

### Untersuchungen über den Einfluss von überschüssigem Zink auf die Aggregation von nativem und photooxydiertem Insulin

Die Erhöhung des Zinkgehaltes einer Insulinlösung führt zwischen pH 6 und pH 8 zu einem ausgeprägten Löslichkeitsminimum und zur Ausfällung schwerlöslicher Insulin-Zink-Komplexe<sup>1</sup>. Andererseits fanden CUNNINGHAM, FISCHER und VESTLING<sup>2</sup> mit steigender Zinkkonzentration eine Zunahme der Sedimentationskoeffizienten des Insulins. Auch FREDERICQ<sup>3</sup> teilte mit, dass das Molekulargewicht des Insulins in Lösungen mit 0,25% Zink zwischen 6000 und 36000 schwanken kann, während in Lösungen mit 1% Zink Werte bis zu 300000 gefunden wurden. Nach den Vorstellungen von CUNNINGHAM, FISCHER und VESTLING<sup>2</sup> sowie TANFORD und EPSTEIN<sup>4</sup> beruht die Assoziation von mehreren Insulinmolekülen zu grösseren Aggregaten auf einer Brückenfunktion von Zinkionen, wobei durch diese jeweils 2 Imidazolreste verschiedener Molekeln verknüpft werden.

Die Photooxydation des Insulins mit Sauerstoff in Gegenwart von Methylenblau als Katalysator führt zur Zerstörung der Imidazolringe und zum Verlust der hormonalen Wirkung<sup>5,6</sup>. Ausserdem wird durch dieses Verfahren der isoelektrische Punkt des Insulins erniedrigt und das Zinkbindungsvermögen herabgesetzt, so dass der isoelektrische Fällungsbereich des photooxydierten Insulins im Vergleich zum nativen Insulin um ca. 1,5 pH-Einheiten erniedrigt ist<sup>5</sup>. Wir konnten kürzlich zeigen<sup>7</sup>, dass die Photooxydation des Insulins ohne Einfluss auf die Aggregation der Monomeren ist. Weder die Zerstörung der Imidazolringe noch die Maskierung des Zinks durch die äquivalenten Mengen Na<sub>2</sub>-EDTA führten zu einer Erniedrigung des Molekulargewichtes, die erwartet werden müsste, wenn für die Bildung höhermolekularer Aggregate sowohl die intakten Imidazolringe des Histidins als auch die Gegenwart von Zink notwendig wären<sup>2,4</sup>. Für natives Insulin wurde von uns<sup>7</sup> mit Hilfe der Ultrazentrifuge<sup>8</sup> in Übereinstimmung mit der Literatur<sup>9-11</sup> ein Molekulargewicht von  $36000 \pm 3000$  ermittelt.

In Fortführung der Untersuchungen über die Bedeutung der Imidazolringe für die hormonale und antigene Wirksamkeit sowie die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Insulins war die Frage zu beantworten, ob sich bei Gegenwart von überschüssigem Zink in wässrigen Insulinlösungen Unterschiede im Sedimentationsverhalten zwischen nativem und photooxydiertem Insulin nachweisen lassen.

Als Insulin wurde von uns kristallines, glukagonfreies Schweineinsulin mit einem Zinkgehalt von 0,29% verwendet<sup>12</sup>. Dabei wurden Photooxydation, Aminosäureanalysen und Molekulargewichtsbestimmungen wie beschrieben ausgeführt<sup>5,7</sup>. In 0,05 M Phosphatpuffer ergaben sich für natives und photooxydiertes Insulin in 1%iger Lösung Sedimentationskoeffizienten von 3,5 S und 3,8 S<sup>7</sup>. Der stark schwermetallbindende Phosphatpuffer wurde durch 0,05 M TRA-Puffer, pH 7,8, ersetzt. Jeweils 50 mg der Insulinproben wurden in 5 ml Messkölbchen eingewogen und durch Zugabe von TRA-Puffer gelöst. Anschliessend setzten wir die berechnete Menge Zinksulfat (1% Zink bezogen auf 50 mg Insulin) zu und füllten Puffer bis zur Marke auf. Die photooxydierte Insulinlösung (Bestrahlungszeit 2 h, Histidin < 5%, Tyrosin 68%) blieb nach Zinkzusatz vollständig klar. Da die durch adsorbiertes Methylenblau verursachte schwache Blaufärbung die optische Verfolgung der Sedimentation stört, wurde die Insulinlösung vor dem Einfüllen in die Küvette mit einer Spur Na-Dithionit entfärbt<sup>7</sup>. Die

Lösung des nativen Insulins trübte sich nach Zinkzusatz unter langsamer Abscheidung schwerlöslicher Insulin-Zink-Komplexe und musste vor der Untersuchung in der Ultrazentrifuge 20 min bei 4000 U/min klarzentrifugiert werden. Das durch isoelektrische Fällung bei pH 5,6 aus dem Überstand gewonnene amorphe Insulin hatte einen Zn-Gehalt von 0,31%. Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten erfolgte nach bekanntem Verfahren mit der PHYWE-Ultrazentrifuge U 50 L bei 45000 U/min unter Verwendung des Überstandes der nativen Insulinlösung und der vollständig gelösten photooxydierten Präparation. Die Konzentration der eingesetzten Lösungen ergab sich aus dem Brechungsinckrement  $\Delta n/\Delta c = 0,182 \text{ ml/g}$  bei 546 nm<sup>13</sup> durch Planimetrieren der Schlierenpeaks, wobei für die photooxydierte Insulinlösung eine Konzentration von 10,2 mg/ml und für den Überstand der nativen Insulinlösung eine solche von 4,2 mg/ml gefunden wurde. Die korrespondierenden Sedimentationskoeffizienten  $s_{20,w}$  waren 3,3 S und 3,2 S. Der Peak des nativen Insulins war im Gegensatz zu dem der photooxydierten Präparation nicht ganz symmetrisch, sondern zum Meniskus hin abgeflacht. Wir führen das auf die Existenz kleinerer Moleküle in der Lösung zurück, die vom Gewichtsmittel abweichen.

Somit ist zu folgern, dass natives Insulin durch überschüssiges Zink bei pH 7,8 unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen durch Bildung schwerlöslicher Insulin-Zink-Komplexe ausgefällt wird. Weder für das in Lösung verbleibende Insulin noch für photooxydiertes Insulin liess sich eine Erhöhung der Sedimentationskoeffizienten und des mittleren Molekulargewichtes nachweisen.

**Summary.** The addition of zinc to a solution of insulin in TRA-buffer pH 7.8, causes a precipitation of poorly soluble insulin-zinc-complexes. Under similar experimental conditions, photooxydized insulin remains in solution. Sedimentation coefficients and average molecular weights of the dissolved insulins were not influenced by additional zinc.

H. FINGER, W. SCHAEG und H. NIEMANN

*Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und Institut für Biochemie und Endokrinologie der Universität Giessen (Deutschland), 14. Dezember 1966.*

<sup>1</sup> K. HALLAS-MOLLER, U. PETERSEN und J. SCHLICHTKRULL, *Science* 116, 394 (1952).

<sup>2</sup> L. W. CUNNINGHAM, R. L. FISCHER und C. S. VESTLING, *J. Am. chem. Soc.* 77, 5703 (1955).

<sup>3</sup> E. FREDERICQ, *Archs Biochem. Biophys.* 65, 218 (1956).

<sup>4</sup> C. TANFORD und J. EPSTEIN, *J. Am. chem. Soc.* 76, 2170 (1954).

<sup>5</sup> G. WEITZEL, W. SCHAEG, G. BODEN und B. WILLMS, *Justus Liebig's Annl. Chem.* 689, 248 (1965).

<sup>6</sup> L. WEIL, T. S. SEIBLES und T. T. HERSKOVITS, *Archs Biochem. Biophys.* 111, 308 (1965).

<sup>7</sup> W. SCHAEG, H. FINGER und H. NIEMANN, *Biochim. biophys. Acta* 126, 168 (1966).

<sup>8</sup> B. SJÖGREN und T. SVEDBERG, *J. Am. chem. Soc.* 53, 2657 (1931).

<sup>9</sup> H. GUTFREUND, *Biochem. J.* 50, 564 (1952).

<sup>10</sup> E. J. HARFENIST und L. C. CRAIG, *J. Am. chem. Soc.* 74, 3087 (1952).

<sup>11</sup> E. FREDERICQ, *J. Am. chem. Soc.* 79, 599 (1957).

<sup>12</sup> Für die Überlassung des Schweineinsulins sind wir den Farbwerken Hoechst zu grossem Dank verpflichtet.

<sup>13</sup> G. E. PERLMANN und L. G. LONGSWORTH, *J. Am. chem. Soc.* 70, 2719 (1948).