tenebrio molitor* L.

Juvenile Hormone Binding Substances with Allosteric Properties in the Ovaries
of *Tenebrio molitor* L.

Peter Schmialek † *, Astrid Geyer, Verena Miosga, Michael Nündel und Burger Zapf

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, Freie Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **30 c**, 730—733 [1975]; eingegangen am 4. Juli 1975)

Juvenile Hormone, *Tenebrio molitor* L., Receptor Proteins, Ovaries

Some receptor proteins were isolated from the ovaries of *Tenebrio molitor* L. One had a molecular weight of 8×10^5 and an isoelectric point of 5.4. In the range of 1×10^6 — 4×10^7 dalton JH-binding particles are existing with the same isoelectric point of 2.5. All proteins showed allosteric effects. Under the used conditions they are stable against heating and some enzymes, precipitable with 5% trichloro acetic acid and hydrolyzable with 1 N HCl. The binding is specific and not displaceable with a great excess of substances with the same polarity.

Das Juvenilhormon bewirkt in den Imagines der Insekten die Eireifung und die Dotterbildung¹. Unsere Versuche sollten klären, ob in den Ovarien selbst ein Rezeptor für das Juvenilhormon vorhanden ist. Erste Versuche mit injizierten JH-wirksamen, radioaktiv markierten Substanzen zeigten, daß das Hormon in den Ovarien an eine hochmolekulare Substanz gebunden wurde. Dieser Effekt trat auch *in vitro* bei isolierten Ovarien auf. Da hier die Dosierung des Hormons, sein Abbau und die Menge an eingesetztem Gewebe besser kontrollierbar waren, benutzten wir dieses System für die hier vorliegenden Untersuchungen. Es wurden einige physikalische Daten dieser Rezeptorproteine ermittelt und deren Verhalten auf äußere Einflüsse wie Hitze und pH-Änderung bestimmt. Weiterhin wurde ihre Bindungskapazität für verschiedene biologisch wirksame Substanzen untersucht.

Material und Methoden

Über die Messung der Radioaktivität, die Proteinbestimmung, die Lösung der verwendeten Hormone und die quantitative Wiedergewinnung der Hormone aus ihrer Bindung wurde bereits berichtet². Die Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes und der Affinitätskonstante sind ebenfalls bereits beschrieben³. Alle Aufarbeitungen und Bestimmungen wurden bei $+4^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Abkürzungen: JH, Juvenilhormon.

Sonderdruckanforderungen an Arbeitsgruppe Lipidhormone, Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, D-1000 Berlin 33, Arnimallee 22.

JH-wirksame Verbindungen

Als Analoga des JH wurden verwendet: 1. 10.11-epoxy-6.7-*trans*-2.3-*trans*-farnesyl[2.3 ^3H]propenyläther (I); 2. 6.7-*trans*-2.3-*trans*-farnesyl[2.3 ^3H]propenyläther (II); 3. 10.11-epoxyfarnesensäureäthylester (III). Die spezifische Aktivität der ^3H -markierten Verbindungen betrug 28 Ci/mmol. Ihre Synthese wurde bereits veröffentlicht⁴.

Haltung der Versuchstiere

Die Larven von *Tenebrio molitor* L. wurden in Massenzuchten bei Raumtemperatur und ca. 60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Puppen wurden täglich abgesucht und nach dem Geschlecht differenziert. 5 Tage nach dem Schlüpfen der Käfer wurden die weiblichen Käfer auf der Flügeldecke mit Lacktupfern markiert und wieder zu den männlichen Käfern gesetzt.

Isolierung der Rezeptoren

15–20 weibliche Tiere wurden durch Eintauchen in kalten isotonen Tris-Puffer (0,15 M KCl, 50 mM Tris, pH 7,4) immobilisiert. Nach Entfernen der Flügeldecke und Öffnen des Körpers konnten die Ovarien *in toto* entnommen werden. Sie wurden sorgfältig lymphfrei gespült und gesammelt. Durch Zerstören der Ovarhaut konnten nach Bedarf auch einzelne Eier erhalten werden. Die Ovarien wurden mit einer definierten Menge Puffer (0,4 M KCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH

* Prof. Dr. Peter Schmialek verstarb am 16. September 1974 in München.

7,4) versetzt und in einem eingeschliffenen Potter bei 1200 U/min gepottet. Hitzedenaturierung durch Kochen entfernte den größten Teil der Begleitproteine, verringerte jedoch nicht die Bindungskapazität für die Hormone. Das Homogenat wurde 20 min bei $30\,000 \times g$ zentrifugiert und der klare Überstand wurde abgenommen. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Hormon (20 min) wurde die Lösung auf eine Sepharosesäule (6B bzw. 2B) gegeben und die hormonbindenden Makromoleküle durch die Radioaktivität in den Fraktionen nachgewiesen und isoliert.

Enzyme

Die Enzyme wurden nach der Zentrifugation bei $30\,000 \times g$ und vor der Inkubation mit dem jeweiligen Hormon zugegeben. Für die verschiedenen Ansätze von je 0,5 ml wurden eingesetzt:

5 mg Trypsin (EC 3.4.4.4), 200 μ g Proteinase K (EC -), 200 μ g Phospholipase C (EC 3.1.4.3), 200 μ g RNase (EC 2.7.7.16), 200 μ g DNase (EC 3.1.4.5).

Beim Einsatz von DNase wurde das Triton X-100 im Homogenatpuffer weggelassen, da die DNase in 1% Triton nicht wirkt, wie ein Vorversuch zeigte. Inkubationszeit waren jeweils 20 min, Inkubationstemperatur war 22 °C.

Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Für die Ermittlung des isoelektrischen Punktes nach O. Vesterberg⁵ wurden die entsprechenden Fraktionen der Vortrennung auf Sepharose 6B in den Saccharosegradienten eingemischt. Die abgegebene Leistung wurde konstant auf 3 W gehalten. Die Focussierung wurde abgebrochen, wenn die Stromstärke auf 3 mA abgesunken war (ca. 72 h). Als Carrierampholyt wurde Ampholine in den pH-Bereichen 3–10 bzw. 2,5–4 benutzt.

Standardisierung der Versuche

Um eine quantitative Aussage zu ermöglichen, wurden bei allen Versuchen die Parameter konstant gehalten. Es wurden pro Ansatz jeweils 15 Ovarien eingesetzt, mit der gleichen Hormonmenge (10^{-11} mol) im gleichen Volumen (0,5 ml) die gleiche Zeit (20 min) inkubiert. Die Säulen hatten immer dasselbe Füllvolumen und die Fraktionsgröße wurde auf 1 ml eingestellt. Außerdem wurde in einem Aliquot des Ansatzes die vorhandene Proteinmenge bestimmt und bei einer eventuellen Differenz wurden die Aktivitäten auf jeweils die gleiche Standardproteinmenge umgerechnet. Diese Standardisierung der Proteinmenge wurde bei der Entfernung der Begleitproteine durch Hitzedenaturierung nicht angewendet.

Ergebnisse und Diskussion

Das Molekulargewicht der hormonbindenden Substanzen wurde auf Sepharose 6B und 2B bestimmt (Abb. 1, 2). Als Analoga des JH wurden I und II verwendet. Beide Hormone unterschieden

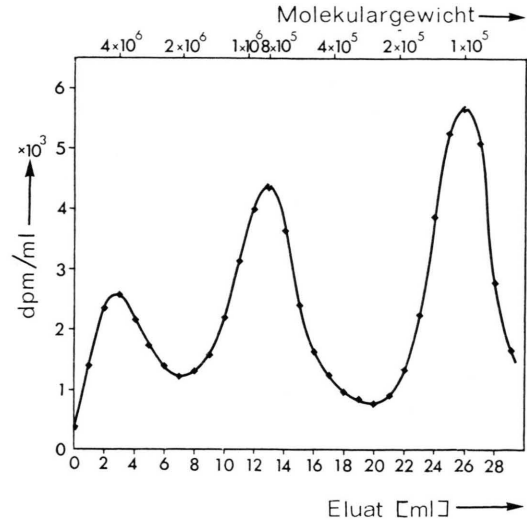


Abb. 1. Elutionsdiagramm einer Sepharosesäule zur Ermittlung des Molekulargewichtes der Rezeptoren. Bei den Trenngrenzen der Sepharose 6B von 10^5 – 4×10^6 ergibt sich nach logarithmischer Einteilung der Abszisse für den Frontpeak ein Molekulargewicht von $> 4 \times 10^6$ und für den anderen Peak ein Molekulargewicht von 8×10^5 .

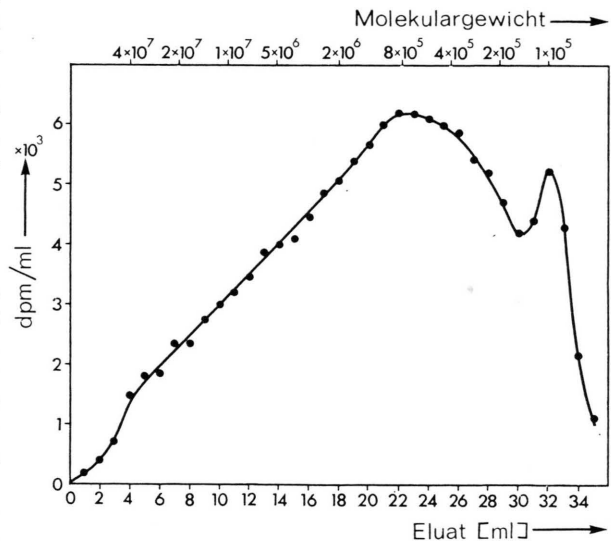


Abb. 2. Elutionsdiagramm einer Sepharosesäule zur Ermittlung des Molekulargewichtes der Rezeptoren. Bei den Trenngrenzen der Sepharose 2B von 10^5 – 4×10^7 ergibt sich ein Molekulargewicht von $8,2 \times 10^5$. Außerdem liegen im Bereich von 1×10^6 – 4×10^7 bindende Kapazitäten vor.

sich nur in der Höhe der Peaks voneinander, die Bindungen traten im gleichen Molekulargewichtsbereich auf. Der Peak bei 8×10^5 ist eindeutig. Der Frontpeak bei der Sepharose 6B-Säule läßt sich keinem definierten Molekulargewicht zuordnen, wie Abb. 2 zeigt. Die Bindung steigt stetig von 4×10^7 bis 1×10^6 an.

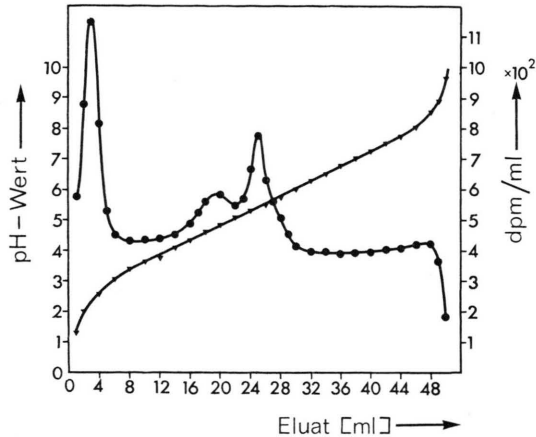


Abb. 3. Verteilung der Radioaktivität (●) und des pH-Werts (▼) in den Fraktionen nach 72-stündiger Fokussierung in einem Saccharosegradienten. Eingesetzt wurde der Gesamtansatz. Bei Verwendung von Ampholine 3–10 zeigten sich Peaks bei pH 5,4, pH 4,7 und pH <3.

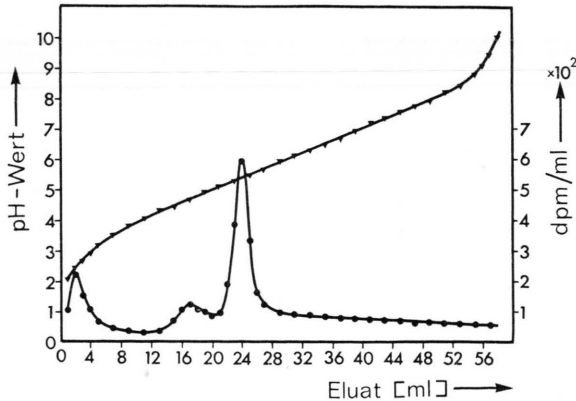


Abb. 4. Verteilung der Radioaktivität (●) und des pH-Werts (▼) in den Fraktionen nach 72-stündiger Fokussierung in einem Saccharosegradienten. Eingesetzt wurde der auf Sepharose 6B isolierte Peak bei $MG\ 8 \times 10^5$. Bei Verwendung von Ampholine 3–10 zeigte sich ein vergrößerter Peak bei pH 5,4.

Bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde das Homogenat mit II inkubiert und an Sepharose 6B vorgetrennt (Abbn. 4, 5). Es zeigte sich, daß zu dem Molekulargewicht von 8×10^5 der isoelektrische Punkt von 5,4 gehörte, während der Frontpeak einem stark sauren pH-Bereich zuzu-

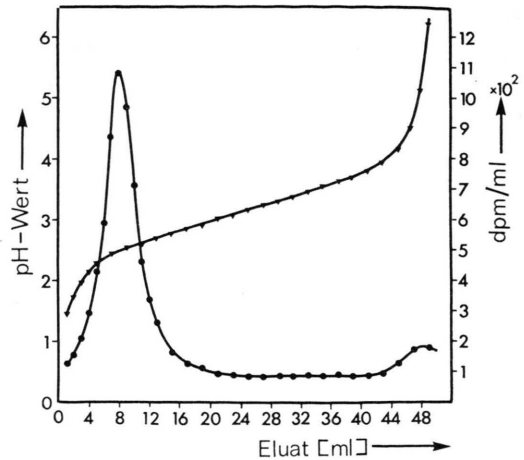


Abb. 5. Verteilung der Radioaktivität (●) und des pH-Werts (▼) in den Fraktionen nach 72-stündiger Fokussierung in einem Saccharosegradienten. Eingesetzt wurde der auf Sepharose 6B isolierte Frontpeak. Bei Verwendung von Ampholine 2,5–4 zeigt sich der Hauptpeak bei pH 2,5 und ein kleiner Peak bei pH >4.

ordnen war (Abbn. 3, 4). Eine Fokussierung des Frontpeaks im pH-Bereich 2,5–4 ergab den isoelektrischen Punkt von 2,5 (Abb. 5). Ein geringes Auftreten auch des jeweiligen anderen Peaks ist durch die nicht vollständige Trennung der beiden Molekulargewichtsbereiche an der Sepharose zu erklären. Im pH-Bereich um 4,7 fielen in dem Gradienten Proteine aus. Den in diesem Bereich auftretenden kleinen Peak interpretieren wir als in diesem ausgefallenen Protein eingeschlossenes Hormon.

Eine Bestimmung der Affinitätskonstante nach Scatchard⁶ war nicht möglich, da mit steigender Inkubationskonzentration eine prozentuale Zunahme des gebundenen Hormons zum freien Hormon zu beobachten war. Um zu entscheiden, ob eine spezifische oder unspezifische Bindung vorliegt, wollten wir das markierte Hormon durch einen großen Überschuß von Substanzen gleicher Polarität aus seiner Bindung verdrängen. Eine Verdrängung des markierten Hormons durch eine biologisch nicht aktive Substanz würde auf eine unspezifische Bindung hindeuten. Beim Einsatz von 10^{-8} mol Geranyl-methyläther⁷ war keinerlei Veränderung gegenüber der Nullprobe zu beobachten, es liegt also keine unspezifische Bindung vor. Eine biologisch aktive Substanz würde das Hormon aus einer spezifischen Bindung herausdrängen. Bei Vorinkubation mit 10^{-8} mol III⁸ war jedoch eine Vergrößerung beider Peaks gegenüber der Nullprobe zu sehen (Abb. 6). Das bedeutet, daß bei gleicher Rezeptor-

menge die Bindungskapazität für das markierte II vergrößert wurde.

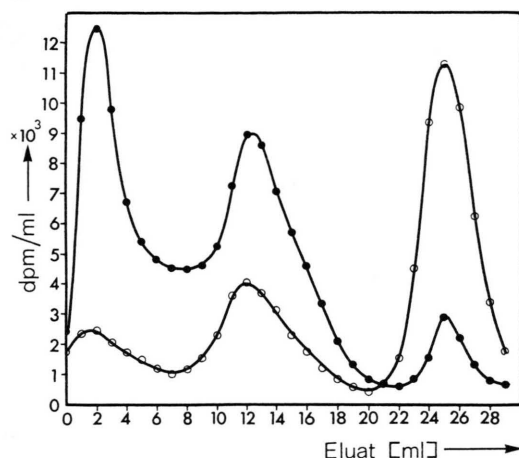


Abb. 6. Vergleich eines normalen Ansatzes mit 10^{-11} mol II (O) und einer Vorinkubation mit 10^{-8} mol III (●) auf Sepharose 6B. Bei unveränderter Lage der Peaks bewirkt die Vorinkubation eine beträchtliche Vergrößerung der Bindungskapazität.

Durch das Auftreten eines allosterischen Effektes läßt sich dieser Befund genauso wie das unerwartete Ergebnis bei der Bestimmung der Affinitätskonstante erklären.

Ein Abbau der Rezeptoren durch Enzyme war nicht zu erreichen, weder RNase, DNase, Protease K, Trypsin noch Phospholipase C hatten irgendeine Wirkung auf die Qualität oder die Quantität der Peaks. Eine Denaturierung der Proteine durch Kochen fällt zwar 91,3% der Proteine aus, im Überstand verblieb jedoch die gesamte Bindungskapazität. Eine Behandlung dieses Überstandes mit den Enzymen zeigte ebenfalls keinen Abbau.

Nach einer Fällung des Proteins mit Trichloroessigsäure war im Überstand keine Bindungskapazität mehr vorhanden. Das gleiche Ergebnis erhielten wir nach vollständiger Hydrolyse mit 1 N HCl (2 h, 100°C). Eine kurzzeitige Hydrolyse über 15 min bei 100°C zeigte neben dem ursprünglich vorhandenen Frontpeak und dem Peak bei 8×10^5 das Auftreten von neuen, JH-bindenden Fraktionen bei den Molekulargewichten von $1,6 \times 10^6$ und $4,2 \times 10^5$ (Abb. 7). Diese Molekulargrößen stehen in ganzzahligen Verhältnissen zu dem Peak beim

Molekulargewicht 8×10^5 . Dieses Ergebnis deutet auf bindungsfähige Untereinheiten des Rezeptors hin; der Peak mit dem Molekulargewicht 8×10^5 stellt eine stabile Untereinheit dar. Der Zusatz von 6 M Harnstoff zum Homogenatpuffer zeigte jedoch keine Aufspaltung in Untereinheiten.

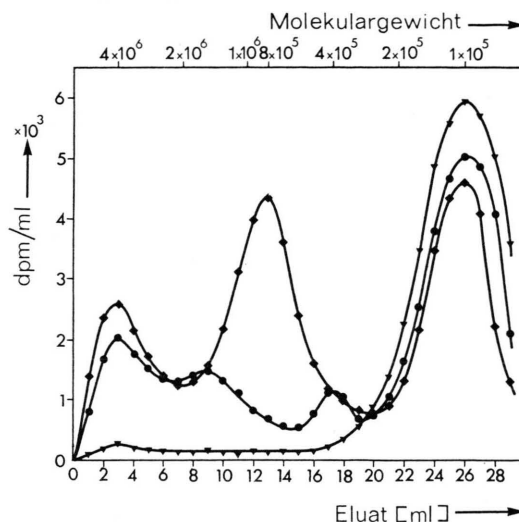


Abb. 7. Abbau der Rezeptoren durch Hydrolyse mit 1 N HCl in der Siedehitze. Die Bindungen in der Nullprobe (◆) werden durch kurzzeitige Hydrolyse (15 min, ●) über bindende Zwischenprodukte bei MG $1,6 \times 10^6$ und $4,2 \times 10^5$ nach vollständiger Hydrolyse (2 Stunden, ▼) bis auf geringe Reste abgebaut.

Eine Aufarbeitung von isolierten Eiern brachte keinerlei Veränderung in der Lage und Größe der Peaks gegenüber den gesamten Ovarien. Die Untersuchung von 2 Tage alten, befruchteten und abgelegten Eiern zeigte keine Unterschiede gegenüber unbefruchteten Eiern.

Bei Weglassen des Triton X-100 im Homogenatpuffer zeigten sich nur sehr kleine Peaks an der üblichen Stelle. Triton X-100 ist also für eine möglichst vollständige Extraktion der Rezeptoren unbedingt notwendig.

Für die finanzielle Hilfe danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Forschung und Technologie.

Herrn Professor Dr. Friedrich Körber danken wir für die Unterstützung bei der Abfassung des Manuskripts herzlich.

¹ V. B. Wigglesworth, Quart. J. Microsc. Sci. **79**, 91 [1936].

² P. Schmialek, M. Borowski, A. Geyer, V. Miosga, M. Nündel, E. Rosenberg u. B. Zapf, Z. Naturforsch. **28c**, 173 [1973].

³ P. Schmialek, M. Borowski, A. Geyer, V. Miosga, M. Nündel, E. Rosenberg u. B. Zapf, Z. Naturforsch. **28c**, 453 [1973].

⁴ P. Schmialek, A. Geyer, V. Miosga, M. Nündel u. B. Zapf, J. Insect Biochem., im Druck.

⁵ O. Vesterberg, Acta Chem. Scand. **27**, 2415 [1973].

⁶ G. Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, 660 [1949].

⁷ P. Schmialek, Z. Naturforsch. **18b**, 516 [1963].

⁸ V. B. Wigglesworth, J. Insect Physiol. **15**, 73 [1969].