

Serumproteinbindung von ACTH

II. Untersuchungen mit Dichtegradientenzentrifugation und ^3H -ACTH

K. v. WERDER, F. KLUGE, K. SCHWARZ und P. C. SCRIBA *

II. Medizinische Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL)

Einleitung

In einer vorhergehenden Arbeit [1] wurde die Bindung von Tritiummarkiertem Tricosapeptid an Serumproteine mit Hilfe der Dextrangelchromatographie mit Sephadex G-25 untersucht. Dabei wurde das Problem, ob es sich wirklich um eine echte Bindung des ACTH-Peptids an Serumeiweißkörper oder nur um

Zentrifugation mit z.B. Enzymen mit bekanntem Molekulargewicht [2—5].

Präparate und Methoden

Präparate (^3H -ACTH, und nichtmarkiertes β^{1-23} Corticotropin-23-amid), Reinigung des ^3H -ACTH von unspezifischer Radioaktivität, biologischer ACTH-Bestimmung, Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie und Proteinbestimmung s. vorausgehende Arbeit [1].

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden Saccharosedichtegradienten nach dem Prinzip von BRITTON und ROBERTS [2—6] hergestellt. Ein einfacher Glasapparat, wie in Abb. 1 schematisch dargestellt, wurde bei geschlossenem Hahn I und II gefüllt. In den Schenkel A wurden 3,45 ml (Totvolumen A = 0,95 ml plus Nutzvolumen A = 2,5 ml) 13% Saccharose, 0,005 M MgCl_2 , 0,025 M KCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gefüllt. In den Schenkel B kamen 0,35 ml (Totvolumen) plus 2,5 ml der gleichen Lösung ohne Saccharose. Vor dem vorsichtigen Anstellen der Preßluft (s. Schema), welche eine Durchmischung des Inhalts von Schenkel A sicherstellte, sollen die Flüssigkeitsspiegel in den Schenkeln A und B gleich hoch stehen (linke Hälfte Abb. 1). Hahn I wurde dann vollständig geöffnet, Hahn II dagegen nur so wenig, daß bei kontinuierlichem Ausfluß die Füllhöhe des Gradienten im Zentrifugenröhrchen von 4,5 cm in 7—10 min erreicht wurde. Je drei Gradienten dieser Art wurden im Swinging Bucket Rotor SW 39 der Spinco Model L Ultrazentrifuge (Fa. Beckman Instr.) 2 Std bei 37500 UPM vorzentrifugiert. Setzt man der Saccharoselösung im Schenkel A z.B. Nilblausulfat zu, so läßt sich die Konzentrationsabnahme an Nilblausulfat und damit an Saccharose von unten nach oben in den hergestellten Gradienten nach Punktion des Bodens der Zentrifugenröhrchen und tropfenweisem Auffangen in Fraktionen und nach Verdünnung photometrisch bestimmen. Abb. 2 zeigt, daß man einen etwa linearen Gradienten von 13—5% Saccharose erhält, wenn man die richtige Füllhöhe für die Zentrifugenröhrchen (Abb. 1) wählt (Versuche mit FRES [5]). Zur elektrophoretischen Auftrennung der Serumeiweißkörper wurde die übliche Papierelektrophorese (Horizontalmethode) verwendet.

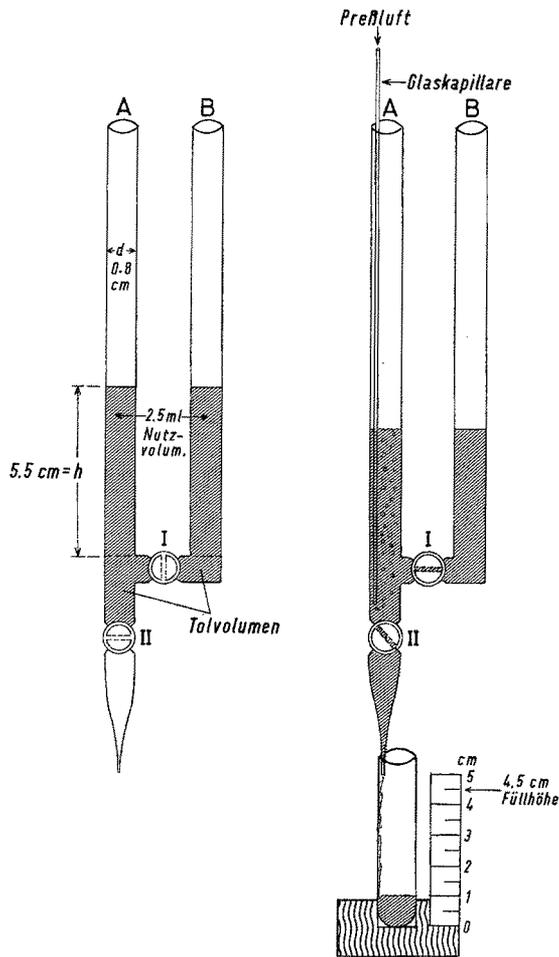


Abb. 1. Apparat zur Herstellung von Saccharosedichtegradienten. Erklärung s. Methoden

eine Verdrängung des ACTH durch Serumproteine aus der Dextrangelbindung handelt, angeschnitten. Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurde von uns noch ein weiteres System zugezogen, mit dem wir die Bindung von ACTH an Serumproteine untersuchen konnten. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation ist es möglich, Peptide mit kleinerem Molekulargewicht (ACTH) von Proteinen mit höheren Molekulargewichten (ACTH + bindendes Protein) grob zu trennen. Die Methode eignet sich auch zur ungefähren Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen bei vergleichender

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk (K. v. W.).

Ergebnisse

a) *Sedimentation der Serumproteine bei der Dichtegradientenzentrifugation.* Um die Sedimentation der einzelnen Serumproteinfraktionen bei der Dichtegradientenzentrifugation zu bestimmen, wurden 0,2 ml mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1 verdünnten Serums auf einen Dichtegradienten gegeben. Nach 18 Std Zentrifugation bei 37500 UPM wurde das Zentrifugenröhrchen punktiert und 5 Fraktionen gesammelt und die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt. Von den bis auf 0,3 ml eingeeengten Fraktionen wurden mit Hilfe der Elektrophorese die Relativprozentante der Eiweißfraktionen bestimmt und daraus die absoluten Mengen errechnet (Abb. 3). Die Abbildung zeigt deutlich die verschiedenen Sedimentationsraten der Serumproteine entsprechend ihrer Molekulargewichte. Albumine und niedermolekulare α_1 -Globuline wurden am wenigsten sedimentiert (ca. 2 cm). Die hochmolekularen β_1 -Globuline wanderten am weitesten.

b) *Sedimentation von β^{1-23} -Corticotropin bei der Dichtegradientenzentrifugation.* Den folgenden Versuchen lag die Frage zugrunde, wie sich ACTH allein und nach Inkubation mit Normalserum bei der Dichte-

gradientenzentrifugation verhält. Einmal wurden 17,2 mE β^{1-23} -Corticotropin-23-amid in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung, das andere Mal wurden 17,2 mE, die mit 0,1 ml Normalserum und 0,9% igem NaCl ($\Sigma V=0,2$ ml) 3 min bei $+37^\circ\text{C}$ inkubiert worden waren, auf einen Gradienten geschichtet. Nach Zentrifugation (18 Std) wurden jeweils 5 Fraktionen gesammelt, die 5 Zonen verschiedener Dichte entsprachen. In allen Fraktionen wurde die biologische ACTH-Aktivität bestimmt. Bei dem Gradienten, der mit β^{1-23} -Corticotropin in 0,9% iger NaCl-Lösung überschichtet war, zeigten die ersten drei (unteren) Fraktionen keine biologische Aktivität. Die vierte Fraktion zeigte einen gerade meßbaren Corticosteronanstieg im Nebennierenvenenplasma und in der fünften Fraktion war die Corticosteroninkretion submaximal stimuliert

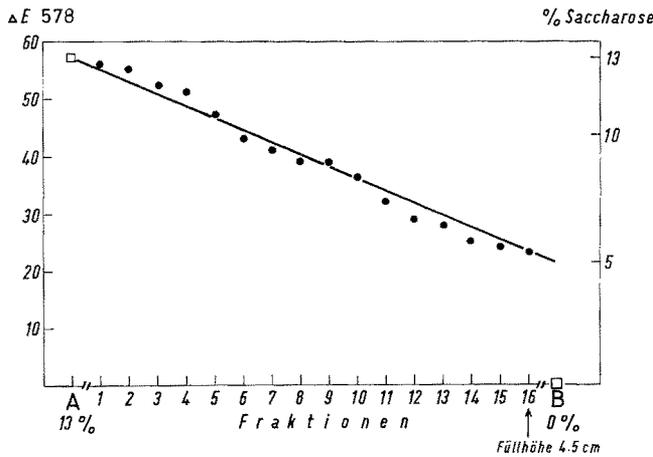


Abb. 2. Prüfung der Linearität der Saccharosedichtegradienten. Erklärung s. Methoden

(Abb. 4). Das β^{1-23} -Corticotropin sedimentierte also praktisch nicht, sondern blieb an der Gradientenoberfläche.

Wurde das ACTH vor Zentrifugation mit Normalserum inkubiert, so fand sich in den ersten beiden Fraktionen ein Corticosteronanstieg, der als noch im Basisbereich liegend gelten kann. Die dritte stärker, noch die vierte und fünfte Fraktion zeigten hingegen eine deutliche Stimulierung der Rattennebenniere (Abb. 4).

Die weitere Sedimentation des mit Serum inkubierten ACTH ist durch dessen Bindung an Serumproteine erklärbar. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß die in jeder Fraktion vorgenommene Proteinbestimmung zeigte, daß gerade in der dritten Fraktion (Albumin, Abb. 3) die höchste Proteinkonzentration gefunden wurde. Die biologische Aktivität in Fraktion 3 wäre ohne Inaktivierung des β^{1-23} -Corticotropins durch Inkubation mit Serum [1] wohl noch höher.

c) Sedimentation von Tritium-markiertem β^{1-23} -Corticotropin. Die Technik der Dichtegradientenzentrifugation wurde auch zur Bestimmung der Sedimentation von mit Tritium markiertem ACTH angewandt. Dabei wurden 0,4 ml eines Inkubationsgemisches (200 mE chromatographisch gereinigtes [1] β^{1-23} -Corticotropin-23-amid-acetat; 0,2 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5, mit und ohne 0,4 ml Normalserum, 0,9% igem NaCl ad $\Sigma V=0,8$ ml) auf einen 5—13% Saccharosedichtegradienten geschichtet. Nach Zentrifugation (18 Std)

wurden die Zentrifugenröhrchen punktiert und die gesammelten Fraktionen zur Flüssigkeitsszintillationszählung aufbereitet [1]. Auch hier zeigte sich, daß das ACTH, das vor der Zentrifugation mit Serum inkubiert worden war, weiter sedimentierte. Nicht mit Serum inkubiertes ACTH blieb an der Gradientenoberfläche und sedimentierte fast nicht (Abb. 5).

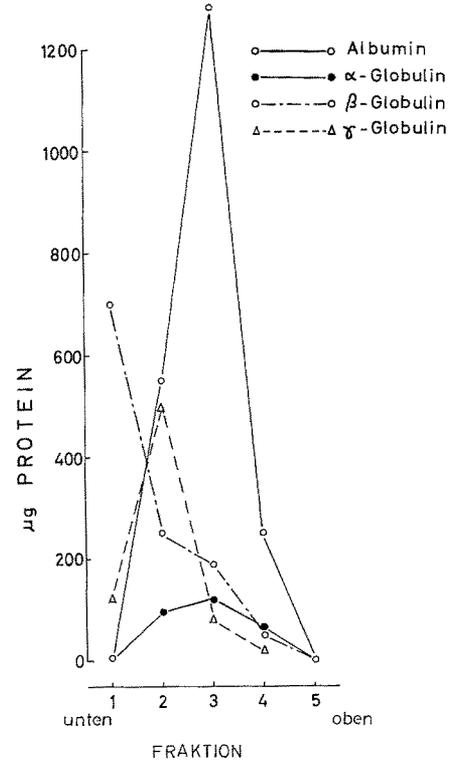


Abb. 3. Dichtegradientenzentrifugation von Serumproteinen. Verteilung der Proteine von 0,1 ml Serum, Proteingehalt der einzelnen Fraktionen nach elektrophoretischer Auftrennung

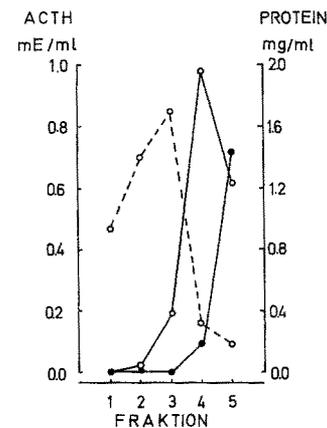


Abb. 4. Dichtegradientenzentrifugation von β^{1-23} -Corticotropin. Protein (○—○) und biologische ACTH-Aktivität bei Inkubation ohne (●—●) und mit (○—○) Serum. Erklärung s. Text

Bei diesen Versuchen mußten wir feststellen, daß ein nicht unbeträchtlicher Teil des ^3H -ACTH an der Wand des Zentrifugenröhrchens hängen blieb [7]. Die Ausbeute der Radioaktivität des ^3H -ACTH nach Inkubation mit Serum betrug nur 55% ($N=7$). Ohne Seruminkubation wurden sogar nur 33% ($N=5$) wieder gefunden. Die höhere Wiederfindenquote nach Seruminkubation macht ein kompetitives Verhalten

von Serumproteinen und Cellulosenitratmolekülen der Wand des Zentrifugenröhrchens bezüglich der Bindung von ³H-ACTH wahrscheinlich. Ein großer Teil der fehlenden Radioaktivität konnte in den leeren Zentrifugenröhrchen nachgewiesen werden [7]. Ein vorheriges Absättigen der Zentrifugenröhrchen mit Albumin

in 0,9%igem NaCl. — Dieselbe Technik der Dichtegradientenzentrifugation wurde in Versuchen mit MÜLLER-BARDORFF [8] auch zur Ermittlung der Proteinbindung von ¹⁴C-Cortisol angewandt. Dabei zeigte sich, daß nach Inkubation mit Normalserum eine weitere Sedimentation durch Proteinbindung des ¹⁴C-Cortisols stattfand (Abb. 7). Eine Inkubation des ¹⁴C-Cortisols mit Albumin hatte, im Gegensatz zu unseren

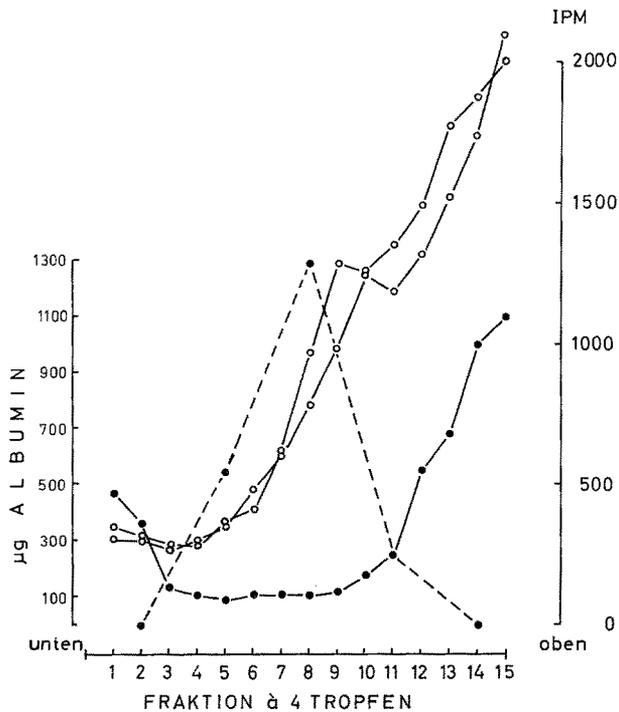


Abb. 5. Sedimentation von ³H-ACTH mit und ohne Seruminkubation. IPM pro Fraktion bei Inkubation mit (○—○) und ohne Serum (●—●) (vgl. Text). Sedimentation von Albumin (●—●) zum Vergleich eingezeichnet

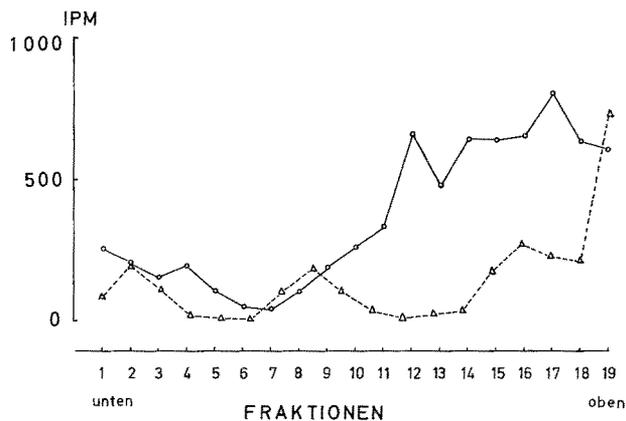


Abb. 6. Sedimentation von ³H-ACTH mit und ohne Inkubation mit Albumin. IPM pro Fraktion bei Inkubation mit (○—○) und ohne (Δ—Δ) Albumin (vgl. Text). Die obere Kurve ist eine Mittelwertskurve von 3 Versuchen, die untere Kurve ein Einzelversuch

oder nicht markiertem Corticotropin hatte keine Verbesserung der Wiederfindenquote zur Folge, ebenso nicht die Verwendung von Polypropylenzentrifugenröhrchen.

Wurde anstelle des Normalserums eine 5%ige Humanalbuminlösung zur Inkubation mit 100 mE ³H-ACTH verwendet (Abb. 6), so fanden wir bei Inkubation mit Albumin ebenfalls eine weitere Sedimentation und höhere Ausbeute (71%) als bei Inkubation

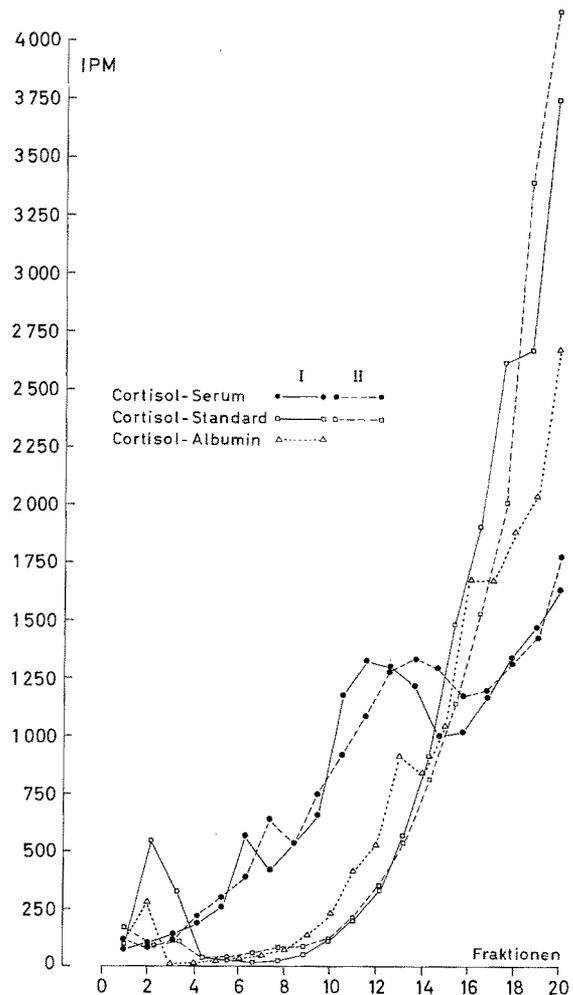


Abb. 7. Sedimentation von ¹⁴C-Cortisol mit und ohne Inkubation mit Serum bzw. Albumin. 0,2 µg ¹⁴C-Cortisol wurden mit und ohne 0,2 ml Serum bzw. 5% Humanalbuminlösung (0,9% NaCl-Lösung ad ΣV=0,4 ml) 15 min inkubiert und dieses Inkubationsgemisch auf den Gradienten gegeben. Zentrifugation: 18 Std

Experimenten mit ³H-ACTH, keinen Effekt auf die Sedimentation. Das ist durch die spezifische und ausschließliche Bindung des Cortisols durch α-Globuline (CBG=Cortisol Binding Globulin) zu erklären. — ACTH wird in diesen hohen Konzentrationen offenbar durch Albumin gebunden und, daß es sich um eine echte Proteinbindung und keine unspezifische Sedimentation durch Störung des Dichtegradienten bei Beladung mit Proteinen handelt, zeigt das Ausbleiben einer Sedimentationsbeschleunigung bei Inkubation von ¹⁴C-Cortisol und Albumin.

Diskussion

Proteinbindung bei Inkubation von verschiedenen ACTH-Peptiden mit Serum wurde mit den unabhängigen Techniken der Dextrangelfiltration [1] und der

Dichtegradientenzentrifugation (diese Arbeit) gezeigt. Es stellte sich heraus, daß die Bindung an Albumine erfolgt. Diese Bindung könnte eine Rolle im Sinne unspezifischer Transportphänomene (BENNHOLD) im Blut spielen. Sie muß ferner beachtet werden, wenn bei radioimmunologischen Bestimmungsmethoden für ACTH die Dextrangelfiltration zur Trennung von ACTH-Antikörperkomplex und freiem ACTH verwandt wird. Die Bedeutung der Proteinbindungsvorgänge für die biologische Aktivität von ACTH-Peptiden muß wegen ihrer komplexen Natur und der möglichen Konkurrenz von Abbauvorgängen [9] zunächst offen gelassen werden.

Zusammenfassung. Mit Hilfe von Saccharosedichtegradientenzentrifugation wurde die Bindung von tritiummarkiertem und nichtmarkiertem β^{1-23} -Corticotropin gezeigt. Es handelt sich um eine Bindung an Albumin.

Summary. Binding of ^3H -labelled and/or unlabelled β^{1-23} -corticotropin to serumproteins resp. albumin was shown by sucrose density gradient centrifugation.

Literatur. 1. WERDER, K. v., K. SCHWARZ u. P. C. SCRIBA: Serumproteinbindung von ACTH. I. Untersuchungen mit

Dextrangelfiltration und ^3H -ACTH. Klin. Wschr. **46**, 940 (1968). — 2. MARTIN, R. G., and B. N. AMES: A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. J. biol. Chem. **236**, 1372 (1961). — 3. SCRIBA, P. C., and J. W. REDDY: Adrenocorticotrophin and adrenal protein synthesis. Endocrinology **76**, 745 (1965). — 4. SCRIBA, P. C.: Klinische und experimentelle Untersuchungen über Dynamik und Wirkungsweise des Adrenocorticotropins. Habil.-Schr. Univ. München 1966. — 5. FRIES, M.: Versuche über die Steigerung der Nebennierenproteinsynthese durch ACTH. Diss. Univ. München 1967. — 6. BRITTON, R. J., and R. B. ROBERTS: High-resolution density gradient sedimentation analysis. Science **131**, 32 (1960). — 7. WERDER, K. v.: Serumproteinbindung von Adrenocorticotropin. Ein Beitrag zum Problem der Bestimmung von ACTH-Plasmaspiegeln. Diss. Univ. München 1968. — 8. MÜLLER-BARDORFF, M.: Funktionsuntersuchungen der menschlichen Nebennierenrinde mit Hilfe der Bestimmung der sog. 11-Hydroxycorticosteroid- und der Cortisol-Bindungsverhältnisse im Plasma. Diss. Univ. München 1968 (in Vorbereitung). — 9. KLAUS, D.: Untersuchungen über die Spaltung von Corticotrophin im Serum. Acta endocr. (Kbh.) **52**, 504 (1966).

Dr. K. v. WERDER
Dr. F. KLUGE
Prof. Dr. K. SCHWARZ
Priv.-Doz. Dr. P. C. SCRIBA
II. Med. Univ.-Klinik
8 München 15, Ziemssenstr. 1

Zur Genese des Pterygium colli beim Turner-Syndrom * **

H. A. HIENZ und A. GROPP

Pathologisches Institut des Klinikum Essen der Ruhr-Universität (Direktor: Prof. Dr. W. MÜLLER) und Abteilung für Cytopathologie und Cytogenetik (Vorsteher: Prof. Dr. A. GROPP) am Pathologischen Institut der Universität Bonn

Einleitung

Das Pterygium colli, die Flügelfellbildung am Hals, wird bei den verschiedensten angeborenen Leiden gefunden. Besonders kennzeichnend ist sein Vorkommen für das Turner-Syndrom (Abb. 4). Obwohl es bei diesem sehr häufig nachweisbar ist, fehlen, trotz ausführlicher Bearbeitung durch ROSSI und CAFLISCH (1951) und CAFLISCH (1952) und trotz einer großen Zahl von Obduktionsbeobachtungen (vgl. KLOOS und NESS, 1958) überzeugende Vorstellungen zu seiner Natur und Entstehung. Es ist Absicht dieser Mitteilung, aus Befunden bei der fetalen Erscheinungsform des Turner-Syndroms die Pathogenese des Pterygium colli zu deuten.

Historisches

KOBYLINSKY, der 1883 als erster das Pterygium colli als Besonderheit herausstellte, nahm eine abnorme Insertion des M. cucullaris (M. trapezius) als Ursache an und bewertete es als atavistisches Phänomen. FUNKE (1902), der einen zweifelsfreien Fall eines Turner-Syndroms beschreibt, hebt hervor, daß bei einem Pterygium „nicht ein Zuviel am Halse vorhanden ist“. Es sähe vielmehr so aus, „als ob jemand rechts und links in die Haut des Halses gegriffen und diese in Form einer Falte abgehoben, und so während des embryonalen und späteren Wachstums festgehalten hätte...“. Für diesen Zug macht er amniotische Verwachsungen verantwortlich. ULLRICH (1938) führte, in Analogie zu der Deutung von BONNEVIE (1934) für die beim Bagg-Littleschen Mäusestamm auftretenden Mißbildungen — der mechanischen Wirkung wandernder Liquorblasen —, auch das Pterygium colli auf

derartige Blasenbildungen im Nackenbereich zurück. Später (1949) faßte er die Hautödeme und Flüssigkeitsblasen bei dem von ihm so genannten symmetrischen Status Bonnevie-Ullrich jedoch als genetisch determiniert und als Folge eines lymphangiektatischen Ödems mit „Lymphblasen“ auf. Damit folgte er bezüglich des Pterygium colli der von BAGG und LITTLE (1924) entwickelten Theorie über die lymphangiektatische Natur der bei der Maus experimentell erzeugten cutanen und subcutanen „Blasen“. ROSSI und CAFLISCH (1952) trennen, wie auch BARTHE (1963), den Begriff der Cutis laxa und den des Pterygium colli, die beide beim Turner-Syndrom auftreten können, scharf voneinander, da es sich ihrer Ansicht nach schon entstehungsmäßig um zwei völlig voneinander verschiedene Erscheinungen handele.

Das fetale Turner-Syndrom

Das Turner-Syndrom, das in der Regel eine Monosomie des X-Chromosoms (Karyotyp: 45, X) und als typische Merkmale beim Erwachsenen Kleinwuchs, Gonadendysgenese, sexuelle Unterentwicklung und häufig ein Pterygium colli aufweist, findet sich nach Untersuchungen von SINGH und CARR (1966) und GROPP, HIENZ und OPITZ (1968) in einer besonderen Erscheinungsform auch bei Feten. In ihren schwersten Manifestationen führt die Monosomie des X-Chromosoms zu einem Frühabort (die Häufigkeit dieser Chromosomenaberration beträgt 4–5% aller Spontanaborte) oder zu einer Ausstoßung der Frucht im 2. oder 3. Trimenon. Dabei handelt es sich um meist macerierte Früchte mit überaus auffälligen symmetrischen Nackenblasen. Sie gleichen durchaus den früher mitgeteilten Beobachtungen von WERTHEMANN und REINIGER (1949), SCHWEINGRUBER (1955) und BARTHE (1963). Da bei diesen Feten jedoch mehr oder minder

* Herrn Prof. Dr. R. BÖHMIG zum 70. Geburtstag.

** Die Untersuchungen wurden mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.