

Über die Chemie des Insulins.

Von Hermann Eyer

Assistent am Hygienisch-bakteriolog. Institut der Universität Erlangen.

(Vortrag am 18. Februar 1936 in der physik.-medizin. Sozietät.)

Übersicht.

Die chemische Aufklärung des Inselhormons ist trotz intensivster Arbeit nur langsam fortgeschritten; das wenige, was darüber berichtet werden kann, ist nicht vergleichbar mit den großartigen Erfolgen, von denen die konstitutionschemische Forschung beim Adrenalin, dem Tyroxin, den Sexualhormonen und ähnlichen Substanzen begleitet war.

Die ersten Vermutungen über Zusammenhänge zwischen der Zuckerharnruhr und einer Erkrankung der Bauchspeicheldrüse liegen um rund 100 Jahre zurück. Um die Jahrhundertwende haben Schulz und Sobolew, sowie v. Mering und Minkovsky in einem Funktionsausfall der seit 1869 bekannten Langerhansschen Inselzellen die eigentliche Ursache des Diabetes mellitus erblickt, und zur selben Zeit begannen auch die ersten Versuche einer therapeutischen Beeinflussung der Krankheit durch Pankreasextrakte.

1912 hatte Zuelzer wohl als erster ein Insulinpräparat in Händen gehabt; aber das typische von ihm beschriebene Bild des insulinbedingten hypoglykämischen Schocks am Versuchstier hat er als nebensächliche toxische Wirkung seiner Präparate betrachtet und sich so um den Ruhm der Entdeckung des Insulins gebracht.

Der Weltkrieg hat die Weiterforschung zunächst ruhen lassen, bis zwei Jahre nach Kriegsende Banting und Best aus der Schule McLeods in Toronto, zusammen mit Colip, die eigentlichen Entdecker des von ihnen sogenannten Insulins wurden.

Nachdem sie die Gewinnung des Hormons aus dem Pankreas gelehrt hatten, haben sich bald zahlreiche Forscher des neuen

Problems bemächtigt, unter ihnen vor allem der Altmeister der amerikanischen Pharmakologen J. J. Abel in Baltimore. Ihm gelang als erstem die zunächst angezweifelte Reindarstellung des Insulins in kristallisierter Form in den Jahren 1925/26.

Die Kristallisation war schon Jahre zuvor in England und Deutschland versucht worden, aber ohne Erfolg; in Deutschland scheiterten die Versuche zunächst an der Beschaffungsschwierigkeit ausreichender und vor allem geeigneter Rohinsuline. Mit amerikanischem Insulin glückte die Kristallisation sehr bald auch in außeramerikanischen Ländern, während das einheimische Material noch lange Schwierigkeiten machte.

Mit dem Jahr 1926 setzte die eigentliche konstitutionschemische Arbeit ein. Begünstigt durch die ausgezeichneten amerikanischen Rohinsuline, haben Toronto mit McLeods Schule und Baltimore unter Abel, Du Vigneaud, Jensen, Wintersteiner und Evans fürs erste die Führung übernommen. In England folgten Dale mit Dudley, Barger und Harrington, Charles und Scott, sowie Blatherwick. In Holland hat Laqueur mit Dingemanse, de Jongh und Freud die Bearbeitung in Angriff genommen, und in Deutschland hat 1926/27 in Heidelberg die Schule Freudenberg's mit Dirscherl, Eyer, Weiß, Eichel und Wegmann, unterstützt durch das Werk Höchst der I. G. Farbenindustrie, ein umfangreiches Arbeitsprogramm entwickelt.

Seinem Wesen nach ist das Insulin eines von vielleicht mehreren Hormonen, die neben einer ganzen Reihe von Fermenten in der Bauchspeicheldrüse von Tier und Mensch gefunden werden. Außer dem Insulin hat in neuerer Zeit von den hormonartigen Stoffen der Pankreasdrüse besonders das Glukagon von Allen, bis zu einem gewissen Grad ein Antagonist des Insulins und diesem hartnäckig anhaftend, eine gewisse Beachtung gefunden.

Das Insulin selbst, ein Regler des Zuckerstoffwechsels, bezüglich seines Wirkungsmechanismus noch nicht völlig aufgeklärt, kommt außer in der Bauchspeicheldrüse auch im übrigen Organismus da und dort in wechselnder Menge vor. — Collip hat schon bald nach der Entdeckung des Insulins auf eine ganze Reihe pflanzlicher blutzuckersenkender Stoffe hingewiesen, die

in Zwiebeln, Salatpflanzen und Leguminosenkeimlingen vorkommen und die von ihm Glukokinine genannt wurden. K a u f f m a n n hat vor Jahren die blutzuckersenkende Wirkung von Bohnenschalenextrakten, die in Form von Teeaufgüssen eine günstige Wirkung auf den Blutzuckerspiegel haben sollten, beschrieben, und ich habe selbst einmal Extrakte von entbitterten Lupinen, die außerdem frei von Spartein waren, untersucht und gelegentlich Senkungen des Blutzuckers bis herunter auf 60 mg% beobachtet, jedoch in keiner Abhängigkeit von der Höhe der Dosierung. Insulinartiger Natur ist jedenfalls keine der zahlreichen Substanzen, von denen eine blutzuckersenkende Wirkung bekannt ist, die aber nicht aus der Bauchspeicheldrüse stammen. Die Synthaline haben ebenfalls mit dem Insulin nichts gemein.

Bezüglich der Darstellung des Insulins ist man auf die Verarbeitung tierischer Bauchspeicheldrüsen angewiesen. Das amerikanische Insulin stammt ganz überwiegend von Rindern, während die deutschen und dänischen Insuline zum größeren Teil aus Schweinepankreas gewonnen werden. Man hat auch schon versucht, bestimmte Fischarten, die im mexikanischen Golf vorkommen, zur Insulindarstellung zu verwenden, hat aber dann diese nur wissenschaftlich interessierenden Experimente wieder aufgegeben, so daß das heute im Handel befindliche in- und ausländische Insulin überwiegend von Rindern und Schweinen stammt. Das meistgebrauchte Prinzip zur Insulingewinnung beruht auf der Extraktion der sofort nach der Schlachtung der Tiere hartgefrorenen und in diesem Zustand pulverisierten Drüsensubstanz, mit salzsaurem Alkohol. Aus diesem Extrakt entfernt man den Alkohol, salzt mit Ammonsulfat aus und erwirkt eine Entfernung der Begleitsubstanzen durch Puffergemische von Pyridinacetat, Ammonacetat und Ammoniak. Außer diesem Verfahren hat S h a f f e r eine Pikrinsäurefällung in Vorschlag gebracht, während S c o t t eine Saponinfällungsmethode ausgearbeitet hat, bei der er in allerjüngster Zeit an Stelle des Saponins das oberflächenaktive Aceton oder den Propylalkohol und ähnliche Substanzen benützt. Der isoelektrische Punkt des Insulins liegt bei etwa PH 5,6. Außer in angesäuertem oder alkalischem Wasser ist Insulin in schwach saurem Methyl- und Äthylalkohol sowie in hochprozentiger Kar-

bolsäure und in 90% Essigsäure löslich. In Aceton und Äther ist es völlig unlöslich und kann mit diesen Stoffen aus seinen Lösungen in Alkohol und Eisessig gefällt werden. Die Darstellung des kristallisierten Insulins gelingt am leichtesten aus Rinderpankreas, dessen vorbeschriebene Extrakte durch wiederholte fraktionierte Fällung bei PH 5,6 mittels Brucinacetat in der Kälte in wenigen Tagen leicht zur Kristallisation zu bringen sind. Vor kurzem hat D. A. Scott eine interessante Beobachtung mitgeteilt, die früher auch von anderen gemacht, mit dem Hinweis auf naheliegende Verunreinigungen nie weiter beachtet worden war. Scott fand, daß in der Insulinasche von reinsten kristallisierten Präparaten eine immer konstante Menge von Schwermetallen vorkam. Das normale Pankreas enthält kleine Zinkmengen; auch kristallisiertes Insulin ist zinkhaltig. Versuche von Scott, die Kristallisation mit zinkfreien Reagenzien zu bewerkstelligen, schlugen fehl; Zusätze von 2 mg $ZnCl_2$ auf 100 ccm Pufferlösung genügten, um eine prompte Kristallisation hervorzurufen. Ähnliche Ergebnisse lieferten Cadmium- und Cobaltsalze. Ob das schlechte Kristallisationsvermögen des Schweineinsulins auf Metallmangel zurückzuführen ist, müssen weitere Versuche lehren. Nach den bisherigen Erfahrungen lassen sich aus 2 g Rohinsulin höchster Wirksamkeit 0,5 g Kristallinat gewinnen.

Die Wirksamkeit des Insulins wird geprüft an seiner blutzuckersenkenden Wirkung gegenüber normalen, nach bestimmten Richtlinien ernährten Kaninchen. Vor dem Versuch selbst dürfen die Tiere 18 Stunden nichts gefressen haben. Die Injektion der zu prüfenden Präparate erfolgt auf dem Rücken unter das Fell. Man bestimmt den Anfangsblutzucker sowie den Stand 2 Stunden nach der Injektion. Um sichere Resultate zu gewinnen, ist eine sehr große Anzahl von Tieren notwendig. Das Präparat wird in 4 steigenden Dosen an je 3 Kaninchen appliziert. Eine gleiche Anzahl von Tieren dient zur Kontrollbestimmung, die mit einem internationalen Standardpräparat ausgeführt wird. 0,125 mg des internationalen Standardpräparates nennt man eine internationale Einheit. 1 mg kristallisiertes Insulins enthält auf Grund von Tausenden von Bestimmungen 20 bis 25 I.E., gleichgültig, wo die Untersuchung durchgeführt wird. Die Mühseligkeit der Vermessung eines

Präparates mag aus der Tatsache sprechen, daß hierzu 250 bis 500 Blutzuckerbestimmungen notwendig sind.

Das Insulin kristallisiert in Form sechseckiger Täfelchen oder in Rhomboedern; der uncharakteristische Schmelzpunkt liegt bei 233 Grad; Insulin ist optisch aktiv und dreht im sauren Gebiet etwa -70 Grad nach links, im alkalischen in der gleichen Richtung, aber nur zweidrittel bis halb so stark. Es ist charakterisiert durch einen hohen 3% betragenden Schwefelgehalt. Die getrocknete Substanz hat die Summenformel $(C_{45}H_{75}O_{17}N_{11}S)_n$. Dingemans aus dem Laboratorium Laqueurs in Amsterdam hat durch Absorption des Insulins an Tierkohle und nachfolgende Elution mit Phenol Präparate erhalten, die viermal stärker als das kristallisierte Insulin gewesen sein sollen. 1929 hat Dirscherl aus dem Heidelberger Institut diese Versuche in Amsterdam nachgeprüft und sie einige Male bestätigen können. Meine Versuche, die in Amsterdam von Dirscherl gewonnenen Präparate, die sofort nach ihrer Herstellung unter Wasserstoff eingeschmolzen und in eisgekühlten Thermosflaschen mit dem Nachtschnellzug nach Heidelberg geschickt waren, ebenda zu vermessen, haben immer kleinere Wirksamkeiten als die in Amsterdam gefundenen und auch kleinere als die des kristallisierten Insulins ergeben. Dirscherl hat nach seiner Rückkunft, und nach ihm auch Scott und andere, diese Ergebnisse nicht mehr reproduzieren können. Es dürfte heute außer jedem Zweifel stehen, daß das kristallisierte Insulin die letzte stabile und überhaupt wirksamste Form des Insulins darstellt.

Nachdem schon die ersten Versuche am Insulin, die hauptsächlich auf seine Reindarstellung hinzielten, mit Sicherheit den Eiweißcharakter dieser Substanz erwiesen hatten, war es naheliegend, analog dem Beispiel des Hämoglobins und des Thyreoglobulins die Abspaltung der lange vermuteten prosthetischen Gruppe zu versuchen. Aus dem Röntgendiagramm des kristallisierten Insulins haben sich nur die Röntgeninterferenzen amorpher Stoffe herleiten lassen; es ist möglich, daß ein Insulinkristall sich aus untereinander nicht immer ganz identischen Molekülen zusammensetzt.

Eine der ersten Aufgaben war die gewesen, Anhaltspunkte über die mutmaßliche Molekulargröße des Insulins zu erhalten.

Der hohe Schwefelgehalt des Insulins mit 3% wurde infolge des Fehlens von Hinweisen auf freie Sulfhydrylgruppen, auf den Disulfid-Schwefel des Cystins bezogen, und *D u V i g n e a u d* hat unter der Annahme einer Cystingruppe ein Molekulargewicht von 2000 berechnet. Die amerikanischen Autoren haben gefunden, daß 37% des Gesamtschwefels im Insulin durch Alkali als sogenannter sodalabiler Schwefel abgespalten werden können. Sie haben mit dieser Reaktion, die unter viel zu scharfen Bedingungen zu einer Inaktivierung des Insulins führt, diese zu erklären versucht. Wir haben später gefunden, daß Insulin schon mit $n/30$ Alkali bei 34 Grad in 3 Stunden praktisch vollkommen inaktiviert wird. Im Laufe dieser Inaktivierung läßt sich durch *N e ß l e r s* Reagenz eine Farbreaktion erhalten, die parallel zur Inaktivierung an Intensität zunimmt und nach der Zerstörung der physiologischen Wirksamkeit trotz weiterer Alkalieinwirkung stehen bleibt. Wir haben uns durch Modellversuche an Aminosäuren, Peptiden sowie einigen Eiweißkörpern überzeugen können, daß diese Reaktion dort entweder gar nicht oder in einer ganz anderen Richtung verläuft. Wir haben die Färbung, die nach dieser milden Alkalihydrolyse mit *N e ß l e r s*chem Reagenz zu erhalten war, ursprünglich als durch Ammoniak bedingt angesehen. Später zeigte sich, daß zunächst Schwefelwasserstoff und erst später Ammoniak abgespalten wird. Durch Verfeinerung der Messung ließ sich zeigen, daß die zu Beginn der Inaktivierung auftretende *N e ß l e r*-Färbung fast nur durch Schwefelwasserstoff bedingt wird. Aus den abgespaltenen Mengen läßt sich ein Molekulargewicht, oder besser gesagt ein Wirkungsäquivalent von 10 bis 20 000 ableiten. *The S v e d b e r g* hat in seinen Sedimentationsversuchen eine Teilchengröße von 35 000 im Bereich des isoelektrischen Punkts festgestellt; *Scott* hat durch seine neuesten, schon beschriebenen Kristallisationsversuche unter Zusatz von Metallsalzen aus den Metallanalysen für das Zink-, Cadmium- und Kobaltsalz des Insulins Metallmengen gefunden, die unter der Annahme von 3 Atomen Metall zu einem Molekulargewicht von 40 000 führen.

Die nun zu beschreibenden Feststellungen sind aus Versuchen hervorgegangen, die die maßgebenden Atomgruppierungen des Insulins dadurch zu ermitteln versuchten, daß die Be-

dingungen verglichen wurden, unter denen das Hormon seine Wirksamkeit verliert und wiedergewinnt. Diese Methodik hat sich bei chemisch undefinierten, aber physiologisch gekennzeichneten Naturstoffen durchaus bewährt. Zunächst sind die Ergebnisse einiger physikalisch orientierter Versuche zu besprechen.

I. Physikalische Versuche.

Bei der schon erwähnten Inaktivierung des Insulins durch schwaches Alkali war ein merkwürdiger Zusammenhang zwischen dem Verlust der physiologischen Wirksamkeit und einer Änderung der optischen Aktivität des Insulins beobachtet worden. Die ursprüngliche Drehung von -50 Grad steigt im Laufe von $1\frac{1}{2}$ Stunden bis auf maximal -70 Grad und fällt in weiteren $1\frac{1}{2}$ Stunden etwas unter den Anfangswert, um dort stehenzubleiben. Der überwiegende Teil der Wirksamkeit des Insulins geht im ersten Teil der Drehungsänderung zu Verlust, nämlich während des Anstiegs. Mit einer gruppenweisen Racemisierung kann die Drehungsänderung, die unter ähnlichen Umständen das Arginin im Peptidverband sowie das Ornithin und das Prolin zeigen, schwerlich zusammenhängen, da dann am Ende der Reaktion noch ein Teil der Wirksamkeit zu erwarten wäre, eventuell sogar die Hälfte.

Man durfte außer der Änderung der optischen Aktivität mit einem gewissen Recht auch auf eine Änderung des Absorptionsspektrogramms schließen. Im sichtbaren Teil erfährt das Spektrum des Insulins bei zahlreichen chemischen Einwirkungen keine Änderung; die Analyse war infolgedessen auf die Untersuchung des ultravioletten Teils angewiesen. Das Spektrogramm des genuinen Insulins ist charakterisiert durch eine steile Zunahme der Extinktion in der Gegend um 3000 \AA , sowie ein Maximum bei 2750 \AA , und ein Minimum bei 2500 \AA . Von hier ab bis in die Gegend um 1800 \AA steigt die Extinktion erneut ohne irgendwelche Besonderheiten zu zeigen an. Zahlreiche spektrographische Vermessungen des alkaliinaktivierten Insulins haben nicht die allergeringsten Veränderungen im Vergleich zum intakten Insulin feststellen lassen.

Das Aussehen des Diagramms ist typisch für Substanzen, die aromatische Aminosäuren sowie Cystin enthalten. Das Absorptionsspektrogramm eines Gemisches von je 1 Mol Tyrosin

und Cystin ist dem des Insulins recht ähnlich. Aus der Größe des Extinktionskoeffizienten der beiden Spektrogramme im Maximum ergibt sich ein logarithmischer Unterschied von 0,55, d. h. also, daß unter der Annahme, daß außer Cystin und Tyrosin keine stärker absorbierenden Substanzen im Insulin enthalten sind, diese beiden Aminosäuren um das $3\frac{1}{2}$ fache verdünnt, also zu ca. 30%, im Insulin vorkommen müssen. Hydrolyseversuche der amerikanischen Forscher haben diese Vermutungen bestätigt. Wenn bei der Alkaliinaktivierung des Insulins auch nicht die geringste spektrographische Veränderung zu beobachten war, so ist das ein Beweis dafür, daß von den das Insulin charakterisierenden aromatischen Aminosäuren und dem Cystin nur ein sehr kleiner Teil mit der sogenannten wirksamen Gruppe im Insulinmolekül etwas zu tun haben kann, daß also mit anderen Worten von den 37% sodalabilen Schwefels nur ein Bruchteil, vielleicht ein Zwanzigstel, am Aufbau der sogenannten spezifischen Gruppierung beteiligt ist. Wir haben zeigen können, daß es eine ganze Reihe chemisch bedingter Inaktivierungen des Insulins gibt, die ohne Änderung des Spektrogramms verlaufen, daß aber andererseits eine Änderung des Spektrogramms stets auch von einem Wirksamkeitsverlust begleitet ist. Es ist bekannt, daß Insulin durch ultraviolettes Licht zerstört wird. Ich habe die Gegend des Maximums und des Minimums der Insulinabsorption unter Vorschaltung geeigneter Filter mit Quecksilberlicht bestrahlt und gefunden, daß eine rasche Zerstörung einsetzt, sofern nur das Licht zwischen 2725 \AA bis 2400 \AA von den Filtern durchgelassen wird. Diese Feststellung hat erneut die Wichtigkeit des Cystins und wohl auch des Tyrosins dargetan. Es ist selbstverständlich, daß das Spektrogramm nach der Bestrahlung verändert war. Sowohl das Maximum wie auch das Minimum steigen an, das Minimum aber viel stärker als das Maximum, so daß nach genügend langer Zeit beide in eine kontinuierliche Absorption übergehen. Auch das Gemisch gleichmolarer Mengen Tyrosin und Cystin zeigt nach der Bestrahlung ein ähnliches Verhalten.

Angeregt durch die eigentümliche Drehungsbeobachtung während der Alkaliinaktivierung des Insulins habe ich die optische Aktivität auch im Bereich des UV. untersucht. Im

Vergleich zum intakten Insulin ist die Drehung alkali-inaktivierter Produkte etwas höher; ich habe die Drehung bis in den Bereich von 2600 Å verfolgt und beobachtet, daß die sonst häufigen Anomalien der Rotationsdispersion nicht auftraten, daß vielmehr ein beschleunigter Drehungsanstieg bis auf minus 1000 Grad eintritt. Tyrosin, das im sichtbaren Spektralbezirk schwach links dreht, ist bei 3500 Å scheinbar inaktiv und wird dann rechtsdrehend mit plus 2000 Grad bei 2500 Å. Cystin dagegen als überhaupt stärkstdrehende Aminosäure bleibt linksdrehend und erreicht bei 2550 Å minus 2500 Grad. Tyrosin und Cystin zusammengenommen liefern eine Rotationsdispersion, die vom Insulin jedenfalls nicht prinzipiell abweicht. Durch UV.-Bestrahlung des Insulins eine selektive Zerstörung der wirksamen Gruppe zu erreichen, ist unmöglich. Auf Grund einer überschlagsweisen Bestimmung der Quantenausbeute ergab sich, daß etwa nur jedes hundertste Quant das Insulinmolekül an seiner empfindlichen Stelle trifft, ein Molekulargewicht des Insulins von 18 000 vorausgesetzt, sowie das Fehlen von Kettenreaktionen, die bei der starken Verdünnung der Insulinlösungen wohl weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

II. Chemische Versuche.

Die nun folgende Besprechung bezieht sich auf rein chemisch orientierte Versuche, die einerseits angestellt worden waren, um mit Hilfe bestimmter Gruppenreagenzien, die eine Inaktivierung des Insulins bedingen, ein Bild der wirksamen Gruppe bzw. der wirksamen Gruppen des Insulinmoleküls zu erhalten; andererseits galt es, Reagenzien zu finden, die in möglichst kleinen Mengen und selektiv die zur physiologischen Wirksamkeit notwendigen Gruppen inaktivierten. Es gibt Reagenzien, die wie Phenylhydrazin, Hydroxylamin oder aromatische Aldehyde die Wirksamkeit nicht beeinträchtigen. Wieder andere, wie schwaches Alkali, Essigsäureanhydrid, Diazomethan, alkoholische Salzsäure, Formaldehyd, Schwefelwasserstoff oder Cystein inaktivieren Insulin unter entsprechend gewählten Bedingungen so, daß eine rückläufige Aktivierung durch andere Reagenzien, wenigstens zum Teil, wie-

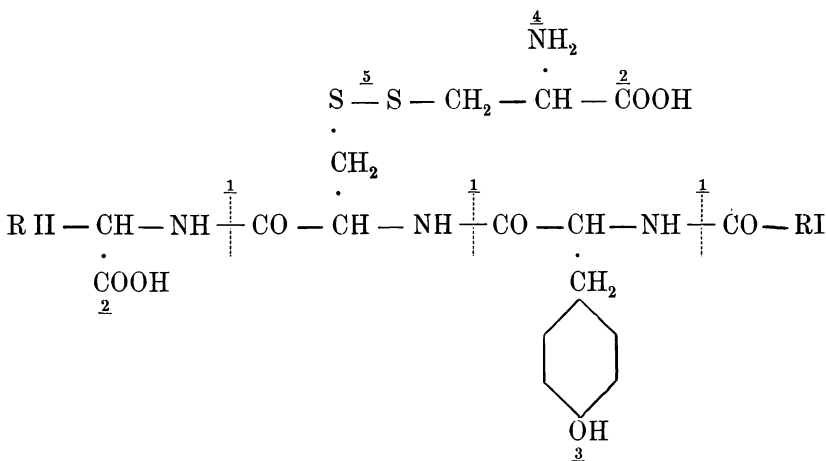
der möglich ist. Irreversible Zerstörungen werden bewirkt durch Phenylisozyanat, Wasserstoffpersulfid, naszierenden Wasserstoff, Cyanide, Ascorbinsäure, Hydrochinon, Jod, Wasserstoffperoxyd und ganz besonders durch Benzopersäure. Ferner noch durch salpetrige Säure und Natriumsulfit; schließlich sind noch die Fermente zu erwähnen, die, sofern sie das Eiweißgerüst des Insulins angreifen, auch eine Inaktivierung zur Folge haben, die irreversibel ist und in keiner Parallelität zum Zuwachs der titrierbaren freien Aminogruppen steht. Inaktiviert wird das Insulin durch Pepsin, Papain — mit und ohne Blausäure —, durch Trypsin-Kinase und Kathepsin, während kinasefreies Trypsin, Aminopolypeptidase und Dipeptidase weder die wirksame Gruppe noch die Eiweißkette angreifen. Die ursprüngliche Hoffnung, aus dem Verdauungsgemisch niedriger-molekulare, physiologisch wirksame Sprengstücke zu erhalten, hat sich als trügerisch erwiesen. Die schon weiter oben als typisch bezeichnete, durch Alkali bedingte Schwefelwasserstoffabspaltung war nach der fermentativen Hydrolyse in keinem Fall mehr feststellbar.

In diesem Zusammenhang sei auch die Hydrolyse des Insulins durch 25%ige Schwefelsäure mitgeteilt, die die amerikanischen Forscher H. Jensen und Oskar Wintersteiner mit 4 g kristallisiertem Insulin — das sind 100 000 I.E. —, ausgeführt haben. Neun Zehntel der Eiweißbausteine des Insulins sind heute mengenmäßig bekannt. Es wurden gefunden 12% Tyrosin, 12% Cystin, 21% Glutaminsäure, 30% Leucin, 3% Arginin, 8% Histidin, 2% Lysin, ferner wenige % von Prolin und Phenylalanin. Tryptophan wurde wie in früheren Hydrolysaten so auch jetzt nicht gefunden, die Anwesenheit von Valin ist zweifelhaft.

Der Versuch ist naheliegend, sämtliche am Insulin gemachten Beobachtungen und Erfahrungen unter einen Generalnenner zu bringen, um so einen Einblick in die mutmaßliche Struktur des Inselhormons zu gewinnen.

Das Insulin ist eine Eiweißsubstanz von sehr hohem Molekulargewicht und einem Cystin- und Tyrosingehalt, der den aller bekannten löslichen Eiweißstoffe übertrifft. Es existiert zur Zeit kein Befund, der darauf hinwiese, daß kleinere wirksame Spaltstücke, als sie das kristallisierte Insulin dar-

stellen, zu finden wären. Hingegen ist es wahrscheinlich, daß die sehr hochwirksamen amorphen Insuline, die man aus wenig wirksamen Präparaten durch Hitzeoagulation in n/10 salzsaurer Lösung erhalten kann, ein etwas anderes Gefüge haben. Eine bestimmte sehr bedeutende Molekülgröße scheint alle wirksamen Insuline zu charakterisieren. Am Aufbau eines Insulinmoleküls beteiligen sich etwa 150 Moleküle der verschiedenen Aminosäuren. 10 von diesen sind Cystin; aber nur einem einzigen der 10 Cystinmoleküle scheint eine ganz besondere Bedeutung zuzukommen; es ist auffallend labil in den Peptidverband eingebaut; seine Integrität ist maßgebend für die physiologische Wirksamkeit. An Hand der folgenden rein schematischen und nur ad hoc aufgestellten Formulierung eines Teilstücks des Insulinmoleküls können die bisherigen chemischen Forschungsergebnisse näher demonstriert werden.



R I und R II sind Fortsetzungen der Eiweißkette.

Die physiologische Wirksamkeit des Insulins kann auf sehr verschiedene Weise zerstört werden. Hiefür sprechen einige Befunde mit Reagenzien, die die empfindlichste Stelle im Molekülbau, nämlich irgendeine der etwa 10 S-S-Gruppen, höchstwahrscheinlich intakt lassen.

Aus Zweckmäßigkeitsgründen unterteilt man die einzelnen die Wirksamkeit des Insulins beeinträchtigenden chemischen Reaktionen in drei Gruppen.

A.

Die S-S-Brücke bleibt wahrscheinlich unangetastet.

Durch fermentative Spaltung (Angriff bei 1 im Formelbild) findet eine mit Inaktivierung einhergehende Molekülverkleinerung statt; beim Pepsin genügt bereits ein Zuwachs von 0,5% des nach Willstätter titrierbaren Aminostickstoffs, um völlige Unwirksamkeit hervorzurufen; aktivierte Trypsin läßt die physiologische Wirksamkeit erst nach einer Aufspaltung entsprechend 5% freiem Aminostickstoff verschwinden. Die Veresterungsversuche mit alkoholischer Salzsäure (Angriff bei 2 im Formelbild), die Carr durchgeführt hat, erfassen zweifelsfrei vorwiegend die Carboxylgruppen der Eiweißkette; durch rückläufige Verseifung mit schwachem Alkali können die Insulinester, die selbst ganz unwirksam sind, wieder völlig aktiviert werden. Die Methylierung mit Diazomethan (Angriff bei 3 und 2 im Formelbild, später auch 4), die ungemein rasch verläuft, aber durch Eisessig momentan abzustoppen ist, erfaßt phenolische Hydroxylgruppen sowie Carboxylgruppen. Aliphatische OH-Gruppen sowie Amine werden praktisch nicht methyliert. Hier ist im Gegensatz zu den Insulinestern eine vollständige Regenerierung von auch nur teilweise inaktiven Präparaten nicht mehr möglich. Insulin, das mit alkoholischer Salzsäure 6 Stunden lang behandelt ist, nimmt 3,9% Aethoxyl auf, die bei alkalischer Verseifung wieder völlig abgespalten werden. Insulin, das $\frac{1}{2}$ Minute mit Diazomethan methyliert und völlig inaktiv war, enthält 2,6% Methoxyl, nach der Verseifung aber noch 1,2% nicht abspaltbares Methoxyl; die Wirksamkeit solcher Regenerate beträgt noch 30%. Auch bei der Methylierung werden die Carboxylgruppen erfaßt, ferner die OH-Gruppen des Tyrosins, sofern sie frei sind, aber, wenn auch langsam, auch die Alphaaminogruppen, da nach der Methylierung der Van-Slyke-Stickstoff um 80% vermindert ist. Ferner ist aus durchmethylierten nicht mehr regenerierbaren Insulinen durch Alkali kein Schwefelwasserstoff mehr abzuspalten.

Einer Azetylierung mit Essigsäure-Anhydrid und Pyridin unterworfenen Insulin (Angriff bei 3 und 4 im Formelbild)

ist ebenfalls unwirksam, kann aber durch Alkali zu 40% wieder regeneriert werden, bei Azetylierung in Eisessig sogar bis zu 80%. Während der Azetylierung nimmt Insulin $3\frac{1}{2}\%$ Azetyl, und zwar in erster Linie O-Azetyl auf; das Regenerat enthält noch 0,8% Azetyl. Es ist wahrscheinlich, daß auch ein Teil der Aminogruppen azetyliert wird, doch dürfte auf Grund der leichten Abspaltbarkeit der ganz überwiegende Teil an den Hydroxylgruppen des Tyrosins verankert werden. Die Wichtigkeit intakter Aminogruppen hat sich durch Versuche mit Formaldehyd nachweisen lassen (Angriff bei 4 im Formelbild). Läßt man Formaldehyd nach Art der Sørensen'schen Formoltitration auf Insulin einwirken, so erhält man unwirksame Präparate, die durch Erhitzen mit schwach angesäuertem Wasser zu 20% regenerierbar sind. Die schlechte Regenerierbarkeit läßt sich auf Oxazolinringbildungen, die Bergmann an verschiedenen Aminosäuren gezeigt hat, zurückführen; bei der Einwirkung von Formaldehyd in Eisessig tritt diese Ringbildung nicht auf; solche Präparate sind fast völlig regenerierbar.

Vor kurzem hat Jensen die Reaktion des Insulins mit Phenylisocyanat beschrieben, wodurch Insulin irreversibel zu 95% inaktiviert wird (Angriff bei 4 im Formelbild). Nach der Inaktivierung ist kein freier Aminostickstoff nach Van Slyke mehr nachweisbar, und nach einer milden Alkalihydrolyse findet keine Neßler-Reaktion mehr statt. Daraus ist zu schließen, daß die für das Insulin so charakteristische diese Reaktion liefernde Gruppierung eine solche ist, die selbst oder deren unmittelbare Nachbarschaft mit Isocyanat reagiert.

B.

Die S-S-Brücke wird angegriffen. Die Reaktionen sind aber zum Teil reversibel.

Die Einwirkung schwefelhaltiger Reagenzien auf das Insulin hat die Schwefelfrage im Insulin selbst in ein neues Licht gerückt. Insulin kann durch Sulfhydrylverbindungen wie Schwefelwasserstoff, Cystein, SH-Glutathion sowie Thioglycolsäure unwirksam gemacht werden (Angriff bei 5 im Formel-

bild). Bei den Sulphydrylverbindungen beruht die Wirkung auf einer Reduktion im Sinn der Gleichung: $R_1 - S - S - R_2 + H_2 = R_1 - S - H + R_2 - S - H$, von der man nicht wußte, daß sie beim Insulin unter bestimmten Bedingungen auch rückwärts verläuft. Der Vorgang der Insulininaktivierung, z. B. durch Cystein, ist offenbar der, daß aus Insulin nach der Gleichung: $Ins - S - SR + H_2 = Ins - SH + RSH$ entsteht. Versucht man dieses reduzierte Gemisch zu oxydieren, dann findet aus reaktionskinetischen Gründen infolge der kleinen Konzentration der RSH-Bruchstücke eine Wiedervereinigung zu $Ins - S - SR$ in größerem Umfang nicht statt. Nimmt man aber die Oxydation in Gegenwart eines großen Cystein-Überschusses vor, dann wird in der Tat eine Regeneration bei nicht völlig inaktivierten Insulinen erreicht. Dabei ist noch durchaus unsicher, ob das bei der Reduktion des Insulins abgespaltene Bruchstück RSH tatsächlich Cystein war oder ein ganz bestimmtes cysteinhaltiges Peptid. Daß letzteres keine notwendige Voraussetzung für die Regenerierung ist, hat das Experiment bewiesen. Es war naheliegend, nach diesem gelungenen Versuch die Regenerierung durch Cystein in all denjenigen Fällen zu probieren, bei denen mit einer Aufspaltung des Insulins zur SH-Form zu rechnen war. Dazu gehörte das durch Alkalihydrolyse geschädigte Insulin sowie das UV.-bestrahlte Insulin, die beide in Gegenwart von Cystein durch Wasserstoffsperoxyd wenigstens teilweise zu regenerieren sind.

C.

Die S-S-Brücke wird irreversibel angegriffen.

Die Reaktion des Insulins mit Sulfit konnte in ihrem Mechanismus erkannt werden, seit Clark am Cystin die Reaktion nach der Gleichung bewies: $R_1 - S - S - R_2 + Na_2SO_3 = R_1 - S - SO_3Na + NaSR_2$. Nach der gleichen Reaktion verläuft die Insulininaktivierung, die bisher noch nicht rückläufig zu machen war.

Die hier gemachten Mitteilungen über die Beteiligung des Schwefels am Aufbau der physiologisch wirksamen Anordnung innerhalb des Insulinmoleküls erklären nun auch die Wirkung

des Jods, durch das das Insulin infolge Oxydation und Schwefelabspaltung schwefelärmer wird. Es scheint, als ob dem Disulfid-Sulphydryl-System eine jedenfalls hauptsächliche Bedeutung am Zustandekommen der physiologischen Wirksamkeit beizumessen ist. Daß dabei nur einer oder zwei der etwa 10 Cystinbausteine im Insulin ursächlich beteiligt ist, wurde früher gezeigt.

Amerikanische Autoren haben eine Insulininaktivierung mit Benzaldehyd beschrieben und sie auf die Bildung von Benzylidenverbindungen bezogen. Reinsten Benzaldehyd reagiert jedoch weder mit Insulin noch inaktiviert er es. Eine Zerstörung des Insulins mit altem persäurehaltigem Aldehyd dagegen erfolgt sehr rasch und irreversibel. Die Benzopersäure-Inaktivierung ist so selektiv, daß ich daraus das Molekulargewicht des Insulins bzw. sein Wirkungsäquivalent mit über 10 000 habe herleiten können. Ähnlich, wenn auch langsamer als die Benzopersäure, wirken Wasserstoffperoxyd sowie Benzoylperoxyd. Diese Reaktion muß als eine Oxydation an einer S-haltigen Gruppe gedeutet werden.

Faßt man die wenigen Ergebnisse, die im Laufe von Jahren mühsam erarbeitet wurden, zusammen, dann stellt sich das Insulin als eine viel Tyrosin und Cystin enthaltende Eiweißsubstanz dar, in der sich offenbar keine eiweißfremden und neuartigen Bausteine finden. Die besondere Verknüpfung bekannter Eiweißbausteine allein scheint zu genügen, um einen physiologisch so wirksamen Körper entstehen zu lassen wie ihn das Insulin darstellt. Der große prozentuale Anteil von Tyrosin und Cystin im Molekülverband des Insulins läßt auf eine Beteiligung dieser beiden Aminosäuren am Aufbau des wirksamen Prinzips schließen. Es wäre abwegig, aus der verhältnismäßig großen Stabilität, durch die diese Aminosäuren, losgelöst aus dem Peptidverband, verglichen mit dem empfindlichen Insulin, ausgezeichnet sind, ihre Beteiligung ablehnen zu wollen. M. Bergmann, aber auch Schöberl haben gezeigt, daß gerade das Cystin im Peptidverband ganz andere Eigenschaften und Empfindlichkeiten zeigt als im isolierten Zustand.

Seit der Nachweis geführt werden konnte, daß das Insulin jedenfalls chemisch einen Eiweißkörper darstellt, stand es fest,

daß eine Synthese des kristallisierten Insulins nicht möglich sein würde.

Wenn dennoch die Konstitutionsforschung nicht ruht, den Feinbau des Insulinmoleküls zu untersuchen, so deswegen, um gerade die scheinbar einfachen Wege und Mittel kennen zu lernen, deren sich die Natur bedient, um solch hochaktive Substanzen entstehen zu lassen. Es ist nicht auszuschließen, daß es eines Tags gelingt, eine wirksame Substanz zu finden, die Insulineigenschaften besitzt; es scheint nicht aussichtslos, sie unter den cystinhaltigen Peptiden zu suchen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sitzungsberichte der Physikalisch-Medizinischen Sozietät zu Erlangen](#)

Jahr/Year: 1935-1936

Band/Volume: [67-68](#)

Autor(en)/Author(s): Eyer Hermann

Artikel/Article: [Über die Chemie des Insulins. 329-344](#)