Einwirkung von Natrium in flüssigem Ammoniak auf die Buntessalz-A-Kette von Schweineinsulin

Y. SHIMONISHI * und H. ZAHN

Deutsches Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

W. PULS

Institut für Pharmakologie der Farbenfabriken Bayer AG, Wuppertal

(Z. Naturforschg. **24 b**, 422—427 [1969]; eingegangen am 11. September 1968)

In connection with synthetic work on insulin a study was made of the behaviour of natural A-chain-Buntessalt isolated from pig insulin after treatment with sodium in liquid ammonia. The A-chain was partially degraded and compounds with different amino acid compositions were built. It was possible to isolate the remaining intact A-chain as tetra-S-sulfonate by chromatography on DEAE-Sephadex with a yield of 55 per cent. This fraction gave, after recombination with isolated B-chain, the same yield of insulin as did A-chain undamaged by sodium.

Bei allen bisher publizierten Synthesen der Insulin-A-Kette¹⁻⁷ wurden die Cysteinreste als S-Benzylcystein eingebaut und die Ketten zur Abspaltung der Benzylschutzgruppe der Einwirkung von Natrium in flüssigem Ammoniak⁸ unterworfen. Bei dieser Reduktion erfolgt nach KATSOYANNIS⁹ eine teilweise Entschwefelung. Die anschließende oxydative Sulfitylyse ergibt ein Gemisch von Ketten mit unterschiedlichem Gehalt an Thiosulfatgruppen. Wir haben kürzlich ein Verfahren zur Gewinnung reiner Tetrathiosulfat-A-Kette durch Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephadex beschrieben¹⁰. So konnte z. B. das aus homogener S-Benzyl-Kette, die nach der Methode von MERRIFIELD synthetisiert worden war⁵, nach Natriumreduktion und oxydativer Sulfitylyse erhaltene Produkt in acht verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden, von denen nur eine

reinem $A(SSO_3^-)_4$ * entsprach, das mit 10–20% Ausbeute isoliert wurde. Dieses Verfahren bot uns jetzt die Möglichkeit, an der Buntessalz-A-Kette zu untersuchen, ob die Entschwefelung durch das Reduktionssystem Natrium/Ammoniak bedingt ist oder von der Art der zu spaltenden Schwefelbindung abhängt. TSOU et al.¹¹ schlossen aus dem Ergebnis von Rekombinations-Versuchen, daß die Natriumbehandlung von Insulin-Thiosulfatketten nicht zu einer Schädigung der Ketten führt.

Aus Schweineinsulin durch oxydative Sulfitylyse dargestelltes $A(SSO_3^-)_4$ wurde als Ausgangsmaterial für die vorliegende Studie gewählt. Dieses Präparat wurde mit Natrium in flüssigem Ammoniak behandelt, das Reduktionsprodukt erneut einer oxydativen Sulfitylyse unterworfen und hierauf das rohe Sulfitylyseprodukt an DEAE-Sephadex frak-

* Jetzt Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

¹ J. MEIENHOFER, E. SCHNABEL, H. BREMER, O. BRINKHOFF, R. ZABEL, W. SROKA, H. KLOSTERMEYER, D. BRANDENBURG, T. OKUDA u. H. ZAHN, Z. Naturforschg. **18 b**, 1120 [1963].

² P. G. KATSOYANNIS, K. FUKUDA, A. TOMETSKO, K. SUZUKI u. M. TILAK, J. Amer. chem. Soc. **86**, 930 [1964].

³ Y.-T. KUNG, Y.-C. DU, W.-T. HUANG, C.-C. CHEN, L.-T. KE, S.-C. HU, R.-Q. JIANG, S.-Q. CHU, C.-I. NIU, J.-Z. HSU, W.-C. CHANG, L.-L. CHENG, H.-S. LI, Y. WANG, T.-P. LOH, A.-H. CHI, C.-H. LI, P.-T. SHI, Y.-H. YIEH, K.-L. TANG u. C.-Y. HSING, Scientia sinica **14**, 1710 [1965].

⁴ A. MARGLIN u. R. B. MERRIFIELD, J. Amer. chem. Soc. **88**, 5051 [1966].

⁵ H. ZAHN, T. OKUDA u. Y. SHIMONISHI, Peptides, Proceedings of the Eighth European Peptide Symposium, Noordwijk, The Netherlands, September 1966, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1967, p. 108; Angew. Chem. **79**, 424 [1967].

⁶ U. WEBER, F. SCHNEIDER, P. KÖHLER u. G. WEITZEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 947 [1967]; U. WEBER, S. HÖRNLE, G. GRIESER, K.-H. HERZOG u. G. WEITZEL, **348**, 1715 [1967]; U. WEBER, S. HÖRNLE, P. KÖHLER, G. NAGELSCHNEIDER, K. EISELE u. G. WEITZEL, **349**, 512 [1968].

⁷ S. HÖRNLE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 1355 [1967].

⁸ R. H. SIFFERT u. V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry **108**, 753 [1935].

⁹ P. G. KATSOYANNIS, Diabetes **13**, 339 [1964], Amer. J. Med. **40**, 652 [1966].

¹⁰ Y. SHIMONISHI u. H. ZAHN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **154**, 598 [1968].

* $A(SSO_3^-)_4$ bedeutet das S-Sulfonat-Derivat der A-Kette des Schweineinsulins, $B(SSO_3^-)_2$ das der B-Kette des Rinderinsulins.

¹¹ C.-L. TSOU, Y.-C. DU u. G.-J. XÜ, Scientia Sinica **10**, 332 [1961].

tioniert. Von den einzelnen Fraktionen wurde das elektrophoretische Verhalten und die Aminosäure-Zusammensetzung bestimmt; die insulinbildende Potenz wurde durch Kombination mit reiner Insulin-B-Kette nach der Methode von DU et al.¹² ermittelt.

Material und Methoden

Schweineinsulin wurde uns großzügigerweise vom Nordisk Insulinlaboratorium als Geschenk überlassen.

DEAE-Sephadex A-25

Das von der Pharmacia Uppsala bezogene Gel besaß eine Korngröße von 40–120 μ und eine Säurebindung von 3,5 $\pm$ 0,5 Milliäquivalenten/g.

Oxydative Sulfitylse von Schweineinsulin und Isolierung der beiden Buntessalzketten A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ und B($\text{SSO}_3^\ominus$)₂

1 g krist. Schweineinsulin wurde nach DRECHSEL¹³ in einem Gemisch von 35 ml 0,05 M Natriumacetat, 25 ml Dioxan und 70 mg Dinatriumäthylendiamintetraacetat (pH 7,5) mit 2,24 g Natriumsulfit und 4,8 g Natriumtetrathionat bei 37° umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 90 Min. wurde die Lösung 5 Stdn. lang gegen dest. Wasser dialysiert (Viskingschlauch 20/32). Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde gefriergetrocknet und das gebildete Pulver in Phosphatpuffer (0,1 M NaH_2PO_4 , 0,1 M Na_2PO_4 , 8 M Harnstoff) gelöst und nach BAILEY und COLE¹⁴ durch Chromatographie an Dowex 50 $\times$ 2 in A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ und B($\text{SSO}_3^\ominus$)₂ getrennt.

Die Fraktionen, welche die Buntessalzketten enthielten, wurden getrennt jeweils 5 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert und der Inhalt des Dialyseschlauches gefriergetrocknet. Zur Abtrennung von Salzen diente die Gel-filtration von Lösungen der Rohpräparate in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat an Sephadex G-25 (20 $\times$ 470 mm). Ausbeute an A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ 280 mg (60% d. Th.) und an B($\text{SSO}_3^\ominus$)₂ 460 mg (75% d. Th.).

Die Proteinkonzentration der isolierten Präparate wurde durch Vergleich ihrer Absorptionsmaxima bei 275 nm im Beckman-Spektrophotometer DK-2 zu

100% $\pm$ 5% für A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄, und
101% $\pm$ 5% für B($\text{SSO}_3^\ominus$)₂ bestimmt.

Enzymatische Hydrolyse

1 μ Mol Substrat wurde bei 37° 24 Stdn. lang mit 400 μ g Aminopeptidase-M¹⁵ (Röhm und Haas GmbH., Darmstadt) in 0,01 M Trispufferlösung (pH 8,0) inku-

biert. Das Enzym besaß eine Aktivität von 10 000 Einheiten. Nach Denaturieren des Enzyms mit 50-proz. Trichloressigsäure wurde das Hydrolysat nach SPACKMAN, MOORE und STEIN¹⁶ analysiert.

Resynthese von Insulin aus Buntessalzketten

Die Rekombination der Ketten wurde unter Anlehnung an die Vorschrift von DU et al.¹² ausgeführt. Ein Gemisch von 8,1 mg A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ und 7,1 mg B($\text{SSO}_3^\ominus$)₂, zusammen 15,2 mg Protein, wurde mit 1 M Thioglykolsäure-Lösung vom pH 5 bei Zimmertemperatur 18 Stdn. lang behandelt. Das Gemisch der reduzierten Ketten wurde mit Essigsäure auf pH 3,8 eingestellt und die Fällung in 2,5 ml Wasser suspendiert und mit 1 N-Natronlauge alkalisch (pH 10,6) gelöst. Anschließend wurde mit 0,1 M Glycinpuffer (pH 10,6) auf 3,0 ml aufgefüllt. Die alkalische Lösung wurde bei 0–3 °C 24 Stdn. aufbewahrt. Nach der Autoxydation der SH-Gruppen der Insulinketten wurde das Oxydationsprodukt durch Gelfiltration über Sephadex G-25 (20 $\times$ 470 mm) entsalzt. Nach Gefrier Trocknung der Lösung in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat resultierten 11,3 mg festes Resyntheseprodukt.

Bestimmung des Insulingehaltes in den Oxydationsprodukten

Die Oxydationsprodukte wurden im Vergleich zu kristallinem Insulin auf ihre Blutzucker-senkende Wirkung an nüchternen Ratten untersucht¹⁷. Ihr Insulingehalt wurde im 4-Punkte-Test ermittelt.

Der wahre Insulingehalt kann zwischen dem halben und dem doppelten Wert liegen. Reines A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ und B($\text{SSO}_3^\ominus$)₂ wurden in 15 verschiedenen Ansätzen miteinander kombiniert und folgende Werte erhalten: Tab. 1.

Behandlung von A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ mit Natrium in flüssigem Ammoniak und Fraktionierung des Sulfitylseproduktes

80,8 mg A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ aus Schweineinsulin, zuvor über P_2O_5 im Vakuum bei 60° über Nacht getrocknet, wurden in 80 ml frisch über Natrium dest. flüssigem Ammoniak gelöst und bei –70° mit 20–25 mg Natriumstückchen 3,5 Min. lang behandelt, bis eine leicht blaue Farbe einige Sek. lang bestehen blieb. Die Lösung wurde durch Zugabe von Ammoniumchlorid entfärbt und sofort lyophilisiert. Das dabei gewonnene feste reduzierte A-Kettenpräparat

¹² Y.-C. DU, R.-Q. JIANG u. C.-L. TSOU, *Scientia sinica* **14**, 229 [1965].

¹³ H. ZAHN u. E. DRECHSEL, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **349**, 359 [1968].

¹⁴ J. L. BAILEY, *Biochem. J.* **67**, 21 P [1957]; J. L. BAILEY u. R. D. COLE, *J. biol. Chemistry* **234**, 1733 [1959].

¹⁵ G. PFLEIDERER, P. G. CELLIERS, N. STANULOVIC, E. D. WACHSMUTH, H. DETERMANN u. G. BRAUNITZER, *Biochem. Z.* **340**, 552 [1964].

¹⁶ D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN u. S. MOORE, *Analyt. Chem.* **30**, 1190 [1958].

¹⁷ H. ZAHN, E. DRECHSEL u. W. PULS, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **349**, 385 [1968].

Prä- parat Nr.	A($\text{SSO}_3^\ominus$) ₄ [mg]	B($\text{SSO}_3^\ominus$) ₂ [mg]	Oxydationsprodukt		Gefundener Insulingehalt in E/mg (Y)	Insulin- ausbeute* bezogen auf A($\text{SSO}_3^\ominus$) ₄ + B($\text{SSO}_3^\ominus$) ₂
			[mg]	Ausbeute in % von (A + B) (x)	in % (= Y/25 · 100)	
S 2	5,28	4,63	9,1	(100)	1,92	7,68
S 3	8,21	7,15	11,2	(79,4)	0,31	1,02
S 5	8,18	7,15	11,3	(80,8)	0,66	2,13
S 8	8,07	7,16	12,2	(87,8)	0,65	2,28
S 10	8,12	7,18	11,0	(78,6)	1,95	6,13
S 13	8,11	7,12	10,9	(78,4)	1,65	5,17
S 15	8,09	7,11	10,6	(76,3)	1,45	4,43
S 17	8,14	7,11	11,9	(85,0)	0,96	3,26
S 19	8,17	7,12	11,8	(84,3)	0,76	2,56
S 21	8,14	7,13	11,7	(83,6)	1,11	3,71
S 23	8,13	7,15	11,2	(80,8)	2,13	6,82
S 25	8,11	7,16	11,7	(83,6)	2,90	9,50
S 27	8,12	7,14	11,3	(80,7)	3,66	11,7
S 39	8,11	7,12	12,3	(88,5)	5,55	19,6
S 41	8,20	7,13	12,2	(87,2)	3,38	11,8

Tab. 1. Insulinausbeuten bei der Kombination von A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ mit B($\text{SSO}_3^\ominus$)₂ nach der Methode von DU et al.¹². *KATSOYANNIS u. TOMETSKO¹⁸ beziehen die Insulinausbeuten auf die Menge an B($\text{SSO}_3^\ominus$)₂ allein. Man hätte auch hier alle Ausbeuten auf die B-Kette umrechnen können. Bei der von KATSOYANNIS und TOMETSKO modifizierten A-Kettenüberschuß-Methode von DU et al. werden 5 Äquivalente A-Kette auf 1 Äquivalent B-Kette verwendet, bei der chinesischen Originalmethode¹², die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, jedoch nur 1,5 Äquivalente A-Kette. Die Berechnung auf B-Kette erhöht die rechnerischen Insulin-Ausbeuten im Falle der KATSOYANNIS-Methode auf etwa den dreifachen Wert des Insulingehaltes der Präparate, bei einem Molverhältnis von 1,5 zu 1 nur auf das 1,2-fache. Im Hinblick auf das präparative Ziel unserer Arbeiten geben wir die Insulinausbeuten so an, daß ersichtlich ist, wieviel Gew.-% aus dem Gemisch der Buntessalzketten in Insulin umgewandelt wurde.

wurde einer oxydativen Sulfityolyse unterworfen, wobei man dies mit 0,25 g Natriumsulfit und 0,25 g Natriumtetrathionat in 2,39 g Guanidin-HCl enthaltendem Wasser (Totalvolumen 5 ml) bei pH 6 bei Zimmertemperatur 20 Std. reagieren ließ. Der Sulfityolyseansatz wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-25 (2 × 47 cm) von Salzen befreit, und die Proteinlösung gefriergetrocknet. Man erhielt 77,8 mg Sulfityolyseprodukt. Dieses Präparat wurde durch Chromatographie an DEAE-Sephadex nach der früher beschriebenen Methode¹⁰ fraktioniert.

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, ließ sich das Sulfityolyseprodukt der mit Natrium reduzierten A-Kette in 6 Fraktionen auftrennen. Und zwar wurden aus 41,9 mg Rohprodukt 2,3 mg Fraktion I, 1,4 mg II, 2,5 mg III, 3,9 mg IV, 23,3 mg V (= 55,6% Ausbeute) und 4,6 mg Fraktion VI, zusammen 38 mg oder 90% des Sulfityolyseproduktes, isoliert.

Die Hauptfraktion V wurde von der DEAE-Sephadexsäule mit dem 0,2 N Salzsäure – 8 M Harnstoffpuffer eluiert, verhielt sich also chromatographisch genau wie authentisches A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄. Dies würde bedeuten, daß A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄ nach Einwirkung

Abb. 1. DEAE-Sephadex-Chromatogramm des Sulfityolyseproduktes von mit Natrium in flüssigem Ammoniak behandeltem A($\text{SSO}_3^\ominus$)₄. Stufenweise Elution. —: Proteinabsorption bei 280 nm. ···×···×: Konzentration der Salzsäure im Eluat. ↑: Pufferwechsel. 1. $3,06 \cdot 10^{-2}$ N HCl – 8 M Harnstoff, 2. $6,50 \cdot 10^{-2}$ N HCl – 8 M Harnstoff, 3. $1,35 \cdot 10^{-1}$ N HCl – 8 M Harnstoff, 4. $1,99 \cdot 10^{-1}$ N HCl – 8 M Harnstoff, 5. $2,65 \cdot 10^{-1}$ N HCl – 8 M Harnstoff.

von Natrium in flüssigem Ammoniak und anschließender oxydativer Sulfityolyse wieder zu 56% regeneriert werden kann und daß die fünf an DEAE-Sephadex abgetrennten Fraktionen nur Nebenprodukte sind.

¹⁸ P. G. KATSOYANNIS u. A. TOMETSKO, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 1554 [1966].

Um festzustellen, welchen Einfluß die Behandlung mit Ammoniak allein auf die regenerierbare Ausbeute an $A(SSO_3^-)_4$ ausübt, wurden 72,3 mg getrocknetes $A(SSO_3^-)_4$ nur mit flüssigem Ammoniak ohne Zugabe von Natrium behandelt. 71,8 mg Sulfitylolyseprodukt wurden wiedergewonnen.

Auch dieses Präparat wurde durch DEAE-Sephadex-Chromatographie fraktioniert. Wie Abb. 2 zeigt, überwiegt hier die mit 0,2 N Salzsäure eluierbare Fraktion V noch stärker als in Abb. 1. 23,9 mg dieser Fraktion konnten ausgehend von 35,4 mg Sulfitylolyseprodukt isoliert werden. Dies sind 67,5 Prozent. Die übrigen Fraktionen wurden in so geringen Mengen erhalten, daß sie nicht näher analysiert werden konnten.

Abb. 2. DEAE-Sephadex-Chromatogramm des Sulfitylolyseproduktes von nur mit flüssigem Ammoniak behandeltem $A(SSO_3^-)_4$. Stufenweise Elution mit Salzsäure in 8 M Harnstoff. —: UV-Absorption bei 280 nm. ····: Konzentration der Salzsäure im Eluat. ↑: Pufferwechsel. 1. $3,06 \cdot 10^{-2}$ N HCl – 8 M Harnstoff, 2. $6,50 \cdot 10^{-2}$ N HCl – 8 M Harnstoff, 3. $1,35 \cdot 10^{-1}$ N HCl – 8 M Harnstoff, 4. $1,99 \cdot 10^{-1}$ N HCl – 8 M Harnstoff, 5. $2,65 \cdot 10^{-1}$ N HCl – 8 M Harnstoff.

Die Ausbeute an regenerierbarem $A(SSO_3^-)_4$ ist also von 56% beim Natriumversuch auf 67,5% beim Kontrollversuch in Ammoniak ohne Natrium gestiegen. Wir finden demnach, daß die Bunesalz-A-Kette bei Einwirkung von flüssigem Ammoniak nur geringfügig geschädigt wird, und daß eine 3,5 Min. lange Natriumbehandlung die Ausbeute an regenerierbarer $A(SSO_3^-)_4$ -Fraktion nur geringfügig verringert.

Elektrophoretisches Verhalten und Aminosäuren-Zusammensetzung der Fraktionen

Die Fraktionen III–VI aus dem DEAE-Sephadex-Chromatogramm des Sulfitylolyseproduktes von natriumbehandeltem $A(SSO_3^-)_4$ wurden elektro-

phoretisch in Ameisensäure-Harnstoffpuffer (pH 2,0) untersucht (Abb. 3).

Fraktion V' war die Hauptfraktion im DEAE-Sephadexchromatogramm des Sulfitylolyseproduktes von nur mit Ammoniak behandeltem $A(SSO_3^-)_4$. Auch laut Elektropherogramm handelt es sich um ungeschädigtes $A(SSO_3^-)_4$.

Abb. 3. Niederspannungs-Elektropherogramme (Ameisensäure-Harnstoff-Puffer, pH 2,0, 8,2 V/cm). Die Banden III, IV, V und VI entsprechen den Fraktionen III, IV, V und VI in Abb. 1, Bande V' entspricht Fraktion V' in Abb. 2. Die Pherogramme wurden durch Besprühen mit Pauly-Reagenz entwickelt.

Die DEAE-Sephadexfraktionen III, IV und V wurden nun der enzymatischen Hydrolyse mit Amino-peptidase-M sowie der salzsauren Hydrolyse unterworfen. Wie aus den Ergebnissen der Tab. 2,1 und 2,2 hervorgeht, stimmt die Aminosäuren-Zusammensetzung der Fraktion V bis auf den erhöhten Glutaminsäurewert mit der von Schweineinsulin- $A(SSO_3^-)_4$ überein, während die Fraktionen III und IV Aminosäuren in abweichenden Molverhältnissen enthalten. Auffallend sind die niedrigen Werte für Leucin und Isoleucin für Fraktion III (Tab. 2,1).

Von besonderem Interesse sind die Abweichungen im S-Sulfocysteingehalt. Die langsamer wandernde Fraktion III enthält statt 4 nur 3 Cysteinreste. Schweineinsulin-A-Kette enthält kein Alanin. Fraktion III liefert mehr Alanin als Fraktion V. Erhöhte Alaninwerte in salzsauren Totalhydrolysaten von Natrium-behandelten A-Ketten wurden erstmalig von KATSOYANNIS⁹ festgestellt. Leider gibt es nur wenig

Aminosäure	DEAE-Sephadexfraktionen				Berechnet für Schweine- insulin $A(SSO_3^\ominus)_4$
	Na III	Na IV	Na V	NH_3 V'	
S-Sulfo- cystein	2,50	4,20	3,85	4,00	4
Asparagin- säure	0,15	0,11	0,13	0,07	0
Threonin	Bei 48° in 0,2 M-Citrat-Puffer wurden diese Aminosäuren nicht vollständig getrennt.				1
Serin					2
Asparagin					2
Glutamin					2
Glutamin- säure	1,47	1,88	2,72	2,28	2
Glycin	1,00	1,00	1,00	1,00	1
Alanin	0,18	0,13	0,07	0,09	0
Cystin	0,00	0,00	0,00	0,00	0
Valin	0,84	1,08	0,97	1,34	1
Isoleucin	0,97	1,50	1,52	1,93	2
Leucin	1,03	1,53	1,80	2,05	2
Tyrosin	1,61	1,29	1,97	2,04	2

Tab. 2.1. Molverhältnis der Aminosäuren in Amino-peptidase-M-Hydrolysaten. Na, Fraktionen aus dem mit Natrium in flüssigem Ammoniak behandelten $A(SSO_3^\ominus)_4 \cdot NH_3$, Fraktion V' des nur mit flüssigem Ammoniak behandelten $A(SSO_3^\ominus)_4$.

Aminosäure	DEAE-Sephadex- fraktionen			Berechnet für Schweine- insulin $A(SSO_3^\ominus)_4$
	Na III	Na IV	Na V	
Cysteinsäure	0,69	0,98	0,40	0
Asparaginsäure	1,39	1,69	1,97	2
Threonin	0,61	0,74	0,77	1
Serin	1,25	1,57	1,51	2
Glutaminsäure	3,23	3,54	3,98	4
Glycin	1,00	1,00	1,00	1
Alanin	0,25	0,23	0,16	0
Cystin	0,71	0,89	1,58	2
Valin	0,54	0,39	0,49	1
Isoleucin	0,73	0,64	1,05	2
Leucin	1,43	1,47	2,02	2
Tyrosin	0,98	1,27	1,75	2

Tab. 2.2. Molverhältnis der Aminosäuren in salzsauren Hydrolysaten, unkorrigiert.

Daten über die Abbauprodukte bei der Natriumbehandlung der einzelnen Peptidfragmente der A-Kette, so daß eine Erklärung der hier gefundenen veränderten Aminosäurezahlen nicht möglich ist (vgl. hierzu BENISEK et al.¹⁹).

Die Insulin-bildende Potenz der Fraktionen

Das entscheidende Kriterium für die Qualität der einzelnen an DEAE-Sephadex erhaltenen Fraktionen ist die Potenz zur Insulinbildung bei der Kombina-

tion mit $B(SSO_3^\ominus)_2$. Ein ungeschädigtes A-Ketten-Präparat sollte ebensoviel Insulin liefern wie eine schonend aus Insulin isolierte S-Sulfonat-A-Kette. Für diese Vergleichsversuche entschieden wir uns für das A-Kettenüberschußverfahren von DU et al.¹², da es einfach ist und für einen Kombinationsversuch 10–20 mg Kettengemisch ausreichen. In Tab. 3 sind die Insulingehalte der Oxydations-Produkte sowie die Insulin-Ausbeuten bezogen auf das Gemisch von A- und B-Kette, von dem ausgegangen wird, in den letzten beiden Spalten angegeben.

Aus Schweineinsulin isoliertes $A(SSO_3^\ominus)_4$ liefert nach gemeinsamer Reduktion mit $B(SSO_3^\ominus)_2$ und anschließender Autoxydation bei pH 10,6 ein Oxydationsprodukt mit 7,7% Insulin (Mittel von 15 Versuchen, vgl. Versuchsteil). Die Insulinausbeute beträgt 6,5 Prozent. Diese Insulingehalte bzw. -ausbeuten werden nur von den an DEAE-Sephadex erhaltenen Fraktionen V und V' erreicht. Das rohe Sulfitylyseprodukt des natriumbehandelten $A(SSO_3^\ominus)_4$ ist im Kombinationsversuch 3–4-mal weniger wirksam. Fraktion III besitzt sogar nur noch 5% der Insulin-bildenden Potenz des $A(SSO_3^\ominus)_4$.

Schon die Behandlung von $A(SSO_3^\ominus)_4$ mit flüssigem Ammoniak erniedrigt die Insulinausbeute beim nicht fraktionierten Sulfitylyseprodukt auf 3,0 Prozent.

Zusammenfassende Diskussion

Wir haben gezeigt, daß eine Bunesalz-Insulin-A-Kette durch Behandlung mit flüssigem Ammoniak nur wenig geschädigt wird, da man aus dem Reaktionsprodukt fast 70% $A(SSO_3^\ominus)_4$ wieder isolieren kann.

Hat man die Bunesalz-A-Kette mit Natrium in flüssigem Ammoniak behandelt und anschließend der oxydativen Sufitylyse unterworfen, so lassen sich 56% $A(SSO_3^\ominus)_4$ regenerieren. Der Vergleich dieser Ausbeuten mit den viel niedrigeren Werten von 10–20%, die wir erhielten, als synthetische S-Benzyl-A-Kette mit Natrium in flüssigem Ammoniak behandelt wurde⁵, zeigt, daß das Vorliegen der schwer reduzierbaren Benzylthioäther-Gruppen und nicht die Aminosäuresequenz der A-Kette ein Hauptgrund für die niedrigen Ausbeuten an $A(SSO_3^\ominus)_4$ ist.

¹⁹ W. F. BENISEK, M. A. RAFTERY u. R. D. COLE, Biochemistry 6, 3780 [1967].

Präparat Nr.	A-Ketten- Präparat	Oxydations- produkt [mg]	[%]**	Unkorrigierter Insulingehalt im Oxydationsprodukt		Mittel- wert [%]	Insulin- ausbeute [%]**
				E/mg Substanz	%*		
S 4	A(SO ₃ [⊖]) ₄ unbehandelt	15 Oxydationsprodukte Tab. 1				7,7	6,5
S 4	A(SO ₃ [⊖]) ₄ mit flüssigem NH ₃ behandelt	10,9	77,8	0,55	2,20	3,8	3,0
S 18		10,6	75,7	1,43	5,72		
S 20		11,8	84,9	0,87	3,48		
S 31	Fraktion V'	11,3	81,3	3,26	13,0	9,3	8,0
S 36		12,9	92,2	2,09	8,26		
S 38		12,6	90,0	1,61	6,44		
S 7	A(SO ₃ [⊖]) ₄ mit Natrium in flüssigem Ammoniak be- handelt, roh	11,4	82,0	0,1	0,4	2,4	1,9
S 9		11,6	82,9	0,7	2,8		
S 12		11,4	82,0	0,98	3,92		
S 24	Fraktion III	5,3***	58,8	0,067	0,26	0,5	0,3
S 6		8,8	62,8	0,21	0,84		
S 26	Fraktion IV	6,5***	71,7	0,58	2,32	2,3	1,6
S 14	Fraktion V	11,5	82,2	0,85	3,4	9,3	7,1
S 16		9,9	71,2	1,90	7,2		
S 22		10,7	77,0	5,20	20,4		
S 34		10,8	77,7	1,62	6,48		

Tab. 3. Insulinausbeuten bei der Kombination von B(SO₃[⊖])₂ aus Schweineinsulin mit A(SO₃[⊖])₄ und Produkten, die nach Natriumbehandlung erhalten wurden. * Bezogen auf Schweineinsulin mit 25 E/mg. ** Bezogen auf die Einwaage von 8,1 mg A-Kettenpräparat + 7,1 mg B(SO₃[⊖])₂ bzw. die abweichenden Einwaagen bei ***. *** Hier wurden 5,3 mg A-Kettenpräparat mit 4,6 mg B(SO₃[⊖])₂ kombiniert.

Das zweite Ergebnis dieser Arbeit ist der Befund, daß eine Inhibierung der Insulinbildung aus den Ketten erfolgt, falls die A-Kette nicht rein vorliegt, sondern teilschwefelte A-Kettenprodukte selbst in geringen Prozentsätzen beigemischt sind.

Sauberes A(SO₃[⊖])₄ liefert z. B. nach Kombination mit B(SO₃[⊖])₂ Insulinausbeuten von 7–8 Prozent. Ein Rohpräparat mit einem Anteil an A(SO₃[⊖])₄ von immerhin beinahe 60% ergibt jedoch nur noch eine Insulinausbeute von 1,9 Prozent. Die Ausbeute ist also nicht auf etwa 2/3, sondern auf 1/4 abgesunken. Niedrige Insulinausbeuten brauchen demnach kein Beweis dafür zu sein, daß eine A-Kettensynthese mißlungen ist. Möglicherweise enthält das rohe Sulfitylseprodukt zwar erhebliche Mengen an A(SO₃[⊖])₄, die aber wegen des Inhibierungseffektes nur wenig Insulin bilden. Man muß also synthetische A-Kettenpräparate so wirksam reinigen, daß intaktes A(SO₃[⊖])₄ in Substanz isoliert wird. Diese Präparate sollten bei der Kombination mit B(SO₃[⊖])₂ dieselbe Insulinausbeute wie isolier-

tes A(SO₃[⊖])₄ liefern. Man wird dann die niedrigen Insulinausbeuten, die man beobachtet, wenn man synthetische Ketten mit natürlichen vergleicht, nicht mehr auf eine unvermeidliche Natriumschädigung zurückführen können. Vielmehr muß man fordern, daß die synthetischen Bunesalzketten der A- oder B-Kette isolierten Bunesalzketten in ihrer Insulinbildenden Potenz äquivalent sind.

Eine ähnliche Untersuchung über die Fraktionierung von rohen Sulfitylseprodukten isolierter und synthetischer B-Kette mit dem Ziele festzustellen, ob und in welchen Ausbeuten voll wirksames B(SO₃[⊖])₂ auch dann zu isolieren ist, wenn die Kette eine Natriumbehandlung mitgemacht hat, steht noch aus.

Wir danken dem Nordisk Insulinlaboratorium, Gentofte, Dänemark, für die Überlassung kristallinen Schweineinsulins, der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen für die Unterstützung des Forschungsvorhabens 1318, und dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen.