

FRAKTIONIERUNG HANDELSÜBLICHEN INSULINS*. GEWINNUNG UND EIGENSCHAFTEN EINER HOCHMOLEKULAREN, INSULIN-ÄHNLICHEN KOMPONENTE

H. ZÜHLKE, K.-D. KOHNERT, M. ZIEGLER, S. KNOSPE

*Zentralinstitut für Diabetes "Gerhardt Katsch", Bereich experimentelle Diabetesforschung,
Karlsburg bei Greifswald, DDR*

und

J. BEHLKE

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, DDR

Received 2 April 1971

A component with high molecular weight is prepared from commercial bovine insulin by gel filtration on Sephadex G 50. The substance has little biological and immunological activity in comparison to insulin. The activity is not changed by incubation with trypsin. It associates in 1 M CH_3COOH and possesses a molecular weight of 28,500 as shown by ultracentrifugation. The ability of the component to precipitate with bovine insulin antibodies demonstrates that it contains immunologically active insulin-like proteins and is not a homogenous substance.

1. Einleitung

In einer früheren Mitteilung [1] berichteten wir, dass sich handelsübliches Insulin mit Hilfe der Gelchromatographie in 3 Fraktionen auftrennen lässt. Es sind dies, nach steigendem Molekulargewicht geordnet, Insulin, die b-Komponente, aus die Intermediärform, das Insulin-Dimere und Proinsulin gewonnen werden können [2–5], sowie die a-Komponente [1].

Inzwischen gelangen Schlichtkrull et al. [6] ebenfalls die Gewinnung der a-Komponente. Sie injizierten Kaninchen a-Komponente sowie von Begleitproteinen befreites Insulin und stellten fest, dass die a-Komponente in geringem Masse und Insulin nicht mit Insulin-Antikörpern reagiert. Daraus zogen sie den Schluss, dass allein die Verunreinigungen in den jetzigen Insulinpräparaten für die Antigenität verantwortlich sind.

Um über die Bedeutung der a-Komponente bei der Behandlung der Diabetiker mit kommerziellem Insu-

lin weitere Aussagen treffen zu können, bemühen wir wir uns, zur Aufklärung der Natur dieses Proteins beizutragen.

2. Material und Methodik

10 g einmal umkristallisiertes Rinderinsulin (VEB Berlin-Chemie) wurden über eine mit Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala) gefüllte Säule der Abmessungen 8×100 cm (Elutionsmittel 1 M CH_3COOH) chromatographiert. Die Rechromatographie erfolgte mit 5 M CH_3COOH –0,15 M NaCl über Sephadex G-50 fine (Säule: $1,5 \times 50$ cm), die Entsalzung über Sephadex G-25.

Die gefriergetrocknete a-Komponente wurde zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten in 1 M CH_3COOH , pH 2,3 gelöst und in einer analytischen Ultrazentrifuge G 110 von MOM, Budapest mit Schlierenoptik unter Verwendung einer Doppelsektorenzelle untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse stellen Mittelwerte aus jeweils 3 Läufen dar. Für die Ab-

* Part V of a series.

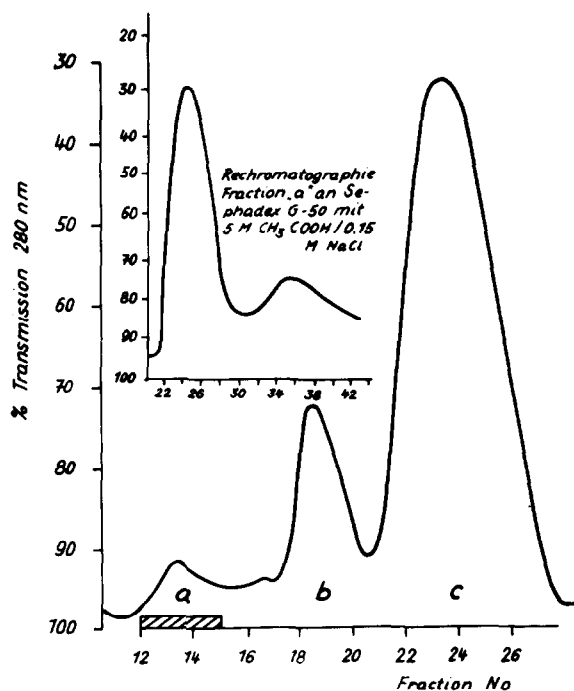


Abb. 1. Gelchromatographie von 250 mg Rinderinsulin (2× umkristallisiert) an Sephadex G-50. Elutionsmittel: 5 M CH₃COOH/0,15 M NaCl. Abmessungen der Säule: 1,5 × 150 cm.

Tabelle 1

Immunologische (IRI) und biologische Aktivität (ILA). (in Klammern: Werte nach Inkubation mit Trypsin).

Fraktion	IRI (E/mg)	ILA (E/mg)
b-Komponente	22,0	2,3 (8,6)
a-Komponente	11,0	1,6 (1,8)

schätzung des Molekulargewichts benutzen wir folgende Beziehungen [7]:

$$M = (s_0 - s_i)/k,$$

wobei s_0 die durch Extrapolation auf die Konzentration $c = 0$ ermittelte Sedimentationskonstante, s_i und k jeweils Konstanten mit den Werten 0,68 bzw. $7,416 \times 10^{-5}$ darstellen.

Die Bestimmung der biologischen Aktivität erfolgte am Fettgewebe nach Renold et al. [8] (Standard: Rinderinsulin, Fa. NOVO, Kopenhagen, 1 mg \approx 25 IE),

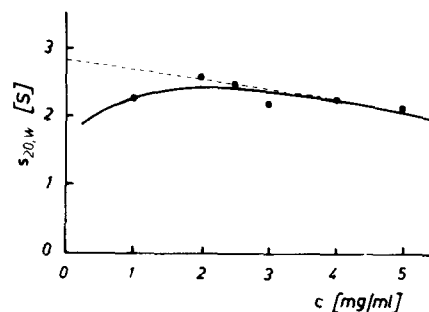


Abb. 2. Sedimentationskoeffizienten der a-Komponente in Abhängigkeit von der Konzentration in 1 M CH₃COOH (pH 2,3).

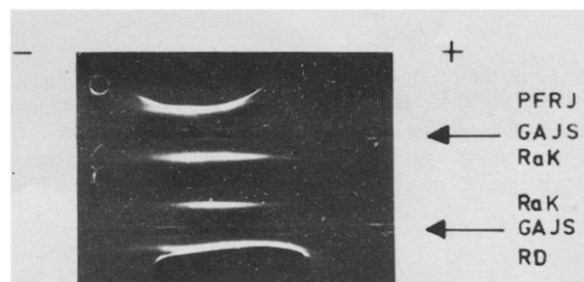


Abb. 3. Immunelektrophorese von proinsulinfreiem Rinderinsulin (PFRJ), Rinder-Dimer (RD) und Rinder- a-Komponente (RaK) im Agar-Gel bei pH 8,2 in Michaelis-Puffer. In die Gräben ist Ziegen-anti-Rinderinsulinserum (GAJS) aufgetragen.

die der immunologischen Aktivität nach Heding [9]. Der Nachweis der präzipitierenden Insulin-Antikörper wurde mit Hilfe eines Ziegen-anti-Rinderinsulinserums (GAIS) in der Mikroimmuno-Elektrophorese vorgenommen [10].

3. Ergebnisse

Wie Abb. 1 zu entnehmen ist, lässt sich nach Rechromatographie die a-Komponente als ein einheitlich erscheinender Peak gewinnen.

Die immunologischen (IRI) und biologischen Aktivitäten (ILA) der a-Komponente sind niedriger als die der b-Komponente (Tabelle 1).

Die unter den früher beschriebenen Bedingungen [11] durchgeführte Inkubation mit Trypsin führt bei Einsatz der b-Komponente zu einer Erhöhung der ILA (vgl. Tabelle 1, Angaben in Klammern), während die biologische Aktivität der a-Komponente sich nicht signifikant verändert.

Die Sedimentationskoeffizienten der a-Komponente sind in Abb. 2 dargestellt. Mit abnehmender Konzentration steigen die gemittelten $s_{20,w}$ -Werte geringfügig an. Durch Extrapolation auf die Konzentration $c = 0$ lässt sich ein Wert $s_{20,w}^0 = 2,8$ [S] ermitteln und ein Molekulargewicht von 28 500 errechnen. Die Verminderung der Proteinkonzentration führt zu einer Abnahme der $s_{20,w}$ -Werte. Das Molekül dissoziiert bei Konzentrationen $c < 1$ mg/ml in stärkerem Masse in Untereinheiten. Die Zugabe von $ZnSO_4$ (10–20 mM) führt zu keiner signifikanten Beeinflussung der Sedimentationskoeffizienten.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich wird, bildet GAIS mit Rinderinsulin, dem Rinder-Dimer und auch der a-Komponente Präzipitate. Das Präzipitat der a-Komponente ist über einen breiten Bereich im Agargel verteilt und liegt hinsichtlich der Mobilität zwischen der des Insulins und des Dimers.

4. Diskussion

Die a-Komponente, die zu etwa 0,5% im handelsüblichen Insulin enthalten ist, stellt unter den gegebenen Bedingungen ein Assoziat dar. Dafür sprechen einerseits die mit zunehmender Verdünnung abnehmenden Sedimentationskoeffizienten und andererseits die im Verhältnis zu den $s_{20,w}$ -Werten viel zu hohen Diffusionskoeffizienten (s. auch [12]). Ob die a-Komponente in ganzzahlige Untereinheiten oder in ein Substanzgemisch vergleichbaren Molekulargewichts dissoziiert, lässt sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht entscheiden.

Das Vorhandensein von immunologischer Aktivität gegen GAIS und die Fähigkeit zur Präzipitation mit

diesem zeigen, dass die a-Komponente immunologisch aktive, insulinähnliche Peptide enthält. Da weder die IRI noch die ILA nach Inkubation mit Trypsin ansteigen (Tabelle 1), sollte die a-Komponente weder Proinsulin noch Intermediär enthalten. Die langgestreckte Präzipitationsbande der a-Komponente in der Immunoelktrophorese deutet ebenfalls auf ein Substanzgemisch hin. Auch in der analytischen Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese (7,5%iges Gel, pH 8,9) zeigt die a-Komponente mehrere Banden.

Wir sind z.Zt. damit beschäftigt, mit Hilfe präparativer Methoden die a-Komponente in weitere Substanzen aufzutrennen und diese näher zu untersuchen.

References

- [1] H. Zühlke und J. Behlke, FEBS Letters 2 (1968) 130.
- [2] D.F. Steiner, O. Hallund, A. Rubenstein, S. Cho und C. Bayliss, Diabetes 17 (1968) 725.
- [3] D.D. Schmidt und A. Arens, Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 1157.
- [4] J. Schlichtkrull, J. Brange, H. Ege, O. Hallund, L.G. Heding, K. Jorgenson, J. Markussen, P. Stahnke, F. Sundby und Aa. Velund, Fifth Annual Meeting European Association for the Study of Diabetes, Montpellier, 16–18 Sept. 1969.
- [5] H. Zühlke und W. Wilke, Acta Biol. Med. Germ. 23 (1969) K 5–8.
- [6] J. Schlichtkrull, Vortrag im Rahmen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 6–9 April, 1970.
- [7] M.Z. Atassi und S.K. Gandhi, Naturwissenschaften 52 (1965) 259.
- [8] A.E. Renold, D.B. Martin, Y.M. Dagenais, J. Steinke, R.J. Nickerson und M.C. Sheps, J. Clin. Invest. 39 (1960) 1487.
- [9] L.G. Heding, Diabetologia 1 (1965) 76.
- [10] M. Ziegler, K.-D. Kohnert und U. Karg, Experientia, im Druck.
- [11] H. Zühlke, H.-G. Lippmann und W. Wilke, Acta Biol. Med. Germ. 23 (1969) 361.
- [12] J. Behlke, unpublizierte Ergebnisse.