

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität,
Berlin, Deutschland.
(Direktor: Prof. Dr. H. Bartelheimer)

INSULIN ALS ANTIGEN. I

Eine klinisch-experimentelle Studie

Von

HERMANN MICHEL

Theoretischer Teil.

Die Stoffwechselstörung des diabetischen Organismus ist auf eine *herabgesetzte Insulinwirksamkeit* zurückzuführen, die sich in mehreren Symptomen des Stoffumsatzes äussert und sich einerseits als *absolute direkte* und *relative indirekte* (Ueberwiegen antagonistischer Wirkstoffe) *Insulinmangelsituation* äussert. Klinisch entspricht der ersteren Situation das Bild des echten *Insulinmangeldiabetes*, während man in letzterem Fall den Begriff der *Insulinresistenz*, der mangelhaften oder überhaupt fehlenden Insulinansprechbarkeit des diabetischen Organismus geprägt hat.

Neben den Spätkomplikationen der Zuckerkrankheit, der *diabetischen Nephropathie*, der *Retinopathia diabetica* und den *peripheren Gefässstörungen*, kann die Insulinresistenz, in jeder Ablaufphase der Zuckerkrankheit auftretend, den behandelnden Arzt vor eine Reihe schwieriger therapeutischer Fragen stellen.

Ehe auf die Begriffsbestimmung der Insulinresistenz, unter Berücksichtigung der Entscheidung, wieweit ihr eine Antigen-Antikörperreaktion zugrundeliegt, eingegangen wird, ist die Frage zu prüfen, ob *Insulin* überhaupt die *Voraussetzungen für ein Antigen* erfüllt.

Die Beurteilung einer Insulinresistenz, die auf Grund des klinischen Gesamteindrucks auf einem echten Antigen-Antikörpermechanismus beruht, wird noch durch den Umstand

erschwert, dass ihr entweder grundsätzlich eine *echte Eiweiss-anaphylaxie* gegenüber *Insulin* oder eine gegen einzelne *Präparate* und deren *Resorptionsverzögerer* zugrundeliegen kann. Das ist immer zu erwägen.

1. DAS INSULINMOLEKÜL ALS ANTIGEN

Die Frage nach der *antigenen Natur des Insulinmoleküls* ist deshalb so schwer und bis jetzt noch nicht schlüssig zu beantworten, weil dieses Hormon als ein lebensnotwendiger Wirkstoff unmittelbar in die zellulären Stoffwechselabläufe eingreift, Grenzflächenphänomene bzw. Permeabilitätsvorgänge beeinflusst und enzymatischen Abbaumechanismen unterliegt. Das unterscheidet das Insulinmolekül grundsätzlich von körperfremden Antigenen, die keine Stoffwechselfunktionen im zu sensibilisierenden bzw. bereits sensibilisierten Organismus ausüben.

H. Schmidt hat drei Voraussetzungen aufgestellt, wann eine Substanz zum Antigen wird und daher zur Antikörperbildung führt. Die *erste* Voraussetzung ist dann gegeben, wenn *Zellen*, in die das Antigen eindringt, zur *Globulinsynthese* befähigt sind. Es ist *zweitens* bedeutsam, dass das *Milieu*, in dem das Antigen zur Antikörper-produzierenden Zelle transportiert wird, *globulinhaltig* ist. Während diese beiden ersten Voraussetzungen für die Diskussion über die Antigenität des Insulinmoleküls bedeutungslos sind, weil sie als gegeben betrachtet werden können, ist die *dritte* für diese Diskussion von Wichtigkeit: weder die Zellen selbst noch deren Umgebung, in der das Antigen zirkuliert, dürfen dieses physiologischerweise und natürlich besitzen. Mit anderen Worten bedeutet das, die Substanz soll „*körperfremd*“ sein. Je *körperfremder* und *unphysiologischer* eine Substanz ist, *umso stärker* ist ihre *antigene Potenz*. Proteine, die als Hormone oder Enzyme im Tierreich und beim Menschen ähnliche Funktionen etwa im Gebiet des Stoffwechsels ausüben, sind chemisch zumindest ähnlich und damit von geringer Antigenität. Eine *vierte* Voraussetzung für die antigene Potenz einer Substanz ist deren komplexer und stabiler *Molekülaufbau* aus einem Protein als Träger determinanter und mehrerer starker polarer Gruppen an dessen Oberfläche (*Haurowitz*). Dazu kommt die Forderung einer *Molekülmindestgrösse*; nach *Heidelberger* wird ein Protein

erst dann zu einem Vollantigen, wenn sein *Molekulargewicht zwischen 20000 und 50000* liegt. Ein Antigen muss ferner eine endgültige und unveränderliche molekulare Konfiguration besitzen, um zur Antikörperproduktion anzuregen.

Wenn man die *Voraussetzungen zur Antigenität* eines Stoffes oder *eines Proteins* auf das Insulin einer Tierspecies in Anwendung bringt, dann könnte letzteres für einen Fremdorganismus, der ein chemisch verwandtes Insulin produziert, nur ein sehr schwaches Antigen sein. Nach *Harington*, teilweise zusammen mit *Neuberger*, kann *Insulin keinen Antigencharakter* zeigen, denn im Körper abgelagerte (z.B. Milchcasein) und strukturierte Proteine (Keratine, Augenlinse) sind im Gegensatz zu den im Stoffwechsel auftretenden Eiweissstoffen sehr viel schwächere Antigene. Durch Anlagerung von *Tyrosin*, das an sich schon im Insulinmolekül enthalten ist, und von *Glukose* entstehen *Glukosidotyrosilderivate des Insulins*, die nach diesen Versuchen als *echte Antigene* wirken können. *Insulin* wäre demnach eine *haptentartige Substanz*. *Lewis*, der nach Sensibilisierung von Meerschweinchen mit Rinder- und Schweineinsulin Schultz-Dale-Versuche am Uterus durchführte, konnte mit den beiden Insulinarten *gekreuzte Reaktionen* beobachten. Damit wäre also noch ein „*Residuum*“ an *Spezifität* zurückgeblieben.

Daraus hat *Lewis* schon 1937 geschlossen, dass die Insuline wohl chemisch und immunologisch eng verwandt, aber nicht völlig identisch sind. Ähnlich wie *Harington* haben auch *Harfenist*, *Abderhalden*, *Wasserman & Mirsky*, *Haurowitz*, *Schwarz & Koller*, *Hult & Jorpes* und neuerdings *Scheiffarth*, *Frenger & Moeckel* die antigene Wirkung des absolut reinen, mehrfach umkristallisierten Insulins abgelehnt, einige dieser Autoren (z.B. *Wasserman & Mirsky*, *Abderhalden*) konnten *keine immunbiologischen Unterschiede der untersuchten Tierinsuline* nachweisen. Bei allen Tierversuchen zur Erfassung von Insulinantikörpern sind *Sensibilisierungen* durch das *Pankreaseiweiss* grundsätzlich abzutrennen, wie es z.B. *Barral & Roux* sowie *Lewis* unternehmen haben.

Im folgenden wird bewusst immer nur von Fremdinsulin gesprochen, da die Bildung von Autoantikörpern gegen körpereigene Hormone, von Autoantihormonen, noch nicht beobachtet wurde.

Sanger und sein Arbeitskreis (*Thompson*, *Kitai*, *Smith*, *Harfenist* u. a.) haben die Reihenfolge der Aminosäuren in einer Peptidkette und die Art der Verknüpfung derselben aufgeklärt. Es war ihm und seinen Mitarbeitern möglich gewesen, die zwei Peptidketten zu präzisieren

und die Zusammensetzung der Insuline verschiedener Tierarten festzustellen. Diese Unterschiede im Molekülaufbau der speciesspezifischen Insuline haben für die Antigenität des Insulinmoleküls gewisse Bedeutung.

Die *kleinste Insulineinheit*, das *Monomer*, besitzt ein *Molekulargewicht von 6000*. Bei einem pH von 7, unter physiologischen Bedingungen, treten acht Untereinheiten durch Nebervalenzen zusammen, sodass ein *Gesamtmolekulargewicht von 48000* resultiert (*Lindner*). Damit ist die untere Grenze der Molekülmindestgrösse, die für die Charakterisierung einer Substanz als Antigen gefordert wird, eindeutig erheblich überschritten.

Der *chemische Aufbau des Insulinmoleküls aus 51 Aminosäuren*, die in zwei durch Disulfidbrücken verbundene Ketten A und B angeordnet sind, darf als bekannt vorausgesetzt werden, es bestehen *Unterschiede in der Reihenfolge der Aminosäuren A 8–A 10* bei verschiedenen Tierinsulinen. Da die physiologischen Angriffspunkte dieser chemisch verschiedenen Insuline im Stoffwechsel nicht differieren, sind diese Verschiedenheiten in der Sequenz der Aminosäuren ohne Einfluss auf die Stoffwechselwirkung. Die freien Amino- und die aliphatischen Hydroxylgruppen sind für die hormonelle Wirksamkeit belanglos. Die Bedeutung der nicht gleichen Aufeinanderfolge der Aminosäuren in der Kette A bei verschiedenen Tierinsulinen ist nach *Lindner* auch für immunbiologische Vorgänge gering. Jedoch differieren Rinder- und Schweineinsulin auch in ihrem Löslichkeitsvermögen und ihren Kristallisationseigenschaften, sodass konstitutions- und kolloidchemische Eigenschaften den Grad der Antigenität bedingen können. Die Frage, ob *innerhalb des Insulinmoleküls* einer bestimmten Gruppierung vorwiegend die Fähigkeit zur *Sensibilisierung* zuzusprechen ist, lässt sich noch nicht schlüssig beantworten. Bei einer Allergie gegenüber Insulinen bestimmter Tierarten spielt die *Aminosäurefolge* in der Stellung A 7 bis 10 für die wechselnde Sensibilisierungsfähigkeit eine wichtige Rolle, wenn auch im allgemeinen die antigene Spezifität eines Eiweisses vorwiegend durch endständige Molekülgruppen bedingt ist.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die *antigene Kraft des Insulins* zur leichteren Sensibilisierung zu *steigern*, auf die von *Harington* wurde bereits hingewiesen. Diese Arbeiten (*Harington & Neuberger*) aus dem Gebiet der synthetischen Immunochemie haben prinzipielle Bedeutung. Es gelang nämlich die experimentelle Herstellung eines Antigens, dessen haptene

Gruppe zugleich physiologisch wirksam war und gegen das ein Antiserum beim Tier hergestellt werden konnte.

Hierher gehört auch das wirksame Prinzip der *Adjuvantien* (Freund und Mitarbeiter). Das sind Substanzen, die selbst antigene Eigenschaften (etwa abgetötete Mikroorganismen) besitzen oder die anorganischer Natur (Aluminium, Mineralöle) sein können. Diese Stoffe vermögen die Antikörper-produzierenden Fähigkeiten schwacher Antigene durch Koppelung mit einem anderen Antigen zu potenzieren. Sie bewirken fernerhin eine *Verteilungsbeschleunigung* des verabreichten Antigens, indem sie einen kontinuierlichen Antigeneinstrom vom Injektionsort in den Organismus hervorrufen.

Ein Zusammenhang der für die hormonelle Wirkung verantwortlichen intramolekularen Gruppierungen mit den antigen wirkenden Determinanten ist noch nicht gesichert. Wir wissen noch nicht, ob diese verschiedenen Eigenschaften des Insulins an die gleichen Aminosäuregruppierungen gebunden sind. F. C. Lowell, auf dessen Arbeiten über die *Entstehung zweier verschiedener Antikörper gegen kristallines Insulin* noch eingegangen wird, betont, dass jener Molekülteil, der als Antigen zur Bildung neutralisierender Antikörper anregt, nicht die Gruppierung mit hormoneller Aktivität darstellt.

Bei diesen Ueberlegungen wird vorausgesetzt, dass *erstens* die Antigenzufuhr erstmalig erfolgt und *zweitens* das Proteinantigen nicht sehr rasch enzymatisch (durch die Insulinasen) abgebaut wird. Sind bereits zirkulierende humorale oder sessile, zellulär fixierte Antikörper vorhanden, so führt jede folgende Antigen-Injektion nach dem *Massenwirkungsgesetz* möglicherweise zu einer Gleichgewichtsstörung in den Antigen-Antikörperkomplexen. Infolge des plötzlich eintretenden Antigenüberschusses kommt es zu einer *Dissoziation der Antigen-Antikörperverbindungen* (Berson & Yalow; Berson, Yalow, Bauman, Rothschild & Newerly). Auch Skom & Talmage konnten die Gültigkeit und Bedeutung des Massenwirkungsgesetzes bei Antigen-Antikörperreaktionen mit ihrer Nachweismethode nicht-präzipitierender Insulinantikörper (Nachweis der Insulinbindung durch Präzipitation mit Antihuman-Globulin) sicherstellen. Man sollte sich daher bei experimenteller Auslösung von Antigen-Antikörperreaktionen prinzipiell über die physiologische Konzentration jeder Substanz im Organismus klar sein, die als Antigen zur Sensibilisierung dient. Der *Plasma-Insulinspiegel* beträgt bei Gesunden nach einer Mahlzeit 1–2 *Milli-Einheiten* pro ml Plasma, nachgewiesen am Rattenzwerchfell mit einem Plasma-Insulin-

konzentrat (*Baird & Bornstein*). Nach *Stadie & Zapp* ist die *Grenzkonzentration*, bei der eben noch ein Insulineffekt auf die Glykogensynthese im Zwerchfell der Ratte festzustellen ist, 10^{-3} E/ml, nach Angaben anderer 10^{-4} bzw. 10^{-6} E/ml (*Krahl & Park*; *Willebrands, v. Groen, Kamminga & Blickman*).

2. ABBAU DES INSULINS DURCH STOFF- WECHSELANTAGONISTEN

Zu den Vorgängen der Abbindung, Neutralisierung oder Inaktivierung von Insulin kommt der *enzymatische Abbau* als weiteres Moment hinzu.

Mirsky und sein Arbeitskreis haben insulin-inaktivierende Fermente, die *Insulinasen*, isoliert und deren Effekt im biologischen Mäusetest und mit J^{131} -Insulin nachgewiesen.

Skom & Talmage diskutierten die Möglichkeit, dass auch der Insulinase Antikörpercharakter zuzusprechen wäre, wenn man sie eindeutig als Antwort auf eine Insulin-Injektion nachweisen und auffassen könnte. Dieser Nachweis ist aber bis jetzt nicht gelungen. Eine gedankliche Verbindung des enzymatischen Insulinabbaus mit der Existenz von Insulin-Antikörpern ist durch *Yalow & Berson* gegeben, die die *Hemmung der Leberinsulinase* durch ein *Insulinantikörper-haltiges Serum* feststellen konnten. Auch ist noch unklar, ob der Insulin-Antigen-Antikörperkomplex eine so stabile Verbindung darstellt, dass er durch Enzymsysteme nicht aufgebrochen werden könnte.

In diesem Zusammenhang sind weit zurückliegende Arbeiten von *Kohl* über die *insulinzerstörende Kraft des Blutes* bei gesunden Versuchspersonen, bei nicht-diabetischen Kranken und bei Zuckerkranken zu erwähnen. Da ihr Blut Insulin sehr rasch inaktiviert im Gegensatz zu dem von Lebercirrhotikern, wurde die Leber als Bildungsstätte dieses Fermentsystems angesehen und die Möglichkeit von *Antiinsulinen* als Abwehrmechanismen gegen hohe, toxisch wirkende Insulindosen diskutiert.

Neben diesem enzymatischen Inaktivierungssystem des Insulins und dessen Hemmung wurden *tierexperimentell* noch

drei Faktoren isoliert, die *Insulinantagonisten* darstellen, die teilweise auch hormonell beeinflusst werden. Ueber ihren Antikörpercharakter besteht allerdings noch keine Klarheit. Zu diesen gehören:

1. Bei diabetischer Acidose findet sich ein *Faktor* in der α_1 -Globulinfraktion, der die Insulinbindungsfähigkeit an den Muskel einschränkt.

2. Der im Serum alloxandiabetischer Ratten mit der Zwerchfellmethode isolierte „*insulin-reversible inhibitor*“ lässt sich elektrophoretisch in die Serumlipoproteinfraction (*Bornstein*) und zwar in die β_1 -Globulinfraktion projizieren.

3. Echte *Insulinantikörper*, die in der β, γ -Intermediärzone elektrophoretisch wandern.

Die Sichtung der Literatur über *Insulin-Antagonisten*, *-Inhibitoren* oder *-Neutralisatoren* unter dem Blickwinkel ihres *Antikörpercharakters* stösst auf Schwierigkeiten, da Laboratorien und Arbeitsgruppen, die sich mit diesen Fragen beschäftigen, keine einheitliche und gleich empfindliche Versuchstechnik anwenden. Die Tatsache aber, dass man im Rahmen des III. Kongresses der Internationalen Diabetesvereinigung (Juli 1958, Düsseldorf) ein Tischrundgespräch über Nachweismethoden von Insulin-Antikörpern und -Inhibitoren im Blut abgehalten hat, beweist das allgemein grosse Interesse, das diesen Fragen entgegengebracht wird (s. auch *Sachsse*). Vor allem besteht keine Einigkeit über den Begriff *Antagonismus*. In der Toxikologie wird damit das Gegenteil von *Synergismus* bezeichnet und Minderung der Leistung oder Wirkung eines Medikamentes oder Giftes durch entgegengesetzte Kräfte angegeben, wobei über das Ausmass derselben nichts ausgesagt ist. Ein *Insulin-Antagonist*, der auf die Insulinwirksamkeit in einem Test oder in einer Reaktion einen Gegeneffekt ausübt, ist damit noch kein echter Insulinantikörper. Ein Insulin-Antagonist oder -Inhibitor ist ganz allgemein ein Hemmstoff, der die physiologische, stoffwechselspezifische Wirkung des Pankreashormons bremst, mindert oder aufhebt. Ein Antikörper braucht andererseits nicht unbedingt ein Stoffwechsel-Antagonist zu sein. Das hängt mit der Tatsache zusammen, dass die

stoffwechselaktive Molekülgruppierung nicht immer auch die antigenwirksame Gruppe darstellt, wenngleich auch das Zusammentreffen der spezifisch determinanten mit der pharmakologisch aktiven Gruppe durchaus möglich ist, sodass sich Antikörper mit entsprechend physiologischer Wirkung bilden.

3. INSULIN-ANTAGONISTEN VON SEITEN DES ENDOKRINIUMS

Auf die insulin-antagonistischen Faktoren von Seiten der Endokrinologie wird nur der Vollständigkeit halber hingewiesen. Die Ueber- oder Unterproduktion bzw. -funktion einzelner Hormone oder von Hormongruppen kann die klinische Symptomatik einer Insulinresistenz erzeugen, die mit dem Ablauf einer Antigen-Antikörperreaktion nichts zu tun hat.

(Schrifttum S. 52)

This document is a scanned copy of a printed document. No warranty is given about the accuracy of the copy. Users should refer to the original published version of the material.