

## VERGLEICHENDE ANALYSE DER GEGEN RINDERPROINSULIN UND RINDERINSULIN GEBILDETEN ANTIKÖRPER

L. KERP\*, S. STEINHILBER und D. D. SCHMIDT

*Medizinische Universitätsklinik Freiburg i. Br. und  
Biochemisches Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG, Wuppertal-Elberfeldt*

Received 23 March 1970

Guinea-pig antisera to bovine insulin and proinsulin were analysed and the association constants and the concentrations of combining sites specific for insulin and for the C-chain were determined. Both antisera contained combining sites with higher ( $Ak_1$  sites) and lower ( $Ak_2$  sites) affinities for the cross-reacting antigens.

Antisera produced in response to both insulin and proinsulin had similar concentrations of both the more affine and less affine insulin-specific binding sites. Bovine insulin contaminated with traces of proinsulin did not induce antibodies specific for the C-chain.

Antisera to proinsulin contained equal amounts of high affinity binding sites specific for the C-chain and for the insulin part of the molecule. After absorption of the insulin-specific antibodies these sera can be used for the immunoassay of proinsulin.

Untersuchungen zur Biosynthese des Insulins haben zur Entdeckung eines als Proinsulin bezeichneten einkettigen Insulinvorläufers geführt [1, 2]. Das verwendete Rinderproinsulin [3] unterscheidet sich von Rinderinsulin durch die aus 29 Aminosäuren bestehende C-Kette, die das N-terminale Ende der A-Kette mit dem C-terminalen Ende der B-Kette verbindet. Die jetzigen immunchemischen Untersuchungen wurden an Antiseren von Meerschweinchen gegen Rinderproinsulin und gegen Rinderinsulin zur Klärung folgender Fragen durchgeführt:

(1) Wie verhält sich die Immunogenität von Rinderproinsulin im Vergleich zum kleinemolekularen Rinderinsulin?

(2) In welchem Umfang werden durch eine Immunisierung mit Rinderproinsulin bzw. mit proinsulinverunreinigtem Rinderinsulin Antikörper mit C-Ketten Spezifität stimuliert?

(3) Zur Frage nach der Verteilung determinanter Antigengruppen des Proinsulins wird geprüft, zu welchen Anteilen ihrer Gesamtkonzentration Antikörper gegen Proinsulin im C-Ketten bzw. im Insulinbereich des Proinsulinmoleküls inserieren.

27 Meerschweinchen aus Koloniezucht wurden mit Rinderinsulin (Proinsulingehalt 1%), 5 Meerschweinchen aus gleicher Zucht mit Rinderproinsulin durch 4 Injektionen von je 12,8 nMol/100 g Körpergewicht immunisiert. Das Antigen wurde subcutan in wöchentlichen Abständen, einmal in komplettem und dreimal in inkomplettem Freund's Adjuvans injiziert.

Zur Aufnahme von Bindungskurven wurden freies und antikörpergebundenes Antigen bei konstanten Konzentrationen der gepoolten Seren beider Versuchstiergruppen und schrittweise erhöhten Konzentrationen an Rinderinsulin bzw. Rinderproinsulin mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifugation [4] gemessen. Hierzu wurden die Seren mit 40 mM albuminhaltigem (38,5  $\mu$ M Rinderalbumin) Phosphatpuffer (pH 8,0) bis zu einer Endkonzentration von 0,3% verdünnt. Die Konzentrationen der Antigene wurden, bezogen auf Molekulargewichte von 6000 für Rinderinsulin und 8800 für Rinderproinsulin, in 11 Stufen von 0,642 bis  $129,5 \times 10^{-9}$  Mol/l gesteigert. Die Konzentrationen der nicht markierten Antigene wurden variiert, die der markierten Antigene (spezifische Aktivitäten 96,4 mCi/mg Rinderproinsulin; 13,7 mCi/mg Rinderinsulin) konstant gehalten. Nach

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

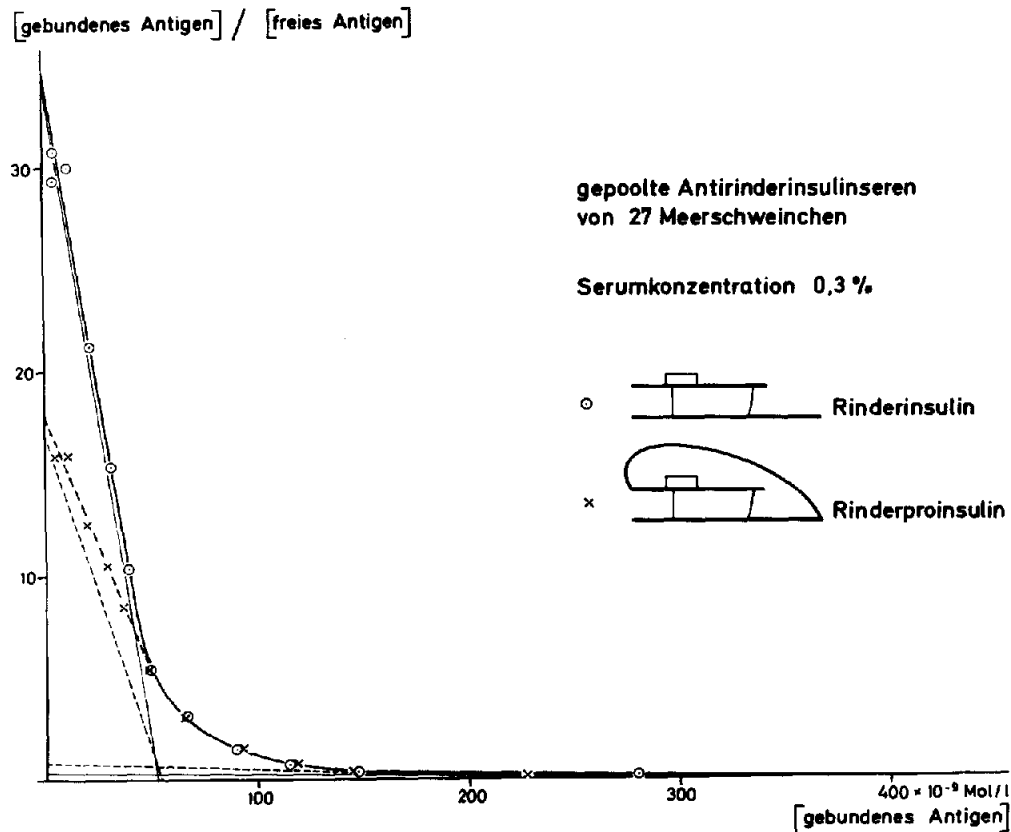


Abb. 1. Messwerte zur Bindung von Rinderinsulin bzw. Rinderproinsulin durch Antirinderinsulinserum (Serumpool) von Meerschweinchen. Aufgetragen ist  $[\text{gebundenes Antigen}] / [\text{freies Antigen}]$  gegen  $[\text{gebundenes Antigen}]$ . Die Schnittpunkte der Asymptoten mit der Abszisse ergeben für die beiden kreuzreagierenden Antigene die Konzentrationen an Bindungsstellen beider Antikörper-Hauptkomponenten. Die Schnittpunkte der Asymptoten mit der Ordinate liefern die Produkte aus den Konzentrationen der jeweiligen Antikörperbindungsstellen und den zugehörigen Assoziationskonstanten.

einer Inkubationszeit von 36 Stunden ( $4^\circ$ ) wurden die Ansätze während 8 Stunden bei ca. 120 000 g ( $4^\circ$ ) bis zur vollständigen Sedimentation der löslichen Antigen-Antikörper-Komplexe zentrifugiert. Während der Zentrifugation stellt sich das freie Antigen in einem von der Ausgangskonzentration unabhängigen Konzentrationsgradienten ein, der jeweils in nicht antikörperhaltigen Parallelansätzen ermittelt wurde. Aus den Anteilen der  $^{131}\text{J}$ -markierten Antigene in den oberen und unteren Abschnitten der Zentrifugenröhrchen wurden, unter Berücksichtigung der Konzentrationsgradienten für die freien Antigene, die Konzentrationen an jeweils freiem und antikörpergebundenem Rinderinsulin bzw. Rinderpro-

insulin ermittelt. Aus diesen Messwerten lassen sich die Konzentrationen beider Hauptkomponenten an Antikörperbindungsstellen ( $Ak_1$ ,  $Ak_2$ ) und die zugehörigen Assoziationskonstanten ( $k_1$  und  $k_2$ ) nach dem Verfahren von Scatchard [5] extrapolieren. Auf eine Isolierung der Insulinantikörper konnte verzichtet werden, nachdem Kontrollversuche zeigten, dass bei den verwendeten Serumkonzentrationen die Konzentrationen an antikörpergebundenem Antigen nicht durch unspezifische Proteinbindungen verfälscht werden.

Analoge Versuche wurden mit den gleichen Seren nach Adsorption der für den Insulinanteil spezifischen Antikörper mit kovalent an Cellulose gebundenem,

Tabelle 1

	Antigene			
	Rinderinsulin		Rinderproinsulin	
	$\times 10^{-6}$ Mol/l	$\times 10^6$ l/Mol	$\times 10^{-6}$ Mol/l	$\times 10^6$ l/Mol
Antirinderinsulinserum	[Ak <sub>1</sub> ] = 17,8 [Ak <sub>2</sub> ] = 121	k <sub>1</sub> = 6,42 k <sub>2</sub> = 0,011	[Ak <sub>1</sub> ] = 18,3 [Ak <sub>2</sub> ] = 75	k <sub>1</sub> = 3,1 k <sub>2</sub> = 0,04
Antirinderinsulinserum nach Adsorption	[Ak <sub>1</sub> ] = 0 [Ak <sub>2</sub> ] = 0	— —	[Ak <sub>1</sub> ] = 0 [Ak <sub>2</sub> ] = 0	— —
Antiproinsulinserum	[Ak <sub>1</sub> ] = 18,3 [Ak <sub>2</sub> ] = 115	k <sub>1</sub> = 8,36 k <sub>2</sub> = 0,012	[Ak <sub>1</sub> ] = 36,7 [Ak <sub>2</sub> ] = 100	k <sub>1</sub> = 2,12 k <sub>2</sub> = 0,013
Antiproinsulinserum nach Adsorption	[Ak <sub>1</sub> ] = 0 [Ak <sub>2</sub> ] = 0	— —	[Ak <sub>1</sub> ] = 18,1 [Ak <sub>2</sub> ] = 0	k <sub>1</sub> = 0,38 —

Antikörperbindungsstellen (Ak<sub>1</sub>, Ak<sub>2</sub>) mit zugehörigen Assoziationskonstanten (k<sub>1</sub> und k<sub>2</sub>) für die beiden kreuzreagierenden Antigene Rinderinsulin und Rinderproinsulin in den gepoolten Antirinderinsulin- und Antirinderproinsulinseren von Meerschweinchen.

von Proinsulin befreitem, Rinderinsulin\* durchgeführt. Die Beladung der Cellulose betrug 18 µg Rinderinsulin/mg Cellulose. Zur Antikörperadsorption wurden 9 ml einer 10% igen Serumverdünnung mit 40 mM, albuminhaltigem Phosphatpuffer (pH 8,0) dreimal während 6 Stunden mit je 1 g Immunadsorbens bei 4° gerührt und anschliessend auf eine Endkonzentration von 0,3% Serum eingestellt.

Es fand sich, dass beide Antiseren (Antiinsulin- und Antiproinsulinserum) Antikörperkomponenten mit höherer (Ak<sub>1</sub>) und mit niedrigerer (Ak<sub>2</sub>) Assoziationskonstante für die Bindung der beiden kreuzreagierenden Antigene (Abb. 1, Tab. 1) enthalten. Der überwiegende Anteil der Antikörperkomponente Ak<sub>2</sub> war in beiden Antiseren zur Bindung beider Antigene befähigt, wobei die Grössenordnungen der jeweils gemessenen Assoziationskonstanten k<sub>2</sub> übereinstimmten. Für die Antikörperbindungsstelle mit höherer Affinität zum Antigen (Ak<sub>1</sub>) fanden sich für die Bindung von Rinderinsulin in beiden Antiseren höhere Assoziationskonstanten als für die Bindung von Rinderproinsulin. Während bei Verwendung von Rinderinsulin als Antigen in beiden Antiseren annähernd gleiche Konzentrationen an Ak<sub>1</sub>-Bindungsstellen gemessen wurden, enthielt das Antiproinsulin-

serum bei Verwendung von Proinsulin als Antigen doppelt höhere Konzentrationen dieser Antikörperbindungsstelle als das Antirinderinsulinserum (Tab. 1).

Nach Adsorption der insulinspezifischen Antikörper an das Immunadsorbens liessen sich in beiden Antiseren für Rinderinsulin keine Antikörperbindungsstellen mehr nachweisen. Das Antiproinsulinserum enthielt nach gleicher Behandlung nur für Proinsulin noch Antikörperbindungsstellen mit hoher Bindungsfestigkeit (Ak<sub>1</sub>), deren Konzentration halb so gross war, wie im gleichen Serum vor Adsorption der insulinspezifischen Antikörper. Im Antirinderinsulinserum war diese Antikörperkomponente nicht vorhanden (Tab. 1).

Die im Antiproinsulinserum gemessenen Konzentrationen insulinspezifischer ( $18,3 \times 10^{-6}$  Mol/l) und C-Ketten spezifischer ( $18,1 \times 10^{-6}$  Mol/l) Ak<sub>1</sub>-Bindungsstellen sind annähernd gleich, ihre Summe entspricht der insgesamt ermittelten Konzentration an Antikörperbindungsstellen dieses Typs für Proinsulin. Hieraus ist zu folgern, dass hochaffine Antikörper der Komponente Ak<sub>1</sub> trotz des Fehlens aromatischer Aminosäuren im Bereich der C-Kette in gleichen Masse gegen determinante Gruppen der C-Kette wie gegen determinante Gruppen im Insulinanteil des Proinsulinmoleküls gerichtet sind. Aus dem Auftreten hochaffiner Antikörper mit Spezifität für die C-Kette ergibt sich die Möglichkeit, aus einem mit Rinderin-

\* Herrn Dr. Schnabel danken wir für die Herstellung des Immunadsorbens.

sulin weitgehend kreuzreagierenden Antiproinsulinserum vom Meerschweinchen durch Adsorption der insulinspezifischen Antikörper ein für den immunologischen Proinsulinnachweis geeignetes Antiserum herzustellen.

Die gepoolten Antiseren gegen Rinderinsulin und Rinderproinsulin enthalten gleiche Konzentrationen an insulinbindenden Antikörpern der Komponenten Ak<sub>1</sub> und Ak<sub>2</sub>. Hieraus ergibt sich, dass in der gewählten Versuchsanordnung Rinderinsulin und Rinderproinsulin bezüglich der Stimulierung insulinspezifischer Antikörper gleiche Immunogenität besitzen.

Das im Rinderinsulin in Spuren enthaltene Rinderproinsulin führte nicht zur Bildung proinsulin-

spezifischer Antikörper. Daraus folgt, dass der Proinsulinverunreinigung des Rinderinsulins bei der angewendeten Immunisierung keine immunogene Wirkung zukommt.

## References

- [1] D.F.Steiner and P.Oyer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57 (1967) 473.
- [2] D.F.Steiner, D.D.Cunningham, L.Spigelman and B.Aten, Science 157 (1967) 697.
- [3] D.D.Schmidt und A.Arens, Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 1157.
- [4] L.Kerp und S.Steinhilber, Klin. Wochschr. 40 (1962) 540.