

Wechselwirkung beim Hämoglobin genannt. Ein anderer extremer Fall wurde an der Aspartat-Transcarbamylase (ATC) von *E. coli* aufgeklärt [58].

Das Enzym leitet mit der Reaktion: Carbamylphosphat + Aspartat \rightarrow Carbamylaspartat die Biosynthese des Cytidintriphosphates (CTP) ein. Es unterliegt der Regulation durch Rückkopplung, CTP hemmt seine Aktivität. Die ATC ($M \approx 3 \times 10^5$) besteht aus enzymatisch inaktiven regulatorischen Untereinheiten ($M \approx 3 \times 10^4$) und enzymatisch aktiven Untereinheiten ($M \approx 9 \times 10^4$); nur die erstere Art bindet CTP. Die von der regulatorischen Untereinheit befreite enzymatisch aktive Untereinheit wird durch CTP nicht mehr gehemmt.

Man kann folgern, daß Multienzym-Komplexe im Prinzip gegenüber anderen Proteinen mit Quartärstruktur

[58] J. C. Gerhart, Brookhaven Symp. Quant. Biol. 17, 222 (1964).

keine Sonderstellung einnehmen. Ob die Vorstellung von homo- und heterofunktionellen Komplexen eine bessere Sicht verschafft, bleibt abzuwarten, da die Organisation der Enzyme weitläufiger ist als hier beschrieben werden konnte. Es blieben Systeme unberücksichtigt, die im Zusammenhang größerer Zellstrukturen wirken, z. B. die vektoriellen Enzyme der Transportsysteme an Membranen oder die mechano-chemischen Systeme kontraktiler oder sonst beweglicher Strukturen.

Für die Überlassung von Abbildungen danke ich den Herren Prof. L. J. Reed und Dr. R. M. Oliver (Abb. 1) sowie Prof. F. Lynen (Abb. 2). Erwähnte eigene Versuche wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Eingegangen am 1. Juni 1966 [A 537]

Chemie und Biochemie des Insulins

von DR. H. KLOSTERMEYER

DEUTSCHES WOLFFORSCHUNGSIINSTITUT AN DER TECHNISCHEN HOCHSCHULE AACHEN

UND PRIV.-DOZ. DR. R. E. HUMBEL
BIOCHEMISCHES INSTITUT, UNIVERSITÄT ZÜRICH (SCHWEIZ)

Das Eiweißhormon Insulin ist im Tierreich weit verbreitet, seine Aminosäurezusammensetzung ist bei gleicher biologischer Wirksamkeit sehr unterschiedlich. — Insulin besteht aus zwei Polypeptidketten, die durch drei Cystinreste zu einem bicyclischen System aus 20 und 85 Ringgliedern verknüpft sind. — Das Protein kristallisiert mit Fremdionen in verschiedenen Formen. In Lösungen bildet Insulin gewöhnlich Aggregate aus 2 n Molekülen. — Das Hormon kann aus den getrennten Polypeptidketten regeneriert werden. Die Totalsynthese erfolgte analog aus synthetisierten Peptidketten. — Bei der Biosynthese wird Insulin anscheinend auch aus den beiden separat entstandenen Ketten zusammengefügt. — Im Organismus fördert Insulin den Aufbau von Glykogen, Fett und Protein; Insulinmangel äußert sich im Anstieg des Blutzuckers. Der eigentliche Wirkungsmechanismus des Hormons ist immer noch unbekannt. — Ein spezifisches Wirkzentrum konnte im Insulinmolekül noch nicht nachgewiesen werden, es enthält mehrere antigene Bereiche.

Einführung

1788 beobachtete der Arzt Cowley^[1] einen Zusammenhang zwischen gestörter Pankreasfunktion und Zuckerkrankheit; von Mering und Minkowski^[2] zeigten 1889, daß sich der Diabetes mellitus durch Pankreasexstirpation experimentell erzeugen läßt. Als Entstehungsort des blutzuckersenkenden Prinzips der Bauchspeicheldrüse erkannten Schulze^[3] und Ssobolew^[4] 1900 die Langerhansschen Inselzellen; die unbekannte Substanz wurde darum 1909 „Insulin“^[5] genannt. Die Extraktion von

[1] Cowley, London med. journal 1788.

[2] J. v. Mering u. O. Minkowski, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 26, 371 (1890).

[3] Schulze, Arch. f. mikros. Anat. u. Entwicklungsmech. 56, (1900).

[4] Ssobolew, Zentralblatt Pathol. 11, 202 (1900).

[5] de Meyer, Archivio di fisiologia 7, 96 (1909).

Insulin aus dem Pankreas gelang wohl schon 1911^[6], wurde aber erst 1920 von Banting und Best^[7] unter Mitwirkung des Biochemikers Collip konsequent durchgeführt. Damit begann die Chemie des Insulins. Sie führte über die Reindarstellung durch Abel (1926)^[8] zur Ermittlung der Konstitutionsformel durch Sanger (1955)^[9] und zur Synthese (1963)^[10, 11]; die vor 30 Jahren be-

[6] E. L. Scott, Amer. J. Physiol. 29, 306 (1911/12).

[7] F. G. Banting u. C. H. Best, J. Lab. clin. Med. 7, 251 (1922).

[8] J. J. Abel, Proc. nat. Acad. Sci. USA 12, 132 (1926).

[9] A. P. Ryle, F. Sanger, L. F. Smith u. R. Kitai, Biochem. J. 60, 541 (1955).

[10] J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda u. H. Zahn, Z. Naturforsch. 18b, 1120 (1963).

[11] P. G. Katsoyannis, A. Tometsko u. K. Fukuda, J. Amer. chem. Soc. 85, 2863 (1963); P. G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki u. M. Tilak, ibid. 86, 930 (1964); G. H. Dixon, Excerpta Medica Int. Congr. Ser. 83, 1207 (1964).

gonnene Bestimmung der Raumstruktur^[12] wird bald abgeschlossen sein.

Über ein aktives Zentrum im Insulinmolekül, über den Wirkungsort des Moleküs und den Wirkungsmechanismus in der Zelle ist noch wenig bekannt. Insulin kommt in Organen höherer Lebewesen einschließlich Fischen vor. Unlängst fand man Hinweise für seine Anwesenheit in Seesternen^[13].

Isolierung und Reinigung

Insulin kann in Mengen bis zu 5 mg^[14] mit Verfahren gewonnen werden, die auf den Pionierarbeiten von *Collip*^[15] sowie *Somogyi*, *Doisy* und *Shaffer*^[16] basieren. Das Hormon wird frischen oder tiegeföhlteten Drüsen mit 60- bis 80-proz. Alkohol bei einem pH-Wert von 1 bis 3 (Inaktivierung der exokrinen Proteasen des Pankreas!) entzogen. Der Extrakt wird im Vakuum eingekengt und von Fetten befreit. Das Hormon wird ausgesalzen, gelöst, und schließlich wird das Insulin bei pH = 5,3 bis 5,4 isoelektrisch gefällt. Es läßt sich auch direkt aus der stärker sauren Lösung durch Animpfen mit Insulinfibrillen^[17] niederschlagen. Bei einem neueren Verfahren wird das Abdampfen des Alkohols vermieden, die inerten Proteine werden bei pH = 8 gefällt und restliche Enzyme durch kurzes Erwärmen im Sauren zerstört; das Insulin kann dann an weitmaschigen Ionenaustauschern (Alginsäure^[18], DEAE- und CM-Cellulose^[19]) adsorbiert und eluiert werden, die Ausbeuten werden dadurch um 20 bis 30 % verbessert^[18]. Aus Rinderpankreas erhält man etwa 2000 I.E./kg Drüsen, aus Kälberpankreas bis 10000 I.E. (≈400 mg)/kg, da bei Neugeborenen die exokrine Funktion der Bauchspeicheldrüse noch nicht entwickelt ist^[20], und aus Fischpankreas ca. 75000 I.E./kg, da dessen endokriner vom exokrinen Teil getrennt ist^[21].

In neuerer Zeit wurden auch Wege gefunden, um kleine Mengen Insulin, etwa aus einzelnen Drüsen von Versuchstieren^[22], zu isolieren. Der Pankreasauszug kann durch Gegenstromextraktion mit Äther^[23] sehr schonend von Alkohol befreit werden, das Insulin wird gewöhnlich durch Ionenaustauschchromatographie^[19, 21] und/oder Gelfiltration^[21, 24] abgetrennt. Sehr kleine

[12] *D. Crowfoot Hodgkin* et al., Oxford.

[13] *S. Wilson* u. *S. Falkmer*, *Canad. J. Biochem.* 43, 1615 (1965).

[14] Laborvorschrift bei *C. W. Pettinga*, *Biochem. Preparations* 6, 28 (1958).

[15] *J. B. Collip*, *J. biol. Chemistry* 55, xl (1923).

[16] *M. Somogyi*, *E. A. Doisy* u. *P. A. Shaffer*, *J. biol. Chemistry* 60, 31 (1924).

[17] *D. F. Waugh*, *J. Amer. chem. Soc.* 70, 1850 (1948); *D. F. Waugh*, *R. E. Thompson* und *R. J. Weimer*, *J. biol. Chemistry* 185, 85 (1950).

[18] *E. Jorpes*, *V. Mutt* u. *S. Rastgeldi*, *Acta chem. scand.* 14, 1777 (1960).

[19] Vgl. *L. F. Smith*, *Biochim. biophysica Acta* 82, 231 (1964).

[20] *B. Werner*, *Acta paediatrica (Uppsala)* 35, Suppl. 6 (1948).

[21] *R. E. Humbel* u. *A. M. Crestfield*, *Biochemistry* 4, 1044 (1965).

[22] *P. R. Davoren*, *Biochim. biophysica Acta* 63, 150 (1962).

[23] *S. S. Randall*, *Biochim. biophysica Acta* 90, 472 (1964).

[24] *I. A. Mirsky*, *R. Jinks* u. *G. Perisutti*, *J. clin. Invest.* 42, 1869 (1963).

Mengen Insulin können durch Fällung mit Antikörpern^[25] isoliert werden.

Rohinsulin läßt sich am einfachsten durch wiederholte Kristallisation reinigen. Man kommt dabei zu Präparaten mit konstanter biologischer Aktivität, die lange als völlig rein galten. Feinere Analysenmethoden zeigten, daß auch mehrfach umkristallisierte Insuline uneinheitlich sind^[26]. Neben dem Insulinantagonisten Glukagon^[27] wurde als häufigste Verunreinigung ein Desamidoinsulin^[28] isoliert, aber auch insulinartige Proteine^[29] mit geringerer oder fehlender biologischer Aktivität sowie antigene Substanzen^[30].

Zur präparativen Feinreinigung des Insulins eignet sich die Gegenstromverteilung^[26]; auch chromatographische Methoden^[31] und die Gelfiltration^[32] wurden erfolgreich benutzt. Leider lassen sich selbst in hochgereinigten Insulinen durch Elektrophorese meist noch einige fremde Komponenten nachweisen^[33].

Kristalle

Reine Insulinkristalle sind nur schwer zu erhalten^[34, 35], bei Zusatz geeigneter Substanzen kristallisiert das Hormon jedoch ziemlich leicht. Es sind zahlreiche kristallisierte Insulinpräparate bekannt, sie enthalten jeweils Kristallwasser, meist aber – im Verhältnis zur Molekülgröße – relativ wenig Fremdionen und werden daher „kristallines Insulin“ genannt. Die Kristalle sind äußerlich häufig gleich, können sich aber auch unterscheiden, wenn die Insulinkomponente von verschiedenen Tieren stammt^[36, 37].

Insulin wurde ursprünglich aus gepufferten Lösungen im isotonischen Bereich bei pH = 5,5 bis 5,6 ohne Zusatz von Metallionen kristallisiert^[34, 38], bis *Scott*^[39] in diesen Kristallen Zink fand und zeigte, daß zweiwertige Metallionen wie Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ oder Cd²⁺ für die Kristallisation des Hormones

[25] *K. W. Taylor*, *V. E. Jones* u. *G. Gardner*, *Nature (London)* 195, 602 (1962); *K. W. Taylor*, *G. Gardner*, *D. G. Parry* u. *V. E. Jones*, *Biochim. biophysica Acta* 100, 521 (1965).

[26] *E. J. Harfenist* u. *L. C. Craig*, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 3083 (1952); *L. C. Craig*, *T. P. King* u. *W. H. Königberg*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 88, 571 (1960); *I. A. Mirsky* u. *K. Kawamura*, *Endocrinology* 78, 1115 (1966).

[27] *M. Bürger* u. *W. Brandt*, *Z. ges. exptl. Med.* 96, 375 (1935); *A. Staub*, *L. Sinn* u. *O. K. Behrens*, *J. biol. Chemistry* 214, 619 (1955).

[28] *E. J. Harfenist*, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 5528 (1953).

[29] *K. Nagasawa*, *S. Nishizaki*, *T. Hiraoka* u. *S. Fukasawa*, *Bull. nat. Inst. hyg. Sci. (Eisei Shikenjo Hōkoku)* 75, 95 (1957).

[30] *T. Deckert*, *Dissertation*, Universität Kopenhagen, 1964.

[31] Vgl. *A. Chrambach* u. *F. H. Carpenter*, *J. biol. Chemistry* 235, 3478 (1960).

[32] *C. J. Epstein* u. *C. B. Anfinsen*, *Biochemistry* 2, 461 (1963).

[33] *F. H. Carpenter* u. *S. L. Hayes*, *Biochemistry* 2, 1272 (1963).

[34] *J. J. Abel*, *E. M. K. Geiling*, *C. A. Rouiller*, *F. K. Bell* u. *O. Wintersteiner*, *J. Pharmacol. exp. Therapeut.* 31, 65 (1927).

[35] *J. Schlichtkrull*, *Dissertation*, Universität Kopenhagen, 1958; *Svensk kem. Tidskr.* 72, 166 (1960).

[36] *J. Schlichtkrull*, *Acta chem. scand.* 10, 1455, 1459 (1956); 11, 291, 299, 439, 484, 1248 (1957).

[37] *K. Nagasawa*, *S. Nishizaki*, *Y. Takenaka*, *T. Honma* u. *T. Hiraoka*, *Bull. nat. Inst. hyg. Sci. (Eisei Shikenjo Hōkoku)* 76, 217 (1958).

[38] *C. R. Harington* u. *D. A. Scott*, *Biochem. J.* 23, 384 (1929).

[39] *D. A. Scott*, *Biochem. J.* 28, 1592 (1934).

nötig sind. Cu^{2+} -, Mn^{2+} - und Fe^{2+} -Ionen^[36] erfüllen den gleichen Zweck, das Zink kann zur Hälfte durch Magnesium oder Calcium^[40], nach Extraktion mit Äthylendiamintetraessigsäure auch ganz durch Blei ersetzt werden^[41].

Der Metallgehalt der Insulinkristalle ist den Atomgewichten direkt proportional^[42] (0,52 % Zn, 0,77 % Cd usw.), es liegen also echte Verbindungen vor. Nun sind aber auch Kristalle mit geringerem Metallgehalt (0,33 % Zn) bekannt^[36], und andererseits kann der Zinkgehalt bis auf 5 % hochgetrieben werden^[43]. Solche Verbindungen werden als Doppelsalze des Typs $2 \text{M}^{2+} \text{Insulin}^{4-} \cdot n \text{MeX}_2$ angesehen^[40, 44]. Metallhaltige Insulinen können die Metallionen ohne Zerstörung der Kristalle entzogen werden^[36, 45].

Außer Zinkchlorid müssen zur Kristallisation des Insulins Anionen wie Acetat, Citrat, Phosphat oder Carbonat zugegen sein^[46]. Aus sauren Lösungen ($\text{pH} = 2$ bis 2,5) geringer Ionenstärke, in denen das Molekül nur wenig assoziiert ist, kristallisiert Insulin auch metallfrei^[47, 48], und zwar als Sulfat (2 Insulin-12 H_2SO_4) in zwei Formen sowie als Selenat, Phosphat, Chlorid, Formiat, Acetat und Citrat. Kristalline zinkfreie und metallhaltige Salze des Insulins mit organischen Basen sind seit langem bekannt^[49].

Die sauren Salze kristallisieren orthorhombisch, sie sind wohl aus Insulindimeren aufgebaut^[50]. Die kubische, metallfreie Form bildet sehr kleine Rhombendodekaeder, in ihnen bilden anscheinend sechs Insulindimere^[51] ein Aggregat. Im monoklinen Zinkinsulin (aus phenolhaltigen Lösungen) enthält die unsymmetrische Elementarzelle Aggregate aus sechs Insulinmolekülen und zwei Zinkionen^[51]. In beiden rhomboedrischen Insulinen enthält die Elementarzelle je nach Halogenidgehalt der Mutterlauge zwei oder vier Zinkionen im Insulinhexameren^[51, 52]. In den dimeren Bausteinen liegen die Insulinmoleküle parallel^[50, 84].

Der Kristallwassergehalt von Insulinkristallen beträgt je nach Modifikation 30–51 %^[51], an der Luft schrumpfen die Kristalle (10 % H_2O). Ein Teil des Wassers (8 %, ≈ 30 Mol je Mol Insulin) wird auch bei drastischer Trocknung nicht freigegeben^[53]. Das Zink kann durch Dialyse oder Gelfiltration^[54], besonders leicht bei Zusatz von Glycin, entfernt werden.

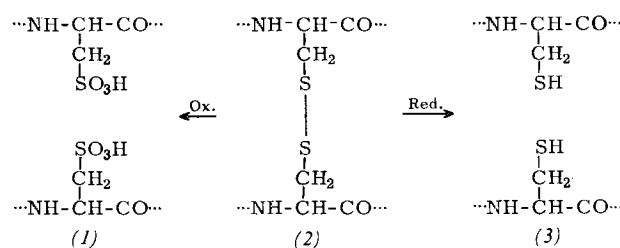
Strukturformel

Obwohl Wintersteiner, du Vigneaud und Jensen^[55] Insulin bereits 1928 als reines Protein erkannten, fehlte es nicht an Versuchen zur Darstellung „eiweißfreien Insulins“ oder zum Nachweis eines Cofaktors. Nach und

- [40] K. Marcker, Acta chem. scand. 13, 2036 (1959).
- [41] D. Crowfoot Hodgkin, persönliche Mitteilung.
- [42] D. A. Scott u. A. M. Fisher, Biochem. J. 29, 1048 (1935); Trans. Roy. Soc. Canada 32 V, 55 (1938).
- [43] Dän. Pat. 97363 (1964), Novo Terapeutisk Lab. A./S.; Chem. Abstr. 61, 9580b (1964).
- [44] E. Jensen, A. T. Jensen u. K. Marcker, Acta chem. scand. 14, 1919 (1960).
- [45] R. Netter, Bull. Soc. chim. France 6, D 1042 (1939).
- [46] K. Hallas-Møller, Dissertation, Univers. Kopenhagen, 1945.
- [47] E. Ellenbogen, Dissertation, Harvard University, Boston, 1949; J. L. Oncley, E. Ellenbogen u. H. H. Dix, 2e Congr. intern. biochim., Paris, Résumés communs. 61 (1952); B. W. Low u. J. E. Berger, Acta crystallogr. 14, 82 (1961).
- [48] F. Sundby, J. biol. Chemistry 237, 3406 (1962).
- [49] D. A. Scott u. A. M. Fisher, Trans. Roy. Soc. Canada 36 V, 45 (1942).
- [50] B. W. Low u. J. R. Einstein, Nature (London) 186, 470 (1960); J. R. Einstein, A. C. McGavin u. B. W. Low, Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 74 (1963).
- [51] M. M. Harding, D. Crowfoot Hodgkin, A. F. Kennedy, A. O'Connor u. P. D. J. Weitzmann, J. molecular Biol. 16, 212 (1966).
- [52] E. Dodson, M. M. Harding, D. Crowfoot Hodgkin u. M. G. Rossmann, J. molecular Biol. 16, 227 (1966).
- [53] E. Ellenbogen, J. Amer. chem. Soc. 77, 6634 (1955).
- [54] K. Brunfeldt, Science Tools 12, 5, 17 (1965).

nach wurden jedoch siebzehn verschiedene Aminosäuren in Insulinhydrolysaten ermittelt und quantitativ bestimmt^[56].

Insulin enthält ungewöhnlich viel Schwefel (3,3 %), und zwar nur in Form von Cystin^[57] (neuerdings wurde in Ratten- und Fischinsulin auch Methionin gefunden). Daraus schlossen Freudenberg und Wegmann^[58] 1935, daß „das wirksame (SS)-Insulin aus mindestens zwei parallel gelagerten Proteinketten bestehen müsse, die durch SS-Brücken wie von Leitersprossen zusammengehalten werden“. Diese Vermutung wurde von Sanger bestätigt, der 1945 neben Phenylalanin^[59] auch Glycin^[60] als N-terminale Aminosäure, beide im Verhältnis 1:1, nachwies. Insulin muß also durch oxidative oder reduktive Spaltung der Disulfidbrücken in Polypeptidketten zu zerlegen sein:



Nach Oxidation des Moleküls mit Perameisensäure^[61] erhält man zwei Fraktionen, die sich auf Grund unterschiedlicher Ladung (acidic und basic) fraktioniert fällen lassen^[62]. Die Trennung ist auch durch Gegenstromverteilung^[63], Zonenelektrophorese^[63] und Ionenaustauschchromatographie^[64] möglich. Fraktion A und B sind in sich homogen, Insulin besteht also aus den beiden Polypeptidketten A und B.

Sanger und Mitarbeiter bestimmten in zehnjähriger Arbeit^[65] die gesamte Strukturformel des Rinderinsulins (Abb. 1), zunächst die Folge der 30 und 21 Aminosäurereste in der B-^[66, 67] und A-Kette^[66, 68], dann die Stellung der Amidgruppen^[69] und der drei Disulfidbrücken^[9]. Das Molekulargewicht ergab sich zu 5734, das

- [55] O. Wintersteiner, V. du Vigneaud u. H. Jensen, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 32, 397 (1928).
- [56] A. C. Chibnall, J. intern. Soc. Leather Trades Chemists 30, 1 (1946); E. Brand, Ann. N.Y. Acad. Sci. 47, 187 (1946).
- [57] V. du Vigneaud, H. Jensen u. O. Wintersteiner, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 32, 367 (1928); G. L. Miller u. V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry 118, 101 (1937).
- [58] K. Freudenberg u. T. Wegmann, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 233, 159 (1935).
- [59] H. Jensen u. E. A. Evans, Jr., J. biol. Chemistry 108, 1 (1935).
- [60] F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 (1945).
- [61] F. Sanger, Nature (London) 160, 295 (1947).
- [62] F. Sanger, Biochem. J. 44, 126 (1949).
- [63] Vgl. L. C. Craig, H. W. Konigsberg u. T. P. King, Biochem. Preparations 8, 70 (1961).
- [64] S. Fittkau, Naturwissenschaften 50, 522 (1963).
- [65] Die dabei entwickelten Methoden wurden bereits von G. Braunitzer in dieser Zeitschrift referiert: Angew. Chem. 69, 189 (1957).
- [66] F. Sanger, Biochem. J. 45, 563 (1949).
- [67] F. Sanger u. H. Tuppy, Biochem. J. 49, 463, 481 (1951).
- [68] F. Sanger u. E. O. P. Thompson, Biochem. J. 53, 353, 366 (1953).
- [69] F. Sanger, E. O. P. Thompson u. R. Kitai, Biochem. J. 59, 509 (1955).

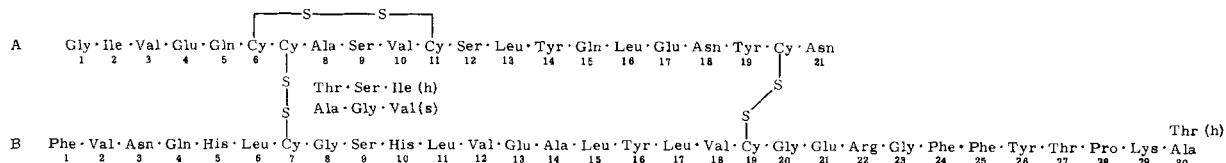


Abb. 1. Primärstruktur des Rinderinsulins. Human- (h) und Schafinsulin (s) unterscheiden sich davon in den Positionen A₈₋₁₀, Humaninsulin auch in B₃₀.

bis dahin meistens angenommene kleinste Molekulargewicht des Insulins von 12000 kommt also dem Dimeren zu.

Sanger fand Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der A-Ketten des Rinder-, Schaf- und Schweineinsulins, und zwar im Bereich A₈₋₁₀^[70]. Inzwischen wurden, besonders durch die Arbeiten von L. F. Smith, über zwanzig Insuline in ihrer Struktur geklärt^[21, 71]; das Hormon tritt in zahlreichen Variationen mit gleicher biologischer Wirksamkeit auf. Die Insuline unterscheiden sich um so mehr, je weiter die Species phylogenetisch auseinanderstehen. Einige Fische^[72] und Ratten^[73, 74] produzieren Insuline unterschiedlicher Sequenz, sogar im selben Pankreas^[74]; wie weit diese Erscheinung in der Natur verbreitet ist, bedarf noch der Klärung.

Raumstruktur

Der räumliche Aufbau des Insulinmoleküls wird in erster Linie durch die Lage der Disulfidbrücken bestimmt. Aus dem unterschiedlichen Verhalten von Insulinfilmen an Wasser-Luft- und Wasser-Öl-Grenzflächen wurde geschlossen^[75], daß die Raumstruktur beim Insulin noch viel stärker als beim Hämoglobin von Kräften vom van-der-Waals-Typ bestimmt wird. Wie der Deuteriumaustausch^[76] zeigt, enthält gelöstes Insulin weniger Wasserstoffbrücken als festes. Der Helixanteil der Ketten wird mit knapp 50 % angegeben^[77], er übersteigt auch im wasserfreien Medium kaum 65 %. Dies muß auf der Lage der Disulfidbindungen beruhen, da die isolierte B-Kette unter gleichen Bedingungen nahezu vollständig eine rechtsgängige α -Helix^[78] bildet.

[70] F. Sanger, Nature (London) 164, 529 (1949); H. Brown, F. Sanger u. R. Kitai, Biochem. J. 60, 556 (1955).

[71] L. F. Smith, vergleiche [74]; L. F. Smith durch F. G. Young, Brit. med. J. 1961 II, 1449; D. S. H. W. Nicol u. L. F. Smith, Nature (London) 187, 483 (1960); J. I. Harris, F. Sanger u. M. A. Naughton, Arch. Biochem. Biophysics 65, 427 (1956); Y. Ishihara, T. Saito, Y. Ito u. M. Fujino, Nature (London) 181, 1468 (1958); S. Wilson u. G. H. Dixon, unveröffentlicht; H. Hama, K. Chitani, S. Sakaki u. K. Narita, J. Biochem. (Japan) 56, 285 (1964); A. Kotaki, J. Biochem. (Japan) 50, 256 (1961); 51, 301 (1962); 53, 61 (1963).

[72] K. Nagasawa u. S. Nishizaki, Bull. nat. Inst. hyg. Sci. (Eisei Shikenjo Hôkoku) 77, 197, 203 (1959); S. Nishizaki, ibid. 81, 30, 34 (1963); M. Yamamoto, A. Kotaki, T. Okuyama u. K. Satake, J. Biochem. (Japan) 48, 84 (1960).

[73] K. W. Taylor u. G. H. Smith, Biochem. J. 91, 491 (1964).

[74] L. F. Smith, Amer. J. Med. 40, 662 (1966).

[75] D. F. Cheesman u. J. T. Davies, Advances Protein Chem. 9, 458 (1954).

[76] A. Hvidt u. K. Linderstrøm-Lang, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 29, 385 (1955).

[77] K. Linderstrøm-Lang, Symp. Chem. Soc. Roy. Inst. (London) 2, 1 (1955).

[78] J. T. Yang u. P. Doty, J. Amer. chem. Soc. 79, 761 (1957).

Interessant ist der Befund von Slobin und Carpenter^[79], wonach die Entfernung der C-terminalen Aminosäure B₃₀ keinen Einfluß auf die Konformation und biologische Aktivität des Insulins hat. Wird jedoch zusätzlich der endständige Rest der A-Kette (A₂₁) abgespalten, so ändert sich die Konformation des Moleküls, gleichzeitig wird das Hormon inaktiviert. Für die hormonelle Wirksamkeit scheint also ein bestimmter räumlicher Aufbau nötig zu sein.

Mehrfach^[50, 77, 80] wurde versucht, experimentelle Befunde mit Modellen zu deuten. Wie weit diese der Wirklichkeit entsprechen, werden dreidimensionale Röntgenanalysen^[51, 52, 81-83] des Insulins zeigen. Da es bei intramolekularer Reaktion des Insulins mit 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol zur Vernetzung von Glycin (A₁) mit Lysin (B₂₉) kommt^[84] (Abb. 2), wurde postuliert^[85], daß die Ketten in sich zurückgeklappt sind. Diese Annahme scheint sich zu bestätigen^[41].

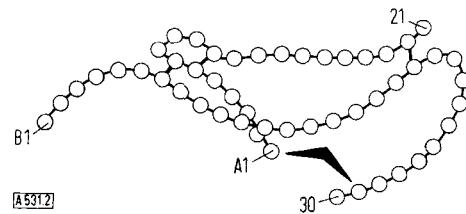


Abb. 2. Bei der intramolekularen Reaktion von Insulin mit 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol entsteht unter anderen auch eine Brücke zwischen der α -Aminogruppe bei A₁ und der ϵ -Aminogruppe bei B₂₉. Folglich müssen diese Gruppen etwa 5 Å voneinander entfernt sein.

Aus der Rotationsdispersion^[86] wurde abgeleitet, daß sich die Konformation des fibrillären Insulins (F-Insulins) stark von der des gelösten unterscheidet. Die verminderte Jodaufnahme^[87] der Fibrillen und der Befund, daß im F-Insulin nur einer der beiden Histidinreste mit Fluordinitrobenzol reagiert^[88] (vgl. aber^[89]), deuten ebenfalls auf eine veränderte

[79] L. I. Slobin u. F. H. Carpenter, Biochemistry 5, 499 (1966).
[80] H. Lindley u. J. S. Rollett, Biochim. biophysica Acta 18, 183 (1955).

[81] Vom Insulin wurde als erstem Protein eine Kristallröntgenaufnahme veröffentlicht: D. Crowfoot, Nature (London) 135, 591 (1935).

[82] D. Crowfoot, Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A 164, 580 (1938).

[83] B. W. Low u. C. C. H. Chen, Acta crystallogr. 19, 686 (1965) und vorhergehende Arbeiten.

[84] H. Zahn u. J. Meienhofer, Makromolekulare Chem. 26, 153 (1958).

[85] H. Zahn, Sixth Intern. Congr. of Biochem., New York, August 1964.

[86] J. A. Schellman, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 30, 415 (1958).

[87] P. H. Springell, Biochem. J. 83, 7P (1962); Biochim. biophysica Acta 63, 136 (1962).

[88] R. R. Porter, Biochem. J. 46, 304 (1950).

[89] K. Wallenfels u. A. Arens, Biochem. Z. 333, 395 (1960).

Raumstruktur, haben aber wenig Beweiskraft, da sie Diffusions- und Oberflächeneffekte sein können. Röntgenaufnahmen^[90] zeigen keine wesentlichen Unterschiede der Monomeren im F-Insulin und in sauren Insulinkristallen.

Aggregation und Komplexbildung

In Lösungen hängt das Teilchengewicht des Insulins von pH, Temperatur, Ionenstärke, Konzentration und Fremdionen ab (Abb. 3). Unter Berücksichtigung der

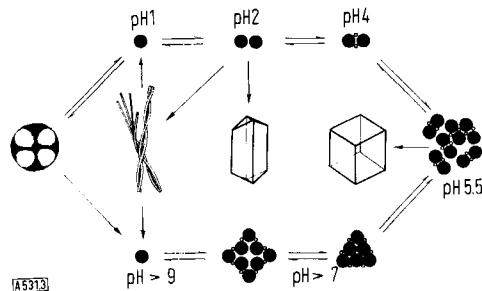


Abb. 3. Verhalten des Zinkinsulins in Lösungen, sehr vereinfachte Darstellung. In der mittleren Reihe von links nach rechts: Sphärit, Fibrillen, Insulinchlorid, Zinkinsulin, isoelektrische Fällung. Die großen schwarzen Kreise symbolisieren Insulin-Moleküle, die kleinen weißen Zn²⁺-Ionen.

Hydratation sollte es um 6000 liegen. Dieser Wert wird in sauren Lösungen ($\text{pH} \leq 2$) geringer Insulin-Konzentration gefunden^[91, 92]. Mit steigender Konzentration und Alkalität dimerisiert das Molekül. Oberhalb pH = 4 bilden sich in Gegenwart geeigneter Metallionen (Zn²⁺) Komplexe, die im Bereich von pH = 4 bis 7 als amorphe,

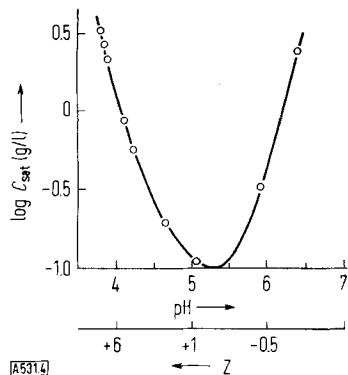


Abb. 4. Löslichkeit des Insulins in 0.1 N NaCl, die Angabe der Ladung Z bezieht sich auf das Dimere (nach Fredericq und Neurath^[91]). Ordinate: Logarithmus der in g/l gemessenen Sättigungskonzentration. Obere Abszisse: pH-Wert. Untere Abszisse: Ladung Z.

hochaggregierte Produkte ausfallen (Abb. 4). Aus zinkreichen Lösungen nimmt das Hormon bei steigendem pH zunehmend Metall auf (bei pH = 7,2 z.B. 2,2 %), dabei fällt die Löslichkeit im neutralen Bereich (pH = 6

[90] W. L. Koltun, D. F. Waugh u. R. S. Bear, J. Amer. chem. Soc. 76, 413 (1954).

[91] E. Fredericq u. H. Neurath, J. Amer. chem. Soc. 72, 2684 (1950).

[92] P. D. Jeffrey u. J. H. Coates, Nature (London) 197, 1104 (1963); Biochim. biophysica Acta 109, 551 (1965).

bis 8) scharf ab^[93]. Der amorphe Niederschlag bildet bei pH = 5,6 bis 6,0 langsam Kristalle^[94].

Die Zinkbindung des Insulins ist trotz vieler Untersuchungen^[95] noch nicht geklärt. Eine der beiden Imidazolgruppen des Hormons ist sicher beteiligt^[96], die Mitwirkung der Aminogruppen ist nicht ausgeschlossen^[97], die von Carboxylgruppen wurde auf Grund theoretischer Betrachtungen gefordert^[80]. Röntgenaufnahmen an kristallinem Zinkinsulin sind, im Gegensatz zu solchen am Bleiinsulin, mehrdeutig. Vielleicht kann das Zinkion in den Insulinaggregaten verschiedene Positionen einnehmen^[41].

Gelöstes Zinkinsulin hat bei pH > 7 ein Teilchengewicht von 36000^[98] bis 48000^[99], liegt also als Hexamer oder Octamer vor, im Gegensatz zum metallfreien Hormon, das unter diesen Bedingungen je nach Konzentration verschieden stark in die Monomeren zerfällt^[100]. Zinkinsulin dissoziiert erst bei pH > 9^[101], der Vorgang scheint mit einer Konformationsänderung des Monomeren verbunden zu sein^[102]. Gleichzeitig wird das Hormon inaktiviert^[103]. Auch Chemikalien wie Guanidiniumchlorid^[104], Harnstoff^[105], einige Salze^[91], organische Lösungsmittel^[106] und Detergentien^[107] wirken disaggregierend auf Insulin.

Während in sauren Lösungen (pH = 2) bei 20 °C das Dimere überwiegt, kommt es bei 80–100 °C zur Bildung eines thixotropen Gels, dessen Micellen aus fibrillärem Insulin bestehen^[108]. Die Fibrillen haben eine Länge bis zu 20000 Å^[109], einen Durchmesser von etwa 80 Å^[109, 110] und scheinen aus vier Filamenten von 25 bis 30 Å Durchmesser mit einer Periode von 1200 Å zusammengedreht zu sein^[110]. Die Weite von 25 bis 30 Å entspricht etwa dem Durchmesser des Insulin-dimeren.

Erfolgt die Aggregation bei pH = 1, so lagern sich die Fibrillen zu Kugeln (Sphäriten) zusammen^[111], aus denen bei anhaltendem Erwärmen das „Hitzepräzipitat“ entsteht^[112].

[93] K. Hallas-Møller, K. Petersen u. J. Schlichtkrull, Science 116, 394 (1952).

[94] C. Tanford u. J. Epstein, J. Amer. chem. Soc. 76, 2163, 2170 (1954).

[95] Vgl. F. R. N. Gurd u. P. E. Wilcox, Advances Protein Chem. 11, 380 (1956); G. Weitzel, Angew. Chem. 68, 566 (1956).

[96] J. M. Summerell, A. Osmand u. G. H. Smith, Biochem. J. 95, 31 P (1965).

[97] K. Marcker, Acta chem. scand. 14, 2071 (1960).

[98] B. Sjögren u. T. Svedberg, J. Amer. chem. Soc. 53, 2657 (1931).

[99] H. Gutfreund, Biochem. J. 42, 544 (1948).

[100] K. Marcker, Acta chem. scand. 14, 194 (1960).

[101] E. Fredericq, Nature (London) 171, 570 (1953).

[102] J. A. Schellman, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 30, 415 (1958).

[103] P. Foenss-Bech u. M. D. Nielson, Rept. Steno Mem. Hosp. Nord. Insulin Lab. 10, 127 (1961).

[104] D. W. Kupke u. K. Linderstrøm-Lang, Biochim. biophysica Acta 13, 153 (1954).

[105] D. W. Kupke, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 32, 107 (1961).

[106] E. Fredericq, J. Amer. chem. Soc. 79, 599 (1957); D. A. Yphantis u. D. F. Waugh, Biochim. biophysica Acta 26, 218 (1957); H. L. Crespi, R. A. Uphaus u. J. J. Katz, J. physic. Chem. 60, 1190 (1956).

[107] G. L. Miller u. K. J. I. Andersson, J. biol. Chemistry 144, 475 (1942); E. de Vito u. J. A. Santomé, Experientia (Basel) 22, 124 (1966).

[108] D. F. Waugh, Amer. J. Physiol. 133, 484 (1941).

[109] D. F. Waugh, J. Amer. chem. Soc. 66, 663 (1944); J. L. Farrant u. E. H. Mercer, Biochim. biophysica Acta 8, 355 (1952).

[110] T.-h. Kung u. T.-c. Tsao, Scientia sinica 13, 471 (1964).

[111] D. F. Waugh, J. Amer. chem. Soc. 68, 247 (1946).

[112] N. R. Blatherwick, F. Bischoff, L. C. Maxwell, J. Berger u. M. Sahyun, J. biol. Chemistry 72, 57 (1927); V. du Vigneaud, R. H. Siffrid u. R. R. Sealock, ibid. 102, 521 (1933).

Fibrilläres Insulin ist biologisch unwirksam, lässt sich aber durch Alkali bei 0 °C und pH = 11 bis 11,5 [113, 114] oder Lösen in kalter 20-proz. Salzsäure [115], in Phenol- [116] oder Harnstofflösungen [117] weitgehend in kristallisierbares, aktives Hormon umwandeln. Die basischen Fischinsuline sind nicht präzipitierbar [118], wogegen das Bis-Sulfonat der Rinderinsulin-B-Kette glatt Fibrillen bildet [119].

Da die Fibrillen auch aus acetyliertem und verestertem Insulin entstehen [90] und kein Disulfidaustausch erfolgt [120], ist die Molekularassoziation auf nichtpolare Kräfte zurückzuführen [121].

Insulin bildet mit vielen niedrig- und hochmolekularen Substanzen Komplexe und Verbindungen, hier sei nur der wohldefinierte gemischte Komplex aus Insulin, Zink und Protamin [122] genannt.

Beständigkeit

Reines Insulin ist bemerkenswert beständig, es bleibt in steriler Lösung bei pH = 4 und 2 °C jahrelang aktiv. Ein kristallines Präparat war nach zweijähriger Lagerung bei 0 °C unverändert wirksam, bei 20–25 °C war jedoch nach einem Jahr ein Aktivitätsverlust von 20 % eingetreten [124].

Insulin wird in alkalischen Lösungen schnell zerstört, neben der Hydrolyse von Amidbindungen treten Abbaureaktionen am Cystin auf. Verdünnte Säuren spalten das Hormon in mehrere Komponenten [48], die Hydrolyse erfolgt bevorzugt an Asparagin- und Glutaminresten [125]. Im wasserfreien Medium verläuft eine zusätzliche N → O-Peptidylverschiebung an Serin- und Threoninresten [126]. An sauren und basischen Ionen austauschern sollen bevorzugt Bindungen im Carboxylende der B-Kette hydrolysiert werden [127], konzentrierte Harnstofflösungen wirken carbamylierend [117, 128], ohne die Aktivität zu vermindern. Reduzierende Agentien wie Schwefelwasserstoff und Cystein inaktivieren das Hormon rasch.

- [113] V. du Vigneaud, E. M. K. Geiling u. C. A. Eddy, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 33, 497 (1928).
- [114] D. F. Waugh, J. Amer. chem. Soc. 70, 1850 (1948).
- [115] V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry 92, liv (1931).
- [116] J. Lens, J. biol. Chemistry 169, 313 (1947).
- [117] F. Bischoff u. A. K. Bakhtiar, J. Amer. chem. Soc. 78, 1343 (1956).
- [118] T. Honma u. T. Hiraoka, J. pharmac. Soc. Japan (Yaku-gaku-zasshi) 78, 1076 (1958).
- [119] T.-c. Tsao et al., Scientia sinica 12, 83, 213 (1963); 13, 1951 (1964); Acta biochim. biophys. sinica 3, 154, 434 (1963); 5, 193 (1965).
- [120] J. Stauff, H. Barthel, R. Jaenicke, R. Krekel u. E. Uehlein, Kolloid-Z. 178, 128 (1961).
- [121] D. F. Waugh, J. cellular comparat. Physiol. 49, Suppl. 1, 145 (1957); F. Oosawa u. M. Kasai, J. molecular Biol. 4, 10 (1962).
- [122] F. Lindner, Med. u. Chem. 4, 248 (1942).
- [123] A. Baldesten, Acta chem. scand. 20, 270 (1966).
- [124] N. R. Stephenson u. R. G. Romans, J. Pharmacy Pharmacol. 12, 372 (1960).
- [125] J. Schultz, H. Allison u. M. Grice, Biochemistry 1, 694 (1962); G. F. Grannis, Arch. Biochem. Biophysics 91, 255 (1960).
- [126] T. Vajda, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 21, 71 (1959); Chem. and Ind. 1959, 197; J. Lenard u. G. P. Hess, J. biol. Chemistry 239, 3275 (1964).
- [127] J. W. Davies u. G. Harris, Arch. Biochem. Biophysics 74, 229 (1958).
- [128] R. D. Cole, J. biol. Chemistry 236, 2670 (1961); Z.-x. Lu u. F.-y. Tang, Acta biochim. biophys. sinica 2, 234 (1962).

Gegen energiereiche Strahlen ist Insulin recht empfindlich. So führt die Sterilisation mit ^{60}Co - γ -Strahlen infolge Veränderung der polaren und aromatischen Gruppen [129] zu schneller Inaktivierung [130]. Röntgenstrahlen und Deuteronen wirken ähnlich [131]. Ultraviolettes Licht zerstört die Cystingruppen, langsamer die Tyrosinreste [132]. Durch Photooxidation können dagegen die Imidazolreste des Histidins bevorzugt zerstört werden [133]. Der Abbau durch Ultraschall ist unspezifischer [134]. An Grenzflächen kann Insulin monomolekulare Filme bilden [135], wird im Gegensatz zu anderen globulären Proteinen dabei aber nicht denaturiert.

Analytik

Eine gravimetrische Methode zur Bestimmung von Insulin nutzt die Fibrillenbildung aus [17]; physikochemische und chromatographische Analysen [136–138] sind bekannt, eignen sich aber nur für angereichertes Insulin. Für Rohprodukte, Körperflüssigkeiten usw. sind biologische Verfahren vorzuziehen, mit denen sich, besonders immunologisch, Insulinmengen bis herab zu 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erfassen lassen.

Die biologische Aktivität von Insulin wird in Internationalen Einheiten (I.E.) ausgedrückt. Kristallines Rinderinsulin besitzt eine Aktivität von 25 bis 27 I.E./mg. Insuline verschiedener Tierspecies scheinen trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenz die gleiche Aktivität zu haben. Insulin vom Fisch *Lophius piscatorius* hat z. B., gemessen am Rattenfettgewebe, eine Aktivität von 26 bis 27 I.E. [21]. Eine Ausnahme scheint das Meerschweinchen-Insulin zu bilden, das sich vom Rinderinsulin in 17 Aminosäuren unterscheidet und im Meerschweinchentest eine größere Aktivität aufweist als im Mäusetest [74].

Für die Aktivitätsbestimmung von reinem Insulin wird die Maus-Krampf-Methode [139] oder die Kaninchen-Blutzucker-Methode [140] verwendet. In neuerer Zeit wurden mehrere biologische und immunologische Bestimmungsmethoden beschrieben, die sich durch ihre größere Empfindlichkeit auch

- [129] M. P. Draké, J. W. Giffee, D. A. Johnson u. V. L. Koenig, J. Amer. chem. Soc. 79, 1395 (1957); A. M. Desai u. K. S. Korgaonkar, Radiat. Res. 21, 61 (1964).
- [130] K. Nagasawa, G. Nakajima, J. Serizawa, H. Sato u. J. Shirai, Bull. nat. Inst. hyg. Sci. (Eisei Shikenjo Hōkoku) 75, 5 (1957).
- [131] R. S. Yalow, Proc. Natl. Biophys. Conf., Columbus, Ohio 1957, S. 169; Chem. Abstr. 54, 24971g (1960).
- [132] E. H. Kaplan, E. D. Campbell u. A. D. McLaren, Biochim. biophysica Acta 4, 493 (1950); W. Siebert, C. Fiore u. K. Dose, Z. Naturforsch. 20b, 957 (1965); J. I. Dunlop u. C. H. Nicholls, Photochem. Photobiol. 4, 881 (1965); C. Fiore, K. Dose, S. Risi u. W. Siebert, Biophysik 2, 360 (1965).
- [133] G. Weitzel, W. Schaeg, G. Boden u. B. Willms, Liebigs Ann. Chem. 689, 248 (1965); L. Weil, T. S. Seibles u. T. T. Herskovits, Arch. Biochem. Biophysics 111, 308 (1965).
- [134] I. E. El'piner et al., Dokl. Akad. Nauk SSSR 146, 700, 929 (1962); Biofizika 8, 344 (1963); Biokhimiya 28, 501 (1963); 30, 1090 (1965).
- [135] E. Fredericq, Biochim. biophysica Acta 9, 601 (1952).
- [136] J. Bouman u. J. D. H. Homan, Biochim. biophysica Acta 29, 417 (1958).
- [137] A. Rueckert u. J. Schoene, Pharmazie 15, 442 (1960); E. L. Fenton, Biochem. J. 81, 570 (1961); K. W. Taylor, R. E. Humber, J. Steinke u. A. E. Renold, Biochim. biophysica Acta 54, 391 (1961).
- [138] S. Genuth, L. A. Frohman u. H. E. Lebovitz, J. clin. Endocrinol. Metabolism 25, 1043 (1965).
- [139] D. M. Young u. A. H. Lewis, Science 105, 368 (1947).
- [140] F. G. Banting, C. H. Best, J. B. Collip, J. J. R. Macleod u. E. C. Noble, Amer. J. Physiol. 62, 162 (1926).

zur Messung kleinsten Insulinmengen im Plasma eignen. Die heute gebräuchlichste biologische in-vitro-Methode ist die von *Renold* et al. [141], mit der die Stimulierung der Umwandlung von $[1-^{14}\text{C}]$ -Glucose in $^{14}\text{CO}_2$ im epididymalen Rattenfettgewebe gemessen wird. Die gebräuchlichste immunologische Methode ist die von *Yalow* und *Berson* [142]. Eine nützliche Kombination biologischer und immunologischer Methoden wurde von *Froesch* et al. beschrieben [143]; die Präzipitation im Zwei-Antikörper-System [144] verläuft schnell und einfach, scheint aber nicht ganz spezifisch zu sein [145]. Biologische in-vitro-Methoden für Plasma-Insulin ergeben in der Regel höhere Werte als immunologische Methoden, wobei die Frage, ob die biologischen Methoden Insulin und insulinähnliche Faktoren bestimmen oder ob die immunologischen Methoden nur einen Teil des Plasma-Insulins, das sog. unbundene [146] oder „typische“ [147] oder durch Antikörper hemmbare Insulin [143] erfassen, noch nicht geklärt ist. Neuere Ergebnisse über das durch Antikörper nicht hemmbare Insulin [148] sprechen eher dafür, daß es sich bei den insulinähnlichen Aktivitäten um physiologisch unwirksame Substanzen handelt. Der Insulingehalt menschlichen Plasmas dürfte sich in der Größenordnung von 20 $\mu\text{E}/\text{ml}$ (immunologische Methode) bis 100 $\mu\text{E}/\text{ml}$ (biologische Methode an Rattenfettgewebe) bewegen, d.h. in 1 Liter Plasma ist ca. 1 μg Insulin enthalten.

Substitutionsreaktionen

Freudenberg begann 1927, die Einwirkung verschiedener Reagentien auf Insulin und die damit einhergehende Wirksamkeitsänderung systematisch zu verfolgen. Diese Arbeiten wurden in neuerer Zeit besonders von *Fraenkel-Conrat* [149] fortgesetzt. Man hoffte, dabei Einblicke in die Beziehung zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung zu erlangen. Nimmt man an, daß eine funktionelle Gruppe für die Wirkung des Hormons überflüssig ist, wenn eine chemische Veränderung dieser Gruppe keinen Einfluß auf die Wirksamkeit des Insulins hat, so sind die drei Aminogruppen sowie die aliphatischen Hydroxygruppen und der Guanidinrest überflüssig, wogegen Amid-, phenolische Hydroxy-, Imidazol- und Carboxylgruppen notwendig sind [133, 149–151].

- [141] *A. E. Renold, D. B. Martin, Y. M. Dagenais, J. Steinke, R. J. Nickerson u. M. C. Sheps*, *J. clin. Invest.* 39, 1487 (1960).
- [142] *R. S. Yalow u. S. A. Berson*, *J. clin. Invest.* 39, 1157 (1960).
- [143] *E. R. Froesch, H. Bürgi, E. B. Ramseier, P. Bally u. A. Labhart*, *J. clin. Invest.* 42, 1816 (1963).
- [144] *C. R. Morgan u. A. Lazarow*, *Diabetes* 12, 115 (1963); *C. R. Morgan, L. Sørensen u. A. Lazarow*, *ibid.* 13, 1, 579 (1964); *C. N. Hales u. P. J. Randle*, *Biochem. J.* 88, 137 (1963).
- [145] *A. E. Renold, P. M. Beigelman, A. F. Willebrands, J. Groen, D. B. Martin, Y. M. Dagenais, S. A. Berson, R. S. Yalow, M. E. Krahl u. H. N. Antoniades*, in *H. N. Antoniades: Hormones in Human Plasma*. Little, Brown & Co., Boston 1960, p. 49. (Vergleichende Bewertung der Methoden.)
- [146] *H. N. Antoniades*, *Endocrinology* 68, 7 (1961).
- [147] *N. Samaan, R. Fraser u. W. J. Dempster*, *Diabetes* 12, 339 (1963).
- [148] *E. A. Rasio, J. S. Soeldner u. F. G. Cahill, jr.*, *Diabetologia* 1, 125 (1965); *E. R. Froesch, W. A. Müller, H. Bürgi, M. Waldvogel u. A. Labhart*, *Biochim. biophysica Acta* 121, 360 (1966).
- [149] *J. Fraenkel-Conrat u. H. Fraenkel-Conrat*, *Biochim. biophysica Acta* 5, 89 (1950).
- [150] *C. H. Li*, *Nature (London)* 178, 1402 (1956); *R. L. Evans u. H. A. Saroff*, *J. biol. Chemistry* 228, 295 (1957); *W. Anderson, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim.* 30, 104 (1956); *D. S. H. W. Nicol*, *Biochim. biophysica Acta* 34, 257 (1959); *F. Tietze, G. E. Mortimore u. N. R. Lomax*, *ibid.* 59, 336 (1962).
- [151] *L. A. Å. Sluyterman u. J. M. Kwestroo-van-den-Bosch*, *Biochim. biophysica Acta* 38, 102 (1960).

Dabei bleibt unberücksichtigt, daß Substitutionen auch den pK-Wert und die Löslichkeit eines Proteins einschneidend verändern. So verschiebt sich der isoionische Punkt des Insulins mit zunehmender Veresterung von 5,6 nach 13,0. Die Aktivität soll der Löslichkeit parallel gehen [152]. Bei der Sulfatierung wird ein zunehmender Aktivitätsschwund mit steigendem Sulfatgehalt, also fallendem isoionischen Punkt, beobachtet [151]. Daß es grundsätzlich falsch sein kann, aus Substitutionseffekten auf den „Wert“ einer Gruppe zu schließen, zeigen *du Vigneauds* Arbeiten am Oxytocin (Aktivität des Oxytocins: 485 I.E./mg, des Acetyloxytocins: 1,7 I.E./mg, des synthetischen Desaminoxytocins aber 750 I.E./mg!).

Zwei Substitutionsreaktionen am Insulin haben praktische Bedeutung: Jodierung und Sulfatierung. Insulin wird durch den Pyridin-Schweifeltrioxid-Komplex an Amino-, Tyrosin- und Histidinresten sulfatiert [151], ähnlich wirkt Chlorsulfinsäure in Pyridin [153]. Konzentrierte Schwefelsäure verestert bei tiefer Temperatur bevorzugt die aliphatischen, weniger die aromatischen Hydroxygruppen [154]. Schwach veresterte Insuline sind hypoglykämisch wirksam, wenig antigen und werden von schon vorhandenen Antikörpern kaum gebunden [155]; man stellt sie jetzt zur Behandlung insulinresistenter Diabetiker her.

Die Jodierung des Insulins erfolgt an den vier Tyrosinresten jeweils in o-Stellung zur Hydroxygruppe. Dabei können also $3^4 - 1 = 80$ verschiedene Jodinsuline, weitere bei zusätzlicher Reaktion mit den Histidinresten [157], entstehen. Als Jodierungsmittel dienen gewöhnlich J_3 , $\text{J}/\text{Chloramin T}$ und JCl . Bisher sind keine Bedingungen bekannt, die ausschließlich zu Mono- oder Di-jodinsulinen führen (stärker jodierte Insuline sind biologisch unwirksam [158]), obgleich die vier Tyrosinreste unterschiedlich leicht reagieren sollen [87, 159] ($\text{A}_{19} > \text{A}_{14} > \text{B}_{16} > \text{B}_{26}$ [160]). Eine teilweise Fraktionierung des Gemisches von Jodinsulinen gelingt durch Dichtegradientenelektrophorese [156].

^{131}J - und ^{125}J -markierte Insuline [138, 161] sind die wichtigsten Indikatoren für kleine Insulinmengen. Stark strahlende Präparate ($> 10\text{mCi}/\text{mg}$) zerstören sich schnell selbst [142, 162], was durch Verdünnen mit Fremd-

[152] *N. Socoloff*, 3e Colloq. St. Jans Hosp. Brugge 1955, S. 97; *Chem. Abstr.* 51, 13148c (1957).

[153] *H. C. Reitz, R. E. Ferrel, H. S. Olcott u. H. Fraenkel-Conrat*, *J. Amer. chem. Soc.* 68, 1031 (1946).

[154] *H. C. Reitz, R. E. Ferrel, H. Fraenkel-Conrat u. H. S. Olcott*, *J. Amer. chem. Soc.* 68, 1024 (1946); *M. B. Glendening, D. M. Greenberg u. H. Fraenkel-Conrat*, *J. biol. Chemistry* 167, 125 (1947).

[155] *P. J. Moloney, M. A. Aprile u. S. Wilson*, *J. New Drugs* 4, 258 (1964).

[156] *C. R. Harington u. A. Neuberger*, *Biochem. J.* 30, 809 (1936); einen Überblick gibt *K. Brunfeldt* [54].

[157] *J. L. Izzo, W. F. Bale, M. J. Izzo u. A. Roncone*, *J. biol. Chemistry* 239, 3743 (1964).

[158] *L. W. de Zoeten u. R. v. Strik*, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* 80, 927 (1961); *C. J. Garrat*, *Nature (London)* 201, 1324 (1964), *J. L. Izzo, A. Roncone, M. J. Izzo u. W. F. Bale*, *J. biol. Chemistry* 239, 3749 (1964).

[159] *N. D. Lee, Feder*, *Proc.* 18, 271 (1959); *L. W. de Zoeten, O. A. de Bruin u. J. Everse*, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* 80, 907, 917 (1961).

[160] Die Oxidation mit Tyrosinase verläuft möglicherweise in umgekehrter Reihenfolge, *J. G. Cory, C. C. Bigelow u. E. Frieden*, *Biochemistry* 1, 419 (1962).

[161] Präparative Arbeitsanleitungen bei *Izzo* et al. [157] und *K. Brunfeldt u. T. Deckert*, *Acta endocrinol.* 47, 353 (1964).

[162] *E. Samols u. H. S. Williams*, *Nature (London)* 190, 1211 (1961).

eiweiß, z.B. Humanalbumin, vermindert werden kann^[157]. Trotz vielseitiger Anwendung ist nicht bekannt, ob sich jodiertes Insulin im Organismus wirklich wie das native Hormon verhält.

⁸²Br-markiertes Insulin^[163] ist zu kurzlebig, ³⁵S-sulfatiertes Hormon^[164] dürfte interessanter sein. ³⁵S-, ¹⁴C- und ³H-haltige Insuline werden durch Biosynthese mit markierten Aminosäuren erhalten und haben Bedeutung für die Erforschung der Biochemie des Insulins. Die Isolierung ist aufwendig, die spezifische Aktivität ist, ebenso wie die des direkt tritiierten Hormons^[165], gering. Mehrere Autoren acylierten die Aminogruppen des Insulins mit ¹⁴C-markierten Aminosäuren, doch fehlt der Nachweis, daß sich diese Präparate wie natives Hormon verhalten. Es ist sicher zweckmäßiger, Insulin mit markierten Aminosäuren zu synthetisieren^[166].

Enzymatischer Abbau

Das native Hormon ist *in vitro* gegen hydrolysierende Enzyme recht beständig, dabei spielt der Zinkgehalt eine besondere Rolle (z.B. verdaut Leucinaminopeptidase nur metallfreies Insulin^[168]). Trypsin und Chymotrypsin spalten das native Insulin nur langsam^[169]; sobald aber eine Bindung gespalten ist, verläuft die restliche Hydrolyse schnell^[170]. Am stärksten wird Insulin vom Subtilisin angegriffen^[171].

Der vorsichtige Abbau mit Carboxypeptidase^[79] ist insofern interessant, als man bei Entfernung nur der C-terminalen Aminosäure der B-Kette voll aktives Desalanin-Insulin erhält^[172]. Bei weitergehender Verdauung spaltet Carboxypeptidase auch die Amidgruppe im C-terminalen Asparagin A₂₁. Das entstehende Desalanin-desamido-insulin weist etwa zwei Drittel^[173–175] der Aktivität des Insulins auf; wird aber auch der Asparaginsäurerest entfernt, so ist das Produkt (Desalanin-desasparagin-insulin) unwirksam^[175, 176].

Trypsin spaltet nur die B-Kette, langsam zwischen B₂₂ und B₂₃, schnell zwischen B₂₉ und B₃₀^[174]. „Desoctapeptid-insulin“ ist inaktiv^[175, 177].

[163] U. Rosa, G. A. Scassellati u. G. Penisi, Prod. Use Short-lived-Radioisotopes Reactors, Proc. Seminar, Wien 1962, Bd. 2, S. 161; Chem. Abstr. 59, 10463a (1963).

[164] W. C. Stadie, N. Haugaard u. M. Vaughan, J. biol. Chemistry 199, 729 (1952).

[165] C. v. Holt, I. Voelker, L. v. Holt, I. Benedikt, I. Hallmann, H. Lüth, E. Schümann u. H. Wilkens, Biochim. biophysica Acta 38, 88 (1960).

[166] Y. Wang, R.-c. Tsien et al., Scientia sinica, im Druck.

[167] Vgl. z.B. E. O. P. Thompson, Advances org. Chem. 1, 149 (1960).

[168] E. L. Smith, R. L. Hill u. A. Borman, Biochim. biophysica Acta 29, 207 (1958).

[169] J. A. V. Butler, E. C. Dodds, D. M. P. Phillips u. J. M. L. Stephen, Biochem. J. 44, 224 (1949).

[170] A. Ginsburg u. H. K. Schachman, J. biol. Chemistry 235, 108 (1960).

[171] E. S. Haugaard u. N. Haugaard, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 29, 350 (1955); B. Meedom, ibid. 29, 403 (1955).

[172] M. Bodanszky u. J. Fried, Franz. Pat. M. 2800 (1964); Chem. Abstr. 62, 12988b (1965).

[173] L. I. Slobin u. F. H. Carpenter, Biochemistry 2, 22 (1963).

[174] J. I. Harris u. C. H. Li, J. Amer. chem. Soc. 74, 2945 (1952).

[175] D. S. H. W. Nicol, Biochem. J. 75, 395 (1960).

[176] L. I. Slobin u. F. H. Carpenter, Biochemistry 2, 16 (1963).

[177] F. H. Carpenter u. W. H. Baum, J. biol. Chemistry 237, 409 (1962).

Leucinaminopeptidase baut die B-Kette vom hydrophoben Aminoende her schnell ab. Die ersten sechs Aminosäurereste sollen für die hypoglykämische Wirkung des Insulins überflüssig sein^[168].

Die enzymatische Reduktion der Disulfidbrücken ist *in vitro*^[178] bedeutungslos, *in vivo* anscheinend der erste Schritt des Insulinabbaues.

Nichtenzymatische Abbaureaktionen

Die primäre β -Amidgruppe des C-terminalen Asparaginrestes (A₂₁) ist besonders hydrolyseempfindlich^[173]. Daraus wird Insulin schon bei der sauren Extraktion des Pankreas teilweise zum biologisch noch fast voll aktiven Desamidoinsulin abgebaut^[26], dessen Abtrennung durch Gegenstromverteilung^[26] und Ionenaustausch-chromatographie gelingt^[179].

Persäuren spalten im Insulin alle drei Disulfidbindungen, aus einem Cystinrest bilden sich jeweils zwei Cysteinsäurereste. Die sogenannten „oxidierten Ketten“ sind beständige, hypoglykämisch unwirksame Verbindungen, die nicht mehr selektiv zu reduzieren sind, durch Proteasen aber abgebaut werden^[167].

Die Chemie der reduktiven und sulfitalytischen Spaltungen des Insulins ist wesentlich interessanter. Wird das Protein mit Schwefelwasserstoff oder Thioglykolsäure^[180] im sauren Milieu behandelt, so erfolgt die Reduktion nur langsam, im alkalischen Milieu schnell. Die Reduktion mit Mercaptoäthanol ist kaum pH-abhängig. Das Hormon wird inaktiv, sobald eine der drei Cystinbindungen gespalten worden ist^[181]. Alkohole und Schwermetallionen beschleunigen die Reduktion^[182], die ohne Denaturierungsmittel nur unvollständig verläuft^[180]. Zur Spaltung aller drei Disulfidbindungen arbeitet man daher gewöhnlich in 6 bis 8 M Harnstofflösung^[183] oder mit vielhundertfachem Überschuß an Mercaptoäthanol^[184]. Da Thiolgruppen der reduzierten Ketten bereits an der Luft oxidiert werden, maskiert man sie bei präparativen Arbeiten gewöhnlich irreversibel durch Carboxymethylierung (RS-CH₂COOH) mit Jodessigsäure^[21, 184, 185], durch Amidomethylierung (RS-CH₂CONH₂) mit Jodacetamid^[180, 186], durch Aminoäthylierung (RS-CH₂-CH₂-NH₂) mit Aminobromäthan^[123] oder reversibel durch Überführung in die S-Sulfonate (Buntesalze, Thiosulfate RS-SO₃⁻).

[178] S. Black, E. M. Harte, B. Hudson u. L. Wartofsky, J. biol. Chemistry 235, 2910 (1960).

[179] E. O. P. Thompson u. I. J. O'Donnell, Austral. J. biol. Sci. 13, 393 (1960).

[180] H. Lindley, J. Amer. chem. Soc. 77, 4927 (1955).

[181] O. Wintersteiner, J. biol. Chemistry 102, 473 (1933); in Verbindung mit dem Befund, daß das Molekulargewicht je Cystinrest 2000 ist [V. du Vigneaud, ibid. 75, 393 (1927)], hätte man hieraus schon 1933 auf ein minimales Molekulargewicht von 6000 schließen können.

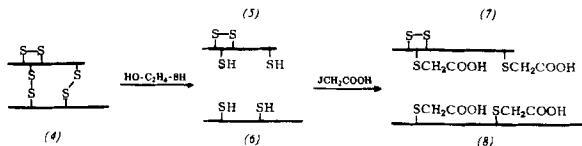
[182] J. Lens u. J. Neutelings, Biochim. biophysica Acta 4, 501 (1950).

[183] Y.-c. Du u. C.-I. Tsou, Acta biochim. biophys. sinica 3, 89 (1963).

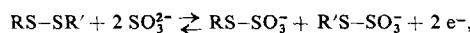
[184] E. O. P. Thompson u. I. J. O'Donnell, Biochim. biophysica Acta 53, 447 (1961).

[185] A. M. Crestfield, S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry 238, 622 (1963).

Nach elektrochemischen Messungen sind die beiden kettenverknüpfenden Disulfidbrücken leichter zu reduzieren als die intrachenare Brücke^[187]; wegen der Disulfidaustauschreaktionen ist es aber schwierig, diesen Effekt zur Darstellung einer 7,20-Dithiol-6,11-disulfid-A-Kette (5) zu nutzen. Wird Insulin jedoch nur kurz mit acht Äquivalenten Mercaptoäthanol behandelt und dann mit Jodessigsäure an den SH-Gruppen blockiert, so kann die Verbindung (7) mit etwa 65 % Ausbeute isoliert werden^[188], d. h. die Disulfidbindung A₆₋₁₁ wird schwerer angegriffen als die beiden anderen S-S-Brücken.



Das bestätigt sich auch bei der oxidativen Sulfitolyse nach



bei der als Oxidationsmittel Luft, Cu²⁺^[189], Luft mit Spuren Cu²⁺, Dijodäthan^[190], o-Jodosobenzoat oder Natriumtetrathionat^[191] dienen können.

Die Reaktion verläuft in Gegenwart von Harnstoff und Guanidin vollständig^[192, 193, 206, 207], führt sonst aber zu einem komplizierten Gemisch, dessen Trennung und Charakterisierung unlängst gelang^[194]. Dabei wurden mehrere Verbindungen isoliert, deren Existenz unter den Reaktionsbedingungen nicht zu erwarten war, z. B. Disulfide der A-Kette des Typs [A(SS)₂]_n mit n = 1, 2, (3, 4). Das interessanteste Produkt, das 7,20-Bis-S-sulfonat mit intaktem 6,11-Disulfidring, entsteht mit bis zu 30 % Ausbeute^[192, 195]. Der Substanz wurde früher, ebenso wie den A-Ketten-Disulfiden, eine geringe Insulinaktivität nachgesagt^[196], doch konnten diese Befunde nicht bestätigt werden^[193, 197]. In diesen Zusammenhang fügt sich die Beobachtung, daß Schwefeldioxid-Vergiftungen im Tierexperiment zur Inaktivierung des Insulins führen^[198]. Die beiden S-Sulfonate sind die präparativ wichtigsten Derivate der Insulinketten. Sie sind einerseits hinrei-

[186] S. Wilson, M. A. Aprile u. L. Sasaki, Canad. J. Biochem., im Druck.

[187] R. Cecil u. P. D. J. Weitzmann, Biochem. J. 93, 1 (1964); G. Markus, J. biol. Chemistry 239, 4163 (1964); P. D. J. Weitzmann, Biochim. biophysica Acta 107, 146 (1965).

[188] H. Zahn u. H. G. Gattner, unveröffentlicht.

[189] J. M. Swan, Nature (London) 180, 643 (1957).

[190] F. Weygand u. K. Eichner, Z. Naturforsch. 18b, 978 (1963).

[191] J. L. Bailey u. R. D. Cole, J. biol. Chemistry 234, 1722 (1959).

[192] R. Cecil u. U. E. Loening, Biochem. J. 66, 18P (1957); 76, 146 (1960).

[193] K. M. Pruitt, J. Cantrell u. B. R. Boshell, Biochim. biophysica Acta 115, 329 (1966).

[194] H. Zahn u. E. Drechsel, unveröffentlicht.

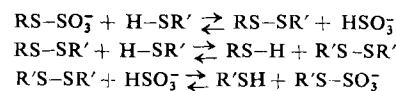
[195] Anderslautende Angaben [J. Meienhofer u. O. Brinkhoff, Nature (London) 199, 1095 (1963)] waren nicht zu reproduzieren, unter den dort genannten Bedingungen entstand die Substanz zu weniger als 5 % [194].

[196] P. Volfin, A.-M. Chambaut, D. Eboué-Bonis, H. Clauser, O. Brinkhoff, H. Bremer, J. Meienhofer u. H. Zahn, Nature (London) 203, 408 (1964).

[197] H. Clauser, A.-M. Chambaut, D. Eboué-Bonis u. P. Volfin, Annales d'Endocrinologie 26, 714 (1965).

[198] A. M. Susarova u. P. T. Tenyakov, Vestnik Chkalov. Oblast. Otdel. Vsesoyuz. Khim. Obschestva im. D. I. Mendeleeva 7, 77 (1957); Chem. Abstr. 54, 199666 (1960).

chend beständig und lassen sich leicht isolieren^[190–192, 199, 207, 209] und sind andererseits durch überschüssiges Thiol leicht in die reaktionsfähigen Thiolketten^[205–207, 210] zu überführen und können auch zur Synthese von Disulfiden nützlich sein:

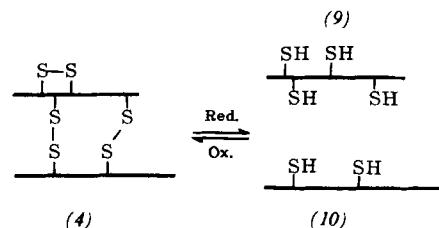


Die Thiosulfatketten spielen eine wichtige Rolle bei synthetischen Arbeiten am Insulin.

Regenerierung und Resynthese

Von zahlreichen Versuchen, aus chemisch verändertem Insulin wieder natives Hormon zu regenerieren, verließen nur wenige erfolgreich. Freudenberg und Dirscherl^[200] erhielten aus acetyliertem Insulin bei der Alkalibehandlung einen Teil der biologischen Wirksamkeit zurück. Insulin, das durch heiße Säuren denaturiert worden war, ließ sich wieder in aktives Hormon überführen^[113–117]. Das Produkt könnte in diesem Fall allerdings Desamidoinsulin gewesen sein, da bei der Präzipitation mit einer Ammoniakabspaltung^[201] zu rechnen ist.

Die oxidative Regenerierung von Insulin aus reduzierten Präparaten ist schwierig und gelang nur bei teilweise reduzierten Produkten^[58, 202]; die Arbeiten blieben auch nicht unwidersprochen^[203]. Gegen die Möglichkeit einer solchen Resynthese spricht, daß die Verknüpfung der Insulinketten bei der Oxidation zu einer unüberschaubaren



Zahl von Produkten führen kann. Werden die SH-Ketten (9), (10) in sehr verdünnten Lösungen oxidiert, so sollten nach dem Ruggli-Ziegler-Prinzip in intramolekularen Reaktionen drei monomere Bis-disulfide der A-Kette (11), (12), (13) und das Disulfid (14) der B-Kette entstehen. Diese Bedingungen sind ideal für den Ringschluß A₆₋₁₁, aber höchst ungünstig für die Kettenverknüpfungen A₇₋₈ und A₂₀₋₂₁, die nur bei höherer Proteinkonzentration erfolgen sollten. Neben dem Insulin (4) sind dann aber elf Isomere (15)–(25) des Hor-

[199] S. J. Leach, J. M. Swan u. L. A. Holt, Biochim. biophysica Acta 78, 196 (1963).

[200] K. Freudenberg u. W. Dirscherl, Naturwissenschaften 15, 832 (1927); Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 175, 1 (1928).

[201] K. Freudenberg, W. Dirscherl u. H. Eyer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 187, 89 (1930).

[202] R. S. Allen u. J. R. Murlin, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 22, 492 (1925); K. Freudenberg u. A. Münch, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 263, 1 (1940).

[203] A. White u. K. G. Stern, J. biol. Chemistry 119, 215 (1937); V. du Vigneaud, A. Fitch, E. Pekarek u. W. W. Lockwood, J. biol. Chemistry 94, 233 (1931).

mons und dazu eine unendliche Zahl von Oligomeren und Polymeren einzelner und beider Ketten zu erwarten. Die Bildungswahrscheinlichkeit für Insulin ist demnach bei der gemeinsamen Oxidation der SH-Ketten gering^[204, 205].

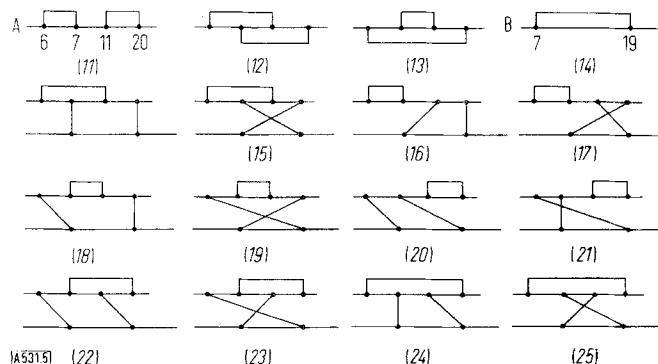


Abb. 5. Schematische Darstellung der A- und B-Ketten des Insulins mit intrachenaren Disulfidbrücken (obere Zeile) und der durch unterschiedliche Bildung der interchenaren Disulfidbrücken möglichen Isomeren des Insulins. Am Anfang der zweiten Zeile ist natives Insulin dargestellt.

Um so überraschender war es, daß Dixon und Wardlaw^[206] sowie Tsou et al.^[207] 1960 Insulin aus vorher vollständig getrennten Polypeptidketten resynthetisieren konnten. Die Ketten wurden als S-Sulfonate getrennt und gereinigt, die inaktiven Ketten dann mit überschüssigem Thiol reduziert und als SH-Ketten (9), (10) gefällt. Die Niederschläge lieferten nach Zusammengabe und Oxidation mit Luft bei pH = 8,5 bis 9,0 Präparate mit 1 bis 2 % Insulingehalt.

Daß die Aktivität der Oxidationsprodukte tatsächlich durch Insulin hervorgerufen wird, zeigte die Reaktion mit Insulin-Antiserum^[206] und die Isolierung von kristallisierbarem Insulin aus den Resyntheseprodukten durch Extraktion mit angesäuertem Butanol^[207].

Durch Variation der Reaktionsbedingungen konnten die Ausbeuten zunächst auf 5 bis 10 %^[205, 208, 209], von Tsou et al.^[210] dann sogar auf 50 % gesteigert werden. Die Autoren nennen in einer neueren Arbeit^[211] allerdings nur noch Ausbeuten von 10 bis 20 % (vgl. [205]); Zahn und Mitarbeiter erhielten bei der Nacharbeitung maximal 25 %.

Bei der Methode von Tsou et al. wird die A-Kette in 50-proz. Überschuß eingesetzt und der ungewöhnliche pH-Wert von 10,6 benutzt. Unter diesen Bedingungen aggregiert Insulin nicht mehr^[101], und die einzelnen B-Ketten aggregieren wahrscheinlich auch nicht. Bei der Trennung von Insulinresyn-

[204] W. Kauzmann in: *Sulfur in Proteins*, Proc. Symposium, Falmouth, Mass. 1958. Academic Press, New York 1959, S. 93.
 [205] K. M. Pruitt, B. S. Robison u. J. H. Gibbs, *Biopolymers* 4, 351 (1966).

[206] G. H. Dixon u. A. C. Wardlaw, *Nature (London)* 188, 721 (1960).

[207] Y.-c. Du, Y.-s. Zhang, Z.-x. Lu u. C.-l. Tsou, *Scientia sinica* 10, 84 (1961).

[208] C.-l. Tsou, Y.-c. Du u. G.-j. Xu, *Scientia sinica* 10, 332 (1961).

[209] S. Wilson, G. H. Dixon u. A. C. Wardlaw, *Biochim. biophysica Acta* 62, 483 (1962).

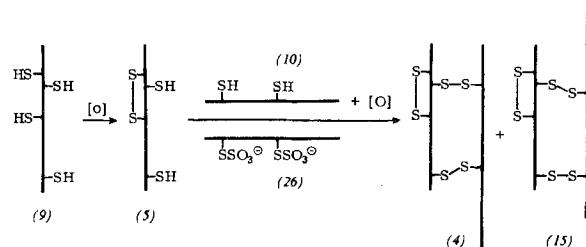
[210] Y.-c. Du, R.-q. Jiang u. C.-l. Tsou, *Scientia sinica* 14, 229 (1965).

[211] C.-i. Niu, Y.-t. Kung, W.-t. Huang, L.-t. Ke, C.-c. Chen, Y.-c. Chen, Y.-c. Du, R.-q. Jiang, C.-l. Tsou, S.-c. Hu, S.-q. Chu u. K.-z. Wang, *Scientia sinica* 15, 231 (1966).

these-Gemischen durch Gelfiltration, Elektrophorese oder Gegenstromverteilung^[212] wurde als Hauptprodukt eine Substanz der Aminosäurezusammensetzung $[AB_2]_n$, daneben $[AB]_n$ (Insulin) und $[A]_n$, aber wenig $[B]_n$ isoliert. $[AB_2]_n$ kann wohl auf zwei Wegen entstehen: durch Reaktion der A-Kette mit der Poly-B-Kette und durch die unlängst nachgewiesene^[194] Reaktion der Thiol-B-Kette mit Insulin.

Die gemeinsame Oxidation der Ketten führt also nicht unbedingt zu einem statistischen Gemisch. Zahn et al.^[213, 214] kamen ebenfalls zu Insulinausbeuten von maximal 50 %, wenn sie die A-Kette in der Thiolform (9) zunächst allein so lange voroxidierten, bis 50 % der SH-Gruppen in Disulfidgruppen übergeführt waren, dann mit der äquivalenten Menge Thiol-B-Kette (10) versetzten und vollständig oxidierten (pH = 8,9).

Unter diesen Umständen wird möglicherweise zunächst der stabilere^[187, 192] Disulfidring A₆₋₁₁ (5) geschlossen. Bei der anschließenden Kombination mit der B-Kette sollte dann außer natürlichem Insulin fast nur noch das Isomere mit antiparalleler Kettenanordnung (15) entstehen. Die Insulinausbeute ließ sich weiter (auf maximal 70 %) steigern^[214, 215], als die B-Kette in Form ihres S-Sulfonats (26) mit voroxidiertem A-Kette (5) umgesetzt wurde; dabei wird die Bildung von $[B]_n$ und $[AB_2]_n$ wohl ausgeschlossen.



Insulinresynthesen unter Verwendung anderer Oxidationsmittel als Luft, z.B. Dijodäthan und Dimethylsulfoxid^[216], oder der Systeme Glutathiondisulfid/Triphosphopyridinnucleotid^[216] und Glutathiondisulfid/Glutathion-Insulin-Transhydrogenase^[217], lieferten maximal 11 % Insulin.

Die Resynthese von Insulin aus natürlichen Ketten diente auch zur Darstellung von immunochemisch interessanten „Hybridinsulinen“, bei denen A- und B-Kette jeweils von verschiedenen Species stammen^[209, 218].

Synthese

Die allgemeinen Fortschritte der Peptidchemie ermutigten mehrere Arbeitskreise, nach Bekanntwerden der Formel mit der Synthese von Peptidsequenzen aus dem Insulin zu beginnen. Das Haupthindernis für eine Totalsynthese des Hormons schien die Verknüpfung der Ket-

[212] H. Zahn, O. Brinkhoff, E. Drechsel u. H. Klostermeyer, unveröffentlicht.

[213] B. Gutte, Diplomarbeit, Technische Hochschule Aachen, 1964; H. Zahn, B. Gutte, E. F. Pfeiffer u. J. Ammon, *Liebigs Ann. Chem.* 691, 225 (1966).

[214] DBP-Anmeldung vom 6. Febr. 1965, Farbenfabriken Bayer A.G., Erf.: H. Zahn u. B. Gutte.

[215] H. Zahn u. B. Gutte durch H. Zahn, Verhandlungsber. Deutsch. Ges. innere Med. 1966, im Druck.

[216] O. Brinkhoff, Dissertation, Technische Hochschule Aachen, 1964.

[217] H. M. Katzen, F. Tietze u. D. Stetten, Jr., *J. biol. Chemistry* 238, 1006 (1963).

[218] G. H. Dixon, *Excerpta Medica Int. Congr. Ser.* No. 83, 1207 (1964); S. Wilson, *ibid.* 84, D 85 (1965).

ten zu sein. Sobald sich dieses Problem, wenn auch nur mit geringer Ausbeute, als lösbar erwies [206, 207], war der Weg für eine Synthese des Insulins vorgezeichnet: Es sollte möglich sein, die beiden Polypeptidketten in Anlehnung an *du Vigneauds* Arbeiten [219] unter Verwendung von S-benzylierten Cysteinresten und permanenter Maskierung funktioneller Gruppen in den Seitenketten getrennt aufzubauen, dann mit Natrium in flüssigem Ammoniak alle Schutzgruppen zu entfernen und die so erhaltenen SH-Ketten oxidativ zu verknüpfen. Das wäre

Der Syntheseplan war richtig. Ende 1963 gelang *Zahn* und Mitarbeitern [10] und etwa zur gleichen Zeit auch *Katsoyannis* et al. in Zusammenarbeit mit *Dixon* [11] die Darstellung von Schafinsulin. Arbeitskreise in China unter den Professoren *Niu*, *Wang*, *Hsing*, *Tsou* und *Tsao* synthetisierten 1965 das Rinderinsulin [220]; es unterscheidet sich vom Schafinsulin durch die Aminosäure (Gly → Ser) in Position A₉ (Abb. 1). Dieses Hormon wurde auch mit einem ¹⁴C-markierten Glycinrest in der Position A₁ synthetisiert [166].

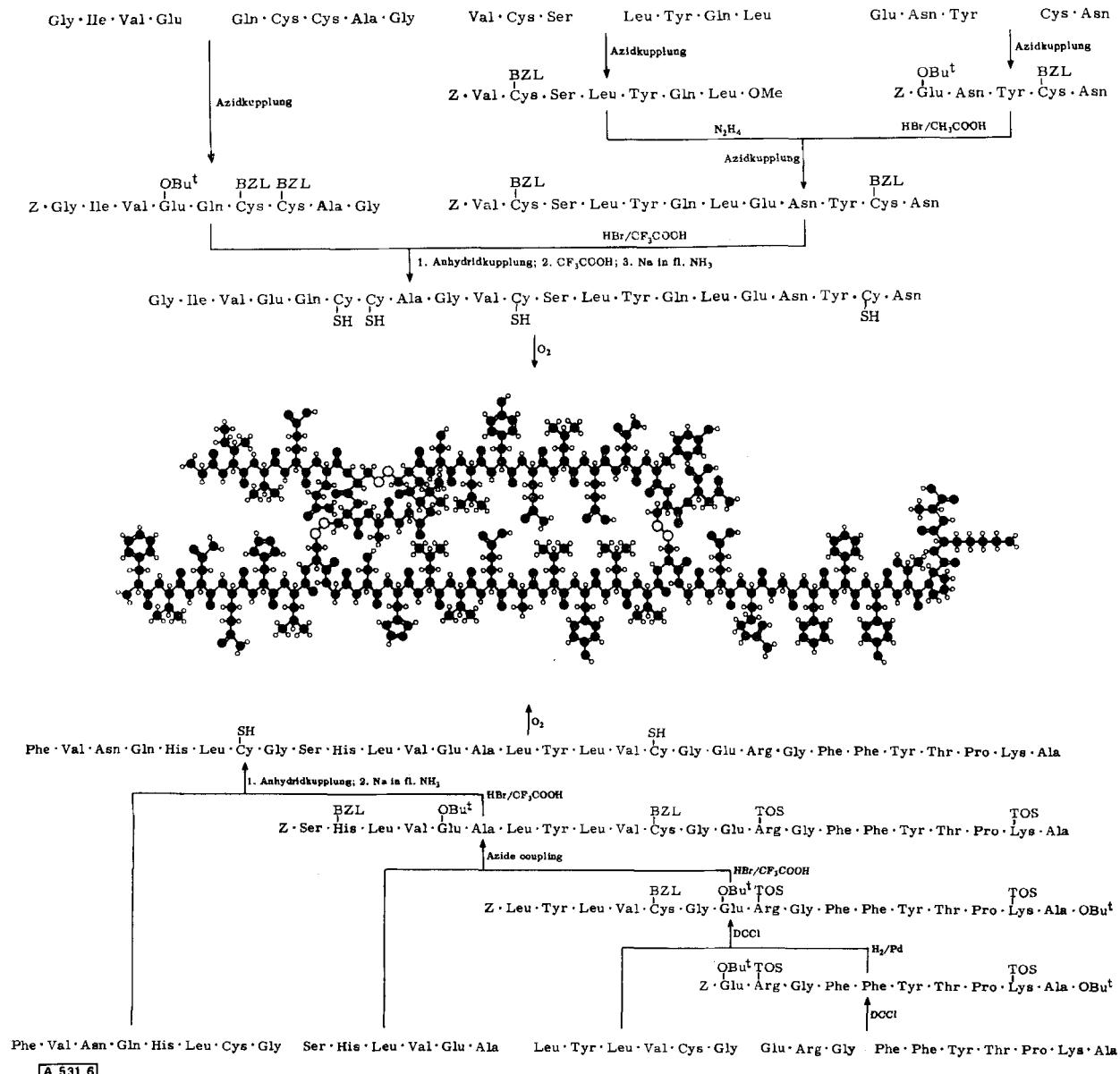


Abb. 6. Projektionsformel des Schafinsulins (Mitte) und Synthesegang nach *Zahn* et al. [10]. Die Kettenfragmente wurden durch stufenweise Verlängerung um jeweils einen Aminosäurerest aufgebaut.

Abkürzungen: BZL = Benzyl, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid, OBut^t = tert.-Butylester, OMe = Methylester, TOS = p-Tolulsulfonyl, Z = Benzyloxycarbonyl.

zwar keine strukturbeweisende Totalsynthese im klassischen Sinne – dazu müßte auch die Knüpfung der drei Disulfidbrücken einzeln und in übersichtlichen Reaktionen erfolgen –, aber es wäre der einfachste Weg zum synthetischen Insulin.

[219] *V. du Vigneaud*: Les Prix Nobel en 1955. Kungl. Boktr. P. A. Norstedt und Söner, Stockholm 1956.

Das Humaninsulin (Abb. 1) unterscheidet sich vom Rinderinsulin durch Threonin statt Alanin in den Positionen A₉ und B₃₀ und durch Isoleucin statt Valin in Position A₁₀. Während

[220] *Y.-t. Kung, Y.-c. Du, W.-t. Huang, C.-c. Chen, L.-t. Ke, S.-c. Hu, R.-q. Jiang, S.-q. Chu, C.-i Niu, J.-z. Hsu, W.-c. Chang, L.-l. Cheng, H.-s. Li, Y. Wang, T.-p. Loh, A.-h. Chi, C.-h. Li, P.-t. Shi, Y.-h. Yie, K.-l. Tang u. C.-y. Hsing*, Scientia sinica 14, 1710 (1965); 15, 544 (1966); *Kexue Tongbao* 17, 241 (1966).

die Synthese der Ketten [221–223] und der vom Schafinsulin abweichenden Peptidsequenzen [224, 225] normal verläuft, führte die Abspaltung der S-Benzylschutzgruppen aus der B-Kette des Humaninsulins bisher stets zur Zerstörung des C-terminalen Threoninrestes [222, 223]. Wie die Aminosäureanalyse zeigt, scheint dies auch bei dem 1966 als „synthetisches Humaninsulin“ beschriebenen Präparat [221] der Fall zu sein. Für die Hormonwirkung ist der B_{30} -Rest allerdings überflüssig [175].

Die bisher veröffentlichten Insulinsynthesen unterscheiden sich nur in methodischen Details, eine Darstellung der Aachener Synthese zeigt Abbildung 6. Für die Synthese der A-Kette waren 89, für die der B-Kette 132 Reaktionsschritte notwendig, für die Kettenvereinigung nochmal 3. Alle Reaktionsfolgen wurden so gewählt, daß Veränderungen an den 48 Asymmetriezentren praktisch ausgeschlossen waren [226].

Die Vereinigung der Ketten gelang verblüffend einfach: ein stöchiometrisches Gemisch der geschützten Polypeptidketten wurde in flüssigem Ammoniak gelöst, mit Natrium behandelt, nach Verdampfen des Lösungsmittels in Pufferlösung (pH = 9,0) gelöst, gegen nicht entlüftetes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Der Insulingehalt des Rückstandes wurde mit verschiedenen Methoden zu 0,2 bis 1,0 % (0,05 bis 0,25 I.E./mg) bestimmt; seine Aktivität ließ sich mit Insulinantisera völlig neutralisieren [227]. Die Ausbeute der Kettenvereinigung lag in der Größenordnung, die mit der damals üblichen Technik – keine Zwischenreinigung der Ketten – auch bei der Rekombination natürlicher Ketten erzielt wurde.

Verknüpfungen synthetischer Ketten mit den nativen Gegenketten zu „halbsynthetischen Insulinen“ zeigten, daß die synthetische A-Kette [11, 228] mehr Insulin liefert als die synthetische B-Kette [11, 229]. Seit 1961 [208] bekannt wurde, daß auch natürliche Insulinketten nach der Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak weniger Insulin als unbehandelte Ketten bilden, weiß man, daß besonders die B-Kette bei der Abspaltung der letzten Schutzgruppen sehr schnell – bevorzugt zwischen den Positionen 27 und 28 (–Thr–Pro–) – abgebaut wird [230]. Aus diesem Grunde brachten Wiederholungen und Versuche zur Verbesserung [222, 231, 232] der Aachener Synthese keine Ausbeuteerhöhung, sondern bewiesen lediglich deren Reproduzierbarkeit.

Es ist möglich, die synthetischen Ketten nach der Entfernung der Schutzgruppen auf dem Umweg über die S-Sulfonate von Spaltprodukten und anderen Verunreinigungen zu befreien [211]. Das so gereinigte Material muß den aus natürlichem Insulin gewonnenen Buntosalzketten äquivalent sein

[221] P. G. Katsoyannis, A. M. Tometsko, J. Z. Ginos u. M. A. Tilak, *J. Amer. chem. Soc.* 88, 164 (1966); P. G. Katsoyannis, A. Tometsko u. C. Zalut, *ibid.* 88, 166 (1966).

[222] H. Zahn, Konf. Spez. Probleme Proteinstrukt., Oestrich, Okt. 1965, Ges. f. Physiol. Chemie, Referate S. 6; *Excerpta Medica int. Congr. Ser.* 112, 336 (1965).

[223] R. B. Merrifield u. A. Marglin, 1965, unveröffentlicht.

[224] H. Arold u. M. Hartmann, *J. prakt. Chem.* 21, 59 (1963).

[225] J. Meienhofer, *Liebigs Ann. Chem.* 692, 231 (1966).

[226] H. Zahn, J. Meienhofer u. E. Schnabel, *Acta chim. Acad. Sci. hung.* 44, 109 (1965).

[227] H. Zahn, O. Brinkhoff, J. Meienhofer, E. F. Pfeiffer, H. Ditschuneit u. Ch. Gloxhuber, *Z. Naturforsch.* 20b, 666 (1965).

[228] H. Zahn, H. Bremer u. R. Zabel, *Z. Naturforsch.* 20b, 653 (1965).

[229] J. Meienhofer u. E. Schnabel, *Z. Naturforsch.* 20b, 661 (1965).

[230] W. F. Benisek u. R. D. Cole, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 20, 655 (1965).

[231] E. Schnabel, unveröffentlicht.

[232] H. Zahn, W. Danho u. B. Gute, *Z. Naturforsch.*, im Druck.

Tabelle 1. Biologische Aktivitäten synthetischer Insulinpräparate.

Produkt	Aktivität [I.E./mg]	Autoren
Schafinsulin	0,05 – 0,25 [a]	1963 Zahn et al. [10]
Schafinsulin	0,005 – 0,017 [b]	1964 Dixon [11]
Rinderinsulin	0,30 – 0,60 [b, c]	1965 Niu, Wang, Hsing et al. [220]
Humaninsulin	ca. 0,48 [b]	1966 Katsoyannis et al. [221]

[a] Ohne Korrektur für Wasser- und Salzgehalt.

[b] Ketten vor der Vereinigung über S-Sulfonate gereinigt.

[c] Aus diesem Material wurde das Insulin in kristalliner Form (> 20 I.E./mg) isoliert.

und sollte bei der Vereinigung Präparate mit mindestens 0,25 I.E./mg Insulin liefern (Tabelle 1). Die Isolierung reinen, kristallinen Insulins aus synthetischem Material [220, 222, 232] ist einfacher, wenn die Insulinketten vor der Vereinigung gereinigt werden, die Gesamtausbeute ist dann aber geringer.

Die Ausbeuten (bezogen auf die C-terminalen Aminosäuren) betrugen bei einer Aachener Synthese für die geschützte A-Kette 2,9 %, für die geschützte B-Kette 7,0 %, für den Insulingehalt des Endproduktes 0,25 bis 0,55 %. Bei den chinesischen und amerikanischen Arbeiten dürften die Ausbeuten ähnlich sein. Eine wirtschaftliche Synthese des Insulins dürfte auf diesem Wege unmöglich sein.

Hier kann die von R. B. Merrifield entwickelte Peptidsynthese an festen Trägern [233] einen Ausweg bieten. Mit der neuen Methode wurden in wenigen Wochen die A- und B-Ketten des Human-, Rinder- und Schafinsulins [221, 234] aufgebaut. Die Ausbeuten an gereinigter, geschützter B-Kette betrugen z.B. 45 bis 60 %. Da bei den neuen Arbeiten zunächst auch mit S-benzyliertem Cystein gearbeitet wurde, also eine Entfernung der Schutzgruppen mit Natrium nötig war, lag die Aktivität des so gewonnenen Insulins nur in der gewohnten Größenordnung.

In den nächsten Jahren dürfte die von Zervas et al. [235] begonnene Entwicklung selektiv abspaltbarer Schwefelschutzgruppen so große Fortschritte machen, daß die Deblockierung geschützter Peptidketten unter milden Bedingungen möglich wird.

Biosynthese

Insulin wird in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln synthetisiert und gespeichert. Die Inseln sind über den ganzen Pankreas zerstreut und machen zusammen nur ca. 1 % der Pankreasmasse aus. Untersuchungen über die Biosynthese des Insulins in Säugetierpankreas mit markierten Aminosäuren sind daher schwierig. Biosynthetisch mit ^3H oder ^{14}C markiertes Insulin konnte bisher aus Rinder-, Kälber- und Rattenpankreas [236–241]

[233] R. B. Merrifield, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 2149 (1963); 86, 304 (1964); *Biochemistry* 3, 1385 (1964); *J. org. Chemistry* 29, 3100 (1964); R. B. Merrifield u. J. M. Stewart, *Nature (London)* 207, 522 (1965).

[234] H. Zahn, T. Okuda u. Y. Shimonishi, unveröffentlicht.

[235] L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos u. D. Borovas, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 4922 (1965).

[236] C. W. Pettinga u. C. N. Rice, *Federat. Proc.* 11, 268 (1952).

[237] A. Light u. W. V. Simpson, *Biochim. biophysica Acta* 20, 251 (1956).

[238] M. Vaughan u. C. B. Anfinsen, *J. biol. Chemistry* 211, 367 (1954).

[239] G. H. Smith, K. W. Taylor u. D. G. Parry, *Nature (London)* 203, 1144 (1964).

isoliert werden. Einfacher sind Untersuchungen am isolierten Inselgewebe einiger Fischarten, deren exokriner Pankreas vom endokrinen räumlich getrennt ist. Der Stoffwechsel von isoliertem Inselgewebe konnte erstmals an Fischgewebe untersucht werden [242, 243]. Wegen der Abwesenheit exokrinen Gewebes gelang es auch, nach Inkubation mit markierten Aminosäuren Insulin hoher spezifischer Aktivität zu isolieren [244, 245].

Die Insulinbiosynthese scheint dem allgemeinen Muster der Proteinbiosynthese zu folgen. So wurde gezeigt [246], daß Insulin im endoplasmatischen Retikulum (an den Ribosomen) synthetisiert wird. Puromycin, ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese, hemmt auch die Insulinbiosynthese [247, 248]. Befunde an pulsmarkiertem Insulin aus Fischinseln [248] lassen darauf schließen, daß die Synthese der Insulin-B-Kette am amino-terminalen Ende beginnt, in Übereinstimmung mit Resultaten an anderen Proteinen wie Haemoglobin, Lysozym oder Ribonuclease.

Ein spezielles Problem der Insulinbiosynthese ist die Verknüpfung der beiden Ketten durch Disulfidbrücken. Prinzipiell gibt es dafür zwei Möglichkeiten: entweder wird eine einkettige Insulinvorstufe gebildet, die alle Aminosäurereste des Moleküls enthält, eventuell zusätzlich die eines hypothetischen Zwischenstückes. In dieser Vorstufe könnten die Disulfidbrücken wie bei der Ribonuclease oder beim Lysozym als intrachenare Brücken gebildet werden, worauf eine hydrolytische Spaltung an einer oder mehreren Stellen zum zweikettigen Insulinmolekül führen würde. So verläuft die Synthese des Chymotrypsins, bei der zunächst das einkettige Chymotrypsinogen entsteht, das dann in die drei Ketten des Chymotrypsins gespalten wird. Die zweite Möglichkeit der Insulinbiosynthese ist die separate Synthese der beiden Ketten mit nachträglicher Bildung der richtigen interchenaren Disulfidbrücken.

Wang und Carpenter [249] haben in Fraktionen von Pankreasextrakten eine einkettige Insulinvorstufe gesucht, jedoch nicht gefunden. Givol et al. [250] inkubierten Insulin mit einem mikrosomalen Enzym aus Leber, das den Austausch von Sulfhydryl- und Disulfidgruppen in Ribonuclease katalysiert. Dieses Enzym vermochte Insulin zu inaktivieren, woraus Givol et al. schlossen, daß die korrekten Disulfidbindungen im Insulinmolekül thermodynamisch nicht begünstigt sind, und daß daher in vivo eine Synthese von Insulin aus den beiden Ketten

[240] A. Mallory, G. H. Smith u. K. W. Taylor, Biochem. J. 91, 484 (1964).

[241] I. Voelker, E. Schümann u. C. v. Holt, Biochem. Z. 335, 384 (1962).

[242] A. Lazarow, Recent Progr. Hormone Res. 19, 489 (1963).

[243] R. E. Humbel u. A. E. Renold, Biochim. biophysica Acta 74, 84 (1963).

[244] G. E. Bauer u. A. Lazarow, Biol. Bull. 121, 425 (1961).

[245] R. E. Humbel, Biochim. biophysica Acta 74, 96 (1963).

[246] A. Lazarow, G. E. Bauer u. A. W. Lindall in: The Structure and Metabolism of Pancreatic Islets. Pergamon Press, Oxford 1964, S. 203.

[247] K. W. Taylor u. D. G. Parry, Biochem. J. 89, 94 P (1963).

[248] R. E. Humbel, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 953 (1965).

[249] S.-S. Wang u. F. H. Carpenter, J. biol. Chemistry 240, 1619 (1965).

[250] D. Givol, F. De Lorenzo, R. F. Goldberger u. C. B. Anfinsen, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 676 (1965).

unwahrscheinlich ist. Die hohen Ausbeuten bei der Rekombination von isolierten A- und B-Ketten in vitro (s. oben) lassen jedoch heute den Zusammenschluß getrennt synthetisierter Insulinketten in vivo als möglich erscheinen. Die getrennte Biosynthese der A- und B-Ketten konnte an doppelmarkiertem Insulin aus Fischinseln nachgewiesen werden [248], so daß eine einkettige Insulinvorstufe mit größter Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Wenn sich die Ergebnisse von Humbel [248] bestätigen lassen, so stellt sich weiter die Frage, ob der Zusammenschluß der beiden Insulinketten in vivo spontan erfolgt, oder ob der Vorgang durch ein Enzym („Insulin-Zipase“ [246]) katalysiert wird. Aus Leber wurde eine Glutathion-Insulin-Transhydrogenase isoliert [252], welche Insulin durch Reduktion der Disulfidbrücken in die Ketten A und B zerlegen kann [253, 254]. Auch der umgekehrte Vorgang, die Synthese von Insulin aus den beiden reduzierten Ketten, konnte mit dem Enzym katalysiert werden; das Ausmaß der Resynthese war allerdings bescheiden [217]. Kotoulas, Morrison und Recant [255] wiesen Glutathion-Insulin-Transhydrogenase-Aktivität in isolierten Inseln aus Rattenpankreas nach, und Varandani und Tomizawa [256] isolierten das Enzym aus Rinderpankreas. Ein Enzym, das Insulin reduktiv zu spalten vermag, scheint demnach nicht nur in der Leber, sondern auch im Pankreas vorhanden zu sein; ob dessen Funktion die Katalyse der Kombination der einzeln synthetisierten Insulinketten oder die Spaltung von Insulin ist, ist bis jetzt nicht bekannt.

Über die Regulation der Insulinbiosynthese ist wenig bekannt. Smith, Taylor und Parry [239] stellten eine geringfügige Stimulierung der Insulinsynthese im Rinderpankreas durch Glucose fest, während Glucose in Fischinseln keinen Einfluß hat [243, 244]. Aus dem Einbau von Leucin in Insulin in Fischinseln in vitro [242, 245] läßt sich berechnen, daß zur Synthese der normalerweise im Pankreas vorhandenen Insulinmenge etwa 12 Tage benötigt werden. Der menschliche Pankreas enthält ca. 250 I.E. Insulin (10 mg), das ist das Fünf- bis Zehnfache des täglich gebrauchten Insulins.

Sekretion

Nach der Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum wird Insulin in den Sekretionsgranula gespeichert, welche selektiv mit fluorescein-markierten Insulin-Antikörpern sichtbar gemacht werden können [257]. Durch Zentrifugieren in einem Dichtegradienten wurden β -Granula von Fischinseln isoliert [258]. Etwa 10 % des

[251] E. Samols, J. Tyler, G. Marri u. V. Marks, Lancet 1965 II, 1257; D. S. Turner u. N. McIntyre, ibid. 1966 I, 351.

[252] H. H. Tomizawa u. Y. D. Halsey, J. biol. Chemistry 234, 307 (1959).

[253] H. H. Tomizawa, J. biol. Chemistry 237, 428 (1962).

[254] H. M. Katzen u. D. Stetten, Jr., Diabetes 11, 271 (1962).

[255] O. B. Kotoulas, G. R. Morrison u. L. Recant, Biochim. biophysica Acta 97, 350 (1965).

[256] P. T. Varandani u. H. H. Tomizawa, Biochim. biophysica Acta 113, 498 (1966).

[257] P. E. Lacy, Amer. J. Med. 31, 851 (1961).

[258] A. W. Lindall, Jr., G. E. Bauer, P. K. Dixit u. A. Lazarow, J. Cell Biol. 19, 317 (1963).

Granula-Proteins sind Insulin [258]. Möglicherweise wird Insulin also in Form eines Komplexes mit anderen Proteinen gespeichert. Lindner [122] hat als erster einen solchen Komplex von Insulin mit einem niedermolekularen basischen Protein, das Nativinsulin, beschrieben. Antoniades et al. [259] postulierten einen ähnlichen Komplex, da pankreatisches Insulin bei pH = 6,6 an einen Kationenaustauscher gebunden wird, während der isoelektrische Punkt von kristallinem Insulin 5,3 ist. Auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeiten von kristallinem und pankreatischem Insulin befürworten Meade et al. [260] ebenfalls eine besondere Form des pankreatischen Insulins, obwohl sie die Befunde von Antoniades et al. [259] nicht bestätigen konnten.

Die Inselzellen enthalten viel Zink [261, 262], das möglicherweise für die Insulinspeicherung von Bedeutung ist. Neuere Untersuchungen über das Verhalten von Zink, β -Granula und extrahierbarem Insulin nach Glucose-Infusion [263] lassen die dem Zink zugeschriebene Rolle bei der Insulinsekretion [262] als fraglich erscheinen.

Der Insulin-Transport vom Syntheseort an den Ribosomen zu den Granula und der eigentliche Sekretionsvorgang, die Verschmelzung der Granulamembran mit der Zellmembran unter gleichzeitiger Freigabe von Insulin in die Blutkapillaren, wurde elektronenmikroskopisch untersucht [264] und scheint dem Sekretionsprozeß im besser studierten exokrinen Pankreas [265] ähnlich zu sein.

Die Insulinsekretion wird hauptsächlich durch die Blutzpiegel von Glucose und Insulin reguliert [266]. Neuere Arbeiten am Pankreasgewebe in vitro zeigen eine direkte Abhängigkeit der Sekretion von der Glucosekonzentration [267, 268]. Eine gleichzeitige Hemmung der Insulinsynthese durch Dinitrophenol hat keinen Einfluß auf die Sekretion [269]. Zugabe von Insulin zum Pankreaspräparat hemmt die Sekretion [270]. Auf Grund von Versuchen mit Hemmstoffen des Glucose-Abbaus [271, 272] wird vermutet, daß nicht Glucose selbst,

[259] H. N. Antoniades, A. E. Renold, Y. M. Dagenais u. J. Steinke, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103, 677 (1960).

[260] R. C. Meade, R. A. Stiglitz u. T. J. Kleist, Diabetes 14, 387 (1965).

[261] G. Weitzel, F.-J. Strecker, U. Roester, A.-M. Fretzendorff u. E. Buddecke, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 295, 83 (1953).

[262] H. Maske, K. Munk, J. D. H. Homann, J. Bouman u. R. Matthijsen, Z. Naturforsch. 11b, 407 (1956).

[263] J. Logothetopoulos, M. Kaneko, G. A. Wrenshall u. C. H. Best: The Structure and Metabolism of Pancreatic Islets. Pergamon Press, Oxford 1964, S. 333.

[264] J. R. Williamson, P. E. Lacy u. J. W. Grisham, Diabetes 10, 460 (1961).

[265] G. E. Palade, P. Siekevitz u. L. G. Caro, Ciba Found. Symp. on The Exocrine Pancreas, London 1962. J. & A. Churchill Ltd., London 1962, S. 23.

[266] P. P. Foa, Ciba Found. Coll. on Endocrinology, Bd. 9, J. & A. Churchill Ltd., London 1956, S. 55.

[267] G. M. Grodsky, A. A. Batts, L. L. Bennett, C. Vcella, N. B. McWilliams u. D. S. Smith, Amer. J. Physiol. 205, 638 (1963).

[268] H. G. Coore u. P. J. Randle, Biochem. J. 93, 66 (1964).

[269] G. M. Grodsky u. L. L. Bennett, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 114, 769 (1963).

[270] H. Frerichs, U. Reich u. W. Creutzfeldt, Klin. Wschr. 43, 136 (1965).

[271] H. G. Coore, P. J. Randle, E. Simon, P. F. Kraicer u. M. C. Shelesnyak, Nature (London) 197, 1264 (1963).

[272] C. Kilo, C. L. Long, Jr., R. M. Bailey, M. B. Koch u. L. Recant, J. clin. Invest. 41, 1372 (1962).

sondern ein Abbauprodukt der Glucose für die Stimulation der Sekretion verantwortlich ist. Nach vorläufigen Resultaten führt die intestinale Zuckerresorption zur Erhöhung des Glukagonspiegels, der seinerseits die Insulinsekretion fördert [251].

Wirkungsweise

Insulin ist im intakten Organismus ein anaboles Hormon, d.h. es fördert den Aufbau von Glykogen, Fett und Protein. Eine elegante Methode, um alle Insulinmangelsymptome hervorzurufen, ist die Injektion von Meerschweinchen-Anti-Rinder-Insulin-Serum [273] in Ratten oder Mäuse. Neben einem Anstieg des Blutzuckers findet man auch alle anderen Symptome eines akuten Diabetes wie Erhöhung der Plasma-Fettsäure-Konzentration, Ausscheidung von Glucose und Ketonkörpern im Urin, negative Stickstoffbilanz und zunehmende Blutacidose [274].

Die Insulinwirkung wurde in vitro vor allem am isolierten Muskel und am Fettgewebe untersucht. Insulinwirkungen im zellfreien System wurden beschrieben, doch ist offenbar nur der Effekt auf die Mitochondrienschwellung reproduzierbar [275], und dieser scheint eine allgemeine Eigenschaft von Disulfiden zu sein.

Es gibt einige Theorien, welche die Vielzahl der Insulinwirkungen auf einen primären Effekt zurückführen. Die bekannteste ist die Permeabilitätstheorie von Levine und Goldstein [276], die sich immer noch halten kann, wenn auch nicht in ihrer ursprünglichen Form [277]. Levine und Goldstein postulierten, daß die primäre Wirkung des Insulins die Förderung des Glucoseeintritts in die Zelle sei. Die vermehrte Glykogen- und Fettsynthese, die vermehrte Glucoseoxidation, der verminderte Protein- und Fettabbau und die Verhinderung der Ketonkörperbildung können so zwangsläufig erklärt werden. Zahllose in vivo und in vitro gewonnene Resultate stützen diese Theorie (vgl. [277]).

In neuerer Zeit mehren sich jedoch Beobachtungen von Insulinwirkungen, für deren Erklärung ein erhöhter Glucosetransport nicht mehr ausreicht. So fördert Insulin auch den Transport einiger Aminosäuren [278, 279] und von K^+ [280], und zwar auch in Abwesenheit von Glucose. Insulin hemmt auch die Abgabe freier Fettsäuren und von Glycerin aus Fettgewebe, ebenfalls in Abwesenheit von Glucose [281, 282]. Rodbell [283] zeigte darüber-

[273] P. J. Moloney u. M. Coval, Biochem. J. 59, 179 (1955).

[274] P. H. Wright in B. S. Leibel u. G. A. Wrenshall: On the Nature and Treatment of Diabetes. Excerpta Medica Found., Amsterdam 1965, S. 354.

[275] A. L. Lehninger u. D. Neubert, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1929 (1961).

[276] R. Levine u. M. S. Goldstein, Recent Progr. Hormone Res. 11, 343 (1958).

[277] R. Levine in B. S. Leibel u. G. A. Wrenshall: On the Nature and Treatment of Diabetes. Excerpta Medica Found., Amsterdam 1965, S. 250; Israel J. Med. Sci. 1, 1249 (1965).

[278] D. M. Kipnis u. M. W. Noall, Biochim. biophysica Acta 28, 226 (1958).

[279] K. L. Manchester u. M. E. Krahl, Nature (London) 183, 1399 (1959).

[280] K. L. Zierler, Amer. J. Physiol. 198, 1066 (1960).

[281] R. L. Jungas u. E. G. Ball, Biochemistry 2, 383 (1963).

hinaus an isolierten Fettzellen, daß alle Insulinwirkungen auf Fettgewebe durch Phospholipase C imitiert werden können. Er postulierte, daß Insulin seine Wirkung auf die Plasmamembran durch eine Veränderung der Membran-Lipide hervorruft. Damit würde sich die ursprüngliche Glucose-Permeabilitätstheorie zu einer allgemeinen Membran-Permeabilitätstheorie ausweiten, doch bleiben einige Insulinwirkungen auch mit dieser erweiterten Theorie nicht erkläbar. Dazu gehört die Stimulierung der Proteinsynthese^[284], die von der Beeinflussung des Aminosäuretransports scharf abgegrenzt ist^[279], die Stimulierung der RNS-Synthese^[285, 286], die Stimulierung der Glykogen-Synthetase^[287] und die Induktion oder Repression einiger Enzyme^[288, 289].

Um das unitarische Konzept der Wirkungsweise des Insulins zu erhalten, schlugen *Krahl*^[290] und *Hechter*^[291] vor, daß sich die bei einer primären Reaktion des Hormons mit der Zellmembran auftretende Veränderung ins Zellinnere fortpflanzen könnte. Die Versuche von *Cadenas* et al.^[292] und von *Carlin* und *Hechter*^[293] ließen einen Disulfid-Sulphydryl-Austausch zwischen Insulin und der Zellmembran vermuten. Ähnliches wurde früher für die Wirkung des Adiuretins postuliert^[294], doch mußte diese Theorie fallen gelassen werden^[295], nachdem gezeigt werden konnte, daß Adiuretin-Analoga ohne Disulfidbrücke ebenfalls, wenn auch schwächer, wirksam sind.

Neuerdings werden Hormone häufig als allosterische Effektoren aufgefaßt, die den Ausdruck einer genetischen Information entweder verhindern oder induzieren können^[296]. Diese Theorie ist so allgemein und flexibel, daß sie schlecht widerlegt werden kann. Ein gewichtiger Einwand im Falle des Insulins dürfte sein, daß auch bei starker Hemmung der RNS-Synthese die Insulin-Effekte auf Transportvorgänge durch Membranen unverändert bleiben^[297].

[282] *E. R. Froesch, H. Bürgi, P. Bally u. A. Labhart*, Mol. Pharm. 1, 280 (1965).

[283] *M. Rodbell*, J. biol. Chemistry 241, 130 (1966).

[284] *J. G. Wool u. M. E. Krahl*, Amer. J. Physiol. 196, 961 (1959).

[285] *J. G. Wool u. A. J. Munro*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 918 (1963).

[286] *J. G. Wool u. A. N. Moyer*, Biochim. biophysica Acta 91, 248 (1964).

[287] *J. Larner, M. Rosell-Perez, D. L. Friedman u. J. W. Craig*: Ciba Found. Coll., Control of Glycogen Metabolism. J. & A. Churchill Ltd., London 1964, S. 273.

[288] *G. Weber, R. L. Singhal u. S. K. Srivasta*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 96 (1965).

[289] *A. Sols* in *B. S. Leibel u. G. A. Wrenshall*: On the Nature and Treatment of Diabetes. Excerpta Medica Found., Amsterdam 1965, S. 118.

[290] *M. E. Krahl*, Perspectives Biol. Med. 1, 69 (1960).

[291] *O. Hechter u. G. Lester*, Recent Progr. Hormone Res. 16, 139 (1960).

[292] *E. Cadenas, H. Kaji, C. R. Park u. H. Rasmussen*, J. biol. Chemistry 236, PC 63 (1961).

[293] *H. Carlin u. O. Hechter*, J. biol. Chemistry 237, PC 1371 (1962).

[294] *J. L. Schwartz, H. Rasmussen, M. A. Schoessler, L. Silver u. C. T. O. Fong*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 1288 (1960).

[295] *J. L. Schwartz, H. Rasmussen u. J. Rudinger*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1044 (1964).

[296] *P. Karlson*, Perspect. Biol. Med. 6, 203 (1963).

[297] *J. G. Wool* in *P. Karlson*: Mechanisms of Hormone Action. Thieme, Stuttgart 1965, S. 98.

Wir sind von einer befriedigenden Erklärung der Wirkungsweise des Insulins noch weit entfernt. Ein vielversprechender Weg zur Klärung dieser Frage scheint die Erforschung des aktiven Zentrums des Insulins zu sein. Wenn erst einmal die Wirkgruppe am Insulinmolekül bekannt ist, wird man gezielter nach einem entsprechenden Rezeptor in der Zellmembran suchen können.

Biologische Inaktivierung

Insulin gelangt von der Pankreasvene zuerst in die Leber, wo durch Abbau ungefähr die Hälfte aus der Zirkulation entfernt wird^[298, 299]. Die Halbwertszeit von Insulin beträgt beim Menschen ca. 30 Minuten^[300]. Die beiden Hauptabbauorte sind Leber und Niere. Die von *Mirsky* beschriebene Insulinase^[301] ist wahrscheinlich identisch mit der Insulin-Glutathion-Transhydrogenase^[217, 252-254, 256, 302], welche die reduktive Spaltung der interchenaren Disulfidbrücken des Insulins katalysiert, worauf die Ketten zu kleineren Bruchstücken hydrolysiert werden^[303, 304]. Das Enzym hat keine absolute Substratspezifität, Vasopressin und Oxytocin werden auch, wenngleich langsamer, abgebaut^[217].

Ensinck et al.^[305] schlossen aus Untersuchungen an ¹³¹I-Insulin, das mit teilweise gereinigter Glutathion-Insulin-Transhydrogenase inkubiert wurde, daß die reduzierte Insulin-B-Kette an Albumin gebunden im Plasma zirkuliert und die Wirkung von Insulin am Muskel kompetitiv hemmt^[306]. Diese Resultate konnten bis jetzt nicht bestätigt werden (vgl. ^[307]), ebenso diejenigen *Langdons*, der über eine Hemmung der Glutathion-Insulin-Transhydrogenase durch die reduzierte B-Kette berichtet^[308]. Daß die teilweise reduzierte A-Kette^[196, 215, 309] oder die reduzierte B-Kette^[308] eine biologische Restaktivität aufweisen, ist unwahrscheinlich^[193, 197].

Außer der Leber scheinen auch Pankreas^[255, 256, 310, 311], Muskelgewebe^[312] und Fettgewebe^[312, 313] die Fähigkeit zu haben, Insulin reduktiv^[255, 256] oder proteolytisch^[310-313] zu spalten.

[298] *G. E. Mortimore u. F. Tietze*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 82, 329 (1959).

[299] *E. Samols u. J. A. Ryder*, J. clin. Invest. 40, 2092 (1961).

[300] *S. A. Berson, R. S. Yalow, A. Bauman, M. A. Rothschild u. K. Newerly*, J. clin. Invest. 35, 170 (1956).

[301] *I. A. Mirsky*, Rec. Progr. Hormone Res. 13, 429 (1957).

[302] *H. T. Narahara u. R. H. Williams*, J. biol. Chemistry 234, 71 (1959).

[303] *H. N. Tomizawa, M. L. Nutley, H. T. Narahara u. R. H. Williams*, J. biol. Chemistry 214, 285 (1955).

[304] *S. A. Berson, R. S. Yalow u. B. W. Volk*, J. Lab. Clin. Med. 49, 331 (1957).

[305] *J. W. Ensinck, G. J. Coombs, R. H. Williams u. J. Vallance-Owen*, J. biol. Chemistry 239, 3377 (1964).

[306] *J. W. Ensinck, R. J. Mahler u. J. Vallance-Owen*, Biochem. J. 94, 150 (1965).

[307] *S. A. Berson u. R. S. Yalow*, Diabetes 14, 549 (1965).

[308] *R. G. Langdon*, J. biol. Chemistry 235, PC 15 (1960).

[309] *R. B. Fisher u. P. Zachariah*, Biochem. J. 76, 155 (1960).

[310] *U. J. Lewis u. E. H. Thiele*, J. Amer. chem. Soc. 79, 755 (1957).

[311] *R. Schucher*, Canad. J. Biochem. 43, 1143 (1965).

[312] *E. U. Piazza, C. J. Goodner u. N. Freinkel*, Diabetes 8, 459 (1959).

[313] *D. Rudman, L. A. Garcia, M. Di Girolamo u. P. W. Shank*, Endocrinology 78, 169 (1966).

Der Nachweis von insulin-neutralisierenden Antikörpern im Serum eines mit Insulin behandelten Schizophrenie-Patienten durch *Banting et al.*^[314] hat die antigene Natur des Insulins sichergestellt. *Moloney und Coval*^[315] bewiesen, daß Meerschweinchen neutralisierende Antikörper gegen Schweine-, Rinder-, Schaf-, Maus- und Kanincheninsulin bilden. ^{131}J -Insulin in Normalserum verhält sich elektrophoretisch wie Albumin, während ^{131}J -Insulin im Serum von mit Insulin behandelten Diabetikern an die γ -Globuline gebunden wird^[300]. Insulin ist ein schwaches Antigen, aber die Existenz spezifischer Insulin-Antikörper ist heute durch diese und andere Untersuchungen (vgl. [316]) sichergestellt.

Insulin-bindende und insulin-neutralisierende Antikörper zeigen keine ausgeprägte Species-Spezifität. So reagieren Antikörper gegen Rinder- und Schweineinsulin nicht nur mit Rinder- oder Schweineinsulin, sondern auch mit Maus-^[315], Wal-, Hunde-, Kaninchen-^[317], Schaf-, Pferde-, Affen-^[318] und Humaninsulin^[300, 319]. Quantitative Unterschiede sind allerdings vorhanden^[320], und zwar um so stärker, je größer die Unterschiede in den Primärstrukturen der Insuline sind. So ist die Reaktion von Kabeljauinsulin^[321] oder Bonitofisch-Insulin^[317] mit Antirinder-Insulin-Serum schwächer als die von Rinderinsulin.

Wenn Meerschweinchen Rinderinsulin injiziert wird, so lassen sich nach einiger Zeit Antikörper im Serum nachweisen, aber die Meerschweinchen werden dabei nicht diabetisch. Ihr Serum neutralisiert hingegen Maus-Insulin, und Mäuse werden diabetisch, wenn ihnen solches Meerschweinchenserum injiziert wird^[274, 315, 316, 318]. Allgemein scheinen Insulin-Antikörper mit zirkulierendem Insulin des Versuchstieres, das die Antikörper produziert, nicht zu reagieren^[322]. *Moloney*^[318] postulierte daher eine besondere Form des endogenen Insulins, das von extrahiertem Insulin (aus Pankreas oder Serum), wie es zur Immunisierung verwendet wird, verschieden sein soll. Die Ergebnisse von *Renold et al.*^[323] scheinen diese Ansicht zu unterstützen. Es gelang diesen Autoren, nach Injektion von Rinderinsulin Antikörper gegen extrahiertes Rinderinsulin in Rindern nachzuweisen. Andere^[324, 325] berichteten über Antikörper im Schwein gegen extrahiertes Schweineinsulin.

[314] F. G. Banting, W. R. Franks u. S. Gairns, Amer. J. Psychiat. 95, 562 (1938).

[315] P. J. Moloney u. M. Coval, Biochem. J. 59, 179 (1955).

[316] P. H. Wright, Brit. med. Bull. 16, 219 (1960).

[317] M. Kitagawa, K. Onoue, Y. Okamura, M. Anai u. Y. Yamamura, J. Biochem. (Japan) 48, 483 (1960).

[318] P. J. Moloney: Ciba Found. Coll. on Endocrinology, Bd. 14. J. & A. Churchill Ltd., London 1962, S. 169.

[319] G. M. Grodsky u. P. H. Forsham, J. clin. Invest. 40, 779 (1961).

[320] S. A. Berson u. R. S. Yalow, J. clin. Invest. 38, 2017 (1959).

[321] P. J. Moloney u. M. A. Aprile, Canad. J. Biochem. 38, 1216 (1960).

[322] E. R. Arquilla: Ciba Found. Coll. on Endocrinology, Bd. 14. J. & A. Churchill Ltd., London 1962, S. 146.

[323] A. E. Renold, J. S. Soeldner u. J. Steinke, Ciba Found. Coll. on Endocrinology, Bd. 15. J. & A. Churchill Ltd., London 1964, S. 122.

[324] D. H. Lockwood u. T. E. Prout, Metabolism 14, 530 (1965).

[325] K. Brunfeldt u. T. Deckert, Acta endocrinol. 47, 367 (1964).

Berson und Yalow^[326] beobachteten Antiseren, die zwischen Spermwal- und Schweineinsulin unterscheiden können, obwohl die Aminosäuresequenz dieser beiden Insuline identisch sein soll. *Berson und Yalow* schlossen daraus, daß die Tertiärstruktur von Proteinen trotz gleicher Aminosäuresequenz verschieden sein kann. Bis ein absoluter Beweis für die Reinheit und für die identische Aminosäuresequenz der beiden Insuline vorliegt, sollten diese Resultate allerdings mit Vorsicht bewertet werden.

Die an der Antikörperbindung beteiligten Gruppen im Insulinmolekül sind wahrscheinlich weder die N-terminalen Aminosäuren^[327] noch die C-terminale Sequenz B₂₃₋₃₀^[328]. *Arquilla*^[327] hat die Möglichkeit diskutiert, daß sich ^{131}J -Insulin von nicht jodiertem Insulin immunologisch unterscheidet, da im ^{131}J -Insulin vor allem die Tyrosinreste der A-Kette jodiert sind^[329], die für die Antigenwirkung eine wichtige Rolle spielen dürften. Durch Hybridisierung der Ketten von Rinder- und Kabeljauinsulin zeigten *Wilson, Dixon* und *Wardlaw*^[209], daß die immunologische Spezifität von Insulin vor allem durch die A-Kette bedingt wird. Rinder-A-Kabeljau-B-Insulin verhielt sich gegenüber Anti-Rinderinsulin immunologisch ähnlich wie Rinderinsulin, während sich Kabeljau-A-Rinder-B-Insulin wie Kabeljauinsulin verhielt. *Yagi, Maier* und *Pressman*^[330] stellten Antikörper gegen Buntosalz(-S-SO₃⁻)-A- und -B-Ketten her. Antikörper gegen derartige A-Ketten reagierten nur mit A-Ketten, während Antikörper gegen solche B-Ketten mit B-Ketten und mit Insulin reagierten. Antikörper gegen Insulin reagierten mit Insulin, schwach mit der B-Kette und gar nicht mit der A-Kette. Daraus wurde geschlossen, daß im Insulin mehrere (drei?) antigene Regionen vorhanden sind. Diese Folgerung konnte kürzlich durch Untersuchungen^[327] an Insulin-Antikörpern von reinen Meerschweinchen-Stämmen, durch Kreuzversuche mit zahlreichen Insulinen und deren Antiseren, sowie mit S-amidomethylierten Insulinketten und deren enzymatischen Hydrolysaten bestätigt werden^[186]. Überraschend ist der Befund, daß bereits ein relativ kleines synthetisches Cystinpeptid aus der Insulin-B-Kette als komplettes Antigen reagiert^[331].

Insulinbindende Antikörper treten häufig im Serum von Diabetikern auf, die mit großen Dosen von Insulin behandelt wurden, doch besteht keine strenge Korrelation zwischen Insulinbindungskapazität und Insulinbedarf. Die Antikörper im Serum von Diabetikern scheinen vor allem – zum Vorteil derselben – die auf artfremdes Insulin angewiesen sind – den Abbau von Insulin zu verzögern^[332].

Den Herren Prof. Dr. A. E. Renold und Prof. Dr. H. Zahn danken wir für die Überlassung unveröffentlichter Manuskripte und, ebenso wie den Herren Dr. E. R. Froesch und Dr. H.-H. Schöne, für die Durchsicht von Teilen des Manuskripts. Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen e.V. (Nr. 822) und des Schweizerischen Nationalfonds (Nr. 3292 und 3900) durchgeführt.

Eingegangen am 26. Mai 1966 [A 531]

[326] S. A. Berson u. R. S. Yalow, Nature (London) 191, 1392 (1961).

[327] E. R. Arquilla, Diabetologia 3, 1 (1966).

[328] R. S. Yalow u. S. A. Berson, Amer. J. Med. 31, 882 (1961).

[329] J. Th. S. de V. van Doesburgh u. E. Havinga, Biochim. biophysica Acta 82, 96 (1964).

[330] Y. Yagi, P. Maier u. D. Pressman, Science 147, 617 (1965).

[331] S. Wilson et al., unveröffentlicht.

[332] S. A. Berson u. R. S. Yalow, Diabetes 6, 402 (1957).