- ³⁷ K. BAHADUR, Nature [London] **173**, 1141 [1954]; T. E. PAVLOVSKAYA and PASSYNSKI, in: The Origin of Life on the Earth, eds. F. CLARK and R. L. M. SYNGE, Pergamon Press, London 1959.
- ³⁸ S. W. FOX and C. R. WINDSOR, Science [Washington] **170**, 984 [1970].

- ³⁹ L. G. SILLEN, Science [Washington] **156**, 1189 [1967].
- ⁴⁰ P. DECKER, in: Progress in Photosynthesis Research, ed. H. METZNER, Vol. I, p. 458, Tübingen 1969.
- ⁴¹ S. L. MILLER and H. C. UREY, Science [Washington] **130**, 245 [1959].

In Vitro Studium der Trägerproteine von ^3H -markierten juvenilhormonwirksamen Verbindungen in der Hämolymphe von *Tenebrio molitor* L. Larven

In Vitro Study of the Carrier Proteins of ^3H -labelled Juvenile Hormone Active Compounds in the Haemolymph of *Tenebrio molitor* L. Larvae

K. HEINZ TRAUTMANN

Physiologisch-chemisches Institut der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **27 b**, 263—273 [1972]; eingegangen am 15. Juni 1970, zurückgestellt bis 2. Januar 1972)

The labelling of Methyl 7,11-dichloro-3,7,11-trimethyl-2-dodecenoate and Methyl 10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2-*cis/trans*-dodecenoate with tritium by methylation of the acids with diazomethane in the presence of carrier-free tritium water and the hydrogenation of 10,11-Epoxy-6,7-*cis-2,3-trans*-*cis*-farnesyl propynyl ether with tritium gas gave high spec. radioactivities (3.7; 0.49 and 25 Ci/mMol).

The strong binding of these hormones to the haemolymph proteins of white newly moulted and of colored larvae was demonstrated by gel filtration with sephadex G-25.

The disc-electrophoretic identification of the carrier proteins in the haemolymph of colored larvae showed that the hormones are approximately total bound by the hormone binding factor of a lipoprotein band.

In the haemolymph of white newly moulted larvae there is a second hormone binding band beside the lipoprotein band with similar binding capacity.

Seit 1961 ist die Juvenilhormonaktivität von Farnesolderivaten bekannt¹. Von Farnesol ausgehend synthetisierten LAW und Mitarb.² den 6.10-Dihydro-7.11-dichlorfarnesensäure-Methylester und BOWERS, THOMPSEN und UEBEL³ die analogen 6.7- und 10.11-Epoxyester bzw. den 10.11-Epoxyfarnesylmethyläther. Überraschenderweise erwiesen sich die beiden natürlichen Hormone, die aus Wildseidenspinner von der Arbeitsgruppe RÖLLER⁴ und von MEYER und SCHNEIDERMAN⁵ isoliert und identifiziert wurden, dem 10.11-Epoxyfarnesensäure-Methylester von BOWERS sehr ähnlich.

Die lipophilen Eigenschaften dieser Isoprenoid-derivate lassen vermuten, daß diese in der Hämolymphe durch Assoziation mit Protein- oder Lipoproteinbestandteilen transportiert werden. Kürzlich berichtete CHINO⁶ von einem Lipoprotein, das als Diglycerid-Carrier in der Lymphe fungiert und eventuell auch für den Transport lipophiler Hormone in Frage kommt.

Im folgenden wird die Synthese von [^3H O-Me-

thyl]-6.10-Dihydro-7.11-dichlor-2.3-*cis/trans*-farnesensäuremethylester (1), [^3H O-Methyl]-10.11-Epoxy-6.7-dihydrofarnesensäure-Methylester (2) durch Methylierung der Säuren mit Diazomethan in Gegenwart eines Überschusses von trägerfreiem Tritiumwasser und die Tritierung von 10.11-Epoxy-6.7-*cis-2.3-trans*-farnesylpropynyläther mit Tritiumgas, LINDLAR-Katalysator⁷ und Chinolin zum [2.3- ^3H -Propenyl]-10.11-Epoxyfarnesylpropenyläther beschrieben. Für die in-vitro Hormon-Protein-Bindungsversuche wurde gesammelte Hämolymphe von frisch gehäuteten und voll pigmentierten *Tenebrio molitor*-Larven verwendet, die sich im „jungen und vorletzten Stadium“⁸ befanden. Gel filtration mittels Sephadex G-25 eignete sich zum qualitativen Nachweis der Protein-hormonkomplexe und für Bindungsaffinitäts-Untersuchungen. Die Ermittlung der Trägerproteine geschah durch Disc-Elektrophorese. Ferner wurde der Einfluß des Emulgators Tween-85 auf die Bindung untersucht.

Material und Methoden

Für die nachfolgenden Tritiummarkierungsversuche durch Austausch in Tritiumwasser wurden zur Erzielung

Sonderdruckanforderungen an K. HEINZ TRAUTMANN, Physiologisch-chemisches Institut der Freien Universität Berlin, D-1000 Berlin.

möglichst hoher spez. Aktivitäten alle dafür verwendeten Glasgeräte, Lösungsmittel und Lösungen sorgfältig getrocknet. Der verwendete Diäthyläther wurde vorher durch Säulenchromatographie an Al_2O_3 (Woelm, bas. Akt. Stufe I) von Peroxid befreit. Die Registrierung der ^3H -Aktivität auf DC-Platten erfolgte mit einem „Dünnschichtscanner“ LB 2721 nach Berthold. Die Messung der ^3H -Aktivitäten von Lösungen geschah mit dem Packard-Flüssig-Scintillations-Spektrometer 314.

[^3H O-Methyl]-6.10-Dihydro-7.11-dichlor-2.3-cis/trans-farnesensäuremethylester

Zur Herstellung der Säure wurden 57,0 mg Dihydrodichlorfarnesensäure-Äthylester in 6,0 ml 0,5 N NaOH (Äthanol : H_2O = 10 : 1) gelöst und 7 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Der Ansatz wurde dann mit 3,2 ml 1 N H_2SO_4 angesäuert und sofort mit 3-mal 20 ml Petroläther (Sdp. 50–70 °C) ausgeschüttelt. Nach dem Neutralwaschen mit NaHCO_3 -Lösung und dest. H_2O wurde die Ätherlösung mit Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeeengt. Die Reinigung der Säure geschah durch DC-Chromatographie auf einer Kieselgel-H-Platte mit dem System Petroläther (Sdp. 50–70 °C) : Essigester = 9 : 1 (V/V). Die Elution der entsprechenden Bande erfolgte mit 70,0 ml über Na-getrocknetem Äther unter Feuchtigkeitsausschluß. Trägerfreies T_2O -Wasser wurde durch Tritierung einer Suspension aus 13,6 mg PtO_2 -Katalysator (vorher über P_2O_5 im Exsicc. aufbewahrt) und 1,0 ml Cyclohexan (über Na getrocknet) mit T_2 -Gas von 2 Ci und 24-stdg. Rühren hergestellt. Nachdem das nicht verbrauchte Tritiumgas abgepumpt worden war, erfolgte die Zugabe von ca. 6 mg Säure gelöst in 0,5 ml abs. Äther und weiteres Rühren für 5 Stunden. Der Ansatz wurde durch Watte filtriert und mit insgesamt 1,0 ml abs. Äther nachgewaschen. Darauf wurde 1,0 ml ätherische Diazomethanol-Lösung hinzugefügt, die nach der üblichen Methode aus *N*-Nitrosomethylharnstoff hergestellt und mit festem KOH getrocknet wurde. Nach 3 Stdn. war die Reaktion beendet. Der Tritiumwasserüberschuß wurde mit einem Tropfen H_2O verdünnt und von 2 Spatelspitzen Na_2SO_4 sicc. gebunden. Nach Filtration wurde mit 20 ml Cyclohexan verdünnt, 2-mal mit 10 ml H_2O die organische Phase vom restlichen T_2O -Wasser extrahiert, dann mit Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeeengt. Nach Rechromatographie auf Kieselgel-H-Platten mit dem System Petroläther (Sdp. 50–70 °C) : Essigester = 9 : 1 (V/V) wurde das Lösungsmittel von der DC-Platte im N_2 -Strom abgedampft. Die Bande des ^3H -Dichlordihydrofarnesensäuremethylesters wurde durch die mit Fluorescein- Br_2 angefärbte Referenzsubstanz festgelegt. Die Elution erfolgte mit 80 ml Cyclohexan (Uvasol-Merck), sodann wurde die Lösung ad 100 ml aufgefüllt.

Für die Bestimmung der spez. Radioaktivität wurde die Elutionslösung 1 : 5 verdünnt. Aus der bei 220 m μ (ϵ = $1,48 \cdot 10^4$) registrierten Extinktion und der gemessenen Radioaktivität von 50,6 μl in 5,0 ml Toluol-Popop ergab sich eine spez. Aktivität von 0,49 Ci/mMol.

Für die Hormon-Protein-Bindungsversuche wurde eine äthanolische Lösung hergestellt, die $6,53 \cdot 10^4$ Zpm/ μl enthielt. Die radiochemische Reinheit wurde mit dem Laufmittel Petroläther (Sdp. 50–70 °C) : Essigester = 4 : 1 getestet. Abb. 1 zeigt das Radiodünnschichtchromatogramm der drei Monate alten Lösung.

Abb. 1. Radiodünnschichtchromatogramm des ^3H -7.11-Dichlor-6.10-dihydro-2.3-cis/trans-farnesensäuremethylesters 3 Monate nach der dünnschichtchromatographischen Reinigung des Syntheserohproduktes.

[^3H O-Methyl]-10.11-Epoxy-6.7-dihydro-2.3-cis/trans-farnesensäuremethylester

Die Säure wurde durch Verseifen von 62,4 mg des Epoxyfarnesensäureäthylesters nach der gleichen Prozedur wie für den Dihydrodichlorfarnesensäure-Äthylester hergestellt.

Für den Austausch in trägerfreiem T-Wasser wurden 13,6 mg PtO_2 -Katalysator mit 2 Ci T_2 -Gas in 1,0 ml Dioxan (über Na getrocknet) umgesetzt. Nach 10-stdg. Rühren wurde das nicht verbrauchte T_2 -Gas abgepumpt und ca. 4 mg Säure in 0,5 ml abs. Dioxan gelöst hinzugefügt und 3 Stdn. gerührt. Im Vergleich zur vorangegangenen Markierung wurde diesmal nicht vom Katalysator abfiltriert, sondern die Umsetzung zum Methylester geschah im gleichen Reaktionskölbchen durch Zugabe von 0,5 ml ätherischer Diazomethanol-Lösung, hergestellt nach der üblichen Methode aus *N*-Nitrosomethylharnstoff. Nach 3 Stdn. wurde ein Tropfen H_2O und zwei Spatelspitzen Na_2SO_4 -sicc. zur Bindung des Überschusses von T_2O -Wasser dazugegeben, einige Min. weitergerührt, filtriert und mit 20 ml Cyclohexan verdünnt. Es folgte die Extraktion des restlichen T_2O -Wassers mit zweimal 10 ml H_2O , Trocknen der organischen Phase mit Na_2SO_4 -sicc. und Einengen im Vakuum auf ein kleines Volumen. Zur Beseitigung von labil gebundenem Tritium wurden 20 ml Methanol dazugegeben und im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde durch Rechromatographie auf Kieselgel-H-Platten mit dem System Petroläther (Sdp. 50–70 °C) : Essigester = 4 : 1 (V/V) gereinigt. Die aufgrund der mit Fluorescein- Br_2 angefärbte Referenzsubstanz entsprechende Bande wurde nach Abdampfen der Lösungsmittel von der DC-Platte im N_2 -Strom mit 80 ml Cyclohexan (Uvasol-Merck) eluiert und ad 100 ml aufgefüllt.

Zur Berechnung der spez. Aktivität wurde die bei $220\text{ m}\mu$ ($\epsilon = 1,42 \cdot 10^4$) registrierten Extinktion und die Radioaktivität von $50,6\text{ }\mu\text{l}$ in $5,0\text{ ml}$ Toluol-Popop gemessen. Spez. Aktivität: $3,7\text{ Ci/mMol}$.

Für die Hormon-Protein-Bindungsversuche wurde eine äthanolische Lösung hergestellt, die $2,59 \cdot 10^4\text{ Zpm/1 }\mu\text{l}$ enthielt. Zur Überprüfung der radiochemischen Reinheit wurde die DC-Chromatographie auf Kieselgel-H-Platten und das Laufmittelsystem Petroläther (Sdp. $50-70^\circ\text{C}$): Essigester = $4:1$ (V/V) gewählt. Das Radiochromatogramm der Lösung weist nach 3 Monaten keine Radiolyseprodukte auf (Abb. 2).

Abb. 2. Radiodünnschichtchromatogramm der 3 Monate alten Lösung des dünnstschichtchromatographisch gereinigten Syntheserohproduktes von ^3H -10,11-Epoxy-6,7-dihydro-2,3 *cis*/*trans*-farnesensäuremethylesters.

[2,3- ^3H -Propenyl]-10,11-Epoxy-6,7-*cis*-2,3-*trans*/*cis*-farnesylpropenyläther

$12,5\text{ mg}$ Epoxyfarnesylpropenyläther und 4 mg Chinolin, gelöst in $1,5\text{ ml}$ Petroläther (Sdp. $50-70^\circ\text{C}$) wurden nach Zusatz von 17 mg Lindlar-Katalysator in einem ca. $2,5\text{ ml}$ fassenden Reaktionskölbchen bei vermindertem Druck einer 4 Ci Tritiumatmosphäre ausgesetzt. Anfangs wollte die Tritierung nicht in Gang kommen. Erst als das Reaktionsgefäß kurzzeitig mit flüssigem N_2 abgekühlt wurde, sank der Druck. Nach 4 Stdn. blieb der Druck konstant und das nicht verbrauchte Tritiumgas wurde abgepumpt. Der Katalysator wurde nun durch Watte abfiltriert, das Filtrat mit ca. 30 ml Petroläther (Sdp. $50-70^\circ\text{C}$) verdünnt und zur Entfernung des Chinolins zweimal mit je 10 ml $0,5\text{ N}$ H_2SO_4 ausgeschüttelt. Nach dem Neutralwaschen mit 3-mal 30 ml H_2O , Trocknen mit $\text{Na}_2\text{SO}_4\text{-sicc.}$, wurde im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeeengt. Das labil gebundene Tritium ließ sich durch Zugabe von zweimal 30 ml Methanol und Destillation im Vakuum entfernen.

Die Reinigung durch Rechromatographie auf Kieselgel-H-Platten mit Cyclohexan: Äthanol = $4:1$ (V/V) und Elution mit Methanol ergab kein radiochemisch reines Produkt.

Die DC-Chromatographie mit Kieselgel H, imprägniert mit 5% AgNO_3 und entwickelt mit dem Laufmittel Cyclohexan: Essigester = $1:1$ (V/V) erwies sich als sehr effektiv und trennt sogar das 2,3-*cis*- und *trans*-

Abb. 3. Radiochromatogramm des ^3H -10,11-Epoxy-6,7-*cis*-2,3-*cis*/*trans*-farnesylpropenyläther-Rohproduktes. DC-Chromatographiesystem: Kieselgel-H- 5% AgNO_3 ; Cyclohexan: Essigester = $1:1$ (V/V).

Isomere. Der Propinäther verbleibt am Start (Abb. 3). Aufgrund des Radiochromatogramms besteht der markierte Propenyläther aus 33% 2,3-*cis*- und 67% 2,3-*trans*-Komponente.

Für die Bestimmung der spez. Aktivität wurde die Hälfte des Rechromatographieeluates auf ein kleines Volumen eingeeengt und mit obigem System chromatographiert. Das Anfärben der Referenzsubstanz erfolgte durch Besprühen mit einer gesättigten Lösung von SbCl_5 in CHCl_3 . Die der Referenzsubstanz entsprechende Bande wurde in ein Eluierröhr (Φ $1,5\text{ cm}$, Länge 25 cm) auf eine 5 cm hohe NaCl (p.a.)-Schicht geschüttet und mit 20 ml CH_3OH (Uvasol) eluiert. Hinsichtlich der UV-Spektroskopie folgte nun die notwendige Abtrennung vom gelösten NaCl bzw. NaNO_3 mit einer Kieselgel-H-Platte und dem Laufmittel Cyclohexan (Uvasol): Äthanol = $4:1$ (V/V). Das für die Beschichtung der Platte verwendete Kieselgel war von den im UV absorbierenden Verunreinigungen durch erschöpfende Elution mit CH_3OH (Uvasol) gereinigt worden. Nach Abdampfen der Lösungsmittel im N_2 -Strom wurde mit 20 ml CH_3OH eluiert und ad 100 ml aufgefüllt.

Das Absorptionsspektrum wurde bei $200-240\text{ m}\mu$ mit dem automatisch registrierenden Zeiss-Spektrophotometer gemessen. Aus der Extinktion bei $208\text{ m}\mu$ ($\epsilon = 8,41 \cdot 10^3$) ergab sich eine Konzentration von ca. $1,2\text{ mg/100 ml}$ Lösung. Nach Flüssig-Szintillation-Zählung mit Dioxan-Popop wurde eine Aktivität von 106 mCi/100 ml Lösung ermittelt entsprechend einer spez. Aktivität von ca. 25 Ci/mMol .

Für die nachfolgenden Hormon-Protein-Bindungsversuche wurde ca. 1 mCi mit dem DC-System Kieselgel-H 5% AgNO_3 in die 2,3-*cis*- und 2,3-*trans*-Ätherisomere aufgetrennt. Die methanolische *trans*-Ätherlösung enthielt $5,0 \cdot 10^4\text{ Zpm/1 }\mu\text{l}$, die *cis*-Ätherlösung $1,76 \cdot 10^4\text{ Zpm/1 }\mu\text{l}$.

9,10- ^3H -Palmitinsäuremethylester

$200\text{ }\mu\text{Ci}$ ^3H -Palmitinsäure (Hersteller New England Nuclear Corp.) gelöst in $200\text{ }\mu\text{l}$ Benzol mit einer spez. Aktivität von 256 mCi/mMol wurden nach der üblichen

Methode mit Diazomethan verestert. Die Reinigung geschah durch DC-Chromatographie auf Kieselgel-G mit dem Laufmittel *n*-Hexan : Diäthyläther : Essigsäure = 70 : 30 : 1 (V/V/V). Die Referenzsubstanz wurde durch Besprühen mit einer 0,05-proz. äthanolischen Rhodamin-B-Lösung sichtbar gemacht. Die Elution erfolgte mit 10 ml Benzol. Die Radioaktivität des Eluats betrug $3,72 \cdot 10^5$ Zpm/1 μ l. Aufgrund des Radiochromatogramms weist diese Lösung nach 4 Monaten keine Zersetzungsprodukte auf.

Gewinnung der Hämolymphe: Die aus einer Zucht erhaltenen *Tenebrio molitor* L.-Larven (Firma Claus, Limburgerhof) wurden auf Kleie bei 24–26 °C und 60–70% rel. Luftfeuchte gezogen. Gelegentlich wurden auch einige Mohrrübenscheiben verfüttert.

Den frisch gehäuteten Larven (0–3 Stdn. alt) und voll pigmentierte Larven, die sich im „jungen und vorletzten Stadium“⁸ befanden, wurde mittels einer Pinzette ein Bein abgezupft und die hervorquellende Hämolymphe mit Hilfe einer Kapillare abgenommen und sofort in ein kleines eisgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt. Pro Tier wurden 3–5 μ l an Hämolymphe gewonnen. Bei nicht sofortigem Gebrauch wurde diese bei –20 °C aufbewahrt. Der Proteingehalt wurde nach der Biuret-Methode unter Verwendung von Rinderserumalbumin (Behringwerke) als Standard bestimmt.

Gelfiltration: Für alle Experimente wurde Sephadex-G25-coarse (Pharmacia, Uppsala) verwendet. Das Vorquellen geschah mit H₂O über Nacht oder für 2 Stdn. im siedenden Wasserbad. Danach wurde das Sephadex 4–5-mal mit Ringerlösung (5,55 g NaCl; 0,22 g KCl und 0,584 g CaCl₂ · 2 H₂O ad 1 l Lösung; pH=6,4) durch Dekantieren gewaschen und dabei von den feinen Körnchen getrennt. Zum Nachweis der Protein-hormonkomplexe diente eine 1,2 · 44 cm Säule (L-Säule) mit der Gelbetheöhe von 38,5 cm.

Je 10–50 μ l Lösung der markierten Verbindungen wurden mit 2,0 μ g inaktiver Substanz, gelöst in 10 μ l verdünnt und im Vakuum ohne zu erwärmen auf ein sehr kleines Volumen (1–3 μ l) eingeeengt. Unter CO₂-Atmosphäre wurden nun 0,4 ml bei 1800 g für 5 Min. zentrifugiert und auf 0 °C abgekühlte Hämolymphe dazugegeben. Das ca. 0,5 ml fassende Schliff Röhrchen wurde unter Luftausschluß verschlossen und bei gelegentlichem sanften Schütteln 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. 350 μ l kamen auf die Säule und wurden mit Ringerlösung eluiert. Die Elution der Proteine und der proteingebundenen Radioaktivität geschah zwischen 13,5 und 21,0 ml Eluatvolumen und war sehr gut reproduzierbar. Aus diesem Grund wurden bei den Filtrationen die ersten 12,0 ml Filtrat verworfen, die nächsten 10,0 ml als Protein- und die nachfolgenden 25,0 ml als Nichtproteinfraktion aufgefangen. Nach Beendigung eines jeden Versuchs wurde mit 150 ml Ringerlösung gespült. Die Filtrationsgeschwindigkeit variierte zwischen 0,9–1,0 ml/Min. Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde 0,1 ml der Proteinfraktion und 0,4 ml der Nichtproteinfraktion mit je 7,0 ml Dioxan-Popop gemischt.

Für die Bindungsaffinitätsversuche wurden je 150 μ l der wie oben bereiteten Hämolymphe gleichzeitig auf die L-Säule und auf eine kurze Säule (K-Säule) mit gleichem Durchmesser aber nur halber Gelbetheöhe gegeben. Eluiert wurde mit Ringerlösung und mit gleicher Elutionsgeschwindigkeit für beide Säulen. Das Proteineluat wurde in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen. Zur Berechnung der gebundenen Aktivität pro mg Protein wurde von jeder Fraktion zur Radioaktivitätsmessung 0,1 ml mit 7,0 ml Dioxan-Popop gemischt und von 0,1 ml der Proteingehalt nach LOWRY et al.⁹ bestimmt.

Disc-Elektrophorese: Es wurde das Trennsystem von WILLIAMS et al.¹⁰ benutzt. Um eine größere Menge von Hämolymphe auftrennen zu können, wurden Glasröhre mit 0,9 cm ϕ und 20 cm Länge gewählt. Zur Erleichterung des Herausstoßens der Gelwurst nach und um Wandeffekte während der Elektrophorese zu vermeiden, waren die Röhre mit 20-proz. Dimethyldichlorsilanlösung in Chloroform hydrophobiert worden. Die Acrylamidkonzentration betrug 5 Prozent. Die Länge des Trenngels betrug 14,0, die des Sammelgels 1,5 cm. Die Sammelgellösung enthielt 20% Saccharose. Das Probegel wurde wie folgt hergestellt: 4–50 μ l Lösung der markierten Verbindungen wurden im Vakuum ohne zu erwärmen auf ca. 1–3 μ l eingeeengt und 400 μ l eiskalter bei 1800 g für 5 Min. zentrifugierte Hämolymphe unter CO₂-Atmosphäre hinzugegeben. Unter Luftausschluß wurde bei Raumtemperatur (24 bis 27 °C) 30 Min. inkubiert und danach mit eiskalter Sammelgellösung 1 : 6 verdünnt. 300 μ l entsprechend 50 μ l Hämolymphe wurden auf das Sammelgel aufgegeben und nach 20–30 Min. Photopolymerisation vorsichtig mit Elektrodenpuffer überschichtet.

Die Elektrophorese lief die erste Stde. bei 3 mAmp. und die weiteren 4–5 Stdn. bei 5 mAmp. pro Gelrohr. Sie war beendet, als die aus der Hämolymphe stammende gelbe Frontbande 0,5–1 cm vor dem Gelende war. Diese Farbkomponente besitzt die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie Bromphenolblau. Alle Elektrophoresen fanden bei 0–2 °C statt. Die Gelwurst wurde aus dem Rohr entfernt, indem ein passender Gummistopfen an der Kathodenseite eingeführt und langsam mit dem Gel zusammen durch einen Messingstab (ϕ 0,6 cm) nach vorn bewegt wurde.

Für die Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung im Gel wurden die ersten 3 cm des ungefärbten Gels vom Kathodenende her mit einer Rasierklinge in 0,25 cm dicke und das restliche Stück in 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten. Jede Gelscheibe wurde in einem Reagensglas mit einem Glasstab an der Wandung fein verrieben und dann mit 1,0 ml einer Mischung aus Dioxan : H₂O = 1 : 1 verrührt. Darauf wurden 7,0 ml Dioxan-Popop hinzugefügt, gut gemischt und für 1–2 Stdn. stehengelassen. Der gesamte Reagensglasinhalt wurde in ein Zählgläschen überführt und darin die Aktivität gemessen.

Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurden einige Gele über Nacht in 1-proz. Amidoschwarzlösung (Methanol : Glycerin : Eisessig = 50 : 50 : 20) angefärbt und durch Waschen mit 7-proz. Essigsäure 2–3

Tage entfärbt. Die Lipoproteine wurden nach der Methode von RESSLER et al.¹¹ sichtbar gemacht. Ein Volumenteil gesättigte Sudanschwarz-B-Lösung in Äthylenglykol wurde mit 2 Volumenteilen zentrifugierter Hämolymphe gemischt und 24 Stdn. bei 0–2 °C aufbewahrt. Zur Herstellung des Probengels wurde dann 1 : 6 mit Sammelgellösung verdünnt und pro Gelrohr 450 μl äquivalent 50 μl Hämolymphe aufgetragen und nach den oben angegebenen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

In-vivo-Einbau von ^3H -Palmitinsäure: Pro voll pigmentierte Tenebrio-Larve wurde 0,5 μl eines ^3H -Palmitat-Albuminkomplexes ($2,2 \cdot 10^5$ Zpm; 0,1 μg) mit einer Hamiltonspritze injiziert und die Hämolymphe nach 3–5 Stdn. abgenommen. Die Albumin-Palmitatkomplexlösung wurde nach MASIRONI¹² hergestellt. Die Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung auf die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine ist bereits oben erwähnt.

Ergebnisse und Diskussion

Tritiummarkierungen

Die Markierung von organischen Säuren durch Veresterung mit Diazomethan nach Austausch mit Tritiumwasser wurde von MELANDER¹³ und VERLY et al.¹⁴ für die Herstellung von markiertem Methanol entwickelt. Die erreichten spez. Aktivitäten waren aber wegen der geringen spez. Aktivität des verwendeten Tritiumwassers sehr klein. Für die nachfolgenden Hormon-Protein-Bindungsversuche war es aber notwendig, die juvenilhormonwirksamen Verbindungen in physiologischer Konzentration quantitativ nachweisen zu können. Um hohe spez. Radioaktivitäten zu erreichen, wurde trägerfreies Tritiumwasser durch Tritierung von PtO_2 -Katalysator mit T_2 -Gas in einem protonenfreien Lösungsmittel (Dioxan, Diäthyläther, Cyclohexan) hergestellt. Die Säuren (7.11-Dichlor-6.10-dihydro-2.3-*cis/trans*- und 10.11-Epoxy-6.7-dihydro-2.3-*cis/trans*-farnesensäure), dargestellt aus den entsprechenden Äthylestern* durch Verseifen mit methanolischer 0,5 N NaOH bei Raumtemperatur, wurden dann dazugegeben und mit einem Überschuß ätherischer Diazomethanolung verestert.

Ob der Unterschied in den spez. Radioaktivitäten des ^3H -Dichlordihydro- (spez. Aktivität = 0,49 Ci/mMol) und des ^3H -Epoxydihydrofarnesensäure-Methylesters (3,7 Ci/mMol) darin begründet liegt, daß die Säure der letzten Verbindung bei Anwesenheit des Katalysators verestert wurde, ist nicht weiter untersucht worden. Das nicht verbrauchte Tritiumwasser (ca. 95% der eingesetzten Radioaktivität)

wurde als Kristallwasser an Na_2SO_4 sicc. gebunden.

Die Tritierung des 10.11-Epoxy-6.7-*cis*-2.3-*cis/trans*-farnesylpropenyläthers mit T_2 -Gas, Lindlar-Katalysator und Chinolin zum 2.3- ^3H -Propenyläther brachte wegen der möglichen Einführung von maximal 2 T-Atomen pro Äthermolekül eine extrem hohe spez. Aktivität von ca. 25 Ci/mMol. Durch DC-Chromatographie auf Kieselgel-H imprägniert mit 5% AgNO_3 war es möglich, das 2.3-*cis*- und das 2.3-*trans*-Isomere zu trennen.

Bei der Verwendung tritierter Verbindungen in biologischen Versuchen ist es wichtig zu wissen, wie leicht die eingeführten Tritiumatome in das Milieu gelangen und eventuell dort zu unspez. Markierungen führen können. Mit dem System $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{OH} = 10 : 1,5$ (V/V) wurde die Austauschbarkeit überprüft. Der Epoxyfarnesylpropenyläther und der Epoxydihydrofarnesensäure-Methylester tauschen in 24 Stdn. weniger als 5% des Tritiums aus. Beim Dichlordihydrofarnesensäure-Methylester waren es ca. 30%. Da für die nachfolgenden in-vitro-Versuche nur eine halbe Stde. inkubiert wurde, konnte deshalb diese Verbindung auch verwendet werden.

Nachweis der Hormon-Proteinbindung durch Gelfiltration

Um das Bindungsvermögen der Hämolympheproteine für die hormonwirksamen Substanzen durch Gelfiltration bestimmen zu können, muß das Sephadex-Gel so beschaffen sein, daß zwar die Hormonmoleküle, nicht aber die Eiweißkörper in das Gelgerüst eindringen können. Diese Voraussetzung wird von Sephadex G-25 erfüllt. Zusammen mit den Eiweißkörpern wandern die an die Proteine gebundenen Hormonmoleküle. Im Gegensatz zu den hochmolekularen Verbindungen vermögen die freien Hormonmoleküle in das Kapillarsystem des Sephadex-Gels einzudringen. Sie besitzen daher eine wesentlich langsamere Wanderungsgeschwindigkeit. Ein Teil des vorausseilenden Protein-Hormonkomplexes muß daher laufend zerfallen, um das Gleichgewicht wiederherzustellen. Erst bei Verwendung großer Volumina an Proteinlösung (15–20 ml) erreicht man, daß sich in der Säule eine Plateauzone mit konstanter Eiweißkonzentration ausbildet, in der ein ungestörtes Gleichgewicht zwischen den Reaktionspartnern besteht. Auf diese Weise haben SCHOLTAN¹⁵ und KRIEGLSTEIN¹⁶ quantitative Bindungsversuche durchgeführt.

Verbindung	Lympe- Bezeich- nung	Konzentration in der Lymphe [$\mu\text{g/ml}$]	Protein- gebundene Radioaktivität [Zpm]	Nichtprotein- gebundene Radioaktivität [Zpm]	Protein- gebundener Anteil [%]
10.11-Epoxy-6.7-dihydro-2.3 <i>cis/trans</i> -farnesensäuremethylester	a	5,1	$1,951 \cdot 10^6$	$1,468 \cdot 10^6$	57
	b	5,1	$1,537 \cdot 10^6$	$1,647 \cdot 10^6$	48
6.10-Dihydro-7.11-dichlor-2.3 <i>cis/trans</i> -farnesensäuremethylester	a	5,9	$9,661 \cdot 10^5$	$1,238 \cdot 10^5$	88
	b	5,9	$1,080 \cdot 10^6$	$3,788 \cdot 10^5$	74
10.11-Epoxy-6.7 <i>cis-2.3 trans</i> -farnesylpropenyläther	a	5,0	$7,980 \cdot 10^5$	$1,161 \cdot 10^5$	87
	b	5,0	$8,284 \cdot 10^5$	$1,671 \cdot 10^5$	83
10.11-Epoxy-6.7 <i>cis-2.3 cis</i> -farnesylpropenyläther	a	5,0	$3,236 \cdot 10^5$	$9,265 \cdot 10^4$	78
	b	5,0	$2,971 \cdot 10^5$	$1,219 \cdot 10^5$	71
Palmitinsäuremethylester	a	0,81	$5,687 \cdot 10^5$	$6,256 \cdot 10^4$	90

Tab. 1. Nachweis der Bindung von juvenilhormonwirksamen Verbindungen und von Palmitinsäuremethylester durch Gelfiltration mit Sephadex G-25 an Proteine der Hämolymphe von a) vollpigmentierten Larven im jungen und vorletzten Stadium (Proteingehalt: 6,27%); b) frisch gehäuteten Larven [0–3 Stdn. alt] im gleichen Stadium (Proteingehalt: 6,49%). Experimentelle Einzelheiten s. „Material und Methoden“. * Die Werte waren reproduzierbar mit einer max. Abweichung von ± 4 Prozent.

Da pro Gelfiltrationsversuche nur 0,35 ml Hämolymphe zur Verfügung stand, so sind die Werte der am Protein gebundenen Anteile für die untersuchten Substanzen nur qualitativ zu bewerten (Tab. 1). Aufgrund gleicher Versuchsparameter (Temperatur, Filtrationsgeschwindigkeit, Gelbetthöhe) lassen sich aber die Werte untereinander vergleichen.

Die verschiedene Radioaktivität in den Fraktionen und die Veränderlichkeit mit dem Eiweißgehalt (Abb. 4) ist ein eindeutiger Beweis dafür, daß die Hämolympheproteine die juvenilhormonwirksamen Substanzen und Palmitinsäuremethylester zu binden vermögen. Der hohe proteingebundene Anteil, der

nach dem Durchgang durch das 38,5 cm hohe Gelbett für alle Substanzen gefunden wurde, besagt, daß eine feste Bindung vorliegt. Als Beispiel für eine schwache Bindung fand DIXON¹⁷, daß der Humanalbumin-Cortisolkomplex bei der Sephadex-Gelfiltration fast vollkommen dissoziiert. Interessant ist die Tatsache, daß der 2.3-*trans*-Epoxyfarnesylpropenyläther stärker gebunden wird als das *cis*-Isomere, da gerade die sterische Konfiguration dieser Doppelbindung für die biologische Aktivität von Bedeutung ist¹⁸. Die wesentlich größere Proteinbindung vom Dichlordihydro- gegenüber dem Epoxydihydrofarnesensäure-Methylester weist auf die starke Affinitätssteigerung durch die beiden Chloratome hin. Bei der Gelfiltration gleicher Hämolymphevolumen desselben Inkubationsansatzes durch eine kurze und eine lange Sephadex-G-25-Säule mit doppelter Gelbetthöhe besitzt der Proteinkomplex der chlorierten Verbindung eine wesentlich geringere Dissoziierbarkeit im Vergleich zum Epoxyester, wenn man die spez. Bindungen (Zpm pro mg Protein) in den Hauptproteinfraktionen der beiden Eluate vergleicht (Tab. 2). Einen weiteren Beweis dafür, daß durch Einführung von Halogenatomen die Bindungsaffinität bei verschiedenen Stoffklassen erhöht wird, liefern die Arbeiten von STERLIN¹⁹ und SCHOLTAN²⁰.

Zur Frage der Art der Hormon-Proteinbindung wurden die Inkubationsansätze bestehend aus Hämolymphe von vollpigmentierten Larven und Hormon eine Sephadex-G-25-Säule zur Abtrennung der freien Hormonmoleküle verwendet. Von einem Aliquot der Proteinfraktion wurde die Radioaktivität mit Diäthyläther extrahiert. Tab. 3 zeigt, daß alle 3 Ver-

Abb. 4. Gelfiltration durch eine Sephadex G-25-Säule von 0,35 ml zentrifugierter Hämolymphe voll pigmentierter *Tenebrio molitor*-Larven, in der $5 \mu\text{g/ml}$ ^3H -10.11-Epoxy-6.7-*cis-2.3-trans*-farnesylpropenyläther gelöst waren. —x—x— Radioakt. pro Frakt. —o—o— Proteingehalt (in Extinkt.) pro Frakt. Experimentelle Einzelheiten s. „Material u. Methoden“.

	Frak- tions- Nr.	Radioaktivität		Protein-Konzentration		Spezifische Bindung	
		[Zpm/ml]		[mg/ml]		[Zpm/mgProtein]	
		a	b	a	b	a	b
Kurze Säule	2	$4,099 \cdot 10^5$	$3,086 \cdot 10^5$	2,97	2,8	$1,38 \cdot 10^5$	$1,10 \cdot 10^5$
Lange Säule	2	$5,905 \cdot 10^4$	$1,399 \cdot 10^5$	0,97	1,48	$6,08 \cdot 10^4$	$9,45 \cdot 10^4$
	3	$1,934 \cdot 10^5$	$1,912 \cdot 10^5$	2,41	1,82	$8,02 \cdot 10^4$	$1,05 \cdot 10^5$

Tab. 2. Nachweis der unterschiedlichen Bindungsaffinität von a) 10.11-Epoxy-6.7-dihydro-2.3-*cis/trans*-farnesensäuremethylester und b) 6.10-Dihydro-7.11-dichlor-*cis/trans*-farnesensäuremethylester an Hämolympheproteine vollpigmentierter *Tenebrio*-larven. Jeweils 150 μl des gleichen Inkubationsansatzes wurden gleichzeitig auf eine kurze und eine lange Sephadex G-25-Säule gegeben und mit gleicher Geschwindigkeit eluiert. Experimentelle Einzelheiten siehe „Material und Methoden“.

bindungen durch dieses organische Lösungsmittel vollständig extrahierbar sind. Die Bindung ist deshalb nicht kovalent in ihrem Charakter. Da ferner die Hormonmoleküle keine Ionen zu bilden vermögen, ist auch eine ionogene Bindung mit den Trägerproteinen der Hämolymphe ausgeschlossen. Die lipophilen Eigenschaften der verwendeten Verbindungen läßt deshalb vermuten, daß die Assoziation durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Hormon und den unpolaren Gruppen der bindenden Proteine zustande kommt. Durch Radiodünnschichtchromatographie auf Kieselgel-H-Platten nach dem Entwickeln mit dem Laufmittelsystem Petroläther (50–70 °C) : Essigester = 9 : 1 (V/V) wurde nachgewiesen, daß keine Veränderungen bei den juvenilhormonwirksamen Substanzen aufgetreten waren.

Nachweis der Trägerproteine durch Disc-Elektrophorese

Für die Ermittlung der bindenden Proteine wurde die Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese wegen ihres guten Auflösungsvermögens gewählt, und weil keinerlei Adsorptionserscheinungen der Proteine mit dem Trägermaterial auftreten. Unter den beschriebenen Elektrophoresebedingungen erfolgt die Konzentrierung bei pH = 7,0 und die Trennung bei pH =

8,0. Dieses pH-System wurde aus physiologischen Gründen gewählt, um den negativen Einfluß höherer pH-Werte auf die Hormon-Proteinbindung auszuschließen.

Sowohl in der Hämolymphe frisch gehäuteter als auch in der von voll pigmentierten Larven waren in den Gelen nach dem Anfärben mit Amidoschwarz 9–11 Proteinbanden sichtbar. In Abb. 5 ist das Proteinbandenmuster der Hämolymphe frisch gehäuteter Larven aufgezeichnet. Interessant ist nun die Tatsache, daß die Proteinbande 4 der Hämolymphe von frisch gehäuteten Larven bei den voll pigmentierten *Tenebrio*-Larven ganz fehlt bzw. nur in Spuren vorhanden ist. Sie erscheint unmittelbar vor jeder Larvenhäutung und verschwindet mit der Pigmentierung wieder. Die gleiche Beobachtung machte MCCORMICK²¹ beim Vergleich der Proteinbandenmuster der Hämolymphe der Heuschrecke *Locusta migratoria* in verschiedenen Entwicklungsstadien. Er vermutet aufgrund des zyklischen Erscheinens einer bestimmten Proteinbande während aller Häutungen, daß diese direkt mit dem Häutungsprozeß verbunden ist. Dasselbe muß man für die Proteinbande 4 annehmen. Ansonsten waren die Proteinbandenmuster der beiden Hämolymphe gleich. In der Intensität der sich entsprechenden Banden konnte visuell kein Unterschied festgestellt werden. Die

Verbindung	Radioaktivität pro 2,0 ml Prot. Fraktion [Zpm]	Extrahierbare Radioaktivität [%]
Epoxydihydrofarnesensäure-Methylester	$9,25 \cdot 10^4$	100
Dichlorhydrofarnesensäure-Methylester	$1,85 \cdot 10^5$	99,5
Epoxy-2.3 <i>trans</i> -farnesylpropenyläther	$2,01 \cdot 10^5$	99,1

Tab. 3. Extrahierbarkeit der juvenilhormonwirksamen Verbindungen, gebunden an Hämolympheproteine von vollpigmentierten Larven. 0,15–0,5 ml Hämolymphe wurde mit ca. 10^6 Zpm der markierten Substanz versetzt und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Filtration durch eine Sephadex G-25-Säule (1,2 $\cdot$ 38,5 cm) wurden 2,0 ml der Proteinfraction (60 ml) mit insgesamt 6,0 ml Äther extrahiert. 0,1 ml der Proteinfraction und 0,5 ml des Ätherextraktes wurden für die Radioaktivitätsbestimmung verwendet.

2.3-*trans*-Epoxyfarnesylpropenyläthers in den Gelen der Hämolymphe voll pigmentierter und frisch gehäuteter Larven. Für den Epoxydihydrofarnesensäure-Methylester ergibt sich, wenn man von einer geringen Bindungsfähigkeit der Banden 10 und 11 (3% der proteingebundenen Radioaktivität) absieht, für beide Hämolymphe die gleichen Verteilungsbilder wie für die Ätherverbindung. In Tab. 4 ist die relative Radioaktivität assoziiert an die verschiedenen Trägerproteine in Prozent der proteingebundenen Gesamtradioaktivität für die Elektrophoreseversuche zusammengestellt. Die Radioaktivität der Banden 10 und 11 und 2 und 3 wurde aus schnidetechnischen Gründen kombiniert.

In der Hämolymphe voll pigmentierter Larven werden 100% der proteingebundenen Radioaktivität des 2.3-*cis*- und des 2.3-*trans*-Ätherisomeren, 97% des Epoxydihydro-, aber nur 75% des Dichlor-dihydrofarnesensäure-Methylesters von dem(n) Lipoprotein(en) der Bande 5 gebunden. Der Rest der proteingebundenen Hormonmenge war mit den Proteinen der Banden 10 und 11 assoziiert. Die feste Bindung des als hormonal inaktiv angenommenen Palmitinsäuremethylesters an die Hämolympheproteine voll pigmentierter Larven wurde durch Gel-filtration (Tab. 1) nachgewiesen. Im Gel waren 72% der proteingebundenen Radioaktivität bei den Banden 10 und 11, aber nur 9% bei Bande 5 lokalisiert. Offensichtlich spielt das durch den Oxiranring in den Epoxy-Verbindungen vorhandene polarapolare Gleichgewicht für die Bindung an die Lipoproteinbande 5 eine Rolle. Doch auch sterische Fak-

toren sind für das Bindungsvermögen von Wichtigkeit, denn bei den Gelfiltrationsversuchen mit Hämolymphe voll pigmentierter als auch frisch gehäuteter Larven war die prozentual gebundene Hormonmenge für das 2.3-*trans*-Ätherisomere größer als bei der analogen *cis*-Verbindung. Bei einem weiteren Elektrophoreseversuch wurde Hämolymphe voll pigmentierter Larven verwendet, die mit $0,024 \mu\text{g/ml}$ ^3H -2.3-*trans*-Epoxyfarnesylpropenyläther aber in Gegenwart einer ca. 1000-fachen Menge nichtradioaktiver Substanz inkubiert worden war. Die proteingebundene Radioaktivität war nur bei Bande 5 lokalisiert und entsprach dem Elektrophoreseversuch ohne Kaltsubstanz. Das bedeutet, daß die im großen Überschuß vorhanden gewesenen unmarkierten Moleküle die markierten nicht von ihren Bindungsstellen verdrängt haben, sondern die Bindungskapazität mit der Erhöhung der Konzentration annähernd linear gestiegen sein muß. Nach der Wanderungsgeschwindigkeit in der Disc-Elektrophorese kann man annehmen, daß das Mol.-Gew. der Proteine in Bande 5 ungefähr zwischen 70000 und 100000 liegt. Pro Trägerprotein müssen demnach mehrere Bindungsstellen vorhanden sein.

Das (die) mit dem Larvenhäutungsprozeß verbundene Protein(e) der Bande 4 tritt neben der Bande 5 in der Hämolymphe frisch gehäuteter Larven als weitere Hormonträgerbande für die 3 juvenilhormonwirksamen Substanzen auf. Die relativen Radioaktivitätswerte der Tab. 4 für die Trägerproteine der Hämolymphe frisch gehäuteter Larven sind mit einem größeren Fehler behaftet (ca.

Verbindung	Hämo- Lympe	Konz. in der Hämolymphe [$\mu\text{g/ml}$]	Relative Radioaktivität			
			Bd. 10, 11	Bd. 5	Bd. 4	Bd. 2, 3
10.11-Epoxy-6.7-2.3 <i>cis/trans</i> -farnesensäure-methylester	a	0,29	3	97	—	—
	b	0,07	3	55	42	—
7.11-Dichlor-6.10-dihydro-2.3 <i>cis/trans</i> -farnesensäuremethylester	a	0,5	26	74	—	—
	b	0,6	45	29	26	—
10.11-Epoxy-6.7 <i>cis</i> -2.3- <i>trans</i> -farnesylpropenyl-äther	a	ca. 0,024	—	100	—	—
	a	26,7	—	100	—	—
	b	ca. 0,024	—	54	—	—
10.11-Epoxy-2.3 <i>cis</i> -2.3- <i>trans</i> -farnesylpropenyl-äther	a	ca. 0,009	—	100	—	—
	a	26,7	—	100	—	—
Palmitinsäuremethylester	a	0,38	72	9	—	19
In-vivo-Einbau von ^3H -Palmitinsäure	a		75	25	—	—

Tab. 4. Relative Radioaktivität assoziiert an die durch Disc-Elektrophorese aufgetrennten hormonbindenden Proteinbanden der Hämolymphe von a) vollpigmentierten Larven im jungen und vorletzten Stadium, b) frisch gehäuteten Larven (0–3 Stdn. alt). Experimentelle Einzelheiten s. „Material und Methoden“. Die gemessene Radioaktivität einer jeden hormonbindenden Proteinbande wurde in Prozent der Gesamt-Radioaktivität aller Bindungsproteinbanden des Geles ausgedrückt. Der angegebene Wert ist der Mittelwert aus zwei Gelwerten. Die Radioaktivitäten der Banden 2 und 3 und der Banden 10 und 11 wurden aus schnidetechnischen Gründen kombiniert.

$\pm 20\%$), da die proteingebundene Radioaktivität der Bande 4 wegen der unbekannten Untergrundaktivität nicht genau berechnet werden kann. Je ca. 50% der proteingebundenen Radioaktivität des 2,3-*trans*-Epoxyäthers und des Epoxyesters sind auf die Banden 4 und 5 verteilt, dagegen waren es beim Dichlordihydroester nur je 25% bei Bande 4 und 5. Der Rest der Radioaktivität war bei den Banden 10 und 11 lokalisiert und entsprach ungefähr der Radioaktivität derselben Banden im Gel der Hämolymphe vollpigmentierter Larven. Dies ist insofern erstaunlich, da die proteingebundene Radioaktivität in den Elektrophoresegele mit Hämolymphe frisch gehäuteter Larven für alle 3 Farnesolderivate ein Viertel bis ein Drittel niedriger war als in den Gelen mit Hämolymphe vollpigmentierter Larven. Die wesentlich geringere Bindungskapazität der Hämolymphe frisch gehäuteter Larven beruht auf der Reduktion der Zahl der Bindungsplätze von Proteinbande 5. Diese Reduktion kann beruhen auf der Konzentrationsabnahme des Lipidanteils dieser Bande, da visuell beim Vergleich der mit Aminoschwarz angefärbten Gele beider Hämolymphe kein Intensitätsunterschied festzustellen war. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die Verminderung der Bindungsplätze durch Konkurrenz von Substanzen erfolgt, die während des Häutungsprozesses in der Hämolymphe erscheinen.

Einfluß des Emulgators Tween-85 auf die Bindung

Nach Injektion von Farnesol und Farnesylmethyläther in Emulsion beobachteten GRÄSSMANN et al.²² in *Tenebrio*-Puppen und WIGGLESWORTH²³ in *Rhodnius* einen fehlenden hormonalen Effekt selbst bei sehr hohen Dosen. Dabei ruft besonders der Farnesylmethyläther, in Pflanzenöl gelöst und nach derselben Applikationsmethode gegeben, in beiden Insekten einen starken Juvenilhormoneffekt hervor. GRÄSSMANN et al. stellten auch fest, daß der Abbau des Äthers in Emulsion wesentlich schneller vor sich ging als nach Injektion in Olivenöl. Es wurde deshalb vermutet, daß der Emulgator den natürlichen Transport oder den Wirkungsmechanismus am Erfolgsorgan blockiert. Der Einfluß des Emulgators Tween-85 (Polyoxyäthylensorbitantriöleat) auf die Bindung zwischen dem Epoxydihydrofarnesensäure-Methylester und dem bindenden Faktor der Lipoproteinbande 5 der Hämolymphe vollpigmentierter Larven wurde bei zwei Emulgatorkonzentrationen

elektrophoretisch untersucht. Bei einer Konzentration von 3,5% Tween-85 in der Hämolymphe wird das Bindungsvermögen auf ein Fünftel und bei 0,5% auf ca. ein Drittel des Wertes reduziert, der ohne Emulgator erhalten wurde.

Die Produktion der natürlichen Hormone von den *Copora allata* erfolgt nicht zusammenhängend, sondern erreicht ungefähr in der Mitte jeder Zwischenhäutungsperiode maximale Konzentration in der Hämolymphe. In der Zeit jeder Häutung wird die Hormonbildung praktisch unterbrochen. Aus diesem Grund kommt dem bindenden Faktor der Lipoproteinbande 5 in der Hämolymphe voll pigmentierter Larven eine besondere physiologische Funktion zu. Da auch die ersten in-vivo-Versuche mit dem Epoxydihydrofarnesensäure-Methylester bei voll pigmentierten *Tenebrio*-Larven das in vitro-Ergebnis bestätigt haben, ist anzunehmen, daß die den verwendeten Epoxyverbindungen strukturell sehr ähnlichen Hormone nach Sekretion durch die Hormondrüse selektiv von dem bindenden Faktor der Lipoproteinbande 5 aufgenommen werden. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von LÜSCHER²⁴ von Wichtigkeit, der in vitro überhaupt keine Wirkung der *Corpora allata* auf die Atmung und Proteinsynthese des Fettkörpers von *Leucophaea* feststellte. Eine Erklärungsmöglichkeit sieht er darin, daß die Hormondrüse bei Abwesenheit von bestimmten Hämolympfhaktoren unfähig ist, Hormon in eine Ringerlösung abzugeben.

Da die Hormon-Proteinbindung reversibel ist und die Gleichgewichtseinstellung des Hormons mit dem Trägerprotein praktisch momentan erfolgt, erfüllt das Trägerprotein neben der Transportfunktion auch noch eine Pufferfunktion, die zur Kontrolle des Hormontiters und damit der auf die Zielorgane wirksamen Konzentration dient.

Besteht die Lipoproteinbande 5 aus einem oder aus mehreren Proteinen? Wie groß ist die Bindungskonstante und die Zahl der Bindungsstellen pro Molekül? Kommt das Trägerprotein auch für den Ecdysontransport in Frage? Wie erfolgt der Juvenilhormontransport im Puppen- und Adultstadium? Die Klärung dieser Fragen soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Der Firma Hoffmann-La Roche gilt besonderer Dank für die materielle Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Prof. SCHMIALEK danke ich für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse.

- ¹ P. P. SCHMIALEK, Z. Naturforsch. **16b**, 461 [1961].
- ² I. W. LAW, C. YUNG u. C. M. WILLIAMS, Proc. nat. Acad. Sci. USA **55**, 576 [1966].
- ³ W. S. BOWERS, M. I. THOMPSON u. E. C. UEBEL, Life Sci. **4**, 2323 [1965].
- ⁴ H. ROELLER, K. H. DAHM, O. C. SWEETLEY u. B. M. TROST, Angew. Chem. **79**, 190 [1967].
- ⁵ A. MEYER u. H. SCHNEIDERMAN, Fed. Proc. **19** [1968].
- ⁶ H. CHINO, S. MURAKAMI, K. HARASHIMA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **176**, 1 [1969].
- ⁷ H. LINDLAR, Helv. chim. Acta **35**, 446 [1952].
- ⁸ F. STELLWAAG-KITTLER, Biol. Zbl. **73**, 12 [1954].
- ⁹ O. H. LOWRY, N. J. FARR, A. L. u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].
- ¹⁰ D. E. WILLIAMS u. R. A. REISFELD, Annu. N. Y. Sci. **121**, 373 [1964].
- ¹¹ N. RESSLER, R. SPRINGGATE u. J. KAUTMAN, J. Chromatogr. [Amsterdam] **6**, 409 [1961].
- ¹² R. MASIRONI u. F. DEPOCAS, Canad. J. Biochem. Physiol. **39**, 219 [1961].
- ¹³ L. MELANDER, Arkiv Kemi **3**, 525 [1951].
- ¹⁴ W. G. VERLY, R. RACHELE, V. DU VIGNEAUD, M. EIDINOF u. E. KNOLL, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5941 [1952].
- ^{*} Die Äthylester und der 10.11-Epoxy-6.7-cis-2.3-cis/trans-farnesyl-propinyläther wurden durch Dr. PEIFFNER und Dr. SCHWITTERS von der Firma Hoffmann-La Roche synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
- ¹⁵ W. SCHOLTAN, Arzneimittel-Forsch. **15**, 1433 [1965].
- ¹⁶ J. KRIEGLSTEIN u. G. KUSCHINSKY, Arzneimittel-Forsch. **18**, 287 [1968].
- ¹⁷ P. F. DIXON, J. Endocrinology **40**, 457 [1968].
- ¹⁸ J. WESTERMANN, M. ROSE, H. TRAUTMANN, P. SCHMIALEK u. J. KLAUSKE, Z. Naturforsch. **24b**, 378 [1969].
- ¹⁹ K. J. STERLING, J. Clin. Invest. **43**, 1721 [1964].
- ²⁰ W. SCHOLTAN, Arzneimittel-Forsch. **18**, 505 [1968].
- ²¹ F. W. McCORMICK u. A. SCOTT, Separatum Experimentia **22**, 228 [1966].
- ²² A. GRÄSSMANN, A. GEYER, G. HERDA u. P. SCHMIALEK, Acta ent. bohemoslov. **65**, 92 [1968].
- ²³ V. B. WIGGLESWORTH, J. Ins. Physiol. **9**, 105 [1963].
- ²⁴ M. LÜSCHER, J. Insect Physiol. **14**, 499 [1968].

Indol-3-essigsäure-induzierte Nukleotidabgabe bei gleichzeitig erhöhter Adenosin-3':5'-monophosphorsäure (c-AMP)-Synthese in Maiskoleoptilzyklindern

3-Indole Acetic Acid Induced efflux of Nucleotides Concomitant with an Increased Synthesis of Adenosin-3':5'-monophosphat (c-AMP) in Maize Coleoptile Sections

B. JANISTYN

Pharmakognostisches Institut der Universität Freiburg/Br.

(Z. Naturforsch. **27 b**, 273—276 [1972]; eingegangen am 7. Dezember 1971)

When maize coleoptile sections were incubated in buffer, nucleotides appeared in the solution as shown by photometric measurement. After 2—3 hours the concentration of the nucleotides stayed constant. However subsequent addition of 3-indole acetic acid to the buffer lead to a linear, rapid and significant net efflux of nucleotides lasting several hours.

The nucleotides Adenosin-5'-monophosphate (5'-AMP) and Adenosin-3':5'-monophosphate (c-AMP) could be identified in the solution after incubation. The incorporation of [8-¹⁴C]-adenine into 5'-AMP and c-AMP was measured. After treatment with 3-indole acetic acid c-AMP-¹⁴C-synthesis was increased in the tissue about 100% over control.

Nach Auxingabe laufen in der Pflanze anabolische Prozesse an, die erwartungsgemäß mit einer Steigerung des Nukleotidstoffwechsels gekoppelt sind¹.

Ein Indol-3-essigsäure (IES)-induzierter, gesteigerter Nukleotidumsatz läßt sich in einfacher Weise photometrisch beim Maiskoleoptilzylinder-Test auf Auxin nachweisen.

Wie die Abb. 1 zeigt, treten in einer auxinfreien Pufferlösung, in die Maiskoleoptilzylinder gelegt werden, sehr schnell Nukleotide auf, deren Konzentration nach 2—3 Stdn. annähernd konstant bleibt. Wird nunmehr zur Pufferlösung IES (10⁻⁵ M) gegeben, so steigt die Konzentration der Nukleotide sehr

schnell und über mehrere Stdn. (12—14 h) gradlinig an. Nach 24 Stdn. hat sie wiederum einen konstanten Wert erreicht.

In der Annahme, daß es sich um Nukleotide des Adenosintriphosphat-Stoffwechsels handle, wurden Inkubationsversuche mit [8-¹⁴C]-Adenin mit und ohne IES durchgeführt.

Als Trägersubstanzen bei der Aufarbeitung der Versuchslösungen auf Nukleotide wurden Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosin-5'-monophosphat (5'-AMP), Adenosin-3'-monophosphat (3'-AMP) und Adenosin-3':5'-monophosphat (c-AMP) zugegeben, mittels verschiedener chromatographischer Systeme aufgetrennt und bei ausreichender radioaktiver Markierung bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität gereinigt. Hierbei