Es darf daran erinnert werden, daß es kürzlich *in vitro* WIGZELL und Mitarb.¹⁹ gelang, an einer mit Antigen beladenen Säule Antigen-sensitive Zellen zu retinieren.

Aktiviert Mesothelien sind jedoch nicht nur als Antigen-fixierende Zellen für die nachfolgende Immunantwort wichtig. Aus Erfahrungen der Gewebekultur weiß man, daß proliferierende Zellen besonders gute „feeder“ für die Clonierung differenzierter Zellen darstellen²⁰. Die Proliferation der Mesothelien könnte damit einen zusätzlichen fördernden Einfluß auf die Proliferation immunkompetenter Zellen haben. Abgeschwächte Proliferation, wie wir sie nach neonataler Thymektomie beobachteten, würde damit zur verminderten spezifischen Proliferation beitragen.

¹⁹ H. WIGZELL and B. ANDERSSON, J. exp. Medicine **129**, 23 [1969].

Eine gewisse Schwierigkeit bereitet es, den Befund zu erklären, daß bei Boosterinjektion die Mesothelstimulierung schwächer ist als nach Primärinjektion. Die veränderte Struktur des zu einem früheren Zeitpunkt stimulierten Omentums muß dabei berücksichtigt werden. Wir nehmen an, daß die größere Zelldichte des schon stimulierten Omentums nach Boosterinjektion bei der dann erneut einsetzen Proliferation zu einer Kontaktinhibition und damit zu einer Verringerung der Mitoserate führt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für großzügige Unterstützung dieser Arbeit. Ferner danken wir Fräulein H. FINTER und Fräulein CH. SPERLING für ihre ausgezeichnete technische Mitarbeit.

²⁰ T. T. PUCK and P. J. MARCUS, Proc. nat. Acad. Sci. USA **41**, 432 [1955].

Unterschiedliche biologische Aktivität des Hühnerinsulins an der Maus *in vivo* und *in vitro*

The Different Biological Activity of Chicken Insulin in Mice Applied *in Vivo* and *in Vitro*

PETER SCHAUDER und MAX DIETER BUCK

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen

(Direktor Prof. Dr. Dr. G. WEITZEL)

(Z. Naturforsch. **24b**, 1424—1428 [1969]; eingegangen am 19. September 1969)

Chicken insulin was tested in mice *in vivo* and *in vitro*. The biological activity was compared to bovine insulin (=100%) as follows: 1. *In vitro*: Fat pad test 375%; ¹⁴C incorporation into the lipids of fat pads 369%; hemidiaphragm insulin assay 373 percent. 2. *Localized intraperitoneal action in vivo*: ¹⁴C incorporation into the fat pads 195%; U-¹⁴C-glucose incorporation into glycogen of hemidiaphragm 215 per cent. 3. *Mouse convulsion test*: The activity was slightly increased.

Hühnerinsulin zeigt gegenüber Rinderinsulin in einigen Testsystemen eine erhöhte Aktivität. *In vitro* Untersuchungen am isolierten Fettgewebe der Ratte hatten im Fettkörpertest eine Aktivität von 224%, im Fettzelltest eine Aktivität von 410% ergeben¹. Bei *in vivo* Untersuchungen an der Maus (Mäusefalltest) hingegen wirkte Hühnerinsulin mit 112% nur wenig stärker als Rinderinsulin¹.

In der vorliegenden Arbeit befassen wir uns mit folgenden Fragen: 1. Wirkt Hühnerinsulin an der Maus anders als an der Ratte? 2. Wirkt Hühnerinsulin an der Maus *in vivo* anders als *in vitro*? 3. Zeigt Hühnerinsulin außer am Fettgewebe auch

an der Muskulatur eine erhöhte Aktivität? Zur Klärung dieser Fragen testeten wir an der Maus kristallines Hühnerinsulin im Ganztierversuch, an isolierten Geweben unter *in-vitro*-Bedingungen und an isolierten Geweben unter *in-vivo*-Bedingungen.

Material und Methoden

Rinderinsulin, kristallin 27 IE/mg*.

Kristallines Hühnerinsulin wurde analog nach WEITZEL et al.² gewonnen. Jedoch wandten wir zur Umgehung der verlustreichen Rekristallisation eine Methode an, die zur Reinigung von Rekombinationsprodukten entwickelt worden ist³.

* Wir danken den Farbwerken Hoechst für die Überlassung des Rinderinsulins.

¹ W. KEMMLER u. K. RAGER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **349**, 515 [1968].

² G. WEITZEL, W. OERTEL, K. RAGER u. W. KEMMLER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **350**, 57 [1969].

³ P. G. KATSOYANNIS, A. C. TRAKATELLIS, S. JOHNSON, C. ZALUT u. G. SCHWARTZ, Biochemistry **6**, 2642 [1967].

a) *CM-Celluloselauf von einmal kristallisiertem Hühnerinsulin*

3,3 g CM-Cellulose (Serva, Nr. 45030) werden in 100 ml Trispuffer (0,1-m. Essigsäure, 8-m. Harnstoff, pH 4,3) aufgeschlämmt und ohne Vorbehandlung in eine Säule (23·0,9 cm) gegeben. Anschließend wird die Säule solange mit dem Puffer durchspült, bis das Eluat einen pH von genau 4,3 erreicht. 5 mg kristallines Hühnerinsulin werden in 1 ml Puffer (pH 4,3) gelöst und auf die Säule gegeben, die an ein Durchflußphotometer (280 m μ) mit Schreiber und Fraktions-sammler angeschlossen ist. Die Durchlaufgeschwindigkeit beträgt 4,5 ml/20 Minuten. Unter diesen Bedingungen wird mindestens 2 Std. eluiert, wobei nach 15 ml ein nicht identifizierter Peak erscheint. Anschließend wird ein linearer NaCl-Gradient (0–0,2-n. NaCl) angelegt. Hühnerinsulin erscheint nach 60 ml.

Abb. 1. Elution von einmal kristallisiertem Hühnerinsulin in Trispuffer (0,1-m. Essigsäure, 8-m. Harnstoff, pH 4,3) auf einer CM-Cellulosesäule (23·0,8 cm). NaCl-Gradient 0–0,2-n.

b) *Dialyse*

Zur Entfernung des Harnstoffs werden die gesamten Fraktionen in einem Visking-Dialysierschlauch 20/32 unter stündlichem Wasserwechsel 9 Std. lang dialysiert. Ein Ausfallen von Insulin wird durch Zugabe von 5 ml Eisessig pro 20 l Wasser verhindert.

c) *Lauf über Sephadex G 50*

Das lyophilisierte Dialysat wird zur weiteren Reinigung und völligen Entsalzung in 1 ml Essigsäure gelöst und auf eine Säule (70·1,5 cm) aufgetragen. Eluiert wird mit 1-m. Essigsäure⁴. Insulin erscheint nach 45 ml.

Abb. 2. Elution des lyophilisierten Dialysates über eine Sephadex G 50-Säule (70·1,5 cm) in 1-m. Essigsäure.

Das Eluat wird lyophilisiert; die Ausbeute der Methode beträgt 50–60 Prozent.

Alle auf diese Weise gewonnenen Chargen zeigen eine einheitliche biologische Aktivität.

Aktivitätsbestimmung

Die Einwaage des für die Eichung benutzten Rinderinsulins und des Hühnerinsulins wurde mit Hilfe der Proteinbestimmung nach LOWRY et al.⁵ überprüft. Zur Testung wurden zwischen 25–35 g schwere männliche und weibliche Mäuse (Zucht: Fa. Invanovas, Kisslegg/Allgäu) verwandt. 18 Std. vor Beginn des jeweiligen Versuches wurden die Tiere bei freiem Zugang zu Wasser nüchtern gesetzt.

1. *Mäusefalltest*⁶
2. *Fettkörpertest*⁷
3. *Lipidbestimmung im Fettkörper*⁸
4. *Glykogensynthese im Hemidiaphragma*⁹
5. *Einbau von U-¹⁴C-Glucose in die Lipide des Fettkörpers in vivo*¹⁰

18 Std. gefasteten Tieren wurde die zu testende Insulinmenge, die zusammen mit 2 μ C U-¹⁴C-Glucose und 2 mg D-Glucose in 1 ml 0,9-proz. NaCl-Lösung enthalten war, intraperitoneal injiziert. Nach genau einer Stde. wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, die epididymalen Fettkörper entnommen und darin die ¹⁴C-Lipide bestimmt¹¹.

6. *Einbau von U-¹⁴C-Glucose in das Glykogen des Hemidiaphragma in vivo*¹²

18 Std. gefasteten Tieren wurde die zu testende Insulinmenge mit den oben beschriebenen Zusätzen intraperitoneal injiziert. Nach genau einer Stde. wur-

⁴ D. D. SCHMIDT u. A. ARENS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **349**, 1157 [1968].

⁵ O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

⁶ D. M. YOUNG u. A. H. LEWIS, Science [New York] **105**, 368 [1947].

⁷ A. E. RENOLD, D. B. MARTIN, Y. M. DAGENAIS, J. STEINKE, P. J. NICKERSON u. M. C. SHEPS, J. clin. Invest. **39**, 1487 [1960].

⁸ B. JEANRENAUD u. A. E. RENOLD, J. biol. Chemistry **234**, 3082 [1959].

⁹ J. K. DAVIDSON, J. A. CODDLING u. R. E. HAIST, Can. J. physiol. Pharmacol. **46**, 361 [1968].

¹⁰ O. J. RAFAELSEN, V. LEWIS u. A. E. RENOLD, Diabetes **14**, 19 [1965].

¹¹ J. N. FAIN, R. O. SCOW u. S. S. CHERNICK, J. biol. Chemistry **238**, 54 [1963].

¹² T. CLAUSEN, Acta endocrinol. [Copenhagen] **50**, 115 [1965].

den die Tiere durch Dekapitation getötet, das Diaphragma entnommen und der ^{14}C -Glykogengehalt der Zwerchfellhälften bestimmt.

In allen Testsystemen wurde Rinderinsulin als Vergleichssubstanz verwendet und dessen Aktivität = 100% gesetzt.

Ergebnisse

1. Wirkung am Ganztier

Eine stichprobenartige Kontrolle an 36 Mäusegruppen zu je 10 Tieren bestätigte den Befund¹, daß Hühnerinsulin im Vergleich zu Rinderinsulin nur wenig stärker wirkt.

2. Lokale intraperitoneale Wirkung in vivo

a) Einbau von $U\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in die Lipide des Fettkörpers

Zur Gewinnung einer Eichkurve wurde jeweils 4 Mäusen 5 ng, 25 ng und 50 ng Rinderinsulin intraperitoneal injiziert. Der durchschnittliche λ -Wert¹³ von 6 Eichkurven betrug 0,13; Standardabweichung $s = \pm 0,1$. Hühnerinsulin wurde in einer Menge von 5 ng und 10 ng/Tier intraperitoneal injiziert. In 24 Bestimmungen zeigte Hühnerinsulin im Vergleich zu Rinderinsulin eine Aktivität von 195 Prozent. Standardabweichung $s = \pm 67\%$; p -Wert nach dem t -Test $< 0,01$.

b) Einbau von $U\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in das Glykogen des Hemidiaphragma

Rinderinsulin wurde wie im obigen Test geschil-
dert eingesetzt. Der λ -Wert von 9 Eichkurven be-
trug im Mittel 0,126; Standardabweichung $s = \pm 0,08$. Hühnerinsulin, in einer Menge von 10 ng/Tier injiziert, zeigte in 36 Bestimmungen eine durchschnittliche Aktivität von 215 Prozent. Standardabweichung $s = \pm 73\%$; p -Wert nach dem t -Test: $p < 0,01$.

3. Aktivität in vitro

a) Fettkörpertest

Zur Gewinnung der Eichkurven wurde Rinderinsulin in den Konzentrationen 0,28; 0,84 und 2,52 ng/ml Inkubationsmedium eingesetzt. Der λ -Wert

¹³ K. F. WEINGES u. H. WÖRNER, Klin. Wschr. 39, 238 [1961].

Abb. 3. Einbau von $U\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in die Lipide des Fettkörpers in vivo. Aktivität des Hühnerinsulins bei einer getesteten Menge: ■ 5 ng/Tier intraperitoneal; ● 10 ng/Tier intraperitoneal.

Abb. 4. Einbau von $U\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in das Glykogen des Hemidiaphragma in vivo. ■: Aktivität des Hühnerinsulins bei einer getesteten Menge von 10 ng/Tier intraperitoneal.

Abb. 5. Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose durch den epididymalen Fettkörper. Aktivität des Hühnerinsulins bei einer getesteten Konzentration/ml Inkubationsmedium: ■ 0,28 ng; ● 0,4 ng.

von 10 Eichkurven betrug durchschnittlich 0,115 mit einer Standardabweichung von $s = \pm 0,05$. Hühnerinsulin, in Konzentrationen von 0,28 und 0,4 ng/ml Inkubationsmedium eingesetzt, zeigte bei der Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in 30 Bestimmungen eine durchschnittliche Aktivität von 375 Prozent. Die Standardabweichung betrug $s = \pm 102\%$; p -Wert nach dem t -Test $< 0,01$.

b) ^{14}C -Einbau in die Lipide des Fettkörpers

Rinderinsulin wurde zur Gewinnung von Eichkurven wie im Fettkörpertest eingesetzt. Der λ -Wert von 9 Eichkurven betrug durchschnittlich $\lambda = 0,08$ mit einer Standardabweichung von $s = \pm 0,05$. Hühnerinsulin wurde in den Konzentrationen 0,28 ng und 0,4 ng/ml Inkubationsmedium getestet. Die durchschnittliche Aktivität von Hühnerinsulin betrug in 27 Bestimmungen 369 Prozent. Standardabweichung $s = \pm 102\%$; p -Wert nach dem t -Test $< 0,01$. Damit steigert Hühnerinsulin die Lipidsynthese des Fettkörpers in vitro (369%) stärker als in vivo (195 Prozent). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. $p < 0,05$.

Abb. 6. Einbau von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in die Lipide des epididymalen Fettanhangs in vitro. Aktivität des Hühnerinsulins bei einer getesteten Konzentration/ml Inkubationsmedium: ■ 0,28 ng; ● 0,4 ng.

c) Stimulierung der Glykogensynthese im Hemidiaphragma

Die Rinderinsulinkonzentrationen der Eichpunkte betrugen 2 ng, 8 ng und 20 ng/ml Inkubationsmedium. Der durchschnittliche λ -Wert von 10 Eichkurven ergab $\lambda = 0,24$ mit einer Standardabweichung von $s = \pm 0,07$. Hühnerinsulin eingesetzt in einer Konzentration von 2 ng/ml Inkubationsmedium zeigte in 60 Bestimmungen eine durchschnittliche Aktivität von 373 Prozent. Standardabweichung

$s = \pm 132\%$; p -Wert nach dem t -Test $p < 0,01$. Somit steigert Hühnerinsulin die Glykogensynthese in vitro (373%) stärker als in vivo (215%). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. $p < 0,05$.

Abb. 7. Stimulierung der Glykogensynthese des Hemidiaphragma in vitro. Der relative Glykogengehalt bestimmt sich aus der Extinktion $\cdot 1000$ gemessen bei einer Wellenlänge von 620 $m\mu$ am Zeiss-Spektralphotometer PMQ II. ■: Aktivität des Hühnerinsulins bei einer getesteten Konzentration von 2 ng/ml Inkubationsmedium.

	in vitro	lokale Wirkung in vivo	Ganztier ¹ (Falltest)
Glykogensynthese (Muskulatur)	373 ± 132	215 ± 73	112 ± 35
Lipidsynthese (Fettgewebe)	369 ± 102	195 ± 67	
$^{14}\text{CO}_2$ -Produktion (Fettgewebe)	375 ± 102	—	

Tab. 1. Aktivität des Hühnerinsulins in [%] im Vergleich zu Rinderinsulin (=100%). Wirkung in vitro: $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose gemessen am epididymalen Fettkörper; Einbau von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in die Lipide des epididymalen Fettkörpers. Steigerung der Glykogensynthese im Hemidiaphragma. Lokale intraperitoneale Wirkung in vivo: Einbau von $U\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in die Lipide des epididymalen Fettanhangs. Einbau von $U\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose in das Hemidiaphragma (Glykogensynthese). Wirkung am Ganztier: Falltest.

Diskussion

Sowohl bei der Ratte wie auch bei der Maus zeigt Hühnerinsulin im Vergleich zu Rinderinsulin in vitro eine deutlich gesteigerte Aktivität. An der Maus wirkt Hühnerinsulin in vitro signifikant stärker.

ker als im Ganztiertest. Die Wirkung an isolierten Geweben ist bei Inkubation unter in vitro Bedingungen stärker als nach Inkubation unter in vivo Bedingungen. Für den überraschenden Befund der unterschiedlichen Aktivität des Hühnerinsulins in vivo und in vitro liegen derzeit keine richtungsweisenden Befunde vor. Die Unterschiede lassen sich möglicherweise durch jeweils unterschiedliche Diffusionsbedingungen in diesen Testsystemen erklären. Es könnte auch ein verschieden schneller Abbau in vivo und in vitro vorliegen. Weiterhin könnte man an Serumhemmfaktoren denken, die bei den

Testen unter in vitro Bedingungen nicht vorhanden sind.

Bisher lagen auch zur Erklärung der unterschiedlichen Aktivitäten von Rinderinsulin und Hühnerinsulin im gleichen Testsystem keine Anhaltspunkte vor. Unter Berücksichtigung unserer Befunde könnte man auch hier in analoger Weise entweder an einen unterschiedlichen Abbau oder an unterschiedliche Diffusionsbedingungen von Hühnerinsulin im Vergleich zu Rinderinsulin denken.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Stipendien.

Absorptionsänderungen von Chlorophyll-b im elektrischen Feld

Absorption Changes of Chlorophyll-b in the Electric Field

S. SCHMIDT, R. REICH und H. T. WITT

Max-Volmer-Institut, I. Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität Berlin

(Z. Naturforsch. **24b**, 1428—1431 [1969]; eingegangen am 23. Juni 1969)

In order to test recent interpretations of field indicating absorption changes in photosynthesis, the influence of the electric field on the absorption spectrum of chlorophyll-b is measured in vitro.

50 monomolecular layers of chlorophyll-b are built up on quartz slides by the technique of B l o d g e t t and L a n g m u i r. Absorption changes induced by an electric field linearly increasing from $-1.8 \cdot 10^6$ V/cm to $+1.8 \cdot 10^6$ V/cm are detected by a repetitive photometer. The absorption changes can be separated into one part, which is proportional to the electric field strength, and a second one, which is proportional to the square of it. The linear change of absorption in the region at ~ 650 nm may be interpreted as a shift of the absorption band of about $2 \cdot 10^{-9} \frac{\text{nm}}{\text{V/cm}}$.

Bei der Untersuchung photochemischer Primärprozesse in Chloroplasten mit Hilfe der Blitzlichtspektroskopie wird ein reichhaltiges Spektrum kurzlebiger Absorptionsänderungen beobachtet¹. Einige von diesen Absorptionsänderungen werden darauf zurückgeführt, daß die mit der Photosynthese verbundenen Ladungsverschiebungen zwischen beiden Seiten der Photosynthesemembran eine Änderung der darin herrschenden elektrischen Feldstärke zur Folge haben, wodurch gleichzeitig die Absorptionsspektren der in der Membran befindlichen Moleküle von Chlorophyll-a, Chlorophyll-b und Carotin verändert werden² (Elektrochromie). Zur Prüfung dieser Vorstellungen soll das Verhalten dieser Farbstoffe in künstlich hergestellten dünnen Schichten bei definierten Änderungen der elektrischen Feldstärke

untersucht werden. Ähnliche Untersuchungen wurden in anderem Zusammenhang von WIEGAND ausgeführt³. In dieser Mitteilung werden vorläufige Meßergebnisse für den Farbstoff Chlorophyll-b angegeben.

Um ein elektrisches Feld auf den Farbstoff einwirken lassen und gleichzeitig seine Absorptionsänderungen messen zu können, wurde der Farbstoff in einen speziellen Kondensator eingebaut, der in Abb. 1 schematisch dargestellt ist.

Der in der Abbildung erkennbare Quarzobjektträger dient nur als mechanische Unterlage. Die „Kondensatorplatten“ sind zwei im Vakuum aufgedampfte Aluminiumschichten, die noch durchsichtig aber bereits elektrisch leitend sind (Widerstandskontrolle während des Aufdampfens). Die abgebil-

¹ Vgl. z. B. H. T. WITT, in: Fast Reactions and Primary Processes in Chemical Kinetics (Nobel Symposium V), Ed. S. CLAESSON, p. 261. Almqvist & Wiksell, Stockholm 1967; Interscience Publ., New York, London, Sydney.

² W. JUNGE u. H. T. WITT, Z. Naturforsch. **23b**, 244 [1968]; H. M. EMRICH, W. JUNGE u. H. T. WITT, Z. Naturforsch. **24b**, 1144 [1969].

³ J. WIEGAND, Dissertation, Marburg 1968.