

Tabelle II sind eigene Messungen (mit *b* bezeichnet) zusammengestellt; sie werden mit Daten aus der Literatur<sup>8</sup> (mit *a* bezeichnet) verglichen, die auf entsprechende Reaktionsbedingungen umgerechnet wurden. Man sieht, dass die Aktivitäten in Fischmuskeln an der oberen Grenze der für verschiedene Säuger-Muskelgewebe erhaltenen Daten liegen. Berechnet auf molarer Basis vermögen Fischmuskelextrakte 77mal mehr Glycylglycin zu spalten, als durch Kathepsin aus Hämoglobin Tyrosin freigesetzt wird. Sollten andere Peptidasen des Fischmuskels ähnlich hohe Aktivitäten besitzen (was noch untersucht werden soll), so ist anzunehmen, dass katheptische Spaltprodukte von Peptidnatur im Fischmuskul alsbald zu Aminosäuren aufgespalten werden.

Die bisher erhaltenen Daten werden ausführlich an anderer Stelle publiziert.

Der Verfasser dankt der Research Corporation, New York und dem Ernährungswissenschaftlichen Beirat der Deutschen Fischindustrie für die Unterstützung der Arbeit, ferner der Firma Hoffmann-La Roche für Pyridoxal-5'-phosphat.

G. SIEBERT

*Physiologisch-chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 10. September 1957.*

#### Summary

Fresh tissues from sea fishes show much higher activities of cathepsins than the corresponding mammalian tissues. The significance of these findings is discussed. There is no indication for the presence in fresh extracts of fish muscle of either proteinases with a pH optimum near neutrality or of decarboxylases for glutamic and aspartic acids. The activities of glycylglycine dipeptidase in fish muscle are found to be at the upper limit of the values obtained by other workers with mammalian tissues.

### Role of Catalase in Heinz Body Formation

The most probable theory explains the Heinz body formation as a degradation process of certain cell components caused by hydrogen peroxide, which accumulates if catalase is inhibited by several materials<sup>1</sup>. Exogenous hydrogen peroxide does actually produce Heinz bodies in potassium cyanide poisoned red cells<sup>2</sup>. On the other hand, catalase acts in certain circumstances peroxidatically<sup>3</sup>, and such an effect of the catalase is also present in connection with catalase poisons. Catalase poisons, such as aniline and 2,4-dichlorophenol, inhibit not only the catalase, but the inhibitor also changes in the presence of catalase and peroxide<sup>4</sup>.

It is possible that inhibited catalase may also have an active role in the Heinz body formation, and therefore the possibility of Heinz body formation in red cells without catalase or with a low catalase content must be investigated.

Catalase inhibition by potassium chlorate is irreversible<sup>5</sup>, and therefore the potassium chlorate treatment of red cells seemed to be a suitable method to

obtain red cells with a low catalase content<sup>6</sup>. In this experiment, 0.5 ml of washed human red cells were incubated at 37.0°C with 0.2 ml of 1.9% potassium chlorate and 0.8 ml of *M*/15 phosphate buffer of pH 7.0. At different times, the red cells were washed with physiological saline 3 times. In this manner red cells were gained with about 50% (60 min), 40% (90 min) and 30% (120 min) catalase content.

To 0.5 ml of treated and washed red cells, a like amount of citrate plasma and 1.0 ml of 1.0% potassium cyanide and, after 5 min, 1.0 ml of 1.0% hydrogen peroxide were added. Hydrogen peroxide was dissolved in *M*/15 phosphate buffer of pH 7.0. The experiment was carried out at 37.0°C. Samples taken after 30 min were stained by Wolfer's staining technique with methyl violet<sup>7</sup>.

This experiment has shown that if red cells are incubated with potassium chlorate 60 min before the cyanide-peroxide test, Heinz bodies still appear, as a rule, in the majority of the red cells. If the treatment is finished in the 90th min, Heinz bodies appear only in few cells.

In a previous paper, an experiment was described which has suggested that the role of catalase inhibitor cannot be limited to the catalase inhibition, but it plays a direct role in the Heinz body formation<sup>2</sup>. The present study has given evidence that the necessary condition for Heinz body formation, besides the inhibitor and peroxide, is the sufficient quantity of catalase. For these reasons, it appears plausible that the Heinz bodies are produced as a result of the interaction of catalase, inhibitor and hydrogen peroxide. In this process, not only peroxide is used as a substrate but also the inhibitor. The former is used by the catalase function of the catalase, the latter by the peroxidase function of the catalase. In this way, both mechanisms act together and both are responsible for Heinz body formation, and when the catalase oxidizes its inhibitor peroxidatically, it does the same with certain cell components.

L. MAGOS

*State Institute of Occupational Medicine, Departement of Industrial Hygiene, Budapest, October 1, 1957.*

#### Zusammenfassung

Bei der Behandlung von Erythrozyten mit Kaliumchlorat sinkt mit der Behandlungsdauer die Fähigkeit zur Bildung von Heinzkörperchen. Dies weist darauf hin, dass die Katalase ebenso sehr Vorbedingung der Heinzkörperchenbildung ist wie Katalase-Inhibitor und Peroxid.

<sup>6</sup> L. MAGOS, in this issue.

<sup>7</sup> Planches d'Hématologie, Sandoz (Basel 1950).

### Catalase Inhibition by Potassium Chlorate in Red Cells

Catalase inhibition by potassium chlorate is irreversible<sup>1</sup>. On this basis it is evident that the catalase activity of red cells after washing with physiological saline, remains as low as at the end of the potassium chlorate treatment.

<sup>1</sup> H. BLASCHKO, Biochem. J. 29, 2303 (1935).

<sup>1</sup> S. BRENNER and A. C. ALLISON, Exper. 9, 381 (1953).

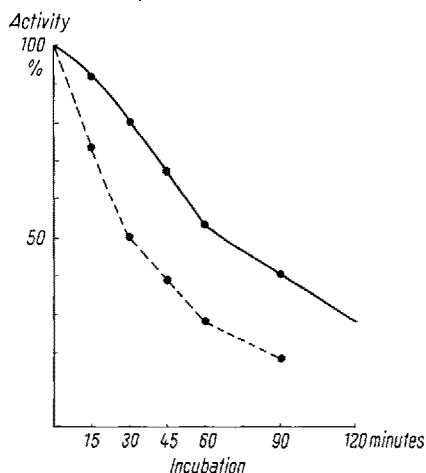
<sup>2</sup> L. MAGOS, Exper. 12, 264 (1956).

<sup>3</sup> D. KEILIN and E. F. HARTREE, Proc. roy. Soc. [B] 119, 141 (1936).

<sup>4</sup> L. MAGOS, A. M. A. Arch. Industr. Health. 15, 148 (1957).

<sup>5</sup> H. BLASCHKO, Biochem. J. 29, 2303 (1935).

In the present study, 0.5 ml washed human red cells were incubated at 37.0°C with 0.2 ml of 1.9% potassium chlorate and 0.8 ml of *M*/15 phosphate buffer of different pH (6.2, 7.0 and 7.8). At different times, red cells were



Catalase activity of potassium chlorate poisoned red cells (— pH 7.0 or 7.8, --- pH 6.2).

washed with physiological saline 3 times and their catalase activity was estimated by the method of RICHARDSON *et al.*<sup>2</sup>. At the end of the incubation, apart from a light haemolysis at pH 7.0 and 7.8, or an increased haemolysis at pH 6.2, there were no signs of erythrocyte destruction either in the form of Heinz bodies or in other microscopical forms. The data presented in the Figure indicate that the pH influences the decrease of catalase activity caused by potassium chlorate.

In addition, information was gained about the possibilities of obtaining red cells with different catalase content.

L. MAGOS

State Institute of Occupational Medicine, Department of Industrial Hygiene, Budapest, October 1, 1957.

#### Zusammenfassung

Die Geschwindigkeit der Katalaseaktivitätsverminderung bei mit Kaliumchlorat vergifteten Erythrozyten wird vom pH beeinflusst. Die vorgeschlagene Methode ist zur Gewinnung von Erythrozyten niedriger Katalaseaktivität geeignet.

<sup>2</sup> M. RICHARDSON, J. F. HUDDLESON, and R. BETHEA, Arch. Biochem. Biophys. 42, 114 (1953).

### Die regionale Verteilung der Katalase-Aktivität im Schwanz von hungrigen und gefütterten Xenopuslarven<sup>1</sup>

Im Anschluss an Untersuchungen über die Kathepsin-Aktivität im Schwanz von Xenopuslarven<sup>2</sup> erschien es

<sup>1</sup> Ausgeführt mit Unterstützung der Eidgenössischen Kommission zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung aus Arbeitsbeschaffungsmitteln des Bundes. Herrn Prof. F. E. LEHMANN möchte ich für seine wertvollen Ratschläge und sein reges Interesse an dieser Arbeit herzlich danken. Herrn Dr. R. WEBER danke ich für Hilfe bei der Abfassung des Manuskriptes.

<sup>2</sup> P. K. JENSEN, F. E. LEHMANN und R. WEBER, Helv. physiol. Acta 14, 188 (1956). – E. M. DEUCHAR, R. WEBER und F. E. LEHMANN, Helv. physiol. Acta 15, 212 (1957). – R. WEBER, Exper. 13, 153 (1957); Rev. suisse Zool. 64, 326 (1957). – G. BENZ, Rev. suisse Zool. 64, 337 (1957).

gegeben, weitere intrazelluläre Enzyme an diesem Objekt zu untersuchen, besonders im Hinblick auf ihre mögliche Beeinflussbarkeit durch histostatische Substanzen (siehe<sup>3</sup>). Die Tatsache, dass die Katalase-Aktivität im neoplastischen Gewebe sehr stark erniedrigt ist<sup>4</sup>, lässt vermuten, dass verschiedene physiologische Zustände der Gewebe durch unterschiedliche Katalase-Aktivität gekennzeichnet sind. Vor einiger Zeit ist von FEINSTEIN<sup>5</sup> eine neue titrimetrische Methode zur Katalasebestimmung mit Natriumperborat als Substrat beschrieben worden, die es ermöglicht, rasch und gut reproduzierbar Serienbestimmungen durchzuführen<sup>6</sup>. Wie die vorliegenden Versuche zeigen, lässt sich diese Methode in Mikroansätzen für Bestimmungen an kleinsten Gewebemengen anwenden. Um einen ersten Hinweis auf die physiologische Bedeutung dieses Enzyms im Xenopuschwanz zu gewinnen, wurde die regionale Verteilung der Katalase-Aktivität im Schwanz von hungrigen und gefütterten Xenopuslarven bestimmt.

**Methode.** 35 Tage alte Xenopuslarven von 28 bis 31 mm Totallänge wurden in destilliertem Wasser bei 18° im Thermostaten gehalten (je 4 Tiere in 150 ml). Die eine Hälfte der Tiere erhielt jeden Tag reichlich Futter, die andere hungerte vom Beginn des Versuchs an (Tag 0). An den Messtagen wurden je 4 «Hunger»- und «Futter»-Tiere narkotisiert (in MS 222 Sandoz 1:7000) und die ganzen Schwänze auf der Höhe des Afters amputiert. Diese wurden nach Ausblutung (Ausschaltung der Erythrozyten-Katalase) von der Schwanzspitze aus in 3 Stücke geteilt: Schwanzspitze *S* (8 mm), Mittelstück *M* (6 mm), Schwanzbasis *B* (Rest). Die einander entsprechenden Stücke wurden auf Filterpapier äusserlich getrocknet, zusammen gewogen (Frischgewicht) und im *m*/15-Phosphatpuffer pH 7.0 bei 0° homogenisiert. Die Konzentration der Homogenate variierte von 1:20 bis 1:120. Die Bestimmung der Katalase erfolgte nach der Methode von FEINSTEIN<sup>5</sup> mit folgenden Ansätzen: 92 mm<sup>3</sup> 1,5% NaBO<sub>3</sub>, 21 mm<sup>3</sup> *m*/15 Phosphatpuffer, 21 mm<sup>3</sup> Homogenat, 130 mm<sup>3</sup> 2-*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zum Unterbrechen. pH der Reaktion 7.0, 5 min Inkubation bei 37°. Rücktitration des unverbrauchten Perborates mit 0,01-*n* KMnO<sub>4</sub>. Die Katalase-Aktivität wird in mÄq verbrauchtes Perborat pro mg Frischgewicht angegeben.

**Ergebnisse.** Die Figuren *a* und *b* zeigen den Verlauf der Aktivitätskurven. Auffallend ist zunächst der starke Aktivitätsgradient für Katalase innerhalb des Schwanzes. Ein analoger Gradient ist von BENZ für das Kathepsin festgestellt worden<sup>7</sup>. Auch für die Katalase ist die Schwanzspitze der Ort der grössten (potentiellen) Enzymaktivität. Dies könnte wohl mit der grösseren physiologischen Aktivität der Spitze (undulierende Bewegung) und der im Verhältnis zur Schwanzbasis grösseren Epithelfläche in Zusammenhang stehen. Bei den «Futter»-Tieren (Fig. *a*) zeigt sich im Verlauf des Versuchs ein starkes Anwachsen der Aktivität in der Spitze und im Mittelstück, während sie in der Basis unverändert bleibt. Gegen Ende des Versuchs (vom 18. Tag an) scheint ein Maximalwert erreicht worden zu sein. Zu diesem Zeitpunkt (im Alter von 62 Tagen am 27. Versuchstag) standen die Tiere kurz vor Beginn der Metamorphose. Bei den «Hunger»-Tieren (Fig. *b*) fällt da-

<sup>3</sup> P. K. JENSEN, F. E. LEHMANN und R. WEBER, Helv. physiol. Acta 14, 188 (1956).

<sup>4</sup> J. P. GREENSTEIN, Biochemistry of Cancer (Academic Press Inc., New York 1954).

<sup>5</sup> R. N. FEINSTEIN, J. biol. Chem. 180, 1197 (1949).

<sup>6</sup> Ich möchte Herrn Prof. H. AEBI für den Hinweis auf diese Methode bestens danken. Siehe hierzu: H. AEBI, E. FREI, R. KNAB und P. SIEGENTHALER, Helv. physiol. Acta 15, 150 (1957).