

Modellsysteme für das Studium von Polypeptidhormon-Rezeptor- Wechselwirkungen

Doctoral Thesis

Author(s):

Bürgisser, Ernst

Publication date:

1978

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000143712>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

MODELLSYSTEME FUER DAS STUDIUM VON
POLYPEPTIDHORMON-REZEPTOR-WECHSELWIRKUNGEN

ABHANDLUNG
zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
ERNST BUERGISSER
Dipl.Naturwissenschaftler ETH
geboren am 30. April 1945
von Werthenstein (Kanton Luzern)

Angenommen auf Antrag von
Prof.Dr.R.Schwyzer, Referent
Prof.Dr.K.Wüthrich, Korreferent.

1978

5

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

5.1 ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Im Hinblick auf eine quantitative Behandlung der Polypeptidhormon-Rezeptor-Wechselwirkung wurde die formal-mathematische Seite der Ligand-Biopolymer-Bindung ausführlich diskutiert und anhand von graphischen, zum Teil perspektivisch dargestellten Figuren visuell verständlich gemacht.
- 2) Mit Hilfe der Informationstheorie und der Fehlerrechnung konnten die theoretisch optimalen Bedingungen für Bindungsstudien herausgearbeitet werden. Computersimulationen von Bindungsexperimenten erlaubten Abschätzungen der Präzision von Bindungsparametern bei veränderten Messbedingungen.
- 3) Glucose-6-phosphatdehydrogenase aus Rindernebennierenrinde wurde affinitätschromatographisch in einer Stufe bis zur Kristallisation mit guter Ausbeute isoliert.

- 4) Fluoreszenzanisotropiemessungen an einer eigens dafür gebauten Apparatur wurden mit gutem Erfolg für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten von ACTH₁₋₂₄ und Dansyl-ACTH₁₋₂₄ an bovine Glucose-6-phosphatdehydrogenase und an das entsprechende Hefe-Enzym angewendet. Damit konnte der Nachweis geführt werden, dass die relativ hohe Affinität ($K \approx 10^{-6}$ Mol/l) nicht nur auf das adrenale Enzym beschränkt ist und die Anwesenheit einer Dansylgruppe eine beachtliche Affinitätssteigerung bewirkt.

- 5) Dank einer selektiven Kupplung von α -MSH an humanes Serumalbumin zum Zweck der Immunisierung gelang es, ein extrem hochtitriges α -MSH-Antiserum (bis 1:10'000'000) zu produzieren, welches gegenüber andern Polypeptiden nur geringe Kreuzreaktion zeigte und eine Hormonbestimmung im picomolaren Bereich ermöglichte. Ferner konnte ein ACTH-Antiserum erzeugt werden, das mit α -MSH keine Kreuzreaktion zeigte und bezüglich Empfindlichkeit und Titer den in der Literatur beschriebenen ACTH-Antisera durchaus ebenbürtig war.

- 6) Polarisierete Fluoreszenzmessungen und Fluoreszenzquenchemperimente von dansylierten Hormonanaloge des α -MSH und ACTH in Gegenwart von Micellen und Lipidvesikeln zeigten überraschend grosse Effekte und zum Teil unerwartetes Verhalten bezüglich der Fluoreszenzeigenschaften.

Model Systems for the Study of Polypeptide Hormone-Receptor Interactions

Abstract

- 1) The formal mathematical treatment for the quantitative analysis of polypeptide hormone-receptor interactions is discussed in detail and illustrated graphically, partly with three dimensional figures.
- 2) The danger of wrong or over-interpretation of binding data from ligand-biopolymer interactions (e.g. hormone/receptor, antigen/antibody, enzyme/substrate) is very large if an unsuitable titration procedure is compounded with a poor choice of concentrations. Computer simulations were used to study the influence of stochastic and systematic errors on the determination of dissociation constants and other binding parameters as a function of the total concentrations of binding species. The results are interpreted on the basis of information theory.
- 3) The enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine adrenal glands has been purified in one step by affinity chromatography. The crystallized product was isolated with good yield.
- 4) With apparatus developed specifically for the task, static fluorescence anisotropy was used for the determination of the dissociation constants of ACTH₁₋₂₄ or dansyl-ACTH₁₋₂₄ with bovine adrenal glucose-6-phosphate dehydrogenase. It was found that the relatively high affinity ($K_{diss} \approx 10^{-6}$ mole/l) is not limited to the adrenal enzyme, and the presence of a dansyl group causes a considerable increase of affinity.
- 5) Radioimmunochemical determination of structurally related polypeptide hormones, such as ACTH and α -MSH, at very low concentrations, requires antisera of high specificity and sensitivity. Prolonged immunization of goats with chemically defined complex-antigens (HSA containing a rather low number of covalently bound ACTH or α -MSH molecules) resulted in an antisera which had high titers

(best titers: 1:220,000 and 1:10,000,000 for ACTH and α -MSH, respectively), low cross-reactions (anti-ACTH serum: < 0.005% with α -MSH; anti- α -MSH serum: < 0.05% with ACTH) and high sensitivity (detection limit for ACTH: < 1 pg; for α -MSH: < 0.5 pg).

- 6) Polarized fluorescence and fluorescence quenching of dansylated α -MSH and ACTH₁₋₂₄ analogues in the presence of micelles and lipid vesicles were studied. The fluorescence characteristics showed surprisingly large and to some extent unexpected effects.