

BBA 65810

ELEKTRONENSPINRESONANZ-UNTERSUCHUNGEN VON  
KATALASEKOMPLEXEN

H. REIN, O. RISTAU, F. HACKENBERGER UND F. JUNG

*Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch (Germany)*

(Eingegangen am 24. April, 1968)

## SUMMARY

*Electron spin resonance studies of catalase complexes*

Beef liver catalase, as well as some catalase complexes, were examined at a temperature of 77 °K by applying the method of electron spin resonance. It was revealed that—just as with the complexes of other hemoproteins—catalase complexes may be divided into high-spin complexes, low-spin complexes and mixed complexes consisting of both forms, depending on their respective electron spin resonance spectra. At a neutral pH, beef liver catalase itself yields an electron spin resonance spectrum with axial symmetry and absorptions at  $g = 6$  and  $g = 2$ ; thus, catalase is a high-spin complex. The following catalase complexes have electron spin resonance spectra with these absorptions: catalase fluoride and catalase formate. The low-spin complexes manifested electron spin resonance spectra of a lower symmetry with 3  $g$  factors at about 2. Only catalase cyanide is a pure low-spin complex. The mixed complexes of both complex forms indicate an absorption at  $g = 6$  and a broad absorption with 3  $g$  factors at about 2. The following catalase complexes have electron spin resonance spectra with these absorptions: catalase acetate, catalase azide,  $H_2S$ -catalase, catalase cyanate and catalase thiocyanate.

## EINLEITUNG

In früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass mit Hilfe von Elektronenspinresonanz-Messungen beim Methämoglobin und einigen Methämoglobinkomplexen verschiedene magnetische Formen direkt nachweisbar sind. Methämoglobinkomplexe mit einem Gesamtspinmoment von  $S = 5/2$  sind durch ein achsialsymmetrisches Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektrum mit den  $g$ -Faktoren von  $g_1 = 6$  und  $g_2 = 2$  gekennzeichnet. Die Methämoglobinkomplexe mit einem Gesamtspin von  $S = 1/2$  zeigen ein ESR-Spektrum niederer Symmetrie mit 3  $g$ -Faktoren um 2 (Litt. 1). Entsprechend einem Vorschlag von GRIFFITH UND ORGEL<sup>2</sup> werden die Verbindungen mit dem hohen Gesamtspin als High-spin- und die mit einem niedrigen Gesamtspin

Abkürzung: ESR, Elektronenspinresonanz.

als Low-spin-Komplexe bezeichnet. Verbindungen, deren mittlerer Spin zwischen  $S = 5/2$  und  $S = 1/2$  liegt, sind als Mischungen der beiden Komplexformen aufzufassen. Im ESR-Spektrum zeigen diese Mischkomplexe eine Absorption bei  $g = 6$  und eine breite Absorption mit 3 g-Faktoren um  $g = 2$ . Neben dem Methämoglobin sind auch andere Hämoproteide in diese charakteristischen Komplexformen einzuordnen wie es aus den ESR-Messungen des Myoglobins von EHRENBURG<sup>3</sup>, der Peroxydase von MORITA UND MASON<sup>4</sup>, der Cytochrom *c* peroxydase von YONETANI, SCHLEYER UND EHRENBURG<sup>5</sup> und der ESR-Messung des Cytochrom *c* (Litt. 6) hervorgeht. In der vorliegenden Arbeit wird über Elektronenspinresonanz-Messungen an Rinderleber-Katalase und einigen Katalaseverbindungen berichtet. Die ESR-Messungen der Katalase wurden wie die ESR-Untersuchungen anderer Hämoproteide bei einer Temperatur von 77 °K durchgeführt. Die Messung der paramagnetischen Absorption erfolgt vorteilhaft bei tiefer Temperatur aus folgenden Gründen: erstens nimmt die Empfindlichkeit der ESR-Messung bei tiefen Temperaturen zu; insbesondere werden durch das Einfrieren einer wässrigen Probe die dielektrischen Verluste stark verringert. Ein zweiter Vorteil besteht darin, dass die Anisotropie des ESR-Spektrums eines Komplexes in eingefrorener Lösung nicht durch die Rotation der Komplexmoleküle ausgemittelt wird. Die Anisotropie der ESR-Spektren von Hämoproteiden ist aber ein wesentliches Merkmal ihrer Spinzustände. So zeigen die High-spin-Komplexe des Methämoglobins<sup>1</sup> und des Metmyoglobins<sup>3</sup> eine achsiale Symmetrie; Low-spin-Komplexe sind dagegen durch eine rhombische Symmetrie gekennzeichnet.

#### *Präparation und Eigenschaften der Rinderleberkatalase*

Die Präparation von kristalliner Rinderleberkatalase erfolgte in modifizierter Weise nach der von SCHNUCHEL<sup>7</sup> angegebenen Methode. Zur Ausfällung des Hämoglobins und anderer Begleiteiweiße benutzte SCHNUCHEL ein Äthanol-Chloroform-Gemisch im Verhältnis 2:1. Wurde das Verhältnis auf 2:0.7 verändert, so verbesserte sich durch den geringeren Chloroformanteil in der Mischung die Katalaseausbeute wesentlich. Auch die Zugabe von nur 350 ml dieses Äthanol-Chloroform-Gemisches statt 500 ml auf 1000 ml Zellsuspension trug zur Steigerung der Katalaseausbeute bei. Die für die Untersuchungen verwendete Katalase war mindestens einmal, meistens aber mehrere Male umkristallisiert. Eine weitere Aufreinigung der Katalase erfolgte durch eine Gelfiltration an Sephadex G-100 bei einem pH von 6.9. Für die ESR-Untersuchungen musste die Katalaselösung noch konzentriert werden. Unter Verwendung eines Rotationsverdampfers wurde die Katalase im Vakuum bei einer Badtemperatur von etwa 20 bis 25° auf eine  $0.3\text{--}0.8 \cdot 10^{-4}$  M Katalaselösung konzentriert. Katalaselösungen mit diesen Konzentrationen fanden für die ESR-Messung Verwendung.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Katalase ergab einen Kat.f.-Wert, der zwischen 50 000 bis 75 000 lag; er wurde nach der von BERGMAYER<sup>8</sup> angegebenen Methode ermittelt. Die Konzentrierung der Katalaselösungen mit dem Rotationsverdampfer hatte keinen Aktivitätsabfall zur Folge.

#### EXPERIMENTELLES

(1) Die Aufzeichnung der optischen Spektren erfolgte mit einem registrierenden Spektralphotometer SP 700 der Fa. Unicam, Great Britain.

(2) Die ESR-Messungen der Katalase erfolgten mit einem X-Band-Superheterodyn-Spektrometer ( $\nu = 9.3$  GHz) von labormässigem Aufbau; Einzelheiten des Spektrometers sind aus den Publikationen<sup>9,10</sup> ersichtlich. Zur  $g$ -Faktor-Bestimmung fand das 1,1-Diphenyl-2-pikryl-hydrazyl als Eichsubstanz Verwendung. Da die genaue Bestimmung der wahren  $g$ -Faktoren von eingefrorenen Lösungen anisotroper Substanzen schwierig ist<sup>4</sup>, wurden die Maxima der Absorptionen für die  $g$ -Wert-Bestimmung benutzt. Das bedeutet, dass die Zahlenwerte für  $g$ -senkrecht in Abhängigkeit von der Linienbreite einen höheren Wert annehmen als die wahren  $g$ -Werte. Die Aufzeichnung der ESR-Spektren erfolgte mit Hilfe des Lock-in-Verfahrens als 1. Ableitung der Resonanzabsorption. Für die Tieftemperatur-Messungen befand sich der  $H_{112}$ -Resonator in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewargefäß.

## ERGEBNISSE

Das ESR-Spektrum der Katalase in eingefrorener Lösung bei einem pH von 6.9 (Fig. 1a, b) ist ein achsialsymmetrisches Spektrum mit den  $g$ -Faktoren  $g_{\parallel} = 6.3$  und  $g_{\perp} = 1.92$ , wie es auch bei der isolierten prosthetischen Gruppe, dem Chlorhäm in gefunden wird<sup>11</sup>. Achsialsymmetrische Spektren dieses Typs entsprechen reinen High-spin-Komplexen<sup>1,3,4</sup> was auch mit den Werten der magnetischen Suszeptibilität von 5.89 Bohr'schen Magnetonen der Katalase übereinstimmt<sup>12</sup>. Die Messung der magnetischen Suszeptibilität der Katalase durch THEORELL UND AGNER<sup>12</sup> erfolgte bei einer Temperatur von 298 °K, das ESR-Spektrum der Katalase wurde bei 77 °K registriert. Die Übereinstimmung des Spinzustandes bei den verschiedenen Temperaturen zeigt, dass der Spinzustand der Katalase nicht von der Temperatur abhängt. Im Gegensatz zum Methämoglobin<sup>1</sup> zeigt die asymmetrische Absorption bei  $g = 6.3$  bei der Katalase noch eine Stufe bei einem  $g$ -Wert von 5.3. Bei der Bildung von ionogenen Komplexen bleibt diese Absorption erhalten bzw. sie wird noch verstärkt und tritt dann als zusätzliche Absorption hervor; dieses ist zum Beispiel beim Azidkomplex der Katalase der Fall.

Die Absorption bei  $g = 1.92$  ist für die achsiale Symmetrie des ESR-Spektrums im Vergleich zur Absorption von  $g$ -senkrecht verhältnismässig gross. Es ist daher anzunehmen, dass ähnlich wie bei anderen Hämoproteiden, dem Myoglobin und der Myeloperoxydase<sup>3</sup> und bei Pflanzenperoxydase<sup>4</sup> noch andere paramagnetische Kationen, insbesondere Kupfer in den Katalasepräparaten vorhanden sind und die Absorption bei  $g = 2$  verstärken. Sowohl Gelfiltration als auch der Zusatz des Komplexbildners EDTA bewirkte keine wesentliche Veränderung dieser Absorption.

Bei den mehrfach durchgeführten Präparationen der Katalase beobachteten wir immer noch eine zusätzliche Absorption im ESR-Spektrum mit einem  $g$ -Wert von 4.2. Diese Absorption stammt von einem Eisen, das nicht am Porphyrin gebunden ist. EHRENBERG<sup>3</sup> findet diese Absorption im ESR-Spektrum des Myoglobins, MORITA UND MASON<sup>4</sup> bei der Peroxydase, YONETANI, SCHLEYER UND EHRENBERG<sup>5</sup> bei der Cytochrom *c* peroxydase und BEINERT UND SANDS<sup>13,14</sup> im ESR-Spektrum der DPNH Cytochrom *c* reduktase. Da das Eisen mit der Absorption bei  $g = 4.2$  als eine Verunreinigung der Katalase aufzufassen ist, haben wir versucht, durch weitere Aufreinigung der Katalase dieses Eisen abzutrennen. Mit dem Komplexbildner EDTA gelang dieses nicht, wohl aber durch weitere Gelfiltration an Sephadex G-100. Die Abb. 1b zeigt das ESR-Spektrum der Katalase nach dieser Aufreinigung: die Ab-

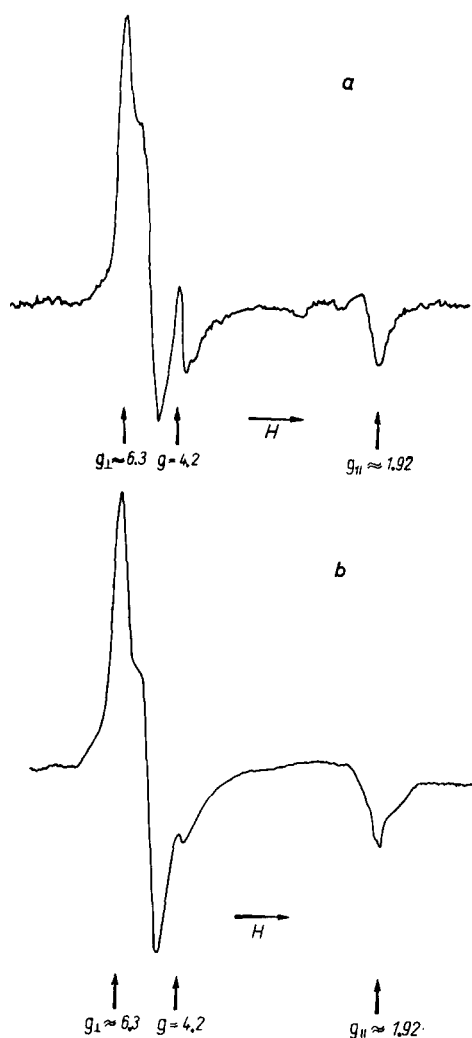


Abb. 1. a, ESR-Spektrum der Rinderleberkatalase (pH 6.9); Messtemperatur 77°K; b, nach weiterer Aufreinigung durch Gelfiltration an Sephadex G-100.

sorptionsbande bei  $g = 4.2$  ist stark reduziert, ohne dass sich das übrige Spektrum verändert hat. Die vollständige Entfernung dieser Absorptionsbande gelang trotz mehrfacher Gelfiltration nicht.

Zunehmende Alkalisierung der Katalaselösung erzeugte im ESR-Spektrum der Katalase eine breite Absorption in der Gegend des  $g$ -Wertes 2 bei gleichzeitiger Reduktion der Absorption bei  $g = 6$ . Das bedeutet, dass die Katalase im alkalischen Milieu ein Mischkomplex der High- und Low-spin-Form ist.

Das ESR-Spektrum einer eingefrorenen Katalasefluoridlösung ist dem ESR-Spektrum der Katalase sehr ähnlich. Das achsialsymmetrische Spektrum mit den  $g$ -Faktoren  $g_{\perp} = 6.4$  und  $g_{\parallel} = 1.92$  entspricht einem reinen High-spin-Komplex, wie es aus seiner hohen magnetischen Suszeptibilität von 5.94 Bohr'schen Magnetonen zu

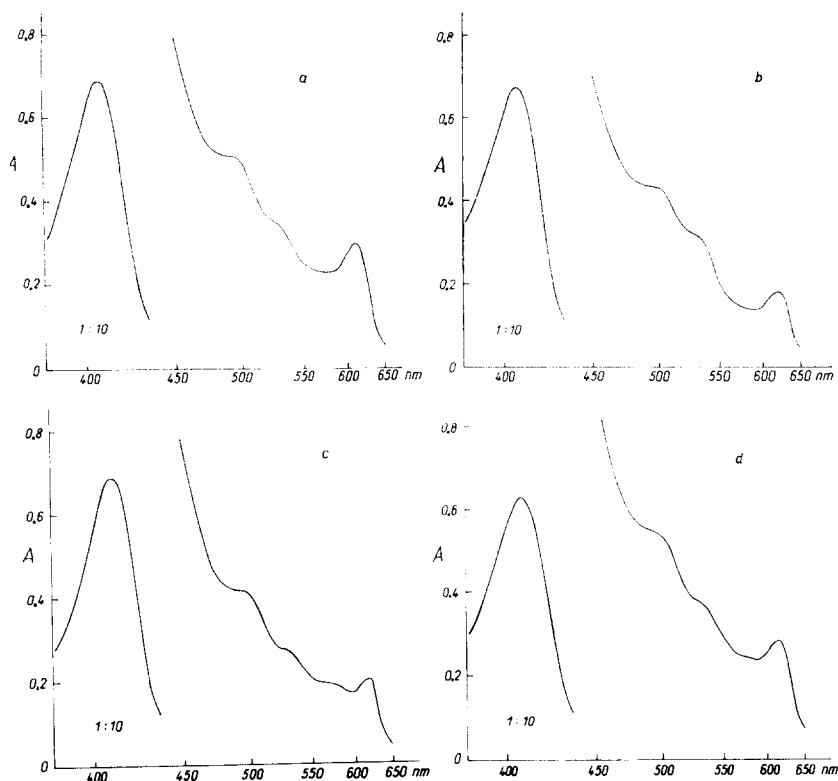


Abb. 2. Lichtabsorptionsspektren verschiedener Katalasekomplexe. a, Katalaseformiat; b, Katalaseacetat; c, Katalaserhodanid; d, Katalasezyanat. Katalasekonzentration:  $2 \cdot 10^{-6}$  M.

erwarten war<sup>12</sup>. Wie die Katalase selbst zeigt auch das ESR-Spektrum der Fluoridverbindung eine Stufe im Bereich des  $g$ -Faktors 6. Typische achsialsymmetrische Spektren zeigen auch die Fluoridverbindungen anderer Hämoproteide: Myoglobin<sup>3</sup>, Peroxydase<sup>4</sup>, Hämoglobin<sup>1</sup> und Cytochrom  $c^6$ .

Vom Methämoglobin ist bekannt, dass es mit verschiedenen Reaktionspartnern wie Formiat, Acetat, Rhodanid und Zyanat zu Komplexen reagiert<sup>15</sup>. Wir haben die genannten Reaktionspartner in Form ihres Natriumsalzes mit der Katalase zur Reaktion gebracht und erhielten ausgenommen der Formiatverbindung ESR-Spektren, wie sie für Mischkomplexe typisch sind. Die optischen Spektren dieser Verbindungen sind erwartungsgemäss auf Grund ihres High-spin-Charakters nur wenig gegenüber dem optischen Spektrum der Katalase verschieden (Abb. 2a–d).

Die Bildung eines Formiatkomplexes der Katalase wurde bereits von AGNER UND THEORELL<sup>16</sup> beschrieben. Diese Verbindung zeigt ein typisches High-spin ESR-Spektrum mit 2 deutlich unterscheidbaren Absorptionen bei niedrigen Feldstärken ( $g_1 = 6.7$  und  $5.2$ ;  $g_{11} = 1.95$ ). Katalaseacetat erscheint dagegen im ESR-Spektrum als Mischkomplex mit 2 deutlich unterscheidbaren Absorptionen bei niedrigen Feldstärken ( $g_1 = 6.65$  und  $5.2$ ) sowie einer breiten Absorption in der Gegend des  $g$ -Faktors 2 mit drei gut voneinander abgrenzbaren  $g$ -Faktoren:  $g_1 = 2.16$ ;  $g_2 = 1.95$ ;

$g_3 = 1.80$ . Auch der Azidkomplex der Katalase (Abb. 3) ist bei einer Temperatur von 77 °K ein Mischkomplex der High- und Low-spin-Form. Die magnetische Suszeptibilität dieses Komplexes entspricht bei Zimmertemperatur mit 5.86 Bohr'schen Magnetonen<sup>12</sup> fast der magnetischen Suszeptibilität der Fluoridkatalase. Da sich die ESR-Spektren der beiden Komplexe bei einer Temperatur von 77 °K wesentlich von einander unterscheiden, muss man annehmen, dass die beiden Komplexe ein unterschiedliches Temperaturverhalten haben. Offenbar nimmt beim Katalaseazid mit Erniedrigung der Temperatur der Low-spin-Anteil zu. Die Fluoridkomplexe der Hämoproteide sind dagegen wenig temperaturempfindlich.

Lässt man auf eine Katalaselösung  $H_2S$  einwirken, so bildet sich ebenfalls ein Mischkomplex. Das ESR-Spektrum dieser Verbindung zeigt Absorptionen bei  $g_1 = 6.5$  und  $5.2$  und die  $g$ -Faktoren  $g_1 = 2.76$ ;  $g_2 = 2.13$ ;  $g_3 = 1.65$ . Der Nachweis eines Mischkomplexes der  $H_2S$ -Katalase im ESR-Spektrum entspricht der von THEORELL UND AGNER<sup>12</sup> gemessenen magnetischen Suszeptibilität dieses Komplexes von 4.15 Bohr'schen Magnetonen. Das ESR-Spektrum der Zyanatverbindung der Katalase zeigt das Vorliegen eines Mischkomplexes an, allerdings war in diesem Fall die breite Absorption bei  $g = 2$  nicht aufgelöst, so dass die  $g$ -Faktoren  $g_1$  bis  $g_3$  nicht bestimmt

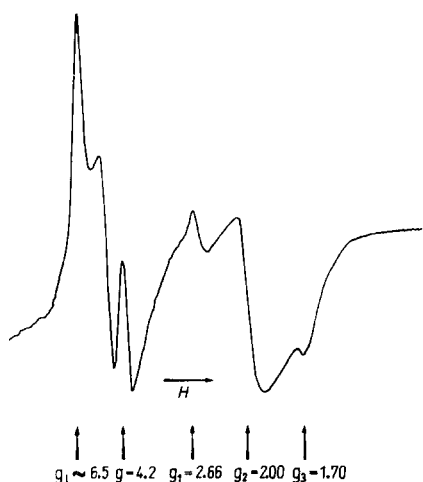


Abb. 3. ESR-Spektrum der Azidkatalase; Messtemperatur 77 °K; Katalasekonzentration  $0.8 \cdot 10^{-4}$  M.

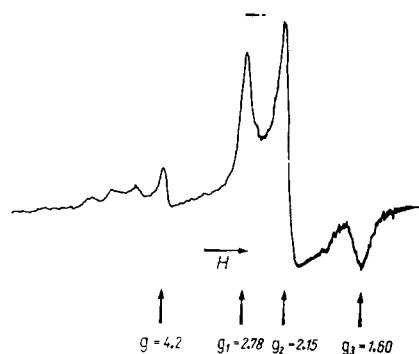


Abb. 4. ESR-Spektrum der Zyanidkatalase; Messtemperatur 77 °K; Katalasekonzentration  $0.8 \cdot 10^{-4}$  M.

werden konnten. Auch Katalaserhodanid ist ein Mischkomplex der High- und Low-spin-Form; die  $g$ -Faktoren sind  $g_1 = 6.5$  und  $5.3$  sowie für  $g_1 = 2.80$ ;  $g_2 = 2.00$  und  $g_3 = 1.65$ . Der einzige Low-spin-Komplex, der nachgewiesen werden konnte, war die Zyanidverbindung der Katalase; im ESR-Spektrum dieser Katalaseverbindung war die Absorption bei  $g = 6$  verschwunden (Abb. 4). Nur im Bereich des  $g$ -Faktors  $g = 2$  zeigten sich drei gut abgrenzbare Absorptionen mit den  $g$ -Faktoren  $g_1 = 2.78$ ;  $g_2 = 2.15$ ;  $g_3 = 1.60$ .

## DISKUSSION

Magnetische Untersuchungen der Katalase und einiger Katalaseverbindungen erfolgten von MICHAELIS UND GRANICK<sup>17,18</sup> und von THEORELL UND AGNER<sup>12</sup>. Nach den Messungen der magnetischen Suszeptibilität von THEORELL UND AGNER ist das Eisen der Katalase, des Katalaseazids und des Katalasefluorids ionogen gebunden. Nur die Katalasecyanidverbindung ist ein kovalenter Komplex wobei jedoch im Falle der Leberkatalase nach Ansicht dieser Autoren nur 3 Hämineisen diese kovalente Bindung eingehen sollen; das vierte Eisen bleibt dagegen ionogen gebunden.

Elektronenspinresonanz-Messungen geben gegenüber der Messung der magnetischen Suszeptibilität und der Aufzeichnung der optischen Absorptionsspektren einen tieferen Einblick in die Elektronenstruktur von Hämoproteiden, da die ESR-Messung unter günstigen Bedingungen den gleichzeitigen Nachweis mehrerer magnetischer Zentren gestattet<sup>1,3-6</sup>. Der direkte Nachweis der High-spin- und der Low-spin-Form ergab sich auch bei einigen Verbindungen der Rinderleberkatalase. Ein Vergleich der ESR-Messungen der Katalaseverbindungen mit anderen Hämoproteiden zeigt, dass zwischen den einzelnen Hämoproteiden mit gleichen Liganden quantitative Unterschiede bezüglich des Anteils der einzelnen Komplexform bestehen. So liefern Methämoglobinazid<sup>1</sup> und Metmyoglobinazid<sup>3</sup> typische Low-spin-Spektren; Katalaseazid zeigt dagegen das typische Spektrum eines Mischkomplexes beider Komplexformen. Der Azidkomplex der Peroxydase<sup>4</sup> zeigt ein ESR-Spektrum mit vorwiegendem Low-spin-Anteil; eine Absorption bei  $g \approx 6$  ist nur angedeutet vorhanden.

TABELLE I

ÜBERSICHT DER  $g$ -FAKTOREN DER GEMESSENEN KATALASEVERBINDUNGEN

Messtemperatur 77° K.

	$g_1$	$g_{11}$	$g_1$	$g_2$	$g_3$
Katalase (pH 6.9)	6.3		1.92		
Katalasefluorid	6.4		1.92		
Katalaseformiat	6.7	5.3	1.95		
Katalaseacetat	6.65	5.2		2.16	1.95
Katalaseazid	6.5	5.25		2.66	2.00
Katalase-H <sub>2</sub> S	6.5	5.2		2.76	2.13
Katalasezyanat	6.65	5.4			~2
Katalaserhodanid	6.5	5.3		2.80	2.00
Katalasecyanid				2.78	2.15

Saures Methämoglobin ist ein Mischkomplex<sup>1,19</sup>; dagegen ist die Katalase bei einer Temperatur von 77° K ein reiner High-spin-Komplex. Ein Zyanidkomplex des Methämoglobins konnte bisher mit der ESR noch nicht nachgewiesen werden; der Zyanidkomplex der Katalase war nachweisbar, es ergab sich ein typisches Low-spin-Spektrum (Abb. 4). Katalasezyanat und Katalaserhodanid verhalten sich ähnlich wie die entsprechenden Methämoglobinverbindungen, d.h., es sind typische Mischkomplexe der High-spin- und Low-spin-Form (Tabelle I). Allgemein kann man sagen, dass bei den Katalasekomplexen im Vergleich zu den entsprechenden Methämoglobin-komplexen die High-spin-Form begünstigt ist. Dieser Befund kann darauf zurück-

geführt werden, dass die am Porphyrineisen komplex gebundene Gruppe des Proteins entweder von anderer chemischer Natur ist als beim Methämoglobin oder aber, dass bei gleicher bindender Gruppe (beim Hämoglobin Histidin) die räumliche Struktur der Hämtasche der Proteine verschieden ist. Auch das Auftreten von zwei Absorptionsmaxima im Bereich von  $g$ -senkrecht, die insbesondere bei den Mischkomplexen der Katalase deutlich in Erscheinung treten, kann durch diese Vorstellungen erklärt werden. Die achsiale Symmetrie, die bei den Methämoglobinkomplexen vorhanden ist<sup>1,19</sup>, ist bei der Katalase und offenbar auch bei anderen Hämoproteiden gestört, zum Beispiel bei der Myeloperoxydase<sup>3</sup> und auch bei der Peroxydase aus Meerrettich<sup>4</sup>. Da die Katalase im Gegensatz zur Peroxydase aus 4 Untereinheiten besteht, ist die Möglichkeit gegeben, dass die Untereinheiten paarweise verschiedene achsiale Spektren ergeben, die sich überlagern. Diese Möglichkeit kann man allerdings nicht für die Peroxydase diskutieren, da diese nur ein Häm pro Proteinmolekül gebunden hat. Vielmehr muss für die Peroxydase eine gestörte Symmetrie des Hämins angenommen werden; auch für die Katalase ist diese Annahme wahrscheinlicher. Bisher ist unbekannt, ob die Proteinbindung des Eisens der Katalase wie beim Hämoglobin und beim Myoglobin über Histidine erfolgt. Bei den abnormen Hämoglobinen  $M_{\text{Osaka}}$  und  $M_{\text{Iwate}}$ , bei denen in der  $\alpha$ -Kette ein hämbindendes Histidin gegen ein Tyrosin ausgetauscht ist, zeigt sich im ESR-Spektrum ebenfalls ein Dublett bei  $g$ -senkrecht<sup>20,21</sup>. Aus diesem Befund ist zu schliessen, dass auch bei der Katalase der 5. bzw. der 6. Ligand wahrscheinlich kein Histidin ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Rinderleberkatalase sowie einige Katalaseverbindungen wurden bei einer Temperatur von 77 °K mit der Methode der Elektronenspinresonanz untersucht. Es zeigte sich, dass die Katalaseverbindungen wie die Verbindungen anderer Hämoproteide entsprechend ihren Elektronenspinresonanz-Spektren in High-spin-Komplexe, Low-spin-Komplexe und Mischkomplexe der beiden Komplexformen einteilbar sind. Rinderleberkatalase selbst ergibt bei neutralem pH ein achsialsymmetrisches Elektronenspinresonanz-Spektrum mit Absorptionen bei  $g = 6$  und  $g = 2$ ; Katalase ist somit ein High-spin-Komplex. Auch die untersuchten Katalaseverbindungen Katalasefluorid und Katalaseformiat sind reine High-spin-Komplexe. Die Low-spin-Komplexe zeigen Elektronenspinresonanz-Spektren niederer Symmetrie mit 3  $g$ -Faktoren um 2. Nur Katalasezyanid ist ein reiner Low-spin-Komplex. Die Mischkomplexe der beiden Komplexformen sind durch eine Absorption bei  $g = 6$  und eine breite Absorption mit 3  $g$ -Faktoren bei  $g \approx 2$  gekennzeichnet. Elektronenspinresonanz-Spektren mit diesen Absorptionen zeigen folgende Katalaseverbindungen: Katalaseacetat, Katalaseazid,  $H_2S$ -Katalase, Katalasecyanat und Katalaserhodanid.

#### LITERATUR

- 1 H. REIN UND O. RISTAU, *Biochim. Biophys. Acta*, 94 (1965) 516.
- 2 J. S. GRIFFITH UND L. E. ORGEL, *Quart. Rev.*, 11 (1957) 381.
- 3 A. EHRENBERG, *Arkiv Kemi*, 19 (1962) 119.
- 4 Y. MORITA UND H. S. MASON, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 2654.
- 5 T. YONETANI, H. SCHLEYER UND A. EHRENBERG, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3240.
- 6 H. REIN, O. RISTAU UND F. JUNG, *Experientia*, 24 (1968) 797.



- 7 G. SCHNUCHEL, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 298 (1954) 241.
- 8 H.-U. BERGMAYER, *Biochem. Z.*, 327 (1955) 255.
- 9 G. SCHOFFA UND O. RISTAU, *Exptl. Tech. Physik*, 8 (1960) 217.
- 10 H. REIN, O. RISTAU UND F. JUNG, *Z. Phys. Chem.*, 221 (1962) 197.
- 11 O. RISTAU, H. REIN UND F. JUNG, *Acta Biol. Med. Germ.*, 8 (1962) 332.
- 12 H. THEORELL UND K. AGNER, *Arkiv Mineral. Geol.*, 16a Nr. 7 (1942).
- 13 H. BEINERT UND R. H. SANDS, in M. S. BLOIS, H. W. BROWN, R. M. LEMMON, R. O. LINDBLOM UND M. WEISSBLUTH, *Free radicals in Biological Systems*, New York, London, 1961, p. 17.
- 14 H. BEINERT UND R. H. SANDS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3 (1960) 41.
- 15 W. SCHELER, G. SCHOFFA UND F. JUNG, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 232.
- 16 K. AGNER UND H. THEORELL, *Arch. Biochem.*, 10 (1946) 321.
- 17 L. MICHAELIS UND S. GRANICK, *Science*, 94 (1941) 285.
- 18 L. MICHAELIS UND S. GRANICK, *J. Gen. Physiol.*, 25 (1941) 325.
- 19 H. REIN UND O. RISTAU, *Blut*, 15 (1967) 221.
- 20 A. HAYASHI, A. SHIMIZU, Y. YAMAMURA UND H. WATARI, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 626.
- 21 H. WATARI, K.-J. HWANG, K. KIMURA UND K. MURASE, *Biochim. Biophys. Acta*, 120 (1966) 131.

*Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 538–546