

Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης στο βόειο πάγκρεας

Περίληψη

Α. Τριάντος

Με εκχύλιση του παγκρέατος με οξινοσμένη αιθανόλη και με διαδοχικά χρωματογραφικά βήματα απομονώθηκαν η ενδιάμεση μορφή της ινσουλίνης και η ινσουλίνη, καθώς η προϊνσουλίνη και δύο ενδιάμεσες μορφές της. Η ενδιάμεση αυτή μορφή της ινσουλίνης, με ινσουλινική ενεργότητα παρόμοια με την ινσουλίνη, έχοντας το ίδιο Μ.Β. με αυτή, παρουσιάζεται ηλεκτροθετικότερη από την ινσουλίνη καθώς έχει ένα επιπλέον υπόλειμμα αργινίνης (Arg) στο καρβοξυτελικό άκρο της Β αλύσου. Η μορφή αυτή απομονώθηκε *in vivo* σε ποσότητα 9 mg/kg ιστού ενώ η ινσουλίνη σε ποσότητα 95 mg/kg ιστού. Η ενδιάμεση μορφή της ινσουλίνης προκύπτει από τη προϊνσουλίνη με τρυπτικόν τύπου διασπάσεις, ενώ στη συνέχεια με διάσπαση τύπου καρβοξυπεπτιδάσης-Β μετατρέπεται σε ινσουλίνη. Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης στο βόειο πάγκρεας *in vivo* πιστεύουμε, ότι ολοκληρώνεται σε τρία διαδοχικά βήματα: με σύντομη σχετικά διάσπαση μετατρέπεται η προϊνσουλίνη στις ενδιάμεσες μορφές της και στη συνέχεια οι τελευταίες με ενζυμικές συνδυασμένες επιδράσεις τύπου τρυψίνης και καρβοξυπεπτιδάσης-Β μετατρέπονται σε ενδιάμεση ινσουλίνη, η οποία τέλος με καρβοξυπεπτιδάση-Β τύπου δράση μετατρέπεται σε ινσουλίνη. Για την ολοκλήρωση των ενζυμικών αυτών διεργασιών απαιτείται η παρουσία ενός ενζύμου που συνδράζει την τρυπτική και καρβοξυπεπτιδική-Β δράση στα β-κύτταρα των νησίδων του Langerhans στο βόειο πάγκρεας.

Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης στα νησίδια του Langerhans και ειδικότερα στα β-κύτταρα^{1,2}, έχει αποδειχθεί ότι επιτυγχάνεται μέσω μιας μεγαλύτερης πρωτεΐνης της προ-προϊνσουλίνης^{3,4}, η οποία διασπάται ενδοκυτταρικά με πρωτεολυτικούς μηχανισμούς για να δώσει τη προϊνσουλίνη και τελικά την ινσουλίνη^{5,6}. Η προ-προϊνσουλίνη βρίσκεται σε ελάχιστα ποσά και διασπάται ταχύτατα σε προϊνσουλίνη η οποία όχι μόνο είναι σταθερότερη και είναι δυνατό να απομονωθεί αλλά βρίσκεται και στη κυκλοφορία. Η προϊνσουλίνη διαχωρίζεται από την ινσουλίνη με χρωματογραφικές πηκτικές μοριακών κοσκίων και η πιθανή σχέση της με την ινσουλίνη αποδεικνύεται από την ισχυρή αντίδρασή της με αντιορό ινσουλίνης¹. Σε προηγούμενες δημοσιεύσεις^{7,8} αναφέραμε την εντόπιση της προ-προϊνσουλίνης και την απομόνωση της προϊνσουλίνης και των ενδιά-

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας,
Ιατρικό Τμήμα, Α.Π.Θ.

μέσων τύπων της απ' ευθείας από το βόειο πάγκρεας. Ο χαρακτηρισμός των αμινοτελικών αμινοξέων των παραπάνω ενώσεων μας επέτρεψε να κάνουμε ορισμένες υποθέσεις για τη φύση και ταυτότητα των πεπτιδικών δεσμών που διασπώνται *in vivo* κατά την ενζυμική μετατροπή της προορμόνης σε ινσουλίνη. Στην εργασία αυτή αναφέρουμε επιπλέον την απομόνωση μιας ενδιάμεσου μορφής ινσουλίνης η οποία είναι το κύριο προϊόν κατά την ενζυμική διαδικασία στο τελευταίο στάδιο πριν από την παραγωγή της ινσουλίνης. Λαμβάνοντας υπόψιν τα αμινοτελικά αμινοξέα της παραπάνω πρωτεΐνης, προτείνουμε ένα ολοκληρωμένο βιοσυνθετικό σχήμα το οποίο συμβαίνει *in vivo* και βρίσκεται σε πλήρη αρμονία με εκείνο που προτείνει ο Steiner και συνεργάτες *in vitro*⁹.

Υλικό και μέθοδοι

Η προμήθεια του βοείου παγκρέατος έγινε από το τοπικό σφαγείο. Το πάγκρεας αφού καθαρίστηκε ταχύτατα από το λιπώδη ιστό, ψύχθηκε αμέσως σε ξηρό πάγο και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι τη μέρα της εκχύλισης.

Εκχύλιση του παγκρέατος: Η εκχύλιση του παγκρέατος έγινε με χρήση οξινισμένης αιθανόλης σύμφωνα με τη μέθοδο του Danogen¹⁰ αλλά και με αρκετές βελτιώσεις όπως έχουμε περιγράψει προηγουμένως^{7,8}. Σύντομα, ο κατεψυγμένος ιστός ομογενοποιήθηκε σε ομπι-μίξερ με οξινισμένη αιθανόλη, αναδεύτηκε για 12 h και μετά διηθήθηκε. Η υγρή φάση-1 φυλάχθηκε ενώ το ίζημα εκχυλίστηκε με οξινισμένη αιθανόλη για 12h. Με την ίδια διαδικασία διήθησης, η υγρή φάση-2 ενώθηκε με την προηγούμενη. Το pH έγινε 8,2-8,4 και ακολούθησε φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο, το pH έγινε 5,2-5,3. Στη συνέχεια με προσθήκη 2 όγκων απολύτου αλκοόλης και 4 όγκων αιθέρα ελήφθη πρωτογενές ίζημα το οποίο περιείχε την Βόειο προΐνσουλίνη και ινσουλίνη και το οποίο μετά από ξήρανση φυλάχθηκε στους -20°C .

Οι διάφοροι τύποι Sephadex που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τύπου Pharmacia. Οι ιοντοαλλακτικές ρητίνες καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC) και διαιθυλοαμινοαιθυλοκυτταρίνης (DEAE) ήταν τύπου Whatman-52. Όλες οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν βασίστηκαν στις οδηγίες των οίκων κατασκευής. Η απορροφητικότητα μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο Beckman DB, ενώ η αγωγιμότητα με αγωγιμόμετρο

Radiometer Copenhagen^{11,12,13}.

Η δισκοηλεκτροφόρηση με πηκτική πολυακρυλαμίδιο βασίστηκε στη μέθοδο Davis¹⁴. Οι πηκτές που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν 10% ακρυλαμίδιο και 0,6% δισακρυλαμίδιο, η βαφή των πρωτεϊνών έγινε με κυανό του Coomassie, ενώ για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης pH 8,2.

Ο προσδιορισμός των αμινοτελικών αμινοξέων έγινε με την μέθοδο Dansyl όπως έχει περιγραφεί από τον Woods¹⁵.

TPCK-τροψίνη προμηθευτήκαμε από τη Worthington. Οι τρυπτικές διασπάσεις έγιναν στους 37°C σε pH 8,2, με επώσεις για διάφορα χρονικά διαστήματα, χρησιμοποιώντας ως αρχικό παρασκεύασμα ένα διάλυμα με σύσταση 1,5 mg τρυψίνης σε 1 ml διαλύματος 1 mM HCl, 1 mM CaCl_2 . Η αντίδραση σταματούσε με 4N HCl¹⁶.

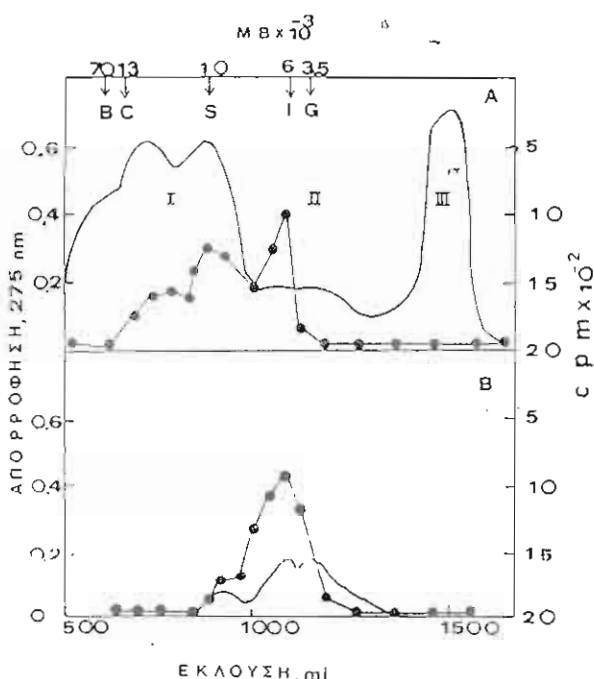
Η ραδιοανοσοχημική μέτρηση της προΐνσουλίνης και των υπολοίπων μορφών ινσουλίνης έγινε με το προϊόν Phadebas Immunoassay, Pharmacia με χρήση ινσουλίνης I¹⁷ και αντίσωμα ινσουλίνης. Οι μετρήσεις έγιναν σε μετρητή Siemens, Well-Type και τα ποσά της ινσουλίνης υπολογιζόταν κάθε φορά βάση των προτύπων καμπυλών¹⁷.

Η μέτρηση της συγκεντρώσεως των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο του Lowry¹⁸.

Αποτελέσματα

Διαχωρισμός πρωτογενών προΐνσουλινών και ινσουλινικών κλάσμάτων

Το πρωτογενές ίζημα που προέκυψε από την εκχύλιση του βοείου παγκρέατος πρώτα διαλύθηκε σε 40 ml 3M CH_3COOH και έπειτα φυγοκεντρήθηκε σε 1000xg για 20 min. Το διαυγές υπερκείμενο φορτίστηκε σε μία στήλη 5×100 cm Sephadex G-50 η οποία είχε προηγουμένως εξισοροποιηθεί με 3M CH_3COOH και βαθμονομηθεί με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους (βλκ. 1A). Η απορροφητικότητα του εκλούσματος μετρήθηκε στα 275 nm και καταγράφηκαν τρία κύρια κλάσματα τα I, II, III εκ των οποίων τα I και II παρουσίασαν ινσουλινική ενεργότητα. Από αυτά το I περιείχε την προ-προΐνσουλίνη και προΐνσουλίνη^{7,8}, ενώ το II πρέπει να περιέχει την ινσουλίνη και παρόμοιες πρωτεΐνες όπως εύκολα συμπεραίνεται από το μοριακό του βάρος (3.500-7.000).



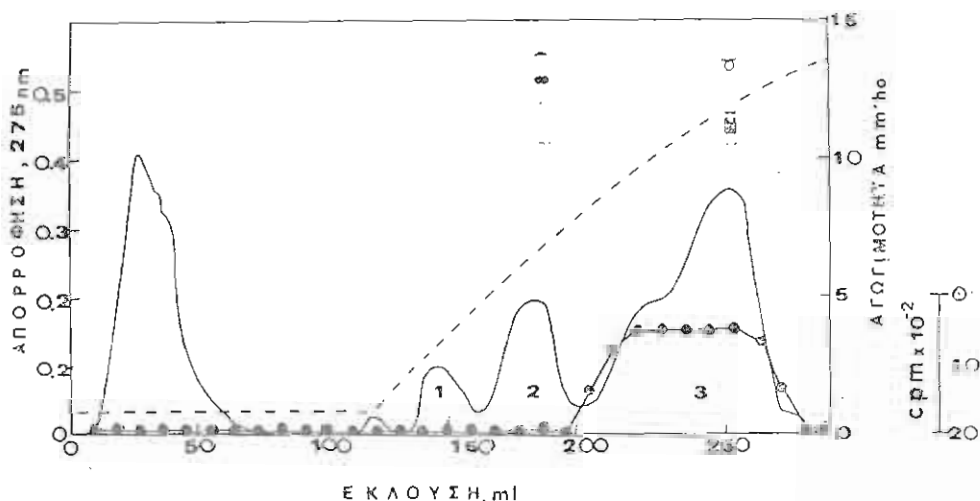
Εικ. 1. Χρωματογραφία πηκτής σε στήλη Sephadex G-50, 5×100 cm που εξισορροπήθηκε με $3M$ CH_3COOH και βαθμονομήθηκε με πρωτεΐνες γνωστού $M.B.$ Β, βόειος λευκωματίνη του ορού, C, κυτόχρωμα -C, S, πρωτεΐνη -S της ριβονοκλεάσης, I, βόειος ινσουλίνη, G, βόειο γλουκαγόνο. Στο πάνω μέρος του χρωματογραφήματος σημειώνονται τα αντίστοιχα μοριακά βάρη. (A), Χρωματογραφία του πρωτογενούς ιζήματος που αποκτήθηκε από την εκχύλιση του βοείου παγκρέατος. (B), επαναχρωματογράφιση του ινσουλινικού κλάσματος II στην ίδια στήλη. (—) Απορρόφηση στα 275 nm, (●—●) ινσουλινική ενεργότητα σε cpm (κύκλοι ανά λεπτό). Έγινε συλλογή χρωματογραφικών κλασμάτων όγκου 20 ml/σωλήνα.

Απομόνωση της ινσουλίνης και των μορφών της ενδιάμεσης ινσουλίνης από το κλάσμα II

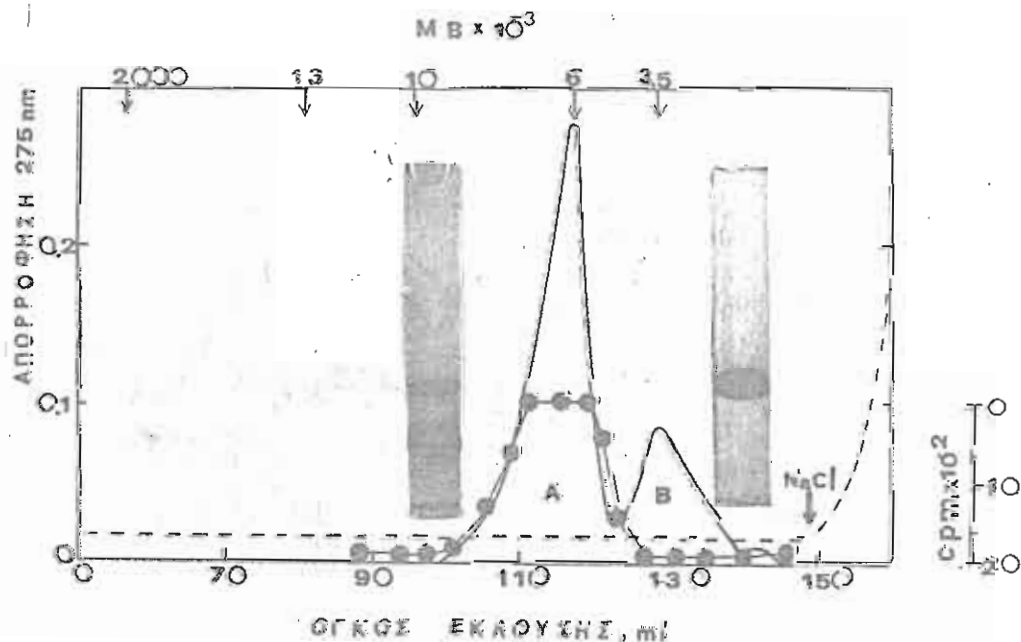
Το κλάσμα II (Εικ. 1A) συμπυκνώθηκε με περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού (Rotavapor-R. Büchi) σε όγκο περίπου 40 ml. Τότε χρωματογραφήθηκε στην ίδια χρωματογραφική στήλη με παρόμοιες συνθήκες (Εικ. 1B). Με το τρόπο αυτό απομακρύνθηκαν τόσο η προΐνσουλίνη όσο και πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους. Στη συνέχεια το κλάσμα II συμπυκνώθηκε με την ίδια τεχνική σε τελικό όγκο 20 ml και αραιώθηκε με ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος CH_3COONa $0,024$ M ώστε να παρουσιάζει τελικά αγωγιμότητα 1,2 msh. Αμέσως μετά φορτίστηκε για να χρωματογραφηθεί σε στήλη $0,9 \times 25$ cm CM-κυτταρίνης η οποία είχε εξισορροποιηθεί με

$0,024$ M $CH_3COONa-CH_3COOH$ pH 3,3. Ύστερα, η στήλη πλύθηκε καλά με διαβίβαση του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος με χρήση αντλίας, ώστε το έκλουσμα να έχει αγωγιμότητα 1,2 msh και να είναι ελεύθερο πρωτεϊνών. Η έκλυση έγινε με εκθετική βαθμίδωση NaCl στο ίδιο διάλυμα (Εικ. 2). Αποκτήθηκαν τρία κλάσματα εκ των οποίων μόνο το κλάσμα-3 παρουσίασε ινσουλινική ενεργότητα. Η ηλεκτροφόρηση του κλάσματος αποκάλυψε την ύπαρξη εκτός της ινσουλίνης και άλλων ουσιών όπως π.χ. γλουκαγόνου που κυριαρχεί στο κλάσμα-2. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών αυτών, το κλάσμα-3 συμπυκνώθηκε σε τελικό όγκο 3 ml αραιώθηκε με πυκνό CH_3COOH ώστε τελικά να γίνει $3M$ CH_3COOH και χρωματογραφήθηκε σε στήλη 2×50 cm Sephadex G-100 εξισορροποιημένη με $3M$ CH_3COOH και βαθμονομημένη όπως περιγράφηκε στην εικόνα 1. Αποκτήθηκαν με τον τρόπο αυτό δύο κλάσματα A και B (Εικ. 3). Το κλάσμα-

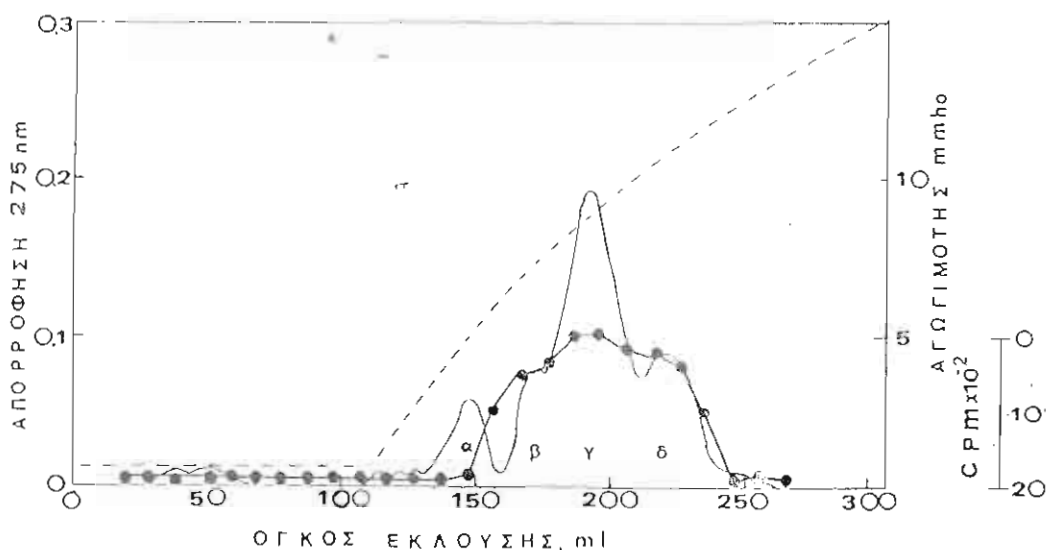
A παρουσίασε ινσουλινική δράση και μοριακό βάρος 6000Ds. Επιπλέον εκλύεται εκεί ακριβώς που εκλύεται η βόειος ινσουλίνη. Έτσι φαίνεται ότι το κλάσμα-A περιέχει την ινσουλίνη ενώ το κλάσμα-B περιέχει κατά πάσα πιθανότητα βόειο γλουκαγόνο. Το μοριακό βάρος, η περιοχή εκλούσεως αλλά και η δισκοηλεκτροφόρηση των δύο κλασμάτων ισχυροποιούν τις παραπάνω υποθέσεις. Όπως βλέπουμε στο κλάσμα-A (Εικ. 3) η δισκοηλεκτροφόρηση αποκάλυψε την ύπαρξη τριών συστατικών με παρόμοιο βέβαια μοριακό βάρος. Τα συστατικά αυτά διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία σε στήλη $0,9 \times 25$ cm DEAE-κυτταρίνης, εξισορροποιημένης με $0,01M$ Tris-HCl pH 7,5 που περιέχει 2,5M ουρίας. Πριν από την χρωματογραφία αυτή το κλάσμα-A (Εικ. 3) συμπυκνώθηκε με τεχνικές που περιγράφηκαν προηγουμένως και αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα $0,01M$ Tris-HCl, $2,5M$ urea, pH 7,5 αφού προηγουμένως έγινε εξουδετέρωση του pH με $0,01M$ NaOH. Στη συνέχεια η αραιώση σταμάτησε όταν η αγωγιμότητα έγινε περίπου 1 msh. Τότε τοποθετήθηκε στη στήλη και πλύθηκε τόσο καλά έως ότου παύει η ανίχνευση πρωτεϊνών στα υγρά που εξέρχονταν από τη στήλη. Η εκθετική βαθμίδωση NaCl στο ίδιο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως μέσο εκλούσεως απέδωσε τα κλάσματα α,β,γ,δ (Εικ. 4). Από αυτά τα β,γ και δ παρουσίασαν ινσουλινική ανοσοδραστικότητα και μοριακό βάρος παρόμοιο με εκείνο της βοείου ινσουλίνης (Εικ. 5) όταν χρωματογραφήθηκαν σε



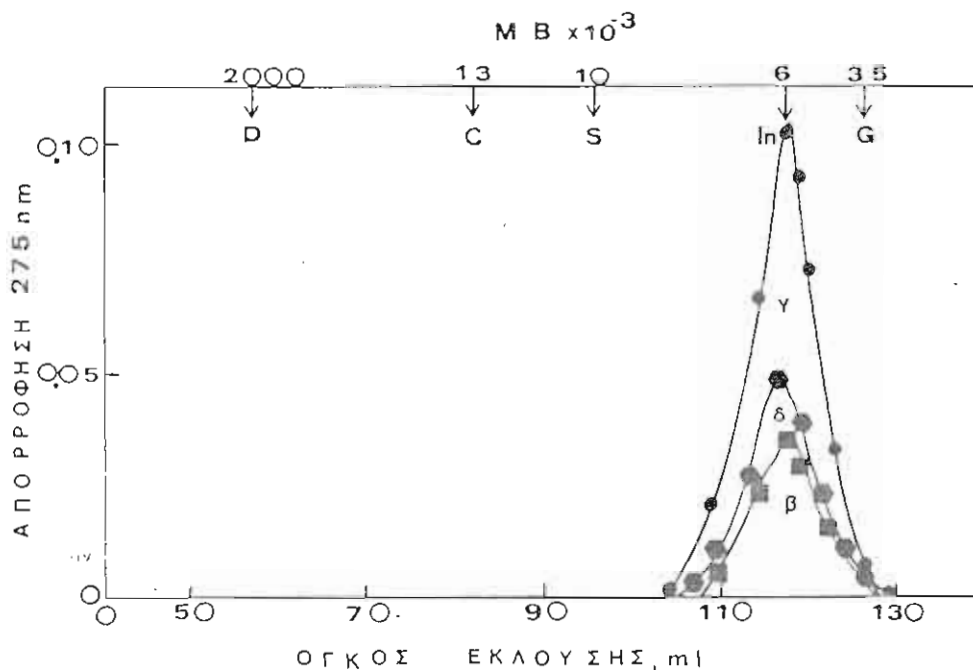
Εικ. 2. Χρωματογραφία του κλάσματος II (Εικ. 1B), σε στήλη 0,9 x 25 cm CM-κυτταρίνης, εξισορροπημένης με ρυθμιστικό διάλυμα $CH_3COONa-CH_3COOH$ pH 3,3 αγωγιμότητας 1,2 mmo. Η εκλούση έγινε με εκθετική βαθμίδωση συγκεντρώσεως NaCl στο ίδιο διάλυμα (συνολικός όγκος 200 ml). Οι ηλεκτροφορήσεις των χρωματογραφικών κλασμάτων απεικονίζονται πάνω από τις κορυφές τους. (—) Απορρόφηση στα 275 nm, (●—●) ινσουλινική ενεργότητα σε cm, (---) αγωγιμότητα σε mmo.



Εικ. 3. Χρωματογραφία του κλάσματος-3 (Εικ. 2) σε στήλη 2x50 cm Sephadex G-100, που εξισορροπήθηκε με 3M CH_3COOH και βαθμικώς ελεγχόταν με πρωτεΐνες γνωστού MB, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου του κλάσματος A, που εμφανίζει MB περίομοιο με τη βόειο ινσουλίνη, απεικονίζεται αριστερά. Δεξιά απεικονίζεται η ηλεκτροφόρηση του κλάσματος B, που εκλύεται στη περιοχή εκλούσεως του βόειου γλυκαγόνου. (—) Απορρόφηση στα 275 nm, (●—●) ινσουλινική ενεργότητα σε cm. Έγινε συλλογή κλασμάτων όγκου 1 ml/σωλήνα.



Εικ. 4. Χρωματογραφία του κλάσματος Α (Εικ. 3) σε στήλη $0,9 \times 25$ cm DEAE κυτταρίνης, εξισορροπημένης με $0,01M$ Tris-HCl, pH 7.5 που περιείχε και $2,5M$ ουρία. Μετά τη φόρτωση του κλάσματος Α η στήλη πλύνθηκε έως ότου η αγωγιμότητα έγινε $0,6$ mμho και η απορρόφηση 0. Τότε εκλούσθηκε με εκθετική βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl στο ίδιο διάλυμα (συνολικός όγκος 200 ml). (—) Απορρόφηση στα 275 nm, (●—●) ινσουλινική ενεργότητα σε cpm, (---) αγωγιμότητα σε mμho. Η συλλογή των κλάσμάτων ήταν 3 ml/σωλήνα.



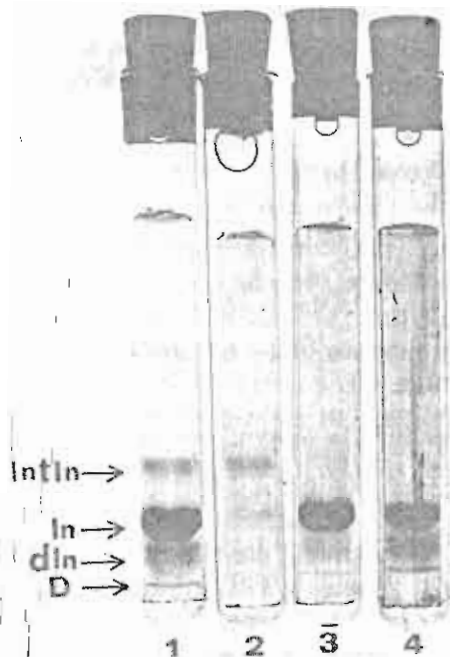
Εικ. 5. Χρωματογραφία των κλάσμάτων β, γ και δ (Εικ. 4) σε στήλη 2×50 cm Sephadex G-75 εξισορροπημένης με $3M$ CH_3COOH και βαθμονομημένης όπως και προηγουμένως. D, δεξτράνη μπλε, C, κτύχρωμα C, S, S-πρωτεΐνη της ριβονουκλεάσης, In, βόειος ινσουλίνη, G, βόειο πάγκρεας. Τα τρία κλάσματα παρουσιάζουν MB παρόμοιο με εκείνο του βοείου ινσουλίνης. (●—●) Απορρόφηση στα 275 nm του κλάσματος γ, (—) του κλάσματος δ και (■—■) απορρόφηση του κλάσματος β. Έγινε συλλογή κλάσμάτων 1 ml/σωλήνα.

μία στήλη 2x50 cm Sephadex G-75 εξισορροπημένη με 3M CH₃COOH και βαθμονομημένη με πρωτεΐνες γνωστού Μ.Β. όπως ακριβώς και σε προηγούμενες περιπτώσεις (Εικ. 1 και Εικ. 3). Δισκοηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου του κλάσματος γ (Εικ. 6) αποκάλυψε τη χαρακτηριστική ταινία που ανήκει στη βόειο ινσουλίνη. Η απομόνωση και ταυτοποίηση των αμινοτελικών αμινοξέων του κλάσματος-γ που είναι η φαινυλαλανίνη (Phe) και γλυκίνη (Gly) είναι παρόμοια με αυτά που έχει η βόειος ινσουλίνη (Πίν. 1). Επομένως το κλάσμα-γ βάσει των παραπάνω αποδείξεων χαρακτηρίζεται ως Βόειος Ινσουλίνη. Το κλάσμα-δ παρουσιάζει συμπεριφορά και χαρακτηριστικά παρόμοια με το κλάσμα-γ ακόμη και όσον αφορά στα αμινοτελικά αμινοξέα (Πίν. 1). Η μόνη διαφορά που υπάρχει είναι ότι το κλάσμα-δ είναι ηλεκτροαρνητικότερο από την ινσουλίνη (Εικ. 6). Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύεται ότι το κλάσμα-δ αποτελείται από

τη δεάμινο-ινσουλίνη. Το κλάσμα-β με ισχυρή ινσουλινική ανοσοδραστικότητα, με Μ.Β. παρόμοιο της ινσουλίνης, με αμινοτελικά αμινοξέα Phe και Gly (Πίν. 1) παρουσιάζεται σε δισκοηλεκτροφόρηση σαφώς ηλεκτροθετικότερο της ινσουλίνης (Εικ. 6), υποδηλώνοντας ότι περιέχει ένα από τα βασικά αμινοξέα, πιθανότατα την αργινίνη (Agr). Το κλάσμα-β χαρακτηρίζεται ως ενδιάμεση-ινσουλίνη^{19,20}.

Πίνακας 1. Αμινοτελικά αμινοξέα των κλασμάτων γ (ινσουλίνη), β (ενδιάμεση-ινσουλίνη) και δ (δεάμινο ινσουλίνη). Ο προσδιορισμός των αμινοτελικών αμινοξέων έγινε με τη μέθοδο Dansyl¹⁵. Το μέγεθος φθορισμού των κηλίδων που αντιστοιχούσαν στη Phe και Gly ήταν ίδιες για τα κλάσματα β, γ, δ. Εκτός από κηλίδες που αντιστοιχούσαν στο Dansyl που αντέδρασε με την ε-αμινομάδα της Lys, δεν παρατηρήθηκαν άλλες που αντιστοιχούν σε άλλα αμινοξέα.

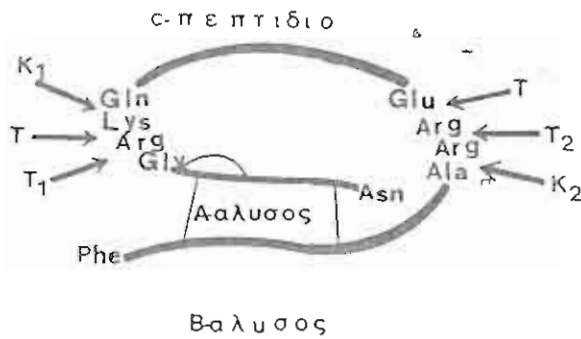
Βόειος Ινσουλίνη	Phe,	Gly
Κλάσμα-β (Εικ. 4)	Phe,	Gly
Κλάσμα-γ (Εικ. 4)	Phe,	Gly
Κλάσμα-δ (Εικ. 4)	Phe,	Gly



Εικ. 6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου των κλασμάτων β, γ και δ (Εικ. 4 και Εικ. 5) σε 10% πηκτή και σε pH 8.3. Η στερέωση των πρωτεϊνών έγινε με τριχλωροξικό οξύ και η βαφή με κυανό του Coomassie I, ηλεκτροφόρηση βοείου ινσουλίνης 2, ηλεκτροφ. του κλασμ. -β. 3, ηλεκτροφόρηση του κλάσματος γ και 4, ηλεκτροφόρηση του κλάσματος δ. D, ο δείκτης της ηλεκτροφόρησης, dIn, δεάμινοϊνσουλίνη, In, ινσουλίνη και Int. In, ενδιάμεσος ινσουλίνη.

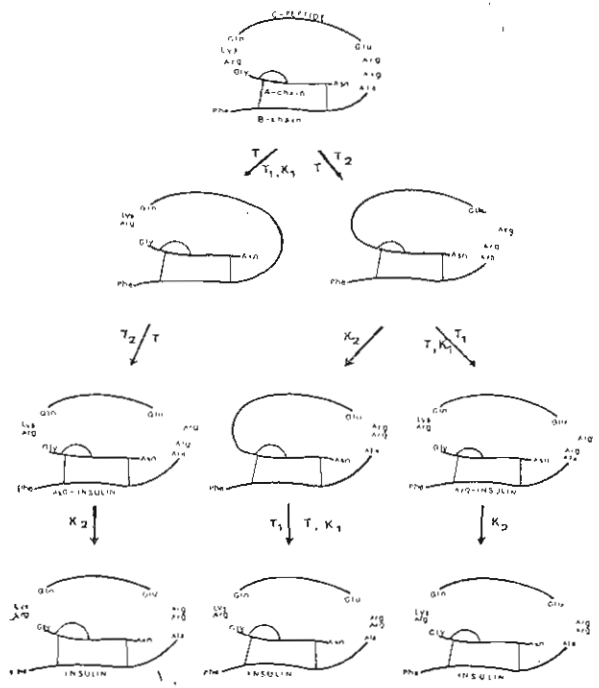
Συζήτηση

Σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται, με εκχύλιση βοείου παγκρέατος και με διαδοχικά χρωματογραφικά βήματα, απομονώθηκε η ενδιάμεση ινσουλίνη, η ινσουλίνη και η δεάμινο ινσουλίνη. Σε προηγούμενες δημοσιεύσεις^{7,8}, περιγράφεται η απομόνωση, με εκχύλιση του βοείου παγκρέατος, της προϊνσουλίνης και των δύο ενδιάμεσων μορφών της προορμόνης κατά την in vivo ενζυμική μετατροπή της σε ινσουλίνη. Η απομόνωση των ενδιάμεσων αυτών μορφών συμπληρώνει την απεικόνιση ενός τύπου βοείου προϊνσουλίνης, στον οποίο γενικά ανταποκρίνονται επίσης με ελάχιστες διαφορές όλες σχεδόν οι μέχρι σήμερα γνωστές προϊνσουλίνες των διαφόρων θηλαστικών²¹ (Εικ. 7). Ο βοείος τύπος της προορμόνης ύστερα από κατάλληλες ενζυμικές διεργασίες μετατρέπεται σε ινσουλίνη. Οι κατεργασίες αυτές πραγματοποιούνται με δράση κάποιου(ων) ενζύμου παρόμοιου με τη τρυψίνη το οποίο όμως πρέπει να συνδυάζει και δράση καρβοξυπεπτιδάσης-Β. Η μεμβράνη των νησίδων του



Εικ. 7. Δομική μορφή της βοείου προϊνσουλίνης και πιθανές ενζυμικές προσβολές. T, τύπου τρυψίνης, K, τύπου καρβοξυπεπτιδάσης-B.

Langerhans είναι παρόμοια με τις μεμβράνες του εξωκρινούς παγκρέατος οι οποίες παράγουν την τρυψίνη όπως και την καρβοξυπεπτιδάση-B. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι δεν παρατηρείται ενζυμική διάσπαση της προϊνσουλίνης στο ήπαρ ή στους νεφρούς, που αποτελούν τους κυριώτερους ιστούς αποδόμησης της ινσουλίνης στα θηλαστικά. Πρέπει λοιπόν να δεχτούμε την ύπαρξη ενός υπεύθυνου ενζύμου για τη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη, στη περιοχή της μεμβράνης των νησίδων. In vivo, η ενζυμική αυτή μετατροπή της προϊνσουλίνης γίνεται κατά τη μεταφορά της από τα ριβοσωμάτια στα β-κοκκία και ειδικότερα στο σύστημα του Golgi. Πιθανώς το ένζυμο (α) να αποτελεί μια εξελικτική μορφή τρυψίνης, αλλά δεν αποκλείεται η πιθανότητα να υπάρχουν δύο διαφορετικά ένζυμα τύπου τρυψίνης και καρβοξυπεπτιδάσης-B^{7,9}. Έχει αποδειχθεί από το Steiner και συνεργ. ότι τρυπτικές διασπάσεις τύπου T1(70%) και T2(30%) συμβαίνουν πολύ γρήγορα αποδίδοντας δύο διασπασμένους τύπους προϊνσουλίνης^{2,23} (Εικ. 7). Εν τούτοις συμβαίνουν και τρυπτικές διασπάσεις τύπου T διότι τα αμινοτιλικά αμινοξέα των δύο μορφών βρέθηκε να είναι Phe, Glu, Gly και Arg^{7,8}. Επίσης χρειάζεται πρόσθετη δράση καρβοξυπεπτιδάσης-B (K1) για να απομακρυνθεί η Lys (59) κατά τη διάρκεια της T1 διάσπασης (Εικ. 7). Με τις διασπάσεις που περιγράφηκαν μέχρι τώρα, προκύπτει από τη διάσπαση της βοείου προϊνσουλίνης η Arg. Ινσουλίνη (Εικ. 8). Η ενδιάμεση αυτή μορφή της ινσουλίνης έχει απομονωθεί πράγματι, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, in vivo κατά την εκχύλιση του παγκρέατος. Στο σημείο αυτό είναι πλέον απαραίτητη η δράση καρβοξυπεπτιδάσης-B (K2) ώστε να απομακρυνθεί η Arg (31) και να αποδοθεί η ινσουλίνη, ως τελικό προ-



Εικ. 8. Σχηματική παράσταση του κύριου βιοσυνθετικού δρόμου της βοείου ινσουλίνης.

ϊόν όλων των ενζυμικών αυτών διεργασιών. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ενώσεων που απομονώσαμε in vivo και τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της ινσουλίνης καθώς και όλα όσα αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία²⁴, προτείνουμε και παρουσιάζουμε σχηματικά το βιοσυνθετικό δρόμο της ινσουλίνης στο βόειο πάγκρεας (Εικ. 8).

Abstract

A. Triantos. The biosynthesis of insulin in bovine pancreas. *Hellen Diabetol Chron* 1990; 2: 116-123.

By extraction of bovine pancreas with acidified ethanol and chromatography on Sephadex G-50, following by chromatography of the insulin immunoreactive fraction on CM- and DEAE-cellulose with the use of 2,5 M urea, an intermediate in the biosynthesis of insulin has been isolated. All the steps of purifications were carried out under appropriate conditions in order to avoid degradation of proteins by proteolytic enzymes. The yields for the pure products obtained by the above procedure were 95 mg/kg of pancreas for insulin and 9 mg/kg for intermediate insulin. The intermediate form of insulin shown to have the structure of insulin, the same MW

and immunoreactivity, with an additional amino acid residue Arg, attached to the carboxyl terminus of the B chain. On disc polyacrylamide gel electrophoresis this fraction was located just above of the mayor band of insulin indicating a more basic character than the insulin.

We propose that the biosynthesis of insulin in bovine pancreas in vivo proceeds via three sequential steps: a rapid tryptic and carboxypeptidase-B like enzymic hydrolysis of proinsulin to yield the proinsulin intermediates^{7,8}, followed by enzymic hydrolysis as above of these intermediates to yield the insulin intermediate and then by a carboxypeptidase-B hydrolysis of this intermediate to produce insulin. It is possible that one tryptic and carboxypeptidase-B like enzyme is operative in all steps.

Βιβλιογραφία

1. Steiner DF, Oyer P. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Nat Acad Sci U.S.* 1967; 57: 473-480.
2. Steiner DF, Gunningham D, Spigelman L, and Aten B. Insulin Biosynthesis: Evidence for a Precursor. *Science* 1967; 157: 697-9.
3. Chan SJ, Keim P, Steiner DFC. Cell free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Nat Acad Sci US.* 1976; 73: 1964-8.
4. Lomedico PT, Chan SJ, Steiner DF, Saunders G. Immunological and chemical characterization of Bovine Preproinsulin. *J Biol Chem* 1977; 252: 7971-8.
5. Young JD, Carpenter FH. Isolation and Characterization of Products Formed by Action of Trypsin on Insulin. *J Biol Chem* 1961; 236: 743-8.
6. Howell SL, Taylor KW. The Secresion of Newly Synthesized Insulin in Vitro. *Biochem J* 1967; 102: 922-9.
7. Τριάντος Α. Μέθοδος απομονώσεως προίνσουλίνης από το Βόειο πάγκρεας. Διδακτορική Διατριβή, Εργαστ Βιολ Χημείας, Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ. 1976: 1-55.
8. Triantos AA, Trakatellis A. Method of isolation of proinsulin and its derivatives from bovine pancreas. In press. *Biochem Biophys Acta.*
9. Steiner DF, Clark JL, Nolan C, Rubenstein AH, Margoliash H, Aten B, Oyer PE. Proinsulin and the Biosynthesis of Insulin, *Recent Prog Hormone Res* 1969; 25: 207-17.
10. Davoren RP. The Isolation of Insulin from a Single Cat pancreas. *Biochim Biophys Acta* 1962; 63: 150-5.
11. Epstein CJ, Anfinsen CB. The Use of Gel Filtration in the Isolation and Purification of Beef Insulin. *Biochemistry* 1963; 2: 461-8.
12. Frank B, Veros AJ. Physical Studies on Proinsulin-Molecular Weight, Association Behavior and Spectral Studies. *Fed Proc* 1963; 27: 392-6.
13. Cole RD. On the Transformation of Insulin in Concentrated Solutions of Urea. *J Biol Chem* 1961; 236: 2670-9.
14. Davis BJ. Disc Electrophoresis II. Method of Application to Human Serum Proteins. *Ann N.Y. Acad Sci* 1964; 121: 404-8.
15. Woods KR, Wang KT. Separation of Dansyl-Amino Acids by Polyimide layer Chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1967; 133: 369-73.
16. Yip CC. A Bovine Pancreatic Enzyme Catalyzing the Conversion of Proinsulin to Insulin. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 1971; 68: 1312-7.
17. Wide L, Porath J. Radioimmunoassay of Protein with the use of Sephadex-Coupled Antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1966; 130: 257-62.
18. Lowry OH, Rose-Brough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-70.
19. Grant PT, Reid KBM. Biosynthesis of an Insulin precursor by cod Islet tissue and the occurrence of intermediates in the conversion to Insulin. *Biochem J* 1968; 110: 289-95.
20. Wagle SR. Studies on Biosynthesis and Catabolism of Insulin. *Biochim Biophys Acta* 1965; 107: 524-9.
21. Yamaji K, Tada K, Trakatellis AC. On the biosynthesis of Insulin in Anglerfish Islets. *J Biol Chem* 1972; 247: 4080-88.
22. Nolan C, Margoliash E, Peterson JD, Steiner DF. The Structure of Bovine Proinsulin. *J Biol Chem* 1971; 246: 2780-95.
23. Oyer PE, Cilio S, Peterson JD, Steiner DF. Studies on Human Proinsulin. *J Biol Chem* 1971; 246: 1375-86.
24. Steiner DF, Hallund O, Rubenstein A, Cho BS, Bayliss C. Isolation and Properties of Proinsulin, Intermediate Forms and other Minor Components from Crystalline Bovine Insulin. *Diabetes* 1968; 117, 12: 725-36.

Πρόσθετοι όροι

Προίνσουλίνη, Ενδιάμεσες μορφές ινσουλίνης, C-πεπτίδιο

Key words

Proinsulin, Intermediate insulin, C-peptide