

SPALTUNG UND RÜCKBILDUNG DER DISULFIDBRÜCKEN
AN INTRAMOLEKULAR VERNETZTEN INSULINEN

S.M.L. Robinson*, I. Beetz**, O. Loge**, D.G. Lindsay* und K. Lübke**

University of Sussex, Falmer-Brighton, United Kingdom,
und Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin und Bergkamen, Deutschland

(Received in Germany 22 January 1973; received in UK for publication 6 February 1973)

Eine Kombination von Insulinketten unter Rückbildung der Disulfidbrücken führt bei einer Verwendung molarer Mengen an A- und B-Kette nur zu einer Ausbeute von maximal 20 %, bestimmt an der biologischen Aktivität des Kombinationsrohproduktes. Zur Erzielung höherer Ausbeuten ist ein Überschuß an A-Kette erforderlich (1). Aufgrund eigener systematischer Untersuchungen liegt unter standardisierten Bedingungen, die einem modifizierten Verfahren nach DU et al (2) entsprechen, die Ausbeute bei $13,8 \pm 4,2$ %.

Diese Werte bestätigen, daß die Information für die räumliche Anordnung der Peptidketten im Insulinmolekül nicht in den isolierten Ketten enthalten ist. Zur Bildung der Disulfidbrücken in der dem nativen Insulin entsprechenden Form sind zusätzliche Faktoren erforderlich, wie sie z.B. bei der Insulinbiosynthese in dem einkettigen Proinsulin vorliegen (3).

Bei einer statistischen Kombination ist zu erwarten, daß sich die Disulfidbrücken nicht gleichzeitig sondern nacheinander bilden. Die Wahrscheinlichkeit, daß die erste Disulfidbrücke zwischen einer A- und einer B-Kette, zwischen zwei A-Ketten oder zwei B-Ketten gebildet wird, hängt bei äquimolaren Mengen von

* University of Sussex; ** Schering AG

der Häufigkeit des Zusammenstoßens der Ketten und der von der Zahl der Thiolgruppen abhängigen Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines reaktionsbereiten Zustandes ab. Unter der Annahme der Gleichwertigkeit aller Thiolgruppen ist die Wahrscheinlichkeit, daß die erste gebildete Disulfidbrücke zwischen A- und B-Kette liegt, 50 %. Durch Bildung der weiteren Disulfidbrücken sollte dann neben vielen disulfidisomeren Derivaten korrektes Insulin in einer bestimmten Ausbeute entstehen. Nimmt man an, daß im Verlauf dieser Folgereaktionen durch Disulfidaustausch oder Thiol-Disulfidaustausch gleiche Mengen an Derivaten mit korrekten Disulfidbrücken in solche mit falschen umgewandelt werden wie umgekehrt, so kann diese mögliche Nebenreaktion aus der Berechnung eliminiert werden.

Von den acht zwischen A- und B-Kette möglichen Disulfidbrücken können nur zwei, die A⁷-B⁷- und A²⁰-B¹⁹-Disulfide, d.h. 12,5 % der ursprünglich eingesetzten Menge, durch Bildung der weiteren Brücken zu intaktem Insulin führen. Dies ist aber bereits die Ausbeute, die bei einer Kombination an Insulinaktivität erhalten wird. Eine einzige konformationsgerechte Verknüpfung von A- und B-Kette muß also bereits genügen, um eine weitgehend quantitative Bildung der Disulfidbrücken in der der nativen Konformation entsprechenden Lage zu gewährleisten. Sollte diese Hypothese zutreffen, so sollten auch andere intramolekular A- und B-Ketten verknüpfende Brücken, sofern sie konformationsstabilisierend sind, die Ausbeute bei einer Kettenkombination erhöhen.

Eine Überprüfung dieser Hypothese wurde mit den präparativ relativ leicht zugänglichen, intramolekular über die N-terminale Aminogruppe der A-Kette und die ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes der B-Kette vernetzten Insulinderivaten durchgeführt. Aufgrund der Röntgenstrukturanalyse (4) sind diese beiden Aminogruppen räumlich so benachbart, daß sie z.B. durch Dicarbonsäuren amidartig verknüpft werden können (5,6). Als Modelle wurden Gly^{A1},Lys^{B29}-Succinyl-insulin und Gly^{A1},Lys^{B29}-Suberoyl-insulin verwendet. Diese Derivate wurden durch Umsetzung der entsprechenden Dicarbonsäure-bis-N-hydroxysuccinimidester mit Insulin in Dimethylformamid/Triäthylamin oder in Dioxan/Hydrogencarbonatpuffer erhalten und durch Gegenstromverteilung gereinigt. Reaktion mit Natriumsulfit und Natriumtetrathionat in Dimethylsulfoxid/Hydrogencarbonatpuffer pH 8 (1:1) und anschließende Dialyse führte zu den Hexa-S-sulfonaten der vernetzten

Insuline. Durch Papierelektrophorese (Ameisensäure/Harnstoffpuffer, pH 2, Pauly-Färbung) und Discelektrophorese (14 %iges Gel, pH 8,6, Amidoschwarzfärbung) konnten weder getrennte A- bzw. B-Ketten-S-sulfonate noch nicht-sulfitolysiertes Ausgangsmaterial nachgewiesen werden.

Die Reduktion der S-Sulfonate erfolgte in 5,5molarer Harnstofflösung mit der 50fachen Menge Thioglycolsäure bei pH 5,0 unter Stickstoff, nach Aufarbeitung durch Fällen mit Aceton bei pH 3,8 wurde die Oxidation in 0,001molarem Glycinpuffer in Gegenwart von Phenanthrolin und Kupfer(II)-Ionen mit Luft durchgeführt (Peptidkonzentration und pH-Wert siehe Tabelle). Die Kombinationsprodukte wurden nach Dialyse durch Einengen auf ein kleines Volumen und Gefriertrocknung isoliert und in dieser Form biologisch getestet (Blutzuckersenkung am Kaninchen oder an der Ratte). Zum Vergleich wurde in einem Parallelansatz aus nativem Insulin erhaltene A- und B-Kette in analoger Weise umgesetzt.

Die biologische Aktivität der Kombinationsrohprodukte der intramolekular vernetzten Insulinderivate liegt etwa dreimal so hoch, bezogen jeweils auf die Aktivität der intakten vernetzten Derivate, wie die der Rohprodukte aus den Kombinationen mit isolierten Ketten, bezogen auf intaktes Insulin (Tabelle).

Damit ist im Prinzip die Hypothese bestätigt, derzufolge bereits eine einzige Bindung (die nicht eine Disulfidbrücke zu sein braucht) zwischen A- und B-Kette genügt, um eine dem nativen Insulin entsprechende Konformation zu stabilisieren und damit im Falle einer Kombination die Bildung der Disulfidbrücken in den richtigen Positionen zu erleichtern.

LITERATUR

1. Y.-c. Du, R.-q. Siang und C.-e. Tsou, *Scientia Sinica* 14, 229 (1965).
2. Y.-c. Du, Y.-c. Zhang, Z.-x. Lu und C.-e. Tsou, *Scientia Sinica* 10, 84 (1961).
3. D.F. Steiner und I.L. Clark, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 60, 622 (1968).
4. T.L. Blundell, I.F. Cutfield, S.M. Cutfield, E.I. Dodson, G.G. Dodson, D.C. Hodgkin, D.A. Merola und M. Vijayan, *Nature* 231, 506 (1971).
5. D.G. Lindsay, *FEBS Letters* 21, 105 (1971).
6. D. Brandenburg, *Z. Physiol. Chem.* 353, 869 (1972).

Verbindung	Biolog. Aktivität	Reaktionsbedingungen bei Kombination	Biologische Aktivität des Kombinationsrohproduktes	Ausbeute, bezogen auf intaktes Derivat
Insulin	27 IE/mg 100 %	Glycinpuffer pH 10,6 5 mg Peptid/ml	3,6 IE/mg	14 %
Gly ^{A1} , Lys ^{B29} - Suberoyl-insulin	33 %	Glycinpuffer pH 10,6 1 mg Peptid/ml	4,2 IE/mg	45 %
Gly ^{A1} , Lys ^{B29} - Succinyl-insulin	50 %	Glycinpuffer pH 10,6 0,1 mg Peptid/ml	4,4 IE/mg	33 %
		Glycinpuffer/ Dioxan 4:1 pH 10,6 1 mg Peptid/ml	5,4 IE/mg	40 %
		Glycinpuffer pH 9,0 1 mg Peptid/ml	3,2 IE/mg	24 %