

377. Kurt Felix und Ernst Waldschmidt-Leitz: Zur chemischen Natur des Insulins (VII. Mittell. zur Spezifität tierischer Proteasen¹⁾).

[Aus d. Laborat. d. II. Medizin. Klinik u. d. Chem. Laborat. d. Bayerisch. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 6. September 1926.)

Die Frage nach der chemischen Natur des Insulins haben die neuen Untersuchungen von J. J. Abel²⁾ in ein entscheidendes Stadium gerückt. Die Isolierung des Hormons in reiner, krystallisierter Form, die beschrieben wird, läßt erwarten, daß man bald über seine Zusammensetzung und über seine Bausteine näheren Aufschluß erlangen wird. Allein der Vorrang, der den amerikanischen Forschern in der weiteren Bearbeitung dieses wichtigen Körpers gebührt, schließt den Versuch nicht aus, durch Anwendung neuer analytischer Verfahren auch auf unreineres Hormon-Material zur Kenntnis seiner chemischen Eigenart beizutragen. Die Eigenschaften und die Reaktionen, die Abel für den reinen Stoff beschrieben hat, deuten auf eine amphotere, und zwar eine protein-artige Natur des Insulins; die alten Erfahrungen über die Unbeständigkeit des Hormons gegenüber proteolytischen Enzymen und die Schlußfolgerungen, welche man daran zu knüpfen hatte, erfahren damit eine neue Bestätigung, wenn nicht der aktive Stoff nur in Assoziation mit einem Protein vorliegt. Es wird so eine der nächsten Aufgaben der Insulin-Forschung, die die Abelsche Untersuchung von neuem aufgeworfen hat, in der Frage bestehen, welcher Gruppe protein-artiger Stoffe das Pankreas-Hormon zuzuordnen ist, und ob man es als einen höhermolekularen Körper oder aber, wie man aus der guten Krystallisationsfähigkeit schließen möchte, als ein einfacheres Peptid anzusehen hat. Die spezifische Angreifbarkeit des Hormons durch einheitliche proteolytische Enzyme, die nun zugänglich sind und über deren Spezifität der eine von uns (Waldschmidt-Leitz) Erfahrungen gesammelt hat, wird man bei der Beantwortung dieser Frage zu berücksichtigen haben.

Es fehlt in der Literatur nicht an Angaben über die Zerstörung der hormonalen Wirksamkeit unter der Einwirkung der verschiedensten proteolytischen Enzyme. Nach F. G. Banting und C. H. Best³⁾ wird die Wirkung des Insulins durch Trypsin und Pepsin, nach E. J. Witzemann und L. Livshis⁴⁾ auch durch Papain zerstört; allein man hat in diesen Fällen die Wirkung des aktivierten Pankreas-Trypsins, der Trypsin-Kinase, noch nicht von der des kinase-freien Enzyms und von der des beigemengten Pankreas-Erepsins zu unterscheiden vermocht. Auch die Angaben von H. A. Shonle und J. H. Waldo⁵⁾, nach welchen eine Zerstörung der Wirksamkeit durch alle untersuchten Proteasen, Pepsin, Papain, Trypsin und Erepsin, zu beobachten sei, beziehen sich nicht auf die Wirkung einheitlicher enzymatischer Individuen.

¹⁾ Frühere Mitteilungen: B. **58**, 1356 [1925]; H. **147**, 286, **149**, 203, 221 [1925], **151**, 31 [1925/26], **156**, 114 [1926].

²⁾ Proc. Nat. Acad. Scienc. Wash. **12**, 132 [1926].

³⁾ Journ. Lab. and Clin. Med. **7**, 251 [1921/22].

⁴⁾ Journ. Biol. Chem. **57**, 425 [1923].

⁵⁾ Journ. Biol. Chem. **58**, 731, und zwar S. 735 [1923/24].

Unterscheidende Merkmale in der Angreifbarkeit durch verschiedene Proteasen sind also noch nicht beobachtet worden. Sie ergeben sich indessen aus der Anwendung gereinigter, einheitlicher Enzyme, z. B. der Pankreas-Proteasen, über deren Gewinnung E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck⁶⁾ zuerst berichtet haben. Es hat sich gezeigt, daß die Wirksamkeit des Insulins durch Pepsin, sowie durch das aktivierte Trypsin, das System Trypsin-Kinase, glatt und vollständig zerstört wird, daß sie dagegen durch die Einwirkung des nicht-aktivierten, kinase-freien Trypsins und ebenso durch die des trypsin-freien Erepsins überhaupt nicht beeinträchtigt wird. Diese Feststellung, die den Erfahrungen bei der Isolierung des Hormons aus der Pankreasdrüse entspricht, scheint uns von Bedeutung für die Beurteilung der chemischen Natur des Insulins. Die Beständigkeit gegenüber dem nur einfache Peptide spaltenden Erepsin macht die Annahme sehr unwahrscheinlich, daß das Hormon, etwa wie das Glutathion, als ein einfaches Peptid von besonderem Reaktionsvermögen anzusehen sei; denn auch die besondere Natur der Amino-säure-Komponenten in einfachen Peptiden ist nach Beobachtungen bei der Hydrolyse des Histons, über die E. Waldschmidt-Leitz und G. Künstner demnächst berichten werden, für die Spezifitäts-Unterschiede zwischen tryptischem und ereptischem Enzym nicht allein verantwortlich. Aber auch das tryptische Enzym, das einfachere Proteine, wie manche Protamine oder auch Peptone, auch ohne eine Aktivierung durch Enterokinase anzuspalten vermag, wirkt für sich allein auf das Pankreas-Hormon nicht ein; es bedarf dazu, wie bei höhermolekularen Proteinen, der Mitwirkung von Enterokinase. Wenn man es daher auf Grund dieser Erfahrungen unternimmt, das Insulin nach seiner enzymatischen Angreifbarkeit mit bestimmten Gruppen protein-artiger Stoffe zu vergleichen, und wenn, wie man annehmen darf, die mitgeteilten Beobachtungen auch mit dem reinen Hormon sich bestätigen werden, so ist daraus zu folgern, daß das Insulin den höhermolekularen Proteinen strukturell näher stehen wird als den einfachen Peptiden.

Beschreibung der Versuche.

Die Bestimmung eines Hormons wie des Insulins, so wie sie vorgenommen wird, ist, wengleich man seine Menge in gewissen Einheiten ausdrückt, noch nicht im Sinne einer streng quantitativen Methode zu werten, wie etwa die Messung eines enzymatischen Katalysators; sie hat zu sehr mit der wechselnden Empfänglichkeit des lebenden Versuchsmaterials zu rechnen. Die Belege, die wir in den folgenden Tabellen für die hormone Wirksamkeit der angewandten Insulin-Lösungen anführen, erlauben daher eher Schätzungen als quantitativ sichere Vergleiche. Allein die Unterschiede, die sich für die Aktivität der Präparate nach der Einwirkung der einzelnen Proteasen ergeben, sind so bedeutend, und der Überschuß des angewandten Enzyms ist in jedem Falle so groß, daß sie eine qualitative Unterscheidung der enzymatischen Angreifbarkeit des Insulins rechtfertigen.

Das zu den Versuchen verwandte Insulin-Präparat war von N. V. Organon-Oss bezogen; es enthielt in 1 mg 2 internationale Einheiten. Die in allen Versuchs-Ansätzen angewandte Menge von 7.0 mg war sehr wirksam; sie

⁶⁾ H. 147, 286, 149, 203 [1925].

bewirkte, einem 1180 g schweren Kaninchen subcutan injiziert, eine Herabsetzung des Blutzucker-Gehaltes von 95 auf 42 mg % in 90 und auf 40 mg % in 215 Min., nach 4¹/₂-stdg. Einwirkung setzten starke Krämpfe ein. Um Störungen durch Bestandteile der Protease-Lösungen zu erkennen, beobachteten wir deren Wirkung auf den Blutzucker-Gehalt für sich allein in einem gleichlaufenden Kontrollversuch, dessen Ergebnisse ebenfalls in den Tabellen verzeichnet sind; es wurden also einem zweiten Versuchstiere die nämlichen Mengen der Versuchslösung, nur ohne Insulin, injiziert. Die Bestimmung des Blutzucker-Gehaltes erfolgte nach dem mikro-analytischen Verfahren von H. C. Hagedorn und B. N. Jensen⁷⁾.

Tabelle 1.

Einwirkung von Erepsin.

(10 mg Insulin; 8.0 ccm trypsin-freie Lösung von Darm-Erepsin⁸⁾ mit I.: 0.0015, II.: 0.0023 Er.-E.; 0.02 ccm *n.* NaOH; Gesamtvolumen 10.0 ccm; p_H = 7.6, 30°; Einwirkungs-dauer I.: 4.75, II.: 3.5 Stdn.; injiziert 7.0 ccm Lösung, entspr. 7 mg Insulin.)

Vers.-Nr.	Versuchstier	Gewicht g	Blutzucker (mg %)		Bemerkungen
			zuvor	nach 3 ¹ / ₂ Stdn.	
I	Insulin-Tier	1480	101; 99	63; 61	starb nach einigen Stdn.
	Kontroll-Tier	1470	110; 109	109; 109	
II	Insulin-Tier	1480	100; 96	45	nach 2 Stdn. starke Krämpfe

Tabelle 2.

Einwirkung von Trypsin.

(10 mg Insulin; III.: 2.5, IV.: 6.0 ccm kinase- und erepsin-freie Trypsin-Lösung⁹⁾ mit III.: 1.0, IV.: 1.2 T.-(e.); 0.05 ccm *n.* NaOH; Gesamtvolumen 10.0 ccm; p_H = 7.6, 30°; Einwirkungs-dauer 4 Stdn.; injiziert 7.0 ccm Lösung, entspr. 7 mg Insulin.)

Vers.-Nr.	Versuchstier	Gewicht g	Blutzucker (mg %)		Bemerkungen
			zuvor	nach 3 ¹ / ₂ Stdn.	
III	Insulin-Tier	2220	95; 95	65; 56	darauf Zuckerlsg. injiz.
	Kontroll-Tier	1480	88; 90	100; 99	
IV	Insulin-Tier	1380	91; 98	58; 54	
	Kontroll-Tier	1470	93; 94	100; 96	

⁷⁾ Bio. Z. **135**, 46 [1923].

⁸⁾ Dargestellt nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner, H. **151**, 31, und zwar S. 51 [1925/26].

⁹⁾ Nach E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Graßmann, H. **156**, 68, und zwar S. 84 [1926].

Tabelle 3.

Einwirkung von Trypsin-Kinase.

(10 mg Insulin; V.: 2, VI.: 5 ccm erepsin-freie Trypsin-Lösung¹⁰⁾ mit 1.0 T.-(e.), aktiviert durch 0.5 ccm Enterokinase-Lösung; 0.02 ccm *n.* NaOH; Gesamtvolumen 10.0 ccm; $p_H = 7.6$, 30°; Einwirkungsdauer 4 Stdn.; injiziert 7.0 ccm Lösung, entspr. 7 mg Insulin.)

Vers.-Nr.	Versuchstier	Gewicht g	Blutzucker (mg %)		Bemerkungen
			zuvor	nach 3 1/2 Stdn.	
V	Insulin-Tier	2180	100; 100	100; 101	
	Kontroll-Tier	1460	103; 103	102; 103	
VI	Insulin-Tier	1190	125; 120	91; 96	Gehalt infolge Narkose vor Injektion übernormal
	Kontroll-Tier	1230	148; 140	106; 104	

Tabelle 4.

Einwirkung von Pepsin.

(10 mg Insulin; 5.0 mg Pepsin (Merck, Brit. Pharm.); 1.20 ccm 0.1-*n.* HCl; Gesamtvolumen 5.0 ccm; $p_H = 2.0$, 30°; Einwirkungsdauer 3 1/2 Stdn.; injiziert 3.5 ccm Lösung, entspr. 7 mg Insulin.)

Vers.-Nr.	Versuchstier	Gewicht g	Blutzucker (mg %)		Bemerkungen
			zuvor	nach 3 1/2 Stdn.	
VII	Insulin-Tier	2300	112; 110	100; 100	
	Kontroll-Tier	1680	110; 108	105; 106	

Frl. Dr. A. Harteneck und Hrn. A. Schäffner danken wir für ihre experimentelle Hilfe.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft schulden wir für die gewährten Mittel besonderen Dank.

378. Richard Kuhn und Ludwig Brann: Über die Abhängigkeit der katalatischen und peroxydatischen Wirkung des Eisens von seiner Bindungsweise¹⁾.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akad. d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 6. September 1926.)

Der Einfluß der chemischen Bindung auf das katalytische Wirkungsvermögen von Elementen ist in sehr zahlreichen Fällen erkannt und auch praktisch ausgewertet worden²⁾. Es ist aber im allgemeinen nicht möglich, chemische Konstitution und katalytische Wirksamkeit zahlenmäßig zu vergleichen. Denn die gesuchten Beziehungen werden bei den meist

¹⁰⁾ Nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 147, 286, und zwar S. 306 [1925].

¹⁾ Der wesentliche Inhalt der vorliegenden Abhandlung wurde erstmalig in der Sitzung der Züricher Chemischen Gesellschaft vom 18. Mai 1926 vorgetragen.

²⁾ Eine Übersicht gab A. Mittasch, B. 59, 13 [1926].