

international latitude service to determine the variation of the poles show, however, a very clear prolongation of this period up to 430 days, which is conditioned by the earth's plasticity, and from which its rigidity can be calculated. This result, though, stands in contradiction to the value derived by DARWIN from the tides. PREY and SCHWEYDAR therefore have assumed a variable rigidity for the earth and have derived for this the function $\mu = 1.6 \cdot 10^{12} (1 - 0.83 r^2)$. The rotation of the earth is also retarded by the tide, as can be recognized from the apparent precession of the moon. Investigation of the wanderings of the poles over long periods of time yield geologically useful results only when one assumes

that only $1/10$ of the shell is wholly rigid. The formation of the continents can be explained by the separation of the moon from the earth, whereupon the sial mantle was torn asunder and the remainder sank clodlike into the sima. A displacement of the continents relative to the sima has taken place at most only in the remoter geological periods. If, though, the sinking of the continental clods shall have occurred only very slowly during whole geological epochs, then one must either assume the earth's viscosity to be of the order of 10^{25} , or one is driven, when one assumes a normal viscosity of the order of 10^{13} , to the conclusion that the sinking of the clods followed very rapidly during the separation of the moon.

Über die Wirkungsweise der Katalasen¹

VON HUGO THEORELL², Stockholm

Die Fähigkeit der meisten biologischen Substanzen, Wasserstoffsuperoxyd zu Sauerstoff und Wasser zu spalten, ist ebenso lange bekannt gewesen wie das Wasserstoffsuperoxyd selbst, das heißt seit 1811. THÉNARD, der Entdecker des Wasserstoffsuperoxyds, beobachtete im selben Jahre, daß Fibrin und viele tierische und pflanzliche Gewebe das Wasserstoffsuperoxyd unter Entwicklung von Sauerstoff spalten. Bis zum Jahre 1900 hat man gemeint, daß diese Reaktion eine Eigenschaft der Lebensvorgänge selbst und also von den lebenden Zellen untrennbar wäre. Gerade um die Jahrhundertwende zeigten nun RAUDNITZ³ und OSKAR LOEW⁴, daß man Wasserstoffsuperoxyd spaltende Enzyme (die Katalasen) aus der lebenden Substanz extrahieren kann. Nach den hervorragenden Arbeiten von OTTO WARBURG und von DAVID KEILIN in den zwanziger Jahren über die Häminfermente war es nicht sehr überraschend, als ZEILE und HELLSTRÖM im Jahre 1930⁵ zeigten, daß die wirksame Gruppe der Katalase Hämin ist. STERN⁶ bewies, daß das Hämin Protohämin ist, und fand weiter, daß Leberkatalasepräparate dazu noch ein blaugrünes Pigment enthalten. SUMNER und seine Mitarbeiter studierten dasselbe zu gleicher Zeit⁷. LEMBERG und seine Mitarbeiter bewiesen, daß der blaugrüne Farbstoff Biliverdin ist⁸.

SUMNER und DOUNCE kristallisierten die Ochsenleberkatalase (1937)⁷, und seitdem sind eine Reihe von Katalasen reinkristallisiert worden, aus verschiedenen Lebern, aus den roten Blutzellen, aus der Pferdeniere

usw. Neulich haben englische Autoren eine Bakterienkatalase reinkristallisiert¹, die anscheinend keine besonderen Verschiedenheiten im Vergleich mit der Blutkatalase aufwies. Trotz der Leichtigkeit mit der schön kristallinische Präparate von Katalase dargestellt werden können, sind unsere Kenntnisse über ihre Zusammensetzung, Wirkung pro mg oder Mol, Wirkungsweise und physiologische Funktion sehr mangelhaft gewesen, was aus den vielen Widersprüchen in der Literatur, z.B. über den Biliverdingehalt und der Katalasefähigkeit verschiedener Präparate hervorgeht.

Wir sind in Stockholm während der letzten zehn Jahre an der Katalasefrage interessiert gewesen.

Das Wort *wir* soll nun wirklich als ein Plural, nicht etwa als ein verstecktes *ich* aufgefaßt werden, denn das meiste von der Arbeit ist von meinen Mitarbeitern während verschiedener Perioden, AGNER, ÅKESON, BONNICHSEN und BRITTON CHANCE, ausgeführt worden.

Die Bestimmung des Molekulargewichts der Ochsen- und Pferdeleberkatalase in SVEDBERGS Institut zu Uppsala ergaben den Wert 225000², der auf vier Eisenatome pro Molekül paßt. In den Blutkatalasen sind nach SUMNER und LASKOWSKI³ sowie AGNER⁴ alle vier in Protohämatin vorhanden, während in den Leberkatalasen eines oder mehrere der Protohämatine zu Verdohämatin oxydiert waren.

Es war nun eine offene Frage, ob die Katalasen vom selben Tier, aber aus verschiedenen Organen, die gleichen oder verschiedene Eiweißkomponenten hätten. BONNICHSEN verglich die Pferdeleber- und die Pferdeblutkatalasen mittels Aminosäureanalysen und immunologischer Experimente und bewies damit die Identität der Eiweißkomponenten⁵.

Wir wandten uns hierauf den prosthetischen Gruppen zu. Die Schwankungen im Biliverdingehalt verschied-

¹ Hauptreferat, gehalten vor der Schweizerischen Medizinisch-Biologischen Gesellschaft in Genf am 31. August 1947, anlässlich der 127. Generalversammlung der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft.

² Biochemisches Institut des Medizinischen Nobelinstituts, Stockholm.

³ R. RAUDNITZ, Zbl. Physiol. 12, 790 (1899).

⁴ O. LOEW, U. S. Dept. Agr. Report No. 68, (1901).

⁵ K. ZEILE und B. HELLSTRÖM, Z. Physiol. Chem. 192, 171 (1930).

⁶ K. G. STERN, J. Biol. Chem. 112, 661 (1935/36).

⁷ J. B. SUMNER und A. L. DOUNCE, J. Biol. Chem. 121, 417 (1937).

⁸ R. LEMBERG und R. H. WYNDHAM, J. Roy. Soc. New South Wales 70, 343 (1936/37).

¹ D. HERBERT und AUDREY J. PINSENT, Nature 160, 125 (1947).

² K. AGNER, Biochem. J. 32, 1702 (1938).

³ M. LASKOWSKI und J. B. SUMNER, Science 94, 615 (1941).

⁴ K. AGNER, Ark. Kem. Min. Geol. 17B, N:r 9 (1943).

⁵ R. K. BONNICHSEN, Arch. Biochem. 12, 83 (1947).

dener Leberkatalasepräparate, die z.B. SUMNER¹ immer fand, erregten unsern Verdacht, daß das Biliverdin überhaupt ein postmortales Kunstprodukt sei, das entweder enzymatisch oder infolge ungeeigneter präparativer Maßnahmen entstanden ist. BONNICHSEN hat neulich diese Frage durch die Darstellung biliverdinfreier Katalasen aus Menschen-, Meerschweinchen- und Pferdeleber gelöst.

noch nicht bewiesen, daß alle vier Hämine im Leberkatalasemolekül Protohämatine sind. Die Möglichkeit steht noch offen, daß die Oxydation des Katalaseprotohämins z.B. zu Oxyhäm in der Leber physiologisch vorkommt.

Die Bestimmung der Aktivität der Katalasen ist niemals sehr befriedigend gewesen. Seit mehr als zwanzig Jahren hat man die Bestimmungsmethode von v. EULER und JOSEPHSON verwendet, wobei eine sehr kleine Menge Katalase – weniger als 1 γ von reinen Präparaten – in 50 ml Phosphatpufferlösung Wasserstoff-superoxyd spaltet. Nach verhältnismäßig langer Zeit, z. B. nach 3, 6 und 9 Minuten, nimmt man Proben heraus und bestimmt mittels Titration mit Permanganat die noch vorhandene Menge von H_2O_2 . Ein Übelstand dabei ist, daß die Reaktionskonstante, die gemäß der Formel

$$k = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{[E]} \cdot \ln \frac{x_0}{x}$$

gleichbleiben sollte, in der Wirklichkeit mit der Zeit erheblich abfällt, so daß man, um den Anfangswert der Aktivität zu finden, eine Extrapolation zur Zeit 0 unternehmen muß.

Wir haben nun gefunden¹, daß die obengenannten Bedingungen zur Messung der Katalaseaktivität in zweierlei Hinsicht ungünstig sind. Erstens wird bei der angewandten hohen Verdünnung der Katalase ein beträchtlicher Teil davon an die Glaswände des Gefäßes adsorbiert, wodurch ja die Aktivität herabgesetzt wird. Zweitens werden die wenigen Katalasemoleküle, die ja eine große Menge von Substrat während langer Zeit spalten müssen, dadurch selbst zum Teil inaktiviert. Beide Nachteile lassen sich nun sehr leicht beseitigen, nämlich einfach durch Erhöhung der Katalasekonzentration und entsprechende Verkürzung der Reaktionszeit.

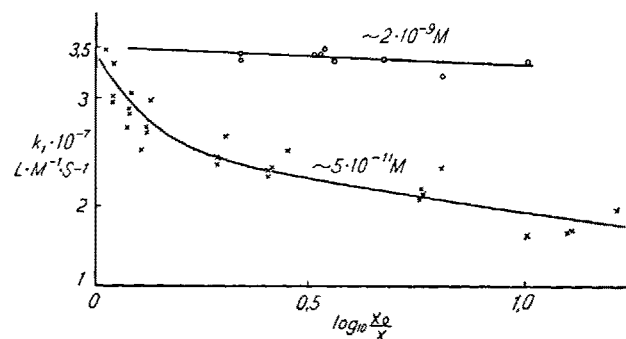


Abb. 2. Ordinate: Liter pro Mol und Sekunde.

Abszisse: $\log \frac{(H_2O_2) \text{ Zeit} = 0}{(H_2O_2) \text{ Zeit} = t}$.

Die Abb. 2 zeigt einige Ergebnisse von Bestimmungen der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante mit demselben Katalasepräparat nach der alten Methode (un-

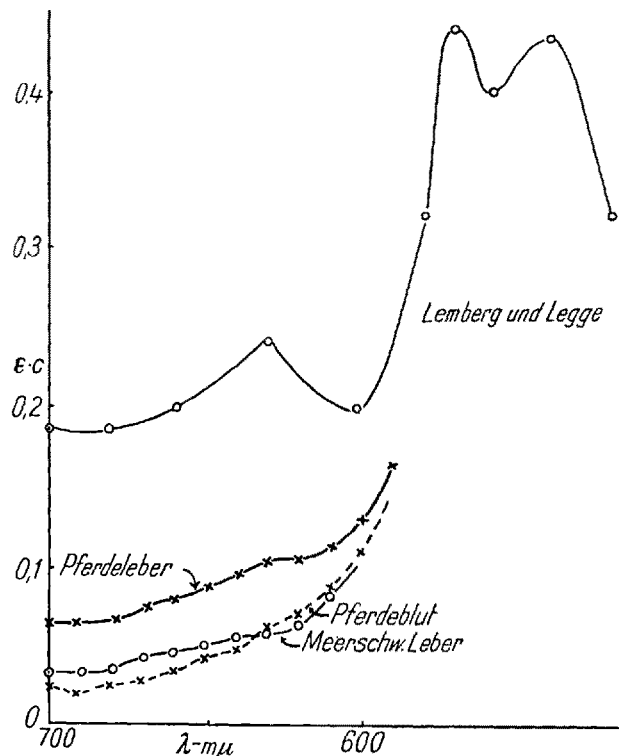


Abb. 1. Lichtabsorption von CO-Hämochromogenen.

$$\epsilon \cdot c = \left(\frac{\log J_0/J}{\text{cm}} \right).$$

Die Abb. 1 zeigt einige Lichtabsorptionskurven von CO-Hämochromogenen, die mit verschiedenen Katalasepräparaten gemacht wurden. Unterhalb der Wellenlänge 580 $m\mu$ sind alle Kurven praktisch gleich, weshalb nur eine ausgezogen ist. Im roten Gebiet dagegen finden sich große Unterschiede, die auf einen wechselnden Gehalt von Verdohämochromogen zurückzuführen sind. Das Pferdeleberkatalasepräparat von LEMBERG und LEGGE² weist eine sehr deutliche Bande bei 630 $m\mu$ auf, die in Pferdeleberkatalasepräparaten von ROGER BONNICHSEN nur angedeutet ist und in den Präparaten aus Pferdeblut und Meerschweinchenleber überhaupt nicht vorkommt. Die Arbeiten von BONNICHSEN³ zeigen, daß der Biliverdingehalt der Leberkatalasepräparate von der Darstellungsweise abhängt, und daß man mit geeigneten Maßnahmen biliverdinfreie Leberkatalase darstellen kann. Dagegen ist es

¹ J. B. SUMNER und A. L. DOUNCE, J. Biol. Chem. 121, 417 (1937).

² R. LEMBERG und J. W. LEGGE, Biochem. J. 37, 118 (1943).

³ R. K. BONNICHSEN, noch unveröffentlicht.

¹ R. K. BONNICHSEN, B. CHANCE und H. THEORELL, Acta Chem. Scand., im Druck.

tere Kurve) und mit der neuen (obere Kurve). Man ersieht daraus, daß nach der alten Methode im Anfang eine schnelle Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante stattfindet. Später wird die Abnahme fast geradlinig und etwas langsamer, ist aber immer noch beträchtlich. Diese letzte Phase entspricht den von den meisten Autoren angewandten 3-, 6- und 9-Minuten-Werten. Offenbar wird eine Extrapolation bis zur Zeit $t = 0$ einen viel zu niedrigen Wert ergeben. Wurde dagegen die Katalasekonzentration auf das 40fache erhöht (obere Kurve), so erwies sich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante als von $\log_{10} \frac{x_0}{x}$ fast unabhängig.

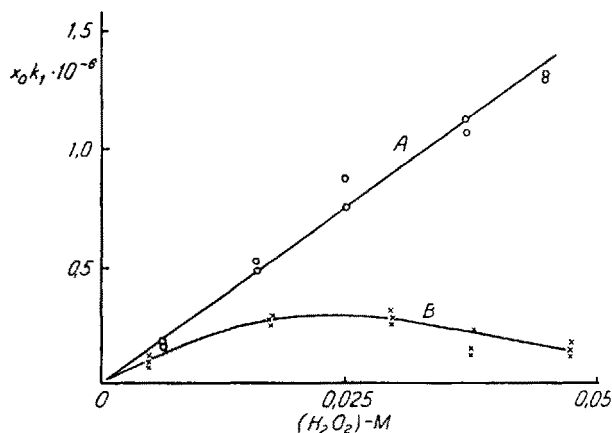


Abb. 3. Ordinate: Anfangskonzentration des H_2O_2 · Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $\cdot 10^{-6}$.
Abszisse: Anfangsmolarität des H_2O_2 .

Noch deutlicher tritt der Einfluß von Katalasekonzentration und Reaktionszeit in der Abb. 3 hervor, wenn die anfängliche Konzentration des H_2O_2 (x_0) variiert wird. Nach der alten Methode der Aktivitätsbestimmung ergibt eine Erhöhung der anfänglichen H_2O_2 -Konzentration eine rasche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit (Kurve B). In einem gewissen Konzentrationsbereich kann es dabei geschehen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit als von der H_2O_2 -Konzentration unabhängig erscheint (um 0,025 M H_2O_2 herum). Manche Autoren haben daraus den Schluß gezogen, daß die Katalasen bei dieser Konzentration im Sinn der MICHAELISSchen Theorie mit H_2O_2 gesättigt sind, und sogar Werte für die MICHAELIS-Konstante angegeben.

Die Experimente mit höherer Katalasekonzentration (Kurve A) lehren indessen, daß die älteren Resultate Artefakte sind, die von der Verwendung allzu verdünnter Katalaselösungen herrühren. Von einer Sättigung der Katalase mit H_2O_2 ist nichts mehr zu sehen, und eine MICHAELIS-Konstante existiert also im experimentell zugänglichen H_2O_2 -Konzentrationsgebiet nicht.

BRITTON CHANCE, der als Guggenheim-Fellow zur Zeit mit uns arbeitet, hat mit einer verfeinerten HART-RIDGE-ROUGHTON-MILLIKAN-Technik die Kinetik der Katalasen und ihre Verbindungen eingehend unter-

sucht¹. Zwei Spritzen, Abb. 4, oben, enthalten z.B. Katalase und H_2O_2 -Lösung. Der Inhalt beider wird gleichzeitig in eine Mischkammer hineingetrieben und fließt nach der Mischung in eine Röhre von etwa 1 mm Durchmesser hinaus. Ein monochromatischer Lichtstrahl von beliebig einstellbarer Wellenlänge passiert quer durch die Kapillare und die Variationen in der Lichtabsorption werden entweder mit einem Galvanometer oder für sehr schnelle Reaktionen mit einem Oszillographen registriert. Mit Hilfe einer im Lumen der Kapillare befindlichen Platinelektrode kann außerdem die H_2O_2 -Konzentration polarographisch registriert werden. Die Experimente können nach zwei etwas verschiedenen Methoden gemacht werden. Nicht allzu schnelle Reaktionen werden am besten dadurch studiert, daß man eine schnelle Injektion der beiden Flüssigkeiten in die Kapillare macht und dann die Veränderungen in der wieder stillstehenden Flüssigkeit in der Kapillare untersucht («flow-stop»-Methode).

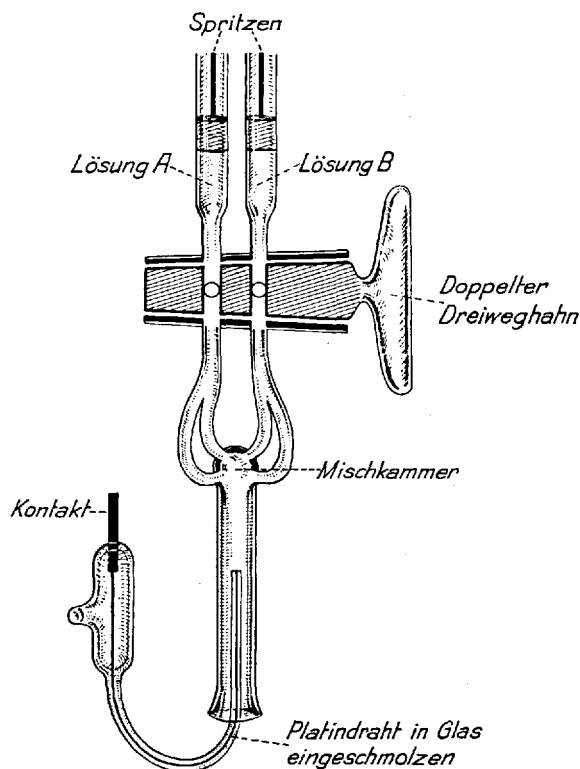


Abb. 4. Mischeinrichtung für Katalase und H_2O_2 -Lösung.

Schnelle Reaktionen, die in einem Bruchteil von einer Sekunde ablaufen, werden dagegen am besten während der Durchströmung der Kapillare registriert («stream-flow»-Methode).

Auf die technischen Einzelheiten², die in der Abb. 5 schematisch dargestellt sind, kann ich hier nicht näher eingehen, nur eines sei besonders hervorgehoben. In-

¹ B. CHANCE, Acta Chem. Scand. 1, 235 (1947). Eine weitere Reihe von Arbeiten über die Kinetik der Katalase werden demnächst veröffentlicht werden.

² B. CHANCE, Rev. Scient. Instr. 18, 601 (1947).

folge der hohen Reaktionsfähigkeit der Katalasen mußte CHANCE mit sehr verdünnten Lösungen arbeiten, deren Farbe mit dem Auge nicht zu sehen war. Infolgedessen waren die Veränderungen der Lichtab-

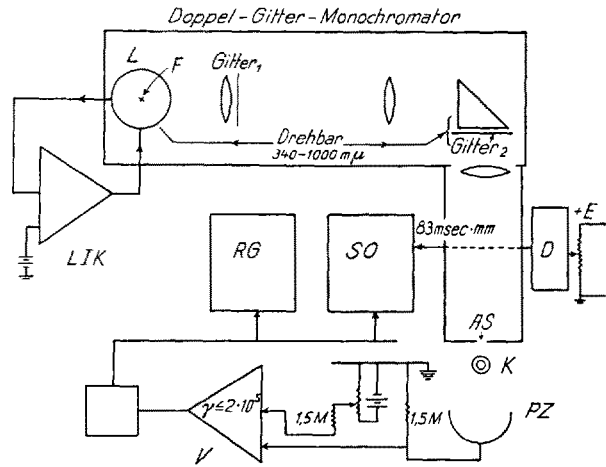


Abb. 5. Meßeinrichtung, schematisiert.

- L = Lampe zu 4 A und 8,5 V. Der Glühfaden (F) wird auf dem Eintrittspalt abgebildet.
- LIK = Einrichtung zur Kontrolle der Lichtintensität ($7 \cdot 10^4$ A/V). Stabilisierungsverhältnis = $3 \cdot 10^4$.
- RG = Registriergalvanometer; 1 Skalenstrich $\geq 10 \mu V$; $\geq 6,7 \cdot 10^{-12}$ A; 0-2 Schwingungen/sec.
- SO = Spiegeloszillograph; 1 mm Ausschlag $\geq 4,2 \mu V$; $\geq 2,8 \cdot 10^{-12}$ A; 0-500 Schwingungen/sec.
- Die Bezeichnung 83 msec/mm gibt an: Mit dieser Mischkammer würde ein Ausschlag von 83 mm bedeuten, daß 1 msec zwischen Mischen und Beobachten verfließt.
- AS = Austrittspalt von 5 mμ.
- D = Apparat, der die Spannungsveränderung mit der Zeit registriert.
- K = Kapillare von 1 mm Durchmesser (vgl. Abb. 4).
- PZ = Photozelle (Fabrikat RCA, Type 929 oder 935).
- V = Verstärkungseinrichtung; 1,5 M = 1,5 MΩ; γ = Verstärkungsgrad. Periode des Galvanometers = 0,020-10 sec.

sorption sogar auf dem Gipfel der Soret-Bande im Violett außerordentlich klein, von der Größenordnung 1% oder weniger, so daß die Anforderungen an die Konstanz der Lichtquelle extrem hoch waren.

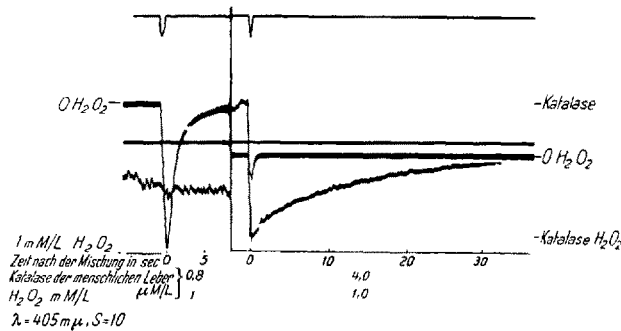


Abb. 6.

Ein «Electroncontroller» reduzierte alle zufälligen Spannungsschwankungen 30000mal und die kontinuierliche Spannungsveränderung war kleiner als 0,001% pro Minute.

Die Abb. 6 zeigt einige Experimente von CHANCE. Links wurde eine sehr kleine Menge von Katalase, 0,08 mμM/L, mit H_2O_2 /1 mM/L gemischt. Die horizontale Linie oben zeigt im Moment der Injektion eine Zacke, die ein Maß der Strömungsgeschwindigkeit in der Kapillare ist. Die mittlere Kurve gibt den Ausschlag der Platinelektrode an. Die große, nach unten gerichtete Zacke ist also ein Maß der H_2O_2 -Konzentration in der Kapillare. Nach 5 bis 10 Sekunden ist demnach alles H_2O_2 gespalten. Die dritte, etwas unregelmäßige Kurve ist das spektrophotometrische Ergebnis. Bei dieser hohen Verdünnung der Katalase ist also spektrophotometrisch nichts zu verzeichnen.

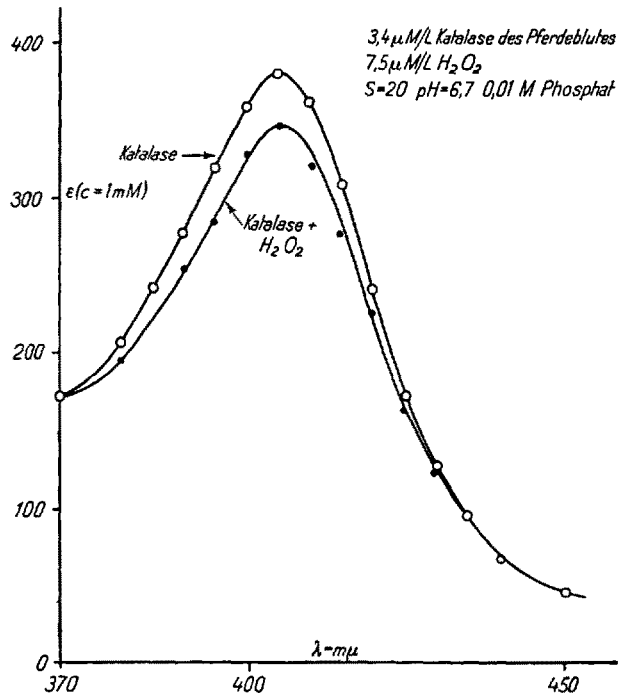


Abb. 7.

Wurde nun die Katalasekonzentration auf das 50-fache erhöht (Experiment rechts), so ist das Bild ein ganz anderes. Die Platinelektrode gibt eine kleine, in etwa einer Sekunde verschwindende Zacke (Kurve « H_2O_2 »). Spektrophotometrisch wurde diesmal ein großer Ausschlag beobachtet, vom Niveau «Katalase» bis zum Niveau «Katalase- H_2O_2 ». Im Laufe ziemlich langer Zeit geht dann der Ausschlag allmählich zum Katalaseniveau zurück. Dieser Versuch ist so zu deuten, daß Katalase und H_2O_2 eine bisher nicht beobachtete Verbindung bilden, wobei die Lichtabsorption bei 405 mμ um etwa 10% abnimmt.

Die Abb. 7 zeigt die Soret-Banden der Katalase bzw. der H_2O_2 -Verbindung.

Die Abb. 8 zeigt einen Versuch von CHANCE mit der «stream-flow»-Methode. Oben ist also die Strömungsgeschwindigkeit in der Kapillare registriert. Die ganze Dauer der Durchströmung betrug in diesem Falle 0,6 Sek. Während dieser Zeit stellte sich die Licht-

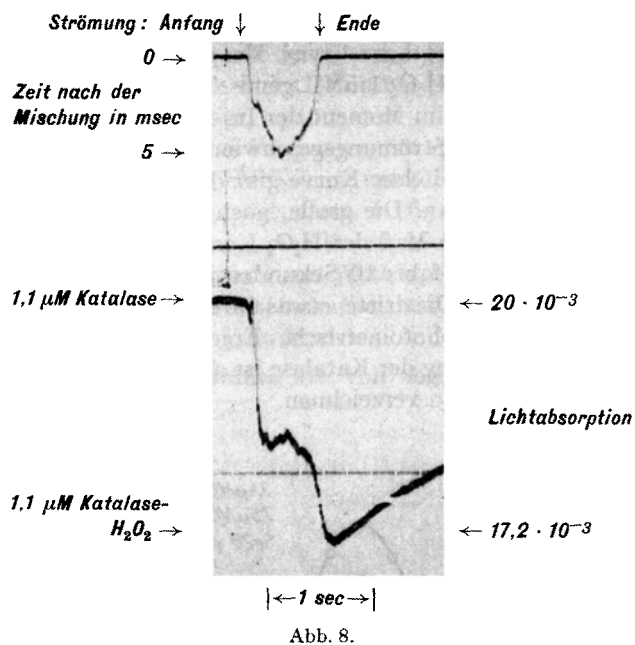


Abb. 8.

absorption auf einen Zwischenwert ein. Sobald aber die Strömung aufhörte, sank die Lichtabsorption bis zum Wert der voll entwickelten H_2O_2 -Verbindung herab. Aus diesem Experiment konnte die Geschwindigkeitskonstante der Verbindung zwischen Katalase und H_2O_2 berechnet werden, wobei der Wert $3 \cdot 10^{-7}$ M/L · sec gefunden wurde. Interessanterweise stimmt diese Zahl innerhalb der Fehlergrenzen mit der Geschwindigkeitskonstante der katalatischen Zersetzung des H_2O_2 überein.

Die Abb. 9 zeigt, was geschieht, wenn:

1. Katalase mit Zyanid gemischt wird (links). Die Verbindungsgeschwindigkeit der Katalase (Leberkatalase mit drei aktiven Häminen) mit Zyanid ist so niedrig, daß während der Durchströmung reine Katalase in der Kapillare vorhanden ist. Nachdem die Strömung aufgehört hat, verbindet sich das Zyanid im Laufe von etwa einer Sekunde mit den Hämatingruppen.

2. Wurde nun Katalase aus der einen Spritze mit Zyanid + H_2O_2 aus der anderen Spritze gemischt, so ergab sich ein anderes Bild (rechts). Dieses Experiment sowie das vorige wurde mit der Wellenlänge $435 \text{ m}\mu$ ausgeführt. Wie aus der Abb. 7 zu ersehen ist, haben bei dieser Wellenlänge die Katalase und ihre H_2O_2 -Verbindung die gleiche Lichtabsorption. Die Zyanidkatalase hat dagegen eine beträchtlich höhere. Deswegen kann man aus dem Experiment ersehen, daß bei Anwesenheit von H_2O_2 das Zyanid sich nur mit zwei von den drei Hämatinen im Katalasemolekül verbinden kann. Dies stimmt mit der Annahme, daß das dritte Hämatin mit H_2O_2 anstatt Zyanid verbunden ist. Aus diesem Experiment konnte geschlossen werden, daß die von CHANCE nachgewiesene Katalase- H_2O_2 -Verbindung ein Molekül H_2O_2 pro ein Molekül Katalase enthält.

Die Katalase- H_2O_2 -Verbindung wird, wie vorher gezeigt wurde, in Wasserlösung langsam zersetzt unter Wiedererscheinen der Katalase. Viel schneller geht die Zersetzung nach Zusatz von Akzeptoren, wie Alkoholen

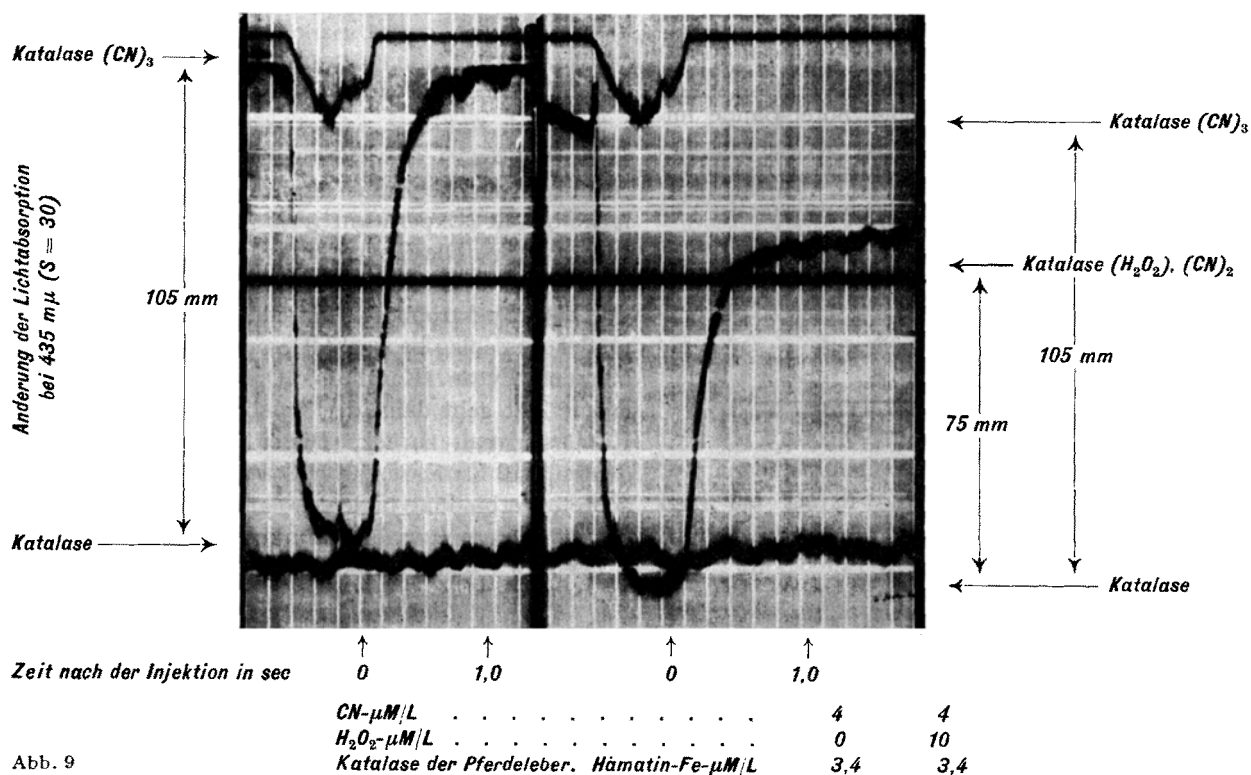


Abb. 9

oder Askorbinsäure. KEILIN und HARTREE¹ haben neulich eine Arbeit über gekoppelte Oxydationen unter Mitwirkung von Katalase veröffentlicht. Der Mechanismus dieser gekoppelten «Oxydation» wurde

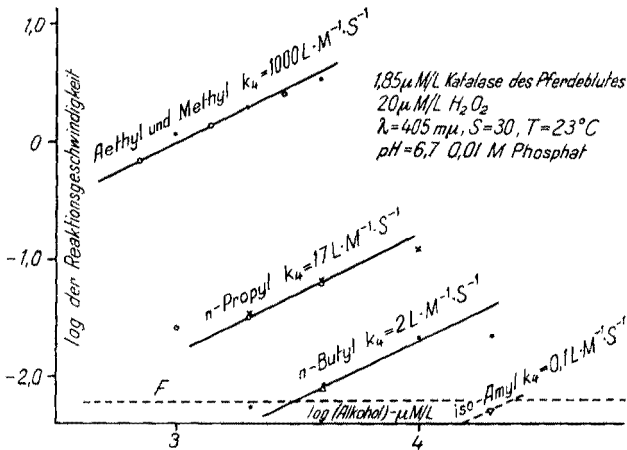


Abb. 10. Oxydationsgeschwindigkeit verschiedener Alkohole durch Katalase-H₂O₂. F = innerhalb der Fehlergrenzen gleich der spontanen Zersetzungsgeschwindigkeit.

durch CHANCES Befund aufgeklärt. Anstatt einer «gekoppelten Oxydation» findet eine reine Peroxydase-wirkung der Katalase statt. Nach den allerletzten Ergebnissen scheint die Analogie zwischen der peroxydatischen Wirkungsweise der Katalasen und der Peroxydasen überraschend vollständig zu sein. In beiden Fällen addiert ein Enzymmolekül ein Molekül H₂O₂, wobei die Bindungsart des Eisens ionisch bleibt (grünliche Verbindungen mit Absorptionsbanden um 650

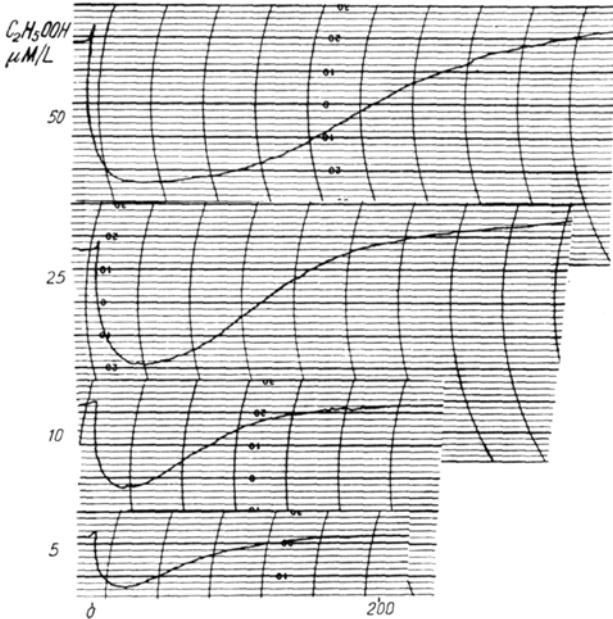


Abb. 11. Zeit nach der Injektion in sec. 1,9 μM/L Katalase der Pferdeleber - λ = 405 mμ S = 30 0,01 M Phosphat pH = 6,7

mμ¹). Von dieser Enzym-H₂O₂-Verbindung werden dann verschiedene Akzeptoren schnell oxydiert.

Die Abb.10 gibt über die Kinetik der peroxydatischen Reaktion von Alkoholen mit Katalase-H₂O₂ Aufschluß. Man ersieht daraus u.a., daß Methanol und Äthanol viel schneller als die übrigen oxydiert werden.

Die Katalasen geben auch Verbindungen mit Methyl- und Äthylhydroperoxyd. Die Anlagerung zur Katalase verläuft bedeutend langsamer als mit H₂O₂ (Abb.11).

¹ D. KEILIN und E. F. HARTREE, Biochem. J. 39, 293 (1945).

¹ H. THEORELL, Ark. Kem. Min. Geol. 16.4, N:r 3 (1942).

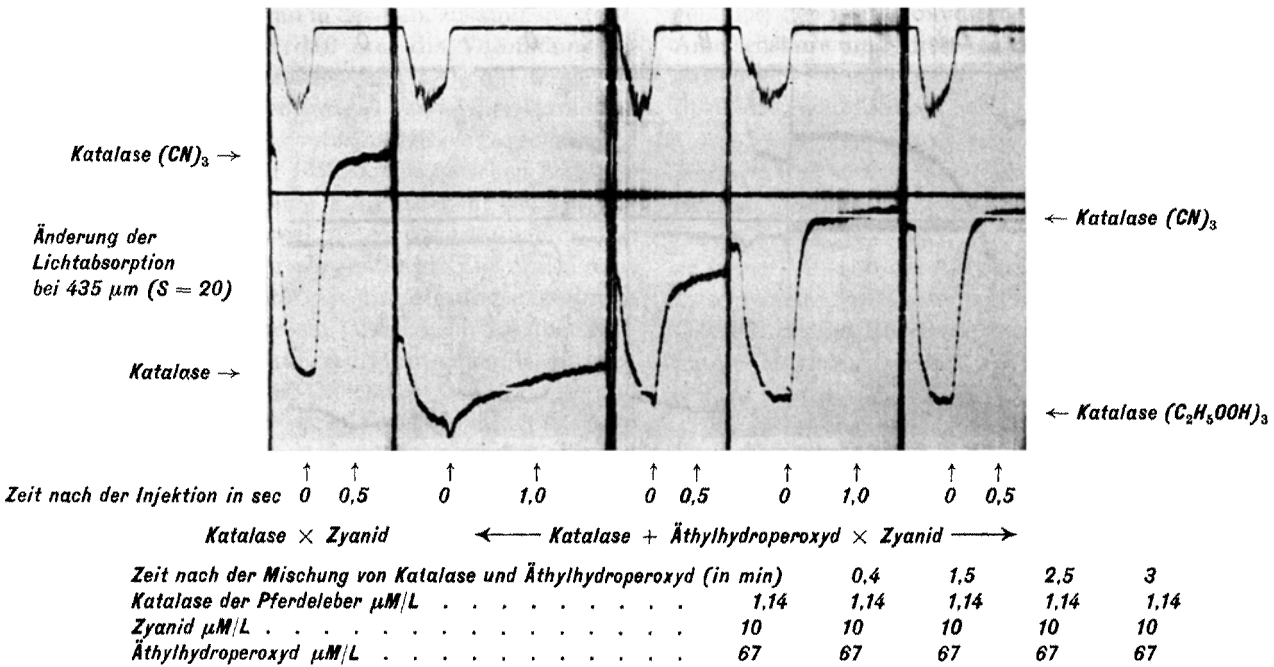
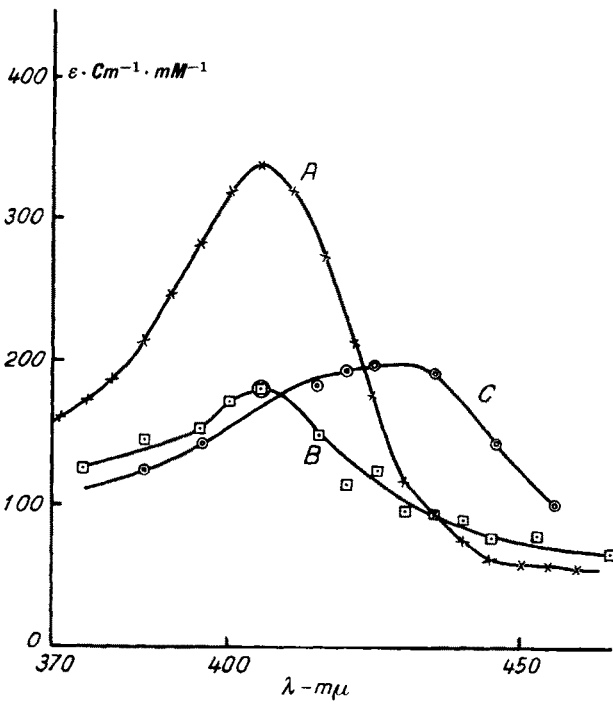


Abb. 12. S = 20: Empfindlichkeit des Galvanometers. Das Zeichen × bedeutet: «In der Kammer Abb. 4 gemischt mit».

Ein anderer Unterschied besteht darin, daß sich die Alkylhydroperoxyde mit allen vier Protohämatinen des Katalasemoleküls verbinden. Blockiert man also diese vier Eisenatome zuerst mit Äthylhydroperoxyd und mischt dann mit Zyanid im Apparat von CHANCE,



so wird keine Zyanidkatalase gebildet (Abb. 12, zweites Experiment von links). Wartet man, bis mehr oder weniger von der Alkylperoxydkatalase zerfallen ist, so wird wieder Zyanidkatalase gebildet (Abb. 12, drei Experimente rechts).

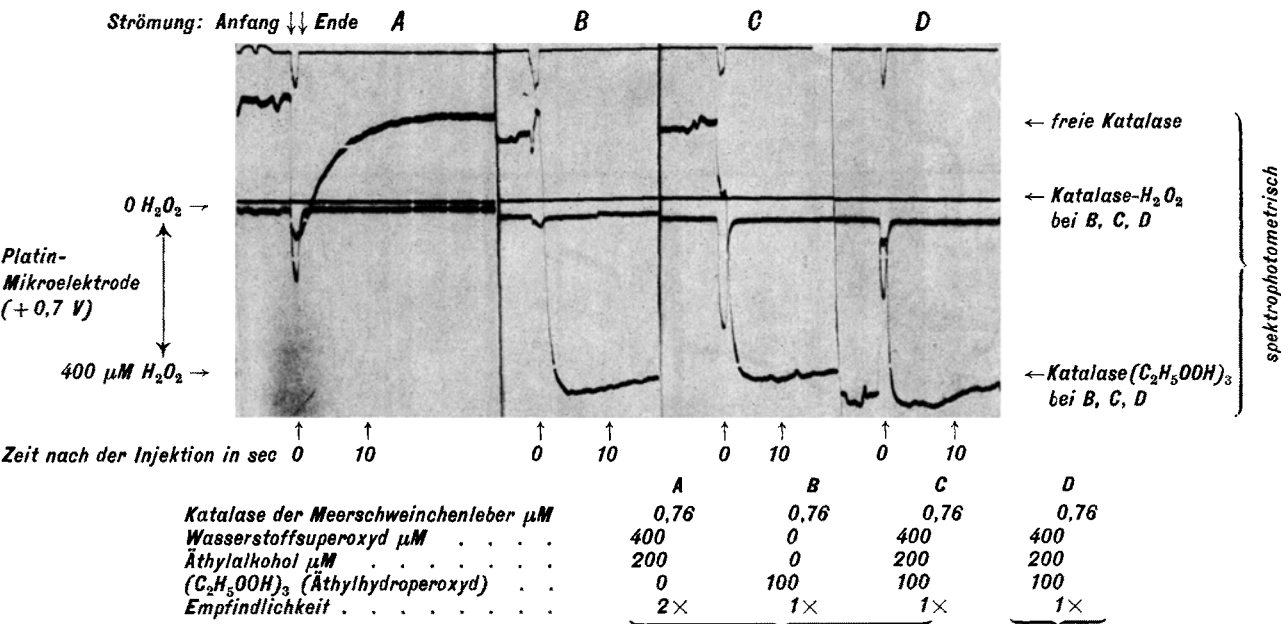


Abb. 15. $\lambda=405$. $S=10$, $p_{\text{H}}=6,5$, $0,01\text{ M}$ Phosphat

Die Abb. 13 zeigt die Soret-Banden der freien Katalasen (A), die nach Zusatz von Alkylhydroperoxyd zuerst gebildeten grünlichen Verbindungen (B) und der rötlichen Alkylhydroperoxydkatalase, die sekundär aus B gebildet wird. Genau so wie bei der Meerrettich-

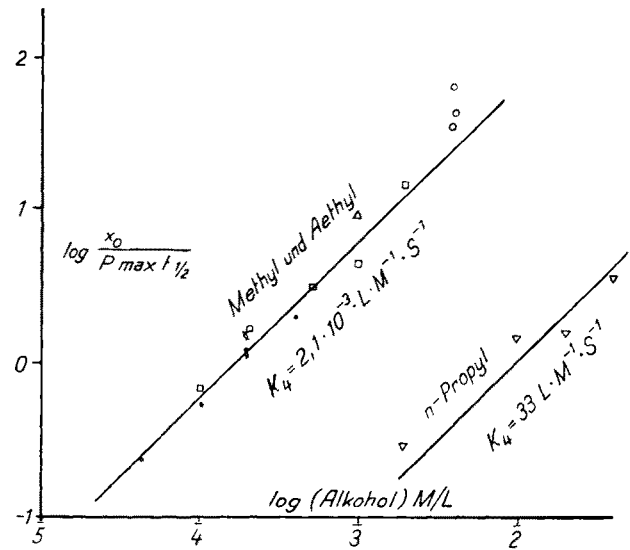


Abb. 14. $\text{l} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bedeutet: Liter pro Mol und Sekunde. Ordinate: \log_{10} der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für Reaktionen von diesem Typ (s. B. CHANCE, J. Biol. Chem. 151, 553 [1943]).

peroxydase nach Zusatz von H_2O_2 (THEORELL,¹) erhält man nach dem Ergebnis von CHANCE mit Alkylhydroperoxyd + Katalase zuerst eine mehr grünliche, sekundär eine rötliche Verbindung.

Die primären Katalasealkylhydroperoxyd-Verbindungen reagieren mit Methanol und Äthanol ungefähr ebenso schnell wie Katalase- H_2O_2 (Abb. 14).

¹ H. THEORELL, Ark. Kem. Min. Geol. 16A, N:r 3 (1942).

Übersicht über die reaktionskinetischen Werte von Hämoproteiden*

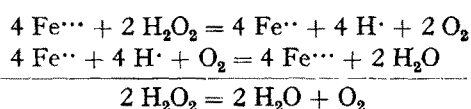
Hämoprotein	Reagens	Zusammensetzung der Komplexverbindungen	Bildung ($\text{l} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Reversibler Zerfall (s^{-1})	Spontaner irreversibler Zerfall	Peroxydatische Reaktion ($\text{l} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Angewendeter Akzeptor	Wahrscheinl. Art des Komplexes ²	
								Wertigkeit des Fe	Bindungsart
Hämoglobin ¹⁾	Sauerstoff	Hb (O_2) ₄	$4,1 \cdot 10^6$	40	—	—	—	+ 2	kovalent
„	Kohlenmonoxyd	Hb (CO) ₄	$1,3 \cdot 10^5$	0,004	—	—	—	+ 2	kovalent
Myoglobin ¹⁾	Sauerstoff	Mgb O_2	$1,9 \cdot 10^7$	37	—	—	—	+ 2	kovalent
„	Kohlenmonoxyd	Mgb CO	$3 \cdot 10^5$	0,04	—	—	—	+ 2	kovalent
Meerrettichperoxydase	Wasserstoffperoxyd	Per. H_2O_2	$1,2 \cdot 10^7$	0,2	< 0,5	$3 \cdot 10^5$	Leukomala-chitgrün	+ 3	ionogen
„	Zyanid	Per. CN	$9,6 \cdot 10^4$	0,4	—	—	—	+ 3	kovalent
Katalase (aus Erythrozyten)	Wasserstoffperoxyd	Kat H_2O_2	$3 \cdot 10^7$	klein	0,02	$1 \cdot 10^3$	Äthanol	+ 3	ionogen
„	Methylhydroperoxyd	Kat (CH_3OOH) ₄	$1 \cdot 10^6$	(0,02)	0,02	$1,1 \cdot 10^3$	Äthanol	+ 3	ionogen
„	Äthylhydroperoxyd	Kat ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$) ₄	$2 \cdot 10^4$	(0,02)	0,04	$2,2 \cdot 10^3$	Äthanol	+ 3	ionogen
„	Zyanid	Kat (CN) ₄	$9 \cdot 10^5$	(0,02)	—	—	—	+ 3	kovalent
„	Wasserstoffperoxyd (katalatische Reaktion)	Kat H_2O_2	$3,5 \cdot 10^7$	4	> 10^9	—	—	+ 3	ionogen

* Temperaturen um 20° C.

Mischt man Katalasealkylhydroperoxyd mit H_2O_2 , so verschwindet das Spektrum des Katalasealkylhydroperoxyds sehr schnell und wird durch das Spektrum der H_2O_2 -Katalase ersetzt. Der Überschuß an H_2O_2 wird katalatisch gespalten, und sobald die Katalase damit fertig ist, verbinden sich die frei gewordenen Hämatine wieder mit Alkylhydroperoxyd (Abb. 15 D).

Einige von den bisher bestimmten kinetischen Daten mit Hämiproteiden sind in der Tab. zusammengefaßt.

Man ersieht daraus, daß u.a. die Verbindungsgeschwindigkeit der Katalase mit H_2O_2 die schnellste Reaktion ist, die bisher auf das Gebiet der Hämoproteide bestimmt wurde. Trotzdem haben Berechnungen über die Häufigkeit der Kollisionen zwischen Katalase und H_2O_2 -Molekülen eine Zahl ergeben, die zur Erklärung der Katalasereaktionen ohne Annahme von Kettenreaktionen mehr als ausreicht. Es ist also nach unserer Meinung theoretisch unnötig und experimentell unbegründet, in diesem Zusammenhang über Kettenreaktionen zu spekulieren. Für einen Reaktionsmechanismus nach der Gleichung von KEILIN und HARTREE



haben die hier kurz geschilderten Experimente keine Stütze ergeben.

Wir gelangen so zur Schlußfolgerung, daß die Katalasen in zweierlei Art und Weise mit dem Wasserstoffsuperoxyd reagieren können; entweder wie *Peroxydäsen*: dabei wird zuerst ein Mol Wasserstoffsuperoxyd von einem Mol Katalase gebunden. Dieses «intermediate compound» von BRITTON CHANCE reagiert mit Methanol und Äthanol mit einer Reaktionskonstante von 1000 M/L · sec. Aus Methanol wird Formaldehyd gebildet, der weiter oxydiert wird, wahrscheinlich zu Ameisensäure und diese zu Kohlensäure. Die Oxydation von Äthanol macht merkwürdigerweise auf der Stufe des Azetaldehyds halt.

Die grüne Verbindung zwischen 4 Mol Äthylhydroperoxyd und einem Mol Katalase oxydiert die niedrigeren Alkohole ungefähr ebenso schnell wie es CHANCES Katalase- H_2O_2 macht. Es ist von Interesse, zu bemerken, daß die Alkylperoxyde demgemäß auch in sehr niedrigen Konzentrationen in der biologischen Oxydation eine Rolle spielen können (wenn sie überhaupt gebildet werden, was noch dahingestellt sei).

STERN wies diesen Gedanken 1936 zurück, weil er nur die rote $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$ -Katalase kannte, welche nur in der Gegenwart hoher Konzentrationen von Äthylhydroperoxyd erscheint (0,1 molar). Die grüne Verbindung aber, die STERN nicht kannte, mag von biologischer Bedeutung sein, weil sie bei sehr niedrigen Konzentrationen von $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOH}$ erscheint.

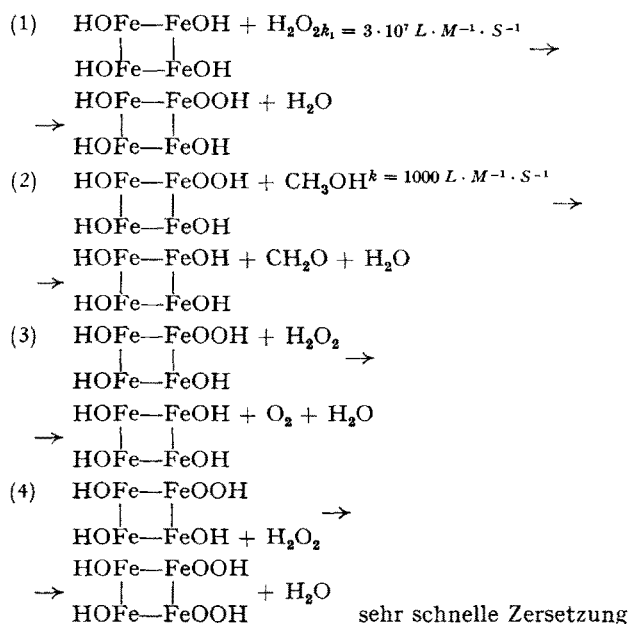
Die Entdeckung der intermediären H_2O_2 -Katalaseverbindung und ihre Reaktionen mit Alkoholen er-

² Nach G. A. MILLIKAN, Proc. Roy. Soc. B., 120, 366 (1936).³ Nach H. THEORELL, Ark. Kem. Geol. 16A, Nr 1 (1942).

klärt alle die Erscheinungen, die KEILIN und HARTREE¹ als «gekoppelte Oxydationen» beschrieben haben. Diese sind also nichts anderes als *peroxydatische Reaktionen* der Katalasen in vollständiger Analogie mit den wohl-bekannten Reaktionen zwischen Peroxydase H_2O_2 und verschiedenen Akzeptoren. Nur die Akzeptorspezifität ist verschieden.

Wie kommt nun die katalatische Spaltung eines Überschusses an H_2O_2 zustande? Ich habe schon erwähnt, daß die Spaltung in einer Reaktion erster Ordnung stattfindet. Die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls ist gleich der Konstante für die Bildung von CHANCES Katalase- H_2O_2 . Man könnte daran denken, daß eines von den vier Eisenatomen des Katalasemoleküls andere Eigenschaften hätte als die übrigen, so daß nur dieses Fe-Atom H_2O_2 zu einer verhältnismäßig stabilen Verbindung anlagern könne, die anderen aber nicht. Dies scheint aber nicht der Fall zu sein, weil z.B. die Titration der Katalase mit Zyanid eine spektrophotometrische Änderung der Lichtabsorption gibt, die geradlinig verläuft. Die Änderung der magnetischen Suszeptibilität verläuft dabei ebenfalls geradlinig. Die Geschwindigkeit der Verbindung der Alkylhydroperoxyde mit Katalase und die peroxydatische Wirkung ist für alle vier Eisenatome die gleiche. Aus diesen Umständen ziehen wir die Schlussfolgerung, daß die Eisenatome gleichwertig sein müssen.

Formelmäßig lassen sich die Bildung der H_2O_2 -Katalase von CHANCE (1), ihre peroxydatische Reaktion mit Methanol (2) und unsere jetzige Arbeitshypothese über den Mechanismus der katalatischen Zersetzung von H_2O_2 (3 und 4) folgendermaßen ausdrücken:



Die Gleichungen 3 und 4 haben zur Voraussetzung, daß die H_2O_2 -Katalase bei der Spaltung des H_2O_2 mit-

wirkt, was sehr wahrscheinlich ist, weil die vier Eisenatome nach dem oben Gesagten ebenbürtig sind. Ob die Spaltung nach der Gleichung 3 oder 4, oder auf beide Weisen verläuft, können wir noch nicht entscheiden. Für eine Reaktion nach der Gleichung 3 spricht z.B. das in der Abb. 15 wiedergegebene Experiment, welches zeigte, daß die Katalase- $(C_2H_5OOH)_4$ mit H_2O_2 schnell reagiert.

Man könnte dann aber fragen, warum die Peroxydasen keine nennenswerte katalatische Wirkung haben. Die Peroxydasen geben doch Verbindungen mit H_2O_2 , die beim Zusammenstoß mit einem freien Molekül H_2O_2 katalatische Spaltung ergeben könnten. Die Antwort darauf, warum das nicht geschieht, ist nicht restlos klar. Wenn es sich durch weitere Experimente herausstellen würde, daß die katalatische Spaltung von H_2O_2 ganz oder hauptsächlich nach der Formel 4 vor sich geht, versteht man ja andererseits ohne weiteres, warum die Peroxydasen H_2O_2 nicht spalten, weil sie ja, soweit bis jetzt bekannt ist, nur 1 Fe pro Mol enthalten. Eine *intramolekulare* Spaltung von zwei an verschiedene Eisenatome im *selben* Katalasemolekül angelagerten H_2O_2 -Molekülen kann offenbar bei den Peroxydasen nicht stattfinden.

Schließlich ergibt sich die folgende Frage: Welche von den beiden Wirkungsweisen der Katalasen, die peroxydatische oder die katalatische, ist physiologisch am wichtigsten? Sind die Katalasen dafür da, um einen Überschuß von H_2O_2 aus den Zellen zu entfernen, oder ist ihre Hauptaufgabe, gewisse Substrate peroxydatisch zu verbrennen?

Wir können die Sache anders ausdrücken: die Katalasen wirken immer wie Peroxydasen. CHANCES Intermediärprodukt oxydiert entweder H_2O_2 oder Alkohole, oder beide, wenn sie gleichzeitig anwesend sind. Ob die katalatische Spaltung vorkommt, beruht also einfach darauf, ob H_2O_2 in Überschuß gebildet wird. Ob das im allgemeinen der Fall ist, können wir noch nicht sagen. Aus AGNERS¹ neuesten Versuchen über die Oxydation des Methanols im lebenden Meerschweinchen läßt sich berechnen, daß die H_2O_2 -Bildung in der Leber so langsam ist, daß nicht einmal das ganze peroxydatische Wirkungsvermögen der Leberkatalase in Anspruch genommen wird.

Wir neigen also der Auffassung zu, daß die physiologische Wirkungsweise der Katalasen analog derjenigen der Peroxydasen ist. Dann versteht man zwei Tatsachen, die vorher unverständlich erschienen:

1. Warum der Katalasegehalt mancher Organe sehr hoch ist — dies ist notwendig, weil die peroxydatische Wirkung nicht sehr schnell ist.

2. Wie die Natur es vermeidet, Energie bei der katalatischen Spaltung von H_2O_2 zu Sauerstoff und Wasser nutzlos zu verschwenden.

¹ D. KEILIN und E. F. HARTREE, Biochem. J. 39, 293 (1945).

¹ K. AGNER, Acta physiol. Scand. 13, 87 (1947).

Summary

Recent experiments carried out in the author's laboratory on the composition and working mechanism of catalases have shown that:

(1) The protein component of blood and liver catalases from horse are identical, as proved by amino acid analyses and immunological tests (R. K. BONNICHSEN).

(2) The biliverdin content of liver catalases is a post-mortem artefact. By using suitable preparative methods BONNICHSEN was able to prepare liver catalases practically free from biliverdin.

(3) The activity values found by the titration method formerly used are too low and uncertain, owing to inactivation of the catalase during the determination. Extrapolation to $t = 0$ does not give correct results. By increasing the catalase concentration and by decreasing the reaction time activity values were obtained which were independent of time, catalase and hydrogen peroxide concentration. The "Kat. F." of all biliverdin-free catalases investigated so far is about 80,000 at 20°, corresponding to an activity constant of $k_1 = 3.5 \cdot 10^7$ Liters \cdot Mol $^{-1}$ \cdot Sec $^{-1}$. Contrary to the results of previous authors no MICHAELIS' constant exists for catalase (BONNICHSEN, CHANCE, and THEORELL).

(4) B. CHANCE, using a highly developed HARTRIDGE-ROUGHTON-MILLIKAN technique ("spectrophotom. with time resolution"), was able to demonstrate the formation of a comparatively stable compound of one mol H_2O_2

with one mol of catalase. Since one catalase molecule contains 4 hematin iron atoms, 3 were left free to combine with ions such as cyanide. The H_2O_2 -catalase has a *peroxidatic* activity towards lower alcohols and ascorbic acid. This finding explains the "coupled oxidations" described by KEILIN and HARTREE.

(5) Alkyl hydroperoxides from compounds with all four catalase hematins (CHANCE). Greenish compounds are formed primarily, red ones secondarily in strict analogy with the horse radish *peroxidase*- H_2O_2 compounds (THEORELL).

(6) Kinetic data were determined for the reactions under (4) and (5).

(7) Catalatic decomposition of H_2O_2 in excess of 1 mol per mol catalase may occur either by the attachment of a second mol of H_2O_2 to a free hematin in catalase- H_2O_2 -complex, or by the reaction of catalase- H_2O_2 with H_2O_2 in some other way, so that O_2 is liberated. No indication of an oxidation-reduction cycle was found.

(8) It is unnecessary to assume that any chain reaction is involved in catalytic decomposition.

(9) If it is assumed that the peroxidatic mode of action of catalases prevails under physiological conditions one can understand (a) why the catalase concentration in many organs is much higher than would be necessary for the decomposition of H_2O_2 ; (b) how Nature avoids the waste of energy that would result from the decomposition of H_2O_2 into oxygen and water.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Azione riducente dei raggi X su soluzioni di bleu di metilene¹

Numerose sono le esperienze volte a spiegare il meccanismo attraverso il quale i raggi X esercitano la loro azione chimica e biologica. Ed è incerto il modo onde nell'acqua stessa le radiazioni ionizzanti determinino reazioni chimiche. Tra le principali ricerche ricorderemo quelle di FRICKE² che usò sostanze inorganiche e organiche semplici e quelle di DALE³ che si servì di enzimi. Tutte queste attività delle radiazioni su soluzioni acquose diluite sono *indirette* in quanto le molecole reagenti del soluto non sono state direttamente eccitate o ionizzate dalle radiazioni, come ammette la Treffertheorie o Targettheorie, ma il loro comportamento dipende dall'eccitazione o ionizzazione delle molecole del solvente. WEISS⁴ ha suggerito l'ipotesi che l'acqua at-

tivata dalle radiazioni risulti di radicali H e OH e ricerche probatorie, anzi concludenti, sono state effettuate da FORSSBERG¹ il quale irradiò soluzioni di catalasi.

Noi ci siamo proposti di studiare la riduzione del bleu di metilene attraverso il meccanismo della ionizzazione dell'acqua. A tal fine noi abbiamo dapprima costruito una curva di taratura del bleu di metilene, con lo spettrofotometro di Pulfrich, usando il filtro S. 66,6/3,5. L'estinzione obbedisce alla legge di LAMBERT-BEER e abbiamo calcolato $\lg \alpha = 1,339$. Vorremmo ricordare a questo punto che i potenziali di ossido-riduzione di soluzioni irradiate di bleu di metilene sono stati studiati da LOISELEUR².

Noi abbiamo irradiato in atmosfera d'azoto 10 cm³ di soluzioni n/100000 e n/50000 di bleu di metilene, in provetta in vetro neutro Murano non contenente elementi ad alto peso atomico, come controllammo radiograficamente. L'apparecchio usato era un Gorla-Siama, tubo A.E.G., 120 kV, 3 mA, 40 r/m, D.F. 30 cm, senza filtro³.

¹ A. FORSSBERG, Acta Radiol. 27, 281 (1946); Nature 159, 308 (1947).

² J. LOISELEUR, Bull. Soc. Chim. biol. 25, 21 (1943).

³ Dell'apparecchio concesso a nostra disposizione dall'Istituto di Radiologia dell'Università di Milano andiamo grati al Prof. PERUSSIA.

¹ Desideriamo esprimere la nostra gratitudine alla Dott. MARIA BASSI la cui collaborazione fu preziosa durante lo svolgimento di queste esperienze.

² H. FRICKE, E. J. HART e H. P. SMITH, J. Chem. Phys. 6, 229 (1938).

³ W. M. DALE, Biochem. J. 34, 1367 (1940); Brit. J. Radiol. 16, 171 (1943).

⁴ J. WEISS, Nature 153, 748 (1944).