

# Hormon-Rezeptoren

Von Klaus Lübke, Ekkehard Schillinger und Michael Töpert<sup>[\*]</sup>

*Corpora non agunt  
nisi fixata  
Paul Ehrlich (1845–1915)*

Hormon-Rezeptoren sind Proteine, die sich an der Zellmembran oder im Cytoplasma der Zelle befinden. Sie haben die Aufgabe, das Hormon zu erkennen und zu binden; die biologischen Wirkungen des Hormons gehen vom Hormon-Rezeptor-Komplex aus. Inzwischen sind für alle Hormone spezifische Rezeptoren gefunden worden. Die Verfolgung der Gleichgewichtseinstellung zwischen Hormon, Rezeptor und Hormon-Rezeptor-Komplex („Bestimmung der Rezeptor-Bindung“) ermöglicht quantitative Hormon-Bestimmungen, hilft bei der Charakterisierung endokriner Störungen und trägt zur Aufklärung von Struktur-Affinitäts-Beziehungen bei.

## 1. Einleitung

Ein Merkmal aller Hormone ist ihre Beteiligung an der Steuerung biologischer Vorgänge. Hormone wirken durch Weitergabe von Informationen, die zur Auslösung zellspezifischer Aktivitäten führen. Die Aufgabe als „first messenger“ können die Hormone nur dann erfüllen, wenn sie von ihren „Erforgsorganen“ erkannt und von anderen Verbindungen differenziert werden. Ein entscheidender Schritt des Erkennungsvorganges ist die Bindung des Hormons an seinen Rezeptor (ein Protein). Die biologische Aktivität eines Hormons (oder einer Hormon-analogen Verbindung) wird durch die Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes am Wirkort und durch die als „intrinsic activity“<sup>[1, 2]</sup> bezeichnete spezifische Wirkung des Komplexes bestimmt. Die Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes hängt von der Verfügbarkeit des Hormons am Wirkort und von der Affinität des Hormons zum Rezeptor ab (Abb. 1).

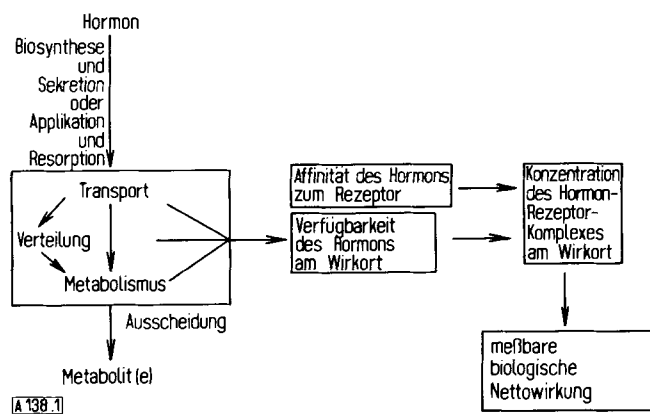


Abb. 1. Faktoren, die in vivo die Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes und damit die biologische Aktivität beeinflussen.

Der Hormon-Rezeptor-Komplex kann sich an oder in der Zelle bilden. Im ersten Fall findet das Hormon seinen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche der Zellmembran. Es braucht nicht in die Zelle einzudringen, sondern löst durch Bindung an den Membran-gebundenen Rezeptor einen intra-

zellulären Vorgang aus. Im zweiten Fall muß das Hormon in die Zelle eindringen. Erst dort erfolgt die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes. Zur ersten Gruppe gehören alle Peptid- und Proteohormone, die Hormone vom Typ der biogenen Amine und die Prostaglandine, zur zweiten Gruppe alle Steroidhormone sowie Thyroxin und Triiodthyronin.

## 2. Der Hormon-Rezeptor-Komplex

Die Existenz spezifischer Hormon-Rezeptoren und ihre Bedeutung für die Wirkungsweise der Hormone wurden schon frühzeitig postuliert<sup>[3]</sup>. Der experimentelle Nachweis der nur in sehr geringer Konzentration vorkommenden Rezeptoren scheiterte jedoch lange Zeit am Fehlen analytischer Methoden. Der Nachweis gelang erst, nachdem es möglich war, Hormone ausreichend hoch radioaktiv zu markieren. Anfang der sechziger Jahre haben Jensen et al. unter Verwendung von Tritium-markiertem Östradiol den ersten cytoplasmatischen (intrazellulären) Hormon-Rezeptor charakterisiert<sup>[4]</sup>. Wenige Jahre später konnten Cuatrecasas<sup>[5]</sup>, Lefkowitz et al.<sup>[6]</sup> sowie Goodfriend et al.<sup>[7]</sup>, ausgehend von mit radioaktivem Iod markiertem ACTH, Insulin bzw. Angiotensin, die ersten Membran-gebundenen Rezeptoren nachweisen. In der Folgezeit wurden für alle Hormone spezifische Rezeptoren beschrieben und Vorstellungen über die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes und seine Bedeutung für die Hormonwirkung entwickelt.

### 2.1. Definition des Hormon-Rezeptors

Ein spezifischer Hormon-Rezeptor muß eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen<sup>[8]</sup>:

1. Die Spezifität des Rezeptors muß sehr hoch sein und den bekannten Beziehungen zwischen Struktur und biologischer Wirkung entsprechen.
2. Die Anzahl der Bindungsstellen muß begrenzt sein.
3. Das Vorkommen von Rezeptoren in verschiedenen Geweben sollte mit der Ansprechbarkeit dieser Gewebe auf das Hormon übereinstimmen.
4. Wegen der sehr niedrigen physiologischen Hormon-Konzentrationen muß der Rezeptor eine hohe Affinität zum Hormon haben.

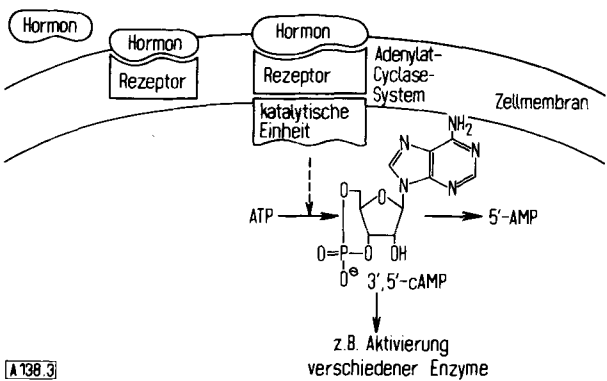
[\*] Dr. K. Lübke, Dr. E. Schillinger und Dr. M. Töpert  
Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen  
Müllerstraße 170–178, D-1000 Berlin 65

5. Die Hormon-Rezeptor-Bindung muß reversibel sein, um den physiologischen Effekt zu beenden und eine neue Stimulierung zu ermöglichen.

Es ist wichtig, die Rezeptor-Bindung, die durch hohe Affinität bei geringer Kapazität gekennzeichnet ist, von der unspezifischen Bindung an andere Hormon-Bindungsproteine zu differenzieren. Für diese ist eine niedrige Affinität bei sehr hoher Kapazität typisch.

## 2.2. Der Zellmembran-gebundene Hormon-Rezeptor

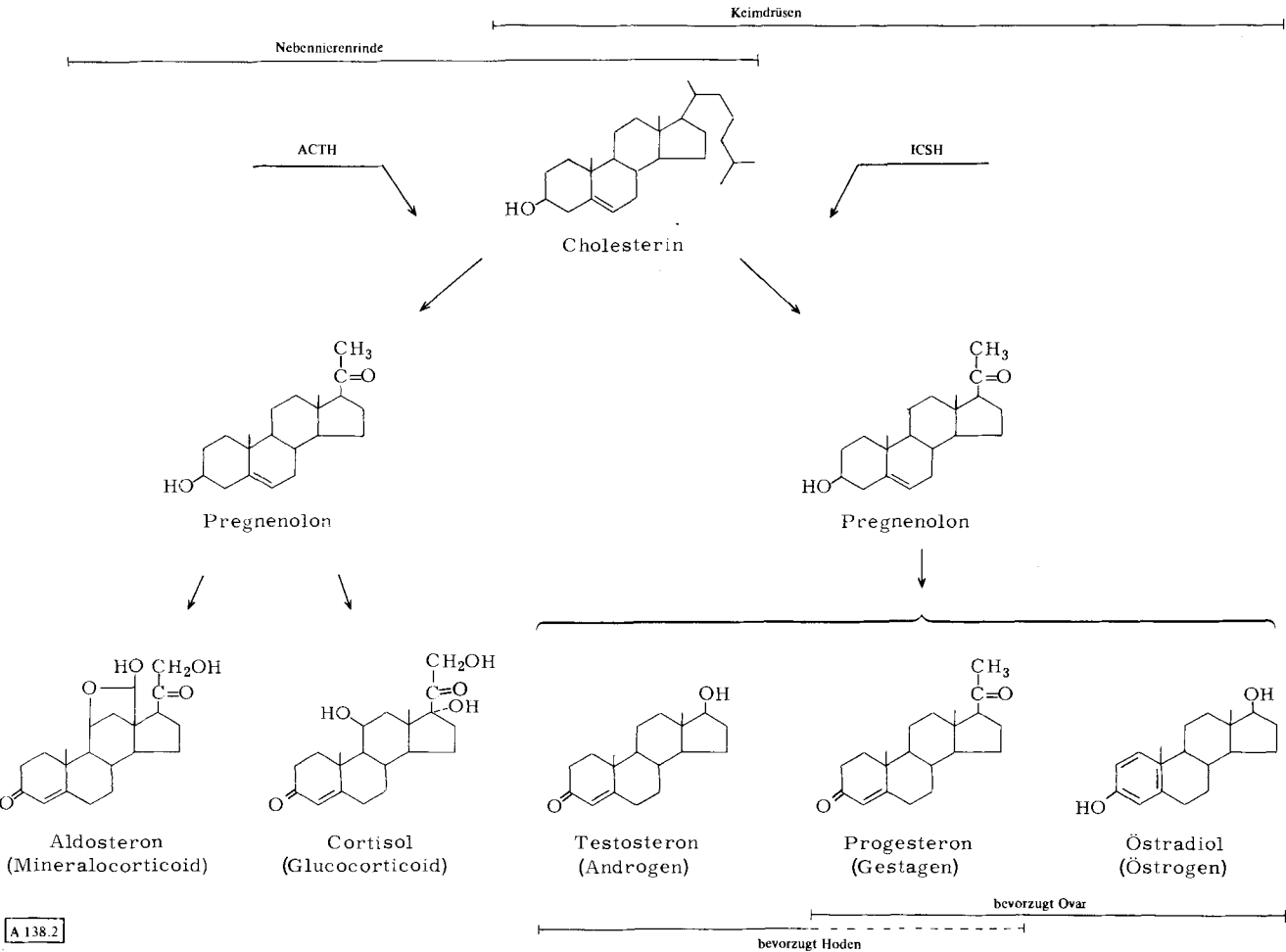
Die durch die Bindung eines Hormons an seinen Membran-gebundenen Rezeptor ausgelösten intrazellulären Reaktionsschritte werden nicht durch das Hormon, sondern durch die Eigenschaften der Zelle bestimmt. So stimulieren z.B. das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) und das Interstitialzellen-stimulierende Hormon (ICSH, LH) die gleiche Reaktion – die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon (3-Hydroxy-5-pregnen-20-on). Daß trotzdem unterschiedliche Endprodukte entstehen (in der Nebennierenrinde bevorzugt die Corti-



A 138.3

Abb. 3. Schema der Hormonwirkung über einen Membran-gebundenen Rezeptor.

werden, nachdem das Enzym Adenylat-Cyclase aktiviert worden ist. Cuatrecasas<sup>[8]</sup> nimmt an, daß Rezeptor und Enzym zunächst getrennt in der Membran vorliegen. Erst der Hormon-Rezeptor-Komplex vereinigt sich mit dem Enzym und bewirkt damit seine Aktivierung.



A 138.2

Abb. 2. Hormonale Stimulierung der Steroid-Produktion in der Nebennierenrinde und in den Keimdrüsen (nach [7a]). ACTH: Adrenocorticotropes Hormon, ICSH: Interstitialzellen-stimulierendes Hormon.

coide und in den Keimdrüsen bevorzugt die Androgene, Östrogene und Gestagene), ist auf die spezifische Enzym-Ausstattung dieser Zellen zurückzuführen (Abb. 2).

Die intrazellulären Vorgänge werden durch einen Überträger gesteuert. In vielen Fällen erfüllt das cyclische 3',5'-Adenosinmonophosphat (3',5'-cAMP) die Rolle dieses „second messenger“ (Abb. 3). 3',5'-cAMP kann aber erst aus ATP erzeugt

## 2.3. Der cytoplasmatische Hormon-Rezeptor

Die Bindung des Hormons an einen cytoplasmatischen (intrazellulären) Rezeptor erfordert das Eindringen des Hormons in die Zelle. Während früher dafür eine einfache Diffusion angenommen wurde, gibt es heute Anhaltspunkte, daß der Transport in die Zelle ein spezifischer, möglicherweise durch

Membran-gebundene Proteine gesteuerter aktiver Vorgang ist<sup>[9]</sup>. In der Zelle bildet sich zunächst der Hormon-Rezeptor-Komplex, der nach einer Aktivierung in den Zellkern eindringen kann (Abb. 4). Diese Aktivierung ist temperaturabhängig und mit einer Änderung der Sedimentationskonstante verbunden<sup>[10]</sup>. Für die Komplex-Bildung und -Aktivierung werden mehrere Modelle vorgeschlagen, wobei allosterische Vorgänge, Dimerisation des Hormon-Rezeptor-Komplexes und seine Aggregation mit anderen Proteinen diskutiert werden. Im Zell-

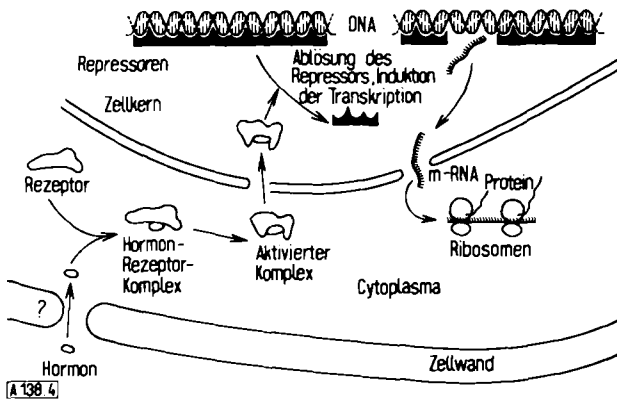


Abb. 4. Schema der Hormonwirkung über einen cytoplasmatischen Rezeptor.

kern wird ein für den Hormon-Rezeptor-Komplex spezifischer Akzeptor angenommen, der z.B. durch die Ablösung eines Repressors über die Transkription und Translation die Synthese der für die Hormonwirkung wichtigen Proteine bewirkt.

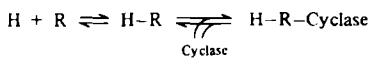
### 3. Die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes

Bei Untersuchungen zur Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes sind theoretische und praktische Probleme zu beachten, die im folgenden diskutiert werden.

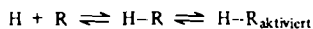
#### 3.1. Die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes als Gleichgewichtsreaktion

Zum Verständnis der Hormon(H)-Rezeptor(R)-Bindung genügt es, im Falle der Membran-gebundenen Rezeptoren (a) und der cytoplasmatischen (intrazellulären) Rezeptoren (b) jeweils zwei Gleichgewichte zu betrachten:

a) Membran-gebundener Rezeptor



b) Cytoplasmatischer Rezeptor



Diese sind die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes  $H-R$  (bei a und b) sowie bei (a) die Aktivierung des Cyclase-Systems (vgl. Abb. 3) und bei (b) die temperaturabhängige Aktivierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes (vgl. Abb. 4). In Abhängigkeit von der Art des Bindungstestes und von den Versuchsbedingungen wird entweder bevorzugt nur das erste Gleichgewicht oder mehr oder weniger die Summe beider Gleichgewichte bestimmt.

#### 3.2. Die „direkte“ Bestimmung der Rezeptor-Bindung

Liegt das Hormon oder Hormonanalogon in radioaktiv markierter Form vor, so kann seine Bindung an den Rezeptor direkt gemessen werden. Als variable Größen werden bevorzugt die leicht meßbaren Konzentrationen des Hormon-Rezeptor-Komplexes ( $[H-R]$ ) und des freien Hormons ( $[H]$ ) verwendet. Besonders vorteilhaft sind graphische Darstellungen der Komplexbildung, die zu einer Geraden führen (Abb. 5)<sup>[11]</sup>. Steigung und Schnittpunkte erlauben dann die Berechnung von Bindungsparametern. Am häufigsten wird die von Scatchard<sup>[12]</sup> angegebene Gleichung verwendet (vgl. auch Abb. 5e), die im folgenden abgeleitet wird.

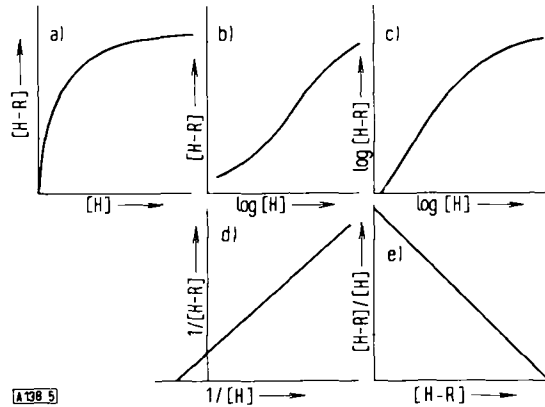
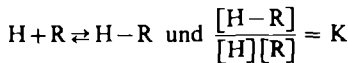


Abb. 5. Graphische Darstellung der Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes ( $H-R$ ). a)  $[H-R] = f[H]$ ; b)  $[H-R] = f(\log[H])$ ; c)  $\log[H-R] = f(\log[H])$ ; d)  $1/[H-R] = f(1/[H])$ ; e)  $[H-R]/[H] = f[H-R]$  (Darstellung nach Scatchard).



Setzt man

$$[R] = [R_0] - [H-R]$$

so folgt

$$\frac{[H-R]}{[H] \cdot ([R_0] - [H-R])} = K$$

oder

$$\frac{[H-R]}{[H]} = K \cdot ([R_0] - [H-R])$$

$$\frac{[H-R]}{[H][R_0]} = K \cdot \frac{[R_0] - [H-R]}{[R_0]}$$

$$\frac{[H-R]}{[H][R_0]} = K \cdot \left( 1 - \frac{[H-R]}{[R_0]} \right)$$

In der Praxis setzt man anstelle der im allgemeinen nicht bekannten Konzentration des freien Rezeptors  $[R]$  die Konzentration des gesamten Rezeptors  $[R_0]$  ein, die als proportional zur leicht meßbaren Protein-Konzentration angenommen wird. Aus der Steigung der Geraden kann die Affinitätskonstante  $K$  abgeleitet werden. Der Schnittpunkt mit der Abszisse ist ein Maß für die Zahl der Bindungsstellen.

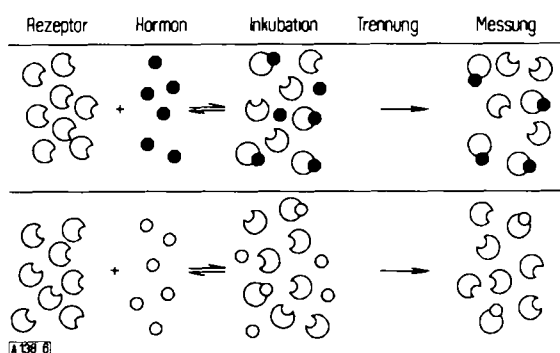


Abb. 6. Schematische Darstellung der „direkten“ Messung der Rezeptor-Bindung. ●: Hormon mit hoher Affinität, ○: Hormon mit geringer Affinität zum Rezeptor.

Um das Massenwirkungsgesetz anwenden zu können, muß man unterhalb des Sättigungsbereiches des Rezeptors arbeiten (Abb. 6). Nach der Einstellung des Gleichgewichtes werden freies und Rezeptor-gebundenes Hormon getrennt und gemessen. Die Rezeptor-Konzentration in einer Präparation liegt normalerweise in der Größenordnung von  $<10^{-8}$  mol/l. Zur Messung derartig niedriger Konzentrationen werden Hormone mit spezifischen Aktivitäten von mehr als 10 Ci/mmol benötigt. In der Praxis haben sich Tritium- und, speziell für Proteohormone, Iodisotope eingebürgert. Die Anwesenheit eines oder mehrerer Tritiumatome in einem Molekül hat praktisch keinen Einfluß auf seine Affinität zum Rezeptor. Die Einführung eines Iodatoms, das etwa die Größe eines Benzolringes hat, kann aber durchaus zu sterischen und physikalisch-chemischen Veränderungen des Moleküls führen und seine Affinität zum Rezeptor verringern. Die Verhältnisse werden noch komplizierter dadurch, daß ein Proteohormon im allgemeinen mehr als eine iodierbare Aminosäure enthält. Es ist daher mit der Anwesenheit verschieden stark iodierter Analoga, die möglicherweise unterschiedliche Affinitäten zum Rezeptor haben, neben nichtiodiertem Hormon zu rechnen. Daß an verschiedenen Stellen monoiodierte Derivate eines Proteohormons den gesamten Bereich von unwirksam bis voll wirksam umfassen können, wurde durch die gezielte Synthese von Monoiod-Analoga des Insulins bewiesen<sup>[13-15]</sup>.

Die graphischen Darstellungen ermöglichen durch den Vergleich berechneter und experimenteller Kurven die Überprüfung theoretischer Bindungsmodelle. So weist eine Scatchard-Kurve, die vor dem linear abfallenden Bereich zunächst einen Anstieg mit einem Maximum zeigt, auf einen kooperativen Effekt bei der Komplexbildung hin (Abb. 7a).

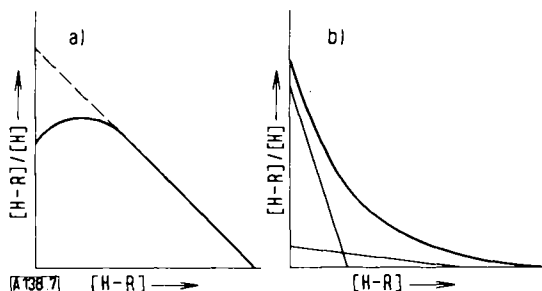


Abb. 7. Scatchard-Darstellung a) bei kooperativer Bindung und b) bei Anwesenheit von zwei Bindungsstellen.

Die graphische Darstellung der Scatchard-Gleichung ergibt gelegentlich durchgebogene Kurven. Dies kann auf das Vor-

handensein von mehr als einer Bindungsstelle zurückgeführt werden. Solche Kurven lassen sich näherungsweise graphisch<sup>[16]</sup> oder durch Iteration mit einem Computer in zwei oder mehr Geraden zerlegen (Abb. 7b). Für viele Hormone wie Insulin und Prostaglandine wurden auf diese Weise zwei Bindungsstellen nachgewiesen<sup>[17, 18]</sup>.

Eine nichtlineare Scatchard-Kurve kann ihre Ursache auch darin haben, daß kein einheitliches Hormon, sondern ein Gemisch aus Verbindungen mit unterschiedlichen Affinitäten vorlag. Dies ist vor allen Dingen bei Iod-markierten Proteohormonen zu erwarten<sup>[19, 20]</sup>.

Bei der „direkten“ Messung der Rezeptor-Bindung muß davon ausgegangen werden, daß neben der Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes auch das zweite Gleichgewicht – die Aktivierung des Cyclase-Systems oder des Rezeptor-Komplexes – erfaßt wird. Die erhaltenen scheinbaren Assoziationskonstanten sind zu hoch.

### 3.3. Die Bestimmung der Hormon-Rezeptor-Bindung nach der Methode der kompetitiven Protein-Bindung

Liegt die Testsubstanz (Hormon oder Hormonanalogen) nicht in radioaktiv markierter Form vor, muß die Methode der kompetitiven Protein-Bindung angewendet werden. Bei diesem Verfahren wird eine radioaktiv markierte Bezugssubstanz benötigt. Der vom Rezeptor gebundene Anteil der Bezugssubstanz wird durch die Testsubstanz herabgesetzt (Abb. 8). Diese Verringerung der Rezeptor-Bindung wird als Kompetition bezeichnet. Sie hängt von der Konzentration der Testsubstanz und von ihrer Affinität zum Rezeptor ab. Im Gegensatz zur „direkten“ Bestimmung der Bindung muß im Sättigungsbereich des Rezeptors gearbeitet werden. Nach der Inkubation sind die Bindungsstellen des Rezeptors abgesättigt. Die Folgereaktion (Aktivierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes oder des Cyclase-Systems) sollte daher keinen Einfluß auf das Verhältnis haben, in dem Bezugssubstanz und Testsubstanz vom Rezeptor gebunden werden.

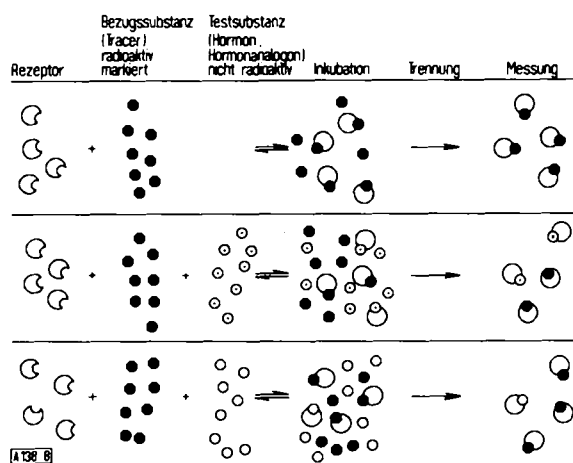


Abb. 8. Schematische Darstellung der kompetitiven Messung der Rezeptor-Bindung. ●: Radioaktiv markierte Bezugssubstanz (Tracer); ○: nicht radioaktive Testsubstanz (Hormon) mit der gleichen Affinität zum Rezeptor wie die Bezugssubstanz; ○: nicht radioaktive Testsubstanz (Hormon) mit kleinerer Affinität zum Rezeptor als die Bezugssubstanz.

Die mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz bei konstanter Konzentration der Bezugssubstanz erhaltenen Kompetitionskurven haben den für eine Protein-Bindung typischen sigmoiden Verlauf. Sie lassen sich innerhalb eines weiten

Bereiches linearisieren, z. B. durch die von Rodbard für den Radioimmuntest entwickelte logit-log-Transformation<sup>[21]</sup> (Abb. 9).

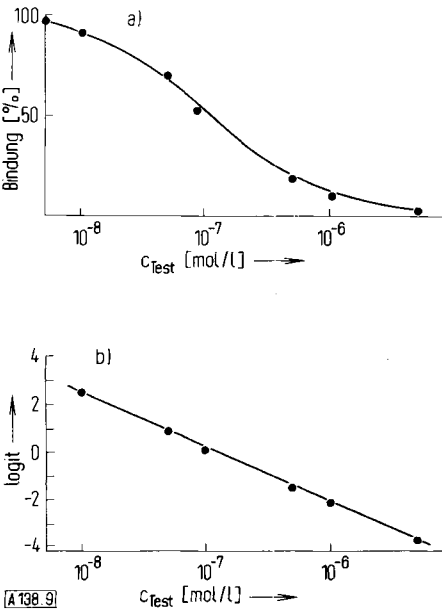


Abb. 9. a) Kompetitionskurve und b) deren Linearisierung durch logit-log-Transformation nach Rodbard [21].  $\ln[\% \text{ Bindung} / (100 - \% \text{ Bindung})] = f(\log c_{\text{Test}})$ . c<sub>Test</sub> = Konzentration der Testsubstanz.

Ein Nachteil der Methode der kompetitiven Protein-Bindung ist, daß die mit mehreren Testsubstanzen am gleichen Rezeptor erhaltenen Kompetitionskurven oft nicht parallel sind. Daher kann aus diesen Kompetitionskurven die relative Affinität nicht in einfacher Weise berechnet werden. Zu ihrer Bestimmung ist ein großer experimenteller und mathematischer Aufwand erforderlich. In der Praxis umgeht man dieses Problem dadurch, daß man willkürlich festgelegte Punkte dieser Kurven, meistens die der 50proz. Competition, miteinander in Beziehung setzt. Die Erfahrung mit nicht parallelen Kompetitionskurven kann durch Simulation am Analog-Computer und durch Berechnung solcher Kurven<sup>[22]</sup> bestätigt werden (Abb. 10).

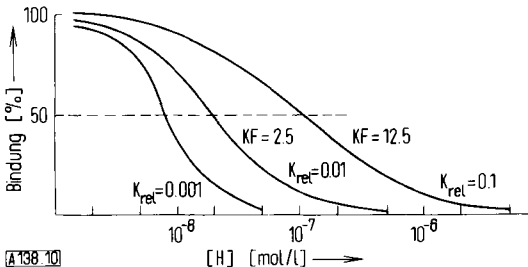


Abb. 10. Durch Simulation am Analog-Computer erhaltene Kompetitionskurven. K<sub>rel</sub> = relative Dissoziationskonstante (vorgegeben), KF = „Kompetitionsfaktor“. Einzelheiten siehe Text.

Die drei Kurven, die für relative Dissoziationskonstanten (K<sub>rel</sub>) von 0.1, 0.01 und 0.001 berechnet wurden, sind nicht parallel. Auch stehen die aus ihnen ermittelten Konzentrationen für 50proz. Competition nicht im Verhältnis 1:10 bzw. 1:100, sondern im Verhältnis 1:2.5 und 1:12.5. Diese Werte dürfen deshalb nicht als relative Affinität bezeichnet werden. Für sie wird der Begriff „Kompetitionsfaktor“ (KF) vorgeschlagen. Er ist definiert als Quotient aus den Konzentrationen

der Testsubstanz (c<sub>Test</sub>) und der Bezugssubstanz (c<sub>Ref.</sub>), die für 50proz. Competition erforderlich sind:

$$KF = \frac{c_{\text{Test}} \text{ bei } 50 \% \text{ Competition}}{c_{\text{Ref.}} \text{ bei } 50 \% \text{ Competition}}$$

4. Die Gewinnung von Rezeptor-Präparationen

Rezeptor-Präparationen werden bevorzugt aus typischen Erfolgsorganen des betreffenden Hormons gewonnen. Für manche Hormone eignen sich mehrere Gewebe (Tabelle 1).

Tabelle 1. Zur Gewinnung von Rezeptor-Präparationen geeignete Gewebe.

Hormon	Gewebe
ACTH (Adrenocorticotropes Hormon)	Nebenniere
Calcitonin	Niere, Knochen, Lymphocyten
Glucagon	Leber, Pankreas, Fettgewebe, Herz
Gonadotropine:	
HCG (Humanes Choriongonadotropin)	Testes, Ovar
LH/ICSH (Interstitialzellen-stimulierendes Hormon)	Testes, Ovar
FSH (Follikel-stimulierendes Hormon)	Ovar
Insulin	Leber, Fettgewebe, Lymphocyten, Muskel
Catecholamine	Myocard, Leber, Erythrocyten, Uterus, Fettgewebe, Gehirn
Oxytocin	Froschhaut, Mamma, Fettgewebe, Uterus
Prolactin	Mamma
Prostaglandine	Uterus, Ovar, Fettgewebe, Leber, Niere, Nebenniere, Schilddrüse, Thrombocyten

Welches Gewebe man wählt, richtet sich oft nach der zu bearbeitenden Fragestellung. So werden Zusammenhänge zwischen Insulin und dem Fettstoffwechsel vorteilhaft an den Rezeptoren der Fettzelle oder der Leber untersucht. Auch die Wahl der Tierspezies kann von Bedeutung sein. Für den Corticoid-Rezeptor<sup>[23]</sup> konnten z. B. von Spezies zu Spezies recht wesentliche Konzentrationsunterschiede in den Geweben nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Tabelle 2. Konzentration des Corticoid-Rezeptors in Ratten- und Kaninchen-geweben.

Gewebe	Juvenile Ratte	Juveniles Kaninchen
[pmol Rezeptor/mg Protein]		
Leber	0.64	0.12
Skelettmuskel	0.06	0.03
Herz	0.26	0.13
Gehirn	0.19	0.12
Niere	0.23	0.16
Testes	0.15	0.22
Thymus	0.45	0.65
Lunge	0.02	0.53
Magen	0.08	0.19
Milz	0.07	0.27

Die Isolierung eines Rezeptors ist sehr aufwendig. Daher wird in der Praxis häufig mit ziemlich rohen Rezeptor-Präparationen gearbeitet. Relativ einfach ist die Aufarbeitung der cytoplasmatischen Rezeptoren. Als Präparation wird fast ausschließlich das nach Homogenisierung des Gewebes und Zentrifugation zugängliche Cytosol verwendet.

Mehr Variationsmöglichkeiten bietet die Gewinnung einer Präparation des Membran-gebundenen Rezeptors. Beschrie-

ben ist das Arbeiten mit Zellen, die bereits als solche vorliegen (z. B. Erythrocyten, Lymphocyten) oder die durch proteolytische Enzyme aus einem größeren Zellverband freigesetzt werden (Leberzellen, Fettzellen usw.). Bei Verwendung ganzer Zellen läßt sich oft parallel zu den Hormon-Bindungsstudien eine biologische Folgereaktion messen, z. B. die Aktivierung des Adenylat-Cyclase-Systems. Häufiger als ganze Zellen werden meist recht unreine Membranfraktionen als Rezeptor-Präparation eingesetzt. Schließlich ist es gelungen, Membran-gebundene Rezeptoren durch Behandlung mit vorzugsweise nichtionischen Detergentien in Lösung zu bringen, ohne ihre Bindungsfähigkeit wesentlich zu beeinträchtigen. Allerdings steht der Beweis noch aus, daß ein solcher löslicher Hormon-Rezeptor-Komplex nach Rekonstitution noch eine biologisch relevante „intrinsic activity“ besitzt.

## 5. Die Durchführung des Rezeptor-Bindungs-Testes

Rezeptor-Präparation und Hormon müssen unter Bedingungen inkubiert werden, unter denen die Stabilität des Rezeptors und die Gleichgewichtseinstellung (siehe Abschnitt 3.1) gewährleistet sind. Mit den nicht sehr stabilen löslichen (cytoplasmatischen) Rezeptoren wird häufig zwischen 4 und 15°C, seltener bei höheren Temperaturen gearbeitet. Inkubationen mit den stabileren Membran-gebundenen Rezeptoren werden oft bei Raumtemperatur, gelegentlich auch bei 37°C durchgeführt. Zur Einstellung des Gleichgewichts genügen im allgemeinen wenige Minuten bis einige Stunden. Besondere Beachtung erfordert die Trennung von freiem und Rezeptor-gebundenem Hormon; sie sollte unter Bedingungen vorgenommen werden, unter denen eine möglichst geringe Dissoziation des Hormon-Rezeptor-Komplexes zu erwarten ist. Im allgemeinen sind Kompromisse zwischen optimalen Trennverfahren und rationeller Durchführung erforderlich.

In der Literatur sind Verfahren beschrieben, die auf sehr verschiedenen Trennprinzipien beruhen. Unterschiede in der Dichte werden bei der Trennung mit der Ultrazentrifuge ausgenutzt<sup>[23a]</sup>. Bei großen Dichteunterschieden, z. B. bei Membranfraktionen oder ganzen Zellen, reicht eine niedertourige Zentrifugation aus<sup>[40]</sup>. Ein besonders elegantes Verfahren für Fettzellen ist die Flotation durch eine Ölschicht mittleren spezifischen Gewichtes<sup>[23b]</sup>. Eine Trennung nach der Molekülgröße gelingt an Membranfiltern<sup>[23c]</sup> oder durch Gelchromatographie<sup>[23d]</sup>. Unterschiede in der Ladung werden bei der Gelelektrophorese ausgenutzt<sup>[23e]</sup>. Eine Trennung ist auch durch Bindung des freien Hormons an Adsorbentien möglich. Diese Adsorptionsverfahren, speziell mit Dextran-behandelter Aktivkohle, werden häufig angewendet. Sie haben allerdings den Nachteil, daß sich die hohe Affinität des Adsorptionsmittels zum Hormon störend auf das Gleichgewicht auswirken kann. Bei allen Trennverfahren ist es empfehlenswert, zur Zurückdrängung der Dissoziation des Hormon-Rezeptor-Komplexes bei tiefen Temperaturen zu arbeiten.

## 6. Anwendungsmöglichkeiten des Rezeptor-Bindungs-Testes

Nach der Diskussion der theoretischen und methodischen Grundlagen des Rezeptor-Bindungs-Testes soll seine Anwendung an einigen Beispielen besprochen werden.

### 6.1. Der Radiorezeptor-Test als Methode der quantitativen Hormon-Bestimmung

Der Radiorezeptor-Test kann wie ein radioimmunologischer Test<sup>[22a]</sup> zur Bestimmung von Hormon-Konzentrationen in Geweben und Körperflüssigkeiten dienen. Anstelle von Antikörpern wird eine Hormon-spezifische Rezeptor-Präparation verwendet.

Während mit dem Radioimmunotest strukturell ähnliche Verbindungen, unabhängig von ihrer biologischen Wirkung, gemessen werden, erfaßt der Radiorezeptor-Test Substanzen mit der Hormon-spezifischen biologischen Aktivität, unabhängig davon, ob sie mit dem originalen Hormon verwandt sind.

Ein Nachteil ist die im Vergleich zu den Immunglobulinen häufig geringere Stabilität der Rezeptoren. Dies gilt in besonderem Maße für die cytoplasmatischen Rezeptoren. Mit diesen ist ein Radiorezeptor-Test bisher auch nur für Östradiol bekannt geworden<sup>[24]</sup>. Für Hormone mit den stabileren Membran-gebundenen Rezeptoren wurden Tests für ACTH<sup>[25]</sup>, Glucagon<sup>[26]</sup>, Insulin<sup>[27]</sup>, Wachstumshormon<sup>[28]</sup> und die Gonadotropine<sup>[29-31]</sup> sowie für Prostaglandin E<sub>2</sub><sup>[32]</sup> beschrieben. Auf der Basis des Rezeptor-Testes für HCG (Humanes Choriongonadotropin) konnte ein höchst empfindlicher Schwangerschaftstest ausgearbeitet werden, der einen Nachweis der Schwangerschaft bereits sechs bis acht Tage nach der Konzeption erlaubt<sup>[33]</sup>.

### 6.2. Der Rezeptor-Bindungs-Test zur Charakterisierung endokriner Störungen

In einigen Fällen ist es gelungen, einen Zusammenhang zwischen endokrinen Erkrankungen und dem Rezeptor-Gehalt der beteiligten Gewebe nachzuweisen. Besonders gut untersucht ist der Zusammenhang von Störungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels mit dem Gehalt an Insulin-Rezeptoren. Beim Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel von Mensch und Tier gibt es eine Reihe pathologischer Zustände, die durch erhöhte oder erniedrigte Insulin-Spiegel im Plasma charakterisiert sind<sup>[34]</sup>. Die in diesen Fällen gemessenen Konzentrationen an Insulin-Rezeptor scheinen sich umgekehrt wie die Insulin-Konzentration zu verhalten (Tabelle 3). Daraus könnte geschlossen werden, daß das Insulin selbst die Rezeptor-Konzentration reguliert. Da bei hohen Insulin-Spiegeln das Gleichgewicht stark auf der Seite der Komplex-Bildung liegt, genügt für die physiologische Wirkung des Insulins eine geringe Anzahl von Rezeptoren. Umgekehrt wird bei niedrigen Insulin-Konzentrationen die Bildung des Komplexes durch eine Zunahme der Rezeptor-Konzentration gefördert<sup>[35, 36]</sup>. Am Tier und am Menschen konnte gezeigt werden, daß nach Normalisierung des pathologischen Zustandes, z. B. durch eine geeignete Diät, mit dem Erreichen normaler Insulin-Spiegel auch weitgehend normale Rezeptor-Konzentrationen erhalten werden.

Besonderes Interesse beansprucht zur Zeit die Bestimmung von Östrogen-Rezeptoren bei Brustkrebs (Mammacarcinom). In etwa der Hälfte der untersuchten Tumorgewebe konnten Östrogen-Rezeptoren nachgewiesen werden. In diesen Fällen hängt das Wachstum der Tumoren von der Anwesenheit von Östrogenen ab (Hormon-abhängige Tumoren). Die durch Östrogene nicht beeinflussbaren Tumoren werden als autonom bezeichnet<sup>[37-39]</sup>. Im Falle Östrogen-abhängiger Tumoren be-

Tabelle 3. Beziehung zwischen Insulin-Konzentration im Plasma und Insulin-rezeptor-Konzentration (gemessen an verschiedenen Geweben) bei endokrinen Störungen. ↑: erhöhte, ↓: erniedrigte Konzentrationen.

	Insulin-Konzentration	Rezeptor-Konzentration
Mensch:		
Fettsucht	↑	↓
Fettsucht + Diät	normal	normal
Altersdiabetes	normal oder ↑	↓
Altersdiabetes + Sulfonylharnstoff	normal	normal
Tier:		
Diabetes (Streifenhamster)	↓	↑
Hypophysectomie	↓	↑
Adrenalectomie	↓	↑
Corticoid-Überschuß	↑	↓

steht eine gute Prognose, durch Behandlung mit Antiöstrogenen, seltener auch mit Androgenen, eine Regression zu erreichen. Zur Ausschaltung der Produktion endogener Hormone wird die Hormontherapie oft durch Ovariectomie, Adrenalectomie, gelegentlich auch durch Hypophysectomie, unterstützt. In etwa 60 % der Fälle kann so eine Besserung erreicht werden. Bei autonomen Tumoren sind Hormonbehandlung und unterstützende ablative chirurgische Maßnahmen praktisch immer ohne Erfolg. Hier ist eine Behandlung mit Cytostatika erforderlich (Abb. 11).

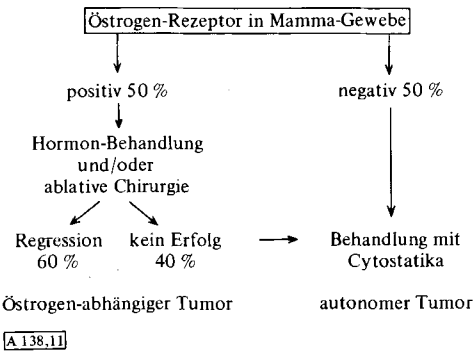


Abb. 11. Behandlungsmöglichkeiten des Mammacarcinoms je nach seinem Gehalt an Östrogen-Rezeptor.

Der Rezeptor-Bindungs-Test ermöglicht eine Zuordnung des Tumors und damit die Festlegung der notwendigen Behandlungsform. Im Falle autonomer Tumoren können so die sehr drastischen chirurgischen Eingriffe vermieden werden.

6.3. Der Rezeptor-Bindungs-Test zur Ermittlung von Struktur-Affinitäts-Beziehungen

Der Rezeptor-Bindungs-Test spielt eine bedeutende Rolle bei der Erforschung der Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung von Hormonen. Wesentliches Ziel dieser verallgemeinert auch als „Drug Design“ bezeichneten Arbeiten ist die Entwicklung von Wirkstoffen, die dem nativen Hormon überlegen sind. Von Interesse können Verbindungen mit verstärkter Wirkung sein, die durch eine höhere Konzentration am Wirkort, Steigerung der Affinität zum Rezeptor oder Erhöhung der „intrinsic activity“ des Hormon-Rezeptor-Komplexes erreicht werden kann (vgl. Abb. 1). Viele Hormone haben ein breites Spektrum biologischer Wirkungen. Aus pharmakologischer Sicht sind oft solche Verbindungen von Interesse, die eine dieser Wirkungen in verstärktem Maße besitzen.

Für Insulin konnte der Einfluß von Modifikationen auf die Bindung an den Rezeptor nachgewiesen werden<sup>[40-42]</sup>. Verschiedene Insulin-Analoga werden an Fettzellen oder an Leberzell-Membranen in geringerem Ausmaß als das native Hormon gebunden. Meistens geht auch die in vitro gemessene biologische Aktivität zurück. Dabei kann mit einer von der Modifikation abhängigen, ausreichend hohen Konzentration immer der maximale biologische Effekt erreicht werden. Durch die Modifizierung wird demnach zwar die Affinität zum Rezeptor, nicht aber die „intrinsic activity“ des Rezeptor-Komplexes verändert. Die Untersuchungen am Insulin wurden dadurch erleichtert, daß Modifizierungen am Molekül in überschaubarer Weise möglich sind. Eine Abspaltung der N- oder C-terminalen Aminosäuren der A-Kette oder die Abspaltung eines C-terminalen Penta- oder Octapeptids der B-Kette führt zu einem deutlichen Affinitätsverlust. Im Gegensatz dazu wird die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure der B-Kette durchaus toleriert (Abb. 12).

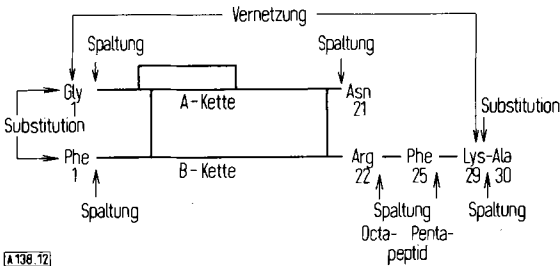


Abb. 12. Modifizierungen am Insulin.

Durch Substitution der terminalen Aminogruppen oder durch Einführung intramolekularer Brücken wird die Affinität verringert, geht aber nicht völlig verloren. Viele dieser Derivate bewirken dennoch in vivo eine relativ starke Blutzuckersenkung. Dieser Effekt wird durch die höhere Stabilität des modifizierten Moleküls gegenüber dem enzymatischen Abbau in der Leber erklärt.

Als weiteres Beispiel soll die Rezeptor-Bindung von Glucocorticoiden dienen (Abb. 13)<sup>[43]</sup>. Ausgehend von Cortisol führt der Verzicht auf die 11β-Hydroxyl-Gruppe (Cortexolon), nicht aber auf die 17α-Hydroxyl-Gruppe (Corticosteron) zu einer Verringerung des gebundenen Anteils. Eine Oxidation zum 11-Keton (Cortison) beeinträchtigt die Affinität stark. Die trotzdem vorhandene biologische Aktivität der 11-Oxo-corticoide ist auf ihre in-vivo-Reduktion zum 11-Hydroxyderivat zurückzuführen. Durch Einführung einer 1,2-Doppelbindung (Prednisolon) wird eine höhere Affinität zum Rezeptor erreicht. Dabei steigt auch die biologische Wirkung. Glucocorticoide mit noch stärkerer Bindung an den Rezeptor werden durch die Einführung von Fluoratomen in die 9α- oder 6α-Stellung erhalten. Vorteilhaft ist auch eine Methyl-Gruppe in 16α-Stellung. Die Veresterung der 21-Hydroxy-Funktion mit einer kurzkettigen Carbonsäure hat praktisch keinen Einfluß auf den gebundenen Anteil. Erst der Ester mit der längerkettigen Valeriansäure wird vom Rezeptor in geringerem Maß gebunden.

Eine neue Klasse von Glucocorticoiden<sup>[44]</sup> sind die Pregnadien-21-carbonsäureester. Sie werden, abhängig von der Kettenlänge der Alkoholkomponente, mäßig bis gut vom Rezeptor gebunden. Trotz dieser Affinität sind die Derivate in allen systemischen Entzündungstesten unwirksam. Grund dafür ist

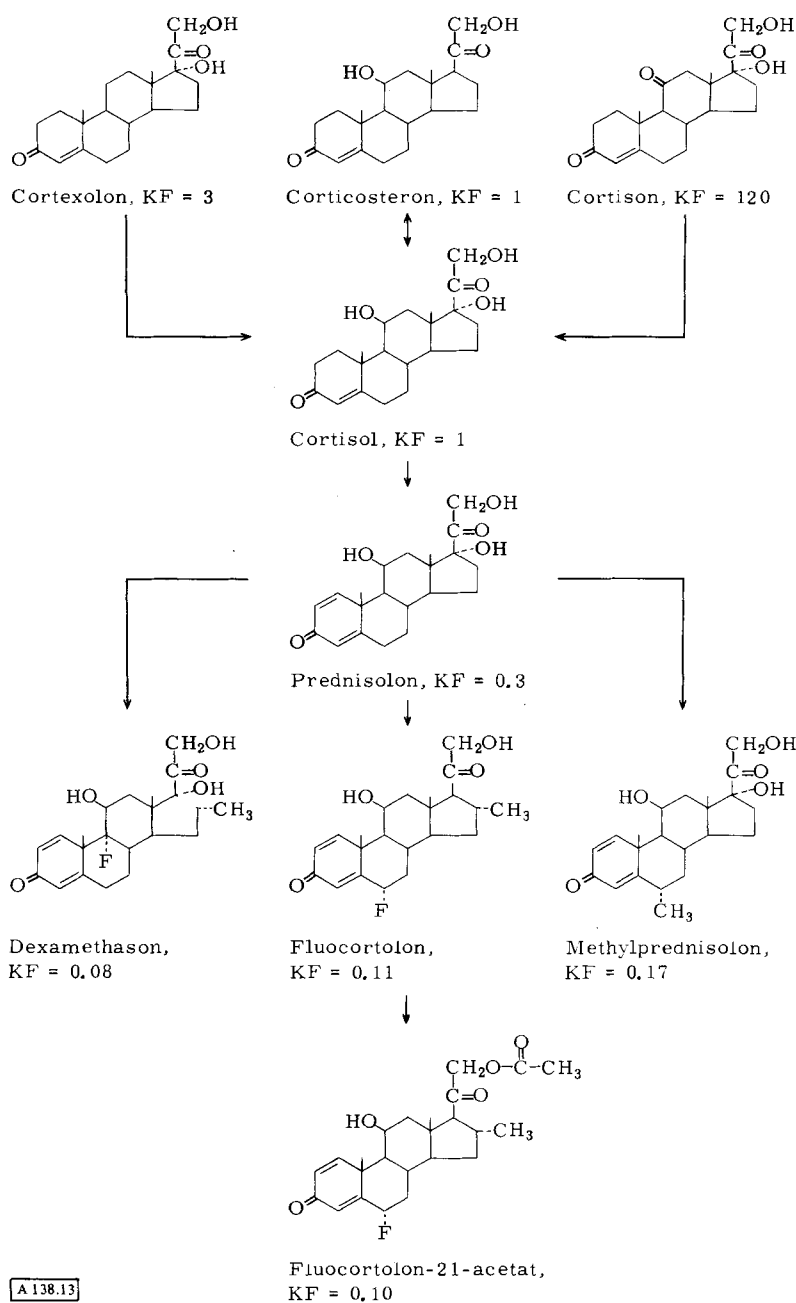


Abb. 13. Bindung von Glucocorticoiden an den Rezeptor (Rattenthyms). KF = „Kompetitionsfaktor“ (siehe Abschnitt 3.3).

die schnelle Hydrolyse zur freien Säure, die keine Affinität zum Rezeptor besitzt (Abb. 14).

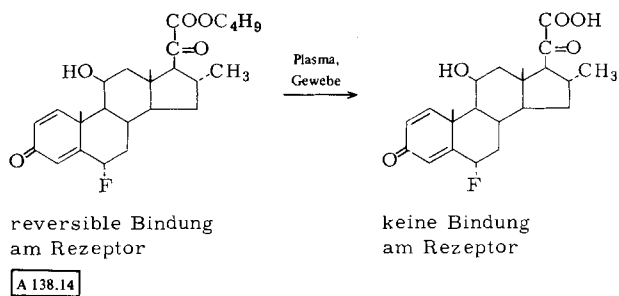


Abb. 14. Topisch wirksames Corticoid mit einer „Sollbruchstelle“ zur Verhinderung einer systemischen Wirkung.

Als topische Entzündungshemmer mit praktisch fehlenden systemischen Nebenwirkungen sind diese Verbindungen von sehr großem Interesse.

## 7. Ausblick

Seit der Beschreibung des ersten Rezeptor-Proteins sind viele Aspekte des Hormon-Rezeptor-Gebietes bearbeitet worden. Trotzdem bleiben Fragen unbeantwortet, z. B. nach der Isolierung und Charakterisierung der Rezeptor-Proteine, nach der Aminosäuresequenz und Konformation oder nach der Struktur des Rezeptor-Moleküls als Teil der Zellmembran. Unbekannt sind weiterhin der Mechanismus der Rezeptor-gesteuerten Gen-Expression und die Regulation der Rezeptor-Biosynthese.



Neuere Ergebnisse auf all diesen Gebieten werden zur Vertiefung unseres Wissens über die Hormonwirkung beitragen.

Eingegangen am 4. Juni 1976 [A 138]

- [1] E. J. Ariëns, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 99, 32 (1954).
- [2] E. J. Ariëns, J. M. van Rossum u. A. M. Simonis, Arzneim.-Forsch. 6, 282 (1956).
- [3] P. Ehrlich, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 42, 17 (1909).
- [4] E. V. Jensen u. H. I. Jacobson, Recent Prog. Horm. Res. 18, 387 (1962).
- [5] P. Cuatrecasas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 450 (1969).
- [6] R. J. Lefkowitz, J. Roth, W. Pricer u. I. Pastan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 745 (1970).
- [7] T. Goodfriend u. S.-Y. Lin, Clin. Res. 17, 243 (1969).
- [7a] K. Lübke, E. Schröder u. G. Kloss in: Taschenlehrbuch der organischen Chemie. Thieme, Stuttgart 1975, Band 2, S. 212.
- [8] P. Cuatrecasas, Biochem. Pharmacol. 23, 2353 (1974).
- [9] E. Milgrom, M. Atger u. E.-E. Baulieu, Biochim. Biophys. Acta 320, 267 (1973).
- [10] E. V. Jensen, S. Mohla, T. A. Gorell u. E. R. de Sombre, Vitam. Horm. N. Y. 32, 89 (1974).
- [11] J. M. Boeynaems u. J. E. Dumont, J. Cycl. Nucleotide Res. 1, 123 (1975).
- [12] G. Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949).
- [13] C. J. Garratt, D. M. Harrison u. M. Wicks, Biochem. J. 126, 123 (1972).
- [14] J. L. Hamlin u. E. R. Arquilla, J. Biol. Chem. 249, 21 (1974).
- [15] S. Linde u. B. Hansen, Int. J. Pept. Protein Res. 6, 157 (1974).
- [16] H. E. Rosenthal, Anal. Biochem. 20, 525 (1967).
- [17] P. Freychet, Diabete Metabol. (Paris) 1, 57 (1975).
- [18] E. Schillinger u. G. Prior in B. Samuelsson u. R. Paoletti: Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research. Raven Press, New York 1976, Bd. 1, S. 259.
- [19] H. J. G. Hollemans u. R. M. Bertina, Clin. Chem. 21, 1769 (1975).
- [20] S. I. Taylor, Biochemistry 14, 2357 (1975).
- [21] D. Rodbard, W. Bridson u. P. L. Rayford, J. Lab. Clin. Med. 74, 770 (1969).
- [22] J. Riemann u. H. Ellmer, Schering AG, persönliche Mitteilung.
- [22a] H. G. Eckert, Angew. Chem. 88, 565 (1976); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 15, 525 (1976).
- [23] P. L. Ballard, J. D. Baxter, S. J. Higgins, G. G. Rousseau u. G. M. Tomkins, Endocrinology 94, 998 (1974).
- [23a] D. Toft u. J. Gorski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1574 (1966).

- [23b] J. Gliemann, K. Osterlind, J. Vinten u. S. Gammeltoft, Biochim. Biophys. Acta 286, 1 (1972).
- [23c] J. Bockaert, Ch. Roy, R. Rajerison u. S. Jard, J. Biol. Chem. 248, 5922 (1973).
- [23d] M. Töpert, I. Zabel u. M. Ziegler, Anal. Biochem. 62, 514 (1974).
- [23e] R. K. Wagner: Endokrinologie der Entwicklung und Reifung. Springer, Berlin 1970, S. 407.
- [24] S. G. Korenman, L. E. Perrin u. T. P. McCallum, J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 879 (1969).
- [25] R. J. Lefkowitz, J. Roth u. I. Pastan, Science 170, 633 (1970).
- [26] S. L. Pohl u. L. R. Chase, Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 256, 504 (1972).
- [27] J. R. Gavin III, C. R. Kahn, P. Gorden, J. Roth, D. M. Neville Jr. u. R. E. Humbel, Diabetes 22, Suppl. 1, 306 (1973).
- [28] P. Gorden, M. A. Lesniak, C. M. Hendricks u. J. Roth, Science 182, 829 (1973).
- [29] R. P. C. Shiu, P. A. Kelly u. H. G. Friesen, Science 180, 968 (1973).
- [30] K. J. Catt, M. L. Dufau u. T. Tsuruhara, J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 123 (1972).
- [31] Y. Tomoda, T. Miwa u. N. Ishizuka, J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 644 (1975).
- [32] J. C. Froelich, T. W. Wilson, M. Smigel u. J. A. Oates, Biochim. Biophys. Acta 348, 241 (1974).
- [33] B. B. Saxena, S. H. Hasan, F. Haour u. M. Schmidt-Gollwitzer, Science 184, 793 (1974).
- [34] J. Roth, C. R. Kahn, P. de Meyts u. P. Gorden in: Workshop on Hormone and Antihormone Action at the Target Cell. Abakon Verlagsgesellschaft, Berlin 1976, S. 87.
- [35] J. M. Amatruda, J. N. Livingston u. D. H. Lockwood, Science 188, 264 (1975).
- [36] J. R. Gavin III, J. Roth, D. M. Neville Jr., P. de Meyts u. D. N. Buell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 84 (1974).
- [37] E. V. Jensen, Cancer Res. 35, 3362 (1975).
- [38] W. L. McGuire, Cancer (Philadelphia) 36, 638 (1975).
- [39] H. Maass, B. Engel, G. Trams, H. Nowakowski u. G. Stolzenbach, J. Steroid Biochem. 6, 743 (1975).
- [40] P. Freychet, J. Roth u. D. M. Neville Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1833 (1971).
- [41] J. Gliemann u. S. Gammeltoft, Diabetologia 10, 105 (1974).
- [42] P. Freychet, D. Brandenburg u. A. Wollmer, Diabetologia 10, 1 (1974).
- [43] M. Töpert, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [44] H. Laurent, E. Gerhards u. R. Wiechert, J. Steroid Biochem. 6, 185 (1975).

## ZUSCHRIFTEN

Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einsendung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vordringliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

### Konformationsuntersuchungen an zwölfgliedrigen Heterocyclen. Kristallstruktur von 5,18-Dimethyl-5,18-diazatribenzo[*a,e,i*]cyclododecen-6,17(5*H*,18*H*)-dion

Von W. David Ollis, Julia Stephanidou Stephanatou, J. Fraser Stoddart, Andrew Quick, Donald Rogers und David J. Williams[\*]

Synthese und Konformationsverhalten von *N,N',N''*-Trime-thyl-<sup>(1)</sup> und *N,N',N''*-Tribenzyltrianthranilid<sup>(2)</sup> sind vor kurzem beschrieben worden. Wir berichten jetzt über die Konformationseigenschaften der *N,N'*-Dimethyl- (2) und *N,N'*-Di-benzyl-Derivate (3) des zwölfgliedrigen ungesättigten Bislac-tams (1)<sup>(3)</sup>.

[\*] Prof. Dr. W. D. Ollis [ + ], Dr. J. F. Stoddart und J. S. Stephanatou  
Department of Chemistry, The University  
Sheffield S3 7HF (England)

Prof. Dr. D. Rogers, Dr. A. Quick und D. J. Williams [ + ]  
Chemical Crystallography Laboratory, Imperial College  
London SW7 2AY (England)

[ + ] Korrespondenzautoren.