

199. Menschliches Calcitonin

I. Isolierung und Charakterisierung

von **B. Riniker, R. Neher, R. Maier, F. W. Kahnt, P. G. H. Byfield,
T. V. Gudmundsson, L. Galante** und **I. MacIntyre**

Forschungslaboratorien des Departements Pharmazeutika der
CIBA AKTIENGESELLSCHAFT Basel, Schweiz

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

(18. IX. 68)

Summary. Two highly active calcitonin peptides, M with 32 amino acids, and D a dimer of M, were isolated from a large human mediastinal C cell tumour. D can easily be transformed into M by the action of 1N ammonia; D and M afford two different sulphoxides, but all four peptides yield the same product upon oxidation with performic acid. Both D and M have a potency of about 120 MRC units/mg dry weight; their sulphoxides, by contrast, are almost inactive. Tryptic digestion of M produces an N-terminal octadecapeptide (Tr_I) and a C-terminal tetradecapeptide (Tr_{II}), the latter being also obtained from D. Amino acid analysis and other analytical data are presented. The structure of the human calcitonin peptides D and M is thus very different from that of porcine α -thyrocalcitonin.

Das von COPP *et al.* [1] 1962 postulierte Hormon Calcitonin konnte bereits in Fischen, Vögeln, Säugern und im Menschen nachgewiesen werden (vgl. [2]). Inzwischen gelang es einigen Gruppen, das Hormon aus Schweineschilddrüsen als ergiebigster Quelle zu isolieren und in seiner Struktur aufzuklären [3]; dieses als Schweine- α -Thyrocalcitonin bezeichnete Dotriacontapeptid wurde kürzlich auch synthetisch zugänglich [4].

Im Hinblick auf die mit einer therapeutischen Anwendung verbundenen Implikationen ist die Frage wesentlich, ob das menschliche Calcitonin mit dem Schweine-Thyrocalcitonin identisch ist oder nicht. Immunologisch erwies sich die Identität zumindest als umstritten [5].

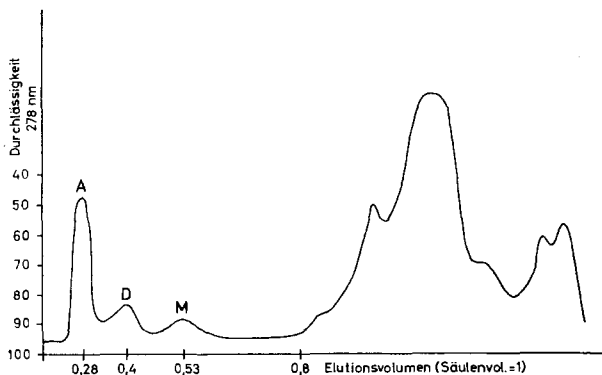
Da die Calcitonin-Aktivität (im Ratten-Test) in Schilddrüsen und Plasma des Menschen eine für Isolierung und Strukturanalyse viel zu geringe Hormonkonzentration erwarten liess, musste eine geeignetere Quelle gefunden werden. WILLIAMS [6] hatte darauf hingewiesen, dass Medullarcarcinome der Schilddrüse und entsprechende Metastasen sehr reich an jenen Zelltypen sind, die schon vorher als Bildungsort für Calcitonin erkannt worden waren (C-Zellen, parafollikuläre Zellen, etc. [7]). Auch gelang es bereits mehreren Autoren [8], hohe Calcitoninaktivität in solchen Tumorextrakten biologisch nachzuweisen.

Im folgenden berichten wir nun über Isolierung und Charakterisierung zweier hochaktiver Calcitoninpeptide aus menschlichem C-Zellgewebe. Es zeigte sich, dass beide von Schweine- α -Thyrocalcitonin strukturell überraschend stark verschieden sind.

Als Ausgangsmaterial diente uns ein 815 g schwerer C-Zellen-Tumor¹⁾ aus dem Mediastinum eines 48 Jahre alten Mannes. Diesem Patienten wurde 3 Jahre vorher ein Medullarkarzinom der Schilddrüse exstirpiert, was allerdings die Bildung von Metastasen nicht verhindern konnte. Das 3 Std. *post mortem* entfernte und histologisch als Medullarcarcinom differenzierte Gewebe wurde bei -20° eingefroren und 5 Monate bei dieser Temperatur aufbewahrt. Nach Lyophilisierung entfettete man 3mal mit Äther (63,1 g) und extrahierte zuerst mit der 15-fachen, dann 7,5-fachen und schliesslich 3,5-fachen Menge eines Gemisches von *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (75+7,5+21) mehrere Stunden lang. Die vereinigten und vom Lösungsmittel befreiten Extrakte wurden zweimal in 0,1N Ameisensäure lyophilisiert.

Der Rohextrakt wog 6,85 g und enthielt bereits ca. 10 MRC-Einheiten²⁾/mg Trockengewicht. Der in heisser 0,1N Ameisensäure lösliche Anteil (3,6 g) aus 6,0 g Rohextrakt wurde in 2 Teilen an einer Bio-Gel-P₆-Säule (5 × 84 cm) in 0,1N Ameisensäure chromatographiert (s. Fig.).

Die nach UV.-Absorption bei 278 nm, biologischer Aktivität, Dünnschichtchromatographie und Elektrophorese (s. Tab. 1) analysierten 100 Fraktionen zu je 19 ml enthielten 3 aktive Zonen, die wir als A, D und M bezeichneten. Das Elutionsvolumen ihrer Maxima betrug 0,28, 0,4 bzw. 0,53 des Säulenvolumens (1650 ml). Zunächst wurde das aktivste Material D und M isoliert und separat mittels multiplikativer Verteilung im System *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4 + 1 + 5) über 277 bzw. 360 Stufen weitergereinigt. Der *K*-Wert von D betrug ca. 0,2 und derjenige von M ca. 0,5; die Hauptfraktionen beider Komponenten erwiesen sich nach Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese und Aminosäureanalyse bereits rein. Beide Peptide wiesen eine spez. Aktivität von ca. 120 MRC-Einheiten/mg auf (s. Tab. 1 und 2). Aus dem lipophilen Bereich der CRAIG-Verteilungen (*K* ca. 3,0) erhielten wir eine geringe Menge einer weiteren aktiven Komponente L, die wie Fraktion A noch nicht näher untersucht wurde.



Chromatographie des Rohextraktes (3 g) aus dem C-Zell-Tumor an Bio-Gel P₆ in 0,1N Ameisensäure

Zur Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Alox (CAMAG D-0) mit den Systemen 52 (*n*-Butanol-Eisessig-Wasser 75+7,5+21), 79 (*n*-Butanol-Pyridin-Wasser 1+1+1) und 45 (*sec*-Butanol-3-proz. NH₃ 7+3) sowie Avicel-Cellulose (SCHLEICHER & SCHÜLL, Selecta) mit dem System 101 A (*n*-Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser 42+24+4+30). Elektrophoresen wurden

1) Herrn Dr. E. D. WILLIAMS, Department of Morbid Anatomy, Royal Postgraduate Medical School, London, möchten wir für die Überlassung dieses Materials bestens danken.

2) Im Rattentest in Gegenwart von 0,1% krist. Rinderserumalbumin [9].

ebenfalls auf Avicel-Dünnschichtplatten ausgeführt. D und M geben Farbreaktionen mit Ninhydrin, Chlor-Tolidin, Kaliumhexacyanoferrat(II)-Eisen(III)-chlorid, diazotiertem Sulfanilsäureamid, aber keine mit EHRlich- oder SAKAGUCHI-Reagens; UV.-Fluoreszenz (254/366 nm) fehlt.

Tabelle 1. Analytische Daten für die menschlichen Calcitonin-Peptide, verglichen mit Schweine- α -Thyrocalcitonin [10]

	D	D-di-sulfoxid a)	M	M-sulfoxid	D/M oxydiert ^{b)}	Tr _I aus M	Tr _{II} aus D/M	α -Thyrocalcitonin
Dünnschichtchromatographie								
auf Alox, Rf (52)	0,54	0,44	0,59	0,55	0,36	0,27	0,75	0,56
auf Alox, Rf (79)	0,63	0,59	0,65	0,62	0,52	0,23	0,78	0,55
auf Alox, Rf (45) ^{c)}	0,32	0,27	0,37	0,33	0,24	0,21	0,69	0,26
auf Cellulose, Rf (101 A)	0,46	0,41	0,52	0,48	0,41	0,42	0,59	0,51
auf Sephadex G 25 ^{d)}	0,95	0,95	0,82	0,82	0,87	0,70	0,68	0,70
Elektrophorese auf Cellulose ^{e)}	4,2	4,2	3,7	3,7	1,3	3,9	4,5	4,8
Biol. Aktivität in MRC-Einheiten/mg [9] (Mittelwerte)	120	ca. 1	120	ca. 1	< 1			100

a) Die Rf-Werte von D-monosulfoxid liegen zwischen denjenigen von D und D-disulfoxid.
 b) Oxydation mit Perameisensäure zum Dicysteinsäure-Methioninsulfon-Peptid, 10 Min. 20°.
 c) In diesem basischen Fließmittelsystem tritt eine teilweise Umwandlung von D in M und von D-disulfoxid in M-sulfoxid ein.
 d) Fließmittel = 0,1N Ameisensäure. Die Zahlen bedeuten Laufstrecken bezogen auf Ribonuclease = 1,0.
 e) pH = 1,9; 90 Min. bei 17 V/cm. Die Zahlen bedeuten kathodische Laufstrecken in cm.

Beim Vergleich der beiden Peptide D und M stellte es sich heraus, dass ersteres eine dimere Form des Dotriacontapeptides M ist. Analoge Dimere, bedingt durch intermolekularen Austausch der Cystin-Disulfidbrücke, wurden auch bei den Hypophysenhormonen Oxytocin [11] und Vasopressin [12] beobachtet. In Übereinstimmung mit der unterschiedlichen Molekelgrösse ist das Verhalten bei der Chromatographie an Bio-Gel P₆ und an Sephadex G 25: Das dimere D läuft jeweils rascher als das monomere M.

Die Bestimmung der Sedimentationskonstante *S* in der Ultrazentrifuge³⁾ ergab die Werte $(0,51 \pm 0,05) \cdot 10^{-13}$ für M und $(0,81 \pm 0,08) \cdot 10^{-13}$ für D.

Bei milder Oxydation der methioninhaltigen Peptide D und M mit Wasserstoffperoxid in 0,01N Essigsäure entstehen die entsprechenden Sulfoxide. Bei D verläuft diese Reaktion in zwei chromatographisch gut unterscheidbaren Stufen über das

³⁾ Bei 20° in 0,5-proz. Lösung in 0,05N Essigsäure bei 67770 U/min ausgeführt von Herrn Dr. P. MosER, Laboratorium für Molekularbiologie, ETH, Zürich, dem wir für die Durchführung dieser Messung zu grossem Dank verpflichtet sind.

Mono- zum Disulfoxid. M-sulfoxid und D-disulfoxid sind überraschenderweise und im Gegensatz zu α -Thyrocalcitonin-sulfoxid biologisch nahezu inaktiv.

Tabelle 2. Aminosäurezusammensetzung der menschlichen Calcitonin-Peptide im Vergleich zu Schweine- α -Thyrocalcitonin [10]

	D	M	D/M oxydiert ^{b)}	Tr _I aus M	Tr _{II} aus D/M	α -Thyro- calcitonin
Trp ^{a)}	0	0	0	0	0	1
Lys	2	1	1	1	0	0
His	2	1	1	0	1	1
Arg	0	0	0	0	0	2
Asp	2	1	1	1	0	0
Asn	4	2	2	2	0	4
Thr	10	5	5	3	2	2
Ser	2	1	1	1	0	4
Glu	0	0	0	0	0	1
Gln	4	2	2	1	1	0
Pro	4	2	2	0	2	2
Gly	8	4	4	2	2	3
Ala	4	2	2	0	2	1
$\frac{1}{2}$ (Cys) ₂	4	2	0	2	0	2
Cys (O ₃ H)	0	0	2	0	0	0
Val	2	1	1	0	1	1
Met	2	1	0	1	0	1
Met (O ₂)	0	0	1	0	0	0
Ile	2	1	1	0	1	0
Leu	4	2	2	2	0	3
Tyr	2	1	1	1	0	1
Phe	6	3	3	1	2	3
Total Aminosäuren	64	32	32	18	14	32
Mol.-Gew. berechnet	6838	3419	3549	1994	1442	3604

a) spektrophotometrisch bestimmt
b) s. Fussnote b), Tabelle 1.

Bei der Oxydation mit Perameisensäure erhielten wir aus D und M sowie deren Sulfoxiden ein *einziges* Oxydationsprodukt, das Dicysteinsäure-Methioninsulfon-Peptid (Tab. 1 und 2).

Bei einstündigem Stehen seiner Lösung in 1N Ammoniak bei 45° geht D nahezu quantitativ in das monomere M über. Ebenso wandelt sich unter diesen Bedingungen das dimere D-disulfoxid in das monomere M-sulfoxid um.

Bei der Inkubation von M mit Trypsin entstand rasch ein Gemisch von 2 Fragmenten (Tr_I und Tr_{II}), die präparativ auf einer Cellulose-Dünnschichtplatte getrennt und analysiert werden konnten. Aus D wurde beim analogen Abbau mit Trypsin das identische C-terminale Fragment Tr_{II} erhalten, jedoch ein von Tr_I verschiedenes (dimeres) N-terminales Peptid, das sich erst beim Erwärmen mit Ammoniak in Tr_I umwandelte.

Das Verhältnis von dimerem D zu monomerem M betrug in diesem Fall von Medullarcarcinom ungefähr 3:2. Über ihre Isolierung aus C-Zell-Gewebe bei weiteren Fällen werden wir separat berichten [13].

Aus dem zur Verfügung stehenden menschlichen Gewebe konnten wir somit bisher 2 hochaktive Komponenten D und M isolieren; wir halten es für wahrscheinlich, dass das monomere Peptid – Calcitonin M – dem genuinen Hormon entspricht. Obwohl dieses menschliche Calcitonin M wie das Schweine- α -Thyrocalcitonin ein lineares Polypeptid mit 32 Aminosäuren und einer Disulfidbrücke darstellt, unterscheiden sich die Strukturen dieser beiden Hormone sehr wesentlich.

Für ihre ausgezeichnete und fleissige Mitarbeit danken wir Frau R. MEIER und Frau M. RIST sowie den Herren A. MILANI, H. MÜLLER, W. PIGNAT, R. STEINER und E. VON ARX. Die Arbeit an der Royal Postgraduate Medical School wurde teilweise vom MEDICAL RESEARCH COUNCIL und vom WELLCOME TRUST unterstützt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. H. COPP, E. C. CAMERON, B. A. CHENEY, A. G. F. DAVIDSON & K. G. HENZE, *Endocrinology* **70**, 638 (1962).
- [2] G. V. FOSTER, *Postgrad. Med. J.* **44**, 411 (1968); I. MACINTYRE, *J. Roy. Coll. Physicians Lond.* **2**, 275 (1968).
- [3] R. NEHER, B. RINIKER, H. ZUBER, W. RITTEL & F. W. KAHNT, *Helv.* **51**, 917 (1968); J. T. POTTS, JR., H. D. NIALL, H. T. KEUTMANN, H. B. BREWER, JR. & L. J. DEFTOS, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **59**, 1321 (1968); P. H. BELL, W. F. BARG, JR., D. F. COLUCCI, M. C. DAVIES, C. DZIUBKOWSKI, M. E. ENGLERT, E. HEYDER, R. PAUL & E. H. SUEDEKER, *J. Amer. chem. Soc.* **90**, 2704 (1968).
- [4] W. RITTEL, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & P. SIEBER, *Helv.* **51**, 924 (1968); St. GUTTMANN, J. PLESS, Ed. SANDRIN, P.-A. JAQUENOUD, H. BOSSERT & H. WILLEMS, *Helv.* **51**, 1155 (1968).
- [5] A. H. TASHJIAN, JR. & P. L. MUNSON, *Endocrinology* **77**, 520 (1965); L. J. DEFTOS, M. R. LEE & J. T. POTTS, JR., *Proc. nat. Acad. Sci.* **60**, 293 (1968).
- [6] E. D. WILLIAMS, *Suppl. J. Clin. Pathol.* **20**, 395 (1967); E. D. WILLIAMS, C. L. BROWN & I. DONIACH, *J. Clin. Pathol.* **19**, 103 (1966); E. D. WILLIAMS, *J. Clin. Pathol.* **19**, 114 (1966).
- [7] G. V. FOSTER, I. MACINTYRE & A. G. E. PEARSE, *Nature (Lond.)*, **203**, 1029 (1964); A. G. E. PEARSE, *Proc. R. Soc. B.* **164**, 478 (1966); G. BUSSOLATI & A. G. E. PEARSE, *J. Endocrinol.* **37**, 205 (1967); A. G. E. PEARSE & A. F. CARVALHEIRA, *Nature (Lond.)* **214**, 929 (1967).
- [8] J. S. MEYER & W. ABDEL-BARI, *New Eng. J. Med.* **278**, 523 (1968); G. MILHAUD, M. TUBIANA, C. PARMENTIER & G. COUTRIS, *C. r. hebdom. Séances Acad. Sc. Paris* **266**, 608 (1968); K. E. W. MELVIN & A. H. TASHJIAN, JR., *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **59**, 1216 (1968); A. H. TASHJIAN, JR. & K. E. W. MELVIN, *New Eng. J. Med.* **1968**, im Druck; W. J. CUNLIFFE, M. M. BLACK, R. HALL, I. D. A. JOHNSTON, P. HUDGSON, S. SHUSTER, T. V. GUDMUNDSSON, G. F. JOPLIN, E. D. WILLIAMS, N. J. Y. WOODHOUSE, L. GALANTE & I. MACINTYRE, *Lancet II* **1968**, 63.
- [9] M. A. KUMAR, E. SLACK, A. EDWARDS, H. A. SOLIMAN, A. BAGHDIAZT, G. V. FOSTER & I. MACINTYRE, *J. Endocrinol.* **33**, 469 (1965).
- [10] F. W. KAHNT, B. RINIKER, I. MACINTYRE & R. NEHER, *Helv.* **51**, 214 (1968).
- [11] CH. RESSLER, *Science* **128**, 1281 (1958); D. YAMASHIRO, D. B. HOPE & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **90**, 3857 (1968).
- [12] A. V. SCHALLY & R. GUILLEMIN, *J. biol. Chemistry* **239**, 1038 (1964); A. V. SCHALLY & J. F. BARRETT, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2497 (1965).
- [13] R. NEHER, B. RINIKER, P. G. H. BYFIELD, T. V. GUDMUNDSSON & I. MACINTYRE, *Nature* **1968**, im Druck.