

25. Isolierung, Aminosäurezusammensetzung und tryptischer Abbau von Thyrocalcitonin aus Schweineschilddrüsen

von J. Franz, J. Rosenthaler, K. Zehnder, W. Doepfner, R. Huguenin und St. Guttman

Forschungslaboratorien, SANDOZ AG, Basel

(23. XII. 67)

Summary. Hog thyrocalcitonin has been isolated in the form of an homogeneous peptide. After digestion with trypsin three fragments have been separated by paper electrophoresis. The amino acid composition of intact thyrocalcitonin and of the three tryptic fragments is given in a table.

In der vorliegenden kurzen Mitteilung geben wir den ersten Teil unserer Resultate betreffend die Isolierung und die Aminosäurezusammensetzung des Thyrocalcitonins aus Schweineschilddrüsen sowie seiner tryptischen Spaltprodukte bekannt.

Die biologische Wirksamkeit wurde an jungen, 100–130 g schweren männlichen Ratten (Stamm SIV 50 von IVANOVAS, Kisslegg, Allgäu) geprüft.

Die nüchteren Tiere erhalten während 16 Std. vor dem Test nur physiologische Natriumchloridlösung, die mit entmineralisiertem Wasser angesetzt wurde. Vor der Applikation des Testpräparates wird am retroorbitalen Venenplexus mit einer scharfrandigen Glaskapillare ca. 1 ml Blut entnommen, dann das in 0,2N Essigsäure gelöste Testpräparat am Schwanz intravenös injiziert und 60 Min. später wieder gleich Blut entnommen. Von der Testlösung wurden stets 1,0 ml pro kg Körpergewicht injiziert. Von jedem Testpräparat wurden mindestens 2 im Verhältnis 1:3 sich unterscheidende Dosen getestet. Pro Dosis wurden mindestens 5–10 möglichst gleich schwere Tiere verwendet. Das Blut wurde in Polyäthylen-Zentrifugenröhrchen aufgefangen, nach dem Gerinnen abzentrifugiert und das überstehende Serum in Polyäthylenröhrchen abpipettiert. Die Calcium-Bestimmung im Serum erfolgte vollautomatisch durch Verdünnung mit 0,25-proz. EDTA-Lösung mittels eines Samplers II und einer Proportionierpumpe des TECHNICON-Auto-Analyzers und Messung mittels eines UNICAM Atom-Absorptionsspektralphotometers SP-90, der mit einem Lin/Log Varicord 43 der PHOTOVOLT CORP. gekoppelt war. Die Aktivitäten wurden nach KUMAR *et al.* [1] berechnet.

Als Ausgangsmaterial für die Extraktion diente ein unter besonders sorgfältigen Bedingungen aus Schweineschilddrüsen hergestelltes Acetontrockenpulver¹⁾. Daraus wurde ein zum Schluss durch Trichloressigsäure-Fällung gewonnenes Präparat nach folgender von uns bedeutend vereinfachten Variante der von RASMUSSEN *et al.* [2] und TENENHOUSE *et al.* [3] publizierten Methode hergestellt.

200 g Acetontrockenpulver werden bei +4° mit 1,2 l eiskaltem, frisch destilliertem Aceton während 15 Min. durchgerührt. Nach Absaugen wird mit 1 l eiskaltem, frisch destilliertem Chloroform und dann nochmals mit 1 l Aceton, wie oben, behandelt. Das noch feuchte Pulver wird bei +4° unter hochtourigem Rühren mit einem Handmixer auf einmal in 2 l eiskalte Lösung, bestehend aus 960 g Harnstoff, 35,1 g Cystein-hydrochlorid, 16,6 ml 37-proz. Salzsäure und Wasser *ad* 2 l, eingetragen und die Suspension so lange gerührt bis ein gleichmässig gelartiger Brei entsteht. Dieser wird nun auf einmal in 4 l eiskalte Aceton-Eisessig-Mischung 1:1 eingetragen, wobei sich, nach mässigem Rühren, der grössere Teil auflöst. Nach 30 Min. Stehen bei +4° werden unter intensivem Rühren im Lauf von $\frac{3}{4}$ Std. nacheinander 6 l eiskaltes Aceton und 56 ml 1N Natriumchloridlösung zugegeben. Nach dem Abfiltrieren (das Ungelöste wird verworfen) wird zum klaren

¹⁾ Wir danken der Firma SANABO, Wien, für die Herstellung dieses Präparates.

Filtrat (ca. 11 l), unter kräftigem Rühren bei +4° ein gleiches Volumen Äther, peroxidfrei, im Lauf von ca. 45 Min. gegeben. Über Nacht lässt man die Fällung im Kühlraum stehen. Nach dem Abdekantieren wird der gebildete Niederschlag 10 Min. bei 16300 g und +2° abzentrifugiert (der Überstand wird verworfen). Der Niederschlag wird sofort in 1 l Lösungsmittelgemisch, bestehend aus 200 ml Eisessig, 1,76 g Cystein-hydrochlorid und bi-dest. Wasser, aufgelöst. Zu dieser Lösung wird unter mässigem Rühren, bei +20°, portionenweise während ca. 10 Min. festes Natriumchlorid bis zur 5-proz. Endkonzentration zugegeben. Dann wird 10 Min. bei 16300 g zentrifugiert. Der klare Überstand wird zum Abtrennen des restlichen Fettes durch ein Kleenex filtriert, der Niederschlag wird verworfen. Zum Filtrat (ca. 1 l) wird tropfenweise bei Eisbadtemperatur eine eiskalte wässrige 45-proz. (Gew./Vol.) Trichloressigsäurelösung bis zur 7,5-proz. Endkonzentration getropft. Nach 1½ Std. wird der Niederschlag 10 Min. bei 16300 g und +2° zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, der Niederschlag wird mit total 200 ml 5-proz., eiskalter Trichloressigsäurelösung gewaschen und nochmals, wie oben, abzentrifugiert. Der nasse Niederschlag wird sofort in ca. 800 ml 0,03N Salzsäure bei +20° unter Rühren gelöst. Nach Auflösen wird 150 g feuchtes Ionenaustauscherharz IRA-400 in der Acetatform zugegeben und die Suspension gerührt bis ihr pH 3,0–3,1 erreicht hat. Dann wird filtriert. Nach Lyophilisieren des Filtrats verbleiben 1,2 bis 1,5 g trockenes Pulver mit einem mittleren Stickstoffgehalt von 15,0%. Die biologische Aktivität dieses Pulvers beträgt 1,9 bis 3,0 MRC-Einheiten/mg.

Die weitere Reinigung erfolgte durch Chromatographie auf Sephadex G-75 (*cf.* POTTS *et al.* [4]) und auf Bio Gel P-6 (*cf.* PUTTER *et al.* [5]):

Eine Menge von 3 g des oben erhaltenen Pulvers wurde in 100 ml 0,2N Ammoniumacetat-Puffer von pH 4,7 gelöst und auf eine Säule von Sephadex G-75 (5,0 × 150 cm) gegeben. Die Säule wurde so lange mit Ammoniumacetat-Puffer von pH 4,7 bei 4° und mit einer Laufgeschwindigkeit von 40 ml/Std. eluiert, bis die UV.-Absorption bei 280 nm im Eluat wieder auf den Ausgangswert abgesunken war. Zur Festlegung des Aktivitätsbereiches im Eluat wurden aliquote Teile von jeder 10. Fraktion im Ratten-Test dosiert (Volumen pro Fraktion 10 ml). Nach dem Lyophilisieren der zusammengefassten aktiven Fraktionen ergab sich eine Ausbeute von 30–40 mg mit einer Aktivität von ca. 25–50 MRC-Einheiten/mg.

100 mg des auf der Sephadex-Säule gereinigten Präparates wurden in 3,0 ml 0,4N Essigsäure gelöst und auf eine Säule von Bio Gel P-6 (2,5 × 250 cm) gegeben. Das Eluieren erfolgte mit 0,4N Essigsäure bei 4° mit einer Laufgeschwindigkeit von 16 ml/Std. Die Messung der UV.-Absorption bei 280 nm im Eluat (Fraktionen à 3 ml) zeigte eine Auftrennung in drei Pike. Der Aktivitätspik stimmte mit dem durch Messung der UV.-Absorption lokalisierten mittleren Pik in der Lage und in der Symmetrie genau überein. Die Ausbeute an lyophilisiertem Präparat betrug 13 mg mit einer Aktivität von ca. 150 MRC-Einheiten/mg Peptid.

Das Präparat erwies sich als einheitlich bei der Hochspannungspapier-Elektrophorese bei pH 1,9 und pH 5,8 nach Entwicklung mit Chlor/Kaliumjodid/Stärke, Bromphenolblau, sowie mit EHRlich-, PAULY-, FOLIN- und YAMADA-[6]-Reagenzien. Mobilität, Farbreaktionen und Aminosäurezusammensetzung (BECKMAN-Unichrom; Methode von STEIN und MOORE; Mittelwerte von zwei Analysen) nach Hydrolyse (188 µg; HCl 6N; 110°; 16 Std.) sind in der Tabelle in µMol und in Molverhältnissen angegeben.

Die von uns gefundene Aminosäurezusammensetzung entspricht den Resultaten von PUTTER *et al.* [5].

Wir haben zusätzlich unser reines Präparat mit Trypsin abgebaut.

Dazu wurden 13,0 mg dieses Präparates in 1,0 ml 0,1M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer von pH 9 gelöst. Nach Zusatz einer Lösung von 100 µg zweimal kristallisiertem Trypsins in 150 µl Puffer wurde bei 37° inkubiert. Nach 2 und nach 4 Std. wurde jeweils die gleiche Menge Trypsin erneut zugesetzt. Nach weiteren 12 Std. wurde abzentrifugiert. Ein Aliquot der Lösung wurde einer Papierelektrophorese (Puffer: Ameisensäure/Essigsäure/Wasser 15:10:75, pH 1,9; 60 V/cm; 60 Min; SCHLEICHER und SCHUELL 2040 gew.) unterworfen. Drei Hauptflecke (T₁, T₂ und T₃) wurden erhalten, deren Mobilitäten und Farbreaktionen in der Tabelle zusammengestellt sind.

Die Hauptmenge wurde lyophilisiert und das Lyophilisat in 0,2 ml Puffer pH 1,9 gelöst. Je eine Hälfte dieser Lösung wurde auf der Schmalseite von zwei 40×28 cm grossen, mit dem Puffer vorgewaschenen Papieren (SCHLEICHER und SCHUELL 2040 gew.) aufgetragen und während 60 Min. einer Elektrophorese bei 2000 V/60 mA unterworfen. Nach Lokalisierung der Fraktionen wurden diese mit dem Puffer eluiert. Man erhielt so drei bei pH 1,9 elektrophoretisch homogene Fraktionen (T_1 , T_2 und T_3), deren Aminosäurezusammensetzung in μMol ausgedrückt (BECKMAN-Unichrom; Methode von STEIN und MOORE; Mittelwerte von je zwei Analysen) nach Hydrolyse (HCl 6N; 110° ; 12 Std.) in der Tabelle zusammengestellt ist. Die in Klammer stehenden Zahlen geben die den gefundenen Werten am besten entsprechenden ganzzahligen Molverhältnisse an.

Elektrophoretische Mobilität (a), Farbreaktionen (b) und Aminosäurezusammensetzung (c) von Hydrolysaten des Thyrocalcitonins (TCT) und seiner tryptischen Spaltprodukte (T_1 , T_2 und T_3)

		TCT	T_1	T_2	T_3
a)	Elektrophoretische Mobilität bei pH 1,9	0,7 Glu	1,3 Glu	1,0 Glu	0,5 Glu
b)	YAMADA [6]	+	+	+	–
	EHRlich	+	–	+	–
	PAULY	+	+	+	–
	FOLIN	+	–	+	–
	Bromphenolblau	+	+	(–)	+
c)	Asp	0,160 (4)	0,081 (3)		0,030 (1)
	Thr	0,075 (2)			0,054 (2)
	Ser	0,152 (4)		0,038 (1)	0,091 (3)
	Glu	0,048 (1)			0,047 (1)
	Pro	0,089 (2)			0,073 (2)
	Gly	0,118 (3)			0,110 (3)
	Ala	0,044 (1)		0,027 (1)	
	Cys/2	0,060 (1,5)			0,021 (1)
	Val	0,040 (1)			0,017 (1)
	Met	0,039 (1)			0,034 (1)
	Ile	0,003 (0)			
	Leu	0,115 (3)	0,026 (1)	0,014 (1)	0,038 (1)
	Tyr	0,036 (1)		0,013 (1)	
	Phe	0,116 (3)	0,025 (1)		0,068 (2)
	Lys	0,006 (0)			
	His	0,039 (1)	0,022 (1)		
	Arg	0,083 (2)	0,027 (1)	0,024 (1)	

Bemerkung. Vor der Hydrolyse wurde ein Rest Tryptophan in TCT und in T_2 durch UV-Absorption, bzw. Farbreaktion (EHRlich) festgestellt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. A. KUMAR, E. SLACK, A. EDWARDS, H. A. SOLIMAN, A. BAGHDIAZ, G. V. FOSTER & I. MACINTYRE, *J. Endocrin.* **33**, 469 (1965).
- [2] H. RASMUSSEN, Y. L. SZE & R. YOUNG, *J. biol. Chemistry* **239**, 2852 (1964).
- [3] A. TENENHOUSE, C. ARNAUD & H. RASMUSSEN, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **53**, 818 (1965).
- [4] J. T. POTTS JR., R. A. REISFELD, P. F. HIRSCH, A. B. WASTHED, E. F. VOELKEL & P. L. MUNSON, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **58**, 328 (1967).
- [5] I. PUTTER, E. A. KACZKA, R. E. HARMAN, E. L. RICKES, A. J. KEMPF, L. CHAIET, J. W. ROTHROCK, A. W. WASE & F. J. WOLF, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 5301 (1967).
- [6] S. YAMADA & H. A. ITANO, *Biochim. biophys. Acta* **130**, 538 (1966).