

6. Zusammenfassung

Es wird erstmalig eine Methode zur Reinigung und Charakterisierung von Luteinisierungs-Hormon-Rezeptor-Bindungs-Inhibitor (LH-RBI) aus bovinem Corpus luteum beschrieben.

Isoliertes Gelbkörpergewebe wurde in kalter Kochsalzlösung homogenisiert, über Nacht gerührt und zweimal mit 25000 U/min zentrifugiert. Durch Zusatz des gleichen Volumens Propanol präzipitierten die Proteine des Cytosols, die durch Zentrifugation und anschließende Lyophilisation gewonnen werden konnten.

Die LH-RBI - Aktivität wurde mittels aufeinanderfolgender Chromatographien auf Sephadex G-50, Anionenaustauscher, Orange-A-Farbstoff, Chelat-Sepharose und durch HPLC isoliert.

Die biologische Aktivität wurde bestimmt über die Fähigkeit der Fraktionen, in vitro die Bindung von markiertem hCG an porcine Granulosazellen zu hemmen.

Die Aktivität eluierte im Totvolumen von Sephadex G-50; in der Ionenaustausch-Chromatographie durch schrittweise Erhöhung des NaCl-Gradienten, konnte sie mit 0.5 M und 1 M NaCl eluiert werden. Sie wurde weder an Orange-A noch an Chelat-Sepharose gebunden.

Die Spezifische Aktivität, die zu einer hCG-Bindungshemmung von 50 % führte, konnte bis zur HPLC-Fraktion um den Faktor 8250 gesteigert werden.

Weiterhin wurde der Einfluß der LH-RBI-Fraktionen auf die basale Sekretion von Progesteron und Estradiol durch porcine Granulosazellen in vitro untersucht. In vivo wurde die Wirkung der Substanz auf die Progesteronsekretion und Ovulation an unreifen, Gonadotropin-stimulierten weiblichen Ratten überprüft.

Die OAUB-Fraktion hemmte *in vitro* die basale Estradiol- und Progesteronsekretion porciner Granulosazellen; *in vivo* hemmte diese Proteinfraction deutlich sowohl die Progesteronsekretion als auch die Ovulation, was durch die niedrigen Oocytenzahlen bei den behandelten Tieren belegt werden konnte.

Das Molekül schien nach dem zweiten HPLC-Schritt homogen zu sein. Elektrophoretisch war eine schwach gefärbte Bande zu sehen, welche dicht der Hauptbande folgte.

Der pI der Kupferchelate-Probe bewegte sich im Bereich von 4.5 - 5, und das Molekulargewicht, ermittelt durch SDS-Elektrophorese lag unter 15000.

Bevor die Substanz sequenziert werden kann, ist eine weitere Reinigung erforderlich.

7. Summary

Walter Kail

Purification and Characterization of Luteinizing-Hormone-Receptor-Binding-Inhibitor from Bovine Corpus Luteum

This is a first report on the purification and characterization of LH-Receptor-Binding-Inhibitor (LH-RBI) from bovine corpus luteum.

Cleaned corpora luteal tissues were homogenized in cold saline, extracted overnight, centrifuged twice at 25000 g. Proteins from the cytosol were precipitated by adding equal volumes of n-propanol, recovered by centrifugation and dried.

The LH-RBI activity was isolated by sequential chromatography on Sephadex G-50, DEAE-ion exchange, orange A dye matrix, chelating sepharose and by HPLC.

The biological activity was assessed by the ability of the fractions to inhibit the binding of radiolabelled hCG to porcine granulosa cells in vitro.

The activity eluted in the void volume of Sephadex G-50. In the ion exchange chromatography using step-wise salt gradient, it could be eluted with 0.5 and 1 M NaCl. It did not bind either to orange A or chelating sepharose.

The specific activity (to effect 50% inhibition of hCG binding) of the final fraction increased by 8250 after HPLC.

In addition the fractions were tested for their influence on the basal secretion of progesterone and estradiol by porcine granulosa cells in vitro. In vivo the effect of the substance on progesterone secretion and ovulation in immature, gonadotropin stimulated female rats was examined.

The OAUB fraction also inhibited the basal secretion of estradiol and progesterone by porcine granulosa cells in vitro, and in vivo, OAUB significantly inhibited both progesterone secretion and ovulation as judged by the decrease in oocyte number following treatment.

The molecule was apparently homogeneous by HPLC. Electrophoretically, one major band followed closely by a faintly stained band was visible.

The pI of the final product was in the range of 4.5 - 5, and the molecular weight, as tested by SDS-electrophoresis, was less than 15000.

Further steps of purification are necessary before any sequence analysis can be carried out.