

## FRAKTIONIERUNG HANDELSÜBLICHEN INSULINS. DAS VERHALTEN VON PROINSULIN IN DER ULTRAZENTRIFUGE

H. ZÜHLKE

*Institut für Diabetes "Gerhardt Katsch", Bereich experimentelle Diabetesforschung,  
Karlsburg/Greifswald, Germany*

und

J. BEHLKE

*Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität, Greifswald, Germany*

Eingegangen am 4. November 1968

Bovine insulin can be split into several fractions by gel filtration on Sephadex G50. These are, in order of decreasing molecular weight, a new unidentified substance, proinsulin, and a large fraction containing several substances. Ultracentrifugal examination of the proinsulin in acetic acid solution (pH 2.3) gave a molecular weight of 9300 and evidence of an association-dissociation equilibrium.

Handelsübliches, aus Pankreas gewonnenes Insulin enthält Proinsulin, wie Steiner [1], Yip und Lin [2] sowie Chance u.a. [3] fanden. Da für unsere Untersuchungen über Beziehungen zwischen Struktur und biologischer bzw. immunologischer Wirkung des Insulins das reine Proteohormon erforderlich ist, mußte das umkristallisierte Insulin einem weiteren Reinigungsprozeß unterworfen werden,

Mittels Sephadexgel-Chromatografie konnten auch wir ein Produkt erhalten, das ein im Vergleich zum Insulin höheres Molekulargewicht aufweist und Proinsulin darstellt.

100 mg 10 X umkristallisiertes Rinder-Insulin vom VEB Berlin-Chemie wurden auf eine Säule (150 X 1,8 cm) gegeben, die mit Sephadex G50 gefüllt war. Als Elutionsmittel diente 1 m Essigsäure (pH 2,3).

Die mit Hilfe eines Uvicord II der Fa. LKB Stockholm erhaltene Extinktionskurve ( $O.D_{280\text{ nm}}$ ) ist in Abb. 1 dargestellt. Die Rechromatografie der Fraktion  $\alpha$  über eine Säule (55 X 1,2 cm) mit Sephadex G50 (Elutionsmittel 1 m  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 2,3) ergab das in Abb. 2 dargestellte Bild. Die Ausbeute an  $\alpha_2$  betrug 3–5%, die an  $\alpha_1$  etwa 0,5%. Die angegebenen Bilder der Gelchromatografie weisen darauf hin, daß

es sich bei der Fraktion  $\alpha_2$  (Abb. 2) um Pro-Insulin handelt. Dieser Befund wird unter anderem durch die Ergebnisse der analytischen Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese, der Testung der biologischen Aktivität nach [4] (über diese Ergebnisse wird an anderer Stelle berichtet) und die Untersuchungen in der Ultrazentrifuge unterstützt. Letztere Resultate sollen im Folgenden mitgeteilt werden.

Das Proinsulin wurde in 1 m  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH 2,3) aufgenommen und das Sedimentations- und Diffusionsverhalten in einer analytischen Ultrazentrifuge G 110 von MOM, Budapest, studiert. Wegen des niedrigen Molekulargewichtes der einheitlich sedimentierenden Substanz arbeiteten wir mit einer 2-Sektoren-Überschichtungszelle. Die Sedimentationskoeffizienten, in Abb. 3a dargestellt, zeigen eine geringe positive Konzentrationsabhängigkeit (Regressionsgerade).

Die durch Extrapolation auf die Konzentration Null ermittelte Sedimentationskonstante  $s_{20,W}^0$  beträgt 1,34 [S]. Die Diffusionskoeffizienten nehmen ebenfalls mit steigender Konzentration höhere Werte an (Abb. 3b). Die Diffusionskonstante  $D_{20,W}^0$  wurde zu 12,9 [F] ermittelt. Diese beiden Parameter dienten zur Bestimmung der Molmasse nach der Svedberg-

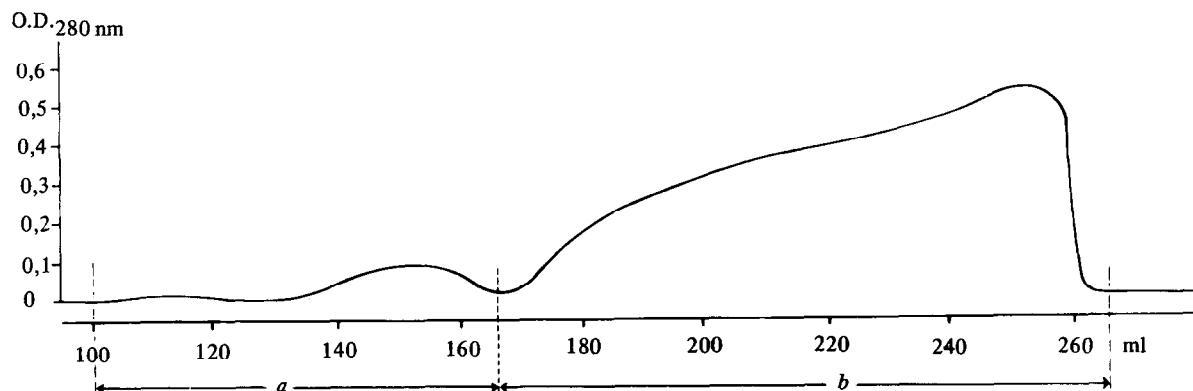


Abb. 1. Gelchromatografie von Rinderinsulin an Sephadex G50. Elutionsmittel: 1 m  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Abmessungen der Säule: 150  $\times$  1,8 cm.

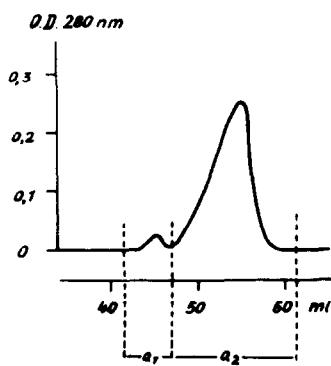


Abb. 2. Rechromatografie des Teils  $a$  (Abb. 1) über Sephadex G50. Elutionsmittel: 1 m  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Abmessungen der Säule: 55  $\times$  1,2 cm.

Gleichung [5]. Das zusätzlich benötigte partielle spezifische Volumen errechneten wir nach Schachman [6] unter Verwendung der von Chance u.a. [3] mitgeteilten Aminosäure-Zusammensetzung zu 0,729. Das mit Hilfe der genannten Daten bestimmte Molgewicht für Pro-Insulin beträgt 9.300 (Abb. 4). Dieser Wert differiert nur geringfügig von dem theoretischen Wert, 9080, der auf Grund der AS-Analyse errechnet wurde [3].

Da Insulin in saurem Milieu leicht Assoziate bildet,

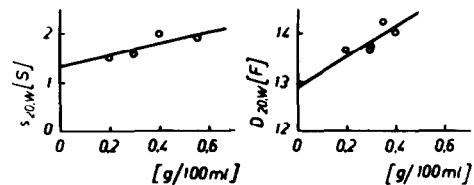


Abb. 3. Sedimentations- (a) und Diffusionskoeffizienten (b) des Proinsulins in Abhängigkeit von der Konzentration in 1 m  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH 2,3).

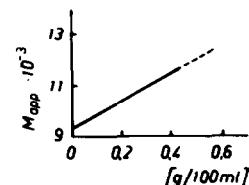


Abb. 4. Scheinbares Molekulargewicht (theoretische Kurve) auf Grund der in Abb. 3a und b dargestellten molekularen Parameter. Bedingungen vgl. Abb. 3.

deren Größe wesentlich durch die Proteinkonzentration und den pH-Wert bestimmt wird [7], war eine entsprechende Untersuchung des Pro-Insulins von Interesse. Die Analyse der scheinbaren Molgewichte dieser Substanz in 1 m  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH 2,3) weist auf die Existenz eines Assoziations-Dissoziationsgleichgewichtes hin (Abb. 4). Das konnte auch durch die Ermittlung des 2. Virialkoeffizienten von  $-28.2$  [ $\text{Atm} \cdot \text{ml}^2 \cdot \text{g}^{-2}$ ] nach Elias [8] bewiesen werden. Ein ähnliches Verhalten des Proinsulins wurde kürzlich

von Frank und Veros [9] in Glycinpuffer bei pH 2,0 gefunden.

Mit der näheren Charakterisierung des Peaks  $\alpha_1$  (Abb. 2) und der Fraktionierung des Substanzgemisches (Abb. 1, Peak  $b$ ) sind wir zur Zeit noch beschäftigt.

Für das fördernde Interesse an der vorliegenden Arbeit sind wir Herrn Dozent Dr. H.G.Lippmann und Herrn Professor Dr. W.Scheler zu Dank verpflichtet. Fräulein Laars möchten wir für die fleißige technische Mitarbeit danken.

### Referenzen

- [1] D.F.Steiner, Trans. N.Y. Acad. Sci. Series II, 30 (1967) 60.
- [2] C.C.Yip und B.J.Lin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 29 (1967) 382.
- [3] R.E.Chance, R.M.Ellis and W.W.Bromer, Science 161 (1968) 165.
- [4] H.G.Lippmann und H.Hommel, Acta biol. med. german., im Druck.
- [5] T.Svedberg und K.O.Petersen, Die Ultrazentrifuge (Steinkopff-Verlag, Dresden, 1940).
- [6] H.K.Schachman, in: Methods in Enzymology, Hrsg. S.P. Colowick und N.O.Kaplan (Academic Press, New York, 1957) S. 32.
- [7] P.D.Jeffrey und J.H.Coates, Biochemistry 5 (1966) 489, 3820.
- [8] H.G.Elias, Ultrazentrifugen-Methoden (Beckman Instr. GmbH, 1961).
- [9] B.H.Frank und A.A.J.Veros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 32 (1968) 155.