



O cukrzycy dla fizyków – historia odkrycia insuliny i poznania jej budowy

Ewa Ł. Stępień

Zakład Fizyki Medycznej, Instytut Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Frederick Banting

Sir Frederick Banting (1891–1941) rozpoczął swoje badania nad hormonem trzustki w lecie 1921 roku. Przyjechał wiosną 1921 roku do Toronto, do laboratorium znanego kanadyjskiego fizjologa, profesora J.J.R. Macleoda¹ i poprosił o możliwość przeprowadzenia doświadczeń na jego psach. Macleod, początkowo sceptyczny, zostawił Bantingowi pod opieką 10 psów i 2 asystentów o nazwiskach Charles Best² i Clark Noble, a sam udał się na wakacje.

Banting, mimo swojego młodego wieku (30 lat) był już wówczas bardzo doświadczonym lekarzem. Studia medyczne rozpoczął na uniwersytecie w Toronto w Kanadzie w 1912 roku (po 2 latach studiów artystycznych) i w 1915 roku został zmobilizowany. Wcześniej nie przyjęto go do armii ze względu na słaby wzrok. Po przyspieszonych szkoleniach medycznych uzyskał dyplom w grudniu 1916 roku i niemalże natychmiast wyruszył na front I Wojny Światowej, gdzie wstąpił się męstwem w bitwie pod Cambrai 8–10 października 1918 roku³, za co został uhonorowany Krzyżem Wojskowym (*Military Cross*).

Po I Wojnie Światowej Banting wrócił do Kanady i rozpoczął pracę jako rezydent w szpitalu dziecięcym w Toronto, a następnie w 1920 roku przeniósł się do Londynu (Ontario) by wykładać antropologię i farmakologię na uniwersytecie Ontario. Z tego okresu (31 października 1920) pochodzą zapiski z dziennika, które zrobił po tym jak przygotowywał się do wykładu na temat trzustki: „Diabetes [sic]. Ligate pancreatic ducts of dog. Keep dogs alive till acini degenerate leaving islets. Try to isolate the internal secretion of these and relieve glycosuria [sic].”⁴ [1]. Banting był zainspirowany pracami takich fizjologów jak Euge-

¹ John James Rickard Macleod (1876–1935); kanadyjski fizjolog i biochemik szkockiego pochodzenia. Jeden z odkrywców insuliny. W roku 1923 wspólnie z F. Bantingiem otrzymał Nagrodę Nobla za to odkrycie.

² Charles Herbert Best (1899–1978), kanadyjski fizjolog i biochemik, był asystentem Bantinga, z którym rozpoczął prace nad izolacją ekstraktu trzustkowego od psów, co pozwoliło na odkrycie insuliny; jego kolejnym sukcesem była izolacja heparyny.

³ Bitwa pod Cambrai stoczona między 8 a 10 października 1918 roku w czasie tak zwanej „ofensywy stu dni”. Jedna z ostatnich bitew na froncie zachodnim I wojny światowej. W bitwie na dużą skalę wzięły udział czołgi, których użyto w liczbie 324.

⁴ Cukrzyca [tak!]. Podwiązać przewody trzustkowe u psów. Utrzymać je aktywne, aż do momentu

ne Opie⁵, czy Oskar Minkowski⁶. Minkowski zapoczątkował swoje studia nad cukrzycą na modelu zwierzęcym, a do badań wybrał psy. Indukował cukrzycę usuwając psom trzustkę, przez co wskazał na bezpośredni związek między podwyższonym poziomem cukru a brakiem trzustki.

Psy Bantinga

Badania nad fizjologią trzustki wymagały ogromnego poświęcenia i cierpienia zwierząt. Banting był tego świadom. Był także bardzo przywiązany do swoich zwierząt, mimo iż pozornie manifestował swój brak empatii. Po śmierci jednego z psów, suczki rasy *collie* o nr 92, 31 sierpnia 1921 Banting napisał w swoim pamiętniku, że płakał⁷, natomiast Theodore Roosevelt⁸ nazwał Bantinga „*the bearded iceberg*”⁹.

Banting rozpoczął swoje doświadczenia na 10 psach, które otrzymał od Macloada. Podwiązał psom przewody trzustkowe, które odprowadzają z trzustki do dwunastnicy enzymy trawienne, w tym trypsynę. Taki zabieg powodował zamieranie komórek produkujących trypsynę, ale komórki z wysepek Langerhansa wciąż pozostawały żywe. Z tak spreparowanych trzustek Banting izolował ekstrakt trzustkowy, który podawał psom z usuniętymi trzustkami (model Minkowskiego)¹⁰. Psy, którym podawano ekstrakt Bantinga przeżywały dłużej [2].

Pierwsze podanie insuliny

Pierwsze podanie ekstraktu trzustkowego Banting i jego asystent Charles Best przeprowadzili na sobie, by sprawdzić, czy jest on bezpieczny dla człowieka. Niestety, podanie go spowodowało podrażnienia i aby uniknąć komplikacji oraz przeprowadzić badania kliniczne na pacjentach, ich mentor prof. Macload podjął decyzję o zaangażowaniu w prace nad oczyszczaniem ekstraktu biochemika Jamesa Collipa¹¹.

Pierwszym pacjentem i wolontariuszem, któremu podano ekstrakt trzustkowy doustnie, był dr Joseph Applebe Gilchrist, przyjaciel Bantinga i Besta. Było

gdy uszkodzenia [wytrawia] wyseпки. Spróbować wyizolować z nich wewnętrzną wydzielinę by złagodzić cukromocz [tak!].

⁵ Eugene Lindsay Opie (1873–1971); amerykański fizjolog i patolog, znany głównie ze swych badań nad gruźlicą oraz pionierskich badań nad cukrzycą. Opie jako student medycyny po raz pierwszy zaobserwował zmiany patologiczne w wysepkach Langerhansa trzustki u chorych na cukrzycę.

⁶ Oskar Minkowski (1858–1872); urodzony na Litwie lekarz żydowskiego pochodzenia, brat Hermana Minkowskiego. W latach 1909–1926 był profesorem Uniwersytetu Wrocławskiego. Dla uczczenia zasług Oskara Minkowskiego w badaniach nad cukrzycą *European Association for the Study of Diabetes* (EASD) ustanowiła w 1966 r. roczną nagrodę dla naukowców zajmujących się badaniami w dziedzinie diabetologii.

⁷ Najdłużej, bo 70 dni żyła suczka o imieniu Marjorie

⁸ Theodore Roosevelt (1858–1919); 26. prezydent Stanów Zjednoczonych w latach 1901–1909

⁹ z angielskiego: brodata góra lodowa

¹⁰ 10 psów oczywiście nie wystarczyło na przeprowadzenia eksperymentów, Banting sprzedał swój samochód, aby zakupić więcej psów do badań

¹¹ James Bertram Collip (1892–1965); kanadyjski biochemik, wspólnie z Bantingiem i Bestem opracował metodę izolacji insuliny z ekstraktu trzustkowego.

to 15 grudnia 1921 roku, niestety nie uzyskano pożądanego efektu. Pierwszym pacjentem, który 11 stycznia 1922 roku otrzymał zastrzyk z oczyszczonym ekstraktem trzustkowym, był 14-letni chory na cukrzycę typu I-go Leonard Thomson. Już w kwietniu tego samego roku powstała pierwsza klinika diabetologii w Toronto.

Nagroda Nobla za odkrycie insuliny i patent

W 1923 roku przyznano Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny dwóm naukowcom, Frederickowi Bantingowi i Johnowi Macloadowi, z pominięciem pozostałych badaczy zaangażowanych w badania nad tym odkryciem: Charlesa Besta i Jamesa Collipa, z którymi jednak Banting i Macload odpowiednio podzielili się kwotą pieniężną uzyskaną z nagrody. Kontrowersje nad przyznaniem Nagrody Nobla ciągle wzbudza fakt, iż pierwsza publikacja o izolacji ekstraktu trzustkowego i jego wykorzystaniu do leczenia cukrzycy ukazała się bez nazwiska Macloada. Sir Frederick Banting jest jak do tej pory najmłodszym laureatem Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, którą otrzymał w wieku 32 lat¹².

Trzej naukowcy: Banting, Best i Collip uzyskali patent na wytwarzanie insuliny z ekstraktu trzustkowego, który od razu odsprzedali za 1 dolara uniwersytetowi w Toronto. Od 1982 roku na rynku dostępna jest rekombinowana insulina ludzka lub jej analogi, które zostały po raz pierwszy wprowadzone przez firmę farmaceutyczną Eli Lilly.

Poznanie struktury insuliny

Intensywne badania nad poznaniem struktury insuliny rozpoczęto już w latach 20. XX wieku, kiedy to John J. Abel (1926) uzyskał pierwsze kubiczne kryształy insuliny [3]. W 1956 roku J. Schlichtkrull wykazał, że te krystaliczne formy insuliny o kształcie rombościanu zależą od obecności jonów cynku (Zn^{2+}) i innych jonów dwuwartościowych. [4,5]. Poznanie struktury krystalicznej insuliny zawdzięczamy dwóm badaczom: Johnowi Desmondowi Bernalowi i Dorothy Crowfoot Hodking¹³. Bernal wywarł ogromny wpływ na życie osobiste i karierę naukową Crowfoot, był jej mentorem i promotorem¹⁴. Dorothy Crowfoot,

¹² Najmłodszym laureatem Nagrody Nobla w historii jest Lawrence Bragg, który otrzymał ją w wieku 25 lat, następnie Werner Heisenberg (31 lat), Rudolf Mossbauer (32 lata), James Watson (34 lata).

¹³ Dorothy Crowfoot Hodgkin (1910–1994) angielska biochemiczka, laureatka Nagrody Nobla w dziedzinie chemii (1964) za badania krystalograficzne biomolekuł. Była ona córką brytyjskiego archeologa i botaniczki. Urodziła się w Egipcie, gdzie zgodnie z bardzo demokratycznymi poglądami swojego ojca na wychowanie pobierała nauki. Podobno jako młoda dziewczyna otrzymała od matki w prezencie książkę o krystalografii, co zainspirowało ją do podjęcia studiów chemicznych na uniwersytecie w Oxfordzie, gdzie poznała Bernala. D. Hodgkin była opiekunem i promotorem Margaret Roberts (Thatcher), która będąc premierem Wielkiej Brytanii, trzymała portret D. Hodgkin na ścianie w gabinecie przy Downing Street.

¹⁴ John Desmond Bernal (1901–1971) irlandzki fizyk znany z pionierskiego zastosowania metod dyfrakcji rentgenowskiej do badań biomolekularnych. Mimo swoich niewątpliwych zasług na tym polu, J.D. Bernal nigdy nie został uhonorowany Nagrodą Nobla. Ze względu na swoje poglądy polityczne jego osiągnięcia podlegały surowej ocenie w środowisku naukowym na zachodzie Europy.

która początkowo publikowała pod tym nazwiskiem, dokonała szeregu odkryć związanych z poznaniem struktury steroli (witaminy D2), pepsyny (wspólnie z Bernelem) i penicyliny¹⁵. Bernel pracował w laboratorium Williama Henry'ego Bragga, gdzie skonstruował goniometr, wykorzystywany później przez niego do badań krystalograficznych nad budową steroli, witaminy B1, pepsyny (pierwsze skryształizowane białko) i wirusa mozaiki tytoniowej (badania z Rosalind Franklin¹⁶) [6]. To u niego D. Crowfoot zaczęła pracę nad strukturą steroli. W 1937 roku Crowfoot wyszła za mąż i zmieniła nazwisko na Hodgkin. Już współpracując z Bernelem, Hodgkin zajmowała się poznaniem struktury insuliny, jednak z powodu trudności w uzyskaniu dobrych kryształów badania te bardzo wolno postępowały. Strukturę molekularną insuliny z rozdzielczością 2.8 Å [angstrom] Hodgkin uzyskała jako pierwsza w 1969 roku [7]. Wcześniej uhonorowano ją Nagrodą Nobla (1964) za opisanie struktury witaminy B12.

Sekwencja aminokwasowa insuliny i jej budowa molekularna

Ogromne zasługi w badaniach nad poznaniem budowy insuliny ma Frederick Sanger.

Sanger, mimo że rozpoczął studia w St. John's College w Cambridge na kierunku fizyka, porzucił ją dla fizjologii. Był bardzo emocjonalnie i ideowo związany ze swoimi rodzicami, szczególnie z ojcem, który był kwakrem¹⁷ i ich przedwczesna śmierć z powodu choroby nowotworowej bardzo wpłynęła na jego rozwój naukowy. Sanger¹⁸ odmówił przystąpienia do służby wojskowej i mocno zaangażował się w pracę społeczną i socjalną. W roku 1940 rozpoczął studia doktorskie nad pozyskaniem przyswajalnego białka z trawy, który to temat porzucił i zajął się badaniami nad metabolizmem egzogenego aminokwasu¹⁹ – lizyny (Lys). Prace nad składem wołowej insuliny Sanger rozpoczął w 1943 roku w laboratorium recenzenta swojej pracy doktorskiej Charlesa Chibnalla w Cambridge. Największym osiągnięciem Sangera było poznanie sekwencji aminokwasów w dwóch peptydach (peptyd A i peptyd B) składających się na aktywną

¹⁵ Dzięki D. Crowfoot wiemy, że penicylina posiada pierścień β -laktamowy, co pozwoliło na opracowanie metod syntezy nowych antybiotyków β -laktamowych (cefalosporyny, karbapenemów).

¹⁶ Rosalind Franklin (1920–1958) angielska chemiczka i fizyczka, znana ze swych prac krystalograficznych nad strukturą DNA. Wspólnie z J.D. Bernalem opisała budowę pierwszego wirusa (mozaiki tytoniowej). Prace nad wirusem polio przerwała jej choroba nowotworowa.

¹⁷ Kwakrzy; protestancka wspólnota religijna utworzona w 1665 roku, Stowarzyszenie Przyjaciół (ang. Society of Friends), za źródło wiary kwakrzy uważają wewnętrzne objawienie Boże udzielane każdemu człowiekowi i zupełnie do zbawienia wystarczające, odrzucają wszelkie formy kultu, jako programowi pacyfści w 1947 otrzymali Pokojową Nagrodę Nobla

¹⁸ Frederick Sanger (1918–2013) angielski biochemik i biolog molekularny, który był podwójnie uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Pierwszy raz w 1958 roku za prace nad poznaniem struktury białek, w szczególności insuliny, drugi raz wspólnie z Paulem Bergiem i Walterem Gilbertem za opracowanie techniki sekwencjonowania DNA.

¹⁹ Aminokwasy egzogenne; 10 aminokwasów jakie nie są syntetyzowane w organizmie człowieka i muszą być dostarczane z pożywieniem: fenyloalanina, izoleucyna, leucyna, walina, metionina, treonina, tryptofan, lizyna, arginina oraz histydyna są aminokwasami względnie egzogennymi.

biologicznie cząsteczkę insuliny wołowej. Swoje badania prowadził za pomocą bardzo prostych technik biochemicznych: chromatografii rozdzielania²⁰ i elektroforezy bibułowej²¹. Do degradacji i modyfikacji białek Sanger zastosował związek o nazwie fluorodinitrobenzen (FDNB), który umożliwił znakowanie tak zwanego N-końca łańcucha polipeptydowego, uzyskanego na skutek trawienia insuliny za pomocą enzymu trzustkowego (trypsyny). Rozdzielone na bibule fragmenty łańcuchów peptydowych Sanger barwił ninhydriną. W taki sposób rozwikłał sekwencję insuliny wołowej (Rys. 1).

Rys. 1. Schemat budowy monomeru insuliny wołowej opracowany przez Sangera. Cząsteczka insuliny składa się z dwóch łańcuchów: peptydu A i peptydu B, z których każdy zbudowany jest odpowiednio z 21 i 30 aminokwasów. Aminokwasy zawierające siarkę o nazwie cysteina (Cys) w pozycjach A6, A7 i A20 w peptydzie A oraz w pozycjach B7 i B19 w peptydzie B tworzą mostki siarczkowe, które stabilizują monomer insuliny

Peptyd A	Peptyd B
Gly	Phe
Ile	Val
Val	Asn
Glu	Gln
Gln	His
Cys	Leu
Cys	Cys
Ala	Gly
Ser	Ser
Val	His
Cys	Leu
Ser	Val
Leu	Glu
Tyr	Ala
Gln	Leu
Leu	Tyr
Glu	Leu
Asn	Val
Tyr	Cys
Cys	Gly
Asn	Glu
	Arg
	Gly
	Phe
	Phe
	Tyr
	Thr
	Pro
	Lys
	Ala

Peptyd A jest kompaktowy i stanowi rdzeń monomeru (pojedynczej cząsteczki), wokół którego owinięty jest peptyd B. W obecności jonów cynku (Zn^{2+}) monomery insuliny tworzą heksamery, który składa się z trzech równoważnych dimerów. Heksamer jest symetryczny w 3 osiach prostopadłych do osi głównej torusa (pierścienia) o wymiarach: 50 Å (średnica) na 35 Å (wysokość). W cząsteczce insuliny ludzkiej 2 jony cynku (Zn^{2+}) znajdują się w odległości 17 Å od siebie na głównej osi, każdy z nich jest skoordynowany przez aminokwas histydynę (His) z peptydu B każdego z 3 dimerów i z 3 cząsteczkami H_2O . Heksamer jest stabilizowany przez wiązania hydrofobowe między aminokwasami peptydu A i B: B1 fenyloalanina (Phe), B14 alanina (Ala), B17 leucyna (Leu), A13 Leu i B18 walina (Val) [8].

Więcej na temat budowy cząsteczki insuliny zaawansowany czytelnik znajdzie w bazie danych na temat białek: Protein Data Base PDB-101 [9]. Jest to portal edukacyjny w języku angielskim, który poza szczegółowymi informacjami na temat budowy białek, zawiera też animacje cząsteczek, opisy dotyczące roli biologicznej białek, odpowiednie odsyłacze do literatury oraz metodyki badawczej. W lutym 2001 insulina została ogłoszona przez PDB cząsteczką miesiąca (ang. *Molecule of the Month*) [9]. W artykule tym czytelnik może także znaleźć odsyłacz do instrukcji, jak samodzielnie wykonać z papieru model 3D monomeru insuliny ludzkiej [10].

²⁰ Chromatografia; technika rozdzielania związków, substancji w oparciu o powinowactwo (adsorbencję) substancji do fazy stacjonarnej. Za rozwój tej techniki Richard Laurence Millington Synges i Archer Martin zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 1952 roku.

²¹ Elektroforeza bibułowa; technika rozdzielania związków, substancji w polu elektrycznym w oparciu o ruchliwość elektroforetyczną cząsteczki na nośniku, jakim jest bibuła.

Podziękowania

Artykuł stanowi treść wykładu wygłoszonego w ramach Krakowskiego Konwersatorium Fizycznego w dniu 11. kwietnia 2019.

Referencje

- [1] <http://www.cdnmedhall.org/inductees/frederickbanting>.
- [2] Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. [Updated 2014 Feb 1]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>.
- [3] J.J. Abel. Crystalline insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 1926; 12: 132–136.
- [4] J. Schlichtkrull. Insulin Crystals. I. The Minimum Mole-Fraction of Metal in Insulin Crystals Prepared with Zn^{++} , Cd^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , or Fe^{++} . Acta Chem. Scan. 1956; 10:1455–1458.
- [5] J. Schlichtkrull. Insulin Crystals. II. Shape of Rhombohedral Zinc-Insulin Crystals in Relation to Species and Crystallization Media. Acta Chem. Scan. 1956; 10:1459–1464.
- [6] British History, Engineers, Scientists and Invebntors <https://spartacus-educational.com/>.
- [7] D. Crawfoot Hodgkin. X-ray crystallography in hormone research. In: Techniques in Endocrine Research: Proceedings of a NATO Advanced Study Institute Held at Stratford-Upon-Avon, England, under the Auspices of the University of Birmingham, Ed. Peter Eckstein Sir Francis William Knowles. Academic Press 1963.
- [8] Insulin monomers, dimers and hexamers: <http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section11/insulin.html>.
- [9] PDB-101 Molecule of the Month. Insulin. doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2001_2.
- [10] <https://cdn.rcsb.org/pdb101/learn/resources/insulin-activity-assets/insulin-activity.pdf>.