

MARKIERUNG VON INSULIN MIT TRITIUM

C. VON HOLT, I. VOELKER UND L. VON HOLT

Unter Mitarbeit von

I. BENEDIKT, I. HALLMANN, H. LÜTH, E. SCHÜMANN UND H. WILKENS

*Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg**

(Eingegangen den 27. April 1959)

SUMMARY

Labelling of insulin with Tritium

Insulin can be labelled with Tritium by the WILZBACH-method.

Repeated crystallisation or preparative paper electrophoresis followed by crystallisation leads to a preparation of constant specific activity. In paper electrophoresis under various pH conditions as well as during fibril growth followed by reactivation and crystallisation of the reactivated hormone [³H]insulin shows a behaviour equal to that of unlabelled insulin. Columnchromatographic analysis of [³H]insulin hydrolysates reveals a preferential incorporation of the hydrogen isotope into the aromatic amino acids. The bloodsugar-lowering effect of the labelled hormone is fully preserved. Unlabelled insulin causes an isotope dilution effect in the combination of [³H]insulin with rat diaphragm and ox retina *in vitro*.

EINLEITUNG

Während über den Eigenstoffwechsel niedermolekularer Hormone zahlreiche Ergebnisse vorliegen, die mit Hilfe von ¹⁴C-, ³H- oder ¹³¹I-markierter Substanzen gewonnen wurden, ist die Kenntnis des Schicksals von Proteohormonen im Stoffwechsel beschränkt, da für letztere keine geeigneten Markierungsverfahren bestehen. Biosynthese von Insulin z.B. in Kälberpankreasschnitten *in vitro* aus [¹⁴C]Aminosäuren^{1,2} sowie bei Ratten *in vivo* aus [³⁵S]Aminosäuren³ führen lediglich zu geringen spezifischen Aktivitäten des isolierten Hormones. Darüber hinaus können aber molekülfremde Atom-Gruppierungen oder Atome durch chemische Reaktionen in das Insulinmolekül eingeführt werden. So wurden der [³⁵S]Schwefelsäureester des Insulins⁴ und das ¹³¹I-markierte Derivat⁵ dargestellt. Jodiertes Insulin ist in zahlreichen Untersuchungen eingesetzt worden⁶. Die biologische Aktivität der benutzten Präparate, soweit untersucht, bewegt sich, gemessen an der hypoglykämisierenden Wirkung, zwischen 100%⁶ und 75%⁷. Die Interpretation der nach Anwendung jodierter Proteine erhaltenen Ergebnisse ist erschwert⁸, da eine intravitale Dejodierung ohne Peptidhydrolyse möglich erscheint⁹. Unterschiede im Stoffwechsel jodierter und biosynthetisch markierter Proteine sind beobachtet worden¹⁰.

Wir haben daher untersucht, ob das von WILZBACH¹¹ entwickelte Verfahren der Inkorporierung von Tritium (³H, β - 0,018 MeV, 12,26 Jahre Halbwertszeit) durch

* Direktor: Prof. Dr. J. KÜHNAU.

Austausch, speziell für das Proteohormon Insulin anwendbar ist. Über erste Untersuchungsergebnisse wurde von uns bereits kurz berichtet^{12, 13}. Von anderer Seite wurde mit Hilfe des WILZBACH-Verfahrens das Protein Lysozym unter Erhaltung der biologischen Aktivität markiert¹⁴.

EXPERIMENTELLES

Markierung mit Tritium

Insulin wurde jeweils in Mengen von 1 g Kristallinsulin* (23 ± 0.5 i.E./mg, 0.62 % Zink) gegenüber einer Gesamtmenge von 2.18 C Tritium bei 0.39 atm. und + 27° über eine Zeit von zwei Wochen exponiert**. Die bei diesen Verfahren beobachteten Anfangsaktivitäten variieren ohne vorangehenden Austausch gegen hydrophile Lösungsmittel zwischen 17.7 und 53 μ C/mg Rohprodukt**.

Radioaktivitätsbestimmungen

Die Tritium-Aktivität wurde im fensterlosen Methandurchflusszähler in einer Schichtdicke unterhalb der Selbstabsorption gemessen bzw. die Impulszahlen mit Hilfe von experimentell ermittelten Selbstabsorptionskurven korrigiert. Die Präparate gelangten auf Aluminiumschälchen nach Verdampfung der benutzten Lösungsmittel (0.001 N-0.01 N HCl bzw. CH₃COOH) unter der Infrarotlampe zur Messung. Die Angabe von spezifischen Aktivitäten erfolgt in Impulsen/Min/Gewichtseinheit ± Impulsen/Min für $p = 0.05$. Bei Bezug auf einen Tritiumstandard** beträgt der Wirkungsgrad der Messanordnung ca. 30 %. Infolge der ausserordentlich geringen β -Energie des Tritiums und der daraus resultierenden unübersichtlichen Absorptionsverhältnisse im Papier besitzen die Aktivitätsmessungen an Papier lediglich qualitativen Charakter.

Proteinbestimmungen

Die Insulinkonzentration in Lösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 278 m μ in 1-cm Schichtdicke unter Bezug auf Kristallinsulinlösungen bekannter Konzentrationen ermittelt. In einem Teil der Untersuchungen wurde die Insulinkonzentration mit Hilfe der von LOWRY¹⁵ angegebenen Methode bestimmt.

Kristallisation von Insulin

Es wurde nach dem Verfahren von ROMAN, SCOTT UND FISHER¹⁵ verfahren. Etwa 0.2 %ige Lösungen von Insulin in 0.1-0.5 N Essigsäure wurden nach Zusatz von 0.07 ml 0.3 %iger Zinkacetatlösung/ml Insulinlösung mit 1 N Ammoniaklösung an der Glaselektrode rasch auf pH 6-7, anschliessend langsam mit 1 N Essigsäure auf pH 5.9 eingestellt, zunächst für 2-3 Stunden bei Zimmertemperatur belassen und dann bei + 4° bis zur vollständigen Kristallisation aufbewahrt. Der durch fraktionierte Zentrifugation bei 100-2000 U./Min gewonnene Kristallniederschlag wurde einmal mit etwa 0.1 M Ammoniumacetatpuffer von pH 5.9 und anschliessend mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Gewinnung von Trockensubstanz erfolgte wiederholte Waschung der Kristalle mit 96 %igem Äthanol und anschliessende Lufttrocknung. Isoelektrische Fällungen wurden im gleichen Ammoniumacetatsystem bei pH 5.2 vorgenommen.

* Herrn Dr. MITTENZWEI, Hormon-Chemie, München, sei herzlich für die grosszügige Überlassung von Insulin gedankt.

** New England Nuclear Corp., Boston, Mass., USA.

Fibrillenbildung und Reaktivierung

Die Herstellung der fibrillären Modifikation des Insulins durch Animpfen von Insulinlösungen mit Fibrillen sowie dessen Reaktivierung erfolgte nach den Angaben von WAUGH^{17,18}. Dabei gelangten Mischungen von elektrophoretisch-gereinigtem [³H]Insulin zu Trägerinsulin wie 1:190 zur Verwendung.

Hydrolyse und Aminosäureanalyse

[³H]Insulin wurde in 5.7 N Salzsäure unter N₂ über 48 Stunden bei 105° hydrolysiert, von überschüssiger Salzsäure im Vakuum über Natriumhydroxyd befreit und nach dem Verfahren von STEIN UND MOORE¹⁹ an Dowex 1- und Dowex 50-Säulen mit ansteigenden Säuregradienten chromatographiert. Konzentrationsbestimmungen erfolgten nach Einengung der Fraktionen zur Trockne (1-10 Torr über Natriumhydroxyd, +50°) nach Wiederaufnahme der Rückstände in 10%igem Pyridin-Wassergemisch mit Hilfe der Ninhydrinreaktion von TROLL UND CANNAN²⁰. Aliquote Teile wurden zur Radioaktivitätsbestimmung verwandt. Orientierende Untersuchungen erfolgten papierchromatographisch nach Hydrolyse in folgenden Lösungsmittelsystemen: Pyridin-Amylalkohol-Wasser (7:6:6), *n*-Butanol-Wasser-Eisessig (14:3:3), wassergesättigtes Phenol.

Paperelektrophorese

Analytische Versuche wurden bei einer Feldstärke von 10 V/cm und 2-5 mA/Streifen (Whatman Papier Nr. 1) über 3 Stunden durchgeführt. Folgende Puffersysteme gelangten zur Anwendung: Glykokoll-Salzsäure (pH 2) und Phosphat-Borat (pH 7-9). Die Anfärbung der Proteine auf dem Papier erfolgte nach der von GRASSMANN angegebenen Methode²¹; auf eine quantitative Auswertung wurde aus naheliegenden Gründen verzichtet. In präparativen Ansätzen wurde [³H]Insulin (100-500 mg) in der Anordnung von GRASSMANN²² (Spinco-Modell CP) bei pH 8.6 im Diäthylbarbitursäure-Natriumdiäthylbarbitursäuresystem (800 V, 58-62 mA, Schleicher u. Schüll-Papier Nr. 470, 4°) aufgearbeitet. [³H]Insulin wurde aus entsprechenden Fraktionen auf zwei Arten isoliert: (a) Isoelektrische Fällung, anschließende erschöpfende Dialyse bei 4° und Kristallisation. (b) Gefriertrocknung der Fraktionen mit Wiederaufnahme der Trockensubstanz in etwa 0.1 des ursprünglichen Volumens an Wasser, Einstellung von pH 3 und Extraktion der ausgefällten Barbitursäure mit Äther; Fällung des Insulins am isoelektrischen Punkt mit nachfolgender Kristallisation bis zur konstanten spez. Aktivität.

Biologische Teste

Blutzuckerbestimmungen erfolgten nach der Methode von FRANK UND KIRBERGER²³ an männlichen Sprague-Dawley-Ratten (150-200 g Körpergewicht) nach 14 Std. Nahrungskarenz. Insulin wurde in 0.01 N Salzsäure gelöst intravenös appliziert. Diaphragmen 3 Stunden nüchtern Ratten wurden in 2 ml Kaliumphosphat-Natriumchloridpuffer (pH 7, durchgast mit 8 % Kohlendioxyd in Sauerstoff) bei 37° und 110 Oszillationen/Min in der Warburg-Apparatur inkubiert. Die Glukosekonzentration des Inkubationsmediums betrug 250 mg %, die Konzentration des Insulins 8.353 µg/Ansatz. Das Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem Insulin wurde variiert. Nach 1 Stunde Inkubation wurde in aliquoten Teilen des Mediums die Tritiumaktivität bestimmt. Die Differenz vor und nach Inkubation wurde als Auf-

nahme/100 mg Diaphragma (Feuchtgewicht) berechnet. In gleicher Weise wie Ratten-diaphragmen wurden Rinderretinen inkubiert und die Tritiumaufnahme auf 100 mg Trockengewicht bezogen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die hohe Aktivität des Rohpräparates nach der Exposition gegenüber Tritium lässt das Auftreten zahlreicher Zerstrahlungsprodukte des Insulins erwarten. Daneben dürfte der Hauptanteil des Tritiums in labiler, gegen Wasserstoff austauschbarer Form vorliegen. Hiermit in Übereinstimmung steht das Ergebnis von Dialyseversuchen, s. Fig. 1 und Tabellen I und II. Der rasche Abfall nicht-wasserdampfflüchtiger Radioaktivität entspricht dem Herausdialysieren niedermolekularer Produkte. Da durch Passage des Dialysewassers über einen Kationenaustauscher (Dowex 50 X8 H⁺) sich etwa 57 % der nicht-wasserdampfflüchtigen Tritiumaktivität an den Austauscher binden und anschliessend mit NH₄OH wieder eluieren lässt, ist anzunehmen, dass es sich bei diesen Substanzen um Aminosäuren und Peptide handelt, zumal die papier-chromatographische Untersuchung des Eluates die Anwesenheit zahlreicher, ninhydrinpositiver, ³H-markierter Substanzen nachweist. Neben der Beseitigung von

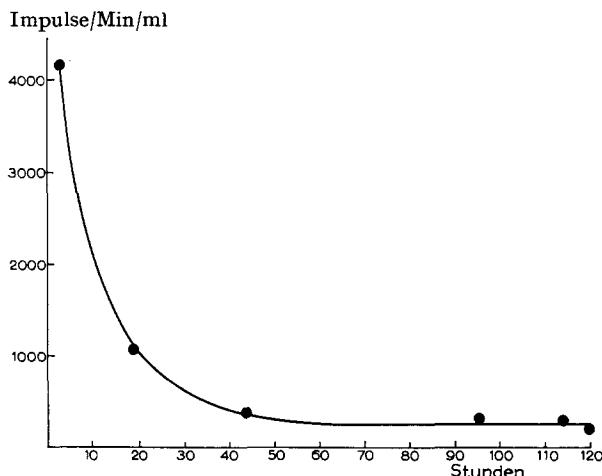


Fig. 1. Nicht wasserdampfflüchtige Bestandteile im Dialysewasser einer [³H]Insulinlösung im Verlaufe der Dialyse von [³H]Insulin gegen Wasser bei 4°.

TABELLE I

SPEZIFISCHE AKTIVITÄT VON [³H] INSULIN NACH BEHANDLUNG MIT WÄSSRIGEN LÖSUNGSMITTELN

Lösungsmittel	Impulse/Min/μg
—	11.810 · 10 ³ Impulse/Min*
0.01 N Salzsäure	7.346 · 10 ³ Impulse/Min
0.01 N Salzsäure nach Dialyse gegen Wasser	2.169 · 10 ³ Impulse/Min

* Theoretische Aktivität in der verwendeten Messanordnung unter Zugrundelegung der im Flüssigkeitsszintillationszähler (New England Nucl. Corp.) gemessenen Aktivität ohne vorausgegangenen Austausch gegen hydrophile Lösungsmittel.

TABELLE II
VERTEILUNG DER TRITIUMAKTIVITÄT EINES [³H]INSULINROHPRAEPARATES AUF
PROTEIN- UND NICHTPROTEIN ANTEILE

<i>Praeparation</i>	<i>Total Impulse/Min</i>
A. Insulin vor Dialyse	$3.149 \cdot 10^6$
B. Insulin nach Dialyse gegen Wasser	$5.783 \cdot 10^5$
C. Nicht-wasser dampf-flüchtige Anteile im Dialysewasser	$1.812 \cdot 10^5$
D. Kationische, nicht-wasser dampf-flüchtige Anteile des Dialysewassers	$1.032 \cdot 10^5$
E. Wasserdampf-flüchtige Anteile des Dialysewassers	$2.389 \cdot 10^6$ (A — Σ BC)

Zerstrahlungsprodukten führt die Dialyse über längere Zeit jedoch zu einem ständigen, langsamen Zerfall des Insulins in der verdünnten Lösung, wie die konstante Aktivität nicht wasser dampf-flüchtiger Produkte im Dialysewasser im weiteren Verlauf des Versuches zeigt.

Wiederholte Kristallisation des Insulins jedoch führt zu einem Produkt konstanter spez. Aktivität, s. Tabelle III. Die Aktivität dieses Präparates verändert sich während 5-stündiger Dialyse gegen Wasser nicht. Es lassen sich keine freien Aminosäuren oder Peptide in dem Insulinkristallisat in gebräuchlichen, papierchromatographischen Systemen durch Messung der Tritiumaktivität bzw. der Ninhydrinreaktion nachweisen.

TABELLE III
VERHALTEN DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT VON [³H]INSULIN
BEI WIEDERHOLTER KRISTALLISATION

<i>Anzahl der Kristallisationen</i>	<i>Spez. Aktivität in Impulse/Min./μg</i>
1	7346 ± 168
2	2907 ± 105
3	3805 ± 121
4	3423 ± 115
5	3617 ± 117
6	3737 ± 119

Bei Aufbewahrung von [³H]Insulinlösungen konstanter spez. Aktivität in Glasgefäßsen beobachtet man einen anfänglich raschen, später langsamen Abfall der Aktivität/Volumeneinheit mit Einstellung einer konstanten Endaktivität. Die Feststellung, dass bei Umfüllung der Lösung nach Erreichen der Endaktivität ein erneuter Abfall einsetzt (s. Fig. 2) und die Möglichkeit, durch vorherige Absättigung des Glases mit unmarkiertem Insulin die Aktivitätsminderung pro Volumeneinheit herabzusetzen (Tabelle IV), sprechen für eine Adsorption des Insulins an das Glas.

Papierenkrophoretische Untersuchungen weisen nach, dass [³H]Insulin außerordentlich intensiv ebenfalls an Papier adsorbiert wird. Unter geeigneten Bedingungen lässt sich auch bei unmarkiertem Insulin eine Adsorption an Papier färberisch nachweisen. Fig. 3 zeigt das Ergebnis der Elektrophorese von [³H]Insulin vor und nach

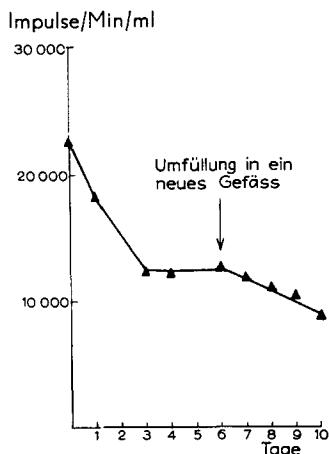


TABELLE IV
EINFLUSS DER ABSÄTTIGUNG VON GLAS MIT INSULIN AUF DEN AKTIVITÄTSVERLUST EINER $[^3\text{H}]$ INSULINLÖSUNG

Zeitpunkt in Tagen	Kontrollgefäß Impulse/Min/ml	"Insulin-gesättigtes" Gefäß Impulse/Min
0	1846	1846
1	885	1311
2	825	1337
3	739	1278

Fig. 2. Aktivitätsverlust einer $[^3\text{H}]$ Insulinlösung bei Aufbewahrung in einem Glasgefäß.

Kristallisation ohne Zusatz von Trägerinsulin. Die Hauptmasse der Radioaktivität wird an der Auftragungsstelle adsorbiert. Der Zusatz von Trägerinsulin beseitigt diesen Effekt und zeigt das durch die Kristallisation erzielte Ausmass der Beseitigung von Zerstrahlungsprodukten (Fig. 4). Trotz des Zusatzes eines grossen Überschusses von Trägerinsulin findet sich jedoch in diesen Versuchen noch Tritiumaktivität, die nicht der Insulinbande zuzuordnen ist. Es wurde daher $[^3\text{H}]$ Insulin im kontinuierlichen Durchlaufverfahren einer präparativen Elektrophorese unterworfen und aus der insulinhaltigen Fraktion das Hormon isoliert und kristallisiert. Durch fraktionierte Zentrifugation wurde ein von amorphen Bestandteilen freies Kristallisat der typischen Kristallform erhalten, s. Fig. 5. Die analytische, papierelektrophoretische Kontrolle zeigt ein dem lediglich durch Kristallisation gereinigten Insulin analoges Verhalten des elektrophoretisch abgetrennten Hormones (Fig. 6). Auch nach elektrophoretischer Reinigung findet sich eine geringe Tritiumaktivität über die gesamte Laufstrecke verteilt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei der Insulinbande nicht zuzuordnenden Aktivität um an das Papier adsorbiertes Insulin handelt und nicht um eine Verunreinigung des Präparates.

In Abhängigkeit von der Anfangsaktivität des $[^3\text{H}]$ exponierten Insulins und der Dauer der Aufbewahrung des Rohpräparates werden verschiedene Aktivitäten des gereinigten $[^3\text{H}]$ Insulins gefunden (Tabelle V). Diese Ergebnisse machen eine interne

TABELLE V
SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN VERSCHIEDENER $[^3\text{H}]$ INSULIN-PRÄPARATE

Aktivitäten in Impulse/Min/mg	Präparation	Zeitpunkt der Untersuchung
$7.35 \cdot 10^6$	Rohprodukt (I)	4 Monate nach Exposition
$3.40 \cdot 10^6$	Kristallisation bis zur konst. spez. Aktivität (I)	4 Monate nach Exposition
$1.59 \cdot 10^6$	Kristallisation bis zur konst. spez. Aktivität (I)	18 Monate nach Exposition
$0.45 \cdot 10^6$	Papierelektrophoretische Reinigung (I)	18 Monate nach Exposition
$9.96 \cdot 10^6$	Rohprodukt (II)	6 Monate nach Exposition
$2.49 \cdot 10^6$	Kristallisation bis zur konst. spez. Aktivität (II)	6 Monate nach Exposition
$0.79 \cdot 10^6$	Papierelektrophoretische Reinigung (II)	6 Monate nach Exposition

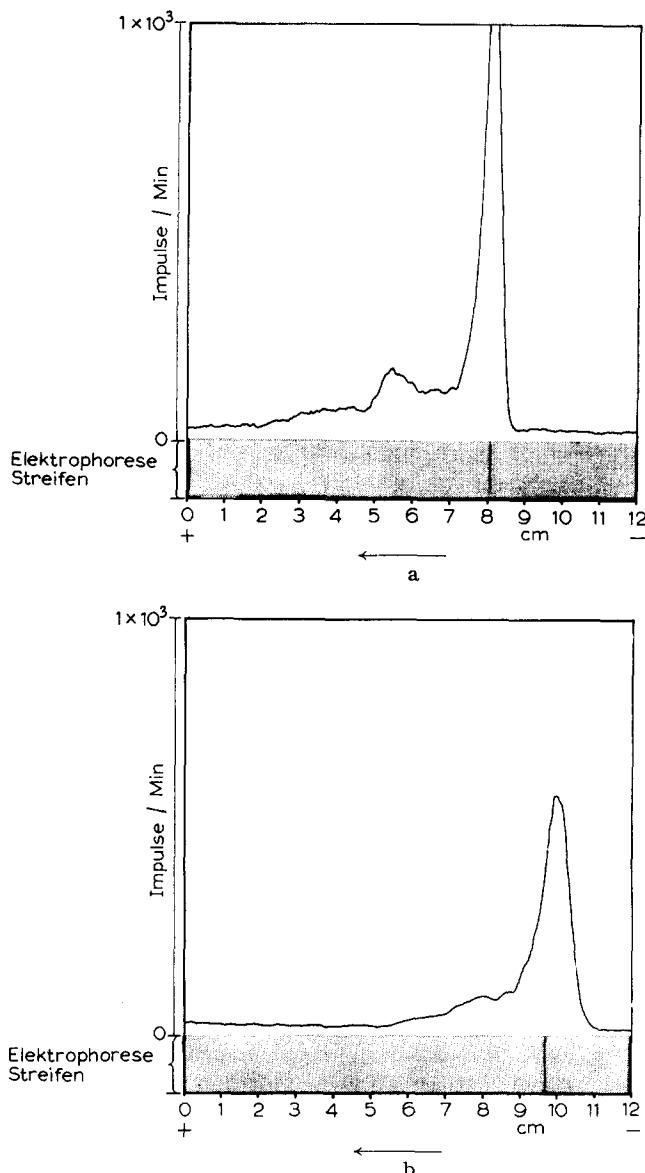


Fig. 3. Papierelektrophorese von $10 \mu\text{g}$ [^3H]Insulin bei pH 8.0. a: Rohprodukt; b: nach dreimaliger Umkristallisation. Vollausschlag: $1 \cdot 10^3$ Impulse/Min, Dämpfung: 100 Sek; Schreibgeschwindigkeit: 60 mm/Stunde; →: Wanderungsrichtung.

Selbstzerstrahlung des [^3H]Insulins wahrscheinlich. Nach elektrophoretischer Reinigung wird ausserdem eine niedrigere spez. Aktivität gefunden als nach wiederholter Kristallisation. Da der papierelektrophoretische Vergleich beider Kristallisate jedoch keinen Anhalt dafür ergibt, dass die Präparate sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzen, muss angenommen werden, dass der lange Verbleib des [^3H]Insulins in einer Lösung von pH 8.6 unter Bedingungen, die eine Oxydation des Insulins

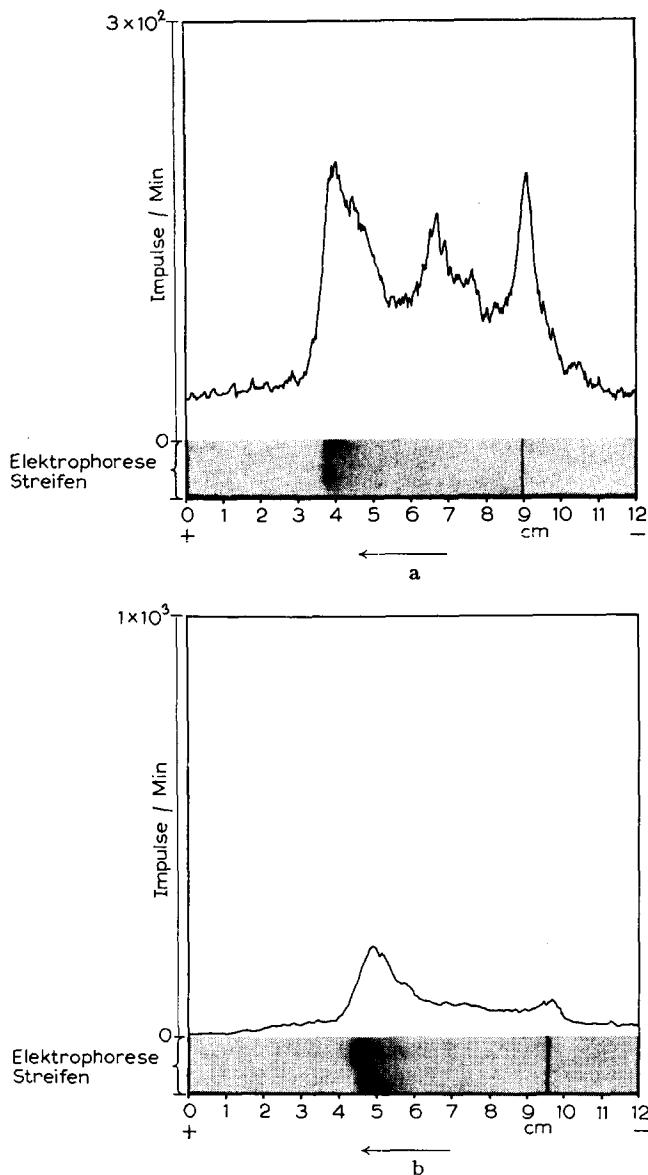
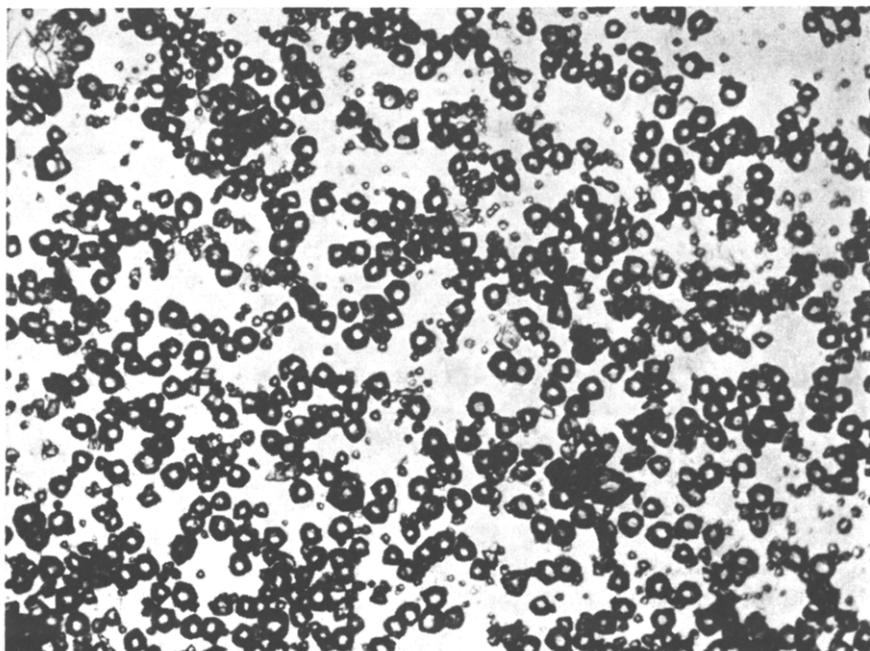


Fig. 4. Papierelektrophorese einer Mischung von $10 \mu\text{g}$ [^3H]Insulin und $900 \mu\text{g}$ unmarkiertem Insulin bei pH 8,0. a: Rohprodukt; b: nach dreimaliger Umkristallisation. Vollausschlag: a = $3 \cdot 10^2$ Impulse/Min; b = $1 \cdot 10^3$ Impulse/Min; Dämpfung: 100 Sek; Schreibgeschwindigkeit: 60 mm/Stunde; →: Wanderungsrichtung.

begünstigen, zu einer Denaturierung von [^3H]Insulin-Molekülspezies höherer spez. Aktivität geführt hat oder unter diesen Bedingungen ein zusätzlicher Rückaustausch von Tritium gegen Wasserstoff stattgefunden hat.

Unter Zugrundelegung der gemessenen spez. Aktivitäten des gereinigten [^3H]-Insulins ist der Wasserstoff des Insulins in der Größenordnung von $10^{-5} - 10^{-4}\%$ durch Tritium ersetzt worden.

Fig. 5. $[^3\text{H}]$ Insulin Kristalle.

Da die papierelektrophoretische Einheitlichkeit eines Proteins sowie dessen Darstellbarkeit in homogener, kristalliner Form allein nicht ausreichend ist für die Annahme der Einheitlichkeit, haben wir das Verhalten von Tritiuminsulin unter Bedingungen der Fibrillenbildung und Reaktivierung untersucht. Insulin lässt sich, wie WAUGH¹⁷ gezeigt hat, unter standardisierten Bedingungen in eine unlösliche, fibrilläre, biologisch inaktive Form überführen, die nach Behandlung mit Alkali in natives Insulin zurückverwandelt und in typischer Weise kristallisiert werden kann¹⁸. Die Bedingungen der Fibrillenbildung (mineralsaure Lösung, pH 1.5, 40°) sind gleichzeitig geeignet, labiles, etwa noch vorhandenes Tritium gegen Wasserstoff auszutauschen. Tabelle VI zeigt die spezifischen Aktivitäten der Lösungen von kristallisierten $[^3\text{H}]$ Insulin-Trägerinsulin-Gemischen vor der Fibrillenbildung und nach Fibrillenbildung mit anschliessender Reaktivierung durch Alkali und Kristallisation. 92.4 ± 4.4 % der eingesetzten Tritiumaktivität verhalten sich unter den Bedingungen der Fibrillenbildung, Reaktivierung und Kristallisation der reaktivierten Fibrillen

TABELLE VI

VERHALTEN DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT VON GEMISCHEN AUS ELEKTROPHORETISCH GEREINIGTEM
 $[^3\text{H}]$ INSULIN UND INAKTIVEM INSULIN UNTER BEDINGUNGEN DER FIBRILLENBILDUNG

<i>Art der Insulinpräparation</i>	<i>Spez. Aktivität in Impulse/Min/mg</i>
Kristallisat vor Fibrillenbildung	4170 ± 185
Kristallisat nach Fibrillenbildung und Reaktivierung	3850 ± 186

wie natives Insulin. Diese Ergebnisse machen eine weitgehende Identität von Tritiuminsulin und unmarkiertem Insulin wahrscheinlich.

Bei der Untersuchung der Verteilung des Einbaues von Tritium in die verschiedenen Aminosäuren des Insulins wurde als analytische Methode das von STEIN UND MOORE¹⁹ angegebene Verfahren der Chromatographie an Dowex 50 X 8 H⁺ mit steigendem Salzsäuregradienten gewählt. Für die Beantwortung unserer Fragestellung erscheint dieses Vorgehen im Vergleich zu den mit Puffergemischen arbeitenden Verfahren trotz der bei letzteren besseren Trennung geeigneter, da eine Messung der Radioaktivität der Aminosäuren im Hinblick auf die geringe β-Energie des Tritiums aus methodischen Gründen möglichst in unendlich dünner Schicht erfolgen muss, dies jedoch bei der verwendeten Probenbereitung und Messung in Gegenwart von Puffersalzen nicht realisierbar ist. Fig. 7 zeigt, dass ein Einbau von Tritium in verschiedene Aminosäuren stattfindet, wobei die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Histidin bevorzugt sind, während die Monoaminodicarbonsäuren und Hydroxyaminoäuren nur geringere Aktivitäten aufweisen. Auffällig erscheint die in mehreren Chromatogrammen beobachtete Aufspaltung von Radioaktivitätsgipfeln bzw. deren Verschiebung gegenüber den Ninhydrinmaxima. Es handelt sich dabei möglicherweise um Isotopeneffekte unterschiedlich markierter Aminosäuren der gleichen Spezies.

Die Markierung des Insulins führt, gemessen an der Blutzuckeraktivität des gereinigten [³H]Insulins, zu keinem Verlust der biologischen Aktivität (Tabelle VII).

TABELLE VII

BLUTZUCKERSENKUNG BEI RATTEN 15 MIN NACH INTRAVENÖSER INJEKTION VON
[³H]INSULIN BZW. UNMARKIERTEM INSULIN *

Mittelwert des Blutzuckerabfalls und Standardabweichung in % des Ausgangsblutzuckers	Anzahl der Tiere	Signifikanz der Mittelwertsdifferenzen
Insulin (25 I.E./mg)	8	Keine Differenz
[³ H]Insulin	12	

* 0.4 µg/100 g Ratte.

Allerdings würde das Vorhandensein von geringsten, biologisch inaktiven Anteilen hoher spezifischer Radioaktivität in einem derartigen Test nicht aufgedeckt werden. Es wurde daher ein weiteres Merkmal zur biologischen Charakterisierung des [³H]Insulins herangezogen. Insulin wird, wie STADIE⁴ gezeigt hat, in spezifischer Weise von verschiedenen Geweben gebunden. Es wurde daher untersucht, ob die Tritiumaktivität [³H]Insulins von Rattendiaphragmen oder Rinderretinen in gleicher Weise gebunden wird wie unmarkiertes Insulin. Wenn die Bindung der Tritiumaktivität an die spezifischen Gewebsstrukturen in gleicher Weise erfolgen würde wie die des Insulins, müsste bei partiellem Ersatz von [³H]Insulin durch unmarkiertes Insulin bei konstanter Konzentration von Gesamtinsulin im Ansatz ein echter Isotopenverdünnungseffekt bezüglich der Bindung an die Gewebe nachweisbar sein. Die Figs. 8 und 9 zeigen, dass die sich aus dem Verdünnungsgrad des [³H]Insulins durch unmarkiertes Insulin errechnende Aufnahme von Tritiumaktivität den experimentell bestimmten Werten entspricht.

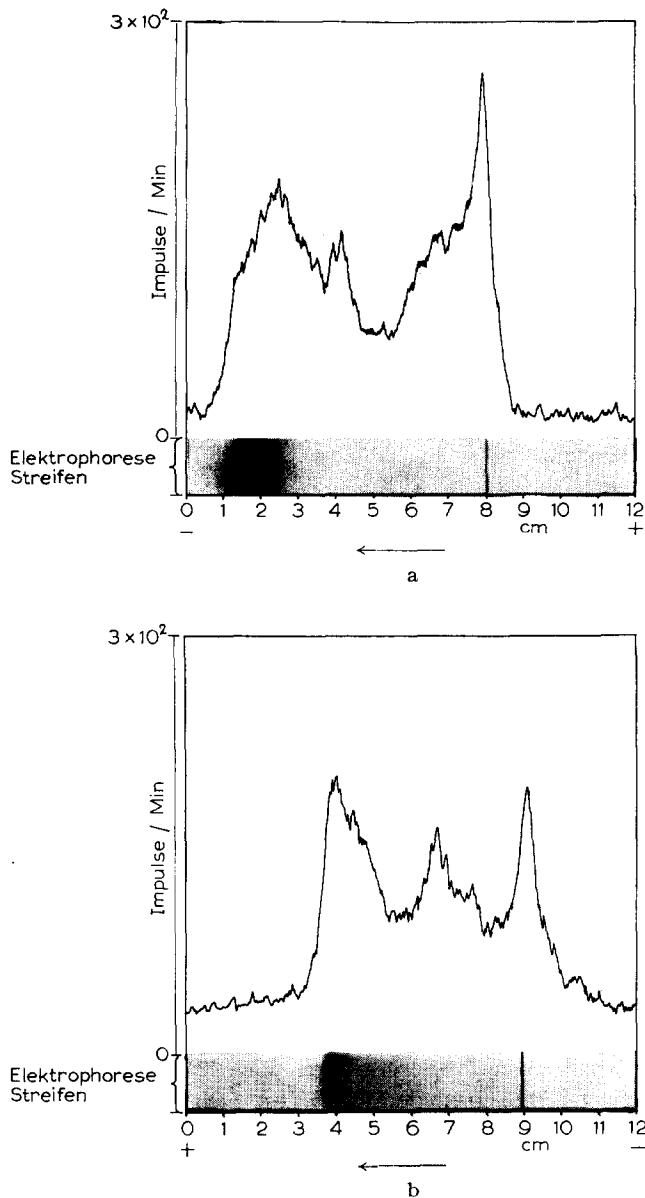


Fig. 6; Legende s. S. 99.

Damit ist bewiesen, dass unter den angewandten Versuchsbedingungen die Bindung von Tritiumaktivität des tritierten Insulins an die Gewebe den gleichen Gesetzmäßigkeiten unterliegt wie unmarkiertes Insulin. Da $[^3\text{H}]$ Insulin sich bei der Kristallisation, Papierelektrophorese und Fibrillenbildung sowie in seiner hypoglykämischen Wirkung als auch in der Bindung an Gewebe wie unmarkiertes Insulin verhält, erscheint seine Verwendung als tracer in biologischen Versuchen berechtigt.

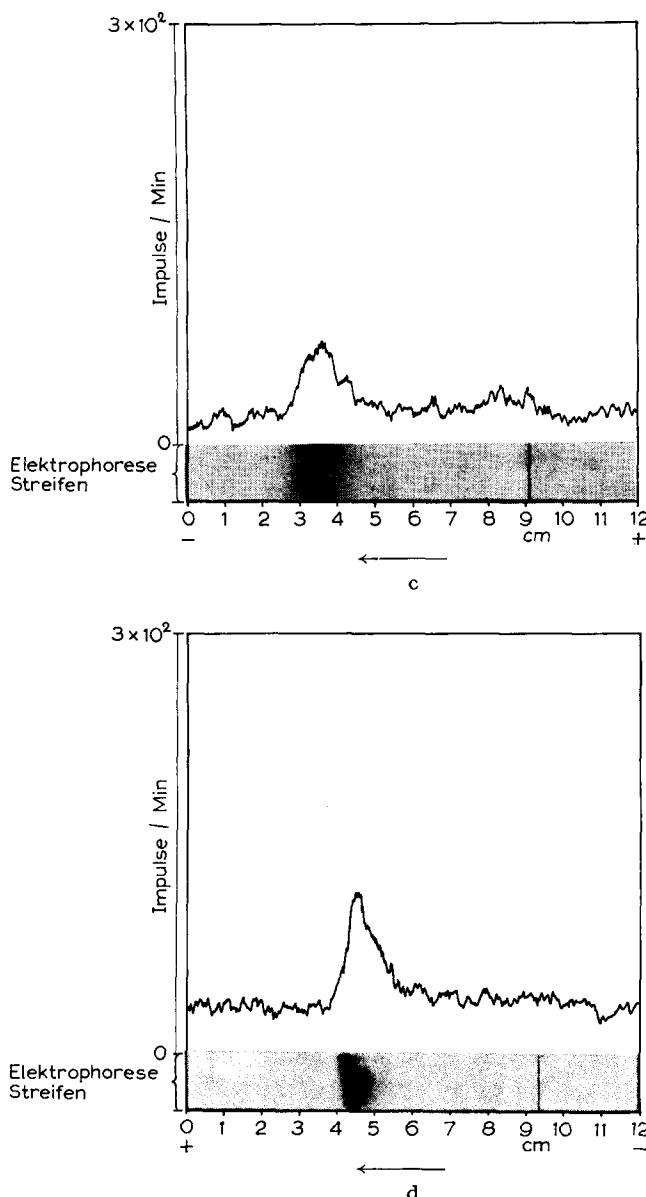


Fig. 6. Papierelektrophorese von Mischungen aus 10 µg [^3H]Insulin und 900 µg unmarkiertem Insulin. a: Rohprodukt pH 2,0; b: Rohprodukt pH 8,0; c: nach elektrophoretischer Reinigung, pH 2,0; d: nach elektrophoretischer Reinigung pH 8,0. Vollausschlag: $3 \cdot 10^2$ Impulse/Min; Dämpfung: 100 Sek; Schreibgeschwindigkeit: 60 mm/Stunde; →: Wanderungsrichtung.

DANK

Die Untersuchungen wurden vom Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft gefördert.

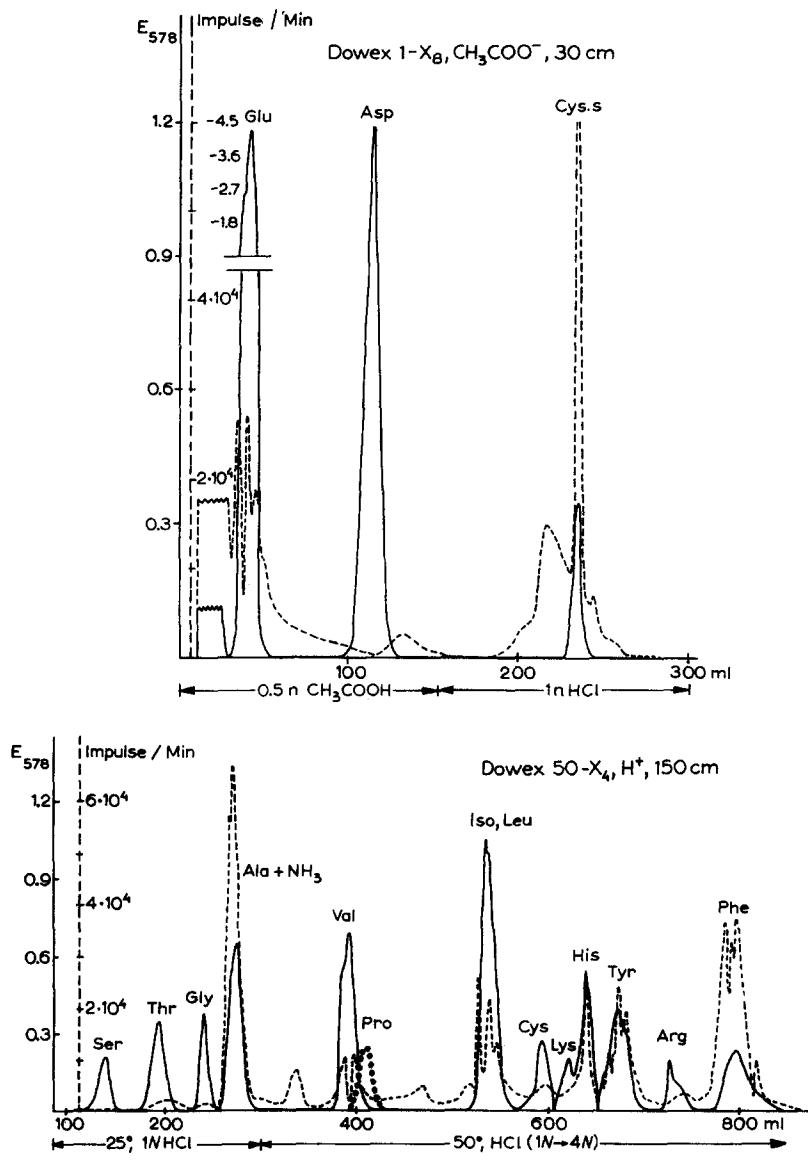


Fig. 7. Chromatographie eines Hydrolysatess von mehrfach umkristallisiertem [³H]Insulin an Ionenaustauschersäulen nach MOORE UND STEIN¹⁹. — = $E_{578 \text{ m}\mu}$; - - - = Impulse/Min; Volumeneinheit; - - - - = $E_{436 \text{ m}\mu}$.

ZUSAMMENFASSUNG

Insulin lässt sich im WILZBACH-Verfahren mit Tritium markieren.

Durch wiederholte Kristallisation oder durch präparative Papierelektrophorese mit nachfolgender Kristallisation kann das Hormon als Präparat mit konstanter spezifischer Aktivität erhalten werden. Tritiuminsulin verhält sich in der Papierelektrophorese unter verschiedenen pH-Bedingungen sowie im Verlaufe der Fibrillen-

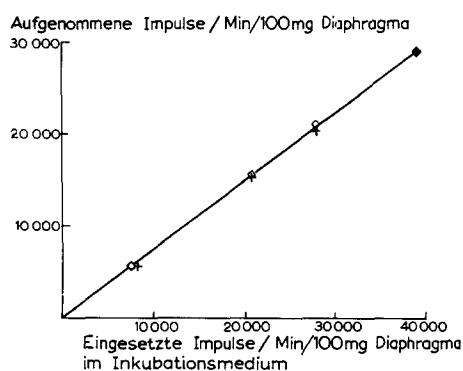


Fig. 8. Bindung von $[^3\text{H}]$ Insulin durch Ratten-diaphragma *in vitro* bei Variation des Verhältnisses von markiertem zu unmarkiertem Insulin und gleichbleibender Gesamtkonzentration von Insulin. \diamond = Berechnete Aufnahme; $+$ = Experimentell bestimmte Aufnahme.

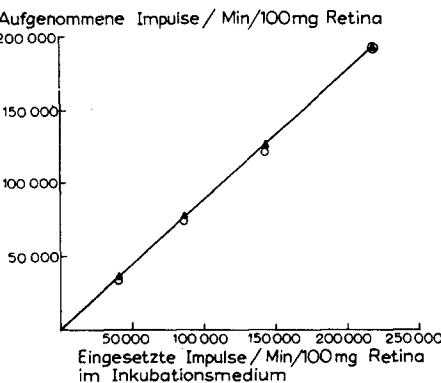


Fig. 9. Bindung von $[^3\text{H}]$ Insulin durch Rinderretina *in vitro* bei Variation des Verhältnisses von markiertem zu unmarkiertem Insulin und gleichbleibender Gesamtinsulinkonzentration. \blacktriangle = Berechnete Aufnahme; \circ = Experimentell bestimmte Aufnahme.

bildung mit nachfolgender Reaktivierung und Kristallisation wie unmarkiertes Insulin. Die säulenchromatographische Analyse von $[^3\text{H}]$ Insulin-Hydrolysaten weist einen bevorzugten Einbau des Wasserstoffisotops in die aromatischen Aminosäuren nach. Die blutzuckersenkende Wirkung des markierten Hormones bleibt voll erhalten. Beziiglich der Bindung von $[^3\text{H}]$ Insulin an Rattendiaphragma oder Rinderretina *in vitro* wird durch unmarkiertes Insulin ein Isotopenverdünnungseffekt bewirkt.

LITERATUR

- ¹ M. VAUGHAN AND C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, **211** (1954) 367.
- ² A. LIGHT AND M. V. SIMPSON, *Biochim. Biophys. Acta*, **20** (1956) 251.
- ³ I. VOELKER UND C. V. HOLT, unveröffentlichte Befunde.
- ⁴ W. C. STADIE, N. HAUGAARD AND M. VAUGHAN, *J. Biol. Chem.*, **199** (1952) 729.
- ⁵ N. D. LEE, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **70** (1957) 94.
- ⁶ N. J. ELGEE, R. H. WILLIAMS AND N. D. LEE, *J. Clin. Invest.*, **33** (1954) 1252.
- ⁷ E. KALLEK UND G. SEYBOLD, *Z. Naturforsch.*, **9b** (1954) 307.
- ⁸ S. A. BERSON AND R. S. YALOW, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **70** (1957) 56.
- ⁹ S. MARGEN AND H. TARVER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **70** (1957) 49.
- ¹⁰ P. D. GOLDSWORTHY AND W. VOLLMILLER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **70** (1957) 26.
- ¹¹ K. E. WILZBACH, *J. Am. Chem. Soc.*, **79** (1957) 1013.
- ¹² C. V. HOLT UND L. V. HOLT, *Naturwissenschaften*, **45** (1958) 289.
- ¹³ C. V. HOLT, I. NOLTE AND L. V. HOLT, *Second U.N. intern. Conf. on the peaceful uses of Atomic energy*, **15** (1958) 979.
- ¹⁴ D. STEINBERG, M. VAUGHAN, C. B. ANFINSEN AND J. GORRY, *Science*, **126** (1957) 447.
- ¹⁵ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR AND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, **193** (1951) 265.
- ¹⁶ R. C. ROMANS, D. A. SCOTT AND A. M. FISHER, *Ind. Eng. Chem.*, **32** (1940) 908.
- ¹⁷ D. F. WAUGH, R. E. THOMPSON AND R. J. WEIMER, *J. Biol. Chem.*, **185** (1950) 85.
- ¹⁸ D. F. WAUGH, *J. Am. Chem. Soc.*, **70** (1948) 1850.
- ¹⁹ S. MOORE AND W. H. STEIN, *J. Am. Chem. Soc.*, **76** (1954) 6063.
- ²⁰ W. TROLL AND R. K. CANNAN, *J. Biol. Chem.*, **200** (1953) 803.
- ²¹ W. GRASSMANN UND K. HANNIG, *Naturwissenschaften*, **37** (1950) 496.
- ²² W. GRASSMANN UND K. HANNIG, *Naturwissenschaften*, **37** (1950) 397.
- ²³ H. FRANK UND E. KIRBERGER, *Biochem. Z.*, **320** (1949/50) 359.