

Aktivität Eiweiss spaltender Enzyme in Fischen

Über Enzymaktivitäten in Fischen ist bisher ausserordentlich wenig bekannt (Übersicht bei ¹), obwohl die nähere Kenntnis von Fischenzymen aus theoretischen (Kaltblüter-Stoffwechselphysiologie) wie praktischen Gründen (Fische als Nahrungsmittel) bedeutsam sein sollte. In dieser Arbeit wird über die Aktivität einiger Eiweiss- und Peptide-spaltender Fermente berichtet.

Methodik. Zur Untersuchung kamen im März/April in der Nordsee gefangene Fische; innerhalb weniger Minuten nach Tötung wurden Extrakte mit 1prozentigem KCl + 0,001 M Versen hergestellt und nach Standardmethoden untersucht: Kathepsin und neutrale Proteinase nach der Anson-Methode², Peptidasen unter Standardbedingungen³ mittels Ninhydrinreaktion⁴, Gesamtstickstoff nach dem Mikro-Kjeldahlverfahren.

Tabelle I

Kathepsinaktivität in Geweben von Fischen und Säugetieren (Mittelwerte aus mindestens 3 Bestimmungen; in alkalischer Harnstofflösung denaturiertes Hämoglobin als Substrat; pH 4,0 mit 0,2 M Acetat; 37°)

Tierart	Gewebe	mg Tyrosin freigesetzt/h	
		je g Frischgewicht	je mg Gesamt-N
Dorsch . . .	Muskulatur	0,94	0,09
Dorsch . . .	Leber	6,09	0,78
Dorsch . . .	Milz	27,5	2,47
Dorsch . . .	Magen-Darmtrakt	5,33	0,36
Hering . . .	Muskulatur	0,46	0,05
Hering . . .	Leber	11,1	0,74
Hering . . .	Milz	31,7	1,70
Hering . . .	Magen-Darmtrakt	9,53	0,79
Seezunge . .	Muskulatur	0,57	0,08
Scholle . . .	Muskulatur	1,04	0,18
Ratte . . .	Muskel	0,11	
Ratte . . .	Leber	1,81	
Ratte . . .	Milz	4,70	
Schwein . .	Muskel	0,07	
Schwein . .	Leber	0,91	
Schwein . .	Milz	2,80	
Rind . . .	Muskel	0,09	
Rind . . .	Leber	2,17	
Rind . . .	Milz	2,98	
Kaninchen .	Muskel	0,05	
Kaninchen .	Milz	8,28	

Ergebnisse. In Tabelle I sind die Zahlen über die *Kathepsin*-Aktivitäten in lebendfrischen Fischen zusammengestellt. Diese sind wesentlich höher als in den entsprechenden Geweben von Säugetieren, die unter den gleichen experimentellen Bedingungen gemessen wurden. Im Vergleich mit Säugetieren (Rind, Schwein, Kaninchen und Ratte) findet sich pro Gramm Frischgewebe 5mal mehr *Kathepsin* in der Leber, 6mal mehr in der Milz und 10mal mehr in den Muskeln der untersuchten Fischarten. Unter der Annahme üblicher Q_{10} -Werte bedeutet dies, dass Fische bei etwa + 7° Körpertemperatur über etwa die gleiche proteolytische Wirkung in ihren Organen verfügen wie Säugetiere bei 37°.

Auffälligerweise fehlt in Milz, Leber und Muskel von Fischen jegliche Aktivität einer *neutralen Proteinase*, die in diesen und anderen Organen von Rind, Kaninchen und Ratte in etwa gleich grosser Aktivität wie das *Kathepsin* vorkommt⁵. Erst wenn nach 3–5wöchiger Kühlung der Fischmuskel deutlich bakteriell verdorben ist (100–500 Millionen Bakterien je ml Extrakt), tritt eine bei pH 7,6 aktive Proteinase auf, die ihren Ursprung vermutlich in den Mikroorganismen hat. Ihre Aktivität erreicht nur rund 40% derjenigen des Fischmuskel-*Kathepsins*.

Tabelle II

Glycylglycin-Dipeptidase-Aktivität in Fisch- und Säugetierorganen

Tierart	Gewebe	μ Mol Glycylglycin gespalten/h/mg Gesamt-N/37°	Bemerkungen
Schwein . . .	Niere	110	a
Scholle . . .	Muskulatur	57	b
Kaninchen . .	Herzmuskel	49	a
Seezunge . . .	Muskulatur	49	b
Mensch	Uterusmuskel	48	a
Dorsch	Muskulatur	35	b
Ratte	Muskulatur	24	a
Kaninchen . . .	Muskulatur	12	a
Schwein	Dünndarm	11	a
Kaninchen . . .	Uterusmuskel	3	a

a = Werte der Literatur⁶; b = eigene Messungen.

Dieses wiederum wird in seiner Aktivität durch die mehrwöchige Kühlung nicht verändert. Eine Überschlagsrechnung zeigt zudem, dass die in 1 g frischer Fischmuskulatur vorhandene *Kathepsinaktivität* ausreicht, um theoretisch innerhalb 24 h bei 37° 290 mg Protein abzubauen, also fast doppelt soviel, wie 1 g Fischmuskel an Proteinen enthält (rund 150 mg). Obwohl diese Abbauwerte in der Praxis nie erreicht werden können, illustrieren die Zahlen jedoch sehr eindringlich, dass die bekannte, überaus leichte Verderblichkeit des Fischfleisches durch die gewebseigenen Enzyme erklärt werden kann.

Decarboxylasen für Glutaminsäure und Asparaginsäure sind bisher noch nie in tierischen Organen gefunden worden (Ausnahme: γ -Aminobuttersäure-Bildung in Säugetierhirngewebe). Da jedoch beim Fischverderb die Decarboxylierungsprodukte γ -Aminobuttersäure und β -Alanin frühzeitig auftreten⁶, wurden Fischmuskel-extrakte mit Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure in Gegenwart von Pyridoxal-5'-phosphat bei 37° inkubiert und anschliessend papierchromatographisch untersucht; γ -Aminobuttersäure und β -Alanin sind unter diesen Bedingungen nicht auffindbar. Das Auftreten von γ -Aminobuttersäure in gelagerten Fischen bedeutet daher nach unseren Erfahrungen das Vorliegen einer bakteriellen Verunreinigung, da frische Fischmuskeln keine γ -Aminobuttersäure zu bilden vermögen. β -Alanin hingegen kann auch aus einer Spaltung von Anserin durch Anserinase⁷ entstehen und ist daher kein Indikator einer bakteriellen Verunreinigung.

Glycylglycin-Dipeptidase kommt in Fischmuskeln ebenso wie *Kathepsin* in recht hoher Aktivität vor. In

⁵ G. SIEBERT und E. ADLOFF, unveröffentlichte Versuche.

⁶ E. RANKE und F. BRAMSTEDT, Arch. Fischereiwiss. 6, 193 (1955). – E. RANKE, B. RANKE und F. BRAMSTEDT, Arch. Fischereiwiss. 6, 343 (1955).

⁷ N. R. JONES, Biochem. J. 60, 81 (1955).

⁸ E. L. SMITH, J. biol. Chem. 173, 571 (1948). – D. S. ROBINSON, S. M. BIRNBAUM und J. P. GREENSTEIN, J. biol. Chem. 202, 1 (1953).

¹ G. HAMOIR, Adv. Protein Chem. 10, 227 (1955).

² M. LASKOWSKI, in COLOWICK-KAPLAN, *Methods of Enzymology*, Bd. 2 (New York, 1955), S. 26.

³ E. L. SMITH, in COLOWICK-KAPLAN, *Methods of Enzymology*, Bd. 2 (New York 1955), S. 83, 93.

⁴ S. MOORE und W. H. STEIN, J. biol. Chem. 211, 907 (1954).

Tabelle II sind eigene Messungen (mit *b* bezeichnet) zusammengestellt; sie werden mit Daten aus der Literatur⁸ (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 Fischmuskel 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 materials¹. Exogenous hydrogen peroxide does actually produce Heinz bodies in potassium cyanide poisoned red cells². On the other hand, catalase acts in certain circumstances peroxidatically³, 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 peroxide⁴.

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 irreversible⁵, and therefore the potassium chlorate treatment of red cells seemed to be a suitable method to

obtain red cells with a low catalase content⁶. 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 violet⁷.

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 formation². 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.

⁶ L. MAGOS, in this issue.

⁷ Planches d'Hématologie, Sandoz (Basel 1950).

Catalase Inhibition by Potassium Chlorate in Red Cells

Catalase inhibition by potassium chlorate is irreversible¹. 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.

¹ H. BLASCHKO, Biochem. J. 29, 2303 (1935).

¹ S. BRENNER and A. C. ALLISON, *Exper.* 9, 381 (1953).

² L. MAGOS, *Exper.* 12, 264 (1956).

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

⁴ L. MAGOS, A. M. A. *Arch. Industr. Health.* 15, 148 (1957).

⁵ H. BLASCHKO, *Biochem. J.* 29, 2303 (1935).