

Zusammenfassung

Weitere chemische Eigenschaften von Sepiapterinen und Drosopterinen werden beschrieben. Die biologische Aktivität der nach der NaBH_4 -Reduktion zurückoxydierten Produkte aus Sepiapterinen wurde bestimmt. Dadurch ist zum ersten Mal der eindeutige Beweis erbracht, dass Sepiapterin und HB_2 -Pterin dasselbe Gerüst besitzen und ineinander chemisch umgewandelt werden können. Vorläufige Formeln für Sepiapterin, Drosopterin und Isodrosopterin werden diskutiert.

Zürich, Chemisches Institut der Universität

180. Temperaturabhängigkeit der Wirkung verschiedener Katalase-Inhibitoren

von R. Gressly und H. Aebi

(11. VI. 59)

Katalase zeigt bei Variation der Versuchstemperatur insofern ein ungewöhnliches Verhalten, als bei Abwesenheit von Inhibitoren nur eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit zu beobachten ist. Bei einer Versuchsdauer von 5 Min. und bei Verwendung von Perborat als Substrat verhalten sich die bei 0° und 37° für kristallisierte Leberkatalase bestimmten Aktivitäten wie 1,0:1,07, was einer (scheinbaren) Aktivierungsenergie von 1100 Cal/Mol entspricht¹⁾. Wie BEERS & SIZER²⁾ festgestellt haben, resultiert bei Gegenwart von Azid eine starke Erhöhung der Temperaturabhängigkeit. Dies hat jene Autoren zur allgemeinen Feststellung veranlasst, dass die Restaktivität der «gehemmten Katalase» eine Temperaturabhängigkeit aufweist, wie sie in der Regel bei enzymatischen Umsetzungen besteht.

Wie bereits kurz erwähnt worden ist¹⁾, verhalten sich verschiedene Katalase-Inhibitoren in dieser Hinsicht recht unterschiedlich. Sofern zur Aktivitätsbestimmung die Methode nach FEINSTEIN³⁾ verwendet wird, lassen sich unter den hier getesteten Katalase-Inhibitoren 3 Gruppen unterscheiden, und zwar 1. Substanzen, welche in der Kälte viel stärker hemmen als bei 37° ; 2. Substanzen, die nur eine geringe Temperaturabhängigkeit der Inhibitorwirkung erkennen lassen, und 3. solche, die bei 37° eine stärkere Aktivitätsabnahme bewirken als bei 0° . Zur 1. Gruppe gehören Azid und Formiat, zur 2. Gruppe Dichlorphenol und Hydroxylamin, während Amino-triazol – welches unter den Katalase-Inhibitoren ohnehin eine Sonderstellung einnimmt – der 3. Gruppe zuzuordnen ist.

Die am Reinzym erhobenen Befunde unterstreichen die Tatsache, dass die Aktivität biologischer Objekte (z. B. Organhomogenate) nicht nur von der Enzym-

¹⁾ R. GRESSLY, H. ERLNMEYER & H. AEBI, *Helv.* **42**, 204 (1959).

²⁾ R. F. BEERS & T. W. SIZER, *J. biol. Chemistry* **195**, 133 (1952).

³⁾ R. N. FEINSTEIN, *J. biol. Chemistry* **180**, 1197 (1949).

menge und der stabilisierenden Wirkung inerter Begleitproteine, sondern auch von der Zusammensetzung der Effektorengarnitur abhängt. Wie aus den vorliegenden Versuchen hervorgeht, kommt diese Hemmwirkung je nach Versuchstemperatur in unterschiedlicher Weise zur Geltung. Beim Vergleich von Ergebnissen, welche unter verschiedenen Bedingungen erzielt worden sind, ist schliesslich auch zu berücksichtigen, dass die Wirkung eines Inhibitors nicht nur von der Versuchstemperatur abhängt, sondern auch von der Reihenfolge, in welcher die Zugabe zum Ansatz erfolgt. Das Verhalten einiger praktisch wichtiger Katalase-Inhibitoren im Routine-Test von FEINSTEIN soll hier vor allem deshalb untersucht werden, weil der Organ-Katalase heute vermehrte biologische Bedeutung beigemessen wird, speziell was die Empfindlichkeit der Gewebe gegenüber ionisierenden Strahlen anbelangt.

Experimenteller Teil

1. *Methodisches.* Die Bestimmung der Katalaseaktivität erfolgte durchweg nach FEINSTEIN³⁾ in leicht modifizierter Form. Die technischen Einzelheiten dieser Methodik sind beschrieben¹⁾⁴⁾. In stark verdünnter Lösung zeigt Katalase bekanntlich eine relativ rasche Aktivitätsabnahme. So hat BERGMAYER⁵⁾ bei einer Katalasekonzentration von 1 γ /ml einen Aktivitätsabfall von 0,5–1,0% je Min. ermittelt. Diese Veränderung der Aktivität ist nach eigenen Erfahrungen bei Reinpäparaten ausgeprägter als im Organhomogenat. Bei kurzzeitigen Methoden dürfte dieser rasche Aktivitätsabfall praktisch ohne Einfluss sein; bei relativ langer Inkubierungsdauer – wie dies hier der Fall ist – muss diesem Umstand speziell bei der Prüfung von Inhibitoren Rechnung getragen werden. Bei der Ermittlung der Restaktivität werden nämlich Werte miteinander verglichen, die zu einem verschiedenen Zeitpunkt bestimmt worden sind. Es ist daher unumgänglich, in regelmässigen Abständen, z. B. alle 2 Min. (jeder vierte Ansatz der Reihe) eine Kontrollbestimmung der Katalaseaktivität ohne Inhibitorzusatz auszuführen. Der Zeitplan muss demnach so angesetzt werden, dass entsprechende Vergleichswerte möglichst gleichzeitig bestimmt werden können. Je nachdem, ob es sich um die Aufnahme einer Zeitumsatzkurve handelt oder um vergleichende Aktivitätsbestimmungen, wird dieser Zeitplan verschieden aussehen. Bezüglich Einzelheiten wird auf ⁴⁾ verwiesen.

Als Katalase-Inhibitoren gelangten folgende Substanzen zur Verwendung: Hydroxylaminhydrochlorid, Na-Azid, Na-Formiat, Kaliumferrocyanid (alle *p. a.* MERCK), 2,4-Dichlorphenol (FLUKA), 3-Amino-1,2,4-triazol⁶⁾ und L-(+)-Ascorbinsäure (ROCHE). Normalerweise erfolgte die Zugabe der Inhibitoren (1 ml) zum Substratpuffergemisch (8 ml) erst unmittelbar vor Versuchsbeginn, d. h. 10–15 Sek. vor dem Zusatz der Fermentlösung (1 ml). Auf die Rolle, welche die Reihenfolge in dieser Hinsicht spielt, wird unten eingegangen werden. Als Enzym wurde durchweg kristallisierte Leberkatalase «BOEHRINGER» verwendet (Kat.-F.: ca. 40000), meist in einer Konzentration von 2,5 γ /Ansatz à 10 ml.

2. *Einfluss der Temperatur auf die Inhibitorwirkung von Azid, Hydroxylamin, Dichlorphenol und Aminotriazol.* Die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Bestimmungsmethoden gegenüber Katalase-Inhibitoren ist bekannt¹²⁾. In Tab. 1 sind die Halbwertskonzentrationen, wie sie mit der Perborat-Methode für verschiedene Inhibitoren bei 0° und 37° bestimmt worden sind, zusammengestellt. Zum Vergleich sind auch I_{50} -Werte, die auf Grund von Angaben der Literatur berechnet worden sind, angegeben. In beiden Fällen bestehen zum Teil beträchtliche Unterschiede, welche vor allem auf die ungleichen Inkubierungstemperaturen zurückzuführen sein dürften. Besonders ausgeprägt ist die Temperaturabhängigkeit der Inhibitorwirkung von Na-Azid. So gelingt es z. B. bei Gegenwart von $2 \cdot 10^{-6}$ -m. Azid, allein durch Senkung der Versuchstemperatur von 37° auf 0° die Restaktivität von 90% auf 17% herabzusetzen. In Fig. 1 ist das Verhalten von Na-Azid (1a) und Hydroxylamin (1b) dargestellt. Obwohl beide Verbindungen

⁴⁾ R. GRESSLY, Dissertation Bern 1959.

⁵⁾ H. U. BERGMAYER, *Biochem. Z.* **327**, 255 (1955).

⁶⁾ Herrn Prof. D. APPLEMAN, College of Agriculture, University of California, Los Angeles, sei für die Überlassung einer Probe Aminotriazol hiermit bestens gedankt.

nach KEILIN & NICHOLLS⁷⁾ derselben Inhibitor-Klasse zuzuordnen sind, verhalten sie sich verschieden: Im Falle von Na-Azid besteht im ganzen experimentell zugänglichen Inhibitor-Konzentrationsbereich eine starke Temperaturabhängigkeit, und zwar auch bei denjenigen Konzentrationen (z. B. 10^{-6} -m.), welche bei 37° praktisch kaum hemmen. Im Gegensatz dazu tritt beim Hydroxylamin ein deutlicher Effekt erst bei relativ hohen Konzentrationen auf ($2 \cdot 10^{-7}$ bis 10^{-6} -m.), während ein solcher bei Konzentrationen, die bei 37° nur wenig hemmen ($\alpha = 0,93 - 0,90$) praktisch ausbleibt.

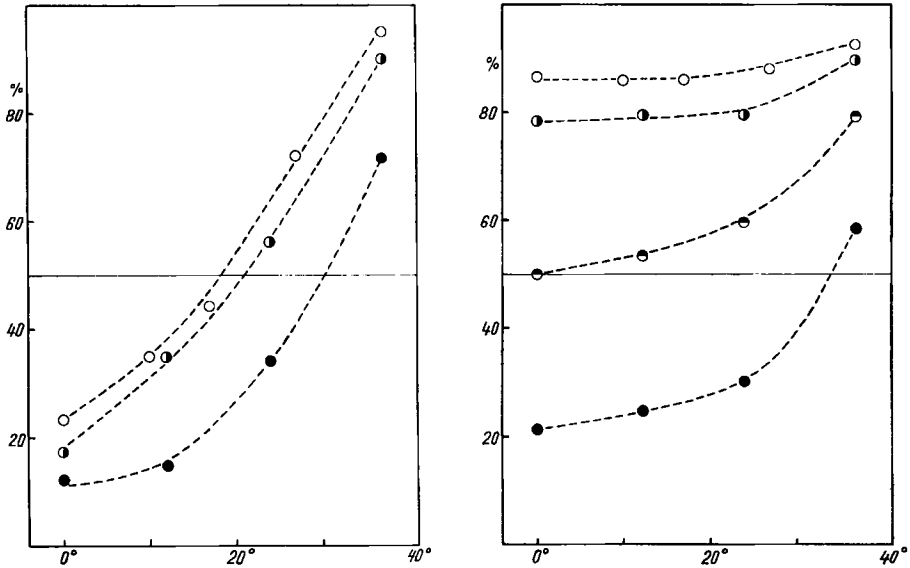


Fig. 1 a und 1 b. Hemmung der Katalase-Aktivität durch Na-Azid und Hydroxylamin
Restaktivität als Funktion der Versuchstemperatur

Fig. 1 a (links)	Na-Azid	10^{-6} -m. ○
		$2 \cdot 10^{-6}$ -m. ●
		$5 \cdot 10^{-6}$ -m. ●
Fig. 1 b (rechts)	Hydroxylamin	$5 \cdot 10^{-8}$ -m. ○
		10^{-7} -m. ○
		$2 \cdot 10^{-7}$ -m. ●
		10^{-6} -m. ●

Ordinate: Restaktivität in Prozent (Kontrolle = 100%)

Abszisse: Versuchstemperatur in °C

Fig. 2 gibt das Verhalten von 2,4-Dichlorphenol und von 3-Amino-1,2,4-Triazol wieder. Während sich Dichlorphenol, der aktivste Inhibitor aus der Phenolreihe⁸⁾, ähnlich wie Hydroxylamin verhält, besteht beim Aminotriazol eine Temperaturabhängigkeit im umgekehrten Sinne: Der Hemmeffekt ist bei 37° am grössten, wobei die inverse Temperaturabhängigkeit bei mittleren Inhibitorkonzentrationen am deutlichsten in Erscheinung tritt. Bei 10^{-2} -m. und 10^{-1} -m. Endkonzentration ergeben sich z. B. bei 0° Restaktivitäten von 95% bzw. 69% und bei 37° solche von 83% bzw. 47%. Die Aminotriazolkonzentration, welche zur Erzielung einer *in-vitro*-Hemmung erforderlich ist, muss als sehr hoch bezeichnet werden (vgl. Tab. 1) und ist möglicherweise auf die Gegenwart eines Co-Faktors zurückzuführen.

⁷⁾ D. KEILIN & P. NICHOLLS, *Biochim. biophys. Acta* **29**, 302 (1958).

⁸⁾ P. L. GOLDACRE & A. W. GALSTON, *Arch. Biochemistry Biophys.* **43**, 169 (1953).

Tabelle 1. *Wirkung einiger Katalase-Inhibitoren bei verschiedenen Temperaturen*
 Vergleich der I_{50} -Werte aus der Literatur mit eigenen Daten

Inhibitor	Halbwertskonzentration bestimmt nach der Perboratmethode von FEINSTEIN ³⁾		Halbwertskonzentration ermittelt nach Literaturangaben		
	Temp. °C	I_{50}	Temp. °C	I_{50}	Autor
Hydroxylamin	0	$2,0 \cdot 10^{-7}$ -m.	0	$1,25 \cdot 10^{-7}$ -m.	⁹⁾
			16,2	$7,2-10 \cdot 10^{-7}$ -m.	¹⁰⁾
	37	$9,2 \cdot 10^{-7}$ -m.	18,0	$6,30 \cdot 10^{-7}$ -m.	¹¹⁾
Na-Azid	0	$1,9 \cdot 10^{-7}$ -m.	0	$5,0 \cdot 10^{-8}$ -m.	⁹⁾
	22	$8,0 \cdot 10^{-7}$ -m.	12,2	$3,0-7,8 \cdot 10^{-7}$ -m.	¹⁰⁾
	37	$4,7 \cdot 10^{-6}$ -m.	18,0	$6,3 \cdot 10^{-8}$ -m.	¹¹⁾
Dichlorphenol	0	$8,4 \cdot 10^{-6}$ -m.	0	$7,1-27 \cdot 10^{-6}$ -m.	¹²⁾
	24	$1,0 \cdot 10^{-4}$ -m.	0	$2,0 \cdot 10^{-6}$ -m.	⁸⁾
	37	$1,9 \cdot 10^{-4}$ -m.	37,0	$1,8-4,7 \cdot 10^{-4}$ -m.	¹²⁾
Aminotriazol	0	$1,7 \cdot 10^{-1}$ -m.			¹³⁾
	37	$1,3 \cdot 10^{-1}$ -m.			vgl. ¹⁴⁾

3. *Beeinflussung der Katalase-Aktivität durch Formiat.* Ameisensäure wird durch Katalase und H_2O_2 peroxydatisch oxydiert¹⁵⁾. Bei relativ hoher Konzentration (0,1–0,2-m.) wirkt Formiat andererseits als Katalase-Inhibitor⁴⁾. Da Formiat bei 0° stärker hemmt ($I_{50} = 2 \cdot 10^{-2}$ -m.) als bei 37° ($I_{50} = 2,5 \cdot 10^{-1}$ -m.), darf dieses der Gruppe I zugeordnet werden. Die Untersuchung dieser Hemmwirkung bei verschiedener Versuchstemperatur und bei variiert Inhibitorkonzentration hat ergeben, dass unter bestimmten Voraussetzungen nicht eine Hemmung, sondern eine Steigerung der Enzymaktivität resultiert. Fig. 3 zeigt das Verhalten der Restaktivität innerhalb des Konzentrationsbereiches von 10^{-5} bis 10^{-1} -m. bei 3 Versuchstemperaturen (37°, 22° und 0°). Es lässt sich daraus entnehmen, dass die erwähnte Steigerung vor allem bei 22° in Erscheinung tritt. Sie ist bei dieser Versuchstemperatur bereits bei 10^{-4} -m. messbar und erreicht zwischen $5 \cdot 10^{-3}$ bis 10^{-2} -m. einen Maximalwert von 116–120% (Aktivität des Kontrollansatzes = 100%). Bei weiterer Zunahme der Formiatkonzentration kommt es rasch zu einer starken Hemmung der Katalase; so beträgt die Restaktivität bei 0,2-m. noch 40%. Bei 37° ist die Steigerung nur in geringem Ausmass vorhanden (max. +6%), während eine solche bei 0° völlig ausbleibt.

Zwecks weiterer Klärung dieser (scheinbaren) Aktivitätssteigerung ist die Wirkung von Formiat auf den Verlauf der Zeitumsatzkurve untersucht worden. Werden die Umsätze bei 22° nach 1, 2 und 5 Min. bestimmt, so ergibt sich beim Vergleich der Ansätze ohne und mit $5 \cdot 10^{-3}$ -m. Formiat folgendes: Während nach 1 Min. eine geringgradige, aber sicher feststellbare Hemmung zu beobachten ist, geht diese nach ca. 2 Min. in die oben beschriebene Aktivierung über, d. h. es resultiert in Gegenwart von Formiat ein etwas gestreckterer Verlauf der Zeitumsatzkurve. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der früher gemachten Feststellung, wonach Effektoren der Katalase keinen wesentlichen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Perboratspaltung aus-

⁹⁾ Y. OGURA, Y. TONOMURA, S. HINO & H. TAMIYA, J. Biochemistry (Japan) **37**, 153 (1950).

¹⁰⁾ H. BLASCHKO, Biochem. J. **29**, 2303 (1935).

¹¹⁾ D. KEILIN & E. F. HARTREE, Biochem. J. **39**, 148 (1945).

¹²⁾ R. VAN REEN, Arch. Biochemistry **50**, 219 (1954).

¹³⁾ R. N. FEINSTEIN, S. BERLINER & O. GREEN, Arch. Biochemistry Biophys. **76**, 32 (1958).

¹⁴⁾ E. MARGOLIASH & A. NOVOROZSKY, Biochem. J. **68**, 468 (1958).

¹⁵⁾ B. CHANCE, J. biol. Chemistry **194**, 471 (1952); D. KEILIN & E. F. HARTREE, Biochem. J. **60**, 310 (1955).

üben. Es sind daher einige andere Inhibitoren in dieser Hinsicht untersucht worden. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, zeigen Azid, Dichlorphenol, Ascorbat und Kaliumferrocyanid keine solche Beeinflussung, indem bei allen diesen Inhibitoren die Restaktivität von der Inkubierungsdauer bzw. vom Spaltungsausmass unabhängig ist. Formiat scheint demnach auch in dieser Hinsicht eine Sonderstellung einzunehmen.

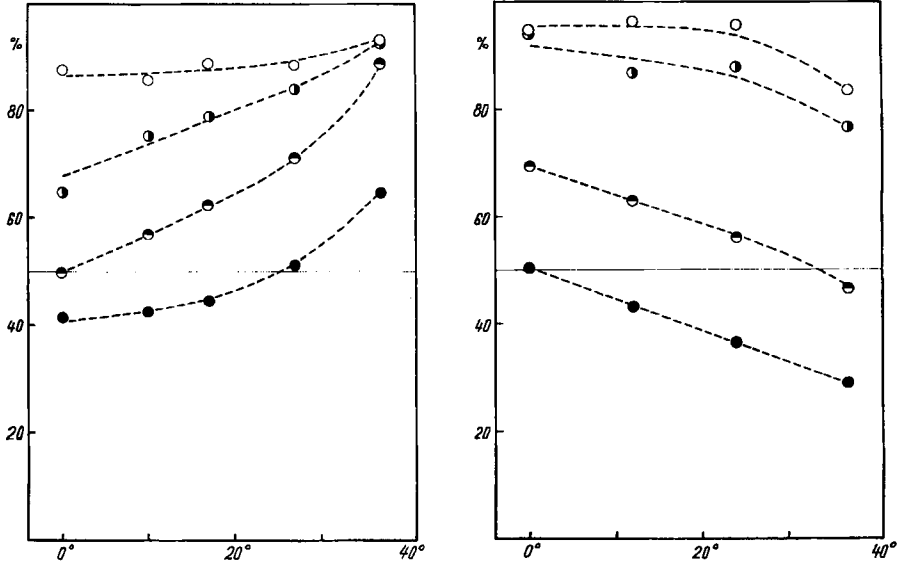


Fig. 2 a und 2 b. Hemmung der Katalase-Aktivität durch Dichlorphenol und Aminotriazol
Restaktivität als Funktion der Versuchstemperatur

- | | | |
|-------------------|-----------------------|---------------------------|
| Fig. 2 a (links) | 2,4-Dichlorphenol | $6,3 \cdot 10^{-6}$ -m. ○ |
| | | $2 \cdot 10^{-5}$ -m. ● |
| | | $5 \cdot 10^{-5}$ -m. ◐ |
| | | 10^{-4} -m. ● |
| Fig. 2 b (rechts) | 3-Amino-1,2,4-triazol | 10^{-2} -m. ○ |
| | | $2 \cdot 10^{-2}$ -m. ◐ |
| | | 10^{-1} -m. ● |
| | | $2 \cdot 10^{-1}$ -m. ● |

Ordinate: Restaktivität in Prozent (Kontrolle = 100%)

Abszisse: Versuchstemperatur in ° C

4. Reihenfolge der Zusätze. Die Mischung der verschiedenen Reaktionspartner, nämlich 1. Substrat-Puffer-Gemisch (S), 2. Enzym (E) und 3. Inhibitor (I) kann in unterschiedlicher Reihenfolge vorgenommen werden. Von den beiden Möglichkeiten, wie sie im folgenden Schema aufgeführt sind, entspricht die Variante A dem hier meist gewählten Vorgehen.



Dabei wird der Inhibitor zum Substrat-Puffer-Gemisch zugesetzt, unmittelbar (10-15 Sek.) bevor die Enzymlösung in den Ansatz pipettiert wird. Werden Inhibitor und Ferment gleichzeitig dem Substrat-Puffer-Gemisch zugefügt, so zeigen die geprüften Inhibitoren ein Verhalten, wel-

ches im wesentlichen demjenigen bei der Variante A entspricht. Was die Grösse der mit diesem Verfahren ermittelten I_{50} -Werte anbetrifft, sei auf Tab. 1 verwiesen.

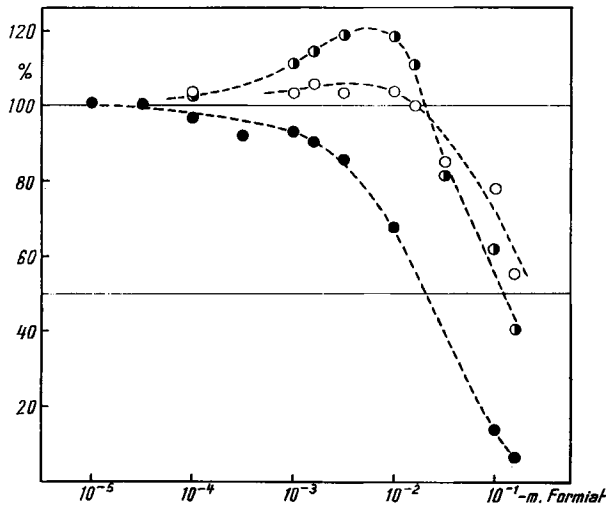


Fig. 3. Effekt von Na-Formiat auf die Katalase-Aktivität
Relative Aktivität bei verschiedenen Versuchstemperaturen

a) ● 0°, b) ● 22°, c) ○ 37°

Ordinate: Katalase-Aktivität (Kontrolle = 100%) Abszisse: Formiatkonzentration

Tabelle 2. Beeinflussung des Verlaufes der Zeit-Umsatzkurve durch verschiedene Katalase-Inhibitoren
Temperatur 22°. Versuchsdauer: 1, 2 und 5 Min. Substrat: 0,06-m. Na-Perborat, pH = 7,0;
Enzym: krist. Leberkatalase

Inhibitor (Endkonz.)	Versuchsdauer in Min.	H ₂ O ₂ -Spaltung in mÄq. KMnO ₄		Restaktivität in Prozent (Kontrolle) (= 100%)
		Kontrollansatz	Versuchsansatz	
Na-Formiat (5 · 10 ⁻³ -m.)	1	2,10	2,05	97
	2	3,05	3,15	103
	5	4,80	5,40	113
Na-Azid (5 · 10 ⁻⁷ -m.)	1	2,72	2,07	76
	2	3,64	2,74	75
	5	5,74	4,42	77
2,4-Dichlorphenol (2 · 10 ⁻⁵ -m.)	1	3,20	2,54	79
	2	3,97	3,17	80
	5	6,19	4,97	80
Ascorbat (5 · 10 ⁻⁶ -m.)	1	2,47	1,90	77
	2	3,30	2,42	73
	5	5,20	3,80	73
Kaliumferrozyanid (5 · 10 ⁻⁶ -m.)	1	2,35	1,97	84
	2	3,27	2,65	81
	5	4,87	3,90	80

Variante B entspricht dem Vorgehen, wie es z. B. von BEERS & SIZER¹⁶⁾ zum Studium progressiv verlaufender Hemmungen verwendet worden ist. Dabei werden zunächst Enzym und Inhibitor gemischt und eine bestimmte Zeit vorinkubiert, bevor das Enzym-Inhibitor-Gemisch zur Substrat-Puffer-Lösung zugesetzt wird. Um abzuklären, welchen Einfluss eine derartige Vorinkubierung auf das Ausmass des Hemmeffektes hat, sind die in Tab. 3 wiedergegebenen Experimente ausgeführt worden. Daraus geht hervor, dass die Inhibitorwirkung von der Dauer der Vorinkubierung nur wenig abhängt, sofern die Perboratspaltung bei 37° erfolgt. Bei den 3 untersuchten Inhibitoren ist selbst nach 60–80 Min. langer Vorinkubierung (Enzym + Inhibitor) bei 0° eine Verstärkung der Hemmung von nur 10–20% festzustellen.

Tabelle 3. *Einfluss der Vorinkubierung der Katalase in Gegenwart von Inhibitoren. Reihenfolge der Zusätze nach Variante B, sonst nach Methode FEINSTEIN*
Versuchstemperatur 37°; Enzym: krist. Leberkatalase; Substrat: 0,06-m. Na-Perborat + 0,013-m. Phosphatpuffer

Dauer der Vorinkubierung von Enzym und Inhibitor	Restaktivität in % (Kontrolle = 100%)		
	Na-Azid (10 ⁻⁶ -m.)	Na-Formiat (2 · 10 ⁻¹ -m.)	2,4-Dichlorphenol (10 ⁻⁴ -m.)
0 Min.	75,9	41,3	64,3
20	69,1	39,1	66,9
40	66,2	37,9	62,2
60	63,4	32,2	57,5
80	61,4	28,3	53,3

Bei einigen Inhibitoren ist der Einfluss der Vorinkubierungsdauer auf die Änderung des Hemmeffektes auch dann etwa gleich, wenn die nachfolgende Bestimmung der Katalaseaktivität bei 0° vorgenommen wird. Dies ist jedoch nicht bei allen geprüften Inhibitoren der Fall. Bei Na-Azid kommt es z. B. schon nach ca. einer 5–10 Sek. dauernden Vorinkubierung zu einer wesentlich stärkeren Hemmung der bei 0° bestimmten Fermentaktivität. Aus Tab. 4 geht hervor, dass

Tabelle 4. *Bedeutung der Zusatz-Reihenfolge und der Versuchstemperatur für die Stärke der Inhibitorwirkung*

Vergleich der mit den Varianten A und B ermittelten Restaktivitäten bei 0° und 37°. Dauer der Vorinkubierung von Enzym und Inhibitor 10–20 Sek. Angegeben sind die Restaktivitäten in % (Kontrolle ohne Inhibitor = 100%)

Inhibitor	37°		0°	
	Variante A (ohne Vorinkubierung)	Variante B (mit Vorinkubierung)	Variante A (ohne Vorinkubierung)	Variante B (mit Vorinkubierung)
Na-Azid (10 ⁻⁷ -m.)	93%	92%	77%	16%
2,4-Dichlorphenol (2 · 10 ⁻⁵ -m.)	78%	73%	64%	22%
Hydroxylamin (2 · 10 ⁻⁷ -m.)	86%	79%	49%	29%
Na-Formiat (5 · 10 ⁻² -m.)	95%	93%	41%	47%

¹⁶⁾ R. F. BEERS & T. W. SIZER, Arch. Biochemistry 60, 115 (1956).

Na-Azid und 2,4-Dichlorphenol bei beiden Varianten etwa gleich stark wirken, sofern die von FEINSTEIN empfohlene Versuchstemperatur (37°) gewählt wird. Wird bei 0° inkubiert, dann genügt bereits die vorgängige Mischung von Enzym und Inhibitor unmittelbar vor Zugabe zum Substrat, um die Restaktivität auf einen Bruchteil ($1/3-1/5$) zu reduzieren. Daraus geht hervor, dass die hier für Variante A beschriebene Temperaturabhängigkeit der Hemmwirkung verschiedener Katalase-Inhibitoren bei der Bestimmung nach Variante B noch wesentlich stärker ausfällt.

Diskussion

Auf Grund ihrer Wirkungsweise sind die H-Donoren der Katalase kürzlich von KEILIN & NICHOLLS⁷⁾ in 6 Gruppen eingeteilt worden. Diese Klassierung basiert vor allem auf dem Verhalten der Katalase in spektroskopischer Hinsicht, indem die zwischen den verschiedenen Komplexen bestehenden Gleichgewichte in charakteristischer Weise beeinflusst werden. Allen diesen H-Donoren ist die Eigenschaft gemeinsam, die Katalaseaktivität zu hemmen. Wenn versucht wird, die mit der FEINSTEIN-Methode gemachten Beobachtungen damit in Beziehung zu bringen, muss bedacht werden, dass es sich bei den nach 5 Min. ermittelten Umsätzen um eine Resultante handelt. Diese dürfte einerseits durch die Anfangsgeschwindigkeit (V_0) und andererseits durch die Inaktivierungsgeschwindigkeit (Bildung von sog. Komplex II) gegeben sein. Da bei der Perboratmethode mit einem relativ grossen H_2O_2 -Überschuss und langer Versuchsdauer gearbeitet wird, verläuft die Bildung von Komplex II eher rasch, was eine entsprechend starke Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit während des Versuches zur Folge hat.

Bei Gegenwart von Katalase-Inhibitoren, welche u. a. die Bildung inaktiver Komplexe beschleunigen (Komplex II bzw. NO-Ferro-Katalase), zeigt der Verlauf der Zeit-Umsatzkurve keine sicher fassbaren Veränderungen. In dieser Hinsicht verhalten sich die getesteten Vertreter der Klassen (nach KEILIN & NICHOLLS) I (Ascorbat, Ferrocyanid), II (Phenole) und V (Azid, Hydroxylamin) praktisch gleich. Es muss in allen Fällen eine rasche Gleichgewichtseinstellung (< 1 Min.) angenommen werden. Einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf der H_2O_2 -Spaltung zeigt dagegen Formiat, welches als Vertreter der Klasse III eine Hemmung der Bildung von inaktivem Komplex II bewirkt. Diese stabilisierende Wirkung kann unter geeigneten Versuchsbedingungen als «Aktivierungseffekt» in Erscheinung treten. Die in Fig. 3 dargestellten Kurven bringen übrigens die Resultanten-Natur der hier gemessenen Umsätze deutlich zum Ausdruck.

Azid und Hydroxylamin sind in kinetischer Hinsicht gut untersuchte Katalase-Inhibitoren, welche nach KEILIN & NICHOLLS⁷⁾ beide der Klasse V angehören. Nach BEERS¹⁷⁾ besitzen sie einen recht ähnlichen Hemm-Mechanismus, indem die Dissoziationskonstante K_5 ($E \rightleftharpoons EI$) in beiden Fällen 10^3-10^4 mal grösser ist als K_6 ($ES \rightleftharpoons ESI$). Beide verdanken somit ihre grosse Wirksamkeit dem Umstand, dass der ES-Komplex eine viel grössere Affinität zum Inhibitor aufweist als das freie Enzym. Die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit der Azid- und der Hydroxylamin-Hemmung weist andererseits darauf hin, dass die Eigenschaften der entsprechenden Enzym-Inhibitor Komplexe doch recht verschiedener Natur sind. Da der I_{50} -Wert vor allem von der Grösse der Dissoziationskonstante K_6 abhängt, dürfte diese Feststellung speziell für den Komplex ESI zutreffen. – Dass Azid die Perboratspaltung bei 37° ohne Rücksicht auf die Zusatz-Reihenfolge gleich

¹⁷⁾ R. F. BEERS JR., J. physical Chemistry 59, 25 (1955).

stark hemmt, dürfte mit der von BEERS & SIZER¹⁶⁾ gemachten Beobachtung zusammenhängen, dass bei Zimmertemperatur praktisch keine, bei 5° dagegen eine ausgeprägte «progressive Katalasehemmung» durch Azid besteht. In der Kälte zeigt Azid einen wesentlich stärkeren Hemmeffekt, wenn die Katalase nicht direkt zugesetzt wird ($E \rightarrow I + S$), sondern mit dem Inhibitor vorinkubiert worden ist ($E + I \rightarrow S$). Dieser Unterschied ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das bei der Vorinkubierung gebildete EI direkt in den inaktiven Komplex ESI übergeht und daher weniger ES (Komplex I) zur Reaktion mit entweder H_2O_2 oder Azid zur Verfügung steht. Nicht nur bei Azid, sondern auch im Falle von Dichlorphenol führen die Varianten A und B – sofern die Bestimmung bei 0° ausgeführt wird – zu verschiedenen I_{50} -Werten (vgl. Tab. 4). Dieses analoge Verhalten steht mit der von BEERS & SIZER¹⁶⁾ geäußerten Vermutung in Einklang, dass diesen beiden Inhibitoren ein ähnlicher Wirkungsmechanismus eigen ist.

Im Gegensatz zur starken Hemmung, welche Aminotriazol *in vivo* auf die Katalase-Aktivität verschiedener Organe ausübt, ist der *in-vitro*-Effekt auf krist. Leberkatalase sehr gering. Wird die Aktivitätsabnahme mit der FEINSTEIN-Methode nach Variante A bestimmt, resultieren I_{50} -Werte von 0,13–0,17-m., was im Vergleich zur vorgelegten Substratkonzentration (0,06-m.) einem 2-3fachen Überschuss entspricht. Nach FEINSTEIN *et al.*¹³⁾ führen AT-Konzentrationen von 0,5-m. und mehr zu einem unspezifischen Aktivitätsabfall infolge Denaturierung. Andererseits haben MARGOLIASH *et al.*¹⁴⁾ gezeigt, dass krist. Leberkatalase bereits durch viel geringere Aminotriazol-Konzentrationen gehemmt werden kann ($I_{50} \sim 5 \cdot 10^{-3}$ -m.), sofern optimale Mengen eines Co-Faktors (z. B. Ribonucleinsäure) zugegen sind. Ähnliche Eigenschaften zeigt der von FEINSTEIN *et al.*¹³⁾ beschriebene «heat stable Factor» sowie ein thermolabiler Faktor, welche in geringer Menge selbst in kristallisierter Leberkatalase vorzukommen scheinen. Obwohl Aminotriazol auch in dem von MARGOLIASH benützten System bei 37° stärker wirksam ist als bei 0°, lässt sich nicht entscheiden, in welchem Ausmass bei der hier untersuchten Aminotriazol-Hemmung Co-Faktoren oder evtl. unspezifische Faktoren beteiligt sind.

Der Kommission für Atomwissenschaft des Schweiz. Nationalfonds sei hiermit für materielle Unterstützung bestens gedankt.

SUMMARY

1. The inhibiting action at 0° and 37° C of a number of Catalase H-Donors on the purified liver enzyme has been compared using FEINSTEIN's perborate-method. Furthermore the effect of enzyme preincubation with inhibitor has been investigated.

2. According to the dependency of the I_{50} -values on temperature, the inhibitors can be divided in three groups; with the exception of 3-Amino-1,2,4-triazole, they all inhibit the more the lower the temperature. This influence is pronounced in azide and formate; it is slight however in 2,4-Dichlorphenol and Hydroxylamine.

3. Under certain conditions formate, acting as a stabilisor of complex I, does not inhibit but causes an apparent increase in catalatic activity.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern