

Chemie und Physiologie biogener Zink-Verbindungen

Von Prof. Dr. Dr. G. WEITZEL

Physiologisch-chemisches Institut der Justus-Liebig-Hochschule Gießen

Als zellvertraute, Zink-bindende Konfigurationen fungieren in erster Linie Imidazol- und SH-Gruppen. Die hohe Zink-Affinität einfacher Imidazol-Verbindungen kehrt wieder bei Histidin und Histidyl-Peptiden sowie bei den Imidazol-Gruppen von Proteinen, wie Albumin, Globulin und Insulin. Das Zink-Bindungsvermögen von Purinen und Nucleosiden beruht ebenfalls maßgeblich auf der in ihnen enthaltenen Imidazol-Konfiguration. Als Zink-affine SH-Verbindungen treten Cystein, Cysteinyl-Peptide und SH-haltige Proteine auf. Die Zink-Anreicherungen in bestimmten Organen des Tierkörpers zeigen dieselben Konfigurationen. So ist das „Inselzink“ des Pankreas mit größter Wahrscheinlichkeit an die Imidazol-Gruppen der blutzuckersteuernden Wirkstoffe gebunden, während im Augenhintergrund verschiedener Säugetierarten große Mengen von Zink-Cystein enthalten sind. Als dritte, physiologisch wichtige Zink-affine Gruppierung zeichnen sich gewisse Glutamyl-Peptide ab.

Zink kommt in allen lebenden Organismen vor und gehört neben dem Eisen zu den wichtigsten biologischen Spurenelementen. Über die speziellen Aufgaben des Zinks im Zellstoffwechsel hat man jedoch bis heute nur ungenügende Kenntnisse, obwohl in den letzten Jahren zahlreiche neue Befunde über Zink-haltige Naturstoffe und über auffallende Zink-Anreicherungen in manchen Zellgeweben hinzugekommen sind. Im Vergleich zum Eisen kann man die biologische Rolle des Zinks zu den bislang vernachlässigten Problemen der Physiologischen Chemie rechnen. So ist z. B. nie recht beachtet worden, daß beim höheren Tier und beim Menschen die meisten Gewebe mehr Zink als Eisen enthalten. Zwar ist der Gesamt-Eisengehalt des Tierkörpers etwas höher als der Zink-Gehalt, jedoch befindet sich über die Hälfte des Eisens in den roten Blutkörperchen, d. h. außerhalb der eigentlichen Organe. Aus dem relativ hohen Zink-Gehalt der Organe (meist 30–50 γ Zn/g Frischgewebe) muß man auf sehr wesentliche Funktionen des Zinks im Zellstoffwechsel schließen; die Konzentrationen an Kupfer und Kobalt z. B. sind um ein bis zwei Zehnerpotenzen geringer.

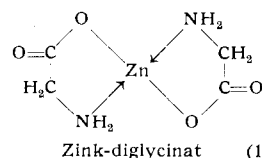
Schwermetalle treten im lebenden Gewebe nicht als freie Ionen auf, sondern wohl immer in Form organischer Komplexverbindungen. Durch die Verknüpfung des Metalls mit organischen Resten werden nicht nur unerwünschte Ionenwirkungen maskiert, sondern gleichzeitig erwünschte Eigenschaften des Metalls verstärkt herausgehoben. Die speziellen chemischen und physiologischen Eigenschaften von Zink-Verbindungen biologischer Herkunft können daher nur mit Hilfe komplexchemischer Methoden und Erfahrungen untersucht und gedeutet werden. Aus der chemischen Koordinationslehre sind zahlreiche Zink-bindende Atomgruppierungen bekannt; von welchen Zink-bindenden Konfigurationen aber die lebende Zelle Gebrauch macht, ist nur unvollständig geklärt.

Zink-Komplexe biogener Liganden

Aminosäuren

Als Zink-bindende Modellspezies biologischer Herkunft sind α -Aminosäuren sehr geeignet, da sie die verschiedensten funktionellen Gruppen aufweisen und Rückschlüsse auf die Zink-Affinität von Peptiden und Proteinen erlauben. Der am längsten bekannte Zink-Aminosäure-Komplex ist das Zink-diglycinat-monohydrat^{1, 2)}, welches heute allgemein in Anlehnung an die entsprechenden Kupfer- und Nickel-Komplexe als inneres Komplexsalz (Scherenkomplex, Chelat) formuliert wird (s. Formel 1). Dabei ergeben sich zwei salzartige Bindungen zu den Sauerstoff-

Atomen der beiden Carboxyl-Gruppen und zwei koordinierte Bindungen zu den einsamen Elektronenpaaren der beiden Stickstoff-Atome. Zink erreicht damit als Zentralatom die Koordinationszahl 4 und gehört zwei fünfgliedrigen Chelatringen an. Die räumliche Anordnung der Liganden um das Zink wird gewöhnlich als tetraedrisch



angenommen³⁾. Neuerdings führten die IR-Spektren von Zink-diglycinat aber zu der Vermutung, der Zink-Komplex besitze ebene Konfiguration wie die entsprechenden Kupfer- und Nickel-glycinat⁴⁾. Sollten sich diese Befunde bestätigen, dann würde zumindest bei allen Komplexen des Typs ZnR_2 mit R als zweizahnigem Liganden mit $-COO^-$ und $-\alpha-NH_2$ -Gruppe die ebene trans-Konfiguration vorliegen. Somit müßte die Tetraeder-Hypothese fallen gelassen werden.

Seit 1909 ist bekannt⁵⁾, daß beim Zusammentreffen von Zink-Ionen und Glykokoll in wäßriger Lösung die Leitfähigkeit ansteigt, da bei der Komplexbildung Wasserstoff-Ionen freierwerden. Diese nach $Me^{2+} + 2 HR \rightarrow MeR_2 + 2 H^+$ freierwerdenden H-Ionen lassen sich quantitativ durch potentiometrische Titration bestimmen, wovon im Falle des Zink-glycins zuerst 1941⁶⁾ Gebrauch gemacht wurde. Bjerrum⁷⁾ sowie Calvin und Wilson⁸⁾ verbesserten die Methodik und vor allem die Auswertung der Meßergebnisse soweit, daß die Bestimmung der Stabilitätskonstanten von Metallkomplexen in wäßriger Lösung für einfache organische Liganden keine Schwierigkeiten mehr bereitet.

Bestimmungen der Stabilitätskonstanten von Zink-Aminosäure-Komplexen^{9–13)} durch potentiometrische Titration ergaben, daß die Stabilität der Zink-Aminosäure-(1:2)-Komplexe jeweils geringer ist als diejenige der entsprechenden Cu^{2+} - und Ni^{2+} -Komplexe, jedoch höher als diejenige der Co^{2+} -, Cd^{2+} -, Fe^{2+} -, Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Komplexe deren Stabilität in dieser Reihenfolge abnimmt. Die

¹⁾ V. Dessaignes, Ann. Chem. Pharm. 82, 236 [1852].

²⁾ Th. Curtius, J. prakt. Chem. 26, 145 [1882].

³⁾ L. Pauling: The nature of the chemical bond Cornell University Press, Ithaca, New York 1939.

⁴⁾ D. Sweeny, C. Curran u. J. Quaglin, J. Amer. chem. Soc. 77, 5508 [1955].

⁵⁾ H. Ley, Ber. dtsch. chem. Ges. 42, 354 [1909].

⁶⁾ J. Eisenbrand u. F. Wegel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 268, 26 [1941].

⁷⁾ J. Bjerrum: Metal ammine formation in aqueous solution, Kopenhagen 1941.

⁸⁾ M. Calvin u. K. W. Wilson, J. Amer. chem. Soc. 67, 2003 [1945].

⁹⁾ H. Flood u. V. Loras, Tidsskr. Kjem. Berg. Metallurg. 5, 83 (zit. n. 11).

¹⁰⁾ L. Maley u. D. Mellor, Nature [London] 165, 453 [1950].

¹¹⁾ A. Albert, Biochem. J. 47, 531 [1950].

¹²⁾ A. Albert, ebenda 50, 690 [1952].

¹³⁾ D. Perkins, ebenda 55, 649 [1953].

gemessenen Stabilitätskonstanten (ausgedrückt als $\log K_s$, (s. hierzu^{11, 12, 13})) liegen für Zink-Aminosäure-Komplexe durchweg im Bereiche von rd. 7–10 mit zwei Ausnahmen: Für Zink-histidin (1:2) fand man als $\log K_s$ 12,9¹⁰ bzw. 12^{12, 13} und für Zink-cystein (1:2) sogar 17,1¹³ bzw. 18,2¹²). Damit lassen die potentiometrischen Titrations vergleichsweise bei fast allen α -Aminosäuren nur eine mittlere, dagegen bei Histidin und besonders bei Cystein hohe Zink-Affinität erkennen.

Inwieweit α -Aminosäuren für physiologische Verhältnisse als Zink-bindende Liganden in Frage kommen, läßt sich aus den potentiometrischen Meßergebnissen nicht sagen. Hier liefern jedoch Untersuchungen an kristallisierten, analysenreinen Zink-Aminosäure-Komplexen, welche zumeist bisher unbekannt waren, deutliche Hinweise¹⁴. Schon Curtius²) hatte festgestellt, daß reines Zink-diglycinat (1) in wäßriger Lösung zerfällt und Zinkhydroxyd abscheidet, während Kupfer- und Nickel-diglycinat ohne Zersetzung aus siedendem Wasser umkristallisiert werden können. Es zeigte sich nun¹⁴), daß fast alle präparativ dargestellten Zink-Aminosäure-(1:2)-Komplexe wie Zink-glycin, -alanin, -serin, -valin, -leucin, -lysin, -arginin, -phenyl-alanin, -prolin usw. in wäßriger Lösung (von p_H 6 an aufwärts) hydrolysieren. Nur wenn man zu der Lösung einen Überschuß der betreffenden Aminosäure gibt, läßt sich die Hydrolyse zurückdrängen. Die Zink-Aminosäure-Komplexe (außer Zink-prolin) sind strukturell dem Zink-diglycinat analog. Da sie sämtlich in Wasser unbeständig sind, muß man folgern, daß der aus Metall und α -Aminosäure gebildete Chelat-Fünfring für das wäßrige Milieu der lebenden Zelle keine stabile Zink-bindende Konfiguration darstellt und somit physiologisch vermutlich ohne Bedeutung ist.

Um so größeres biologisches Interesse beanspruchen die Aminosäuren, deren Zink-Komplexe durch Wasser nicht hydrolysiert werden. Die präparativen Untersuchungen zeigen — übereinstimmend mit den potentiometrischen Messungen^{10, 12, 13}) — die Ausnahmestellung von Histidin und Cystein: Zink-histidin (1:2) und Zink-cystein (1:2) hydrolysieren in wäßriger Lösung nicht. Die gegenüber den anderen α -Aminosäuren so auffallend hohe Zink-Affinität von Histidin und Cystein ist auf die Anwesenheit des Imidazol-Rings bzw. der SH-Gruppe zurückzuführen, welche stark Zink-bindend sind. Dadurch führt die Untersuchung der Zink-Aminosäure-Komplexe zu der viel weitergehenden Frage, ob Imidazol- und SH-Verbindungen ganz allgemein hohe Zink-Affinität besitzen, denn außer Histidin und Cystein kommen Imidazol- und SH-Derivate in vielfältiger Art im Zellstoffwechsel vor. Neuere Untersuchungen (s. u.) haben ergeben, daß Imidazol- und Thiol-Verbindungen zu den wichtigsten zellvertrauten Zink-bindenden Konfigurationen gehören und daß, vom Standpunkt der Zink-Bindung aus gesehen, Histidin und Cystein nicht als α -Aminosäuren, sondern als Imidazol- bzw. SH-Derivate zu behandeln sind.

Imidazol-Verbindungen, Purine, Nucleotide

Die hohe Affinität des Imidazol-Rings zu Schwermetallen ist seit langem aus präparativen Arbeiten bekannt. Im Hinblick auf die im physiologischen p_H -Bereich auftretenden Bindungsmöglichkeiten zwischen Zink und Imidazol wurden in jüngster Zeit zahlreiche Zink-imidazol-Verbindungen analysenrein dargestellt¹⁵), wobei Imidazol, 1-Methyl-, 2-Methyl-, 4(5)-Methyl-, 1,3-Dimethyl-imidazol,

Benzimidazol, 1-Methyl-, 2-Methyl-benzimidazol, 2-Äthyl-benzimidazol, Histamin und Urocaninsäure als Liganden dienten. Es ergab sich in allen Fällen sehr hohe Zink-Affinität, verbunden mit auffallend großer Variationsbreite der Zink-Imidazol-Bindung, da der Imidazol-Ring als Anion, als ungeladene Molekel oder auch als Kation mit Zink feste Komplexe bildet. Zink-imidazol (1:2) ist der Grundkörper derjenigen Imidazol-Zink-Verbindungen, in denen der Heterocyclus als Anion fungiert. Entsprechende Zink-Imidazol-(1:2)-Verbindungen lassen sich von alkylierten Imidazolen, vom Benzimidazol und zahlreichen anderen Imidazol-Derivaten darstellen¹⁵). Im Hinblick auf die Struktur von Kettenmolekeln (Histidyl-polypeptide) ist die Frage von besonderem Interesse, ob schon ein einzelner Imidazol-Ring ein Zink-Ion fest binden kann. Es gelang, gemischte Komplexe der Zusammensetzung Imidazol-Zn-R (1:1:1) darzustellen, in denen als R ein Carbonsäure-Anion besonders geeignet ist, z. B. Imidazol-zinkbutyrat, Benzimidazol-zinkacetat, Benzimidazol-zinkbutyrat bis -stearat (sämtlich 1:1:1)¹⁵). Dagegen gelang es nicht, Imidazol-Zink-R-Komplexe herzustellen, in denen R Glycin oder eine ähnliche Aminosäure ist.

Titrimetrische Bestimmungen der Stabilitätskonstanten sind bei Zink-Imidazol-Verbindungen mit anionischem Imidazol wegen deren Schwerlöslichkeit kaum möglich, dagegen aber bei „Doppelsalzen“ vom Typ Imidazol₂-ZnCl₂. p_H -Messungen ergaben¹⁶), daß ein Zink-Ion maximal vier Imidazol-Ringe assoziiert, wobei nach Bindung des ersten Imidazols die Tendenz zur Bindung des zweiten, dritten und vierten Imidazols fortlaufend zunimmt, so daß Zink-(imidazol)₄ besonders begünstigt wäre¹⁶). Die Isolierung derartiger Komplexe gelang jedoch bisher nicht; vielmehr bindet Zink koordinativ stets höchstens zwei Imidazol-Ringe¹⁵).

Unter den einfachen Imidazol-Derivaten besitzt Histamin besonderes biologisches Interesse; definierte Zink-Salze des Histamins waren bis vor kurzem nicht bekannt. Man konnte jedoch neuerdings vom Histamin analysenreine Zink-Komplexe gewinnen, die den Komplexarten entsprechen, die man auch sonst bei Imidazol-Verbindungen findet, z. B. Zink-(histamin)₂ oder das Zinkchlorid-Doppelsalz des Histamins, in dem zwei Histamin-Molekeln nur koordinativ an Zink gebunden sind, so daß der Komplex die Ladung des Zink-Ions trägt¹⁵). Aus potentiometrischen Messungen an Histamin-Lösungen¹⁷) in Gegenwart von Kupfer-, Kobalt- und Nickel-Salzen kommt man zu Strukturformeln, wie sie auch für Zink-Komplexe zu fordern sind: Formel 2 entspricht der Struktur des Zink-Histamin-1:2-Komplexes¹⁵). Das Zink gehört hier gleichzeitig zwei sechsgliedrigen Chelat-Ringen an, wobei der Imidazol-Ring nach Abgabe eines Protons als Anion auftritt, so daß dem Zink die Koordinationszahl 4 zukommt. Über Zink-Verbindungen von Urocaninsäure s.¹⁵).

Im Histidin erweitern sich im Vergleich zum Histamin die Möglichkeiten der Zink-Bindung durch die zusätzliche Carboxyl-Gruppe. Die Literatur kannte bisher nur die potentiometrischen Titrationsmessungen an wäßrigen Lösungen von Histidin-Zink-Salzen^{11, 12, 13}), die auffallend hohe Stabilitätskonstanten für Zink-histidin ergaben. Über die erste präparative Darstellung und Identifizierung verschiedener Arten von Zink-Histidin-Komplexen wird soeben berichtet¹⁸). Die 1:2-Zink-Komplexe des L-, D- und DL-Histidins sind in wäßriger Lösung hydrolysebeständig, die letztgenannte Verbindung läßt sich sogar ohne zu

¹⁴) G. Weitzel u. W. Schaeg, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. (im Druck).

¹⁵) G. Weitzel u. A.-M. Fretzdorff, ebenda 305, 1 [1956].

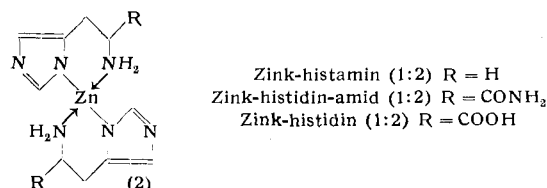
¹⁶) J. Edsall, G. Felsenfeld, D. Goodman u. F. Gurd, J. Amer. chem. Soc. 76, 3054 [1953].

¹⁷) B. Mickel u. A. Andrews, ebenda 77, 323, 5291 [1955].

¹⁸) G. Weitzel, F. Schneider, A.-M. Fretzdorff u. H. E. Heyke, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 306 [1956] im Druck.

zerfallen aus siedendem Wasser umkristallisieren. Neben den 1:2-Komplexen gelingt aber auch die Darstellung des Zink-histidins 1:1 sowie die Gewinnung von kristallisierten Zink-chlorid-Doppelsalzen des Histidins. Auch die bei Imidazol- und Benzimidazol nachgewiesene Bildung der 1:1:1-Komplexe vom Typ Imidazol-zink-butytrat findet ihre Parallele im Histidin-zink-butytrat oder -capronat (1:1:1)¹⁸⁾.

Die Formulierung des Zink-histidins (1:2) wirft die Frage nach der Art der Beteiligung des Imidazol-Rings an der Zink-Bindung auf. In der Formel 2 ist nur eine Möglichkeit angedeutet, dabei bleibt das Carboxyl unbeteiligt.

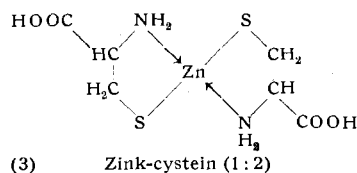


Im Zink-histidin (1:2) könnte Zink die Koordinationszahl 4 aber auch durch koordinierende Bindungen von den Amino- und den „Pyridin“-Ring-Stickstoff-Atomen erreichen, während die Carboxyl-Gruppe „in äußerer Sphäre“ die Ladung des Zink-Ions absättigt. Der extremste Fall der Imidazol-Zink-Bindung im Zink-histidin würde dann vorliegen, wenn das Metall nach Art des Zink-imidazols (1:2) lediglich durch die beiden Imidazol-Ringe gebunden wäre ohne Beteiligung von Carboxyl- und α -Amino-Gruppe. Zwischen diesen Möglichkeiten kann z. Zt. noch nicht entschieden werden (s.¹⁹⁾). Das ebenfalls dargestellte Zink-(histidinamid)₂ dagegen besitzt sehr wahrscheinlich die in Formel 2 aufgezeichnete Struktur¹⁸⁾.

Der Imidazol-Kern ist Bestandteil der Purinkörper, deren hohes Bindungsvermögen für Schwermetalle seit Beginn der Purinchemie bekannt ist. Zink-Purin-Verbindungen sind kaum untersucht worden, obwohl Kossel¹⁹⁾ schon 1886 Adenin durch Zink-Zusatz ausfällt. Ein dem Zink-(imidazol)₂ ähnliches Zink-(adenin)₂ sowie Zink-(hypoxanthin)₂ und Zink-(guanin)₂ wurden kürzlich dargestellt²⁰⁾. Auch in Nucleosiden wie z. B. im Adenosin ist die Zink-Affinität des Imidazol-Kerns erhalten, obwohl hier wegen des fehlenden Imino-Wasserstoffs nur noch koordinative Metallbindung möglich ist. Dementsprechend gelang die Darstellung eines kristallisierten Komplexes Adenosin-Zink-Thiophenol (1:1:2)²¹⁾, in welchem die Stickstoff-Atome des Adenosins zwei koordinierte, die Schwefel-Atome der Thiophenole zwei polare Bindungen zum Zink ausbilden. Der kürzlich dargestellte Komplex Adenosin-Zink-oxalat²⁰⁾ dürfte analog zu formulieren sein. Auch die verschiedenen Adenosin-phosphorsäuren bilden Zink-Komplexe, in denen das Ringsystem koordinierend an der Metallbindung beteiligt ist. Zink-AMP (1:1) ist schwerlöslich²⁰⁾, Titrationskurven und Papierionophorese der Zink-Salze von ADP und ATP ergaben, daß ATP die stärkere Zink-Bindung besitzt²²⁾. Die Überführung unlöslicher Metallsalze in lösliche Komplexe dürfte zu den physiologisch wichtigen Funktionen von ATP gehören²³⁾. Entsprechendes gilt für Inosintriphosphat und Flavinnucleotid, da die Schwermetallaffinität von Inosin und Riboflavin sehr hoch ist²⁴⁾. Über Zink-Komplexe von DPN, die im Hinblick auf die Zink-haltigen Dehydrasen (s. u.) ganz besonders interessieren, sind z. Zt. noch keine sicheren Angaben möglich.

Thiol-Verbindungen

Die oben^{12, 13)} erwähnte hohe Stabilität des Zink-cysteins (1:2) ließ die Beteiligung des Schwefels an der Zink-Bindung vermuten. Durch vergleichende Messungen an verschiedenen SH-Verbindungen konnte für Zink-cystein (1:2) die in Formel 3 gegebene Struktur gesichert werden²⁵⁾. Denn Zink-cystein (1:2) und Zink-cysteamin (1:2) — (2-Mercapto-äthylamin) —, besitzen die gleiche Komplexstabilität, während Mercaptoessigsäure (Thioglykolsäure) einen viel weniger festen 1:2-Komplex mit Zink bildet. Daraus folgt (s. 3), daß im Zink-cystein (1:2) die Carboxyl-Gruppen nicht an der Zink-Bindung beteiligt sind, sondern daß Amino-Stickstoff und S⁻ das Metall binden. Dies



ist ein Beispiel für den häufig auftretenden Fall, daß Zink die Bindung an die stärker saure Gruppe (hier COOH) meidet, wenn es statt dessen in einen fünfgliedrigen Chelat-Ring eintreten kann.

Zink-cystein (1:2) ist bisher nur in wäßriger Lösung bekannt; es ist äußerst schwierig präparativ darzustellen¹⁴⁾, da der Komplex überaus leicht löslich ist und der sich bildende schwerlösliche 1:1-Komplex¹⁴⁾ stört. Schon früher hatte man⁵⁾ auf Grund von Titrationsmessungen ein Zink-cystein 1:1 vermutet; die Existenz dieses Komplexes, der Li und Manning²⁵⁾ wegen seiner Schwerlöslichkeit offenbar entgangen ist, wurde durch präparative Darstellung von Zink-cysteinat-monohydrat (1:1:1) sowie durch Isolierung aus dem Augenhintergrund von Säugetieren bewiesen (s. u.).

Peptide

Nach unseren heutigen Kenntnissen entspricht das Zink-Bindungsvermögen von Peptiden den Erwartungen, die sich aus der Kenntnis der Zink-Aminosäure-Komplexe ergeben. So ist die Zink-Affinität von Peptiden wie Di-, Tri- und Tetraglycin, Alanyl-glycin, Glycyl-alanin, Glycyl-leucin, Leucyl-glycin, Leucyl-glycyl-glycin, Glycyl-serin usw. nicht sehr hoch, in jedem Falle geringer als die der entsprechenden freien Aminosäuren²⁶⁾. Die präparative Darstellung derartiger Zink-peptide (1:2) führt stets zu Komplexen, die in Wasser sofort hydrolytisch zerfallen¹⁴⁾. Für eine Beteiligung der Peptid-Gruppe an der Metallbindung, wie es für die Cu(II)-, Co(II)- und Ni(II)-Komplexe von Di- und Tri-glycin vermutet wird²⁷⁾, liegen für Zink noch keine Anhaltspunkte vor.

Vom biologischen Standpunkt aus sind auf Grund der hohen Zink-Affinität des Imidazol-Kerns Zink-Komplexe von Histidyl-peptiden besonders interessant, über welche soeben erstmals berichtet wird²⁸⁾. Man prüfte sieben Dipeptide (L-Histidyl-glycin, DL-Histidyl-DL-alanin, DL-Histidyl-DL-leucin, Glycyl-L-histidin, L-Asparagyl-L-histidin, DL-Histidyl-DL-histidin, Carnosin) und ein Tripeptid (Glycyl-L-histidyl-L-leucin), welche sämtlich hohe Zink-Affinität besitzen. Die analysenrein gewonnenen Zink-histidyl-peptide liegen als 1:2-, in einigen Fällen als 1:1-Komplexe vor. Sie lösen sich zumeist sehr leicht in Wasser und hydrolysieren dabei nicht. In den Struktur-

¹⁹⁾ A. Kossel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 10, 248 [1886].

²⁰⁾ G. Weitzel u. Th. Spehr, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. (im Druck).

²¹⁾ K. Wallenfels, diese Ztschr. 67, 787 [1955].

²²⁾ M. A. G. Kaye, Biochim. Biophysica Acta 18, 456 [1955].

²³⁾ C. Neuberg u. I. Mandl, Arch. Biochemistry 23, 499 [1949].

²⁴⁾ A. Albert, Biochem. J. 54, 646 [1953].

²⁵⁾ N. Li u. R. Manning, J. Amer. chem. Soc. 77, 5225 [1955].

²⁶⁾ D. J. Perkins, Biochem. J. 57, 702 [1954].

²⁷⁾ A. Manyak, C. Murphy u. A. Martell, Arch. Biochem. Biophysics 59, 373 [1955].

²⁸⁾ G. Weitzel, F. Schneider u. A.-M. Fretzdorff, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 306 [1956] im Druck.

formeln dieser Zink-histidyl-peptide ist die maßgebliche Beteiligung des Imidazol-Kerns an der Zink-Bindung zu berücksichtigen (näheres s.²⁹), wobei das Tripeptid Glycyl-L-histidyl-L-leucin durch die spontane Bildung eines 1:1-Zink-Komplexes gewisse Schwierigkeiten der Formulierung bietet. In diesem speziellen Falle muß eine etwaige Mitwirkung der Peptid-Gruppe an der Zink-Bindung erwogen werden²⁸).

Unter den Cysteinyl-peptiden ist bisher nur das Glutathion als Zink-bindender Ligand titrimetrisch geprüft worden²⁹). Die Stabilitätskonstanten sprechen beim reduzierten Glutathion für Zink-Bindung durch $-S^-$ und $-NH_2$, beim oxydierten Glutathion für Zink-Bindung durch $\alpha-COO^-$ und $-NH_2$.

Unter den Peptiden der Glutaminsäure treten ebenfalls solche mit hoher Zink-Affinität auf. Dies ergibt sich einerseits aus Kellers Untersuchungen über das Coferment der Carboanhydrase (s. S. 572), andererseits aus Stabilitätsmessungen an synthetischen Zink-glutamyl-peptiden³⁰).

Zink-Komplexe von Proteinen

Zink und Insulin. Unter den Zink-Protein-Komplexen hat man die Beziehungen zwischen Zink und Insulin sowie Zink und Albumin eingehend geprüft. Die Versuchsbedingungen liegen beim Insulin besonders übersichtlich, da Insulin kristallisiert und hochgereinigt leicht zugänglich ist und seine chemische Struktur durch die Arbeiten von Sanger³¹) so gut wie völlig aufgeklärt ist. Für die Ermittlung der Zink-bindenden Konfigurationen kommt ein weiterer Vorteil hinzu: Insulin besitzt pro Molekel (Mol.-Gew. ca. 5750)³²) zwei Histidyl-Reste, jedoch keine Cystein- (nur Cystin-) Reste, so daß Konkurrenzreaktionen zwischen Imidazol- und SH-Gruppen gegenüber Zink-Ionen ausscheiden.

Das Zink-Bindungsvermögen des Insulins wurde 1934 bei Kristallisationsversuchen entdeckt³²); für die Kristallisation des Insulins ist die Anwesenheit von Zink (oder ersatzweise von Cd, Co, Ni) erforderlich, Zink-freies kristallines Insulin ist bis heute nicht bekannt. Die üblichen Kristallisationsmethoden liefern Insulin-Präparate mit etwa 0,5% Zink, die Zink-Sättigung des Insulins liegt aber wesentlich höher. Durch Suspendieren von Insulin-Kristallen in Acetatpuffer + $ZnCl_2$ (p_H 7,2) erhält man Präparate mit etwa 2,2% Zink, wobei der Zink-Gehalt vom p_H der Lösung streng abhängig ist³³): Bei p_H 5 werden ca. 0,5%, bei p_H 6 ca. 1% und bei p_H 7 ca. 2% Zink aufgenommen. Pufferlösungen, die selbst Zink-bindend sind, verhindern, daß die Zink-Sättigungswerte des Insulins erreicht werden³³). Zu gleichen Ergebnissen kommt man mit einer zur Bestimmung des maximalen koordinativen Zink-Bindungsvermögens von Peptiden und Proteinen geeigneten Methodik^{34, 35}): Bietet man überschüssiges, locker komplex gebundenes Zink an, z. B. in Form von Zink-glycinat (1:2,5) oder anderer Zink-Aminosäure-Komplexe, so nimmt Insulin bei p_H 7,2 bis zu 2,2% Zink in kürzester Zeit auf. Ein maximaler Zink-Gehalt von 2,2% entspricht der Aufnahme von zwei Zink-Ionen pro Insulin-Molekel, so daß auf die beiden Histidyl-Reste des Insulins je ein

Zink-Ion entfallen würde. Da andere Zink-bindende Konfigurationen in der Strukturformel des Insulins nach den heutigen Kenntnissen nicht enthalten sind, liefert die mit 2,2% ermittelte Zink-Sättigungsgrenze des Insulins ein wesentliches Argument für die Annahme, daß das Zink im Insulin mit Hilfe der Imidazol-Ringe des Histidins gebunden wird. Zu demselben Ergebnis führten vergleichende potentiometrische Titrations an Zink-freiem und Zink-haltigem Insulin³⁶). Weitere Hinweise auf Zink-histidyl-Bindungen im Insulin ergeben sich aus der Darstellung gemischter Insulin-Zink-R-Komplexe^{34, 35}), in denen bestimmte niedermolekulare Liganden (R) ebenso wie in einfachen Imidazol-Zink-R-Komplexen an Insulin gebunden sind¹⁵).

In engem Zusammenhang mit der p_H -abhängigen Dissoziation der Zink-Insulin-Komplexe (s. o.) steht die Löslichkeit des Insulins. Suspendiert man Insulin in Pufferlösungen (p_H 6–8), die selbst nicht Zink-bindend sind, so zeigt sich, daß die Löslichkeit des Insulins direkt von seinem Zink-Gehalt abhängt³³). Löslichkeitsbestimmungen von Insulin-Präparaten verschiedenen hohen Zink-Gehaltes in Acetatpuffer (p_H 7,2) ergaben z. B., daß Zink-freies Insulin praktisch völlig löslich ist, während bereits ein Zink-Gehalt von 0,2 bis 0,5% die Löslichkeit erheblich vermindert und Insulin mit mehr als 1% Zn fast gänzlich ungelöst bleibt³⁷). Dies könnte auf einer durch Zink begünstigten Assoziation der Insulin-Molekeln zu größeren Aggregaten beruhen, denn in der Ultrazentrifuge führt eine Zunahme des Insulin-gebundenen Zinks zum Ansteigen der Sedimentationskonstanten der betreffenden Zink-Insulin-Komplexe³⁸). Die Löslichkeit des Insulins als Funktion des Zink-Gehaltes bildet ein eindrucksvolles Beispiel für die Beeinflussung der Eigenschaften von Proteinen durch Spuren komplex gebundener Schwermetalle, denn schon ein Zink-Ion pro Insulin-Molekel (d. s. 1,1% Zn bei Mol.-Gew. 5750) genügt, um das Insulin fast völlig unlöslich zu machen.

Zink-albumin, Zink-globulin. Die polarographische Prüfung des p_H -Einflusses auf die Assoziation verschiedener Schwermetalle an Rinder-Serumalbumin spricht für die Imidazol-Gruppen als Ort der Zink-Bindung³⁹). Die Anwendung der Gleichgewichts-Dialyse auf menschliches Serumalbumin führt zu demselben Ergebnis, daß nämlich nur die Histidyl-Reste als Zink-bindende Konfigurationen fungieren, wobei maximal auf jeden Imidazol-Ring ein Zink-Ion entfällt⁴⁰). Durch Guanidierung oder Diazo-Veresterung ändert sich die Zink-Bindung des Albumins nicht⁴⁰). Dem stehen jedoch Befunde am Rinder-Serumalbumin gegenüber, wonach Zink von den SH-Gruppen des Albumins gebunden wird, bevor Histidyl-Reste reagieren⁴¹). Die Bindung von Zink an die Serum-eiweißkörper beeinflusst in verschiedener Weise deren Löslichkeit, wodurch ein schonendes Verfahren zur Protein-Fraktionierung gegeben ist⁴²). Zink-Ionen in bestimmter Konzentration bilden z. B. mit Serumalbumin, α -Lipoprotein, α -Glykoprotein, alkalischer Phosphatase usw. lösliche, mit γ -Globulin und β -Lipoproteinen unlösliche Komplexe⁴³).

Die physiologische Bedeutung der an Albumin und Globulin gebundenen Zink-Ionen dürfte in der „Brücken-

²⁹) N. Li, O. Gawron u. G. Bascuas, J. Amer. chem. Soc. 76, 225 [1954].

³⁰) G. Weitzel u. M. Liefänder, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. (im Druck).

³¹) F. Sanger u. Mitarbb., Biochem. J. 60, 541, 556 [1955].

³²) D. A. Scott, ebenda 28, 1592 [1934].

³³) K. Hallas-Möller, K. Petersen u. I. Schlichtkrull, Ugeskrift f. Laeger 52, 1761 [1951].

³⁴) G. Weitzel, A.-M. Fretzdorff, F. J. Strecker u. U. Roester, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 293, 190 [1953].

³⁵) G. Weitzel, E. Buddecke, F. J. Strecker u. U. Roester, ebenda 298, 169 [1954].

³⁶) C. Tanford u. I. Epstein, J. Amer. chem. Soc. 76, 2163, 2170 [1954].

³⁷) G. Weitzel u. A.-M. Fretzdorff, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. (im Druck).

³⁸) L. Cunningham, R. Fischer u. C. Vestling, J. Amer. chem. Soc. 77, 5703 [1955].

³⁹) C. Tanford, ebenda 74, 211 [1952].

⁴⁰) F. Gurd u. D. Goodman, ebenda 74, 670 [1952].

⁴¹) I. Klotz, J. Urquhart u. H. Fiess, ebenda 74, 5537 [1952].

⁴²) E. J. Cohn u. Mitarbb., ebenda 72, 465 [1950].

⁴³) H. Isliker u. H. Antoniadis, J. Amer. chem. Soc. 77, 5863 [1955].

funktion“ des Metalls gegenüber niedermolekularen Liganden liegen. Ähnlich den oben erwähnten Insulin-Zink-R-Komplexen^{34, 35)} lassen sich Substanzen, die sonst nicht von Proteinen gebunden werden, durch Zink fest mit Proteinen verknüpfen, z. B. organische Farbstoffe mit Zinkalbumin⁴⁴⁾. Für Imidazol-gebundenes Zink an Proteinen ist dabei eine auswählende Funktion gegenüber dem assoziierten Liganden anzunehmen, denn dieses Zink lagert bevorzugt einen zweiten Imidazol-Ring oder eine Carbonsäure an¹⁵⁾. Quantitative Bestimmungen der Stabilität von ternären Albumin-Zink-R-Komplexen (R = Pyridin-2-azo-p-dimethylanilin) im p_H-Bereich 6–8 lassen hohe Empfindlichkeit der Komplexe gegen OH⁻-Ionen erkennen. Schon kurz oberhalb p_H 7 sinkt die Stabilität stark ab, vermutlich infolge einer Hydroxylierung des Metalls⁴⁵⁾.

Zink im Tierkörper

Blut

Über den Zink-Gehalt des Blutes und seiner Fraktionen liegen zahlreiche, nicht immer übereinstimmende Angaben vor. Der Zink-Gehalt des Vollblutes vom Menschen wird mit 650–900 γ %^{46, 47, 48)}, derjenige des Serums mit 100 bis 200 γ % angegeben^{47, 48, 49)}. Sowohl die Erythrocyten als auch die Leukocyten gelten als Zink-reich⁴⁶⁾. Die Frage nach den im Blut vorhandenen Zink-Verbindungen läßt sich z. Z. nur in Umrissen beantworten. Im Blutserum sind als Zink-Proteide Albumin und Globuline mit Sicherheit vorhanden (s. o.); man nimmt eine locker und eine fest an die Serumproteine gebundene Zink-Fraktion an⁴⁸⁾. Den Zink-Gehalt der Erythrocyten führt man allgemein auf das Ferment Carboanhydrase zurück^{50, 51, 52)} (s. u.), das reichlich in ihnen enthalten ist, während aus menschlichen Leukocyten ein nicht näher identifiziertes Zink-Proteid isoliert wurde^{53, 54)}. Die beim Zerfall menschlicher eosinophiler Granulocyten entstehenden *Charcot-Leyden*-schen Kristalle wurden in jüngster Zeit als Zink-reiches Polypeptid erkannt⁵⁵⁾.

Pankreas

Nachdem die engen chemischen Beziehungen des Zinks zum Insulin bekannt wurden⁵⁶⁾, begann man, das Pankreas (Bauchspeicheldrüse) auf seinen Zink-Gehalt zu untersuchen. Die im Pankreas liegenden Produktionsstätten des Insulins, die sogen. *Langerhansschen* Inseln, sind als geschlossene Zellgruppen über das ganze Organ verstreut in die Masse des exokrinen Pankreasgewebes eingebettet, so daß man die Inseln, die nur ca. 2% des Gesamtorgans ausmachen, präparativ nicht isolieren kann. Die ursprüngliche Annahme, das Gesamtpankreas sei auf Grund seines Insulin-Gehaltes ein Zink-reiches Organ⁵⁷⁾, hat sich als unzutreffend erwiesen⁵⁸⁾; die Gesamtdrüse enthält nicht mehr Zink als andere Organe auch, d. h. 25–45 γ Zn/g Frischgewebe⁵⁹⁾. 1942 konnte jedoch *Okamoto*⁶⁰⁾ mit histologi-

scher Methodik zeigen, daß speziell im Inselgewebe, aber nicht im exokrinen Gewebe, Zink angereichert vorhanden ist. Damit war qualitativ der Zinknachweis im Inselgewebe gelungen; dagegen konnten quantitative Zinkanalysen des Gesamtpankreas nicht zum Ziele führen, da das Zink-arme exokrine Gewebe als Ballast (ca. 98%!) den Zink-Reichtum der Inseln verschleierte. Die direkte chemische Bestimmung des Insel-Zinks gelang jedoch an den isolierten Inselorganen von Knochenfischen (Seeteufel, Kabeljau, Heilbutt, Steinbutt, Seelachs, Flunder usw.)⁶¹⁾, bei denen – abweichend von allen anderen Wirbeltieren – das Inselgewebe als isoliertes Organ getrennt vom exokrinen Gewebe vorhanden ist. Der Zink-Gehalt des reinen Inselgewebes liegt bei 500–1000 γ Zn/g Frischgewebe gegenüber rd. 30 γ Zn im exokrinen Gewebe⁶¹⁾.

Histologisch kann man in den *Langerhansschen* Inseln des Pankreas zwei Zelltypen unterscheiden, die sogen. A- und B-Zellen. Die letzteren produzieren mit Sicherheit das blutzuckersenkende Insulin, während die A-Zellen einen blutzuckersteigernden Faktor, Glucagon genannt, bilden. Seit 1952 vertreten *Weitzel* und Mitarbeiter⁶²⁾ die Ansicht, das Glucagon besitze, ähnlich dem Insulin, enge Beziehungen zum Zink und liege im Organismus als Zink-Komplex-Verbindung vor. Diese These stützt sich auf die Zusammenhänge zwischen Zink-Gehalt und blutzuckersteigernder Wirkung von Pankreasextrakten⁵⁹⁾ sowie zwischen Zink-Gehalt und Glucagoneffekt kristallisierter Insulin-Präparate³⁴⁾, weiterhin auf blutzuckersteigernde Wirkung gewisser Zink-Verbindungen⁶³⁾, schließlich auf das Zink-Bindungsvermögen des Glucagons selbst^{34, 59)} und auf die in ihm enthaltenen Zink-bindenden Gruppen. Denn aus der Reindarstellung⁶⁴⁾ und der Aminosäure-Analyse⁶⁵⁾ des Glucagons geht hervor, daß es sich um ein Polypeptid (Mol.-Gew. ca. 4200) mit einem Histidyl-Rest am basischen Kettenende handelt. Derartige endständige Histidyl-Reste in der „Histamin-Konfiguration“ sind stark Zink-affin, wie die Erfahrungen an synthetischen Histidyl-peptiden (His-gly, His-ala, His-leu s. o.)²⁸⁾ gezeigt haben.

Der Zink-Glucagon-Hypothese stand längere Zeit die Ansicht entgegen, das Insel-Zink befinde sich nur zusammen mit dem Insulin in den B-Zellen, während die Glucagon-produzierenden A-Zellen Zink-frei seien. Histologische Untersuchungen an den Inseln von Ratten und Kaninchen⁶⁶⁾ sowie vor allem am Pankreas der Ente⁶⁷⁾ ergaben jedoch, daß Zink in den A- und B-Zellen reichlich vorhanden ist. Das Entenpankreas eignet sich als Untersuchungsobjekt deshalb besonders gut, weil es zum Teil *Langerhanssche* Inseln besitzt, welche nur aus A-Zellen bestehen. Die präparative Isolierung der A-Zellen-Inseln von Enten ermöglichte zwei Beweisführungen⁶⁸⁾: 1.) Die Hormonaufarbeitung derartiger A-Inseln lieferte nur den blutzuckersteigernden Faktor (Glucagon), kein Insulin. 2.) Die quantitative Zink-Analyse ergab hohe Werte, rd. 500–1000 γ Zn/g Frischgewebe, d. h. die A-Zellen zeichnen sich durch etwa ebenso hohen Zink-Reichtum aus wie die B-Zellen⁶⁸⁾. Zur Deutung dieser Befunde liegt die An-

⁴⁴⁾ I. Klotz u. W. C. Loh Ming, J. Amer. chem. Soc. 76, 805 [1954].

⁴⁵⁾ Th. Hughes u. I. Klotz, ebenda 78, 2109 [1956].

⁴⁶⁾ B. Vallee u. J. Gibson, J. biol. Chemistry 176, 435, 455 [1948].

⁴⁷⁾ H. Wolff, Dtsch. Arch. klin. Med. 197, 263 [1950].

⁴⁸⁾ I. Vikbladh, Scand. J. clin. lab. invest. 2, 143 [1950]; ebenda, suppl. 2 [1951].

⁴⁹⁾ I. Reichenberger, Z. inn. Med. 10, 645 [1955].

⁵⁰⁾ B. Vallee u. M. D. Altschule, Physiol. Rev. 29, 370 [1949].

⁵¹⁾ B. Vallee u. a.; Blood, J. Hematol. 4, Nr. 5 [1949].

⁵²⁾ R. Berfenstam, Upsala Läkaref. förh. 54, 349 [1949]; zit. n. ⁴⁴⁾.

⁵³⁾ F. Hoch u. B. Vallee, J. biol. Chemistry 195, 531 [1952].

⁵⁴⁾ B. Vallee, F. Hoch u. W. Hughes, Arch. Biochem. Biophysics 48, 347 [1954].

⁵⁵⁾ E. Buddecke, A. Essellier u. H. Marti, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 305, Heft 4 [1956].

⁵⁶⁾ D. A. Scott, Biochem. J. 28, 1592 [1934]; D. A. Scott u. A. M. Fisher, ebenda 29, 1048 [1935].

⁵⁷⁾ D. A. Scott u. A. M. Fisher, J. clin. Invest. 17, 725 [1938].

⁵⁸⁾ I. Eisenbrand u. M. Siem, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 268, 1 [1941].

⁵⁹⁾ G. Weitzel, U. Roester, E. Buddecke u. F. J. Strecker, ebenda 303, 162 [1956].

⁶⁰⁾ K. Okamoto, Trans. Soc. pathol. japan. 32, 99 [1942]; 33, 247 [1943].

⁶¹⁾ G. Weitzel, F. J. Strecker u. Roester, A.-M. Fretzdorff u. E. Buddecke, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 295, 83 [1953].

⁶²⁾ G. Weitzel, Tagung Dtsch. Ges. Physiol. Chem., 27. IX. 1952, Hamburg.

⁶³⁾ G. Weitzel, F. J. Strecker u. U. Roester, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 292, 286 [1953].

⁶⁴⁾ A. Staub, L. Sinn u. O. K. Behrens, Science [Washington] 117, 628 [1953].

⁶⁵⁾ A. Staub, L. Sinn u. O. K. Behrens, J. biol. Chemistry 214, 619 [1955].

⁶⁶⁾ H. Wolff u. D. Ringleb, Z. ges. exp. Med. 124, 236 [1954].

⁶⁷⁾ W. Runge, I. Müller u. H. Ferner, Z. Zellforsch. mikroskop. Anat. 44, 208 [1956].

⁶⁸⁾ G. Weitzel, E. Buddecke u. D. Kraft, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 305, 132 [1956].

nahme auf der Hand, daß Insulin und Glucagon, welche Zink an ihre Histidyl-Reste binden, in den B- bzw. A-Zellen als Zink-Komplexe enthalten sind.

In physiologischer Hinsicht führen diese Ergebnisse zu der merkwürdigen Erkenntnis, daß in den B-Zellen der Inseln ein blutzuckersenkendes, in den A-Zellen ein blutzuckersteigerndes Zink-Histidyl-Peptid gebildet wird⁶⁸). Die eigentliche funktionelle Aufgabe des Zinks in diesen Wirkstoffen liegt jedoch noch außerhalb der heutigen Kenntnisse. Das Metall könnte bei der Synthese oder Speicherung der Insel-Wirkstoffe erforderlich sein, es könnte aber auch Funktionen in ihren Stoffwechselwirkungen außerhalb des Pankreas übernehmen. Nach histologischen Befunden scheint bei der Insulin-⁶⁹) sowie bei der Glucagon-⁶⁸) Abgabe zugleich auch Zink die Inseln zu verlassen. Ein Zink-reiches und damit (s. o.) schwerlösliches Insulin könnte als Speicherform des Hormons in den B-Zellen vorhanden sein. Dies führt zu der naheliegenden Vermutung, daß die Insulin-Abgabe chemisch durch ein geeignetes Stoffwechselprodukt selbst reguliert wird, welches das Hormon durch Öffnen der Zink-Insulin-Bindung in Lösung bringt. Derartige Gedankengänge sind jedoch z. Z. noch rein spekulativ (s. hierzu⁶⁹)).

Im Anschluß an den histologischen Nachweis des Insel-Zinks⁶⁰) konnten Okamoto⁷⁰) und seine Mitarbeiter⁷¹) zeigen, daß in das lebende Tier injizierte Zink-bindende Substanzen, wie z. B. Dithizon oder 8-Hydroxychinolin, mit dem Insel-Zink reagieren, dabei die Inselzellen schädigen und Diabetes auslösen. Okamoto's „Zinktheorie des Diabetes“⁷⁰) erklärt die teils diabetogene, teils diabetes-verhütende Wirkung Zink-affiner Substanzen und hat zur Auffindung zahlreicher diabetogener Stoffe geführt⁷²). Auch der Angriffspunkt des Alloxans⁷³) und der Dehydroascorbinsäure⁷⁴) im Inselgewebe ist nach Okamoto⁷²) in der Bindung dieser Stoffe an das Insel-Zink zu suchen. Die von einer anderen japanischen Gruppe⁷⁵) vertretene Ansicht, die dem menschlichen Stoffwechsel nicht fremde Xanthurensäure (4,8-Dioxy-chinolin-carbonsäure-2) sei als Zink-affine Substanz ebenfalls diabetogen, ließ sich nicht bestätigen^{35, 76, 77}), obwohl Zink-xanthurenat (1:1) sowie Insulin-Zink-xanthurenat als stabile Komplexe darstellbar sind³⁵). Das gesamte Xanthurensäure-Problem wurde neuerdings eingehend behandelt⁷⁸). Entscheidend für die Schädigung des Inselgewebes ist offenbar, daß die injizierte Substanz außer hohem Zink-Bindungsvermögen noch eine cytotoxische Wirkungskomponente besitzt⁷²).

Auge

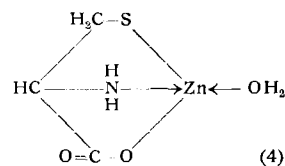
Der Zink-Gehalt von Linse, Glaskörper, Netzhaut und Regenbogenhaut ist bei Säugetieren (Rind, Pferd, Ziege, Schaf, Kaninchen, Hase, Schwein, Hund, Fuchs, Katze, Marder, Wiesel usw.) nicht ungewöhnlich hoch, d. h. er liegt fast immer unter 50 γ Zn/g Frischgewebe⁷⁹). Bei Knochenfischen fand man auffallend hohe Zink-Mengen in der Aderhaut, z. B. durchschnittlich 538 γ Zn/g Frischgewebe⁸⁰). Fische, Amphibien und Säugetiere besitzen in ihren pigmentierten Augenteilen (Chorioidea, Iris) mehr

Zink als in den nicht pigmentierten⁸¹); die Existenz eines Zink-haltigen Melanin-Protein-Komplexes ließ sich durch Untersuchungen an Augengewebe und an Modellsystemen wahrscheinlich machen⁸²). Das isolierte Pigment-epithel der Netzhaut von Herbivoren ist ebenfalls Zink-reich^{82a}).

Die Zink-Analysen der oben erwähnten Säugetieraugen lieferten jedoch extrem hohe Zink-Werte für die hinter der Netzhaut liegende Aderhaut (Chorioidea) der Carnivoren; mehr als 10000 γ Zn/g Frischgewebe waren z. B. bei Fuchs und Marder keine Seltenheit. Durchschnittlich enthielt die Trockensubstanz der Gesamt-Aderhaut beim Hund 0,9%, beim Marder 3,2% und beim Fuchs 3,8% Zink⁷⁹). Diese enormen Zink-Mengen sind jedoch nicht gleichmäßig über die ganze Aderhaut verteilt, sondern befinden sich in einem speziellen Gewebe innerhalb der Aderhaut, dem *Tapetum lucidum*⁸³). Dieses nimmt ein etwa dreieckiges Gebiet in der oberen Hälfte des Augenhintergrundes ein und zeichnet sich durch farbenprächtig schillernden Glanz aus; es bewirkt das Augenleuchten der Tiere. Histologisch tritt es in zwei Formen auf: bei Pflanzenfressern als *Tapetum lucidum fibrosum* (Zink-arm⁸³)), bei Fleischfressern als *Tapetum lucidum cellulosum*, welches als isoliertes Trockengewebe beim Hund bis zu 8,5%, beim Fuchs bis zu 14% Zink enthält⁸³)!

Die im *Tapetum lucidum* vom Hund, gewöhnlichen Fuchs, Silberfuchs und Blaufuchs vorliegende Zink-Verbindung erwies sich als 1:1-Komplex des Cysteins⁸⁴). Als Folge der Zn:S-Relation = 1:1 ist damit das *Tapetum lucidum cellulosum* nicht nur das Zink-, sondern auch das Schwefel-reichste, bisher bekannte Gewebe des Tierkörpers. Der Komplex wurde als Zink-cysteinat-monohydrat (1:1:1) identifiziert, s. Formel (4).

Die Verbindung ist jedoch sicherlich polymer, denn sie konnte bisher nur amorph erhalten werden und ist völlig wasserunlöslich. Cystein fungiert hier gegenüber Zink als dreizahniger Ligand mit einer polaren Bindung vom Carboxyl, einer mehr kovalenten vom Schwefel und einer koordinativen vom Amino-Stickstoff. Die Koordinationszahl 4 wird durch eine sehr fest gebundene Wassermolekel erreicht.



Besonders stark ausgebildet ist das *Tapetum lucidum* bei Robben. Das Auge eines Seehundes z. B. liefert etwa das 12fache an *Tapetum*-Trockensubstanz verglichen mit dem Fuchsaugen, so daß man im Augenhintergrund eines Seehundauges bis zu 10 mg Zink findet⁸⁵). Auch hier liegt Zink-cystein (1:1) vor, Cystin oder andere organische Liganden waren nicht aufzufinden⁸⁵). Dagegen besitzen die Katzen mit ihrem besonders imponierenden Augenleuchten zwar ebenfalls ein zinkreiches *Tapetum lucidum* (rd. 1% Zink im Trockengewebe), doch liegt hier nicht Cystein als Zink-bindender Ligand vor, sondern ein höheres Peptid⁸⁵).

Durch Injektion Zink-bindender cytotoxischer Stoffe (Dithizon) läßt sich bei Hunden das *Tapetum lucidum* in wenigen Stunden völlig zerstören⁸³). Bereits 10–15 min nach Injektion von 100 mg/kg Dithizon i.v. am Hund beobachtet man im *Tapetum*-Bezirk rotviolette Verfä-

⁶⁸) H. Maske, *Experientia* 11, 122 [1955].

⁷⁰) K. Okamoto, *Acta Scholae med. Univ. Kioto* 27, 42 [1949].

⁷¹) I. Kadota, *J. Lab. clin. Med.* 35, 658 [1950]; I. Kadota u. O. Midorikawa, ebenda 38, 671 [1951].

⁷²) K. Okamoto, *Tohoku J. exp. Med.* 67, [1955], Supplement III.

⁷³) J. Dunn, H. Sheehan u. M. McLetchie, *Lancet* 1943, 484.

⁷⁴) J. Patterson, *J. biol. Chemistry* 183, 81 [1950].

⁷⁵) Y. Kotake jr. u. T. Inada, *Proc. Jap. Acad. [Tokyo]* 28, 68 [1952]; *J. Biochemistry [Tokyo]* 40, 291 [1953].

⁷⁶) C. v. Holt, W. Heinrich u. L. v. Holt, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 297, 241 [1954].

⁷⁷) S. Markees, *Helv. physiol. Acta* 12, 680 [1954].

⁷⁸) E. Buddecke, *Ärzt. Forsch.* 10, 57 [1956].

⁷⁹) G. Weitzel u. A.-M. Fretzdorff, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 292, 221 [1953].

⁸⁰) M. Leiner u. G. Leiner, *Biol. Zbl.* 62, 119 [1942]; 64, 293 [1944].

⁸¹) I. M. Bowness u. R. A. Morton, *Biochem. J.* 51, 530 [1952].

⁸²) I. M. Bowness u. R. A. Morton, ebenda 53, 620 [1953].

^{82a}) G. Weitzel u. Mitarbb., unveröffentl.

⁸³) G. Weitzel, F. J. Strecker, U. Roester, E. Buddecke u. A.-M. Fretzdorff, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 296, 19 [1954].

⁸⁴) G. Weitzel, E. Buddecke, A.-M. Fretzdorff, F. J. Strecker u. U. Roester, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 299, 193 [1955].

⁸⁵) G. Weitzel, E. Buddecke, A.-M. Fretzdorff, F. J. Strecker u. U. Roester, ebenda 304, 1 [1956].

burg (Zink-dithizonat), die von schweren Veränderungen des Augenhintergrundes begleitet wird. Nach einigen Stunden folgen Netzhautablösung und Erblindung des Hundes. Entzinkung und Zerstörung des *Tapetum*-Gewebes sind irreversibel, während eine gleichzeitige Schädigung des Inselgewebes, dessen Zink-Reichtum erheblich geringer ist, nicht nachzuweisen ist⁸³).

Die physiologische Aufgabe des *Tapetum lucidum* besteht ohne Zweifel in der Unterstützung des Dämmerungssehens. Seit etwa 100 Jahren nimmt man an^{86, 87}), das *Tapetum* wirke als reflektierende Schicht und ermögliche dadurch eine bessere Ausnutzung geringer Lichtmengen. Inwieweit aber die Funktion des *Tapetum lucidum cellulosum* mit seinem hohen Zink-Gehalt zusammenhängt, ist noch ungeklärt. Möglicherweise sind Lumineszenzeffekte beteiligt, die bei Zink-Verbindungen nicht ungewöhnlich wären; eine ältere Hypothese⁸⁸) schreibt in der Tat dem *Tapetum* Lumineszenzwirkungen zu. Das im *Tapetum* enthaltene Zink-cystein (s. o.) legt außerdem den Gedanken an die in der Technik benutzten Fluoreszenzschirme nahe, welche Zinksulfid enthalten.

Weitere Organe

Im Tierkörper finden sich noch einige weitere Organe, die durch erhöhten Zink-Gehalt auffallen, z. B. Prostata^{88, 89, 59}), Hypophyse⁹¹), Darmcarcinoide⁵⁹), Ammonshorn im Hirn⁹²). Auf welchen Zink-Verbindungen dabei im einzelnen der Zink-Reichtum dieser Organe beruht, ist noch ungewiß, doch liegen folgende Hinweise vor: Das Zink der Prostata⁹⁰) wird mit dem Prostata-Sekret abgegeben und gehört praktisch nicht dem Enzym Carboanhydrase (s. u.) an; Beziehungen zu anderen Enzymen (Phosphatasen?) werden diskutiert. Das Zink der Hypophyse dürfte zu einem wesentlichen Teile an das im Vorderlappen enthaltene adrenocorticotrope Hormon (ACTH) gebunden sein, das ein stark zinkbindendes Protein ist^{93, 94}). Das Hormon zeigt als Zink-Komplex Verlängerung und Verstärkung seiner Wirkung, da es offenbar durch das assoziierte Zink vor enzymatischem Abbau geschützt wird⁹⁵). Darmcarcinoide, bestehend aus sog. argyrophilen hellen Zellen, sind endokrin tätig und produzieren u. a. Serotonin. Ob ihr hoher Zink-Gehalt⁵⁹), der etwa demjenigen des Inselgewebes entspricht, auf einen Zink-Serotonin-Komplex zurückzuführen ist, wird z. Z. geprüft.

Zink im Schlangengift

*Delezenne*⁹⁶) teilte 1919 mit, daß viele Schlangengifte sehr hohen Zink-Gehalt besitzen; im Kobra-Trockengift fand er z. B. 0,56% Zn. Allgemein enthält das Trockengift von Colubriden und Viperiden rd. 0,05–0,55% Zink, wobei eine deutliche Parallelität zum Schwefel-Gehalt der Gifte und zu deren Toxizität besteht^{96, 97}). Die stärksten Schlangengifte weisen den höchsten S- und Zn-Gehalt auf. *Fleckenstein*⁹⁸) wies mit den von ihm entwickelten Schlangengift-Testen (Dehydrasen- und Dotter-Koagulationstest)

nach, daß Zinksalze die Schlangengift- (und auch Biengift-)Wirkung spezifisch hemmen. Dabei wird jedoch das Gift nicht bleibend abgeschwächt oder zerstört, denn bei Entfernung des Zinks kehrt die volle Giftwirkung zurück. Vermutlich schützt der hohe Zink-Gehalt die Giftdrüse gegen Schädigungen durch ihr eigenes Giftssekret^{98, 99}). Entfernt man das Zink aus dem Gift, so tritt eine starke Aktivierung der 5-Nucleotidase ein, besonders wenn zugleich Mg^{2+} zugegeben wird²²). Wahrscheinlich hemmt Zink das Enzym durch Bildung eines 5-Nucleotidase-Zink-Komplexes, während Magnesium das Enzym aktiviert. Im nativen Gift verdrängt Zink auf Grund seiner höheren Komplex-Bildungstendenz das Mg vom Enzym, während die nach dem Schlangenbiß einsetzende Verdünnung des Giftes zur Dissoziation des Zn und damit zur Aktivierung führt²²).

Zink-haltige Enzyme

Enzyme, die durch Anwesenheit zweiwertiger Schwermetallionen aktiviert werden, sind keine Seltenheit; dagegen sind nur wenige Fermente bekannt, welche mit Sicherheit Zink-Verbindungen sind und bei Zink-Entzug ihre Wirkung verlieren. Das am längsten bekannte derartige Ferment ist die Carboanhydrase, deren Aktivität direkt vom Zink-Gehalt abhängt¹⁰⁰); hochgereinigte Präparate enthalten 0,33% Zn¹⁰⁰). Das Metall ist sehr fest an das Ferment gebunden, wie Austauschversuche mit Isotopen Zink ergaben¹⁰¹). *Keller*¹⁰²) gewann aus Carboanhydrase-Präparaten eine thermostabile, Zink-haltige, kristalline Substanz, die sich als 1:1-Komplex eines Tripeptides aus zwei Mol Glutaminsäure und einem Mol Glykoll in der Aminosäuren-Reihenfolge Glu-gly-γ-glu¹⁰²) erwies. Dieser Zink-Komplex aktiviert hochverdünnte Ferment-Lösungen und ist sehr wahrscheinlich mit dem Coferment der Carboanhydrase identisch, zumal er eine sehr hohe Stabilität besitzt¹⁰²). Es kommt hinzu, daß Carboanhydrase offenbar keine SH-Gruppen enthält^{103, 104}). Näheres über Chemie und Biologie der Carboanhydrase findet sich in der Gesamtübersicht von *Gibian*¹⁰⁵).

Ein weiteres, mit hoher Wahrscheinlichkeit als Zink-Verbindung anzusprechendes Ferment ist die Zymohexase (Aldolase) der Hefe¹⁰⁶), welche durch Komplexbildner, wie z. B. Cystein, Metall und Wirkung verliert, durch Zusatz von Zink-Salz aber reaktiviert wird¹⁰⁶). Damit stimmt überein, daß Zinkmangel-Pflanzen ihre Aldolase-Aktivität weitgehend einbüßen, nicht jedoch Pflanzen mit Kupfermangel¹⁰⁷).

Neuerdings sind mehrere bereits länger bekannte kristallisierte Fermente als Zink-Verbindungen erkannt und zugleich Hinweise für die ausschlaggebende Rolle des Zinks im enzymatischen Wirkungsmechanismus erbracht worden. Es handelt sich um Carboxypeptidase¹⁰⁸), Glutaminsäure-dehydrase¹⁰⁹), Alkohol-dehydrase¹¹⁰) und Milchsäure-dehydrase¹¹¹). Kristalline Carboxypeptidase¹⁰⁸) enthält 0,18–0,2% Zn, so daß auf eine Ferment-Molekel (Mol.-Gew. 34400) ein Zink-Atom entfällt. Andere Metalle

⁸⁶) F. Brücke; Arch. Anat. Physiol. 1845, zit. n. Handb. vgl. Anat. Wirbeltiere, 1934, Bd. II/2, S. 1220.

⁸⁷) H. v. Helmholtz, zit. n. Handb. vgl. Physiol. (Jena 1913) Bd. IV, S. 733.

⁸⁸) C. Hess, Arch. vgl. Ophthalmologie 2, Nr. 1 [1911].

⁸⁹) C. Mawson u. M. Fischer, Nature [London] 167, 859 [1951]; Canad. J. med. Sci. 30, 336 [1952].

⁹⁰) C. Mawson u. M. Fischer, Biochem. J. 55, 696 [1953].

⁹¹) J. Kocsis, E. Walaszek, C. Graham u. E. Geiling, Feder. Proc. 12, 336 [1953].

⁹²) H. Maske, Naturwissenschaften 42, 424 [1955].

⁹³) H. Holtermann, A. Heier u. H. Bergh, Lancet 262, 1308 [1952].

⁹⁴) J. Carr, J. Conn u. Th. Wartman, Science [Washington] 116, 566 [1952].

⁹⁵) G. Overbeck u. a., J. Clin. Endocrinol. Metabol. 14, 681 [1954].

⁹⁶) C. Delezenne, Ann. Inst. Pasteur 33, 68 [1919].

⁹⁷) P. Ray, J. Indian Chem. Soc. 17, 681 [1940].

⁹⁸) A. Fleckenstein u. H. Gerckhardt, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. 214, 135 [1952].

⁹⁹) A. Fleckenstein u. W. Jaeger, ebenda 215, 163 [1952].

¹⁰⁰) D. Keilin u. T. Mann, Nature [London] 44, 442 [1939]; Biochem. J. 34, 1163 [1940].

¹⁰¹) R. Tupper, R. Watts u. A. Wormald, Biochem. J. 52, 429 [1952].

¹⁰²) H. Keller, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 299, 104 [1955]; Habilitationsschrift Aachen 1956.

¹⁰³) D. A. Scott u. J. R. Mendive, J. biol. Chemistry 140, 445 [1941].

¹⁰⁴) N. Haugaard, ebenda 164, 265 [1946].

¹⁰⁵) H. Gibian, diese Ztschr. 66, 249 [1954].

¹⁰⁶) O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 314, 149 [1943].

¹⁰⁷) T. Quinlan-Watson, Nature [London] 167, 1033 [1951].

¹⁰⁸) B. Vallee u. H. Neurath, J. Amer. chem. Soc. 76, 5006 [1954]; J. biol. Chemistry 217, 253 [1955].

¹⁰⁹) B. Vallee, J. Adelstein u. J. Olson, J. Amer. chem. Soc. 77, 5196 [1955].

¹¹⁰) B. Vallee u. F. Hoch, ebenda 77, 821 [1955].

¹¹¹) B. Vallee u. W. Wacker, ebenda 78, 1771 [1956].

sind praktisch nicht vorhanden; Zink-affine Komplexbildner hemmen die Enzymwirkung, Zink-Zusatz reaktiviert. Glutaminsäure-dehydrogenase¹⁰⁹) aus Rinderleber läßt bei der Anreicherung und schließlich Kristallisation zusammen mit der Zunahme des Wirkungsgrades Anstieg des Zink-Gehaltes erkennen; kristallisierte Präparate enthalten ca. 0,03% Zn. Bei einem Mol.-Gew. von ca. 1 Million würde dies 4–5 Zink-Atomen pro Ferment-Molekel entsprechen. Zink-affine Agentien hemmen auch dieses Ferment.

Die Alkohol-dehydrogenase aus Hefe¹¹⁰) enthält auch in sehr reiner kristalliner Form stets Zink, das für die Aktivität des Fermentes unerläßlich ist. Der Zink-Gehalt liegt zu meist bei 0,17–0,2% Zn, wobei 0,17% dem besonders fest gebundenen, durch Dialyse nicht zu entfernenden Zink-Anteil entsprechen. Bei einem Mol.-Gew. von rd. 150000 entsprechen 0,17% Zn vier Zink-Atomen pro Molekel. Wird der Zink-Gehalt unter diesen Wert gesenkt, so geht die Fermentwirkung verloren. Es wird angenommen, daß die vier Zink-Atome der Alkohol-dehydrogenase die Aufgabe haben, vier Molekeln DPN oder DPNH an das Ferment zu binden¹¹⁰). Alkohol-dehydrogenase aus Leber verhält sich vermutlich ähnlich¹¹⁰).

Näheren Aufschluß über den Wirkungsmechanismus der Alkohol-dehydrogenase erbrachten Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Zink und SH-Gruppen in kristallisierten Alkohol-dehydrogenase^{112, 113}). Die Aktivität der Enzympräparate hängt direkt von der Zahl der freien SH-Gruppen ab, die bei den besten Präparaten 36/Molekel

(Mol.-Gew. 150000) erreicht. Sind nur noch vier SH-Gruppen vorhanden, so erlischt die Aktivität. Vermutlich sind die vier Zink-Atome der Alkohol-dehydrogenase (s. o.) an SH-Gruppen gebunden, so daß vier SH-Gruppen der Alkohol-dehydrogenase zur Bindung von Zink, die übrigen zur Anlagerung von DPN und Alkohol in sterisch richtiger Lage an die Alkohol-dehydrogenase dienen dürften.

Als Mechanismus der Wasserstoff-Übertragung wird ein der *Meerwein-Ponndorf-Reaktion* analoger Vorgang angenommen, wobei Hydrid-Wasserstoff im gemischten Komplex Protein-Zink-Alkohol-DPN wandert. Diese von *Wallenfels*¹¹³) entwickelte Vorstellung ist die erste und bisher einzige Hypothese über die funktionelle Rolle des Zinks in einem Zink-haltigen Ferment.

Die vor kurzem als Zink-Ferment erkannte Milchsäure-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel¹¹¹) zeigt ebenfalls hohe Empfindlichkeit gegenüber Zink-bindenden Reagentien und verliert ihre Wirkung bei Zink-Entzug. Die angegebenen Werte für den Zink-Gehalt kristallisierter Präparate liegen im Bereiche von 0,04–0,08%¹¹¹). Dieser Befund ist eine weitere Stütze der Hypothese, daß die in ihrer Funktion mit Pyridinnucleotid verknüpften Dehydrogenasen Metallenzyme, insbesondere Zink-Enzyme, seien¹⁰⁹). Der eingangs genannte durchschnittliche Zink-Gehalt der meisten Organe (30–max. 50 γ Zn/1 g Frischgewebe) dürfte weitgehend auf der Anwesenheit von Zink-Fermenten beruhen. Treten dagegen hochgradige Zink-Anreicherungen in einem Gewebe auf, so beruht dies nach den vorliegenden Befunden auf Zink-Komplexen nicht fermentativer Natur.

Eingegangen am 23. Juli 1956 [A 749]

Ein chemischer Beitrag zum Silicose-Problem

Von Prof. Dr. R. SCHWARZ und Dr. E. BARONETZKY*)

Institut für Anorganische Chemie und Elektrochemie der Rhein.-Westf. T. H. Aachen

Als chemischer Beitrag zur Lösung des Silicose-Problems wurden der Existenzbereich der wasserlöslichen Monokieselsäure, das System Quarz-Wasser und die Dephosphorylierung der Ribonucleinsäure untersucht. An Hand von Leitfähigkeitsmessungen läßt sich zeigen, daß Monokieselsäure den hydrolytischen Abbau der Ribonucleinsäure beschleunigt. Es wird eine Theorie aufgestellt, wonach die Silicose auf einen Antagonismus Phosphorsäure-Kieselsäure im Lungengewebe zurückgeführt wird.

Eine der schwersten Berufskrankheiten ist die Staublungenerkrankung der Bergleute, die sog. Silicose. Sie wirft nicht nur medizinische, sondern auch chemische und technische Probleme auf, an deren Lösung seit vielen Jahren von einer großen Zahl von Forschern gearbeitet wird. Die Bedeutung der Staublungenerkrankung ergibt sich aus der Tatsache, daß von 1943–1952 die Zahl der tödlichen Unfälle im Ruhrbergbau rund 5500, die der Todesfälle durch Silicose 10500 betrug. Für 1952 gelten folgende Zahlen: 539 tödliche Unfälle, 1486 Todesfälle durch Silicose. Im Jahre 1953 sind für die Bekämpfung der Silicose und ihrer Folgen im deutschen Bergbau etwa 170 Mill. DM aufgewendet worden¹).

Unter Staublungenerkrankung oder Pneumokoniose versteht man alle Schädigungen der Lunge, die durch Einatmen irgendwelcher Staubarten entstehen. Unter diesem Normalbegriff fällt die Silicose als scharf abzugrenzende Erkrankung, deren klinisches Bild gekennzeichnet ist durch Erscheinung einer diffusen Bronchitis mit verbreiteten,

aber zunächst spärlichen Rasselgeräuschen, wobei häufig ein Mißverhältnis zwischen dem ausgedehnten Röntgenbefund und der verhältnismäßig geringen Beeinträchtigung der Atem- und Kreislauffunktion besteht. Im fortgeschrittenen Stadium bilden sich größere tumorartige Schattenbezirke aus, hervorgerufen durch zusammengewachsene silicotische Herde.

Vom pathologisch-anatomischen Gesichtspunkt aus stellt die Silicose eine charakteristische Reaktion des Bindegewebes auf quarzhaltigen Staub dar. Der Staub gelangt in die Gewebsspalten des Lungengewebes, die Lymphbahnen werden hier zum Teil durch den Staub verstopft. Granulome entstehen als typische Bindegewebsbildungen, wobei sich kollagene Faserstrukturen entwickeln. Die Korngröße des schädigenden Staubes liegt bei etwa 1 μ , da Teilchen von mehr als 5 μ nicht mehr bis in die Alveolen eingeatmet und Partikel unter 0,1 μ nicht zurückgehalten werden. Tierversuche haben gezeigt, daß besonders die Quarzstäube von einer mittleren Korngröße um 1 μ am schnellsten silicotische Veränderungen hervorrufen. Für das chemische Geschehen bei der Silicose ist wichtig, daß weder feine Stäube von Korund noch von silicatischen

*) Nach einem Vortrag am 17. I. 1956 vor der Münchener Chemischen Gesellschaft.

¹) Entnommen einem Vortrag von F. Lange, Arbeitsgemeinschaft für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen, Heft 40 [1954].