

Untersuchungen über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.

IX. Mitteilung: Hemmung der Aktivität kristallisierter Katalase aus Rinderleber durch Chinone und Indophenole.

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und S. Gierer.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 20. Jän. 1948. Vorgelegt in der Sitzung am 20. Jän. 1948.)

In einer früheren Mitteilung¹ berichteten wir über die von Chinonen auf die Aktivität eines verhältnismäßig rohen Blutkatalasepräparates ausgeübten Hemmwirkungen. Analoge Experimente mit Indophenolen, die weitgehend ähnliche Ergebnisse zeitigten, wurden an einer anderen Stelle publiziert.² Durch die Ungunst der Zeitverhältnisse war es uns damals nicht möglich, unsere Versuche mit hochgereinigten Katalasepräparaten, wie z. B. kristallisierter Pferde- oder Rinderleberkatalase, zu verifizieren, da zum damaligen Zeitpunkt die für die Darstellung dieser Präparate notwendigen Mengen Pferde- oder Rinderleber in Wien nicht erhältlich waren. Dadurch konnte auch nicht entschieden werden, ob die von uns beschriebenen Effekte tatsächlich für die Katalase spezifisch sind oder auf Verunreinigungen beruhen, wenn auch letzteres durch die gute Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse unwahrscheinlich erschien. Die auf Grund unserer damaligen Versuche aufgestellten theoretischen Betrachtungen³ waren deshalb solange nicht ausreichend fundiert, als die Experimente nicht mit dem hochgereinigten Enzym reproduziert wurden.

Vor einigen Monaten konnten wir das für eine kleine Menge kristallisierter Katalase notwendige Quantum Rinderleber erhalten. In der

¹ Mh. Chem. **76**, 319 (1947).

² Exper. **3**, 108 (1947).

³ Exper. **3**, 152 (1947).

vorliegenden Mitteilung sollen nun die Ergebnisse wiedergegeben werden, die bei den Hemmungsversuchen mit Chinonen und Indophenolen auf die kristallisierte Rinderleberkatalase, bzw. auf die durch sie bewirkte Zersetzung von Wasserstoffperoxyd, erhalten wurden.

Methodik.

Die Herstellung des für die Versuche verwendeten kristallisierten Ferments erfolgte nach der Vorschrift von *Sumner* und *Dounce*⁴ aus 2 kg frischer Rinderleber durch fraktionierte Fällung mit vorgereinigtem Dioxan, Auflösen des aktiven Präzipitats in wenig Wasser und Dialyse im Pergamentschlauch gegen destilliertes Wasser nach vorhergehender Zerstörung des Glykogens durch Zugeben einer kleinen Menge von Speichel. Die so erhaltenen Kristalle wurden umgefällt und einer weiteren Dialyse unterzogen, worauf sich schöne prismatische Kristalle bildeten, deren *Kat. f.* (Katalasefähigkeit nach *Euler* und *Josephson*⁵) unter den üblichen Bedingungen etwa 30000 betrug, was den von *Sumner* und *Dounce*⁴ angegebenen Werten entspricht.

Die für die Versuche verwendete Fermentlösung wurde durch Auflösen einiger kleiner Kristalle in etwas Phosphatpufferlösung von pH 7,4 hergestellt und durch Verdünnung mit destilliertem Wasser auf die gewünschte Konzentration gebracht. Bei ständiger Aufbewahrung im Eisschrank war sie ohne nennenswerte Aktivitätseinbuße einige Tage lang gut haltbar.

Die Hemmungsversuche wurden in zwei verschiedenen Versuchsserien durchgeführt.

Bei der *ersten* Serie wurde *keine* Inkubationszeit zur Reaktion des Ferments mit dem Hemmkörper vorgeschaltet, sondern Enzym, Hemmkörper und Substrat zusammen angesetzt.

Ansatz: 2 ccm Fermentlösung
 10 ccm H₂O₂-Lösung
 5 ccm 1/5-n Phosphatpufferlösung (pH = 7)
 5 ccm Lösung des Hemmstoffes (bzw. H₂O in Kontrollversuchen).

Sämtliche Lösungen wurden vor dem Ansatz auf Versuchstemperatur gebracht. Der Versuch wurde im Thermostaten bei 20° durchgeführt. Nach genau 10 Min. Reaktionszeit wurde die enzymatische Zersetzung durch Zugabe von 10 ccm 10%iger Schwefelsäure abgestoppt und nicht umgesetztes Wasserstoffperoxyd jodometrisch titriert. Die Berechnung der Hemmung erfolgte in üblicher Weise.

Bei der *zweiten* Serie schalteten wir eine Inkubationszeit ein, um dem Ferment Gelegenheit zu geben, mit dem Hemmstoff zu reagieren; wir setzten daher die Substratlösung erst 10 Min. nach Ansatz der übrigen Reaktionsteilnehmer zu. Sonst wurde völlig gleichartig wie oben beschrieben gearbeitet.

Ergebnisse.

Bei den ersten Versuchen mit dem kristallisierten Enzym erhielten wir im allgemeinen bedeutend niedrigere Hemmwerte als mit dem rohen Blutkatalasepräparat. Wir konnten aber dann beobachten, daß die perzentuelle Hemmung der Reaktion von der *Fermentkonzentration* ab-

⁴ J. biol. Chemistry 121, 417 (1937); 127, 439 (1939).

⁵ Liebigs Ann. Chem. 452, 158 (1927).

hängt. Abb. 1 zeigt diese Verhältnisse für den Fall des relativ stark wirksamen Phenol-indo-o-kresols. Als Abszisse ist hier die Fermentkonzentration (bzw. der ihr proportionale Wirkungswert der betreffenden

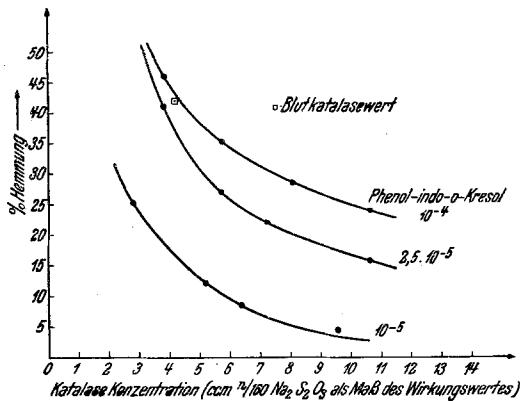


Abb. 1. Abhängigkeit der perzentuellen Hemmung von der Fermentkonzentration (kristall. Leberkatalase).

Fermentlösung, gemessen in Kubikzentimeter verbrauchte $n/160 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) als Ordinate die perzentuelle Hemmung aufgetragen. Die Meßpunkte waren bei strikter Einhaltung der Reaktionsdauer (10 Min.) vor allem bei höheren Fermentkonzentrationen sehr gut reproduzierbar, während bei geringeren Fermentaktivitäten die Meßgenauigkeit wegen zu geringer

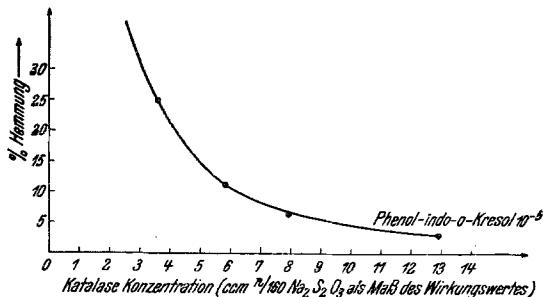


Abb. 2. Abhängigkeit der perzentuellen Hemmung von der Fermentkonzentration (Blutkatalasepräparat).

Titrationswerte leidet. Wie man sieht, steigt mit der Verdünnung der Katalase bei allen drei untersuchten Hemmstoffkonzentrationen die perzentuelle Hemmung stark an, um bei Konzentrationen, die etwa denjenigen bei unseren seinerzeitigen Blutkatalaseversuchen entsprechen, auch die dort gefundene Höhe zu erreichen. Bei einem entsprechenden Versuch mit einem Blutkatalasepräparat konnte festgestellt werden, daß auch in diesem Fall die Hemmwerte Funktionen der Enzymkonzentration sind (vgl. Abb. 2).

Dieselbe Abhängigkeit der percentuellen Hemmung von der Fermentkonzentration konnten wir auch bei allen von uns seinerzeit auf ihre Hemmwirkung auf Blutkatalase untersuchten Chinonen und Indophenolen nachweisen (vgl. z. B. Abb. 3), wenn auch bei Substanzen mit besonders hohem positivem Oxydations-Reduktionspotential Abweichungen von der erwarteten Kurvengestalt festzustellen waren, was wir der Tatsache zuschreiben, daß diese Hemmstoffe teilweise bei der jodometrischen Titration des Substrates miterfaßt werden. Diese Komplikation läßt sich auch durch Anbringung einer entsprechenden Korrektur nicht völlig ausschalten, da diese Redoxsysteme sich mit dem Wasserstoffperoxyd in

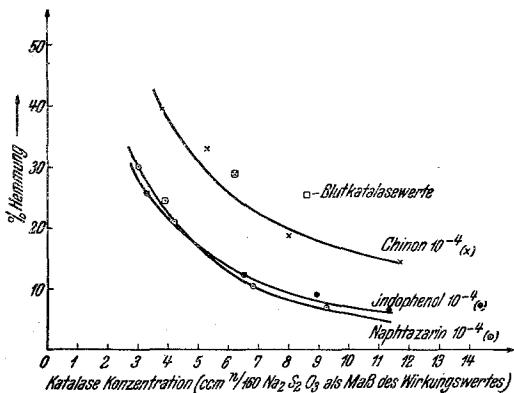


Abb. 3. Abhängigkeit der percentuellen Hemmung durch verschiedene Inhibitoren von der Fermentkonzentration (kristall. Leberkatalase).

ein bestimmtes Redoxgleichgewicht setzen, so daß je nach Menge des noch vorhandenen H₂O₂ das erforderliche Korrekturglied verschieden wäre. Bei Konzentrationen des Hemmstoffs unter 10⁻⁴ kann diese Wechselwirkung und damit die Störung der jodometrischen Titration vernachlässigt werden.

Neben Chinonen und Indophenolen wurde noch eine Reihe weiterer redoxaktiver Substanzen untersucht. Porphyrexid und Porphyrindin, Substanzen mit besonders hohem Redoxpotential, ergaben wohl merkliche Hemmungswerte; diese waren aber auffallend schlecht reproduzierbar und außerdem konnte keine entsprechende Abhängigkeit der percentuellen Hemmung von der Fermentkonzentration wie bei Chinonen und Indophenolen nachgewiesen werden. In 10⁻⁴-molarer Lösung bei pH 7 war von allen sonst noch untersuchten Substanzen nur noch das Pyocyanin ein wenn auch schwach wirksamer Inhibitor. Als vollkommen unwirksam erwiesen sich die folgenden Verbindungen: Methylenblau, Toluylenblau, Gallocyanin, Neutralrot, Ponceau 2 R, Methylrot, Alkaliblau, Safranin, Malachitgrün, Chrysoidin, Methylviologen, Benzylviologen und Betain-

viologen — alles Substanzen, deren Redoxpotential bei pH 7 schon ziemlich niedrig ist. (Hierzu muß bemerkt werden, daß nach *Alexejew* und *Russinowa*⁶ Methylenblau bei niedrigerem pH die Aktivität der Blutkatalase gegenüber Wasserstoffperoxyd hemmt; eine Nachprüfung dieser Angabe wurde von uns nicht vorgenommen.)

Die pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung durch Chinone und Indophenole ergab sich bei unseren jetzigen Versuchen als völlig übereinstimmend mit den mit Blutkatalase erhaltenen Werten.

Die Versuchsserie unter Einschaltung einer Inkubationszeit ergab Werte, die mit den entsprechenden ohne Inkubationszeit erhaltenen völlig übereinstimmen. Es war nicht möglich, durch Zusatz von Reduktionsmitteln (Sulfit, Dithionit, Viologene) die durch Chinone oder Indophenole erzielte Hemmung der Katalaseaktivität aufzuheben.

Diskussion.

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen unsere seinerzeit³ ausgesprochene Vermutung, daß die von uns an den ungereinigten Blutkatalasepräparaten beobachteten Hemmungsscheinungen nicht als Folgeerscheinung der Verunreinigungen der Enzympräparate angesprochen werden dürfen, sondern für die Katalase selbst spezifisch sind. Bemerkenswert ist hier die große Abhängigkeit der Hemmwerte von dem Wirkungswert der Fermentlösung, d. h. also auch von der Fermentkonzentration, obwohl die Katalase selbst in den konzentriertesten Lösungen noch immer um etwa fünf Zehnerpotenzen verdünnter vorliegt als die angewandten Hemmstoffe der Indophenol- oder Chinonreihe.

Über die Wirkungsweise dieser Hemmstoffe, bzw. allgemein über den Mechanismus der Katalasewirkung hat der eine von uns kürzlich³ eine Vorstellung entwickelt, an der mit Rücksicht auf die hier berichteten Ergebnisse nichts zu ändern ist. Trotz der Einwände, die insbesondere von *Theorell* und *Stern*⁷ gegen die Annahme eines Wertigkeitswechsels der Eisenatome im Katalasemolekül während der katalatischen Wirkung gemacht wurden, erscheint uns dieser Erklärungsversuch allein geeignet, die von uns beschriebenen Hemmungsscheinungen zwanglos zu deuten. Wir sind uns dabei völlig dessen bewußt, daß unsere Methodik gegenüber der von *Chance* im Laboratorium von *Theorell* entwickelten ihre Nachteile aufweist; trotzdem glauben wir, daß wir auch mit unseren Titrationen, welche — mit alleiniger Ausnahme der Hemmstoffe mit extrem hohem Oxydationspotential — gut reproduzierbare Kurven ergeben, brauchbare Resultate erzielen können.

⁶ Bull. Inst. Rech. biol. Perm **6** (1928); Chem. Zbl. 1929 II, 2055.

⁷ Diskussion zum Vortrag von *H. Theorell*, VI. Kongreß für experimentelle Zellforschung, Stockholm, Juli 1947.

Unsere Beobachtungen ermöglichen zwar grundsätzlich eine kinetische Analyse der Hemmreaktion, von der wir aber zunächst noch absehen wollen, u. a. auch deswegen, weil außer der eigentlichen Hemmung der Katalaseaktivität durch die Inhibitoren augenscheinlich auch noch andere Reaktionen für die vorliegenden Ergebnisse eine Rolle spielen können; es sei hier insbesondere auf die schon nachgewiesene Reoxydation des im Verlauf der Hemmungsreaktion etwa gebildeten Hydrochinons zu Chinon durch das Substrat hingewiesen. Dafür, daß die Hemmungsreaktion sehr schnell, vielleicht augenblicklich vonstatten geht, sprechen die übereinstimmenden Resultate mit und ohne Inkubationszeit; auch dieser Befund paßt gut zu unserer Vorstellung einer Ionenreaktion.

Es sei uns gestattet, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. L. Ebert für sein Interesse und seine Anregungen bei dieser Arbeit unseren Dank auszusprechen.

Anmerkung bei der Korrektur: Erst nach der Einsendung dieser Arbeit erschienen ausführliche Veröffentlichungen von H. Theorell⁸ und B. Chance⁹ über die von diesen Autoren mit Hilfe einer verfeinerten Hartridge-Roughton-Millikan-Technik durchgeführten Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Katalase. Ohne sich mit den erhaltenen Ergebnissen und daraus gezogenen Schlußfolgerungen weiter auseinandersetzen zu wollen, soll hier nur ausgeführt werden, daß diese Autoren die Vorstellung eines Wertigkeitswechsels des Katalaseeisens auf Grund ihrer Versuche ablehnen. Die ansonsten sehr einleuchtenden Hypothesen der Autoren, die durch experimentelle Befunde wohl gestützt sind, scheinen aber keine Möglichkeit zur Erklärung der von uns geschilderten Hemmungserscheinungen zu bieten.

Eine Klärung dieser Fragen wäre wohl nur bei Wiederholung unserer Versuche in der Apparatur von Chance zu erreichen, wozu uns aber derzeit leider die Hilfsmittel fehlen.

Zusammenfassung.

Die seinerzeit an Blutkatalase mit Chinonen und Indophenolen gefundenen Hemmungserscheinungen wurden unter Verwendung kristallisierter Rinderkatalase reproduziert. Es wurden den früheren Untersuchungen entsprechende Werte erhalten. Bemerkenswert ist eine neu gefundene starke Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Fermentkonzentration. Die Hemmungsreaktion stellt sich mit unmeßbarer Geschwindigkeit ein, was zu der Annahme einer Ionenreaktion paßt.

⁸ Exper. 4, 100 (1948).

⁹ Nature 161, 914 (1948).