

Isolierung und Lymphozytenstimulation von Kalbthymuspeptiden.

WOLFGANG VOELTER^{*}, OCTAVIA LEHAR^{*},
HERMANN BAUER^{*} UND DIETHARD BARON^{**}

^{*} *Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tuebingen, Hoppe-Seyler-Str. 1, D-7400 Tuebingen, West Germany.*

^{**} *Chirurgische Klinik, Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Immunologie der Universität Tuebingen, D-7400 Tuebingen, West Germany.*

(Received 14th April, 1983)

Summary: A gel chromatographically uniform extract of soluble peptides of thymus (thymus fraction A) of molecular weight about 10,000 is separated into further six subfractions with a HPLC system developed in our laboratory for preparation of peptides.

Thymus fraction A induces a moderate proliferation of human lymphocytes as assessed by the incorporation of ³H thymidine into the DNA yielding a maximal stimulation index of 15.4 at the 4th day at a concentration of 50 ug/ml. Except factor I which causes a slight but significant lymphocyte proliferation, the factors II to VI do not show any stimulating activity. Therefore, besides the well known differentiation-inducing capacity, thymus fraction A has also a cell division-inducing activity.

Zusammenfassung

Eine gelchromatographisch einheitliche Fraktion löslicher Thymuspeptide (Thymusfraktion A) mit einem Molekulargewicht von 10,000 Dalton wird mit Hilfe eines in unserem Laboratorium entwickelten HPLC-Systems zur präparativen Trennung von Peptiden in sechs weitere Unterfraktionen aufgetrennt.

Die Thymusfraktion A verursacht in vitro eine mittelgradige Proliferation von menschlichen Lymphozyten, gemessen durch den Einbau von ³H-Thymidin in die DNA, wobei ein maximaler Stimulationsindex von 15.4 am vierten Kulturtag bei einer Konzentration von 50 ug/ml erreicht wird. Mit Ausnahme der Subfraktion I, die eine schwache aber signifikante Lymphozytenproliferation induziert,

können die Fraktionen II bis VI menschliche Lymphozyten nicht zur Zellteilung anregen. Demzufolge besitzt die Thymusfraktion A neben einer bekannten Differenzierungsaktivität auch eine proliferationsauslösende Aktivität gegenüber Lymphozyten.

Thymuspeptide spielen bei der Erhaltung der Immunkompetenz eine entscheidende Rolle; bei frühzeitiger Entfernung des Thymus bei Säugern tritt das Wasting Syndrom auf. Aus Kalbthymus isolierte Peptidgemische wurden zuerst von Goldstein et al. [1] bearbeitet. Inzwischen werden Thymuspeptide zur Behandlung verschiedener Carcinomarten, Chronischer Hepatitis, Multipler Sklerose, Myasthenia Gravis, Virusinfektion und bei Immunschwäche angewandt [2-5].

In der vorliegenden Arbeit werden gereinigte Fraktionen vom Molekulargewicht un 10,000 aus einem Rohextrakt von Kalbsthymus hergestellt und auf ihre immunologische in vitro-Aktivität überprueft.

Material und Methoden

Materialien

Es wurden zur Herstellung von Laufmitteln und Puffern ausschliesslich p.A. Substanzen der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.

Pyridin wurde folgendermassen gereinigt:

1. Destillation über KOH, 2. Destillation über Chlorsulfonsäure, 3. dreimalige Destillation über Ninhydrin. Das gereinigte Pyridin darf nicht mehr mit Ninhydrin reagieren.

Die Düenschichtchromatographie wurde auf Fertigplatten, Kieselgel 60 F der Fa. Merck, Darmstadt, durchgeführt.

Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrinlösung und Chlor-Tolidinlösung entwickelt.

Für die Säulenchromatographie wurden folgende Materialien verwendet: Sephadex LH-20, G-25 und G-50 von Pharmacia Fine Chemicals, Kieselgel der Fa. Merck, Darmstadt (0.04-0.063 μ m, 230-400 mesh ASTM).

Herstellung des Rohextraktes.

1.1 kg Kalbsthymus werden vom Fett befreit, mit etwas Eis vermengt, zerkleinert, mit dem gleichen Volumen 0.1 M Ammoniumacetatlösung versetzt und im Potterhomogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wird mit zwei Volumenteilen 1 M Ammoniumacetatlösung versetzt und diese Suspension

20 min. bei 70°C geruehrt. Über eine dreifache Mullbindenlage wird abgesaugt und der Ruckstand verworfen. Das Filtrat wird bis zur 45%igen Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt. Anschliessend wird 1 h bei 5000 x g zentrifugiert. Der Ruckstand wird verworfen. Zum Überstand wird bis zur 90%igen Sättigung Ammonsulfat gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation wird der Überstand verworfen, der Ruckstand in wenig Wasser gelöst, diese Lösung ultra-filtriert (Amicon-PM-10, Ausschlussgrenze 10,000 Dalton) und lyophilisiert.

Das Lyophilisat wird in wenig Wasser (pH 5) aufgenommen und zur Entsalzung auf eine Sephadex G-25 Säule aufgetragen. Dieser Reinigungsschritt wird zweimal wiederholt. Nach Einengen wird die salzfreie Lösung zur weiteren Reinigung auf Sephadex G-50 Säule aufgetragen. Die Peptidfraktion wird zur Trockene eingengt, das reine Produkt in wenig Wasser aufgenommen, lyophilisiert und bei 5°C im Kühlschrank aufbewahrt. (Ausbeute: 28.5 mg). Das isolierte Peptidgemisch wird auf Kieselgelfertigplatten in verschiedenen Laufmittelsystemen chromatographiert. Die Detektion erfolgt mit Ninhydrin und Chlor-Tolidin. Mit n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 8:5:3:6 wird eine Auftrennung in 5 Fraktionen erhalten.

Isolation von Lymphozyten.

Menschliche Lymphozyten wurden nach der Methode von Böyum⁶) aus heparinisiertem peripheren Blut isoliert. Nachdem die Zellen zweimal in dem Medium RPMI 1640 + 50 μ g/ml Gentamycin + 10 % hitzeinaktiviertem Donor-Serum gewaschen worden waren, werden sie auf eine Endkonzentration von 0.8×10^6 pro ml in dem gleichen Medium eingestellt.

Lymphozytenstimulation durch Thymuspeptide.

Pro U-förmiger Vertiefung einer Mikrotiterplatte werden 200 μ l Lymphozytensuspension und 5,15,50 oder 150 μ g/ml Thymusfraktion A oder einer seiner gereinigten Subfraktionen gegeben; das Endvolumen betraegt 250 μ l. Die Ansaetze werden fuer 2,4 oder 6 Tage bei 37°C inkubiert und 18 Stunden vor Kulturrende werden 10 μ l H-Thymidin (0.67 μ Ci) mit einer spezifischen Aktivitaet von 2 Ci/mMol pro Vertiefung hinzugegeben. Die Zellen bzw. die markierte DNA werden auf Glasfibrerfilterscheibchen gesammelt und ihre Aktivitaet (cpm) wird ein einem Beta-Szintillationszähler bestimmt.

PHA-Stimulation.

Der Test wird analog der oben beschriebenen Lymphozytenstimulation durchgefuehrt; anstelle von Fraktion A werden 5 μ g/ml Phytohaemagglutinin (PHA-P, Difco) eingesetzt.

Berchnung des Stimulationsindes(S.I.)

Aktivitaet in cpm einer mit Thymusfraktion A behandelten Kultur

$$S.I. = \frac{\text{Aktivitaet in cpm einer mit Thymusfraktion A behandelten Kultur}}{\text{Aktivitaet in cpm einer unbehandelten Kontrollkultur}}$$

Bei den Kontrollkulturen liegen die Werte zwischen 100 und 150 cpm und bei den mit Thymusfraktion A behandelten Kulturen werden Werte bis 2100 cpm erreicht.

Ergebnisse.

Trennung durch Ionenaustauschchromatographie.

Die weitere Auftrennung der Thymusfraktion erfolgt mit einem praeparativen Mitteldruck-Chromatographiesystem, das speziell fuer die Ionenaustauschchromatographie von Peptiden und Proteinen an einem Kationenaustauscher ausgelegt ist [7,8].

Fuer die Elution der Thymuspeptide wird ein fuenfstufiger Konzentrations und pH-Gradient von Pyridin-Acetatpuffer verwendet. Er ueberstreicht einen Konzentrationsbereich von 0.1 - 3 M Pyridin und einen pH-Bereich von pH 3.0 - pH 4.2. Zur Detektion werden ca. 4% des Eluates einer kontinuierlichen Partialhydrolyse in 6 N Natronlauge unterworfen und entstandene freie Aminogruppen mit einem angesaeuerten Ninhydrinreagenz bei 570 nm photometrisch detektiert. Dadurch lassen sich auch Peptide ohne freie Aminogruppen und groessere Peptide mit hoeherer Empfindlichkeit nachweisen. Die Nachweisgrenze liegt unter 1 μ g je Fraktion.

Durch Lyophilisieren werden die isolierten Fraktionen als salzfreie Produkte direkt gewonnen, da Pyridin-Acetat-Puffer rueckstandsfrei verdampfbar sind.

Die Abbildung 1 zeigt die Trennung der Thymusfraktion an einem stark sauren Ionenaustauscher auf der Basis

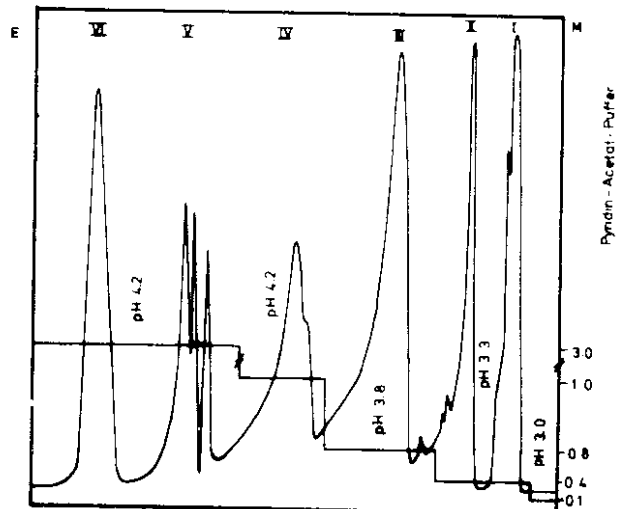


Abb.1: Trennung von 80 mg der Thymusfraktion A mit Hilfe des Mitteldruckchromatographiesystems. Saule: 0.9 x 55 cm, stark saurer Ionenaustauscher, Pyridinacetatpuffer gemab den: 1.5ml/min. bei einem Druck von 20-40 bar; Splitting fuer die Detektion: 4 %.

eines zu 8% quervernetzten Polystyrol-divinylbenzolgerustes, durch den 6 Hauptfraktionen erhalten werden, die zum Teil angetrennt sind. Die mittels des Mitteldrucksystems gewonnenen Fraktionen werden im Vakuum eingengt, in bidest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Zur Überprüfung der Reinheit und des molekularen Aufbaus der isolierten Peptide wird ein kleiner Anteil einer 24-stündigen Hydrolyse in 6 N HCl bei 110°C unterworfen. In Tabelle 1 sind die gefundenen Werte zusammengefasst. Die einzelnen Fraktionen unterscheiden sich deutlich in ihrer Zusammensetzung.

Table Aminosäureanalysen der Fraktionen I - VI der Thymusfraktion A

	I	II	III	IV	V	VI
Asp	8.72	11.51	11.76	10.74	9.1	7.05
Thr	8.34	5.84	5.85	4.52	4.32	3.35
Ser	11.82	9.53	8.13	6.70	6.18	5.56
Glu	16.75	15.54	13.76	12.73	12.08	9.65
Gly	17.34	14.18	13.23	14.62	18.83	17.50
Ala	14.25	11.43	9.20	8.26	7.49	6.61
Val	6.68	8.14	6.83	6.74	5.55	13.96
Met	0.43	0.72	1.26	1.43	1.27	0.57
Ile	3.18	3.58	4.06	3.86	4.06	3.15
Leu	6.56	7.16	0.78	6.74	6.69	14.01
Tyr	0.80	0.65	0.88	1.06	0.98	0.35
Phe	0.93	0.93	1.10	1.59	1.83	1.03
Lys	2.29	5.78	9.02	10.34	9.81	13.62
His	0.72	1.55	2.50	3.31	3.83	2.63
Arg	1.14	2.80	4.38	7.29	7.98	10.12

Wie die Abbildung 2 zeigt, verursachte Thymusfraktion A eine deutliche Lymphozytenstimulation mit einem S.I. von 15.4, der bei einer Konzentration von 50 µg/ml am vierten Inkubationstag erreicht wurde. Bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen wurden zwar geringere S.I. erzielt, jedoch wurde auch in diesen Fällen ein jeweiliges Proliferationsoptimum am Tag 4

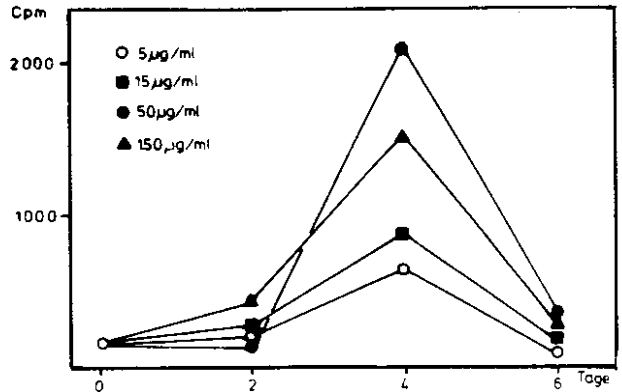


Abb. 2: Der Einbau von ³H-Thymidin in periphere menschliche Lymphozyten, die für 2, 4 oder 6 Tage mit verschiedenen Konzentrationen der Thymusfraktion A behandelt worden waren.

beobachtet. Von den gereinigten Subfraktionen war nur die Komponente I in der Lage, eine signifikante ³H-Thymidin-Inkorporation mit einem S.I. von 3.7 bei 15 µg/ml zu induzieren. Die anderen Subfraktionen verursachten entweder keine signifikante Stimulation oder zeigten keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit. Positive Kontrollkulturen, die zum Nachweis der Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten mit dem T-Zell-Mitogen Phytohämagglutinin - (PHA) behandelt worden waren, erreichten einen S.I. von 183 am Tag 3 und einen S.I. von 41 am Tag 4.

Diskussion

Der gelchromatographisch gereinigte Thymusextrakt mit einem mittleren Molekulargewicht von 10,000 Dalton kann an einem stark sauren Ionenaustauscher in sechs weitere Unterfraktionen aufgetrennt werden. Mit dem in unserem Laboratorium entwickelten Mitteldruckchromatographie-system können noch Peptide und Proteine im g-Bereich nachgewiesen werden. Die isolierten sechs Unterfraktionen werden auf ihre physiologische Wirksamkeit überprüft.

Die Behandlung von peripheren menschlichen Lymphozyten mit der Thymusfraktion A fuehrt zu einer mittelgradigen Lymphozytenproliferation mit einem S.I. von maximal 15.4 Im Gegensatz dazu werden bei der PHA-Stimulation Werte von bis zu 183 erreicht. Diese Diskrepanz wird dadurch erklart, dass PHA ein generelles T-Zell-Mitogen fuer reife T-Lymphozyten ist (9), die im peripheren Blut nur zu einem geringen Prozentsatz vorhanden sind. Das bedeutet weiterhin, dass die Thymusfraktion A eher Differenzierungs-induzierende Eigenschaften als mitogene Eigenschaften hat. Um diese Moeglichkeit auch quantitativ zu erfassen, muessten mit der Thymusfraktion A exponierte Lymphozyten mit radioaktiv markierten Aminosaeuren inkubiert werden, um die de novo Proteinbiosynthese zu bestimmen, die meistens mit Differenzierungsprozessen assoziiert ist. Von den Unterfraktionen der Thymusfraktion A war nur die Komponente I in der Lage, eine signifikante Lymphozytenstimulation zu induzieren. Allerdings wurden dabei wesentlich geringere S.I. als bei der Thymusfraktion A erreicht. Dieses Resultat konnte dadurch erklart werden, dass (1) die aktiven Peptide im Verlauf der Reinigungsprozedur inaktiviert wurden, (2) die aktive Komponente nicht eluiert wurde und (3) eine Rekombination von Unterfraktionen durchgefuehrt werden muss, was auf einen Synergismus von zwei oder mehreren Komponenten hindeutet. Auch fuer die Subfraktionen waere die oben vorgeschlagene Markierung mit aktiven Aminosaeuren sinnvoll, um

nachzuweisen, ob der Aktivitaetsverlust auch fuer die Differenzierungs-induzierende Eigenschaft der Einzelkomponenten der Thymusfraktion A gilt.

References:

1. A. L. Goldstein, F. D. Slater, u. A. White, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **56**, 1010-1014 (1966).
2. B. G. W. Arnason, u. J. Antel, *Annales d'Immunologie*, **129 C**, 159-166 (1978).
3. Tioyama, S. Kawanami, I. Goto, u. Y. Kuroiwa, *Clinical and Experimental Immunology*, **37**, 452-458 (1979).
4. Y. Borel, A. J. Strelkavkas, E. Matzouranis, R. T. Callery, u. S. F. Schlossman, *Arthritis and Rheumatism*, **22**, 595-599 (1979).
5. L. A. Schafer, J. U. Guttermann, E. M. Hersh, G. M. Mvligit, u. A. L. Goldstein, *Prog. Cancer Res. Therapy*, **2**, 329-339 (1977).
6. A. Boeyum, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 51-63 (1968).
7. W. Voelter, H. Bauer, S. Fuchs, u. E. Pietrzk, *J. Chromatography*, **153**, 433-442 (1978).
8. O. Lehar, *Diplomarbeit, Universitaet Tubingen*, 1982.
9. W. Heinzel, u. W. Voelter, *Chemiker-Zeitung*, **3**, 37-49 (1981).