

71. Wasserstoff-Donor-Konkurrenz bei peroxydatischen Umsetzungen der Leberkatalase

von H. Aebi und A. Hassan

(8. I. 60)

Die peroxydase-artige Aktivität der Katalase lässt sich im Modell-System von KEILIN & HARTREE¹⁾ dann gut verfolgen, wenn als H-Donor ¹⁴C-markierte Substrate verwendet werden. Auf diese Weise lässt sich z. B. die Oxydation von Ameisensäure an Hand der ¹⁴CO₂-Bildung im WARBURG-Ansatz direkt verfolgen (FREI & AEBI²⁾). Dabei kann durch Variation des Mengenverhältnisses zwischen Notatin und Katalase nach Belieben eine Begrenzung des Gesamt-Umsatzes a) durch H₂O₂-Bildung (Glucoseoxydation durch Notatin) oder b) durch H₂O₂-Verbrauch (katalatische oder peroxydatische Umsetzung durch Katalase) erreicht werden. Beim Vorliegen eines Notatinüberschusses bzw. bei relativ grossem H₂O₂-Angebot wird die Oxydationsgeschwindigkeit des H-Donors durch die im Ansatz vorhandene Katalase bestimmt. Werden beide Enzymkonzentrationen nicht allzu hoch gewählt, so wird ein beträchtlicher Anteil des intermediär gebildeten H₂O₂ zur peroxydatischen Umsetzung eines im Überschuss angebotenen H-Donors (z. B. Formiat) verwendet.

In der lebenden Zelle kommen eine ganze Reihe möglicher H-Donoren vor. Es ist daher anzunehmen, dass sie alle miteinander um den Katalase-H₂O₂-Komplex konkurrieren. Als Beitrag zur Klärung dieser Frage sind hier unter Benützung des Modell-Systems (Katalase + Notatin + Glucose) Versuche mit einigen H-Donoren von biologischem Interesse ausgeführt worden. Die folgenden Umsetzungen wurden mit Hilfe ¹⁴C-markierter Substanzen untersucht:

1. Ameisensäure → CO₂ (erfasst als Carbonat);
2. Methanol → Formaldehyd (erfasst als Semicarbazon, bzw. Dimedonat);
3. Äthanol → Acetaldehyd (erfasst als Dinitrophenylhydrazon).

Wird im Konkurrenzversuch abwechselungsweise nur einer der beiden zugesetzten H-Donoren mit ¹⁴C markiert, dann lässt sich ohne weiteres entscheiden, in welchem Ausmass die einzelnen Substrate umgesetzt worden sind. Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, bestehen zwischen den 3 untersuchten Substraten hinsichtlich Halbsättigungskonzentration ($\sim Km$) und maximaler Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) beträchtliche Unterschiede. Bei der enzymkinetischen Behandlung der hier beobachteten Konkurrenzphänomene ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Grössen für Km und V_{max} zunächst nur um relative Vergleichswerte handelt. Dieses Vorgehen hat zudem zur Voraussetzung, dass eine Betrachtung des Katalase-H₂O₂-Komplexes als «Enzym» und der H-Donoren als «Substrat» statthaft ist. Trifft dies zu, dann ist – wenigstens in formaler Hinsicht – die Möglichkeit zur Anwendung der 2-Substrat-

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

²⁾ EVA FREI & H. AEBI, Helv. 47, 241 (1958).

Gleichung gegeben, wie sie von THORN³⁾ und von WHITTAKER⁴⁾ zur Behandlung analoger Probleme formuliert worden ist.

Wenn ein Ferment gleichzeitig auf 2 Substrate einwirkt, dann hängt das Ausmass, in welchem die beiden Komponenten umgesetzt werden u. a. von folgenden Faktoren ab:

1. vom gegenseitigen Mengenverhältnis der Substrate (S_1/S_2);
2. vom Verhältnis der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten ($V \max_2/V \max_1$);
3. vom Quotienten aus den (reziproken) Affinitäten, welche die beiden Substrate gegenüber dem Enzym zeigen (Km_1/Km_2).

Ausgehend von der Annahme, dass das eine Substrat gegenüber dem anderen als kompetitiver Inhibitor wirkt³⁾⁵⁾, ergeben sich für den stationären Zustand folgende Gleichungen: Die totale Umsatzgeschwindigkeit (v_t), die Summe beider Teilreaktionen ($v_1 + v_2$) beträgt:

$$v_1 = \frac{V \max_1}{1 + \frac{Km_1}{S_1} \left(1 + \frac{S_2}{Km_2}\right)} \quad (1) \quad v_2 = \frac{V \max_2}{1 + \frac{Km_2}{S_2} \left(1 + \frac{S_1}{Km_1}\right)} \quad (2)$$

$$v_t = v_1 + v_2 = \frac{V \max_1 \frac{S_1}{Km_1} + V \max_2 \frac{S_2}{Km_2}}{1 + \frac{S_1}{Km_1} + \frac{S_2}{Km_2}}. \quad (3)$$

Ohne dass weitere Annahmen gemacht werden müssen, lässt sich diese Formel durch Bildung von Quotienten vereinfachen:

Es seien $x = V \max_2/V \max_1$ (= Quotient der theoretischen Maximalgeschwindigkeiten)

und $y = Km_1/Km_2$ (= Quotient der scheinbaren MICHAELIS-Konstanten).

Ersetzt man in Gleichung 3 $V \max_2$ durch $x \cdot V \max_1$ und Km_2 durch Km_1/y , dann ergibt sich:

$$v_t = \frac{V \max_1 (S_1 + x y S_2)}{Km_1 + S_1 + y S_2}. \quad (4)$$

Einführung der Quotienten in Gleichung 2 ergibt Gleichung 5. Division der Gleichung 5 durch Gleichung 4 führt zu Gleichung 6. Analoge Formeln lassen sich für v_1 herleiten.

$$v_2 = \frac{V \max_2 (y S_2)}{Km_1 + S_1 + y S_2} \quad (5) \quad \frac{v_2}{v_1 + v_2} = \frac{1}{1 + \frac{S_1}{x y S_2}} \quad (6)$$

Wie sich aus Formel 4 unschwer ersehen lässt, resultiert – falls $x = 1$ und $y = 1$ gesetzt werden – die gewöhnliche Formel für den allgemeinen Fall. Zeigen die beiden Substrate S_1 und S_2 verschiedene maximale Umsetzungsgeschwindigkeiten ($V \max_1 > V \max_2$), jedoch dieselben Affinitätsverhältnisse ($Km_1 = Km_2$), dann entfällt y . In diesem Falle sind v_t , sowie auch v_1 und v_2 lineare Funktionen von S_1 bzw. S_2 . Sind dagegen die MICHAELIS-Konstanten verschieden, ($Km_1 < Km_2$), dann weichen diese Funktionen umso stärker von der Linearität ab, je mehr sich $y = Km_1/Km_2$ von 1 entfernt (vgl. Fig. 7).

⁵⁾ M. DIXON & E. C. WEBB, *Enzymes*, S. 92, Acad. Press, New York 1958.

³⁾ M. B. THORN, *Nature (London)* 164, 27 (1949).

⁴⁾ V. P. WHITTAKER & D. H. ADAMS, *Nature (London)* 164, 315 (1949).

THORN³⁾ hat auf Grund des Kurvenverlaufes von v_t f $[S_2/(S_1 + S_2)]$ den Quotienten aus den MICHAELIS-Konstanten auf planimetrischem Wege näherungsweise ermittelt. Dieselbe Frage haben WHITTAKER & ADAMS⁴⁾ dadurch gelöst, dass sie ausschliesslich mit einem äquimolaren Substratgemisch ($S_1 = S_2$) bei grösstmöglicher Sättigung des Fermentes mit Substrat gearbeitet haben. Während in beiden Fällen das Hauptaugenmerk aus methodischen Gründen auf v_t gerichtet worden ist, ergibt sich hier die Möglichkeit einer gleichzeitigen Bestimmung von v_t und v_1 (bzw. v_2) mit Hilfe zweier unabhängiger Methoden; v_t durch Messung des O_2 -Mehrverbrauches; v_1 (v_2) durch Messung der ^{14}C -Aktivität. Unter dieser Voraussetzung bestehen zur Untersuchung der Substratkonkurrenz u. a. folgende experimentelle Möglichkeiten:

1. Bestimmung von K_m und V_{max} für jedes Substrat (S_1 , S_2) bzw. H-Donor allein und planimetrische Auswertung nach LINEWEAVER-BURK.
2. Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit von S_1 bei konstanter Konzentration an S_1 und Variation von S_2 (und umgekehrt).
3. Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit von S_1 (bzw. S_2) bei Konstanz der Summe $S_1 + S_2$ und Variation des Verhältnisses $S_1:S_2$.

Experimenteller Teil

1. **Methodik.** – Bei den *Versuchen mit ^{14}C -Formiat* hatten die WARBURG-Ansätze (sofern nicht anders vermerkt) folgende Zusammensetzung: Hauptraum 0,4 ml 0,2 M Na-Phosphatpuffer pH = 6,0, 0,2 ml 1,5-proz. Glucoselösung (16,7 μ Mol Glucose), 0,4 ml Katalase-Lösung, 0,2 ml 0,2 M ^{14}C -Formiatlösung (40 μ Mol HCO_2^-); im zentralen Einsatz 0,2 ml 20-proz. NaOH; im Seitenarm 0,4 ml 0,2-proz. Notatinlösung (0,8 mg/Ansatz). Gesamtflüssigkeitsvolumen 2,5 ml; Gasphase Luft; Versuchstemperatur 27°. Nach einem Temperatúrausgleich von 10 Min. wurde das im Seitenarm befindliche Notatin (= Glucoseoxydase) zugekippt und der O_2 -Verbrauch alle 15 Min. abgelesen. Sofort nach Versuchsende (30–150 Min.) wurden die Ansätze aus dem Thermostaten genommen, in Eis gekühlt, und die im zentralen Einsatz befindliche Lauge in ein ERLÉNMEYER-Kölbchen (50 ml) übergeführt. Das darin enthaltene Carbonat wurde wie beschrieben (AEBI *et al.*⁶⁾) zu $BaCO_3$ -Plättchen verarbeitet und deren ^{14}C -Aktivität mit einem MYLAR-Endfensterzählrohr (0,8 mg/cm²) gemessen. Alle angegebenen Werte sind bezüglich Nulleffekt, Standard und Selbstabsorption korrigiert. Das ^{14}C -Formiat (RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham) wurde auf eine spezifische Aktivität von $1,0 \times 10^6$ counts/min/mMol verdünnt. Alle Werte stellen Mittel aus Doppelanalysen dar und sind durch Subtraktion eines Blindwertes (Ansätze ohne Notatin) korrigiert. Herkunft der Enzympräparate: a) krist. Katalase aus Rinderleber («BOEHRINGER»), b) Notatin, TAKAMINE DEE O («WORTHINGTON»); bezüglich Präparation und Aktivität siehe 2).

Die *Methanol-Versuche* wurden mit Ansätzen derselben Zusammensetzung ausgeführt, ausser dass als Substrat (H-Donor) 0,2 ml einer 5-(vol)proz. Lösung von ^{14}C -Methanol (250 μ Mol) zugesetzt wurden. Spezifische Aktivität $1,25 \times 10^6$ counts/min/mMol. Zum Abfangen des Formaldehyds wurden ferner 0,4 ml einer 0,05 M Semicarbazidlösung (pH \sim 6) hinzugefügt. Zur Gewinnung des während des Versuches gebildeten Semicarbazons wurden die Ansätze nach Versuchsende aus dem Hauptraum quantitativ in ein ERLÉNMEYER-Kölbchen übergeführt und mit einigen Tropfen 1 N HCl auf pH \sim 4 angesäuert. Es wurden nun 2 ml einer 1-prom. Paraformaldehydlösung als Träger sowie 20 ml einer 0,4-proz. Dimedonlösung zugegeben und die Ansätze 24 Std. bei +2° stehengelassen. Das ausgefallene Dimedonat wurde durch Abfiltrieren gewonnen und in 10 ml Äthanol gelöst. Nach Zugabe von 70 ml H_2O wurden die Ansätze nochmals 12 Std. im Kühlraum belassen. Das in feinen Nadeln auskristallisierte Dimedonat wurde sodann nach der Filtrationsmethode zu messfertigen Plättchen (d = 1,8 cm) verarbeitet.

Versuche mit Äthylalkohol: Als Substrat wurden 0,2 ml einer 2,5-(vol)proz. Lösung von Äthanol- $[1-^{14}C]$ zugesetzt (86,5 μ Mol). Spezifische Aktivität $1,5 \times 10^6$ counts/min/mMol. Zwecks

⁶⁾ H. AEBI, EVA FREI, R. KNAB & P. SIEGENTHALER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 15, 150 (1957).

Gewinnung des Acetaldehyds wurden die Ansätze in ERLLENMEYER-Kölbchen übergeführt, wobei Äthylalkohol als Spülflüssigkeit diente. Es wurden sodann 3 ml einer 1-prom. 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung sowie 25 mg Hydrazon des Acetaldehyds als Träger zugefügt. Nach 1 Stunde wurde das Flüssigkeitsvolumen durch H_2O -Zusatz auf 40 ml gebracht. Nach 12 Std. Stehenlassen bei $+2^\circ$ wurde das auskristallisierte Hydrazon in oben beschriebener Weise zu Plättchen verarbeitet.

2. **Wirkung verschiedener Versuchsfaktoren.** – Da das Verhalten des Standardansatzes beschrieben ist²⁾, sei hier lediglich auf folgende Punkte eingegangen: Die *Notatin*-konzentration wurde mit 0,3⁰/₁₀₀ eher niedrig gewählt, um während der ganzen Versuchsdauer von (meist) 150 Min. ein geringes, dafür aber gleichbleibendes H_2O_2 -Angebot zu gewährleisten. Der im Leerversuch (ohne H-Donor) resultierende O_2 -Verbrauch von 95–110 mm³ O_2 /Std. entspricht

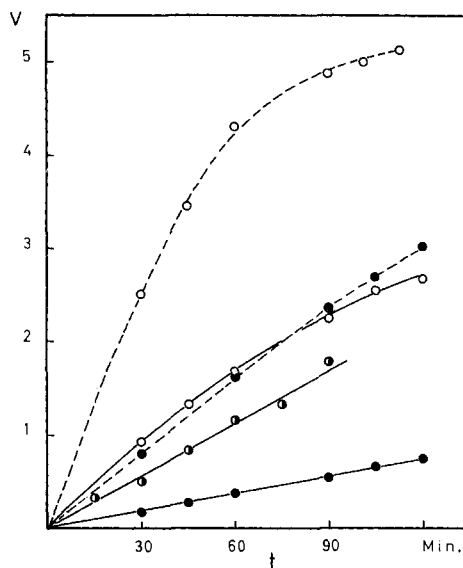


Fig. 1. Zeit-Umsatz-Kurven für die gekoppelte Oxydation von Formiat (●), Methanol (○) und Äthanol (◐)

a) ——— 20 γ Katalase/Ansatz; b) - - - - 80 γ Katalase/Ansatz; Ordinate: Substratumsatz in μ Mol/Ansatz; Abszisse: Zeit in Minuten.

einer H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit von 9–10 μ Mol/Std./Ansatz. Die meist gewählte *Katalasemenge* von 20 γ /Ansatz fällt in den Konzentrationsbereich, in welchem der Gesamtumsatz durch die Katalase-Aktivität begrenzt wird (Bestehen eines Isotopie-Effektes!; vgl. ²⁾, Fig. 4). Wird das 4fache an Katalase zugesetzt, dann resultiert im Falle von Formiat und Methanol eine Steigerung der Oxydationsrate um das 3–4fache, entsprechend dem beschriebenen Funktionsverlauf (vgl. ²⁾, Fig. 3). Aus Fig. 1 geht hervor, dass bei niedriger Katalasekonzentration (20 γ /Ansatz), je nach Art des H-Donors 0,4–1,8 μ Mol und bei der 4fachen Katalasekonzentration 1,5–4,5 μ Mol/Std. Substrat oxydiert werden. Der Anteil an peroxydatisch umgesetztem H_2O_2 ist somit bei einer mittleren Bildungsrate von 9–10 μ Mol H_2O_2 /Std. je nach Bedingungen auf 5–50% zu veranschlagen. Wie unten gezeigt wird, lässt sich dieser Prozentsatz durch Erhöhung der H-Donor-Konzentration noch weiter steigern. Das restliche H_2O_2 wird, indem dieses selbst als H-Donor wirkt, katalatisch zu H_2O und O_2 zerlegt.

Die *Zeit-Umsatz-Kurve* zeigt unter den hier gewählten Bedingungen für die getesteten H-Donoren einen verschiedenen Verlauf. Wie aus Fig. 1 ersichtlich, besteht im Falle von Formiat und Äthanol direkte Proportionalität zwischen Versuchsdauer und Umsatz. Bei der Methanol-oxydation ist dagegen – wenigstens bei hoher Substratkonzentration – schon nach 30–60 Min.

ein merklicher Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten. Mehrverbrauch an O_2 und Ausmass der Substratoxydation entsprechen bei allen getesteten H-Donoren dem stöchiometrischen Verhältnis, indem pro μMol umgesetztes Formiat, Methanol oder Äthanol ca. $11\text{ mm}^3 O_2$ verbraucht werden. Eine starke *Pufferung der Ansätze* durch $32\text{ }\mu\text{Mol/ml}$ Phosphat ($\text{pH} = 6,0$) musste vorgenommen werden, weil bei der Glucoseoxydation *via* Lacton Gluconsäure gebildet wird und diese lediglich bei der Formiatoxydation durch freiwerdende Basenäquivalente teilweise kompensiert wird. pH-Bestimmungen im Standard-Ansatz zu Beginn und am Ende des Versuches zeigen Verschiebungen von 0,2–0,3 pH-Einheiten, was im Hinblick auf die bestehende pH-Abhängigkeit (vgl. ²⁾, Tab. 3) toleriert werden darf. Demgegenüber sind bei Verwendung verschiedener Puffersysteme, wie Phosphat, Citrat und Acetat im Bereich von pH 6,0–5,0 Aktivitätsunterschiede zu beobachten. Auf diese Effektorenwirkung der Puffer-Anionen und anderer Stoffe wird an anderer Stelle eingegangen.

3. **Einfluss der H-Donor-Konzentration.** – Misst man die Oxydationsrate in Abhängigkeit der H-Donor-Konzentration, dann ergeben sich typische Sättigungskurven (Fig. 2). Im Falle von Formiat wird ein Grenzwert bereits bei relativ niedriger Konzentration erreicht, entsprechend einer Halbsättigungskonzentration ($\sim Km$) von 4–6 $\mu\text{Mol/ml}$. Mit verschiedener Enzymmenge ausgeführte Versuche zeigen eine gewisse Abhängigkeit von der Katalasekonzentration. Während bei der hier meist verwendeten Enzymmenge (ca. $20\text{ }\gamma$ Katalase/Ansatz) im Mittel ein Wert von $0,005\text{ M}$ resultiert, ergeben sich bei höheren Katalasekonzentrationen niedrigere Werte, welche der in anderen Versuchsanordnungen bestimmten Halbsättigungskonzentration von ca. $0,002\text{ M}$ näherkommen (vgl. ⁶⁾ und ⁷⁾). Bei Gegenwart eines Formiatüberschusses

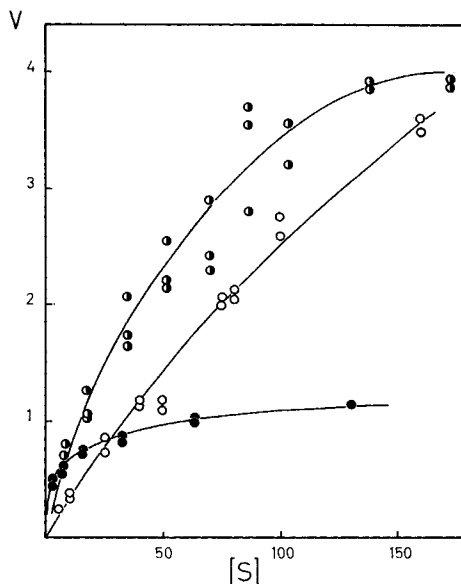


Fig. 2 Oxydation verschiedener H-Donoren in Abhängigkeit von der Substratkonzentration:
Formiat (●), Methanol (○) und Äthanol (◐)

Ordinate: Substratumsatz in $\mu\text{Mol/Ansatz}$ zu $20\text{ }\gamma$ Katalase/Std.

Abszisse: H-Donor-Konzentration in $\mu\text{Mol/ml}$.

($0,064\text{ M}$) ergibt sich unter Standardbedingungen eine Oxydationsrate ($\sim V_{\text{max}}$) von durchschnittlich $1,2\text{ }\mu\text{Mol/Std./Ansatz}$ zu $20\text{ }\gamma$ Katalase. Wird mehr Katalase zugesetzt, dann besteht innerhalb eines Bereiches von $20\text{--}100\text{ }\gamma$ Katalase/Ansatz annähernde Proportionalität zwischen Oxydationsrate und Enzymmenge.

⁷⁾ H. AEBI & EVA FREI, Helv. 41, 361 (1958).

Die für die beiden Alkohole ermittelten pS-Kurven zeigen hinsichtlich Halbsättigungskonzentration und Maximalgeschwindigkeit einen ganz anderen Verlauf (vgl. Fig. 2). So ist vor allem beim Methanol fast im gesamten Versuchsbereich eine Abhängigkeit der Oxydationsrate von der Alkoholkonzentration zu beobachten. Da bei derart hohen Alkoholkonzentrationen Enzymschädigungen möglich sind (vgl. Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurven in Fig. 1!), wurden die nach 30 Min. bestimmten Umsätze auf 1 Std. extrapoliert. Wie aus Fig. 2 weiter ersichtlich,

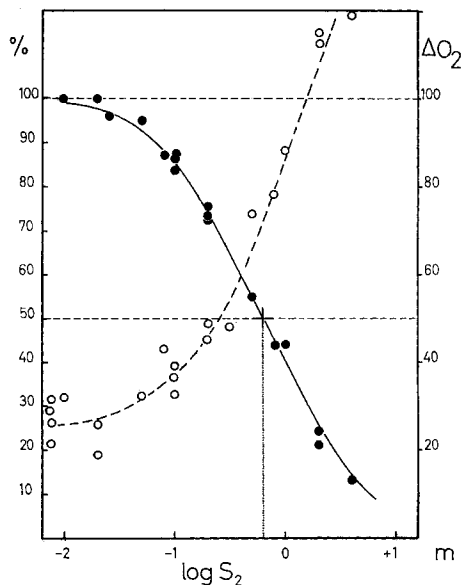


Fig. 3. Hemmung der Oxydation von ¹⁴C-Formiat durch Methanol

Versuchsbedingungen: 20 γ Katalase/Ansatz, 0,016 M Formiat, Versuchsdauer 150 Min. Ordinate links: —●— prozentuale ¹⁴CO₂-Bildung, Ansatz ohne Methanol = 100% (ca. 2,5 μMol oxyd. ¹⁴C-Formiat/Ansatz). Ordinate rechts: —○— O₂-Mehrverbrauch gegenüber Kontrolle ohne H-Donor, in mm³ O₂/Ansatz. Abszisse: Methanolkonzentration in mMol/ml.

zeigt Methanol von den getesteten H-Donoren die höchste Halbsättigungskonzentration. Sie ist bei der Auswertung nach LINEWEAVER-BURK auf ca. 0,12 M geschätzt worden und somit im Vergleich zu derjenigen von Formiat etwa 25mal grösser. Mit derselben Methode ergibt sich bei Extrapolation nach $[S] \rightarrow \infty$ eine Oxydationsrate von $V_{\max} \sim 5 \mu\text{Mol/Std./Ansatz}$ à 20 γ Katalase, während die bei 0,15–0,2 M experimentell ermittelten Werte 3–4 μMol/Std. betragen. Auch im Falle von Methanol besteht bis zur 5fachen Katalasemenge näherungsweise Proportionalität zwischen Umsatz und Fermentkonzentration. In analogen Experimenten mit Äthanol ist die Halbsättigungskonzentration zu 0,046 M und die Oxydationsrate bei 0,14–0,18 M Äthanol zu 3,9 μMol/Std./Ansatz à 20 γ Katalase bestimmt worden. Die planimetrische Extrapolation auf $[S] \rightarrow \infty$ ergibt einen Wert für V_{\max} von 4,5 μMol/Std.

4. Hemmung der Oxydation von ¹⁴C-Formiat durch Methanol und Äthanol. – *Versuche mit Methanol:* Setzt man in einer Reihe von Standard-Ansätzen mit konstantem ¹⁴C-Formiat-Gehalt steigende Mengen von inertem Methanol zu, kommt es zu einer graduellen Abnahme der Formiatoxydation. Wie aus Fig. 3 zu entnehmen ist, zeigt die ¹⁴CO₂-Ausbeute in Abhängigkeit vom Logarithmus der Methanolkonzentration einen S-förmigen Kurvenverlauf. In formaler Hinsicht verhält sich das inerte Methanol gegenüber ¹⁴C-Formiat als Inhibitor. Im abgebildeten Fall wird die Oxydation von 0,016 M Formiat durch 0,66 M Methanol auf die Hälfte reduziert; beim I_{50} -Wert besteht somit ein molares Verhältnis zwischen Methanol und Formiat von ca. 40:1. Wie aus Fig. 3 weiter hervorgeht, ist mit steigender Methanolkonzentration neben einer Abnahme der Formiatoxydation auch eine Erhöhung des O₂-Verbrauches festzustellen.

Da die zugesetzten Methanolmengen auf die Aktivität des Notatinsystems an sich ohne Einfluss sind, darf dieser O_2 -Mehrverbrauch als Mass für den Gesamtumsatz beider H-Donoren genommen werden. Da bei der Oxydation von Formiat und Methanol pro μMol je $0,5 \mu\text{Mol } O_2$ ($11,2 \text{ mm}^3$) verbraucht wird, bringt der mit zunehmender Methanolkonzentration nach rechts ansteigende Kurvenverlauf zum Ausdruck, dass bei Substratsättigung Methanol rascher oxydiert wird als Formiat. Ohne Methanolzusatz werden unter den hier gewählten Bedingungen im Mittel $2,5 \mu\text{Mol}$ Formiat oxydiert, was dem gemessenen O_2 -Mehrverbrauch (im Vergleich zum Kontrollansatz ohne H-Donor) von $28 \text{ mm}^3 O_2$ entspricht. Demgegenüber beträgt der Mehrverbrauch an O_2 beim Vorliegen eines Methanolüberschusses ca. 100 mm^3 , was einer (maximalen) Oxydationsrate von ca. $9 \mu\text{Mol}$ Methanol entspricht.

Die Methanolkonzentration, welche zur Erzielung einer 50-proz. Hemmung erforderlich ist, hängt vom Substratangebot, d. h. von der Konzentration an ^{14}C -Formiat ab. Die Konzentrationsabhängigkeit geht daraus hervor, dass z. B. bei $1,6 \mu\text{Mol/ml}$ ^{14}C -Formiat eine Halbwertskonzen-

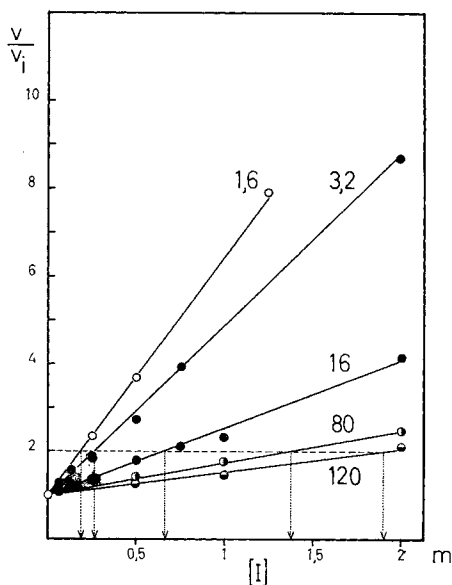


Fig. 4. Hemmung der Formiatoxydation durch Methanol bei verschiedenen Formiatkonzentrationen Ordinate: Reziproke Umsatzgeschwindigkeit ($v =$ Geschwindigkeit ohne Inhibitor; $v_i =$ Geschwindigkeit bei Inhibitorzusatz). Abszisse: Methanolkonzentration in mMol/ml. Die bei den einzelnen Geraden angeführten Zahlenwerte geben die ^{14}C -Formiat-Konzentration in $\mu\text{Mol/ml}$ an. Versuchsbedingungen wie bei den Versuchen von Fig. 3.

tration bereits bei $0,19 \text{ m}$ Methanol erreicht wird, wogegen dies bei Gegenwart eines Formiatüberschusses ($0,08 \text{ m}$) erst bei $1,37 \text{ m}$ Methanol der Fall ist (vgl. Tab. 2). Die Konkurrenznatur dieses Hemmeffektes lässt sich aus der in Fig. 4 gewählten Darstellung ersehen, indem die mit verschiedenen ^{14}C -Formiat-Mengen ausgeführten Experimente verschieden stark ansteigenden Geraden entsprechen. K_1 bzw. K_{m_2} lässt sich aus der Steigung ($\tan \alpha$) dieser Geraden berechnen, indem man die aus Fig. 4 abgelesenen Werte für $\tan \alpha$ in die entsprechende Geradengleichung einsetzt (vgl. ⁸⁾). Legt man der Berechnung, die mit $3,2$ und 16 mM Formiat erzielten Versuchsergebnisse zugrunde, erhält man $K_1 = 0,15 \text{ m}$ (Methanol). Extrapolation der für verschiedene Formiatkonzentrationen $[S]$ gemessenen I_{50} -Werte nach $[S] \rightarrow 0$ führt zum gleichen Ergebnis (vgl. Tab. 2).

⁸⁾ K. J. LAIDLER, The chemical kinetics of Enzyme action, Clarendon Press, Oxford 1958, S. 81–83.

Versuche mit Äthanol: Hemmt man die Oxydation von ^{14}C -Formiat (0,016 M) auf analoge Weise durch steigende Mengen von Äthanol, kommt es bereits bei 0,16 M Äthanol zur Erniedrigung der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion auf die Hälfte. Die gleichzeitig erfolgende Oxydation des inerten Äthylalkohols gibt sich durch eine entsprechende Erhöhung des O_2 -Verbrauches zu erkennen. Wie das in Tab. 1 gegebene Beispiel zeigt, übertrifft der auf die Äthanoloxydation zurück-

Tabelle 1. Oxydation von ^{14}C -Formiat in Abhängigkeit von der Äthanol-Konzentration
Versuchsbedingungen gemäss Angaben in Fig. 3

Äthanolkonzentration = $[\text{S}_2]$ bzw. $[\text{I}]$	Oxydation von ^{14}C -Formiat (= S_1)		O_2 -Verbrauch ($\text{mm}^3 \text{O}_2/\text{Ansatz}$)		Oxydation von Äthanol (= S_2) berechnet auf Grund des O_2 -Mehrverbrauches	
	$\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$	Kontrolle = 100%	total	abzüglich Leerwert	$\Delta \text{mm}^3\text{-O}_2$	$\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$
0	0	—	152	—		
0	1,06	100%	164	12	0	—
0,005 M	1,05	99	172	20	8	0,7
0,010	1,0	94,5	175	23	11,5	1,0
0,025	0,95	89,5	186	34	23	2,0
0,050	0,80	75	195	43	34	3,0
0,10	0,70	66	212	60	54	4,9
0,25	0,41	38,5	228	76	71	6,3
0,50	0,29	27,5	246	94	91	8,1

Tabelle 2. Auswertung der in Fig. 3, 4 und Tab. 1 wiedergegebenen Versuche

^{14}C -Formiat-konz. (konstant) = $[\text{S}_1]$ bzw. $[\text{S}]$	Inhibitor-konz. bei 50% Hemmung = Km_2^*	$Q \frac{[\text{S}_2]}{[\text{S}_1]}$ bei $\text{I}_{50\%}$	Berechnung von Km_2 (bzw. K_1)	
			durch Extrapolation $\text{S}_1 \rightarrow 0$ (a)	auf Grund der Steigung der Geraden in Fig. 4 (b)
S_2 bzw. I = Methanol				
0,0016 M	0,19 M	119	(0,14 M)	(0,37 M)
0,0032	0,26	81	0,16	0,16
0,016	0,66	41	0,15	0,16
0,08	1,37	17	—	—
0,12	(1,9)	16	—	—
S_2 bzw. I = Äthanol				
0,0016 M	0,071 M	44	(0,054 M)	(0,050 M)
0,016	0,16	10	0,038	0,049

zuführende Mehrverbrauch an O_2 den Formiat-bedingten Anteil um das Mehrfache. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, sind auch die für Äthanol bestimmten I_{50} -Werte von der Formiatkonzentration abhängig. Korrigiert bzw. extrapoliert man die experimentell ermittelten Grössen für K_1 bzw. Km_2 in der oben für Methanol angegebenen Weise, erhält man Werte von 0,038–0,054, im Mittel $K_1 = 0,046 \text{ M}$ (Äthanol). Diese Zahl stimmt mit der bei der Äthanoloxydation beobachteten Halbsättigungskonzentration überein (vgl. 3. Abschnitt).

Zur Berechnung von Km_2 (bzw. K_1) benutzte Formeln (vgl. ⁸, S. 89 bzw. 81):

$$(a) \quad Km_2 = Km_2^* \frac{1}{1 + (\text{S}_1/Km_1)} \quad (7) \quad (b) \quad \text{tg} \alpha = \frac{Km_1}{K_1 (Km_1 + \text{S})} \quad (8)$$

Am Beispiel des H-Donor-Paares ^{14}C -Formiat und Äthanol (inert) ist der Einfluss von pH und Versuchsdauer auf den I_{50} -Wert untersucht worden. Bestimmt man den Verlauf der pI-

Kurve für Äthanol bei einer Versuchsdauer von 30 und einer von 150 Min., lässt sich kein gesicherter Unterschied nachweisen. Vergleicht man den bei pH 6,8 resultierenden Kurvenverlauf mit der beim üblichen pH (6,0) aufgenommenen Hemmungskurve, ergibt sich ein I_{50} -Wert von 0,090 M (Äthanol), anstelle von 0,16 M (vgl. Tab. 2). Während bei pH 6,0 ein 10-facher Äthanolüberschuss erforderlich ist, resultiert bei pH 6,8 eine 50-proz. Hemmung schon bei einem molaren Verhältnis von Formiat: Äthanol $\sim 1:5$. Bei der Beurteilung dieses pH-Unterschiedes wird zu berücksichtigen sein, dass bei pH 6,0 ca. 4⁰/₁₀₀, bei pH 6,8 nur ca. 0,6⁰/₁₀₀ des Formiates in Form der undissoziierten Säure – die allein mit der Katalase reagiert – vorliegen ($pK = 3,6$).

5. **Hemmung der Oxydation von ^{14}C -Methanol durch Äthanol und Formiat.** – Bei der Verfolgung der Oxydation von ^{14}C -Methanol ist das Vorgehen im Prinzip dasselbe wie bei den Experimenten mit ^{14}C -Formiat. Während dort eine Leerwertkorrektur praktisch ent-

Tabelle 3. Oxydation von ^{14}C -Methanol durch Notatin und Katalase
Ansätze enthaltend 300 μMol Methanol; übrige Versuchsbedingungen siehe Methodik

Notatin und Glucose	Ansatz		Spez. Aktivität des Dimedonats Imp./Min./20 mg Träger		Oxydiertes ^{14}C -Methanol $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$
	Katalase (20 γ)	H_2O_2 (20 μMol)	total	– Blindwert	
–	–	–	702	–	–
+	+	–	4495	3793	3,04
–	–	+	841	139	0,11
–	+	+	798	96	0,08

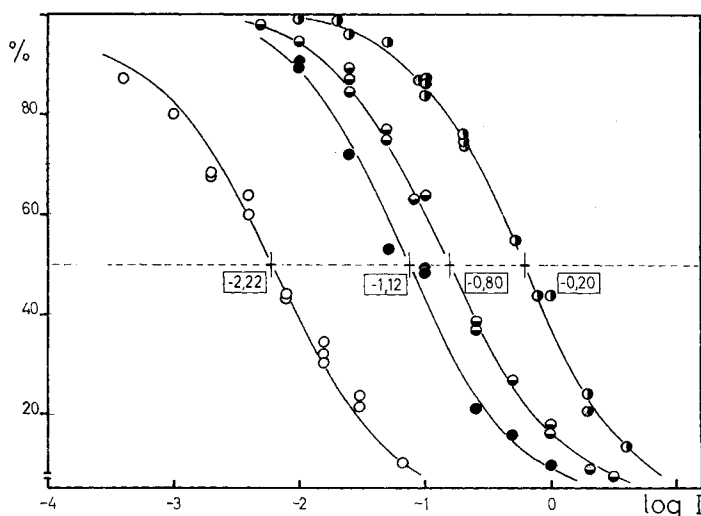


Fig. 5. Konkurrenzversuche mit verschiedenen H-Donor-Paaren

a) 0,05 M ^{14}C -Methanol + Formiat (var.) ○ c) 0,016 M ^{14}C -Formiat + Äthanol (var.) ○
b) 0,05 M ^{14}C -Methanol + Äthanol (var.) ● d) 0,016 M ^{14}C -Formiat + Methanol (var.) ●
Ordinate: proz. Restaktivität (Kontrolle ohne Inhibitor = 100%); Abszisse: log Inhibitor-
konzentration (mMol/ml); Versuchsbedingungen wie bei den Versuchen von Fig. 3.

fällt, ist eine solche bei den ^{14}C -Versuchen hier erforderlich. Wie aus dem in Tab. 3 wiedergegebenen Versuch hervorgeht, enthält das verwendete ^{14}C -Methanol bereits Spuren von Formaldehyd. Diese sind jeweils in mit-inkubierten Kontrollansätzen (ohne Notatin und Katalase) bestimmt

worden. Das Ausmass der Methanoloxydation, wie sie in Ansätzen ohne Enzyme, jedoch nach Zugabe von freiem H_2O_2 beobachtet werden kann, ist gering (2–3% des Standardansatzes), so dass diese – wenigstens unter den hier gewählten Bedingungen – vernachlässigt werden darf. (Das im Vergleich zur $^{14}\text{CO}_2$ -Bestimmung wesentlich kompliziertere Verfahren der Isolierung als Dimedonat bringt es mit sich, dass die Messwerte, im Vergleich zu den Formiat-Versuchen, etwas stärker streuen.)

Das Ergebnis der mit konstanter ^{14}C -Methanol-Menge ausgeführten Versuche ist in Fig. 5 dargestellt. Der Verlauf dieser Kurven entspricht näherungsweise demjenigen einer Dissoziations-Restkurve. Es lässt sich aus ihnen entnehmen, dass die Oxydation von 0,05 M ^{14}C -Methanol durch $6,0 \cdot 10^{-3}$ M Formiat bzw. durch 0,076 M Äthanol auf den halben Betrag herabgesetzt wird. Dies entspricht beim Paar ^{14}C -Methanol-Formiat einem molaren Verhältnis von 8,3:1, im Falle von ^{14}C -Methanol-Äthanol einem solchen von 0,66:1.

6. Versuche mit gegenseitiger Variation der Substratkonzentration. – Variiert man bei gleichbleibender Gesamtkonzentration das Mischungsverhältnis, so wird derjenige H-Donor bevorzugt umgesetzt, welcher gegenüber dem Reaktionspartner (Katalase-Komplex I) die grössere Affinität aufweist. In Fig. 6 ist das Ergebnis eines Versuchspaares dargestellt, in welchem die Summe Formiat + Methanol konstant (100 $\mu\text{Mol/ml}$) gehalten ist und abwechselungsweise einer der beiden H-Donoren ^{14}C -markiert wurde. Wie aus diesen angenähert spiegelbildlich verlaufenden Kurven hervorgeht, wird die relative Oxydationsgeschwindigkeit für ^{14}C -Formiat (bzw. ^{14}C -Methanol) dann auf die Hälfte reduziert, wenn das angebotene H-Donor-Gemisch zu 90% (bzw. 93%) aus Methanol besteht. Dies entspricht einem molaren Methanolüberschuss von 10:1 bzw. 13:1.

Diese Quotienten scheinen zu den für Formiat und Methanol einzeln bestimmten Halbsättigungskonzentrationen ($\sim K_m$) von 0,005 bzw. 0,12–0,15 ($\sim 1:25$ –30) zunächst in Widerspruch zu stehen. Der in Fig. 6 wiedergegebene Kurvenverlauf für S_2 (Methanol) folgt formal

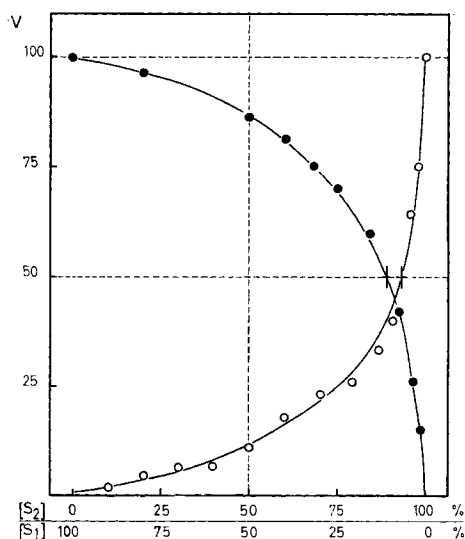


Fig. 6. Oxydation von ^{14}C -Formiat (●) und ^{14}C -Methanol (○) in Formiat-Methanol-Gemischen verschiedener Zusammensetzung

($\text{S}_1 + \text{S}_2 = 0,1 \text{ M}$); 20 γ Katalase/Ansatz; Versuchsdauer 150 Min.; Ordinate: relative Oxydationsgeschwindigkeit (Wert für 0,1 M Formiat bzw. Methanol = 100%); Abszisse: molares Mischungsverhältnis.

Gleichung 5, wenn v_2 als Funktion von $\text{S}_2/(\text{S}_1 + \text{S}_2)$ dargestellt wird. Durch Einsetzen verschiedener Werte für K_{m1} in Gleichung 5 lässt sich zeigen, dass das Ausmass der Bevorzugung des einen Substrates um so ausgeprägter ist, je stärker das Enzym mit Substrat gesättigt wird. Nimmt

man im vorliegenden Fall (System Formiat-Methanol) den Quotienten der reziproken Affinitäten ($y = Km_1:Km_2$) zu 1:30 an, dann ergeben sich für v_2 f. $[S_2/(S_1 + S_2)]$ die in Fig. 7 dargestellten Kurven. Aus dem Verlauf der Kurve a geht hervor, dass beim Vorliegen eines grossen Substratüberschusses (Km_1 und $Km_2 \gg [S_1 + S_2]$) dann ein Wert von $v_2 = 0,5$ resultiert, wenn der Anteil an S_2 96,5% beträgt. Unter diesen extremen Bedingungen ist somit bei einem Angebot der Substrate im Verhältnis $S_1:S_2 \sim 1:30$ Gleichheit von v_1 und v_2 zu erwarten. Ist dagegen die Substratkonzentration von gleicher Grössenordnung oder gar kleiner als die Halbsättigungskonzentration ($\sim Km$), ist das Mischungsverhältnis, bei welchem $v_1 = v_2$, weniger ungleich. Dieses nähert sich – wie die Kurven b, c und d in Fig. 7 zum Ausdruck bringen – mit abnehmender Konkurrenz dem Grenzwert 1. Die in diesem Experiment gewählten Bedingungen entsprechen bezüglich $S_1 + S_2$ ($= 100 \mu\text{Mol/ml}$) und Km_1 und Km_2 ($= 5$ bzw. $\sim 150 \mu\text{Mol/ml}$) der Kurve b; ihr Verlauf

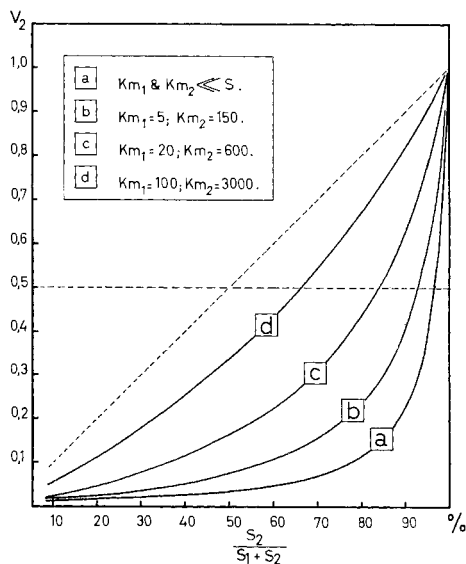


Fig. 7. Abhängigkeit der Substrat- bzw. H-Donor-Konkurrenz vom Sättigungsgrad des Enzyms (S/Km) und vom Mischungsverhältnis des Substrats $[S_2/(S_1 + S_2)]$

Kurvenverlauf berechnet nach Formel 5, unter Einsetzung von $y = Km_1/Km_2 = 1/30$, $S_1 + S_2 = 0,1 \text{ M}$ und $V \max_2 = 1$; Ordinate: v_2 (Umsatzgeschwindigkeit von S_2), wobei Wert für $S_2 = 100\%$ stets gleich eins gesetzt wurde; Abszisse: Proz. Anteil von S_2 .

stimmt näherungsweise mit den experimentell ermittelten Werten überein. Über die Ursache der z. T. bestehenden Abweichungen zwischen den Experimenten mit ^{14}C -Formiat und ^{14}C -Methanol können, da methodische Unterschiede bestehen, keine Aussagen gemacht werden.

Diskussion

Nach den Untersuchungen von CHANCE⁹⁾ ist das Gleichgewicht, welches bei der Katalase zwischen peroxydatischer Umsetzung und H_2O_2 -Spaltung herrscht, ein Ausdruck dafür, dass H_2O_2 und eine andere Substanz (H-Donor) miteinander um den Katalase- H_2O_2 -Komplex I konkurrieren. Das zwischen katalatischer und peroxydatischer Aktivität bestehende Verhältnis hängt von zahlreichen Faktoren ab, u. a. von der H-Donor-Konzentration und dem Quotienten aus Katalasekonzentration und H_2O_2 -Angebot. Werden diese Versuchsbedingungen nach Möglichkeit konstant ge-

⁹⁾ B. CHANCE, Acta scand. chem. 1, 236 (1947).

halten und zum System gleichzeitig verschiedene H-Donoren zugesetzt, kommt es zwischen diesen zur Konkurrenz um das Enzym. Dabei zeigen – wie aus diesen Versuchen hervorgeht – Formiat, Äthanol und Methanol ein scheinbares Affinitätsverhältnis von 25–30:8–10:1. Wenn auch die untersuchten H-Donor-Paare wechselseitig eine Verdrängungshemmung zeigen, kann zunächst nichts darüber ausgesagt werden, wie diese zustande kommt. Dasselbe gilt für die Bedeutung der hier gemessenen Grössen für Km und V max.

Sucht man nach einer Deutung für die zwischen den einzelnen Werten für Km und V max gefundenen Unterschiede, so geben vor allem die von CHANCE⁹⁾ auf optischem Wege ermittelten Daten wertvolle Hinweise. So wurden von ihm die Reaktionen zwischen Katalase- H_2O_2 -Komplex I und verschiedenen H-Donoren spektrophotometrisch verfolgt und die entsprechenden Reaktionskonstanten für die Bildung (k_4) und den Zerfall (k_5) des resultierenden Katalase- H_2O_2 -Äthanol-Komplexes ermittelt. Während Angaben über die Grösse von k_4 für Äthanol, Methanol und Formiat vorliegen (1000, 1000, 470 Mol⁻¹ s⁻¹), wurde k_5 , welches für den Gesamtumsatz massgebend ist, bei Äthanol auf 10 s⁻¹ geschätzt. Dies entspricht einer Wechselzahl von 600 min⁻¹. Auf Grund der hier gemessenen Oxydationsraten lassen sich im Falle von Äthanol und Methanol Wechselzahlen von ca. 700 min⁻¹ und für Formiat eine solche von ca. 250 min⁻¹ errechnen.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Äthanolkonzentration hat CHANCE (vgl. ⁹⁾, S. 253) eine gewisse Sättigung des Katalase-Komplexes I beobachtet. Er hat bei der Interpretation dieses Befundes auf die Bestimmungsmöglichkeit einer «MICHAELIS-Konstante» hingewiesen und diese auf ca. 0,01 M geschätzt. Es ist anzunehmen, dass die scheinbaren MICHAELIS-Konstanten im optischen Test und mit der «Tracer»-Technik verschieden ausfallen werden. Als feststehend dürften indessen die hier bestimmten Affinitätsunterschiede betrachtet werden. Bemerkenswert ist hinsichtlich V max und Km die Parallele, welche zur Hemmung der Leberesterase durch Ketocarbonsäureester besteht¹⁰⁾. In beiden Fällen handelt es sich um eine Konkurrenz zwischen 2 Substraten, von denen sich das eine durch eine wesentlich grössere Affinität zum Enzym, aber auch durch eine geringere Umsatzgeschwindigkeit vom anderen Substrat unterscheidet.

Die Erscheinung der H-Donor-Konkurrenz bei der Katalase interessiert nicht allein in enzymkinetischer Hinsicht; sie zeigt auch Aspekte von biologischem Interesse. Die grossen Katalasemengen in Leber und Niere genügen, um selbst ein relativ grosses H_2O_2 -Angebot (z. B. Rattenleber $\sim 25 \mu\text{Mol } H_2O_2/\text{g Trocken-Gew./Std.}$) praktisch völlig peroxydatisch umzusetzen, sofern genügend H-Donoren zugegen sind¹¹⁾. Es ist wahrscheinlich, dass sich neben den hier untersuchten, bekannten H-Donoren noch weitere an dieser Konkurrenz beteiligen. Schliesslich ist die Hemmung der peroxydatischen Methanoloxydation von praktisch-klinischem Interesse, weil bei der Behandlung der Methanolvergiftung versucht wird, die Bildung toxischer Oxydationsprodukte (Formaldehyd) durch Verdrängungshemmung zu unterbinden¹²⁾.

¹⁰⁾ R. WILLSTÄTTER, R. KUHN, O. LIND & F. MEMMEN, Z. physiol. Chem. 167, 303 (1927).

¹¹⁾ F. PORTWICH & H. AEBI, Helv. physiol. pharmacol. Acta, im Druck (1960).

¹²⁾ H. AEBI, H. KOBLET & J. P. VON WARTBURG, Helv. physiol. pharmacol. Acta 15, 384 (1957).

Die vorliegenden Ergebnisse erwecken den Anschein, dass sich Formiat für diesen Zweck eher eignen dürfte als der bisher mit wechselndem Erfolg als Antidot verwendete Äthylalkohol.

SUMMARY

1. Competition among H-donors for catalase- H_2O_2 -complex I has been studied in a system containing notatin, clucose, crist. liver catalase and H-donors, one of them being labelled with ^{14}C .

2. Comparing formate, ethanol and methanol with each other, apparent K_i and Km -values have been determined indicating an affinity ratio of 25:8:1. The apparent maximal velocity of the peroxidatic oxidation of alcohol is about three times that of formate.

3. Some suggestions with respect to kinetical treatment are made and medical aspects of competitive behaviour of H-donors are discussed.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern

72. Diensynthesen mit Menthofuran

von Marc Häring

(8. I. 60)

Seit der erstmaligen Feststellung von DIELS & ALDER, dass Furan zur Diensynthese mit Maleinsäureanhydrid befähigt ist¹⁾, ist auch das im Pfefferminzöl vorkommende Furanderivat Menthofuran (I)²⁾ von verschiedenen Autoren auf sein Verhalten gegen dienophile Agenzien untersucht worden. So wurde z. B. das Additionsprodukt mit Maleinsäureanhydrid zur Isolierung des Menthofurans aus natürlichen Ölen³⁾, das p-Benzochinon-Additionsprodukt zur Gehaltsbestimmung solcher Öle an Menthofuran verwendet⁴⁾. WIENHAUS & DÄSSLER⁴⁾ stellten ausserdem fest, dass Menthofuran auch mit Acrolein und Crotonaldehyd DIELS-ALDER-Additionsprodukte bildet.

Eine vor einiger Zeit erschienene Mitteilung⁵⁾, wonach Furan, 2-Methylfuran (Sylvan) und 2,5-Dimethylfuran mit Azodicarbonsäure-diäthylester (II) zwar reagieren, aber keine fassbaren DIELS-ALDER-Addukte ergeben, veranlasst uns, kurz über einige etwa gleichzeitig von uns ausgeführte Diensynthesen von Menthofuran mit Azodicarbonsäure-diäthylester und anderen stickstoffhaltigen Philodienen zu berichten.

¹⁾ O. DIELS & K. ALDER, Ber. deutsch. chem. Ges. 62, 554 (1929).

²⁾ E. GUENTHER, The essential oils 2, 699, Van Nostrand Company, New York 1949.

³⁾ R. H. EASTMAN, J. Amer. chem. Soc. 72, 5513 (1950).

⁴⁾ G. OHLOFF, Ber. deutsch. pharmaz. Ges. 57, 353 (1952); H. WIENHAUS & H. G. DÄSSLER, Chem. Ber. 91, 260 (1958)

⁵⁾ P. BARANGER & J. LEVISALLES, Bull. Soc. chim. France 1957, 704.