

Biochemie des Peroxysoms in der Leberzelle

Von Helmut Sies^[*]

Leitenzym des Peroxysoms – einer phylogenetisch alten, jedoch erst seit einigen Jahren bekannten Zellorganelle – ist Katalase, ein Hämoprotein, welches Wasserstoffperoxid sowohl katalatisch als auch peroxidatisch umsetzt. In den Peroxysomen ist die Katalase u. a. mit H_2O_2 -liefernden Oxidasen vergesellschaftet. Auch in Gewebszellen, beispielsweise der Leber und der Niere, läuft ein Teil der Sauerstoffreduktion über die Bildung von H_2O_2 . Drehscheibe des peroxysomalen H_2O_2 -Umsatzes ist das aktive Intermediat, Katalase- Fe^{3+} - H_2O_2 (Komplex I), das sich durch spezifische Absorptionsbanden auszeichnet. Die Organphotometrie an der intakten, hämoglobinfrei durchströmten Rattenleber zur selektiven Messung des Komplexes I ermöglicht einen direkten Einblick in die Dynamik des im Nanomolbereich ablaufenden H_2O_2 -Umsatzes. Endrogen bildet 1 g Leber etwa 50 nmol H_2O_2 pro min. Die Wechselzahl, die im stationären Zustand bei $< 10 \text{ min}^{-1}$ in der Zelle gegenüber $> 10^8 \text{ min}^{-1}$ am isolierten Enzym bei Substratüberschuß liegt, kann durch intrazelluläre Stimulation der H_2O_2 -Produktion (z. B. durch Glykolat oder Urat) auf etwa 10^2 min^{-1} gebracht werden. Die bei den niedrigen Wechselzahlen gegenüber dem katalatischen Weg begünstigte peroxidatische Oxidation von Wasserstoffdonoren (z. B. Methanol und Äthanol) hat im normalen Metabolismus und bei pathologischen Zuständen Bedeutung.

1. Einführung

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, hat der Gegenstand dieses Fortschrittsberichtes eine etwa 150jährige Geschichte.

Die in den letzten Jahren stark belebte Forschung über biologisch-chemische Aspekte der Katalase und des Wasserstoffperoxidumsatzes erhielt einen wesentlichen Impuls aus der Zellbiologie. Rhodin beobachtete 1954 elektronenoptisch in Nierentubuluszellen der Maus cytoplasmatische Einschlüsse, „Microbodies“^[1], welche auch in der Leberzelle^[2] und vielen anderen Zelltypen aerober Organismen vorkommen. Über die biochemische Funktion dieser Zellorganellen war nichts bekannt; man sah sie zunächst als Vorläufer der Mitochondrien oder als Lysosomenformen an. Wie Untersuchungen an Homogenaten und Zellfraktionen ergaben, lagen einige Oxida-

sen sowie Katalase „partikulär“ vor^[3–6], waren jedoch nicht den Mitochondrien, Mikrosomen oder Lysosomen zuzuordnen. Aus dem Verhalten dieser Enzymaktivitäten bei der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation von Zellfraktionen und aus morphologischen Studien schloß dann der Arbeitskreis von deDuve, daß es sich vielmehr um die „Microbodies“ handele^[7–12]. Das gemeinsame Vorkommen der H_2O_2 -liefernden Oxidasen und der H_2O_2 -spaltenden Katalase führte zum Konzept dieser Zellorganellen als Funktionseinheit des H_2O_2 -Umsatzes, als „Peroxysomen“^[11, 12].

Während zu Anfang dieses Jahrhunderts das Hämoprotein Katalase bei der Erforschung der Natur der Zellatmung zunächst im Zentrum des Interesses stand, geriet es nach der Entdeckung des Atmungsferments (Cytochrom-Oxidase) quasi in Vergessenheit. Erst in den letzten Jahren wurde klar, daß die Katalase eine nicht zu vernachlässigende Rolle bei der biologischen Oxidation spielt. Dabei kommt dem von Chance 1947 entdeckten aktiven Intermediat, Katalase- Fe^{3+} - H_2O_2 (Komplex I)^[13], eine Schlüsselrolle zu (Schema 1a und 1b).

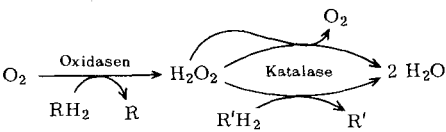
[*] Priv.-Doz. Dr. H. Sies

Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität

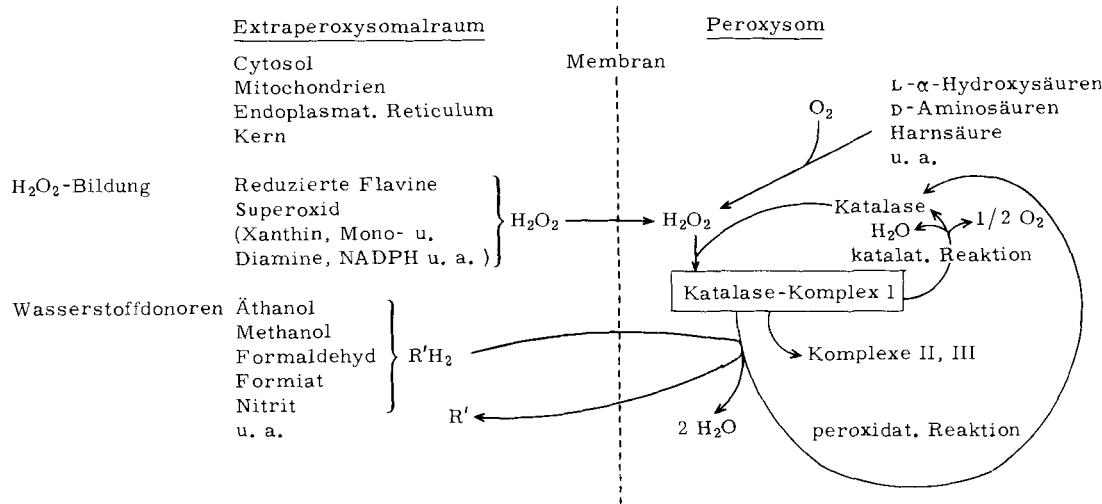
8 München 2, Goethestraße 33

Tabelle 1. Entwicklung der Kenntnisse über H₂O₂, Katalase und Peroxysomen.

Entdeckung	Jahr	Autor	Lit.
H ₂ O ₂ und dessen Umsatz durch Gewebe	1818	Thénard	[66]
Prägung des Namens Katalase	1901	Loew	[67]
Eisen in der Wirkgruppe der Katalase	1923	Warburg	[70]
Peroxidatische Reaktion der Katalase	1936, 1945	Keilin u. Hartree	[77, 78]
Kristallisation der Katalase	1937	Sumner u. Dounce	[74a]
Kristallisation der Peroxidase	1942	Theorell	[74b]
Aktives Intermediat (Katalase-Fe ³⁺ -H ₂ O ₂ =Komplex I)	1947	Chance	[13]
Komplex I in Bakterien	1952	Chance	[131]
„Microbodies“	1954	Rhodin	[1]
Glutathion-Peroxidase	1957	Mills	[143]
Peroxisom als Funktionseinheit des H ₂ O ₂ -Umsatzes	1966	deDuve u. Baudhuin	[12]
Induzierbarkeit der Peroxysomen	1966	Svoboda u. Azarnoff	[47]
Superoxid-Dismutase	1969	McCord u. Fridovich	[124a]
Komplex I in intakter perfundierter Rattenleber	1970	Sies u. Chance	[116]
Komplex I in der Leber der anästhetisierten Ratte	1974	Chance, Oshino, Sugano u. Jamieson	[151]



Schema 1a. deDuves Schema [12].



Schema 1b. Die Rolle der Oxidasen und der Katalase sowie des Katalase-Komplexes I im peroxysomalen H₂O₂-Stoffwechsel.

Die Funktion des Peroxysoms bei intrazellulären peroxidatischen und katalatischen Reaktionen kann nur zum Teil an isolierten Peroxysomen aufgeklärt werden; vielmehr muß das System an der intakten Zelle oder dem intakten Organ untersucht werden. Hier erlaubt die in den letzten Jahren entwickelte Spektrophotometrie am intakten Organ einen direkten Einblick in das Stoffwechselgeschehen. Am Beispiel des Katalase-Komplexes I der isoliert durchströmten Rattenleber lassen sich die Möglichkeiten demonstrieren, welche die Organphotometrie für das Studium der Dynamik intrazellulärer Prozesse bietet.

Trotz der Anstrengungen vieler Arbeitskreise sind die vielfältigen Funktionen der Peroxysomen in tierischen Zellen gegenwärtig nur unvollständig bekannt (vgl. Übersichten zur Zellbiologie der Peroxysomen^[12, 14–17] und zur Enzymologie der Katalase^[18–20]).

2. Das Peroxysom

Das Peroxysom besteht aus einer Matrix, welche von einer einfachen Membran („unit membrane“) umgeben ist und einen als Kristalloid bezeichneten zentralen Bereich aufweist (Abb. 1).

Die Leberzelle der Ratte enthält etwa 350–400 dieser Organellen. Einen Einblick in die Enzymgarnitur gibt Tabelle 2, aus der hervorgeht, daß nur etwa die Hälfte des Peroxysomenproteins für die bekannten Enzymaktivitäten aufkommt. Die Funktion

Tabelle 2. In Peroxysomen aus Rattenleber nachgewiesene Enzymaktivitäten [a] (nach [24–28]).

EC-Nummer	Enzym (Trivialname)	Anteil am Peroxysomenprotein [25] [%]
1.1.1.8	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase	n. b. [b]
1.1.1.26	Glyoxylat-Reduktase [NAD]	n. b.
1.1.1.29	Glycerat-Dehydrogenase [NAD]	n. b.
1.1.1.42	Isocitrat-Dehydrogenase [NADP]	≤ 25
1.1.1.–	Glyoxylat-Reduktase [NADP]	n. b.
1.1.1.–	Glycerat-Dehydrogenase [NADP]	n. b.
1.1.3.1	Glykolat-Oxidase	n. b.
1.1.3.α	L-α-Hydroxysäure-Oxidase	≤ 3
1.4.3.3	D-Aminosäure-Oxidase	≤ 2
1.7.3.3	Urat-Oxidase	≤ 10
1.11.1.6	Katalase	≤ 16
2.3.1.7	Carnitin-Acetyltransferase	n. b.

[a] Einige der homologen aufgeführten Aktivitäten können auf dasselbe Enzym zurückgehen.
[b] n. b.: nicht bestimmt.

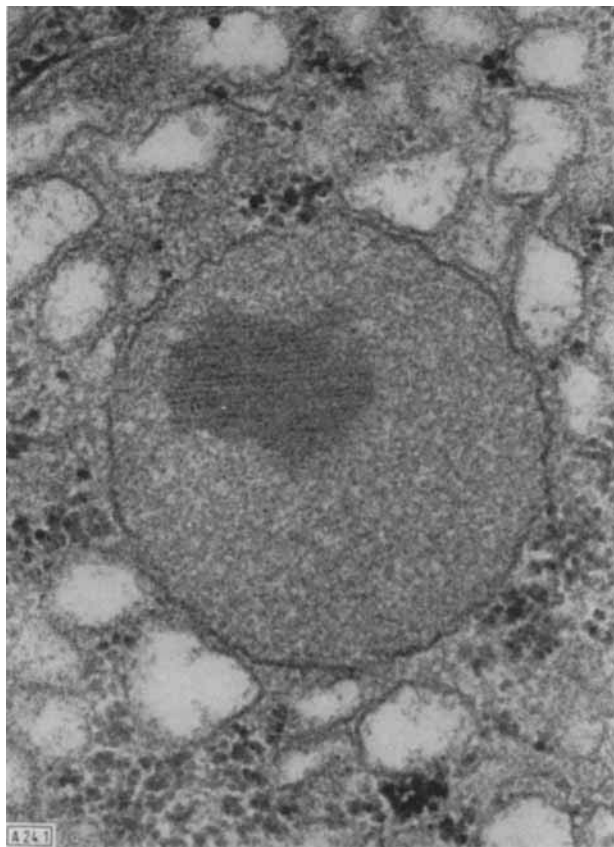


Abb. 1. Peroxysom aus Rattenleber. Der zentrale Bereich zeigt die in längs-geschnittenen Tubuli vorliegende Urat-Oxidase^[21]. Vergrößerung 82000-fach. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. F. Miller zur Verfügung gestellt.

des restlichen Proteins ist noch unbekannt. Durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation können die Peroxysomen von den anderen Zellorganellen getrennt werden. In Abb. 2 wird dies durch die Lokalisation der Aktivitäten von Leitenzymen der Peroxysomen, Mitochondrien, Mikrosomen und Lysosomen im Dichtegradienten demonstriert.

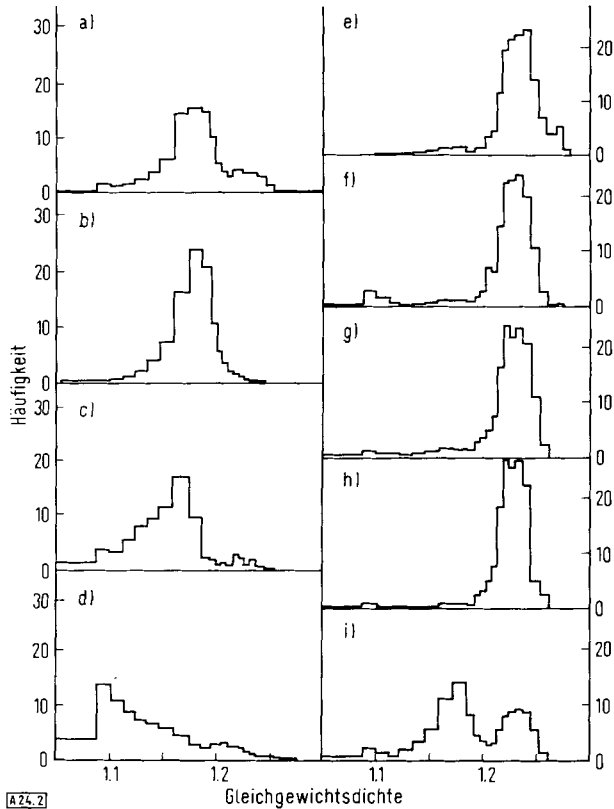


Abb. 2. Gleichgewichtsdichtenverteilung von Leitenzymaktivitäten in einer λ -Fraktion [10] aus Rattenleber im Rohrzuckergradienten. a) Gesamtprotein; darunter: Leitenzyme für b) Mitochondrien (Cytochrom-Oxidase), c) Mikrosomen (Glucose-6-phosphatase) und d) Lysosomen (saure Phosphatase); rechts: Peroxysomenenzyme: e) Urat-Oxidase, f) Katalase, g) D-Aminosäure-Oxidase, h) L- α -Hydroxysäure-Oxidase, i) Isocitrat-Dehydrogenase (bei der Dichte von 1.24–1.25). Die NADP⁺-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase hat eine zweipikige Verteilung. Die Lysosomen haben nach Vorbehandlung mit Triton W-1339 [22] eine besonders niedrige Dichte. (Nach [23]).

Zur funktionellen Morphologie des Peroxysoms sei erwähnt, daß die Organelle für niedermolekulare gelöste Stoffe frei permeabel ist (osmotischer Raum gleich Null). Über spezielle

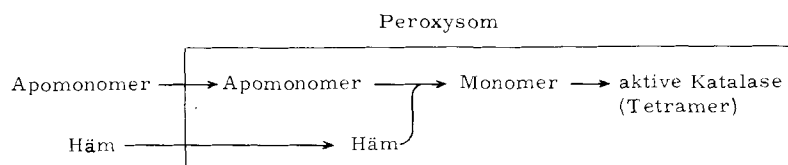
Tabelle 3. Zur Zellbiologie und Zellchemie von Organellen aus Rattenleber mit sauerstoffaktivierenden Systemen.

Parameter	Peroxisomen	Mitochondrien	Mikrosomen	Lit.
Volumenanteil in der Leber [%]	1.16	18.1	12.8	[30]
Zahl [ml^{-1}]	62×10^9	280×10^9	entfällt	[30]
Gleichgewichtsdichte im Rohrzuckergradienten [g/ml]	1.23	1.18		
Rohrzuckerraum [ml/g Leber trocken]	2.5	0.9	entfällt	[31]
Osmot. Raum [ml/g Leber trocken]	0	0.6	entfällt	[31]
Membran	„unit membrane“	Innen- u. Außenmembran [je eine „unit membrane“]	„unit membrane“, rauhes u. glattes Reticulum	
Phospholipidgehalt [mg/mg Protein]	0.09	0.20	0.32	[29]
Cardiolipin	—	+	—	
DNA	—	+	—	
System der Proteinsynthese	—	+	+	
„Endoxidase“	Katalase	Cytochrom-Oxidase	Cytochrom P-450, „Cytochrom-b ₅ -Oxidase“	
Induzierbarkeit von Komponenten	hypolipidämische Substanzen [a], Salicylate	Thyroxin	Barbiturate, alicyclische Kohlenwasserstoffe	
Leitenzyme	Katalase	Cytochrom-Oxidase, Succinat-Dehydrogenase	Glucose-6-phosphatase, Cytochrom P-450	
Halbwertszeit des Umsatzes	1.5–2 Tage	Proteine der Innenmembran 12–13 Tage, der Außenmembran 4 Tage	Proteine im rauhen und glatten Reticulum 4 Tage	[32–36]

[a] Beispiel: Clofibrat (Äthyl-2-(p-chlorphenoxy)isobutyrat).

Permeabilitätseigenschaften der Peroxysomenmembran ist noch wenig bekannt; in der Phospholipidzusammensetzung ähnelt sie der Membran der Mikrosomen^[29]. Einige Eigenschaften der Peroxysomen sind in Tabelle 3 den Eigenschaften von zwei weiteren Zellorganellen mit sauerstoffaktivierenden Systemen, den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Reticulum (Mikrosomen), gegenübergestellt.

Peroxysomen aus extraperoxysomal synthetisierten Vorläufern zusammengesetzt wird (^[56], vgl. auch ^[57, 58]). Dabei wird das Apomonomer als solches auf noch ungeklärte Weise mit einer Halbwertszeit von 14 min in das Peroxysom geschleust und erhält dort die Hämgruppe. Apomonomer und Monomer machen 1,6 % bzw. 0,5 % der Gesamtkatalasemenge aus; ihre Lebensdauer liegt unter 1 h (Schema 2).



Schema 2. Katalasesynthese (nach [56]).

2.1. Cytochemie der peroxysomalen Katalase

Cytochemisch wird Katalase als Leitenzym der Peroxysomen betrachtet^[37]. Der Nachweis wird anhand der 3,3',4,4'-Biphenyltetramin-Oxidase-Aktivität der Katalase geführt^[38-41]. Diese peroxidatische Aktivität der Katalase wird nur nach Fixation des Enzyms, z. B. mit Glutaraldehyd, beobachtet. Dies gilt sowohl für Katalase innerhalb des Peroxysoms in der Zelle^[42] als auch für das isolierte Enzym^[43] und ist wahrscheinlich von einer Umfaltung des Proteins abhängig. Hierfür spricht auch die Erhöhung der Reaktivität für peroxidatische Substrate, wenn das Enzym unter milden Bedingungen tryptisch verdaut oder alkalisch denaturiert wird^[44].

Die Frage, ob in vivo ein nennenswerter Anteil der Katalase extraperoxysomal vorkommt^[45] und ob dieser cytochemisch erfaßt wird^[41], kann aus methodischen Gründen noch nicht beantwortet werden.

2.2. Lebensdauer und Biogenese des Peroxysoms

Die Organelle unterliegt einem relativ raschen Umsatz in toto. Die gemessene Halbwertszeit liegt bei etwa 1,5–2 Tagen^[32, 33].

Der stationäre Gehalt der Leberzelle an Peroxysomen hängt von zahlreichen hormonellen, nutritiven und medikamentösen Einflüssen ab (vgl. ^[15, 46]). Beispielsweise bewirkt Äthyl-2-(p-chlorphenoxy)isobutyrat (Clofibrat) einen Anstieg der Peroxysomenzahl^[47], der den Anteil der Peroxysomen am Leberzellvolumen von ca. 2 % auf ca. 17 % erhöht^[48]. Dieser Anstieg ist mit einem Anstieg des mit Antikatalasenserum reagierenden Antigens verbunden^[49], d. h. die Katalasemenge nimmt gleichfalls zu. Die Aktivität der in Tabelle 2 angeführten peroxysomalen Oxidasen bleibt unverändert^[50], während die Aktivität der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase ebenfalls ansteigt^[51]. Ähnliche Wirkungen hat z. B. Acetylsalicylsäure^[52]. Die Zunahme der Peroxysomenzahl durch Clofibrat ist nicht von der Katalasesynthese abhängig, denn sie tritt ebenfalls auf, wenn die Katalaseneubildung durch Allylisopropylacetamid gehemmt wird^[53].

Die Biogenese der Organelle ist noch umstritten. Enge Beziehungen zum endoplasmatischen Reticulum in morphologischer und biochemischer Hinsicht wurden wiederholt beschrieben^[54, 55]. Besondere Bedeutung haben Untersuchungen zur Biosynthese der Katalase. Experimentell gestützt wurde die Hypothese, daß Katalase im wesentlichen erst innerhalb der

Histochemische Versuche, eine Entscheidung zugunsten des Weges aktiver, fertiger Katalase über das freie Cytoplasma in die Peroxysomen zu treffen^[41], scheiterten an methodischen Problemen^[59, 60]. Auch die Frage, ob Katalaseprotein in vivo an freien und/oder membrangebundenen Polysomen synthetisiert wird, ist nicht einheitlich beantwortet worden^[61-64]. Redman et al.^[64] fanden im rauen endoplasmatischen Reticulum keine Katalase. Exportproteine wie Albumin und zellständige Proteine wie Katalase dürften danach an getrennten Stellen synthetisiert werden. In vitro können allerdings sowohl membrangebundene als auch freie Ribosomen ¹⁴C-Leucin in enzymatisch aktive Katalase inkorporieren^[62, 65].

3. Enzymologie der Katalase

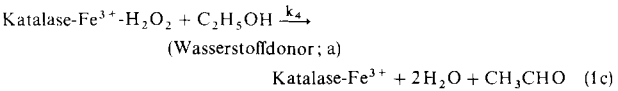
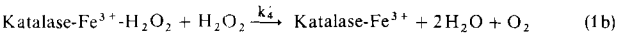
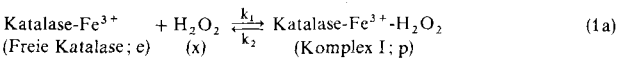
Katalase ist ein tetrameres Enzym mit vier wahrscheinlich gleichen Untereinheiten und vier Hämgruppen; das Hämeisen ist dreiwertig. Im Gegensatz zum Hämoglobin besteht kein Anhaltspunkt für eine Kooperativität der Untereinheiten. Das Molekulargewicht liegt bei 240000 Dalton. Die Methoden der Isolierung und Kristallisation sowie Struktureigenschaften und Aminosäurezusammensetzung sind von Deisseroth und Dounce^[20] referiert worden.

Die katalatische Wirkung der Katalase [Gl. (1a) und (1b), s. Abschnitt 3.1] war eine der am ersten erkannten enzymatischen Funktionen. Thénard beobachtete schon 1818 bei der Entdeckung des Wasserstoffperoxids, daß sich diese Substanz in Gegenwart tierischer Gewebe unter Entwicklung von Sauerstoff zersetzt^[66], eine Reaktion, welche auch an Platinoberflächen abläuft. Die Katalase stand im Zentrum intensiver Auseinandersetzungen über die Natur der Enzymwirkung^[68, 69] und besonders der Schwermetallkatalyse in Enzymen^[70-73] und diente nach ihrer Kristallisation^[74a] als Objekt zahlreicher Untersuchungen^[18-20, 75, 76] über die Biokatalyse durch Hämoproteine.

3.1. Katalase-Komplexe

Chance^[13] entdeckte bei der Reaktion von Katalase mit H₂O₂ spektrophotometrisch unter Anwendung schneller Mischmethoden ein Komplex I („Compound I“) genanntes Zwischenprodukt, welches durch verminderte Extinktion bei 405 nm und erhöhte Extinktion bei 665 nm charakterisiert ist (Abb. 3). Bei Zugabe von Alkoholen zum Komplex I steigt die

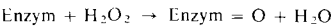
Extinktion rasch wieder an, d.h. durch die von *Keilin* und *Hartree* entdeckte peroxidatische Reaktion^[77, 78] [Gl. (1a) und (1c)] entsteht wieder freie Katalase:



e, x, p, a siehe Abschnitt 3.2.

Die Schreibweise „Katalase-Fe³⁺-H₂O₂“ für den Komplex I soll andeuten, daß das Häm mit H₂O₂ besetzt wird (Hämbesetzung, „heme occupancy“). Es ist bemerkenswert, daß ein mol Katalase nicht vier mol H₂O₂ aufnimmt – d.h. ein Molekül pro Häm – sondern nur etwa 1 bis 1.6 mol H₂O₂^[79]. Die restlichen Hämgruppen bleiben frei. Wird jedoch Alkylhydroperoxid, z. B. Methyl- oder Äthylhydroperoxid, statt H₂O₂ verwendet, so lassen sich alle vier Katalaseuntereinheiten in den Komplex I überführen^([80], vgl. [81]).

Die chemische Struktur des Komplexes I ist noch unbekannt^[20]. Neuerdings sprechen Versuche mit Peroxysäuren für eine Reaktion:



geringe peroxidatische Aktivität. Hinweise für das Vorkommen dieser Komplexe in normaler intakter Leber fehlen^[87]; sie werden daher hier nicht näher besprochen. Komplex II entsteht durch Reduktion aus Komplex I mit H₂O₂, auch mit Phenolen und Ascorbat^[88]. Die Beziehungen der Komplexe I, II und III untereinander und zu den Donoren haben *Nicholls* und *Schonbaum*^[18] referiert.

Im Katalase-HCN-Komplex^[89, 90], der eine Dissoziationskonstante von 10⁻⁶ bis 10⁻⁵ mol/l aufweist, trägt jede der vier Hämgruppen ein Molekül HCN. Der Komplex ist spektroskopisch u.a. durch ein Minimum bei 624 nm gegenüber der freien Katalase gekennzeichnet.

Bei der Reaktion zwischen Azid und Komplex I wird unter Reduktion des Eisens Katalase-Fe²⁺-NO gebildet^[91-93].

Ein kovalenter Komplex entsteht in einer irreversiblen Reaktion zwischen 3-Amino-1,2,4-triazol^[94, 95] und Katalase, wobei eine Histidengruppe beteiligt ist^[96]. Das Häm ist dann nicht mehr^[97] oder kaum noch^[98] imstande, Peroxide oder Liganden wie HCN zu binden.

3.2. Steady-State-Kinetik der Katalase

Die kinetischen Konstanten k₁, k₄ und k'₄ der Gl. (1a)–(1c) wurden am isolierten Enzym bestimmt (Tabelle 4). Für die kinetische Analyse des Fließgleichgewichts im Katalasesystem

Tabelle 4. Kinetische Konstanten der Katalase [vgl. Gl. (1a)–(1c)]. Die Werte wurden z.T. nicht direkt gemessen, sondern aus indirekten Messungen berechnet. Sie geben die Größenordnungen der Werte bei 20–22°C an. Neue Berechnungen [102] führen zu etwas niedrigeren Zahlenwerten für k₁ und k₄.

Konstante		Präparat	Lit.
k ₁	1.7 × 10 ⁻⁷ l mol ⁻¹ s ⁻¹	Rattenleber	[79]
k' ₄	2.6 × 10 ⁻⁷ l mol ⁻¹ s ⁻¹	Rattenleber	[79, 99] [a]
k ₄	(0.2–1.0) × 10 ³ l mol ⁻¹ s ⁻¹	Pferdeerythrocyten	[13, 79, 100] [b]
k ₂	(0–7.5) × 10 ⁻³ s ⁻¹	<i>M. lysodeikticus</i>	[101, 86]

[a] Berechnet nach Gl. (5a) mit p₀/e=0.4.

[b] Für Äthanol und Methanol.

welche für die Peroxidase wahrscheinlich gemacht wurde^[83–86].

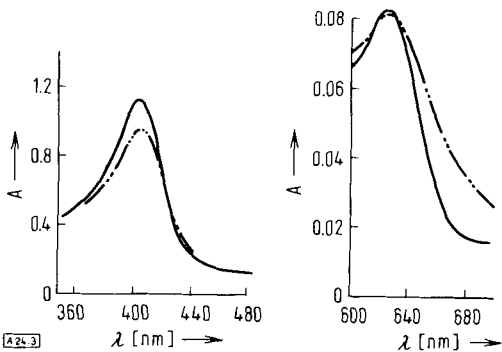


Abb. 3. Absorptionsspektren von gereinigter Katalase (—) aus Rattenleber (Katalasehäm: 9.3 μmol/l). Komplex I (---) wurde mit H₂O₂ (23.5 μmol l⁻¹ min⁻¹) aus der Glucose-Oxidase-Reaktion erzeugt (nach [82]).

Die weiteren Katalase-Komplexe (Komplex II und III) sind katalatisch inaktiv. Komplex II hat gegenüber Phenolen eine

ergibt sich unter Verwendung der Nomenklatur nach *Chance*^[79, 103]:

$$\frac{dp}{dt} = k_1 x(e-p) - k'_4 xp - (k_2 + k_4 a)p \quad (2)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{dx_0}{dt} - k_1 x(e-p) - k'_4 xp + k_2 p \quad (3)$$

$$\frac{da}{dt} = -k_4 ap \quad (4)$$

e = Konzentration an Gesamtkatalasehäm

p = Konzentration an Komplex I

x = H₂O₂-Konzentration

dx₀/dt = stationäre H₂O₂-Bildungsgeschwindigkeit

a = Wasserstoffdonorkonzentration

Im Fließgleichgewicht des Komplexes I (dp/dt=0) und der H₂O₂-Bildungsgeschwindigkeit (dx₀/dt=const.) und für die Bedingung k₂=0 erhält man für den Anteil des Gesamtkatalasehäm e, welcher als Komplex I (p) vorliegt (d.h. für die Hämbesetzung, Gl. (5)):

$$\frac{p_m}{e} = \left(1 + \frac{k'_4}{k_1} + \frac{k_4 a_0}{k_1 x_m}\right)^{-1} \quad (5)$$

mit Index m für das Fließgleichgewicht. Mit $x_m \rightarrow \infty$ wird $p_m \rightarrow p_M$, also

$$\frac{p_M}{e} = \left(1 + \frac{k'_4}{k_1}\right)^{-1} \quad (5a)$$

Gl. (5a) besagt, daß die bei maximaler H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit vorliegende maximale Hämbesetzung p_M/e in einer einfachen Beziehung zu den Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung für Bildung und katalatischen Abbau von Komplex I steht.

Eine weitere nützliche Beziehung beschreibt die Katalasereaktion für die Bedingung, daß die Wasserstoffdonorkonzentration a so gewählt wird, daß $p_m = p_M/2$. Im Fließgleichgewicht ist die Donorkonzentration für halbmaximale Hämbesetzung direkt proportional der stationären H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit dx_n/dt und umgekehrt proportional der Gesamthäm-konzentration e ^[10,3]:

$$a_{p_m=p_M/2} = \left(\frac{3 \frac{k'_4}{k_1} + 1}{2 \left(\frac{k'_4}{k_1} + 1 \right)^2} \right) k_4 \cdot \frac{1}{e} \frac{dx_n}{dt} \quad (6)$$

$\frac{1}{e} \frac{dx_n}{dt}$ = stationäre Wechselzahl

Aus Gl. (6) geht hervor, daß das Katalasesystem weder für H_2O_2 noch für den Wasserstoffdonor a eine „Michaelis-Konstante“ besitzt. Vielmehr spielt der Quotient der H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit und der Katalasenhämkonzentration (die stationäre Wechselzahl) eine Rolle für die stationäre Konzentration an Komplex I und damit für die Donorkonzentration, die für halbmaximale Entsättigung des Komplexes I erforderlich ist. Wie unten gezeigt wird, sind diese Verhältnisse von Bedeutung für die Beurteilung der katalatischen und der peroxidatischen Reaktionen in biologischen Systemen.

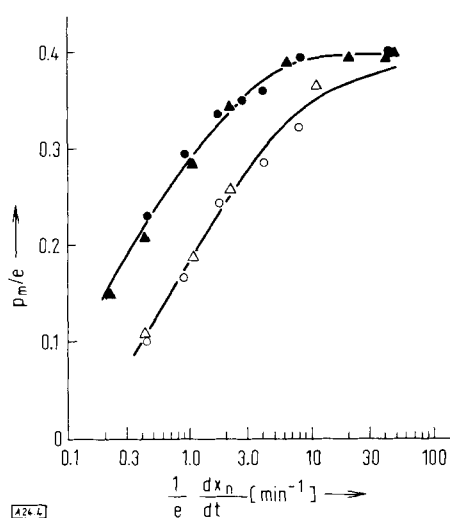


Abb. 4. Abhängigkeit der stationären Hämbesetzung der Katalase (p_m/e) von der Wechselzahl (H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit/Katalasenhämkonzentration), gemessen an isolierter Rattenleberkatalase. Die H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit (\bullet, \circ) wurde von 0.3 bis $100 \mu\text{mol l}^{-1} \text{min}^{-1}$ variiert, die Katalasenhämkonzentration ($\blacktriangle, \triangle$) von 0.1 bis $12 \mu\text{mol/l}$. Stimulation des peroxidatischen Weges durch Äthanolzusatz (0.1 mmol/l) erniedrigt die stationäre Hämbesetzung (rechte Kurve, offene Symbole) (nach [82]).

Zur Illustration seien zwei Beispiele von Experimenten mit isolierter Rattenleberkatalase aufgeführt. In Abb. 4 wird gezeigt, wie die stationäre Hämbesetzung p_m/e von der stationären Wechselzahl abhängt. Dabei wurde sowohl die H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit (durch Variation des Systems Glucose plus Glucose-Oxidase) als auch die Konzentration an Katalasenhäm variiert. Wie zu erwarten, wird bei Konkurrenz des peroxidatischen Weges (durch Zusatz von Äthanol) die Kurve nach rechts verschoben.

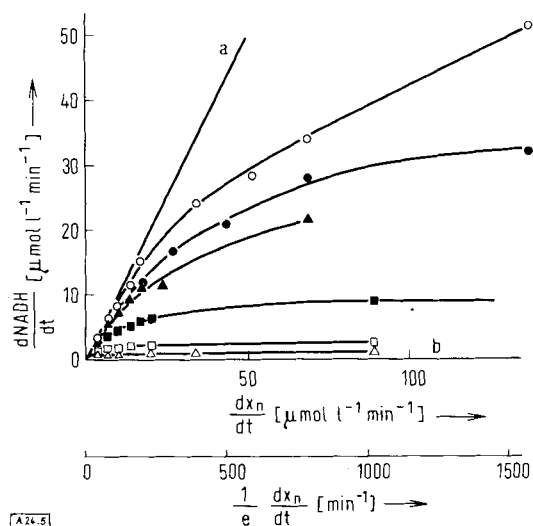


Abb. 5. Aufteilung der H_2O_2 -Umsetzung in „peroxidatische“ und „katalatische“ Reaktion: a: 100% „peroxidatische“, b: 100% „katalatische“ Reaktion. Aufgetragen ist die Oxidationsgeschwindigkeit von Äthanol (angegeben als NADH-Bildungsgeschwindigkeit) bei mehreren stationären H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeiten dx_n/dt in Gegenwart folgender Äthanolkonzentrationen: \circ 100, \bullet 50, \blacktriangle 25, \blacksquare 5, \square 1, \triangle 0.33 mmol/l (nach [105]).

Abb. 5 läßt dagegen deutlich erkennen, wie die Aufteilung in peroxidatische und katalatische Reaktion von der H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit und der Äthanolkonzentration abhängt. Ausschließlich peroxidatische Reaktion kann nur bei extrem hohen Donorkonzentrationen und bei niedrigen Wechselzahlen erreicht werden^[104, 105].

4. Status der Katalase der Leberzelle in der hämoglobin-frei durchströmten Rattenleber

4.1. Organphotometrie des Katalase-Komplexes I

Da anzunehmen ist, daß das peroxysomal vorliegende H_2O_2 in Form des Komplexes I angezeigt wird, eröffnet die Photometrie dieses Komplexes direkten Einblick in den Stoffwechsel von H_2O_2 und seinen Reaktionspartnern. Wird die Rattenleber mit einer Perfusionslösung ohne Hämoglobin durchströmt, so sind optische Methoden ohne größere Schwierigkeiten anzuwenden^[106-108]; der Stoffwechsel der katalasehaltigen Erythrocyten stört nicht. Brauser^[109] zog das durch den Lap- pen der perfundierten Leber tretende Licht für Extinktionsmes- sungen heran (Durchlichtphotometrie, im Gegensatz zur Refle- xionsphotometrie), eine Methode, die an isolierten Geweben wie Muskeln ebenfalls mit Erfolg verwendet wurde^[110-112]. Änderungen des stationären Gehalts der Leber am Katalase- Komplex I können sowohl im Blauen (z. B. bei 405 nm) als auch im Roten (z. B. bei 660 nm) gut verfolgt werden.

Das Problem bei der Photometrie eines Organs, also eines Multikomponentensystems, die gemessenen Signale Übergängen spezifischer Komponenten zuzuordnen, wird durch Anwendung der Zweiwellenlängentechnik^[109–113] und von Differenzabsorptionsspektren^[114, 115] weitgehend gelöst. Da beim langwelligen Extinktionsmaximum andere Hämproteine kaum interferieren, erweist sich an der perfundierten Leber die Extinktionsdifferenz 660–640 nm als am besten geeignet zum spezifischen Nachweis des Übergangs zwischen dem Katalase-Komplex I und der Katalase^[116, 117].

Wie Abb. 6 zeigt, nimmt die Extinktionsdifferenz bei Sauerstoffentzug (dadurch Abbruch der H_2O_2 -Bildung) und bei Zusatz von überschüssigem Methanol zu (dadurch peroxidatischer Abbau des Komplexes I). Die beiden Effekte sind nicht-additiv. Es handelt sich um zwei unabhängige Stoffwechselübergänge, bei denen Katalase aus dem Komplex I freigesetzt wird. Die Abbildung zeigt außerdem, daß die Extinktionsdifferenz bei Infusion von Glykolat abnimmt. Dies spiegelt die Zunahme der intrazellulären H_2O_2 -Produktion durch das Flavinenzym Glykolat-Oxidase wider. – Bei irreversibler Hemmung der Katalase mit 3-Amino-1,2,4-triazol unterbleiben sowohl der

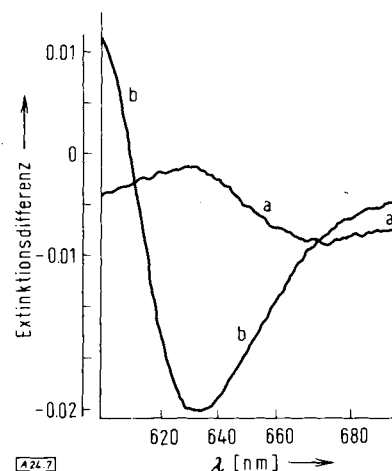


Abb. 7. Extinktionsdifferenzspektren der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber. a) Katalase-Komplex I, b) HCN-Katalase (als Maß des Katalasehäms). Das Bezugsspektrum ist freie Katalase in der Leber. Die Spektren entsprechen verschiedenen stationären metabolischen Zuständen (vgl. Text); sie wurden mit einem Rapspektroskop [118] aufgenommen. Zur Speicherung und digitalen Subtraktion diente ein Instrumentcomputer nach der Methode von Brauser et al. [114] (nach [82]).

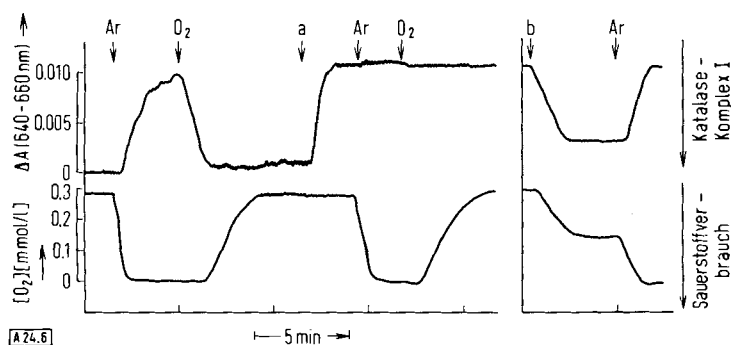


Abb. 6. Obere Kurven: links: Registrierung der Extinktionsdifferenz ΔA (640–660 nm) eines perfundierten Leberlappens. Die Abnahme des Katalase-Komplexes I durch Sauerstoffentzug oder durch Infusion von Methanol (2,5 mmol/l bei a) äußert sich in einem Anstieg von ΔA . Rechts: Rückbildung von Komplex I als Folge der H_2O_2 -Bildung aus infundiertem Natriumglykolat (2 mmol/l bei b in Gegenwart von 1 mmol/l Methanol). Untere Kurven: Sauerstoffkonzentration im aus der Leber tretenden Perfusat (nach [116]).

Methanol- als auch der Sauerstoffentzugseffekt fast vollständig^[116].

4.2. Hämbesetzung der Katalase

Nachdem eine stationäre endogene H_2O_2 -Produktion der Leber (Abb. 6) nachgewiesen ist, kann anhand der am isolierten Enzym gewonnenen Beziehungen ein Maßsystem entwickelt werden, welches über den Status des Enzyms Auskunft gibt. Die Hämbesetzung $p_m/e=0$ wird durch Überschuß an Methanol erhalten, die maximale Hämbesetzung p_m/e durch Überschuß an Glykolat, und unter gleichen Bedingungen wird am perfundierten Organ der Katalase-HCN-Komplex als Maß des Gesamtkatalasehäms zugänglich.

In Abb. 7 werden zwei Extinktionsdifferenzspektren gezeigt. Nacheinander wurden in das in die Leber tretende Perfusat Natriumglykolat (2 mmol/l), Methanol (4,8 mmol/l) und Methanol (4,8 mmol/l) plus Natriumcyanid (0,05 mmol/l) für je 2 bis 3 min infundiert. Während der diesen drei Bedingungen entsprechenden stationären Zustände wurden im Bereich von 600–700 nm je 256 Absorptionsspektren eines Leberlappens innerhalb von 12 s aufgenommen und gespeichert. Das Spektrum a entspricht der durch digitale Subtraktion erhaltenen Extinktionsdifferenz der Leber zwischen dem Zustand in Ge-

genwart von Methanol und dem in Gegenwart von Glykolat, d. h. es zeigt die Abnahme der maximalen Hämbesetzung im Komplex I der Katalase auf die Hämbesetzung Null. Das Spektrum b entspricht der Extinktionsdifferenz der Leber zwischen dem Zustand in Gegenwart von Methanol plus Cyanid und dem in Gegenwart von Methanol, d. h. es zeigt die Bildung von HCN-Katalase aus freier Katalase (im Bereich

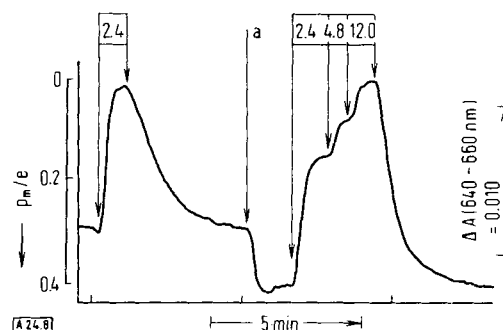


Abb. 8. Registrierung der Extinktionsdifferenz ΔA (640–660 nm) eines perfundierten Leberlappens. Zur Entsättigung (d. h. zur H_2O_2 -Abspaltung) von Komplex I sind bei Stimulierung der H_2O_2 -Bildung durch Glykolat (bei a Zugabe von 2 mmol/l) höhere Methanolkonzentrationen erforderlich (vgl. Gl. (6) und Abb. 4). Die endogene Hämbesetzung liegt bei 3/4 des Maximalwertes. Oberhalb des Spektrums ist die jeweils herrschende Methanolkonzentration (in mmol/l) angegeben (nach [82]).

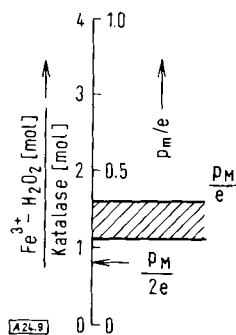


Abb. 9. Schematische Darstellung zur Hämbesetzung p_m/e der Katalase. Der schraffierte Bereich entspricht der in der Leber beobachteten Hämbesetzung im endogenen stationären Zustand. Die maximale Hämbesetzung p_m/e wird durch Glykolat, Urat usw. hervorgerufen, die Hämbesetzung Null durch Sauerstoffentzug, Methanol, Äthanol usw.

um 610 nm liefert die Cytochrom-Oxidase einen geringfügigen Beitrag).

Mit Hilfe der an isolierter Katalase aus Rattenleber bestimmten Differenzextinktionskoeffizienten^[8,2] läßt sich aus ΔA (640–660 nm) der Spektren a und b eine maximale Hämbesetzung $p_m/e = 0.38$ berechnen. Die maximale Hämbesetzung der Rattenleberkatalase in vitro (Abb. 4) und in situ (Abb. 7) stimmt somit überein. Nach Gl. (5a) heißt dies, daß das Katalasemolekül bei der in vitro angewendeten Verdünnung (ca. 10^{-6} mol/l bezogen auf Häm) und bei der in situ innerhalb der Peroxysomen vorliegenden Konzentration (ca. 10^{-3} mol/l bezogen auf Häm, siehe unten) einen vergleichbaren Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten k'_4/k_1 besitzt.

Der endogene stationäre Zustand der Hämbesetzung läßt sich durch Bestimmung der Extremzustände mit Methanol und Glykolat erfassen. In Abb. 8 liegt er bei 3/4 des Maximalwertes. Man sieht außerdem, daß bei Erhöhung der H_2O_2 -Produktion die zur Entsättigung des Komplexes I notwendige Methanolkonzentration steigt [vgl. Gl. (6)]. Die Befunde und Definitionen sind in Abb. 9 zusammengefaßt.

4.3. Katalasegehalt

Gewöhnlich werden Enzymgehalte pro Gramm Organ aus der im Homogenat bestimmten Aktivität und der spezifischen Aktivität des isolierten Enzyms oder mit quantitativen immunologischen Methoden ermittelt. Eine weitere Methode arbeitet ohne Gewebszerstörung am intakten Organ. Der Enzymgehalt wird dabei durch photometrischen Vergleich mit Komponenten bekannten Gehalts bestimmt. Für Katalase eignet sich Cytochrom-Oxidase als Vergleichskomponente, deren Gehalt in der Leber 18 nmol/g beträgt; der Übergang Normoxie \rightarrow Anoxie kann durch Messung der Bande bei 607 nm erfaßt werden^[119]. Der so bestimmte Katalasegehalt beträgt 1/3 des Cytochrom-Oxidase-Gehalts, also 6 nmol/g oder 24 nmol/g bezogen auf das Katalasehäm (ca. 1.5 mg Katalaseprotein/g Leber). Aus den Daten von Price et al.^[133] sowie von Higashi und Peters^[134] werden 1 bzw. 1.5 mg/g berechnet. Dies entspricht einer Katalasekonzentration im Peroxysom von ca. 0.5 mmol/l oder 120 mg/ml.

Zur Illustration wird in Abb. 10 eine relative Gewebegehaltsbestimmung gezeigt. Hier ist das Verhältnis Katalase/Cytochrom-Oxidase von 0.33 auf 1.1 erhöht, da die Peroxysomenzahl durch Vorbehandlung mit Äthyl-2-(p-chlorphenoxy)isobutyryl vergrößert worden ist. Diese Tatsache geht auch aus dem elektronenoptischen Bild der perfundierten Leber hervor.

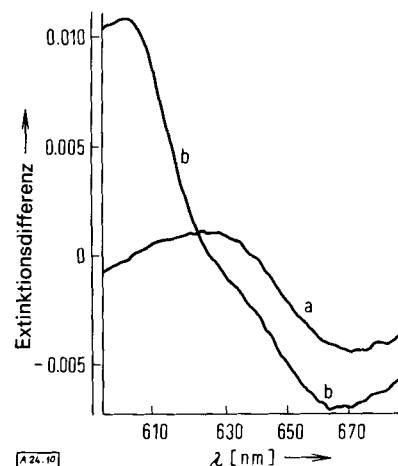
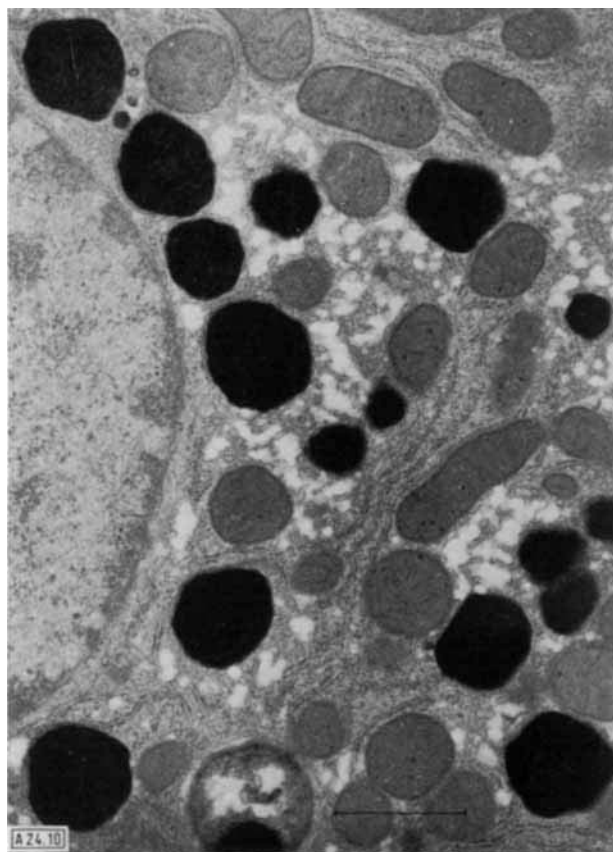


Abb. 10. Perfundierte Leber einer mit Äthyl-2-(p-chlorphenoxy)isobutyryl vorbehandelten Ratte. Unten: Extinktionsdifferenzspektren, a) Katalase minus Katalase-Komplex I (vgl. Abb. 7), b) Cytochrom-Oxidase (durch nachfolgende Anoxie). Der Quotient aus Katalase- und Cytochrom-Oxidase-Gehalt beträgt 1.1 (gegenüber 0.33 bei der unbehandelten Ratte). Oben: Elektronenoptisches Bild dieser Leber nach einstündiger Perfusion. Die Zahl der Peroxysomen (kontrastreich durch DAB-Reaktion nach [41]) hat zugenommen, die Zahl der Mitochondrien ist unverändert (nach [42]). Der Strich entspricht 1 μ m.

5. H_2O_2 -Stoffwechsel der Leberzelle

5.1. H_2O_2 -Bildung

Eine Identifizierung der Substrate, welche in der Leber im endogenen stationären Zustand H_2O_2 bilden, ist noch nicht vorgenommen worden. Beispielsweise entsteht laufend Harnsäure aus dem Purinabbau; ihre Konzentration in Rattenleber beträgt 70 μ mol/l^[120]. Neben der Urat-Oxidase kommen für die H_2O_2 -Produktion in erster Linie flavinabhängige Enzym-

systeme in Frage^[121], entweder direkt oder über das Superoxidradikal O₂⁻^[122, 123] durch Vermittlung der Superoxid-Dismutase^[124 a-c]. Die Autoxidabilität der Flavinenzyme ist jedoch sehr unterschiedlich, wie die Einteilung in Flavin-Oxidase und Flavin-Dehydrogenasen andeutet (vgl. Übersichten über Acceptorspezifitäten^[125 a, b]). Bei der Xanthin-Oxidase

Tabelle 5. Geschwindigkeit der H₂O₂-Produktion in isolierter, hämoglobin-frei durchströmter Rattenleber in mehreren metabolischen Zuständen. Bestimmung durch Messung der Hämbesetzung [vgl. Gl. (6)] (nach [127]).
 $\frac{1}{e} \frac{dx_n}{dt}$ = stationäre Wechselzahl, dx_n/dt = H₂O₂-Bildungsgeschwindigkeit.

Substrate oder Hemmstoffe	[CH ₃ OH bei p _M /2e [mmol/l]	$\frac{1}{e} \frac{dx_n}{dt}$ [min ⁻¹]	$\frac{dx_n}{dt}$ [nmol/min][a]
L-Lactat 2mmol/l, Pyruvat 0.3mmol/l	0.12 (0.09–0.16)	3.8	49
+ Antimycin A 8µmol/l	0.18	5.8	75
+ Octanoat 0.3mmol/l, Antimycin A 8µmol/l	0.40	13.0	170
+ Oleat 0.1mmol/l	0.16	5.1	66
+ Urat 1mmol/l	—	54 [b]	750
+ Glykolat 3mmol/l	—	34 [b]	490

[a] Bezogen auf 1g Leber.
[b] Titration in Gegenwart von 0.6mmol/l Methanol.

wurde auch der Wechsel zwischen Oxidase- und Dehydrogenaseaktivitäten beschrieben^[126].

Inkrement der H₂O₂-Bildung durch Zugabe H₂O₂-liefernder Substrate können direkt durch einen Anstieg der für halbmaximale Entsättigung des Komplexes I erforderlichen Methanol-

konzentration bestimmt werden [vgl. Gl. (6)]. Die auf diese Weise an intakter Leber bestimmte H₂O₂-Bildung von ca. 50nmol min⁻¹ g⁻¹ steigt in Gegenwart von Glykolat auf das 10fache, in Gegenwart von Urat auf das 15fache an (Tabelle 5). Sie bewegt sich damit in der Größenordnung von 1/100 bis 1/10 der Gesamt-O₂-Aufnahme. Portwich und Aebi^[128] fanden an Leberschnitten und -homogenaten durch Messung der peroxidatischen Oxidation von ¹⁴C-Formiat vergleichbare Geschwindigkeiten der H₂O₂-Bildung. Die H₂O₂-Konzentration liegt im endogenen stationären Zustand bei 10⁻⁹ mol/l und steigt bei maximaler Stimulierung der H₂O₂-Bildung aus zugeführten Substraten bis auf 10⁻⁷ mol/l an^[127]. Charakteristisch sind die niedrigen stationären Wechselzahlen von < 10 min⁻¹ bis etwa 100 min⁻¹ bei maximaler Stimulierung. Isolierte Katalase ist bekannt für die besonders hohen maximalen Wechselzahlen von > 10⁸ min⁻¹^[129]. In situ arbeitet die Katalase somit in einem Bereich, welcher die peroxidatische Reaktion relativ zur katalatischen begünstigt. Einige H₂O₂-liefernde Enzyme der Leber sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die zu Anfang des Jahrhunderts stark diskutierte Frage: „Spielt Wasserstoffperoxid eine Rolle in der lebenden Zelle?“ (vgl. ^[130]) ist dahingehend zu beantworten, daß die Produktion von H₂O₂ [sowie O₂⁻ und organischen Hydroperoxiden] ein normales Attribut des aeroben Stoffwechsels ist. Eine Übersicht über den Nachweis der H₂O₂-Bildung in lebenden Zellen und Zellfraktionen ist in Tabelle 7 gegeben.

Die obengenannten H₂O₂-Bildungsgeschwindigkeiten dürfen als untere Grenze der in-vivo-Geschwindigkeiten gewertet werden, da im Extraperoxysomalraum andere Peroxidasen, z. B.

Tabelle 6. H₂O₂- (oder O₂⁻-) liefernde Enzyme der Leber und Angaben zur subzellulären Lokalisation.

EC-Nummer	Enzym (Trivialname)	Lokalisation
1.1.3.1	Glykolat-Oxidase	Peroxisom
1.1.3.2	L-α-Hydroxysäure-Oxidase	Peroxisom
1.1.3.8	L-Gulonolacton-Oxidase	
1.2.3.1	Aldehyd-Oxidase	
1.2.3.2	Xanthin-Oxidase	Cytosol
1.4.3.3	D-Aminosäure-Oxidase	Peroxisom, einörtig
1.4.3.4	Monoamin-Oxidase	mitochondriale Außenmembran, einörtig
1.4.3.5	Pyridoxamin-Oxidase	
1.4.3.6	Diamin-Oxidase	endoplasm. Reticulum
1.6.99.1	NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	endoplasm. Reticulum, einörtig
1.6.99.3	NADH-Cytochrom-c-Reduktase	
1.7.3.3	Urat-Oxidase	Peroxisom, „core“, einörtig
1.15.1.1	Superoxid-Dismutase	Cytosol, Mitochondrienmatrix

Tabelle 7. Nachweis der H₂O₂-Bildung in lebenden Zellen und subzellulären Fraktionen.

Quelle	Beispiel	Nachweis durch	Lit.
Bakterien	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Katalase-Komplex I	[131]
Würmer	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Polarographie	[132, 133]
Blutzellen	Leukocyten	Diacetyldichlorfluorescein	[134]
Leber	Leberschnitte und -homogenate	¹⁴ C-Formiat	[128]
	Isoliert perfundierte Rattenleber	Katalase-Komplex I	[113]
Zellfraktionen			
Mitochondrien	Leber (Ratte)	Katalase-Komplex I	[103]
	Herz (Tauben)	Cytochrom-c-Peroxidase	[137]
		Scopoletin-Meerrettich-Peroxidase	[135]
		Cytochrom-c-Peroxidase	[136]
	Hefe (<i>S. cerevisiae</i>)	Cytochrom-c-Peroxidase	[138]
Mikrosomen	Protozoon (<i>C. fasciculata</i>)	Cytochrom-c-Peroxidase	[139]
	Leber (Ratte)	Scopoletin-Meerrettich-Peroxidase	[140]
		Cytochrom-c-Peroxidase	[137]
		Cytochrom-c-Peroxidase	[137]
Peroxisomen	Leber (Ratte)	Cytochrom-c-Peroxidase	[137]
Cytosol	Leber (Ratte)	Cytochrom-c-Peroxidase	[137]
Submitochondriale Partikel	Leber (Ratte)	Diacetyldichlorfluorescein	[141]
		Polarographie	[142]

Glutathion-Peroxidase^[143, 144], mit der Katalase um H_2O_2 konkurrieren können^[145]. Beispielsweise erscheint bei Infusion von H_2O_2 oxidiertes Glutathion im ausfließenden Perfusat^[146], ein Zeichen der Aktivität der Glutathion-Peroxidase. Dieses Enzym ist zu 1/3 in der Mitochondrienmatrix und zu 2/3 im Cytosol lokalisiert^[147]. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen kann auch aus den Peroxisomen intraperoxisomal gebildetes H_2O_2 austreten und z. B. durch den Komplex mit Cytochrom-c-Peroxidase aus Hefe nachgewiesen werden. Der Anstieg der Hämeseitzung bei Infusion von Octanoat und von Antimycin A (Tabelle 5), der auf Inkremente der mitochondrialen H_2O_2 -Produktion zurückgeführt wird^[127], ist somit besonders markant.

Aus den bisherigen Untersuchungen an subzellulären Fraktionen^[141, 99, 135–137] geht hervor, daß die H_2O_2 -Produktion der Mitochondrien vom Kontrollstatus abhängt^[99] und beim Status der Atmungskontrolle durch das Angebot an Phosphat-acceptor („State 4“^[148]) am höchsten ist^[99, 135]. Dabei scheinen das Segment Succinat-Cytochrom b_{566} sowie das System der Energiekonservierung eine Rolle zu spielen^[149, 136]. Da im erwähnten Segment der Atmungskette der Übergang von der Zwei-Elektronenübertragung auf die Ein-Elektronenübertragung stattfindet, könnte das primäre Produkt auch das Superoxidradikal O_2^- sein, welches dann in H_2O_2 und O_2 übergeht. Loschen et al.^[150] erbrachten hierfür experimentelle Hinweise.

Die Erhöhung des Sauerstoffdrucks vom atmosphärischen Druck auf 1.92 MPa (19 atm) erhöht die H_2O_2 -Produktion um das Vierfache in Mitochondrien aus Taubenherz und um das 15- bis 20fache in Mitochondrien aus Rattenleber^[136]. Somit dürften beträchtliche Unterschiede in der Sauerstoffaffinität der H_2O_2 -produzierenden Systeme bestehen. Kürzlich konnten Oshino et al.^[151a] in situ an der anästhetisierten Ratte in Gegenwart von Glykolat einen Anstieg der H_2O_2 -Produktion der Leber auf das Vierfache demonstrieren, wenn das Tier in der Überdruckkammer Sauerstoffdrücken über 1 atm ausgesetzt wurde.

Eine normalerweise wohl vernachlässigbare, aber erwähnenswerte H_2O_2 -Quelle ist energiereiche Strahlung. Bei Röntgen-Bestrahlung neutraler wäßriger Lösungen entsteht als stabiles Produkt H_2O_2 in einer Konzentration von ca. $3\text{--}4\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ KR^{-1} ^[152, 153].

5.2. Wasserstoffdonoren für die peroxidatische Reaktion

Die peroxidatische Reaktion („coupled oxidation“ von Keilin und Hartree)^[77, 78], d. h. die Kombination von Reaktion (1a) und (1c), hat für den Stoffwechsel einer Reihe von Wasserstoffdonoren in der Leber Bedeutung, so für Methanol^[13, 154–157], Äthanol^[158], Nitrit^[159] und Formiat^[160]. Aus der Reaktionsfolge geht hervor, daß die Oxidationsgeschwindigkeit der Wasserstoffdonoren im Fließgleichgewicht nicht größer als die Bildungsgeschwindigkeit des Wasserstoffperoxids sein kann. Außer bei extrem hohen Wasserstoffdonorkonzentrationen wird jedoch dieser Wert nicht erreicht, da die katalatische mit der peroxidatischen Reaktion konkurriert (vgl. Abb. 5)^[105]. Es sei erwähnt, daß hohe Werte durch exogene Zufuhr erreicht werden können (50 mmol/l Äthanol $\approx 2.3\%$).

Die Titrationskurven der stationären Hämeseitzung der Katalase (p_m/e) in der perfundierten Leber sind für die beiden primären Alkohole Methanol und Äthanol verschieden (Abb.

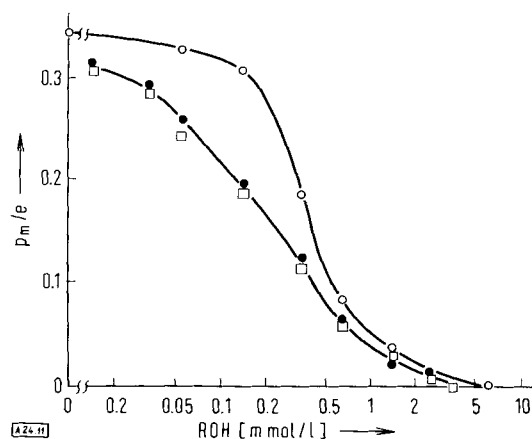


Abb. 11. Abhängigkeit der Hämeseitzung der Katalase (p_m/e) von der Methanol- (□) und Äthanolkonzentration im Perfusat (ROH). Die Äthanoltitration wurde in Gegenwart (●) und in Abwesenheit (○) von 0.1 mmol/l 4-Methylpyrazol durchgeführt (nach [127]).

11). Durch Zusatz von 4-Methylpyrazol zum Äthanol wird der Unterschied aufgehoben; er ist demnach auf die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase zurückzuführen^[127]. Die Methanoltitrationskurve bleibt bei 4-Methylpyrazolzusatz unverändert – ein Hinweis auf das Fehlen einer nennenswerten Reaktivität des Methanols mit der Dehydrogenase. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Gleichheit der Geschwindigkeitskonstanten k_4 bei der Reaktion der Katalase mit Methanol oder mit Äthanol^[13].

Die Äthanoloxidation über den Katalaseweg wird durch verstärkte H_2O_2 -Bildung stimuliert, wie Abb. 12 zeigt. Durch Zusatz von Glykolat in Gegenwart von 4-Methylpyrazol nimmt die Äthanoloxidation pro g Leber um etwa 150 nmol/min zu. Die Stimulierung der H_2O_2 -Produktion pro g Leber unter diesen Bedingungen liegt bei etwa 400 nmol/min , so daß also ca. 35–40% des zusätzlich anfallenden H_2O_2 für die peroxidatische Reaktion genutzt werden. Dieser Anteil steigt, wie erwartet, bei höheren Äthanolkonzentrationen^[162]. Auch die Geschwindigkeit der Methanoloxidation steigt nach Glykolatgabe an^[163]. Da die peroxidatische Äthanoloxidation nicht mit einer NAD^+ -Reduktion verbunden ist, kann dieser Weg zur Umgehung der durch die Alkohol-Dehydrogenase verursachten Negativierung im Redoxpotential des cytosoli-

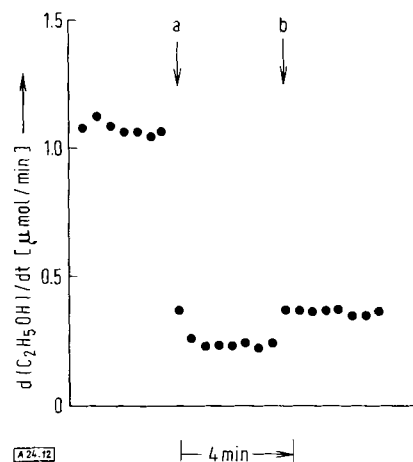


Abb. 12. Umsatz von Äthanol (2 mmol/l im eintretenden Perfusat) durch die Rattenleber. Die Umsatzgeschwindigkeit ist bezogen auf 1 g Leber. Der Äthanolumsatz in Gegenwart von $90\text{ }\mu\text{mol/l}$ 4-Methylpyrazol (Zugabe bei a) beträgt 22% des Kontrollwertes und steigt nach Zugabe von 3.8 mmol/l Glykolat (bei b) auf 34% an. Der Zuwachs entspricht pro g Leber etwa 150 nmol/min (nach [161]).

schen freien NAD^+ -Systems^[165-169] von Nutzen sein^[116, 164].

Gegenwärtig wird erwogen, ob hieraus Vorteile für die Beeinflussung des Leberstoffwechsels bei Alkoholismus zu ziehen sind. *Blomstrand* und *Kager*^[170] demonstrierten am Menschen, daß die Hemmung der Fettsäureoxidation und die Anhäufung von Triglyceriden durch Äthanol bei Gabe von 4-Methylpyrazol weitgehend aufgehoben werden. Die Verwendung von Pyrazolderivaten bei gleichzeitiger Stimulation des peroxidatischen Abbaufweges des Alkohols eröffnet somit interessante Perspektiven.

Nach neueren Untersuchungen soll die peroxidatische Äthanoloxidation durch Katalase für die Aktivität eines besonderen „mikrosomalen äthanoloxidierenden Systems“ („MEOS“)^[171-173] verantwortlich sein^[105, 137, 140, 174]. Die NADPH -Spezifität der mikrosomalen Aktivität ist dabei auf die Coenzymspezifität eines autoxidablen mikrosomalen Flavoproteins zurückzuführen^[137, 175]. Sollte diese Erklärung richtig sein, so dürfte die Äthanoloxidation am intakten endoplasmatischen Reticulum ohne Katalase keine physiologisch wichtige Rolle spielen (Diskussion siehe^[176]).

Katalase setzt von den Aldehyden nur Formaldehyd um, Acetaldehyd wird nicht oxidiert^[177]. Durch Messung des Katalase-Komplexes I kann man somit die Bildung von Äthanol aus Acetaldehyd^[178] in der Leber verfolgen^[161].

Die Frage nach der Qualität der endogenen Wasserstoffdonoren ist noch weitgehend offen. Lediglich für Äthanol wurde eine kontinuierliche Zufuhr aus dem Intestinaltrakt bei Ratten durch Bestimmungen im Portal- und Cavalblut belegt^[179]. Methanol dürfte laufend mit Hilfe der Pektase durch hydrolytische Abspaltung aus Pektinen entstehen; es werden beim Menschen pro Tag schätzungsweise 10–20 mmol Methanol auf diesem Wege freigesetzt^[180].

deDuve und *Baudhuin*^[12] postulierten, daß die peroxidatische Oxidation von α -Hydroxysäuren für die Gluconeogenese durch Oxidation von extramitochondrialen Reduktionsäquivalenten (NADH) eine Rolle spielt. Experimentelle Beweise stehen noch aus.

Die schon von *Novikoff* und *Shin*^[54] postulierte und auch durch die Effekte der hypolipidämisch wirksamen Pharmaka wie Clofibrat angedeutete mögliche Funktion der Katalase im Lipidstoffwechsel der Leberzelle bleibt ebenfalls unübersichtlich. Akatalasämische Mäusestämme enthalten gegenüber Wildstämmen eine verringerte Serumkonzentration von Triglyceriden und Cholesterin^[181]. Diesem Verhalten könnte ein höherer Gehalt der Peroxysomen an Katalaseabbaustufen zugrundeliegen. Es ist bekannt, daß die Akatalasämie der Mäuse auf eine thermolabile Variante der Katalase zurückzuführen ist^[182], woraus möglicherweise ein erhöhter Gehalt an Abbaustufen (z. B. Untereinheiten) resultiert. Durch Injektion von Katalase-Untereinheiten mit peroxidatischer Aktivität wurde experimentell ein Abfall der Blutlipide erzeugt^[183-185]. Kürzlich wurde am Menschen bei einem tödlich verlaufenen cerebro-hepato-renal Syndrom (Zellwegersche Erkrankung) das Fehlen von Peroxysomen in der Leber, welche starke Lipiddepots enthielt, beschrieben^[186].

6. Ausblick

Die Methodik der Gewinnung biochemischer Informationen über intrazelluläre Prozesse am intakten überlebenden Organ

erlaubt einen Einblick in den im Nanomolbereich ablaufenden Stoffwechsel des Wasserstoffperoxids. Die ständige Produktion von H_2O_2 ist ein normaler Bestandteil des Leberstoffwechsels. Auf exogene Einflüsse, z. B. durch Strahleneinwirkung^[187, 188], Sauerstoff- und Ozonvergiftung^[189, 190], konnte hier nicht im einzelnen eingegangen werden.

Entsprechend der gegenwärtig noch begrenzten Kenntnis des speziellen Stoffwechsels der endogenen H_2O_2 -liefernden Substrate und der endogenen Wasserstoffdonoren stehen wir bei der Einschätzung der Funktion der Leberkatalase noch am Anfang (vgl. ^[12, 18, 20]). Auch Phänomene wie die erniedrigte Aktivität der Katalase in Tumorzellen^[191] und die Hemmung der Katalaseaktivität durch Tumorextrakte^[192], die auf Komplex-II-Bildung beruhen soll^[193, 194], bedürfen noch weiterer Klärung. Dagegen bestehen für die pflanzlichen Varianten der Peroxysomen, z. B. die Glyoxysomen, schon klare Vorstellungen über Funktionen im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel (Glyoxylatzyklus) sowie bei der Photorespiration und Photosynthese (Übersichten siehe ^[17, 195]). Insbesondere bedarf die mit der Bezeichnung Peroxysom verknüpfte Implikation für die tierische Gewebszelle weiteren Inhalts. Bei der ständig zunehmenden Zahl bekanntwerdender Enzymaktivitäten in Peroxysomen und peroxysomenhaltiger Zelltypen mit Biphenyltetraamin-Oxidase-Aktivität (vgl. die Peroxysomen in Dünndarm^[196], Herzmuskel^[197, 198], steroidseziernden Zellen wie Leydigische Zwischenzellen der Testes^[199] und Nebennierenrinde^[200]) sowie der raschen Entwicklung biochemischer und cytologischer Methodik sind in Zukunft weitere Aspekte zur Zellbiologie der einmal als „fossiles Enzym“^[181] bezeichneten Katalase zu erwarten.

Herrn Prof. Dr. B. Chance und Herrn Dr. N. Oshino sei auch an dieser Stelle herzlich gedankt für die Anregungen und die fruchtbare Zusammenarbeit, Herrn Prof. Dr. Th. Bücher für die ständige Unterstützung der Untersuchungen sowie für wertvolle Diskussionen bei der Abfassung dieses Manuskripts, Herrn Priv.-Doz. Dr. B. Brauser für seine Kollegialität und für die Überlassung neuentwickelter Meßtechniken, und Herrn Prof. Dr. F. Miller und Herrn Dr. V. Herzog für die Kooperation bei cytochemischen Fragen. Die im Text zitierten eigenen Arbeiten wurden in dankenswerter Weise gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Sonderforschungsbereich 51, Medizinische Molekularbiologie und Biochemie, Teilprojekt D/8, sowie durch den Nato Research Grant No. 416.

Eingegangen am 30. April 1974,
ergänzt am 1. August 1974 [A 24]

[1] *J. Rhodin*: Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Convulated Tubule Cells of the Mouse Kidney. Aktiebolaget Godvil, Stockholm 1954.

[2] *C. Rouiller* u. *W. Bernhard*, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2 Suppl. 355 (1956).

[3] *W. C. Schneider* u. *G. H. Hogeboom*, *J. Biol. Chem.* 195, 161 (1952).

[4] *K. Paigen*, *J. Biol. Chem.* 206, 945 (1954).

[5] *J. F. Thomson* u. *F. J. Klipfel*, *Arch. Biochem. Biophys.* 70, 224 (1957).

[6] *D. H. Adams* u. *E. A. Burgess*, *Brit. J. Cancer* 11, 310 (1957).

[7] *C. deDuve*, *B. C. Pressman*, *R. Gianetto*, *R. Wattiaux* u. *F. Appelmans*, *Biochem. J.* 60, 604 (1955).

[8] *C. deDuve*, *R. Wattiaux* u. *P. Baudhuin*, *Advan. Enzymol.* 24, 291 (1962).

[9] *P. Baudhuin*, *H. Beaufay* u. *C. deDuve*, *J. Cell Biol.* 26, 219 (1965).

[10] *F. Leighton*, *B. Poole*, *H. Beaufay*, *P. Baudhuin*, *J. W. Coffey*, *S. Fowler* u. *C. deDuve*, *J. Cell Biol.* 37, 482 (1968).

[11] *C. deDuve*, *J. Cell Biol.* 27, 25A (1965).

- [12] C. deDure u. P. Baudhuin, *Physiol. Rev.* **46**, 323 (1966).
- [13] B. Chance, *Acta Chem. Scand.* **1**, 236 (1947).
- [14] J. F. Hogg, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **168**, 209 (1969).
- [15] H. Hruban u. M. Rechcigl, *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **1** (1969).
- [16] P. Baudhuin in *A. Lima-de-Faria: Handbook of Molecular Cytology*. North Holland, Amsterdam 1969, S. 1179.
- [17] N. E. Tolbert in *D. D. Davies: Rate Control of Biological Processes*. Cambridge University Press 1973, S. 215.
- [18] P. Nicholls u. G. R. Schonbaum in *P. Boyer, H. A. Lardy u. K. Myrback: The Enzymes*. 2. Aufl., Academic Press, New York 1963, Bd. 8, S. 147.
- [19] A. S. Brill in *M. Florkin u. E. H. Stotz: Comprehensive Biochemistry*. Elsevier, Amsterdam 1966, Bd. 14, S. 447.
- [20] A. Deisseroth u. A. L. Dounce, *Physiol. Rev.* **50**, 319 (1970).
- [21] Z. Hruban u. H. Swift, *Science* **146**, 1316 (1964).
- [22] R. Wattiaux, M. Wibo u. R. Baudhuin in: *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*. Churchill, London 1963, S. 176.
- [23] P. Baudhuin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **168**, 214 (1969).
- [24] D. deDure, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **168**, 369 (1969).
- [25] F. Leighton, B. Poole, P. B. Lazarow u. C. deDure, *J. Cell Biol.* **41**, 521 (1969).
- [26] R. Gee, E. McGroarty, B. Hsieh, D. M. Wied u. N. E. Tolbert, *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 187 (1974).
- [27] E. McGroarty, B. Hsieh, D. M. Wied, R. Gee u. N. E. Tolbert, *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 194 (1974).
- [28] M. A. K. Markwell, E. McGroarty, L. L. Bieher u. N. E. Tolbert, *J. Biol. Chem.* **248**, 3426 (1973).
- [29] R. P. Donaldson, N. E. Tolbert u. C. Schnarrenberger, *Arch. Biochem. Biophys.* **152**, 199 (1972).
- [30] E. R. Weibel, W. Stäubli, H. R. Gnägi u. F. A. Hess, *J. Cell Biol.* **42**, 68 (1969).
- [31] C. deDure, *Harvey Lect.* **59**, 49 (1965).
- [32] B. Poole, F. Leighton u. C. deDure, *J. Cell Biol.* **41**, 536 (1969).
- [33] V. E. Price, W. R. Sterling, V. A. Tarantola, R. W. Hartley u. M. Rechcigl, *J. Biol. Chem.* **237**, 3468 (1962).
- [34] T. Higashi u. T. Peters, *J. Biol. Chem.* **238**, 3945 (1963).
- [35] G. Brunner u. W. Neupert, *FEBS Lett.* **1**, 153 (1968).
- [36] T. Omura, P. Sickeritz u. G. Palade, *J. Biol. Chem.* **242**, 2389 (1967).
- [37] T. K. Shnitka u. A. M. Seligman, *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 375 (1971).
- [38] R. C. Graham u. M. J. Karnofsky, *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 291 (1966).
- [39] A. B. Novikoff u. S. Goldfischer, *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 507 (1968).
- [40] H. D. Fahimi, *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 547 (1968).
- [41] P. G. Leqq u. R. L. Wood, *J. Cell Biol.* **45**, 118 (1970).
- [42] H. Sies, V. Herzog u. F. Miller, *Proc. Fifth Eur. Congr. Electron Microscopy 1972*, 274.
- [43] V. Herzog u. H. D. Fahimi, *J. Cell Biol.* **60**, 303 (1974).
- [44] S. Marklund, *Biochim. Biophys. Acta* **321**, 90 (1973).
- [45] R. S. Holmes u. C. J. Masters, *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 217 (1972).
- [46] D. J. Scoboda u. D. L. Azarnoff, *Fed. Proc.* **30**, 841 (1971).
- [47] D. J. Scoboda u. D. L. Azarnoff, *J. Cell Biol.* **30**, 442 (1966).
- [48] W. Stäubli u. R. Hess in *R. Uyeda: Electron Microscopy*. Bd. 2. Maruzen, Tokyo 1966, S. 625.
- [49] J. Reddy, M. Chiga u. D. Scoboda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 318 (1971).
- [50] D. Azarnoff u. D. R. Tucker, *Fed. Proc.* **25**, 388 (1965).
- [51] T. P. Krishnakantha u. C. K. Kurup, *Biochem. J.* **130**, 167 (1972).
- [52] Z. Hruban, H. Swift u. A. Slesers, *Lab. Invest.* **15**, 1884 (1966).
- [53] J. Reddy, M. Chiga, S. Binyaratvej u. D. Scoboda, *J. Cell Biol.* **44**, 226 (1970).
- [54] A. B. Novikoff u. W. Y. Shin, *J. Microsc.* **3**, 187 (1964).
- [55] C. deDure, *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 941 (1973).
- [56] a) P. B. Lazarow u. D. deDure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 1198 (1971); b) *J. Cell Biol.* **59**, 491, 507 (1973).
- [57] A. Nakamura, T. Hara u. S. Minakami, *J. Biochem.* **73**, 47 (1973).
- [58] A. Nakamura u. S. Minakami, *J. Biochem.* **74**, 683 (1973).
- [59] A. M. Novikoff u. A. B. Novikoff, *J. Cell Biol.* **53**, 532 (1972).
- [60] H. D. Fahimi, *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 999 (1973).
- [61] K. Kashiwagi, T. Tobe u. T. Higashi, *J. Biochem.* **70**, 785 (1971).
- [62] a) T. Sakamoto u. T. Higashi, *J. Biochem.* **73**, 1083 (1973); b) M. Takagi, T. Tanaka u. K. Ogata, *ibid.* **65**, 651 (1969).
- [63] T. Higashi u. T. Peters, *J. Biol. Chem.* **238**, 3952 (1963).
- [64] C. M. Redman, D. J. Grab u. R. Irukulla, *Arch. Biochem. Biophys.* **152**, 496 (1972).
- [65] K. Uenoyama u. T. Ono, *J. Mol. Biol.* **65**, 75 (1972).
- [66] L. J. Thénard, *l'Académie des Sciences, Paris 1818: vgl. L. J. Thénard: Traité de Chimie*. 6. Aufl. Bd. 1. Ed. Crochard, Paris 1834, S. 529.
- [67] O. Loew, *U. S. Dep. Agr. Report No.* **68** (1901).
- [68] C. F. Schönbein, *J. Prakt. Chem.* **98**, 339 (1863).
- [69] J. Jacobsen, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **16**, 340 (1892).
- [70] O. Warburg, *Biochem. Z.* **136**, 266 (1923).
- [71] O. Warburg: *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten*. Editio Cantor, Freiburg 1949.
- [72] H. Wieland, *Liebigs Ann. Chem.* **445**, 181 (1925).
- [73] H. v. Euler u. K. Zeile in *H. v. Euler: Chemie der Enzyme*. II. Teil. Verlag Bergmann, München 1934, 3. Abschnitt, S. 1.
- [74] a) J. B. Sumner u. A. L. Dounce, *Science* **85**, 366 (1937); b) H. Theorell, *Enzymologia* **10**, 25 (1942).
- [75] B. Chance in *J. B. Sumner u. K. Myrback: The Enzymes*. Bd. II, Teil 1. Academic Press, New York 1951, S. 428.
- [76] H. Theorell in *J. B. Sumner u. K. Myrback: The Enzymes*. Bd. II, Teil 1. Academic Press, New York 1951, S. 397.
- [77] D. Keilin u. E. F. Hartree, *Proc. Roy. Soc. B* **119**, 141 (1936).
- [78] D. Keilin u. E. F. Hartree, *Biochem. J.* **39**, 293 (1945).
- [79] B. Chance, D. S. Greenstein u. F. J. W. Roughton, *Arch. Biochem. Biophys.* **37**, 300 (1952).
- [80] B. Chance, *J. Biol. Chem.* **179**, 1341 (1949).
- [81] A. S. Brill u. R. J. P. Williams, *Biochem. J.* **78**, 253 (1961).
- [82] H. Sies, T. Bücher, N. Oshino u. B. Chance, *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, 106 (1973).
- [83] P. George in *D. E. Green: Currents in Biochemical Research*. Interscience, New York 1956, S. 338.
- [84] G. R. Schonbaum u. S. Lo, *J. Biol. Chem.* **247**, 3353 (1972).
- [85] P. Jones u. D. N. Middlemiss, *Biochem. J.* **130**, 411 (1972).
- [86] G. R. Schonbaum, *Abstr. Wenner-Gren Symp. Stockholm 1970*, S. 48.
- [87] N. Oshino, B. Chance u. H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 704 (1973).
- [88] D. Keilin u. P. Nicholls, *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 302 (1958).
- [89] K. Zeile u. H. Hellström, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **192**, 171 (1930).
- [90] B. Chance, *J. Biol. Chem.* **179**, 1299 (1949).
- [91] D. Keilin u. E. F. Hartree, *Biochem. J.* **39**, 148 (1945).
- [92] H. Theorell u. A. Ehrenberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **41**, 442 (1952).
- [93] P. Nicholls, *Biochem. J.* **90**, 331 (1964).
- [94] W. G. Heim, D. Appleman u. H. T. Pyfrom, *Amer. J. Physiol.* **186**, 19 (1956).
- [95] E. Margoliash u. A. Novogrodsky, *Biochem. J.* **68**, 468 (1958).
- [96] B. B. L. Agrawal, E. Margoliash, M. I. Levenberg, R. S. Egan u. M. H. Studier, *Fed. Proc.* **29**, 732 (1970).
- [97] E. Margoliash, A. Novogrodsky u. A. Schejter, *Biochem. J.* **74**, 339 (1960).
- [98] P. Nicholls, *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 414 (1962).
- [99] B. Chance u. N. Oshino, *Biochem. J.* **122**, 225 (1971).
- [100] M. Kremer, *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 199 (1970).
- [101] B. Chance u. G. R. Schonbaum, *J. Biol. Chem.* **237**, 2391 (1962).
- [102] E. Zidoni u. M. L. Kremer, *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 658 (1974).
- [103] B. Chance u. N. Oshino, *Biochem. J.* **131**, 564 (1973).
- [104] H. Laser, *Biochem. J.* **61**, 122 (1955).
- [105] N. Oshino, R. Oshino u. B. Chance, *Biochem. J.* **131**, 555 (1973).
- [106] H. Schnitger, R. Scholz, T. Bücher u. D. W. Lübbers, *Biochem. Z.* **341**, 334 (1965).
- [107] D. W. Lübbers, M. Kessler, R. Scholz u. T. Bücher, *Biochem. Z.* **341**, 346 (1965).
- [108] R. Scholz u. T. Bücher in *B. Chance, R. W. Estabrook u. J. R. Williamson: Control of Energy Metabolism*. Academic Press, New York 1965, S. 393.
- [109] B. Brauser, *Z. Anal. Chem.* **237**, 8 (1968).
- [110] B. Chance u. C. M. Connelly, *Nature* **179**, 1235 (1957).
- [111] J. Ramirez, *J. Physiol.* **147**, 14 (1959).
- [112] F. Jäbsis, *J. Gen. Physiol.* **46**, 905 (1963).
- [113] B. Chance, D. Mayer u. L. Rossini, *IEEE Trans. Bio-Med. Eng.* **17**, 118 (1970).
- [114] B. Brauser, T. Bücher, H. Sies u. H. Versmold in *K. Gaede, B. L. Horecker u. W. J. Whelan: Molecular Basis of Biological Activity*. Academic Press, New York 1972, S. 197.

- [115] H. Sies u. B. Brauser, *Eur. J. Biochem.* 15, 531 (1970).
- [116] H. Sies u. B. Chance, *FEBS Lett.* 11, 172 (1970).
- [117] H. Sies, *Fed. Proc.* 30, 1132A (1971).
- [118] W. Niesel, D. W. Lübbers, D. Schneewolf, J. Richter u. W. Botticher, *Rev. Sci. Instrum.* 35, 578 (1964).
- [119] B. Brauser, H. Sies u. T. Bücher, *FEBS Lett.* 2, 167 (1969).
- [120] V. Eggleston u. H. A. Krebs, *Biochem. J.* 138, 425 (1974).
- [121] O. Warburg u. W. Christian, *Biochem. Z.* 266, 377 (1933).
- [122] I. Fridorich u. P. Handler, *J. Biol. Chem.* 236, 1836 (1961).
- [123] V. Massey, S. Strickland, S. G. Mayhew, L. G. Howell, P. C. Engel, R. G. Matthews, M. Schumann u. P. A. Sullivan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 891 (1969).
- [124] a) J. M. McCord u. I. Fridorich, *J. Biol. Chem.* 244, 6049 (1969); b) I. Fridorich in O. Hayaishi: *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*, Academic Press, New York 1974, S. 453; c) U. Weser, *Struct. Bonding* 17, 1 (1973).
- [125] a) P. Hemmerich, G. Nagelschneider u. C. Vecger, *FEBS Lett.* 8, 69 (1970); b) M. Dixon, *Biochim. Biophys. Acta* 226, 269 (1971).
- [126] F. Stirpe u. E. DellaCorte, *J. Biol. Chem.* 244, 3855 (1969).
- [127] N. Oshino, B. Chance, H. Sies u. T. Bücher, *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 117 (1973).
- [128] F. Portwich u. H. Aebi, *Helv. Physiol. Acta* 18, 1 (1960).
- [129] Y. Ogura, *Arch. Biochem. Biophys.* 57, 288 (1955).
- [130] F. Battelli u. L. Stern, *Ergeb. Physiol.* 12, 96 (1912).
- [131] B. Chance, *Science* 116, 202 (1952).
- [132] E. Bueding u. B. Charms, *J. Biol. Chem.* 196, 615 (1952).
- [133] K. S. Cheah u. B. Chance, *Biochim. Biophys. Acta* 223, 55 (1970).
- [134] B. Paul u. A. J. Sharra, *Biochim. Biophys. Acta* 156, 168 (1968).
- [135] G. Loschen, L. Flohé u. B. Chance, *FEBS Lett.* 18, 261 (1971).
- [136] A. Boveris u. B. Chance, *Biochem. J.* 134, 707 (1973).
- [137] A. Boveris, N. Oshino u. B. Chance, *Biochem. J.* 128, 617 (1972).
- [138] M. Erecinsca, N. Oshino, P. Loh u. E. Brocklehurst, *Biochim. Biophys. Acta* 292, 1 (1973).
- [139] J. P. Kusel, A. Boveris u. B. T. Storey, *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 799 (1973).
- [140] R. G. Thurman, H. G. Ley u. R. Scholz, *Eur. J. Biochem.* 25, 420 (1972).
- [141] P. C. Hinkle, R. A. Butow, E. Racker u. B. Chance, *J. Biol. Chem.* 242, 5169 (1967).
- [142] P. K. Jensen, *Biochim. Biophys. Acta* 122, 157 (1966).
- [143] G. C. Mills, *J. Biol. Chem.* 229, 189 (1957); *Arch. Biochem. Biophys.* 36, 1 (1960).
- [144] L. Flohé, *Klin. Wochenschr.* 49, 669 (1971).
- [145] P. Hochstein u. H. Utley, *Mol. Pharmacol.* 4, 574 (1968).
- [146] H. Sies; C. Gerstenecker, H. Menzel u. L. Flohé, *FEBS Lett.* 27, 171 (1972).
- [147] L. Flohé, W. Schlegel, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1401 (1971).
- [148] B. Chance u. G. R. Williams, *J. Biol. Chem.* 217, 409 (1955).
- [149] G. Loschen, A. Azzì u. L. Flohé, *FEBS Lett.* 33, 84 (1973).
- [150] G. Loschen, A. Azzì, C. Richter u. L. Flohé, *FEBS Lett.* 42, 68 (1974).
- [151] B. Chance, N. Oshino, T. Sugano u. D. Jamieson in R. G. Thurman, T. Y. Yonetani, J. R. Williamson u. B. Chance: *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*, Academic Press, New York 1974, S. 169.
- [151a] N. Oshino, D. Jamieson, T. Sugano u. B. Chance, *Biochem. J.*, im Druck.
- [152] H. Aebi, A. Temperli, R. Gressly, R. Oestreicher u. A. Zuppinger, *Helv. Chim. Acta* 18, 1714 (1960).
- [153] H. Aebi, *Radiat. Res. Suppl.* 3, 130 (1963).
- [154] H. Aebi, E. Frei, R. Knab u. P. Siegenthaler, *Helv. Physiol. Acta* 15, 150 (1957).
- [155] T. R. Tephly, R. E. Parks u. G. J. Mannering, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 143, 292 (1964).
- [156] D. R. Van Harken, T. R. Tephly u. G. J. Mannering, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 149, 36 (1965).
- [157] T. R. Tephly, W. D. Watkins u. J. I. Goodman: *Essays in Toxicology*, Bd. 5, Academic Press, New York 1974, S. 149.
- [158] E. Jacobsen, *Nature* 169, 645 (1952).
- [159] L. A. Heppel u. V. T. Porterfield, *J. Biol. Chem.* 178, 549 (1949).
- [160] H. Aebi, H. Kohlet u. J. P. von Warburg, *Helv. Physiol. Acta* 15, 384 (1957).
- [161] H. Sies in R. G. Thurman, T. Y. Yonetani, J. R. Williamson u. B. Chance: *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*, Academic Press, New York 1974, S. 183.
- [162] R. G. Thurman, *Fed. Proc.* 32, 1510 (1973).
- [163] G. J. Mannering, D. R. Van Harken, A. B. Makar, T. R. Tephly, W. D. Watkins u. J. I. Goodman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 168, 265 (1969).
- [164] H. Theorell, B. Chance, T. Yonetani u. N. Oshino, *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 434 (1972).
- [165] H. A. Krebs, *Advan. Enzyme Regul.* 6, 467 (1968).
- [166] T. Bücher in H. Sund: *Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases*, Springer, Berlin 1970, S. 439.
- [167] J. R. Williamson, R. Scholz, E. T. Browning, R. G. Thurman u. M. H. Fukami, *J. Biol. Chem.* 244, 5044 (1969).
- [168] G. A. Martini u. C. Bode: *Metabolic Changes Induced by Alcohol*, Springer, Berlin 1971.
- [169] R. Blomstrand u. H. Theorell, *Life Sci.* 10, 631 (1970).
- [170] R. Blomstrand u. L. Kager in R. G. Thurman, T. Y. Yonetani, J. R. Williamson u. B. Chance: *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*, Academic Press, New York 1974, S. 339.
- [171] W. J. Orme-Johnson u. D. M. Ziegler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 78 (1965).
- [172] C. S. Lieber u. L. M. DeCarli, *J. Biol. Chem.* 245, 2505 (1970).
- [173] R. Teschke, Y. Hasumura, J. G. Joly, H. Ishii u. C. S. Lieber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1187 (1972).
- [174] E. Feytmans u. F. Leighton, *Biochem. Pharmacol.* 22, 349 (1973).
- [175] J. R. Gillette, B. B. Brodie u. B. N. LaDu, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 119, 532 (1957).
- [176] R. G. Thurman, T. Y. Yonetani, J. R. Williamson u. B. Chance: *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*, Academic Press, New York 1974.
- [177] B. Chance, *J. Biol. Chem.* 182, 649 (1950).
- [178] K. O. Lindros, R. Vilma u. O. A. Forsander, *Biochem. J.* 126, 945 (1972).
- [179] H. A. Krebs u. J. R. Perkins, *Biochem. J.* 118, 635 (1970).
- [180] H. Aebi, persönliche Mitteilung.
- [181] S. Goldfischer, P. S. Roheim, D. Edelstein u. E. Essner, *Science* 173, 65 (1971).
- [182] H. Aebi, H. Suter u. R. N. Feinstein, *Biochem. Genet.* 2, 245 (1968).
- [183] J. Caravaca, M. D. May u. E. G. Dimond, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10, 189 (1963).
- [184] J. Caravaca u. M. D. May, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 528 (1964).
- [185] J. Caravaca, E. G. Dimond, S. C. Sommers u. R. Wenk, *Science* 155, 1284 (1967).
- [186] S. Goldfischer, C. L. Moore, A. B. Johnson, A. J. Spiro, M. P. Valsamis, H. K. Wisniewski, R. H. Ritch, W. T. Norton, I. Rapin u. L. Gartner, *Science* 182, 62 (1973).
- [187] R. N. Feinstein, *Radiat. Res. Suppl.* 3, 1 (1963).
- [188] W. Bors, M. Saran, E. Lengfelder, R. Spötl u. C. Michel, *Curr. Top. Radiat. Res. Quart.* 9, 247 (1974).
- [189] R. Gerschman in F. Dickens u. E. Neil: *Oxygen in the Animal Organism*, Pergamon, Oxford 1964, S. 475.
- [190] D. B. Menzel, *Annu. Rev. Pharmacol.* 10, 379 (1970).
- [191] O. Warburg, K. Gawelin, A. W. Geissler, W. Schröder, H. Gewitz u. W. Volker, *Arch. Biochem. Biophys.* 78, 573 (1958).
- [192] A. Seabra u. H. F. Deutsch, *J. Biol. Chem.* 214, 447 (1955).
- [193] N. M. Alexander, *J. Biol. Chem.* 227, 975 (1957).
- [194] E. Margoliash u. A. Novogrodsky, *Biochim. Biophys. Acta* 30, 182 (1958).
- [195] N. E. Tolbert, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 22, 45 (1971).
- [196] P. M. Novikoff u. A. B. Novikoff, *J. Cell Biol.* 53, 532 (1972).
- [197] V. Herzog u. H. D. Fahimi, *Science* 185, 271 (1974).
- [198] A. R. Hand, *J. Histochem. Cytochem.* 22, 207 (1974).
- [199] J. Reddy u. D. Srobona, *Lab. Invest.* 26, 657 (1972).
- [200] V. H. Black u. B. I. Bogart, *J. Cell Biol.* 57, 345 (1973).