

# ANGEWANDTE CHEMIE

84. Jahrgang 1972

Heft 23

Seite 1117–1156

## Untersuchungen zur Wirkungsweise der Hormone (Nobel-Vortrag)<sup>[\*\*]</sup>

Von Earl W. Sutherland<sup>[\*]</sup>

Zu Beginn meiner Untersuchungen über die Wirkungsweise der Hormone vor 25 Jahren war bei den Biologen die Meinung weit verbreitet, Hormonwirkungen könnten auf sinnvolle Art nur an intakten Zellstrukturen studiert werden. Als ich dann aber über die Geschichte der Biochemie nachdachte, erschien mir eine Wirkung der Hormone auf molekularer Ebene durchaus möglich. erinnert man sich beispielsweise an die Aufklärung der Biosynthese des Harnstoffs, so erkennt man zunächst einen Zeitraum, in dem die Untersuchung nur am ganzen Lebewesen möglich war. Später ließ sich die Harnstoffbildung in perfundierten Lebern beobachten, dann in Leberschnitten und schließlich sogar in zellfreien Extrakten. In gleicher Weise vermutete ich, daß eine systematische Analyse der Wirkungsweise der Hormone ebenfalls mit Experimenten an intakten Tieren beginnen und zu Untersuchungen an isolierten Geweben und schließlich an löslichen Systemen übergehen könnte. Das waren meine Gedanken, als ich mit der Erforschung von Adrenalin und Glucagon begann. Zu dieser Zeit betrachteten wir das Glucagon als den hyperglykämisch-glykogenolytischen Faktor (HGF) des Pankreas, wobei wir nicht bemerkten, daß *Burger* und seine Mitarbeiter dieses Hormon bereits viele Jahre früher in Deutschland studiert hatten.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor *Carl Cori* meine große Dankbarkeit bekunden. Als ich nach meinem ärztlichen Dienst im Zweiten Weltkrieg nach St. Louis

zurückkehrte, war ich mir noch nicht im klaren, ob ich mit der medizinischen Praxis beginnen oder in die Forschung gehen sollte. *Cori* überzeugte mich, weniger durch Worte als durch sein Beispiel, daß die Forschung der richtige Weg für mich war. Obwohl ich gelegentlich das Bedürfnis hatte, häufiger mit Patienten zusammenzukommen, habe ich den Entschluß, im Laboratorium zu bleiben, niemals wirklich bereut.

Die geistige Atmosphäre in *Coris* Laboratorium trug natürlich viel zu dieser Entscheidung bei. Ich glaube, daß eine stimulierende Umgebung mit der nötigen „Kritischen Masse“ junger und talentierter Forscher und der Möglichkeit zum freien Austausch von Ideen eine wesentliche Voraussetzung für den wissenschaftlichen Erfolg ist. Ein solcher Geist herrschte damals an der Washington University, genauso wie er heute an der Vanderbilt University zu finden ist. Er war aber schon immer selten, und ich bedauere sehr, daß er zumindest in den Vereinigten Staaten infolge der ständig abnehmenden staatlichen Unterstützung der Grundlagenforschung noch seltener zu werden droht.

Kehren wir nun zu Adrenalin und Glucagon zurück. Aus mehreren Gründen waren Untersuchungen über die glykogenolytische Wirkung dieser Hormone reizvoll. Ihre Effekte auf den Glykogenabbau und die Glucoseproduktion in der Leber waren rasch, stark und reproduzierbar. Man konnte Leberschnitte benutzen; von einem einzigen Tier ließen sich viele Schnitte erhalten. Außerdem waren die grundlegenden biochemischen Vorgänge beim Glykogenabbau unter der Wirkung von Phosphorylase, Phosphoglucomutase und Glucose-6-phosphatase durch die klassischen Arbeiten der *Coris* und anderer bereits bewiesen worden<sup>[1]</sup>.

[\*] Dr. E. W. Sutherland, Professor of Physiology  
Vanderbilt University  
Nashville, Tennessee 37232 (USA)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1972. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

Es war jedoch bekannt, daß auch andere Enzyme im Glykogenmetabolismus eine Rolle spielen: in diesem Stadium wurde sogar die Hydrolyse von Glykogen in Erwägung gezogen. Ein anderer grundlegender Punkt, welcher der Klärung bedurfte, war die Frage, ob die Glucoseabgabe nicht möglicherweise der Glykogenolyse vorausgeht. Es erschien nämlich denkbar, daß vorgebildete Glucose unter dem Einfluß von Hormonen aus der Zelle herausgepumpt wird und daß nicht die Freisetzung das Ergebnis der durch Glykogenolyse angestiegenen Glucoseproduktion ist. Messungen der Glucose-Konzentrationen überzeugten uns davon, daß die vermehrte Glucoseabgabe die Folge eines intrazellulären Konzentrationsanstieges durch Neubildung war und nicht vom aktiven Transport bereits vorhandener Glucose aus dem Zellinneren her-rührte<sup>[2]</sup>.

Messungen radioaktiv markierter Zwischenprodukte, die während der Inkubation von Leberschnitten von Kaninchen in Gegenwart anorganischen Phosphats gebildet worden waren, führten uns zum Schluß, daß wahrscheinlich die Phosphorylase und nicht die Phosphoglucomutase oder die Glucose-6-phosphatase bei der Umwandlung von Glykogen in Glucose geschwindigkeitsbestimmend ist und daß die Hormone die Aktivität dieses Enzyms steigern<sup>[3]</sup>. Die Abnahme von Glykogen war nicht nur mit einer Zunahme von Glucose, sondern auch mit erhöhten Konzentrationen an Glucose-1-phosphat und Glucose-6-phosphat verbunden.

Ein wichtiges, die Analyse in diesem Stadium erschweres Problem war die allgemein anerkannte Theorie, daß die Phosphorylase *in vivo* sowohl die Synthese als auch den Abbau von Glykogen katalysiert. Da bekannt war, daß die Hormone den Abbau des Glykogens immer stärker als dessen Synthese anregen, wurde ein zusätzlicher Faktor selbst dann noch vermutet, als die Aktivierung der Phosphorylase als Antwort auf den Zusatz von Hormonen nachgewiesen worden war (Abb. 1).

Einer der Faktoren, die *in vivo* die Synthese von Glykogen durch die Phosphorylase verhindern, ist das im Inneren der Zelle normalerweise vorherrschende hohe Verhältnis von anorganischem Phosphat zu Hexosephosphat. Die Glykogen-Synthetase<sup>[5]</sup> war damals noch nicht bekannt; heute aber wissen wir, daß infolge derselben

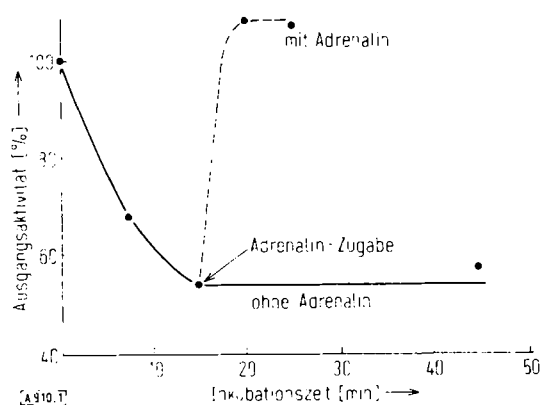


Abb. 1. Einfluß von Adrenalin auf die Phosphorylase-Aktivität in Leberschnitten vom Hund. Nachdem die Schnitte bei 37°C die angegebene Zeit in einem Glycylglycin-Phosphatpuffer (pH = 7.4) inkubiert worden waren, wurden sie homogenisiert und auf ihre Phosphorylase-Aktivität untersucht. Nach [4].

Grundreaktion ihre Aktivität abnimmt, während die der Phosphorylase ansteigt<sup>[6, 7]</sup>.

Um welche Reaktion handelt es sich aber? Obwohl die Phosphorylase unter dem Einfluß von Adrenalin oder Glucagon in intakten Zellen leicht aktiviert werden konnte (Abb. 1), ging nach Zerstörung der Zellstruktur scheinbar jede Antwort auf die Hormone verloren. Es war deshalb keineswegs klar, daß ein besseres Verständnis der Phosphorylase-Aktivierung direkt zu einer genaueren Vorstellung über die Wirkungsweise von Hormonen verhelfen würde. Trotzdem hielten wir dieses System für den besten Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems. Nachdem es *Wosilait* und mir gelungen war, aktive Phosphorylase aus Extrakten von Hundelebern zu reinigen, fanden wir ein Enzym, das die Phosphorylase inaktiviert. Da sich ihr Molekulargewicht während dieser Inaktivierung nicht zu ändern schien, vermuteten wir, daß nur eine kleine Änderung im Molekül für den Aktivitätsverlust verantwortlich ist; dabei war der Verlust einer Phosphatgruppe nur eine von vielen Möglichkeiten. Wäre die Bestimmung der Aktivität ebenso einfach gewesen wie bei manchen anderen Enzymen, so hätten wir wahrscheinlich bis zur Entdeckung, daß die Inaktivierung der Phosphorylase tatsächlich von einem Verlust an anorganischem Phosphat begleitet wird, viel mehr Experimente durchgeführt (Abb. 2). Auf jeden Fall war gezeigt, daß es sich bei unserem inaktivierenden Enzym um eine Phosphatase handelt.

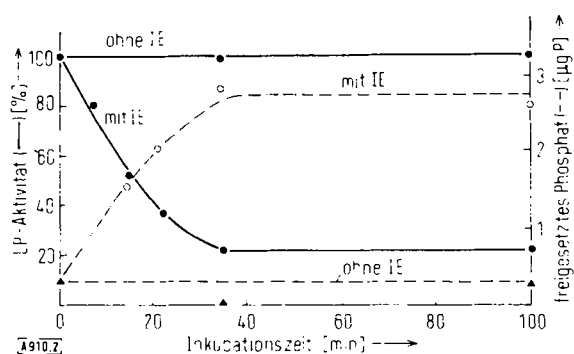


Abb. 2. Einfluß des „Inaktivierenden Enzyms“ (IE) auf die Aktivität der Leber-Phosphorylase (LP; ausgezogene Linien) und auf die Freisetzung von anorganischem Phosphat (gestrichelte Linien). Das Phosphat wurde im Überstand der Trichloressigsäure-Fällung bestimmt. Nach [8].

Etwa zu dieser Zeit schloß sich mir *Ted Rall* an, und es begann eine lange und fruchtbare Periode der Zusammenarbeit. Die Inaktivierungsexperimente hatten die Vorstellung geweckt, die Aktivierung der Phosphorylase könnte mit einer Phosphorylierung des Enzymmoleküls verbunden sein. Diese Annahme konnten wir leicht bestätigen, indem wir Leberschnitte in Gegenwart eines <sup>32</sup>P enthaltenden Phosphatpuffers inkubierten und zeigten, daß das Phosphat rasch in die Phosphorylase eingebaut wird. Die Hormone fördern diesen Vorgang ungefähr in gleichem Maße wie sie das Enzym aktivieren<sup>[4]</sup>. Auf diese Weise wurde klar, daß die Menge der aktiven Phosphorylase in der Leber ein Gleichgewicht zwischen der Inaktivierung durch eine Phosphatase und der Reaktivierung durch einen Prozeß widerspiegelt, bei dem Phosphat an das Protein gebunden wird. Inzwischen hatten *Krebs* und *Fischer*<sup>[9]</sup> die Aktivierung der Phosphorylase in Extrakten von Kanin-

chenmuskeln studiert und bewiesen, daß ATP und  $Mg^{2+}$  für diesen Vorgang erforderlich sind.

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse begannen wir, unseren Leber-Extrakten in Gegenwart von ATP und  $Mg^{2+}$  Hormone zuzusetzen. Eine Zeitlang erzielten wir jedoch keine weiteren Fortschritte, da wir unseren Homogenaten zusammen mit gereinigter, inaktiver Phosphorylase auch Fluorid zufügten. Dieser Zusatz erschien uns sinnvoll, weil wir wußten, daß Fluorid die Phosphatase inhibiert, und wir wollten dieses Enzym soweit wie möglich ausschalten, um die eventuell gebildete aktive Phosphorylase vor der sofortigen Inaktivierung zu bewahren. Wir wissen heute, daß Fluorid einen anderen wichtigen Effekt in Gewebhomogenaten hervorruft – die Stimulierung der Adenylat-Cyclase – und so die Wirkung von Hormonen maskiert. Glücklicherweise inkubierten wir häufig auch Homogenate ohne Fluorid, und in diesen Ansätzen konnten wir allmählich deutliche Wirkungen von Adrenalin und Glucagon beobachten<sup>[10]</sup>. Unsere früheren Entdeckungen – die Aktivierung der Phosphorylase in Gewebeschnitten und die Art der damit verbundenen chemischen Modifizierung – waren zwar wichtige Meilensteine auf unserem experimentellen Weg, aber sie waren bei weitem nicht so aufregend wie die Tatsache, endlich Hormonwirkungen bei zerstörter Zellstruktur nachweisen zu können. Wohl hatten wir und auch andere Autoren mehrfach Effekte von Hormonen in diesem oder jenem zellfreien System festgestellt, aber diese erwiesen sich bei gründlicher Beobachtung immer als unspezifisch. Im Gegensatz dazu war die stimulierende Wirkung auf die Phosphorylase offensichtlich physiologisch signifikant.

Später fanden wir, daß die Wirkung der Hormone verlorenging, wenn wir unsere Homogenate vor der Inkubation zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugierten. Der Hormoneinfluß konnte jedoch durch Kombination der partikulären Fraktion mit dem Überstand wieder hergestellt werden (Abb. 3). Außerdem fanden wir nach Inkubation der partikulären Fraktion mit den Hormonen einen hitzestabilen Faktor, der in der Lage war, im Über-

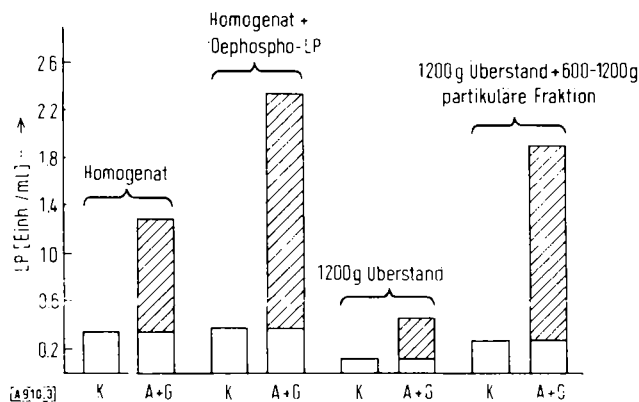


Abb. 3. Wirkungen von Adrenalin und Glucagon (A + G; K = Kontrolle) auf die Aktivierung der Phosphorylase (LP) im gesamten und im fraktionierten Leberhomogenat der Katze. Einem Ansatz wurde inaktive Leber-Phosphorylase (Dephospho-LP) zugefügt. Die Mischungen wurden zusammen mit ATP und  $Mg^{2+}$  in Gegenwart oder Abwesenheit der Hormone inkubiert. Die Phosphorylase-Aktivität wurde vor und nach 10 min. Inkubation bei 30°C gemessen. Jede Säule stellt die während dieser Zeit gebildete LP-Aktivität dar. Der Effekt der Hormone ist durch die schraffierten Flächen wiedergegeben. Nach [10].

stand die Phosphorylase zu aktivieren<sup>[10]</sup>. Demnach konnten bei der Wirkungsweise der Hormone zwei getrennte Vorgänge unterschieden werden.

Der nächste Schritt unserer Untersuchungen bestand in der Identifizierung des hitzestabilen Faktors. Wir erkannten ihn als ein Adeninribonucleotid<sup>[11]</sup>, das aus ATP neben Pyrophosphat<sup>[15]</sup> unter der Einwirkung partikulärer Fraktionen nicht nur aus Leber, sondern auch aus Herzmuskel, Skelettmuskel sowie aus Gehirn entsteht<sup>[12]</sup>. Lipkin und seine Mitarbeiter hatten die gleiche Verbindung nach Behandlung von ATP mit Bariumhydroxid isoliert. Sie bewiesen später, daß es sich um Adenosin-3',5'-monophosphat handelt<sup>[13]</sup>, welches heute gewöhnlich cyclisches AMP oder cAMP genannt wird (Abb. 4).

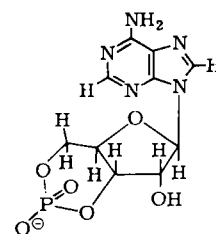


Abb. 4. Strukturformel von Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP).

Einige der bekannten Phosphatasen oder Diesterasen konnten cyclisches AMP nicht hydrolysieren, doch fanden wir in tierischen Geweben ein Enzym, welches cAMP unter Bildung von Adenosin-5'-phosphat (5'-AMP) rasch inaktiviert. Dadurch wurde allmählich klar, daß die Konzentration des cyclischen AMP im Gewebe möglicherweise ein Gleichgewicht zwischen zwei entgegengesetzten Reaktionen widerspiegelt, nämlich seiner Bildung aus ATP einerseits und seinem Abbau zu 5'-AMP andererseits. Unsere nächsten Versuche befaßten sich daher mit den Enzymen, die für diese Reaktionen verantwortlich sind.

Die Enzymaktivität in den partikulären Fraktionen, welche die Umwandlung von ATP zu cyclischem AMP katalysiert, wurde ursprünglich Adenyl-Cyclase genannt, obwohl die chemisch korrektere Bezeichnung Adenylat-Cyclase oder auch Adenylat-Cyclase gewesen wäre. Wir zeigten, daß dieses Enzym nicht nur im Gewebe von Säugetieren, sondern auch im Gewebe von Tieren vieler anderer Stämme weit verbreitet ist<sup>[14]</sup>, und daß Pyrophosphat als zweites Reaktionsprodukt entsteht<sup>[15]</sup>. In der Zwischenzeit untersuchte Bill Butcher die Phosphodiesterase, die den Abbau des cyclischen AMP katalysiert. Er benutzte dieses Enzym, um das weit verbreitete Vorkommen von cyclischem AMP in Zellen und Körperflüssigkeiten aufzuzeigen<sup>[16]</sup>.

Zu diesem Zeitpunkt war bereits klar, daß Adrenalin und Glucagon eine Anreicherung des cyclischen AMP in Leberhomogenaten durch Stimulierung der Adenylat-Cyclase und nicht durch Hemmung der Phosphodiesterase bewirken. Glucagon erwies sich in diesem System – wie auch später in der intakten Leber<sup>[18]</sup> – wirksamer als Adrenalin<sup>[17]</sup>. Auch in Herzmuskel-Präparationen waren Adrenalin und andere Catecholamine aktiv<sup>[19]</sup>. Dann häuften sich die Hinweise, daß einige der biologischen

Wirkungen anderer Hormone ebenfalls auf diese Weise zustande kommen. Zum Beispiel zeigte Haynes<sup>[20]</sup>, daß ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) im Gegensatz zu Glucagon oder Adrenalin die Adenylat-Cyclase in Präparationen der Nebenniere stimuliert, aber nicht in der Leber wirksam ist. In Zusammenarbeit mit Mansour und Bueding fanden wir, daß in Präparationen des Leberegels, *Fasciola hepatica*, nicht die Catecholamine, sondern Serotonin aktiv ist<sup>[21]</sup>. Später wurde der stimulierende Effekt von TSH (Thyreoidea-stimulierendes Hormon) auf die Cyclase in Schilddrüsenpräparationen entdeckt<sup>[22]</sup>. Die bis zu diesem Stadium gewonnenen Erkenntnisse sind in mehreren Übersichtsartikeln eingehend dargestellt<sup>[23]</sup>.

Obwohl die bisherigen Befunde für eine Lokalisation der Adenylat-Cyclase in der Zellmembran sprachen, mußten wir auch die Möglichkeit erwägen, daß das Vorkommen dieses Enzyms hauptsächlich auf den Zellkern beschränkt ist. Es kann nämlich in kernlosen Hunde-Erythrocyten nicht nachgewiesen werden, kommt aber in den Erythrocyten von Vögeln vor, die Zellkerne besitzen. Daraufhin baute Davoren einen Druck-Homogenisator, der eine starke Zertrümmerung der Zellmembranen bei nur geringer Beschädigung der Kerne erlaubte. Durch anschließende Zentrifugation im Dichtegradienten konnten wir zeigen, daß sich der Hauptanteil der Adenylat-Cyclase nicht in den Zellkernen, sondern in der Fraktion befindet, die überwiegend Zellmembranbruchstücke enthält<sup>[24]</sup>.

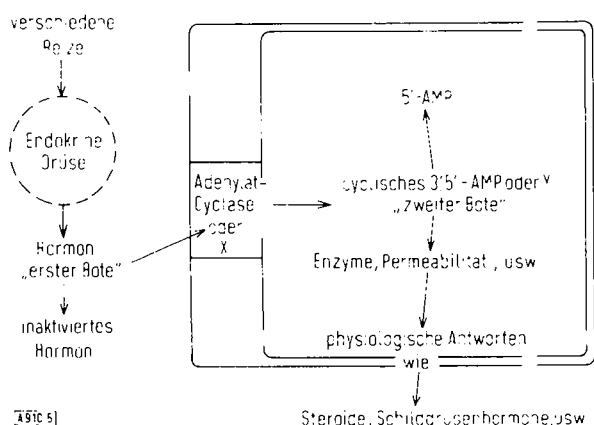


Abb. 5. Schematische Darstellung des Konzeptes vom ersten und zweiten Boten. Nach [26].

Aufgrund dieser und anderer Ergebnisse begannen wir allmählich, das cyclische AMP als „zweiten Boten“ bei der Hormonwirkung zu betrachten, wobei das Hormon selbst als „erster Bote“ anzusehen wäre<sup>[25, 26]</sup>. Dieses Konzept veranschaulicht Abbildung 5. Demnach enthalten unterschiedliche Zellen Rezeptoren für jeweils andere Hormone. Infolge einer Wechselwirkung zwischen Hormon und Rezeptor wird die Adenylat-Cyclase stimuliert und so ein Anstieg der Konzentration von cyclischem AMP erreicht. Das cyclische AMP beeinflusst dann in der Zelle die Geschwindigkeit des einen oder anderen chemischen Prozesses. Da unterschiedliche Zellen unterschiedliche Enzyme enthalten, wirkt sich eine Änderung der cAMP-Konzentration von Zelle zu Zelle verschieden aus: z. B. Aktivierung der Phosphorylase in der Leber, Steigerung der Steroid-

synthese in der Nebennierenrinde usw. Dieses Modell war in der Lage – so erschien es zumindest uns – viele der Phänomene, die wir und andere beobachtet hatten, zu erklären.

Um diese Hypothese möglichst auch quantitativ zu stützen und um leichter erkennen zu können, welche Wirkungen welcher Hormone auf diese Folge von Reaktionen zurückgeführt werden können, planten wir eine Serie von Untersuchungen an mehreren biologischen Systemen unter Beachtung folgender Kriterien: Erstens sollte die Adenylat-Cyclase in der Erfolgszelle durch ein bestimmtes Hormon stimuliert werden, wenn dessen spezifische Antwort über das cAMP erfolgt; umgekehrt dürften Hormone, die diese Zellen nicht beeinflussen, auch das Enzym dort nicht aktivieren. Zweitens wäre zu erwarten, daß sich der cAMP-Spiegel im intakten Gewebe ungefähr mit dem Grad und dem Zeitpunkt der hormonellen Stimulation ändert. Drittens vermuteten wir, daß Substanzen wie Theophyllin<sup>[1, 6]</sup> den Effekt der über die Adenylat-Cyclase wirkenden Hormone verstärken, indem sie die Phosphodiesterase hemmen. Schließlich sollte es noch – zumindest theoretisch – möglich sein, das Hormon durch Verabreichen von exogenem cAMP oder einem seiner Acyl-derivate nachzuahmen.

Wir wußten natürlich, daß die meisten organischen Phosphatverbindungen wie cyclisches AMP nur in sehr geringem Maße in Zellen eindringen können. Theo Posternak synthetisierte daher einige Derivate des cAMP in der Hoffnung, daß deren stärker lipophile Natur sie zu einem

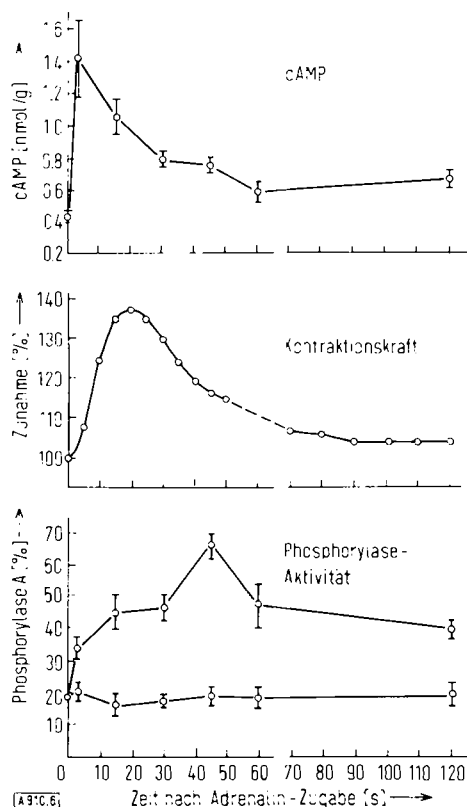


Abb. 6. Wirkung einer einzelnen Dosis Adrenalin auf cAMP-Konzentration, Kontraktionskraft und Phosphorylase-Aktivität am isolierten, perfundierten, arbeitenden Rattenherzen. Die Herzen wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion von Adrenalin eingefroren. Die niedrigere Kurve im untersten Feld zeigt, daß eine Salzinjektion keine Reaktion hervorruft. Nach [28].

rascheren Durchdringen der Zellmembran befähigen würde. In der Tat waren viele dieser Derivate wirksamer als cyclisches AMP, wenn sie intakten Zellen und Geweben zugesetzt wurden<sup>[27]</sup>. Ob dieser Effekt auf eine bessere Penetration zurückzuführen ist, muß aber noch bewiesen werden. Alle diese Kriterien dienen uns zwar als Leitfaden durch unser Forschungsprogramm, aber sie mußten durch weitere Experimente erhellt werden. Ich möchte kurz auf einige der erhaltenen Ergebnisse eingehen.

Die positive inotrope Wirkung<sup>[\*]</sup> des Adrenalins war aus vielen Gründen interessant und für uns besonders deshalb attraktiv, weil das Herz nur eine begrenzte Anzahl verschiedenartiger Zelltypen enthält, unter denen die Muskelzellen vorherrschen. Wir vermuteten daher, daß sich biochemische Untersuchungen am Herzen relativ leicht auswerten lassen. Obwohl die Ergebnisse dieser Studien an anderer Stelle ausführlich beschrieben sind<sup>[28-30]</sup>, wird ein besonders wichtiger Befund hier in Abbildung 6 dargestellt.

Wir hatten schon früher gefunden, daß das Ausmaß, in dem mehrere Catecholamine die Adenylat-Cyclase des Hundeherzens stimulieren, der Stärke der inotropen Antwort entspricht, wie sie andere Autoren bereits mitgeteilt hatten<sup>[19]</sup>. Daraufhin wollten wir wissen, ob die Konzentration des cyclischen AMP im intakten Herzen genügend schnell ansteigt, um diese Reaktion hervorrufen zu können. Wie in Abbildung 6 gezeigt, fanden wir eine außerordentlich rasche Zunahme: Nach einer einzigen Adrenalin-Injektion wurde innerhalb von drei Sekunden das Vierfache der Ausgangskonzentration an cAMP erreicht. Das war mit Sicherheit schnell genug, um die angestiegene Kontraktionskraft erklären zu können. Wir fanden außerdem, daß mehrere adrenerge Hemmstoffe die Anhäufung von cyclischem AMP in dem Maße verhindern, in dem sie auch der inotropen Antwort entgegenwirken. Unsere Experimente am Rattenherzen waren auch deshalb so wichtig, weil wir hier zum ersten Mal die Konzentration des cyclischen AMP im Gewebe zu messen versuchten, während wir gleichzeitig eine mechanische oder andere funktionelle, chemisch nicht faßbare Reaktion beobachteten. Auch diese Versuche veranlaßten uns, ernstlich die Möglichkeit zu erwägen, daß beta-adrenerge Effekte allgemein über cyclisches AMP vermittelt werden<sup>[29]</sup>. Anschließend Untersuchungen durch uns und andere Autoren stützten diese Ansicht<sup>[30-32]</sup>. Dabei wurde auch entdeckt, daß einige alpha-adrenerge Effekte durch einen Rückgang der cAMP-Konzentration verursacht werden<sup>[32,33]</sup>. Auf welche Weise die alpha-Rezeptoren diese Effekte auslösen und inwieweit alpha-adrenerge Effekte allgemein diese Ursache haben, sind jedoch Fragen, deren Beantwortung zukünftiger Forschung überlassen bleibt.

Die im Fettgewebe von Ratten unter dem Einfluß von Hormonen auftretende Lipolyse war hauptsächlich deshalb von großem Interesse, weil so viele Hormone diese Wirkung hervorrufen können. Da beispielsweise Adrenalin, ACTH und Glucagon in anderen Zellen die Adenylat-Cyclase stimulieren, lag die Vermutung nahe, daß sie das-

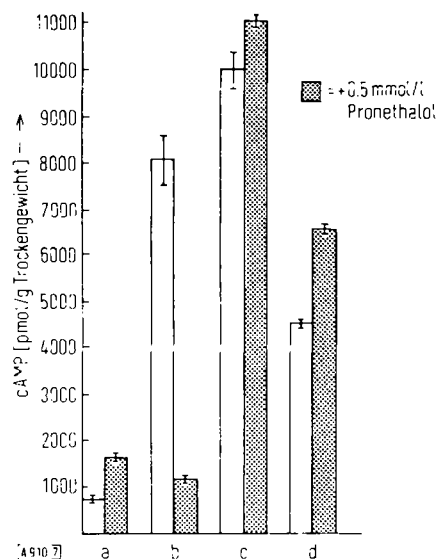


Abb. 7. Wirkung von Adrenalin, ACTH und Glucagon in Gegenwart von 1 mmol/l Coffein auf die cAMP-Konzentration in isolierten Fettzellen der Ratte. Die Zellen wurden zehn Minuten lang in Gegenwart der Hormone in den angegebenen Konzentrationen mit und ohne Pronethalol inkubiert [34]. a) ohne Hormonzusatz, b) Zusatz von 5.5 µmol Adrenalin/l, c) Zusatz von 0.2 Einheiten ACTH/ml, d) Zusatz von 2 µg Glucagon/ml.

selbe auch in Fettzellen tun. Abbildung 7 bestätigt diese Erwartung und zeigt, daß alle drei Hormone nach Zusatz zu isolierten Fettzellen einen deutlichen Anstieg der Konzentration des cyclischen AMP verursachen; die Abbildung zeigt auch die selektive Blockierung der Adrenalinwirkung durch den beta-adrenergen Hemmstoff Pronethalol. Die Tatsache, daß die Wirkungen übermaximaler Dosen von zwei oder mehr Hormonen niemals additiv waren, erlaubte den Schluß, daß die Hormone alle die gleichen Zellen und mutmaßlich auch die gleiche Adenylat-Cyclase beeinflussen. Der Versuch mit Pronethalol beweist jedoch eindeutig, daß die Hormone mit den Zellen über getrennte Rezeptoren in Wechselwirkung treten. Zusätzliche, andernorts zusammengefaßte Versuchsergebnisse<sup>[30,34-36]</sup> zeigen, daß die Wirkungen der betreffenden Hormone – Anstieg der Konzentration des cyclischen AMP und Beschleunigung der Lipolyse – durch Inhibitoren der Phosphodiesterase gesteigert werden. Das gleiche gilt für den Einfluß des exogenen cyclischen AMP oder zumindest seiner Acyl-Derivate. Außerdem fanden wir, daß Insulin und einige Prostaglandine die Konzentration des cyclischen AMP in Fettzellen senken. Vermutlich verdanken diese Substanzen zumindest einen Teil ihrer antilipolytischen Wirksamkeit diesem Effekt. In jüngerer Zeit bewiesen wir, daß einige Xanthin-Derivate die Lipolyse in gleichem Maße steigern wie sie die Phosphodiesterase in Fettzellen hemmen<sup>[37]</sup>. Unser neuester Befund auf diesem Gebiet ist die Tatsache, daß Fettzellen unter dem Einfluß von Hormonen, welche die Bildung von cyclischem AMP stimulieren, auch einen Antagonisten synthetisieren, der eine weitere Reaktion auf diese Hormone verhindert<sup>[38]</sup>. Vielleicht spielt dieser Antagonist im Sinne einer negativen Rückkoppelung bei der Regulation des Stoffwechsels vieler Zellen eine wichtige Rolle.

In Zusammenarbeit mit anderen befaßten wir uns auch mit den Wirkungen von Vasopressin auf die Harnblase

[\*] Steigerung der Kontraktionskraft des Herzmuskels (Anmerkung der Übersetzer).

der Kröte<sup>[39]</sup> und den Einflüssen von L.H. (luteinisierendes Hormon) und ACTH auf die Biosynthese von Steroiden<sup>[40]</sup>. Eine ins einzelne gehende Diskussion dieser und anderer Ergebnisse ist hier nicht möglich. Während der letzten Jahre waren auch außerhalb meiner Gruppe zahlreiche Forscher auf diesem Gebiet tätig; der Fortschritt war dementsprechend schnell. Wir haben versucht, in einer Monographie einige dieser Resultate zusammenzufassen<sup>[41]</sup>, die ich hier kurz rekapitulieren möchte.

Wir wissen heute, daß außer Adrenalin und Glucagon auch ACTH, MSH (melanocyten-stimulierendes Hormon), L.H., Nebenschilddrüsenhormon und TSH zumindest einen Teil ihrer Wirkungen auf dem Wege über cyclisches AMP hervorbringen. Die Synthese gewisser anderer Hormone, z.B. der Steroidhormone, scheint durch cyclisches AMP reguliert zu werden. Somit dürfte dieses Nucleotid in der gesamten Endokrinologie eine entscheidende Rolle spielen. Wir verstehen aber immer noch nicht, auf welche Weise die Wechselwirkung zwischen Hormon und Receptor zu

aus einem regulatorischen Teil mit dem Receptor, der an den extrazellulären Raum grenzt, und aus einer katalytischen Untereinheit, deren aktives Zentrum mit dem Cytoplasma in Kontakt steht. Dieses Modell läßt sich jedoch nur sehr schwer experimentell überprüfen. Eukaryonten scheinen über ein ziemlich komplexes Adenylatecyclase-System zu verfügen, wahrscheinlich im Gegensatz zu Bakterien, aus denen *Hirata* und *Hayaishi*<sup>[42]</sup> eine lösliche Cyclase erhielten. Vermutlich spielen auch Phospholipide eine Rolle<sup>[43]</sup>; außerdem diskutierten kürzlich *Rodbell* und seine Mitarbeiter<sup>[44]</sup> eine Beteiligung von Guanylnucleotiden an der Regulation der Adenylat-Cyclase in der Leber. Auch Fluorid, das wir anfangs zur Hemmung der Phosphorylase-Phosphatase benutzt hatten, vermag die Cyclase-Aktivität in den meisten Gewebshomogenaten zu stimulieren<sup>[14,45]</sup>; wie dieser Effekt zustande kommt, verstehen wir jedoch noch nicht. Neuerdings sprechen einige Befunde für die Annahme, daß die Adenylat-Cyclase in der Membran in einer desaktivierten oder gehemmten

Tabelle 1. Einige Wirkungen des cyclischen AMP [a].

Beeinflusste Enzyme oder Prozesse	Gewebe oder Organismus	Änderung der Aktivität oder der Geschwindigkeit
Protein-Kinase [b]	mehrere	Zunahme
Phosphorylase	mehrere	Zunahme
Glykogen-Synthetase	mehrere	Abnahme
Phosphofructokinase	Leberegel	Zunahme
Lipolyse	Fettgewebe	Zunahme
Clearing-Factor-Lipase	Fettgewebe	Abnahme
Aufnahme von Aminosäuren	Fettgewebe	Abnahme
Aufnahme von Aminosäuren	Leber und Uterus	Zunahme
Synthese mehrerer Enzyme	Leber	Zunahme
Netto-Protein-Synthese	Leber	Abnahme
Gluconeogenese	Leber	Zunahme
Ketogenese	Leber	Zunahme
Biosynthese von Steroiden	mehrere	Zunahme
Permeabilität für Wasser	Epithel	Zunahme
Permeabilität für Ionen	Epithel	Zunahme
Resorption von Calcium	Knochen	Zunahme
Produktion von Renin	Niere	Zunahme
Entladungsfrequenz	Purkinje-Zellen im Kleinhirn	Abnahme
Membran-Potential	Glatte Muskulatur	Zunahme
Spannung	Glatte Muskulatur	Abnahme
Kontraktilität	Herzmuskel	Zunahme
HCl-Sekretion	Magenschleimhaut	Zunahme
Speichel-Sekretion	Speicheldrüsen von Insekten	Zunahme
Freisetzung von Amylase	Parotis	Zunahme
Freisetzung von Insulin	Pankreas	Zunahme
Freisetzung von Schilddrüsenhormon	Schilddrüse	Zunahme
Freisetzung von Calcitonin	Schilddrüse	Zunahme
Abgabe anderer Hormone	Hypophysenvorderlappen	Zunahme
Freisetzung von Histamin	Mastzellen	Abnahme
Ausbreitung der Melanin-Granula	Melanocyten	Zunahme
Aggregation	Blutplättchen	Abnahme
Aggregation	Zelluläre Schleim-Pilze	Zunahme
Synthese von mRNA	Bakterien	Zunahme
Synthese mehrerer Enzyme	Bakterien	Zunahme
Proliferation	Thymocyten	Zunahme
Zellwachstum	Tumorzellen	Abnahme

[a] Literatur über die meisten dieser Effekte siehe [41].

[b] Die Wirkungen des cyclischen AMP auf mehrere Systeme, z.B. auf die Glykogen-Synthetase und die Phosphorylase, beruhen auf der Stimulierung von Protein-Kinasen. Diese Enzyme sind an vielen oder sogar allen anderen Effekten des cyclischen AMP beteiligt.

einer Stimulierung der Adenylat-Cyclase führt (vgl. Abb. 5). *Robison* entwickelte ein interessantes Modell, nach dem die Proteinkomponente der membrangebundenen Adenylat-Cyclase aus zwei Untereinheiten besteht<sup>[29]</sup>, nämlich

Form vorkommt<sup>[46]</sup> und die Hormone und Fluorid möglicherweise durch Beseitigung dieser Hemmung wirken. Einige interessante Beobachtungen wurden auch an der Phosphodiesterase gemacht, die sich als interessanteres

Enzym (oder vielleicht sollte ich besser Enzyme sagen) entpuppen könnte als ursprünglich angenommen wurde<sup>[47]</sup>.

Seit unseren ersten Untersuchungen über die Aktivierung der Phosphorylase fand man eine große Anzahl von Effekten, die durch cyclisches AMP ausgelöst werden: ich habe einige davon in Tabelle 1 zusammengestellt. Wir haben in den letzten Jahren die Wirkungsweise des cAMP nicht selbst weiter untersucht, ganz im Gegensatz zu anderen Gruppen, denen entscheidende Fortschritte gelangen. *Walsh, Perkins* und *Krebs*<sup>[48]</sup> entdeckten eine Protein-Kinase, die durch cyclisches AMP stimuliert wird und die nicht nur für die Aktivierung der Phosphorylase, sondern auch für die Inaktivierung der Glykogen-Synthetase verantwortlich ist<sup>[7]</sup>. Das Enzymmolekül besteht aus zwei Untereinheiten, einem regulatorischen Teil, der das cyclische AMP bindet, und einer katalytischen Untereinheit, die durch den regulatorischen Teil gehemmt wird<sup>[49]</sup>. Wird cyclisches AMP an die regulatorische Untereinheit gebunden, so dissoziiert das Enzymmolekül, und der katalytische Teil entfaltet seine volle Aktivität. Protein-Kinasen sind in der Natur weit verbreitet<sup>[50]</sup>. Ihre Aktivierung (oder Reaktivierung) durch cyclisches AMP kann manche der bekannten Effekte dieses Nucleotids erklären.

Natürlich können nicht alle die vielfältigen Beziehungen im endokrinen System auf ähnlich einfache Schemata wie in Abbildung 5 dargestellt, zurückgeführt werden. Ich habe bereits erwähnt, daß Wirkungen einiger Hormone, z.B. des Insulins, auf einer Senkung der cAMP-Konzentration beruhen: den Mechanismus verstehen wir noch nicht. Die primäre Wirkung der Steroidhormone scheint auf einem gänzlich anderen Wege<sup>[\*]</sup> zustande zu kommen<sup>[51]</sup>, obwohl sich vielleicht auch bei diesen noch einige interessante Beziehungen zu den Hormonen finden lassen, die über cyclisches AMP wirken. Wie kürzlich entdeckt wurde, verursacht Prolactin in der Brustdrüse eine verstärkte Synthese der Protein-Kinase: in diesem Gewebe bestimmt offenbar eher die Menge dieses Enzymproteins als die Konzentration des cAMP die Geschwindigkeit der Casein-Produktion<sup>[52]</sup>.

Cyclisches AMP spielt auch bei solchen Regulationsvorgängen eine wichtige Rolle, die von Hormonen nicht beeinflusst werden. So fand *Makman*<sup>[53]</sup>, daß Glucose die Bildung des cyclischen AMP in *Escherichia coli* unterdrücken kann. Durch die Arbeiten von *Pastan, Perlman* und anderen<sup>[54]</sup> wissen wir heute, daß cyclisches AMP auch an der Regulation des Stoffwechsels von Bakterien teilnimmt. *Bonner* und *Konijn* und ihre Mitarbeiter fanden<sup>[55]</sup>, daß cyclisches AMP für die Aggregation und Differenzierung gewisser Arten von Schleimpilzen notwendig ist; interessanterweise scheint cAMP in diesen Organismen eher die Rolle des „ersten“ als die des „zweiten Boten“ zu übernehmen. Es ist denkbar, daß cyclisches AMP zeitweise auch bei Säugetieren extrazellulär wirkt, besonders seitdem gezeigt wurde, daß die Proliferation der Lymphocyten im Thymus durch ähnliche Konzentrationen von exogenem cyclischem AMP stimuliert wird, wie sie im Plasma normalerweise vorliegen<sup>[56]</sup>. Außerdem scheint cyclisches AMP bei der Kontrolle der Immunreak-

tion beteiligt zu sein<sup>[57]</sup>. Eine weitere, nicht von Hormonen gesteuerte Funktion übt cAMP wahrscheinlich bei der Regulation des Sehens<sup>[58]</sup> und möglicherweise auch anderer Sinnesvorgänge aus. Vermutlich ist unser gegenwärtiges Verständnis von der biologischen Rolle des cyclischen AMP im Vergleich mit unseren zukünftigen Kenntnissen noch sehr gering.

Wir befaßten uns in den letzten Jahren hauptsächlich mit der cyclischen Guanylsäure (cyclischem GMP). Sie wurde von *Price* und seinen Mitarbeitern erstmals im Urin gefunden<sup>[59]</sup> und ist neben cAMP bis heute das einzige bekannte natürliche 3',5'-Mononucleotid geblieben. In mancher Hinsicht war unser Vorgehen hier dem Weg genau entgegengesetzt, den wir bei unseren Untersuchungen mit Adrenalin und Glucagon eingeschlagen hatten. Damals wußten wir von einer Funktion und fanden ein Nucleotid; heute kennen wir ein Nucleotid und versuchen, seine Funktion aufzuklären. Vermutlich sind wir noch weit von einer Lösung des Problems entfernt. Cyclisches GMP wurde in allen untersuchten Säugetieren und in vielen niederen Tierstämmen gefunden<sup>[60]</sup>. Seine Konzentration ist in den meisten Zellen um etwa eine Größenordnung geringer als die des cyclischen AMP; allerdings enthalten einige Insekten mehr cGMP als cAMP. Die Guanylat-Cyclase<sup>[61]</sup> unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht von der Adenylat-Cyclase der Säugetiere: Im Gegensatz zur völlig partikulären Adenylat-Cyclase ist dieses Enzym in den meisten Geweben teilweise löslich, benötigt  $Mn^{2+}$  und wird durch Fluorid nicht aktiviert. Wichtiger ist, daß wir noch keinen Einfluß irgendeines Hormons auf die Aktivität dieses Enzyms entdecken konnten.

Obwohl cAMP und cGMP mit Sicherheit durch verschiedene Enzyme synthetisiert werden, bestehen Zweifel, ob sie auf getrennten Wegen abgebaut werden. Während unter gewissen in-vitro-Bedingungen beide Nucleotide dem gleichen Enzym als Substrate dienen<sup>[47]</sup>, spricht auch einiges dafür, daß sie in vivo durch verschiedene Enzyme hydrolysiert werden<sup>[62]</sup>. Auffallend ist die Beobachtung, daß physiologische Konzentrationen von cyclischem GMP die Hydrolyse des cyclischen AMP durch die Phosphodiesterase der Leber um ein Mehrfaches steigern können<sup>[63]</sup>.

Bei Untersuchungen über die Ausscheidung von cyclischen Nucleotiden erhielten wir einige interessante Ergebnisse<sup>[64, 65]</sup>. Während die Konzentration dieser Nucleotide im Plasma normalerweise niedrig ist – etwa  $10^{-8}$  mol/l – so liegt sie im Urin meistens um mehrere Größenordnungen höher. Gesunde Menschen scheiden 2 bis 9 µmol cyclisches AMP pro Tag aus. An cyclischem GMP werden etwa 30% dieser Menge ausgeschieden. Ungefähr 60% des cAMP im Urin kommen durch glomeruläre Filtration aus dem Plasma, während der Rest von der Niere selbst abgegeben wird. Dagegen stammt fast das gesamte mit dem Harn ausgeschiedene cyclische GMP aus dem Blutplasma. Mit Sicherheit wissen wir weder, von welchen Zellen diese cyclischen Nucleotide ins Plasma abgegeben werden, noch den Anteil, den die einzelnen Organe liefern. Das Nebenschilddrüsenhormon (Parathormon, PTH) scheint die Ausscheidung des cyclischen AMP stark zu beeinflussen. Beim Menschen läßt sich nach Injektion von PTH ein deutlicher Anstieg an cyclischem

[\*] Durch Induktion der Enzymsynthese nach Einwirkung des Hormons auf das genetische Material des Zellkerns (Anmerkung der Übersetzer).

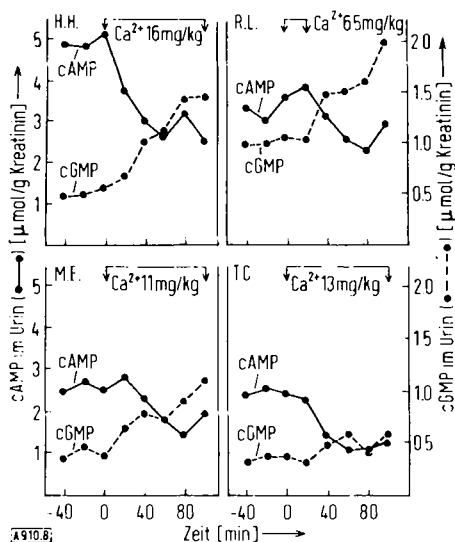


Abb. 8. Vergleich der Konzentrationen von cAMP und cGMP im Urin nach Infusion von Calciumchlorid. Die vier Patienten erhielten während der ersten 15 Minuten der Infusion pro Minute 0.33 bis 0.50 mg  $\text{Ca}^{2+}$ /kg Körpergewicht [66].

AMP im Urin nachweisen, wogegen die Infusion von Calciumchlorid, das die PTH-Abgabe unterdrückt, entgegengesetzt wirkt. Dieser bei vier Patienten erhobene Befund ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Abbildung enthält auch die unerwartete Beobachtung, daß der cGMP-Spiegel im Urin auf Calciumchlorid-Infusionen hin *zunimmt*. Wir stellten noch weitere unterschiedliche Wirkungen auf diese beiden Nucleotide fest. Bei Ratten zum Beispiel sinkt nach Entfernung der Hypophyse die Ausscheidung von cyclischem GMP auf weniger als die Hälfte des Normalwertes, während die von cAMP nur leicht beeinträchtigt ist<sup>[64]</sup>. Im Gegensatz dazu verstärkt die Injektion von Glucagon die Ausscheidung von cyclischem AMP erheblich, ohne die von cGMP zu beeinflussen. Ein anderer interessanter Befund wurde von *Goldberg* und seinen Mitarbeitern erhoben<sup>[67]</sup>; Acetylcholin erhöhte die Konzentration des cyclischen GMP im isolierten, perfundierten Rattenherzen, während es die des cAMP verminderte.

Diese und andere Ergebnisse erlauben den Schluß, daß sich die biologische Rolle des cyclischen GMP, wenn es eine solche überhaupt besitzt, von der des cyclischen AMP stark unterscheidet. Anfangs im Widerspruch zu dieser Vermutung schien die Beobachtung zu stehen, daß exogenes cGMP die Glucoseproduktion in der isolierten, perfundierten Rattenleber fast ebenso stark wie cAMP stimuliert. Das war deshalb so überraschend, weil wir vorher gefunden hatten<sup>[15]</sup>, daß cyclisches GMP bei der Aktivierung der Phosphorylase in Extrakten von Hundelebern um einige Größenordnungen weniger wirksam als cyclisches AMP ist. Unser erster Gedanke, das cyclische GMP könnte die Phosphodiesterase in der Rattenleber hemmen und so eine Anhäufung des cyclischen AMP hervorrufen, erwies sich als falsch. Wir fanden dann, daß sich zugeführtes cyclisches GMP in der Leber wesentlich stärker anreichert als cyclisches AMP, womit sich seine unerwartet starke Wirkung erklären ließe<sup>[68]</sup>. Wir bemühen uns weiter um eine Aufklärung der Funktion des cyclischen GMP. Es müssen aber noch viele Möglichkeiten überprüft werden, und es bleibt abzuwarten, ob sich cGMP als genauso interessant wie cAMP erweisen wird.

Ich möchte mich noch kurz der Rolle des cyclischen AMP bei Krankheiten des Menschen zuwenden. Da cyclisches AMP primär eine regulatorische Aufgabe erfüllt, liegt die Vermutung nahe, daß viele Erkrankungen vielleicht auf Störungen bei der Bildung oder der Funktion dieses Nucleotids zurückgeführt werden können. Eines der zuerst untersuchten Beispiele war der Pseudohypoparathyreoidismus, eine seltene Erbkrankheit, bei der das PTH die Bildung des cAMP im Erfolgs gewebe in vivo nicht stimulieren kann<sup>[69]</sup>. Andere Krankheiten mit erblichen Komponenten, bei denen eine Mitwirkung des cyclischen AMP diskutiert wird, sind zum Beispiel Bronchialasthma<sup>[70]</sup>, Diabetes mellitus<sup>[71]</sup> und gewisse psychische Störungen<sup>[72]</sup>. Auch bei einigen bakteriellen Infektionen scheint das cyclische AMP beteiligt zu sein; hierfür ist die Cholera ein besonders interessantes Beispiel. Das für diese Krankheit verantwortliche Toxin verursacht eine offensichtlich irreversible Aktivitätssteigerung der Adenylat-Cyclase, die ihrerseits zu einer anhaltend hohen Konzentration an cyclischem AMP in der Darmschleimhaut führt. Dadurch kommt es zu dem für diese Krankheit so charakteristischen starken Verlust an Flüssigkeit und Elektrolyten<sup>[73]</sup>. Als letztes und möglicherweise sehr wichtiges Beispiel möchte ich erwähnen, daß es auch beim Wachstum von Tumoren Anzeichen für eine gestörte Bildung von cyclischem AMP gibt<sup>[74]</sup>. – Bis heute haben unsere Kenntnisse über die Beteiligung des cyclischen AMP bei bestimmten Krankheiten noch nicht zu besseren therapeutischen Methoden geführt. Es ist jedoch zu erwarten, daß solche neue Methoden entwickelt werden, sobald noch mehr Einzelheiten bekannt sind. Mehrere Medikamente, die bereits im Umlauf sind, wirken wahrscheinlich über cyclisches AMP.

In diesem Vortrag habe ich versucht, einige meiner Forschungsergebnisse über die Wirkungsweise von Hormonen im Zusammenhang mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen zu beschreiben und so die Entwicklung zu erläutern, die zu unserem heutigen Verständnis von der Rolle des cyclischen AMP geführt hat.

Ich danke meinen vielen Kollegen, die bei diesen Untersuchungen mitgewirkt haben. *James W. Davis* hat über 15 Jahre mit mir zusammengearbeitet. Weitere wichtige Beiträge lieferten unter anderen Dr. *W. D. Wosilait*, Dr. *T. W. Rall*, Dr. *R. W. Butcher*, Dr. *G. A. Robison* und Dr. *J. G. Hardman*. Weiterhin bin ich den National Institutes of Health und der American Heart Association für ihre jahrelange Unterstützung dankbar. Dr. *Rollo Park* schulde ich nicht nur für seine Freundschaft, sondern auch dafür Dank, daß er für die Forschung ideale Voraussetzungen schuf.

Eingegangen am 13. März 1972 [A 910]

Übersetzt von Doz. Dr. R. Schauer und R. Veh, Bochum

[1] C. F. Cori, *Physiol. Rev.* 11, 1943 (1931); C. F. Cori u. A. D. Welch, *J. Amer. Med. Ass.* 116, 2590 (1941); G. T. Cori u. C. F. Cori, *J. Biol. Chem.* 158, 321 (1945).

[2] E. W. Sutherland, *Recent Progr. Horm. Res.* 5, 441 (1950).

[3] E. W. Sutherland u. C. F. Cori, *J. Biol. Chem.* 188, 531 (1951).

[4] T. W. Rall, E. W. Sutherland u. W. D. Wosilait, *J. Biol. Chem.* 218, 483 (1956).

[5] L. F. Leloir u. C. E. Cardini, *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 6340 (1957).



- [6] H. G. Hers, H. De Wulf u. W. Stalmans, *FEBS Lett.* 12, 72 (1970).
- [7] T. R. Soderling, J. P. Hickenbottom, E. M. Reimann, F. L. Hunkeler, D. A. Walsh u. E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 245, 6317 (1970).
- [8] W. D. Wosilait u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 218, 469 (1956).
- [9] E. G. Krebs u. E. H. Fischer, *Biochim. Biophys. Acta* 20, 150 (1956).
- [10] T. W. Rall, E. W. Sutherland u. J. Berthet, *J. Biol. Chem.* 224, 463 (1957).
- [11] E. W. Sutherland u. T. W. Rall, *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 3608 (1957); *J. Biol. Chem.* 232, 1077 (1958).
- [12] T. W. Rall u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 232, 1065 (1958).
- [13] D. Lipkin, W. H. Cool u. R. Markham, *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 6198 (1959).
- [14] E. W. Sutherland, T. W. Rall u. T. Menon, *J. Biol. Chem.* 237, 1220 (1962).
- [15] T. W. Rall u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 237, 1228 (1962).
- [16] R. W. Butcher u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 237, 1244 (1962).
- [17] M. H. Makman u. E. W. Sutherland, *Endocrinology* 75, 127 (1964).
- [18] G. A. Robison, J. H. Exton, C. R. Park u. E. W. Sutherland, *Fed. Proc.* 26, 257 (1967); J. H. Exton, G. A. Robison, E. W. Sutherland u. C. R. Park, *J. Biol. Chem.* 246, 6166 (1971).
- [19] F. Murad, Y. M. Chi, T. W. Rall u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 237, 1233 (1962).
- [20] R. C. Haynes, *J. Biol. Chem.* 233, 1220 (1958).
- [21] T. E. Mansour, E. W. Sutherland, T. W. Rall u. E. Bueding, *J. Biol. Chem.* 235, 466 (1960).
- [22] L. M. Kainer, Y. M. Chi, S. L. Friedberg, T. W. Rall u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 237, 1239 (1962).
- [23] E. W. Sutherland u. T. W. Rall, *Pharm. Rev.* 12, 265 (1960); R. C. Haynes, E. W. Sutherland u. T. W. Rall, *Recent Progr. Horm. Res.* 16, 121 (1960); T. W. Rall u. E. W. Sutherland, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 347 (1961); E. W. Sutherland, *Harvey Lect.* 57, 17 (1962).
- [24] P. R. Davoren u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 238, 3016 (1963).
- [25] E. W. Sutherland, I. Øye u. R. W. Butcher, *Recent Progr. Horm. Res.* 21, 623 (1965).
- [26] E. W. Sutherland u. G. A. Robison, *Pharm. Rev.* 18, 145 (1966).
- [27] Th. Posternak, E. W. Sutherland u. W. F. Henion, *Biochim. Biophys. Acta* 65, 558 (1962); W. F. Henion, E. W. Sutherland u. Th. Posternak, *ibid.* 148, 106 (1967).
- [28] G. A. Robison, R. W. Butcher, I. Øye, H. E. Morgan u. E. W. Sutherland, *Mol. Pharmacol.* 1, 168 (1965).
- [29] G. A. Robison, R. W. Butcher u. E. W. Sutherland, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 139, 703 (1967).
- [30] E. W. Sutherland, G. A. Robison u. R. W. Butcher, *Circulation* 37, 279 (1968).
- [31] S. E. Epstein, G. S. Levey u. C. L. Skeleton, *Circulation* 43, 437 (1971); P. J. LaRaia u. E. H. Sonnenblick, *Circ. Res.* 28, 377 (1971).
- [32] G. A. Robison, R. W. Butcher u. E. W. Sutherland in J. F. Danielli, J. F. Moran u. D. J. Triggle: *Fundamental Concepts in Drug-Receptor Interactions*. Academic Press, New York 1969, S. 59 ff.; G. A. Robison u. E. W. Sutherland, *Circ. Res.* 26, Suppl. 1, 147 (1970).
- [33] J. R. Turtle u. D. M. Kipnis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 797 (1967); J. S. Handler, R. Bensinger u. J. Orloff, *Amer. J. Physiol.* 215, 1024 (1968); K. Abe, G. A. Robison, G. W. Liddle, R. W. Butcher, W. E. Nicholson u. C. E. Baird, *Endocrinology* 85, 674 (1969); G. A. Robison, A. Arnold u. R. C. Hartmann, *Pharmacol. Res. Commun.* 1, 325 (1969); L. V. Avioli, W. Shieber u. D. M. Kipnis, *Endocrinology* 88, 1337 (1971); G. A. Robison, P. E. Langley u. T. W. Burns, *Biochem. Pharmacol.* 20 (1971).
- [34] R. W. Butcher, C. E. Baird u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 243, 1705 (1968).
- [35] R. W. Butcher, R. J. Ho, H. C. Meng u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 240, 4515 (1965).
- [36] R. W. Butcher, G. A. Robison, J. G. Hardman u. E. W. Sutherland, *Advan. Enzyme Regul.* 6, 357 (1968).
- [37] J. A. Beavo, N. L. Rogers, O. B. Crofford, J. G. Hardman, E. W. Sutherland u. E. V. Newman, *Mol. Pharmacol.* 6, 597 (1970).
- [38] R. J. Ho u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 246, 6822 (1971).
- [39] J. Handler, R. W. Butcher, E. W. Sutherland u. J. Orloff, *J. Biol. Chem.* 240, 4524 (1965).
- [40] J. M. Marsh, R. W. Butcher, K. Savard u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 241, 5436 (1965); D. G. Grahame-Smith, R. W. Butcher, R. L. Ney u. E. W. Sutherland, *ibid.* 242, 5535 (1967).
- [41] G. A. Robison, R. W. Butcher u. E. W. Sutherland: *Cyclic AMP*. Academic Press, New York 1971.
- [42] M. Hirata u. O. Hayaishi, *Biochim. Biophys. Acta* 149, 1 (1967).
- [43] G. S. Levey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 108 (1971).
- [44] M. Rodbell, L. Birnbaumer, S. L. Pohl u. H. M. J. Kras, *J. Biol. Chem.* 246, 1877 (1971).
- [45] I. Øye u. E. W. Sutherland, *Biochim. Biophys. Acta* 127, 347 (1966); R. A. Johnson u. E. W. Sutherland, *Fed. Proc.* 30, 220 Abs (1971).
- [46] M. Schramm u. E. Naim, *J. Biol. Chem.* 245, 3225 (1970); M. J. Schmidt, E. C. Palmer, W. D. Dettbarn u. G. A. Robison, *Develop. Psychobiol.* 3, 53 (1970); J. P. Perkins u. M. M. Moore, *J. Biol. Chem.* 246, 62 (1971).
- [47] J. A. Beavo, J. G. Hardman u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 245, 5649 (1970); W. Y. Cheung, *ibid.* 246, 2859 (1971); W. J. Thompson u. M. M. Appleman, *ibid.* 246, 3145 (1971); S. Kakiuchi, R. Yamazaki u. Y. Teshima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 968 (1971).
- [48] D. A. Walsh, J. P. Perkins u. E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 243, 3763 (1968).
- [49] G. N. Gill u. L. D. Garren, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 786 (1971); C. O. Brostrom, J. D. Corbin, C. A. King u. E. G. Krebs, *ibid.* 68, 2444 (1971).
- [50] J. F. Kuo u. P. Greengard, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 1349 (1969).
- [51] E. Jensen, N. Numata, P. Brecher u. E. Desombre in R. M. S. Smellie: *The Biochemistry of Steroid Action*. Academic Press, New York 1971; B. W. O'Malley, *Metab. Clin. Exp.* 20, 981 (1971).
- [52] G. C. Majumder u. R. W. Turkington, *J. Biol. Chem.* 246, 5545 (1971).
- [53] R. S. Makman u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 240, 1309 (1965).
- [54] I. Pastan u. R. Perlman, *Science* 169, 339 (1970); G. Zubay, D. Schwartz u. J. Beckwith, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 433 (1970); T. Yokota u. J. S. Gots, *J. Bacteriol.* 103, 513 (1970); S. P. Nissley, W. B. Anderson, M. E. Gottesman, R. L. Perlman u. I. Pastan, *J. Biol. Chem.* 246, 4671 (1971); J. S. Hong, G. R. Smith u. B. N. Ames, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2258 (1971).
- [55] J. T. Bonner, D. S. Barkley, E. M. Hall, T. M. Konijn, J. W. Mason, G. O'Keefe u. P. B. Wolfe, *Develop. Biol.* 20, 72 (1969); T. M. Konijn, Y. Y. Chang u. J. T. Bonner, *Nature* 224, 1211 (1969).
- [56] J. P. MacManus u. J. F. Whitfield, *Exp. Cell Res.* 58, 188 (1969).
- [57] C. W. Parker, J. W. Smith u. A. L. Steiner, *Int. Arch. Allergy* 41, 40 (1971); M. E. Cross u. M. G. Ord, *Biochem. J.* 124, 241 (1971); W. Brun u. M. Ishizuka, *J. Immunol.* 107, 1036 (1971).
- [58] M. W. Bitensky, R. E. Gorman u. W. H. Miller, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 561 (1971).
- [59] D. F. Ashman, R. Lipton, M. M. Melicow u. T. D. Price, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 330 (1963); T. D. Price, D. F. Ashman u. M. M. Melicow, *Biochim. Biophys. Acta* 138, 452 (1967).
- [60] N. D. Goldberg, S. B. Dietz u. A. G. O'Toole, *J. Biol. Chem.* 244, 4458 (1969); E. Ishikawa, S. Ishikawa, J. W. Davis u. E. W. Sutherland, *ibid.* 244, 6371 (1969).
- [61] J. G. Hardman u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 244, 6363 (1969); A. A. White u. G. D. Aurbach, *Biochim. Biophys. Acta* 191, 686 (1969); G. Schultz, E. Böhme u. K. Munske, *Life Sci. Pt II*, 8, 1323 (1969).
- [62] W. J. Thompson u. M. M. Appleman, *Biochemistry* 10, 311 (1971).
- [63] J. A. Beavo, J. G. Hardman u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 246, 3841 (1971).
- [64] J. G. Hardman, J. W. Davis u. E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* 241, 4812 (1966); 244, 6354 (1969).
- [65] A. Broadus, J. G. Hardman, N. I. Kaminsky, J. H. Ball, E. W. Sutherland u. G. W. Liddle, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 185 (1971).
- [66] N. I. Kaminsky, A. E. Broadus, J. G. Hardman, D. J. Jones, J. H. Ball, E. W. Sutherland u. G. W. Liddle, *J. Clin. Invest.* 49, 2387 (1970).
- [67] W. J. George, J. B. Polson, A. B. O'Toole u. N. D. Goldberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 398 (1970).
- [68] J. H. Exton, J. G. Hardman, T. F. Williams, E. W. Sutherland u. C. R. Park, *J. Biol. Chem.* 246, 2658 (1971).
- [69] L. R. Chase, G. L. Melson u. G. D. Aurbach, *J. Clin. Invest.* 48, 1832 (1969); R. Marcus, J. F. Wilber u. G. D. Aurbach, *J. Clin. Endocrinol.* 33, 537 (1971).
- [70] A. Szentivanyi, *J. Allergy* 42, 203 (1968).
- [71] E. Cerasi u. R. Luft in E. Cerasi u. R. Luft: *Pathogenesis of Diabetes*. Interscience, New York 1970, S. 17 ff.
- [72] M. I. Paul, H. Cramer u. W. E. Bunney, *Science* 171, 300 (1971).
- [73] D. E. Shafer, W. D. Lust, B. Sircar u. N. D. Goldberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 851 (1970); G. W. G. Sharp u. S. Hynie, *Nature* 229, 266 (1971); D. V. Kimberg, M. Field, J. Johnson, A. Hendersen u. E. Gershon, *J. Clin. Invest.* 50, 1218 (1971).
- [74] G. S. Johnson, R. M. Friedman u. I. Pastan, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 425 (1971); J. R. Sheppard, *ibid.* 68, 1316 (1971); M. H. Makman, *ibid.* 68, 2127 (1971); M. L. Heidrick u. W. L. Ryan, *Cancer Res.* 31, 1313 (1971); J. Otten, G. S. Johnson u. I. Pastan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1192 (1971).