

24. Thyrocalcitonin. I. Isolierung und Charakterisierung wirksamer Peptide aus Schweineschilddrüsen

von F. W. Kahnt, B. Riniker, I. MacIntyre und R. Neher

Chemische Forschungslaboratorien des Departments Pharmazeutika
der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT Basel, Schweiz

Royal Postgraduate Medical School, Ducane Road, London W. 12., Great Britain

(23. XII. 67)

Summary. α - and β -thyrocalcitonin isolated from pig thyroids were found to be single-chain polypeptides with 32 amino acid residues containing a disulphide bridge. Tryptic digestion yielded inactive hepta-, undeca- and tetradecapeptides, the amino acid composition of which is given. β -thyrocalcitonin proved to be the methionine sulphoxide derivative of the easily oxidizable methionine peptide α -thyrocalcitonin; thus, the designation β can be eliminated. Both peptides have a potency of about 200 MRC units/mg dry weight. They can readily be differentiated by their electrophoretic and chromatographic properties, as well as by their tryptic undecapeptide, whereas the hepta- and tetradecapeptides, respectively, produced by trypsin are identical.

COPP *et al.* [1] wiesen 1962 ein neues Hormon nach, welches – im Gegensatz zu Parathormon – das Blutcalcium in Säugetieren zu senken vermag. Ursprünglich wurden die Nebenschilddrüsen für die Produktion dieses *Calcitonin* genannten Stoffes verantwortlich gemacht, doch zeigten neuere Untersuchungen, dass es offenbar von Zellen sezerniert wird, die sich bei Säugetieren innerhalb der Thyroidea befinden [2]; deshalb bezeichnet man das aus Schilddrüsen gewonnene Hormon auch als *Thyrocalcitonin* (im weiteren TC genannt). Es hemmt die Knochenresorption und scheint ein physiologischer Antagonist der Wirkung von Parathormon auf das Knochengewebe zu sein [3].

Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten am «Symposium on Thyrocalcitonin and the C cells» im Juli 1967 über die Isolierung eines oder mehrerer TC-Peptide [4], deren Identität oder Nicht-Identität aber offen blieb. Um die Basis für einen genaueren Vergleich dieser Stoffe zu schaffen, insbesondere mit dem soeben publizierten TC von WOLF *et al.* [5], und um zu dem angeblichen Jodgehalt von TC [6] Stellung zu nehmen, berichten wir hier kurz über Isolierung und eindeutige Charakterisierung von zwei wirksamen Peptiden, welche wir bisher mit α - und β -TC bezeichneten [4b].

Auf Grund eingehender Vorversuche extrahierten wir die Wirkstoffe aus getrockneten und entfetteten Schweine-Schilddrüsen mehrmals mit 70-proz. Äthanol unter Stickstoff bei pH 5,4–6,0, oder aus tiefgefrorenen Drüsen mit Aceton-konz. Salzsäure (4:1) bei pH 2,5; nach schonendem Einengen der zentrifugierten Lösungen wurden inaktive Niederschläge abgetrennt, und die klaren, sauren Konzentrate, im Fall der gefrorenen Drüsen nach Entfettung mit Methylenchlorid, in der Kälte mit Trichloroessigsäure gefällt. Die mit Äther-Aceton gewaschenen Niederschläge enthielten die Hauptmenge der Aktivität in einer Ausbeute von 1–2 MRC-Einheiten/g frische Drüse; die spezifische Aktivität betrug 0,5–1 MRC-Einheit/mg Trockengewicht. Als Mass der Aktivität diente die Senkung des Blut-Calciums in jungen Ratten nach MACINTYRE

et al. [7] in Gegenwart von 0,1% krist. Rinderserumalbumin¹⁾. Das Rohprodukt chromatographierten wir zunächst in grossen Säulen an Bio-Gel P₆ in 0,1N Ameisensäure und analysierten die Eluate nach UV.-Absorption bei 280 nm, Dünnschichtchromatographie auf Sephadex G 25 und biologisch. Die Lyophilisate der aktivsten Eluate enthielten 10–40 MRC Einheiten/mg Trockengewicht und waren frei von Stoffen mit einem Molekulargewicht über 5000; Aktivität war jedoch auch noch in höher molekularen Anteilen nachweisbar. Je 2–5 g angereichertes Material reinigten wir durch multiplikative Verteilung über 250–300 Stufen im System *n*-Butanol-Methanol-0,1N Essigsäure (4:1:5). Nach biologischer und chromatographischer Kontrolle [4b] erhielten wir 2 aktive Hauptfraktionen mit Verteilungskoeffizienten von ca. 0,5 und 1,5, welche jedoch stark von der Konzentration und den vorhandenen Begleitstoffen beeinflusst wurden. Die weniger polare Komponente wurde α -, die stärker polare β -TC genannt; nach einer weiteren Bio-Gel-P₆-Chromatographie in 0,1N Ameisensäure waren ihre spezifischen Aktivitäten auf 50–80 MRC Einheiten gestiegen. Diese stark angereicherten Fraktionen enthielten immer noch Trichloressigsäure, die, wenn erwünscht, durch Ionenaustausch in 0,1N essig- oder ameisenaurer Lösung an Amberlite IRA 400 oder durch Verteilung an einer Bio-Gel-P₁₀-Säule im System *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) mit 0,25 g NaCl/l entfernt wurde. Zur weiteren Reinigung verteilten wir 100–500 mg des 50–70-proz. Wirkstoffes über 800–1100 Stufen unter ständiger chromatographischer und elektrophoretischer Kontrolle, entweder im System *n*-Butanol-1N Essigsäure (1:1) mit 0,25 g Ammonacetat/l oder in dem weniger zu Emulsionen neigenden System *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5 bis 5:1:4). Nach wiederholter Lyophilisation erhielten wir aus den entsprechenden Verteilungselementen chromatographisch und elektrophoretisch einheitliches α - bzw. β -TC einer mittleren spez. Aktivität von je 200 MRC Einheiten/mg Trockensubstanz; beide Peptide sind als Acetate leicht, als Trichloracetate relativ schwer löslich.

α - und β -TC lassen sich gut auf dünnen Aluminiumoxid-Schichten (CAMAG D-O) in sauren Systemen wie *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (75 + 7, 5 + 21) oder basischen wie Chloroform-Methanol-17-proz. NH₃ (41 + 41 + 18) unterscheiden [4b], wobei α -TC weiter läuft als β -TC. Für den Nachweis dienen Chlor/Tolidin-Reagens [8] oder BARTON's Reagens [9]. Die Ninhydrin-Reaktion ist positiv, aber relativ schwach, ebenso wie die Nitroprussid-Cyanid-Reaktion auf Disulfide [10]. Eine elektrophoretische Unterscheidung beider Peptide bei pH 1,9 ist auf Celluloseacetatfolien (Cellogel), nicht aber auf Celluloseschichten (Avicel) oder in Polyacrylamidsäulen möglich; auf Cellogel wandert β -TC kathodisch rascher als α -TC.

Vor und nach Perameisensäureoxydation ergab die Aminosäureanalyse des Totalhydrolysates (6N HCl, 110°, 24 h) keinen qualitativen oder quantitativen Unterschied zwischen α - und β -TC (s. Tabelle; die darin angeführten molaren Verhältniszahlen wurden auf- oder abgerundet, wenn sie nur wenig von ganzen Zahlen abwichen). Mit Ausnahme einer identischen, soeben von WOLF *et al.* [5] publizierten Analyse weichen die meisten bisher erschienenen Daten mehr oder weniger stark von unseren ab (s. auch [4] [11]).

Wie schon früher berichtet [4b] ist β -TC gegen *milde* Oxydation mit Wasserstoffperoxid in verdünnter Ameisensäure chemisch und biologisch stabil; α -TC ist zwar

¹⁾ Für die kompetente Durchführung sehr zahlreicher Bestimmungen sind wir Miss L. GALANTE (London) sowie Dr. R. MAIER und Herrn W. PIGNAT (CIBA AG, Basel) sehr dankbar.

Analytische Daten für α -TC und α -TC-sulfoxid (= β -TC) sowie deren tryptische Fragmente

	α -TC/ α -TC-sulfoxid	α -TC oxydiert	Tr ₁	Tr ₁ oxydiert	Tr ₂	Tr ₃ /Tr ₃ -sulfoxid
Trp ^{a)}	1	– ^{b)}	1	–	0	0
His	1	–	0	–	1	0
Arg	2	–	1	–	1	0
Asp/Asn	4	4	1	1	3	0
Thr	2	2	1	1	0	1
Ser	4	4	3	3	0	1
Glu/Gln	1	1	0	0	0	1
Pro	2	2	0	0	0	2
Gly	3	3	0	0	0	3
Ala	1	1	1	1	0	0
1/2 (Cys) ₂	1,3	0	1,2	0	0	0
Cys(O ₃ H)	0	2	0	2	0	0
Val	1	1	1	1	0	0
Met	1	0	0	0	0	1
Met(O ₂)	0	1	0	0	0	0
Leu	3	3	2	2	1	0
Tyr	1	0,5	1	0,8	0	0
Phe	3	3	0	0	1	2
Total Aminosäuren	32		14		7	11
Mol.-Gew. berechnet	3604/3620		1601		914	1125/1141
Dünnschicht- chromatographic ^{c)}						
BuOH-AcOH-H ₂ O	0,56/0,51		0,53		0,29	0,55/0,40
MeOH-CHCl ₃ -NH ₄ OH	0,54/0,48		0,51		0,24	0,78/0,73
Elektrophorese ^{d)}						
auf Celluloseacetat	1,1/1,5		1,6		5,3	1,6/1,9
auf Avicel-Cellulose	2,9		2,5		4,7	1,6

a) spektrophotometrisch bestimmt
b) – bedeutet nicht bestimmt
c) Rf-Werte auf Aluminiumoxid
d) pH = 1,9; 90 Min.; 9 V/cm. Die Zahlen bedeuten kathodische Laufstrecken in cm.

ebenfalls biologisch stabil, nicht aber chemisch, wobei es in ein stärker polares Produkt (früher als α_2 bezeichnet) übergeht, das sich chromatographisch von β -TC nicht sicher unterscheiden liess. Analyse (s. Tab.) und chromatographischer Vergleich der tryptischen Abbauprodukte Tr₁, Tr₂, Tr₃ erwiesen nun, dass sich β -TC chemisch vom α -Peptid nur durch den Gehalt an Methioninsulfoxid statt Methionin unterscheidet. Der tryptische Abbau ergab bei einem Peptid-Enzym-Verhältnis von 50:1 bei pH 7,5 nach 40 Min. in glatter Reaktion 3 Bruchstücke, die durch multiplikative Verteilung im Ammoniumacetatsystem getrennt und rein isoliert werden konnten. Die Bruchstücke waren biologisch nicht mehr aktiv. Nach Aminosäureanalyse (s. Tab.) bildeten sich je ein Hepta-, Undeca- und Tetradecapeptid, die sich chromatographisch und elektrophoretisch sehr gut zur einwandfreien Charakterisierung von α - und β -TC eignen. Der durch Methionin/Methioninsulfoxid bedingte Unterschied von α - und β -TC kommt nur im Bruchstück Tr₃ zur Geltung. Wir möchten in Zukunft die Bezeich-

nung α -Thyrocalcitonin-sulfoxid für β -TC verwenden. Das Präfix α scheint uns gerechtfertigt zu sein, da noch weitere, teils stärker, teils schwächer polare aktive Komponenten in Rohextrakten nachweisbar sind.

Aus den Daten von WOLF *et al.* [5], die nur ein einziges aktives Peptid beschrieben, ist nicht ersichtlich, ob es sich um α -TC oder sein etwa gleich wirksames Sulfoxid handelt. Da wir noch nie angereicherte Thyrocalcitonin-Proben frei von α -TC-Sulfoxid erhielten, letzteres aber in der Regel vorherrscht, stellt das von WOLF *et al.* isolierte Peptid möglicherweise α -TC-sulfoxid dar.

Von anderer Seite [6] wurde kürzlich postuliert, das «Thyrocalcitonin» Jod enthalten sollte; über die Reinheit des Präparates herrscht jedoch Unklarheit. Es war prinzipiell auch bei unserem α -TC-Peptid nicht ganz auszuschliessen, dass es ausser den bei der Totalhydrolyse erfassbaren Aminosäuren, NH_3 und einer salzbildenden Säure-Komponente noch andere Elemente wie Jod oder Schwermetalle als integrierende Bestandteile enthält. Auf Grund der mit α -TC-sulfoxid durchgeführten Aktivierungsanalyse²⁾ konnten jedoch keine solchen Elemente in grösseren als Spurenkonzentrationen nachgewiesen werden.

Die hier mitgeteilten Daten weisen darauf hin, dass α -TC ein lineares Polypeptid mit 32 Aminosäuren und einer Disulfidbrücke darstellt. Über die Sequenz dieser Bausteine berichten wir in einer folgenden Arbeit.

Frl. M. MERKLE und den Herren A. MILANI, H. STEFFEN, R. STEINER und E. VON ARX danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit sowie den Herren Dr. M. SUTTER, Dr. W. VOSER, K. WEISS und H. WIEGAND für ihre wertvolle Hilfe bei der Aufarbeitung grösserer Mengen Drüsenmaterial.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. H. COPP, E. C. CAMERON, B. A. CHENEY, A. G. F. DAVIDSON & K. G. HENZE, *Endocrinology* **70**, 638 (1962).
- [2] P. F. HIRSCH, G. F. GAUTHIER & P. L. MUNSON, *Endocrinology* **73**, 244 (1963); G. V. FOSTER, A. BAGHDIAZT, M. A. KUMAR, E. SLACK, H. A. SOLIMAN & I. MACINTYRE, *Nature (London)* **202**, 1303 (1964).
- [3] J. FRIEDMAN & L. G. RAISZ, *Science* **150**, 1465 (1965); G. MILHAUD, A.-M. PERAULT & M. S. MOUKHTAR, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. **267**, 813 (1965); M. A. ALIAPOLIOS, P. GOLDBERGER & P. L. MUNSON, *Science* **157**, 330 (1966); C. J. ROBINSON, T. J. MARTIN, E. W. MATTHEWS & I. MACINTYRE, *J. Endocrinol.* **39**, 71 (1967); I. MACINTYRE, J. A. PARSONS & C. J. ROBINSON, *J. Physiol.* **197**, 393 (1967).
- [4] Symposium on Thyrocalcitonin and the C-Cells, London, 17.–20. Juli 1967 (William Heinemann Medical Books Ltd., London 1968): a) T. V. GUDMUNDSSON, P. G. H. BYFIELD, L. GALANTE & I. MACINTYRE; b) R. NEHER & F. W. KAHNT; c) J. T. POTTS JR., R. A. REISFELD, P. F. HIRSCH, A. B. WASTED & P. L. MUNSON; d) P. H. BELL; e) F. J. WOLF.
- [5] I. PUTTER, E. A. KACZKA, R. E. HARMAN, E. L. RICKES, A. J. KEMPF, L. CHAIET, J. W. ROTH ROCK, A. W. WASE & F. J. WOLF, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 5301 (1967).
- [6] P. BLANQUET, M. CROIZET, A. M. MOURA, F. DUMORA & A. BAGHDIAZT, *Science* **158**, 381 (1967).
- [7] M. A. KUMAR, E. SLACK, A. EDWARDS, H. A. SOLIMAN, A. BAGHDIAZT, G. V. FOSTER & I. MACINTYRE, *J. Endocrinol.* **33**, 469 (1965).
- [8] C. G. GREIG & D. H. LEABACK, *Nature* **188**, 310 (1960).
- [9] G. M. BARTON, R. S. EVANS & J. A. F. GARINER, *Nature* **170**, 250 (1952).
- [10] G. TOENNIS & J. J. KOLB, *Analyt. Chemistry* **23**, 823 (1951).
- [11] C. D. HAWKER, H. RASMUSSEN & J. D. GLASS, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **58**, 1535 (1967).

²⁾ Diese Analyse wurde in verdankenswerter Weise von Herr Dr. A. WYTENBACH, Eidgenössisches Institut für Reaktorforschung Würenlingen, ausgeführt.