

## Untersuchungen an künstlichen Peroxydasen

HUGO THEORELL und ANDREAS C. MAEHLY

*Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska Avdelningen, Stockholm, Schweden*

Theorell und Mitarbeiter haben gezeigt, dass sich die Meerrettich-Peroxydase (Peroxydase II)<sup>1</sup> mit HCl in Aceton in der Kälte in prosthetische Gruppe (Protohämin) und Trägerprotein spalten lässt, sowie das eine erneute Zugabe von Protohämin und anderen Häminen zu einer Rekombination unter Änderung des sichtbaren Spektrums führt<sup>2</sup>. Die dabei entstehenden Verbindungen sollen hier „künstliche Peroxydasen“ genannt werden („synthetic peroxidases“ nach Theorell<sup>3</sup>).

Theorell und Paul<sup>4</sup> haben den Verlauf der sauren Spaltung der Meerrettich-Peroxydase an Hand der Änderung der Extinktion bei den Wellenlängen 490, 510, 530 und 550 m $\mu$  verfolgt und gefunden, dass dieser einer Reaktion I. Ordnung entspricht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nun, die Rekombination der freien Proteinkomponente mit verschiedenen Häminen messend zu verfolgen und die dabei gebildeten künstlichen Peroxydasen näher zu charakterisieren.

### METHODEN

#### A. Ausgangsmaterialien

Zur Gewinnung des freien Proteins diente eine aus 200 kg Meerrettichwurzeln nach den Angaben von Theorell<sup>5</sup> gewonnene Peroxydasepräparation:

Büschel feiner Nadeln von bis zu 16  $\mu$  Länge. Eigenschaften der elektrodiagnostischen Probe:

P. Z.\*: 1020. N-Gehalt:  $12,5 \pm 0,3$  %

$\frac{\epsilon_{402}}{\epsilon_{280}} = \text{R. Z.**} = 3,04$ . Hämingehalt: 1,36 %

Fe-Gehalt: 0.12 %

\* P. Z. = „Purpurogallinzahl“<sup>6</sup>

\*\* R. Z. = „Reinheitszahl“ =  $\frac{\Sigma_{402}}{\Sigma_{280}}$  bei pH 7.0.

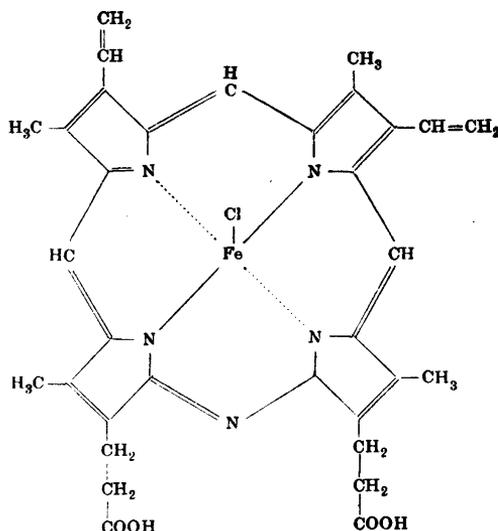


Abb. 1. Azahämmin.

Die Spaltung wurde im Prinzip nach Theorell<sup>2</sup> durchgeführt, nur wurden die Bedingungen etwas schärfer gewählt: die dialysierte, etwa 0,5—1,5 %ige Peroxydase-Lösung wurde 2mal je 20 Min. bei 0° mit 0.1 % HCl-Aceton behandelt, jeweils kurz zentrifugiert und in 1%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gelöst. Anschliessend wurde unmittelbar mit 1/15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 7,1 gebracht und die Lösung im Kühlschrank verwahrt. Unter diesen Bedingungen wird zwar ein Teil des freien Proteins inaktiviert (die Aktivität nach erfolgter Rekombination liegt in der Regel zwischen 60 und 70 %), dafür aber eine fast quantitative Spaltung erzielt (98—99,8 %). Auf diese Weise kann in der Regel der Einfluss ungespaltener „Proto“-Peroxydase auf die Messungen vernachlässigt werden.

Als künstliche prosthetische Gruppen wurden folgende Hämine verwendet:

1. Protohämmin. Aus Rinderblut hergestelltes krystallisiertes Hämmin wurde nach einer von Fischer gegebenen Vorschrift<sup>1</sup> 2mal aus Eisessig umkrystallisiert.

2. Deuterohämmin. Dasselbe Präparat wie bei Theorell und Mitarb.<sup>1</sup>

3. Mesohämmin. Nach Zaleski<sup>8</sup> hergestellt und nach Fischer und Orth<sup>7</sup> krystallisiert.

4. Phäophorbid a-Hämmin. Ebenfalls wie bei Theorell und Mitarb.<sup>2</sup>; das Hämmin wurde nach Fischer und Bäuml<sup>7</sup> gewonnen und aus Chloroform-Petroläther umkrystallisiert.

5. Chlorin e<sub>6</sub>-Hämmin. Das Porphyrin wurde nach<sup>3</sup> synthetisiert und Eisen nach Zaleski<sup>8</sup> eingeführt.

6. Azahämin. Eine Probe dieser Substanz wurde uns in dankenswerter Weise von Dr. W. G. Rawlinson zur Verfügung gestellt. Es wurde nach Lemberg und Holden<sup>10</sup> hergestellt.

Zur Analyse wurde 2 Std. bei 30° im Hochvakuum getrocknet.

7,44 mg Substanz gaben 0,682 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bei 24° und 745 mm Hg.

C <sub>33</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub> N <sub>5</sub> FeCl (652.93)	ber.	N 10.73
	gef.	» 10.30

Formel siehe Abb. 1.

### B. Herstellung der künstlichen Peroxydasen

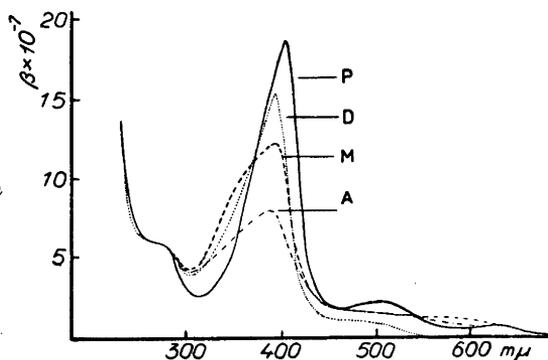
Da eine präzise stöchiometrische Reaktion zwischen Protein und Hämin praktisch nicht durchführbar ist kamen 2 Möglichkeiten für die Herstellung der künstlichen Rekombinationsprodukte in Betracht: Überschuss an Protein oder Überschuss an Hämin. Da in der Literatur Angaben über die Empfindlichkeit des freien Proteins gegenüber Dialyse und Erwärmung vorlagen<sup>1,2</sup> wurde zuerst ein Proteinüberschuss verwendet. Die Dialyse vermochte aber nicht die freie Proteinkomponente durch Denaturierung oder auch Desaktivierung völlig zu eliminieren. Da die native Peroxydase sehr wärmebeständig ist<sup>11,12</sup> dachten wir, das „empfindliche“ freie Protein durch Erwärmen zu denaturieren. Erstaunlicherweise gelang dies aber keineswegs. Systematische Versuche über die Wärmebeständigkeit von Peroxydase und freiem Protein wurden deshalb nötig, worüber unten berichtet wird.

Der andere Weg hingegen erwies sich als gangbar:

Die auf pH 7 gepufferte Lösung des Proteins wurde mit einem Überschuss der Lösung des betreffenden Hämins in 0,1 N NaOH (mit 1/15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7 gebracht) versetzt. Nach einem Tag wurde mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gesättigt, wobei sowohl die gebildete Peroxydase wie auch der Überschuss an Hämin ausfielen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Niederschlag in Wasser gelöst und gegen destilliertes Wasser gründlich dialysiert. Zum Dialysieren der sehr kleinen Volumina wurde ein geeignet geformtes, kurzes, beiderseits offenes Rohr an einem Ende mit einer Cellophanmembran verschlossen und in ein Becken mit destilliertem Wasser getaucht. Beim Abpipettieren kann der letzte Tropfen durch leichten Druck gesammelt und aufgesaugt werden. Nach einer Wiederholung der Fällung ging kein Hämin mehr in Lösung, die somit lediglich die künstliche Peroxydase enthielt. Das Spektrum dieser Lösung wurde nun bei pH 7,1 in 0,01 M Phosphatpuffer gemessen. Sodann wurde etwas festes KCN zugegeben und das Spektrum erneut ausgemessen. Die spezifische Absorption wurde auf Grund der Annahme gleicher Absorption bei

Abb. 2. Absorptionsspektren der künstlich hergestellten Peroxydase.

P = Protohämin  
 D = Deuterohämin  
 M = Mesohämin  
 A = Azahämin



275  $m\mu$  für alle künstlichen Peroxydase berechnet. Bei dieser Wellenlänge \* liegt ein charakteristisches Plateau, wie aus Abb. 2 hervorgeht. Bewiesen ist die Annahme gleicher Absorption bei dieser Wellenlänge nicht, hingegen wird sie durch die relative Grösse der Extinktionszunahme bei der Rekombination gestützt.

C. Die Messung der Rekombination

An Hand der Spektren des reinen Hämins bei pH 7,1 einerseits und der aus demselben Hämin + Peroxydaseprotein entstandenen Verbindung andererseits wurde die Wellenlänge grösster Absorptionsdifferenz bestimmt. Die dabei für 5 Hämine gefundenen Werte sind mit anderen, meist neu bestimmten spektroskopischen Daten in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Häminkomponente	Freies	Hämin	Künstliche Peroxydase		Peroxydase-CN-Komplex		Wellenlänge max.*** Differenz, $\lambda \Delta \epsilon = \max m\mu$
	$\epsilon_{\max}$ $m\mu$	$\beta \times 10^{-7}$	$\epsilon_{\max}$ $m\mu$	$\beta \times 10^{-7}$	$\epsilon_{\max}$ $m\mu$	$\beta \times 10^{-7}$	
Protohämin	362	10.6	402	18.7 **	423	20.2	406
Deuterohämin	385	11.2	393	15.3	—	—	402
Mesohämin	388	10.0	395	12.7	415	18.0	400
Azahämin	380	10.8	386	11.8	416	11.7	397
Phäophorbid a-Hämin	385	6.7	400	7.6	—	—	412

\* Dem Gebiet der Absorptionsmaxima der cyclischen Aminosäuren.

\*\* Nach Theorell 13.

\*\*\* Optimale Wellenlänge zur Verfolgung der Rekombination als Funktion der Zeit. Bei dieser Wellenlänge ist die Differenz der Absorption des betreffenden Hämins einerseits und der gebildeten Peroxydase andererseits am grössten.

Die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes im praktisch verwendeten Konzentrationsbereich wurde mit Lösungen von Protohäm in und Phäophorbid a-Häm in bekannter Konzentration geprüft und bestätigt.

Zur zeitlichen Verfolgung des Rekombinationsvorganges wurde das Spektrophotometer (Beckmann, Modell DU) auf die Wellenlänge mit  $\lambda_{\epsilon=\max}$  eingestellt und zwei Küvetten mit einem bestimmten Volumen der gleichen Häm inlösung bekannter Konzentration und von pH 7,1 gefüllt \*. Die eine der Küvetten wurde mit einem bestimmten Volumen Wasser versetzt, gemischt und als Blankwert eingestellt. Zur zweiten Kuvette wurde dasselbe Volumen einer auf pH 7,1 gepufferten Proteinlösung bekannter Konzentration gegeben, umgerührt, die Stoppuhr in Gang gesetzt und die Zunahme der Extinktion gemessen.

Die Messung der Aktivität der künstlichen Peroxydasen geschah mit Hilfe der Willstätter'schen Purpurogallinprobe<sup>14</sup> in der von Keilin und Mann<sup>6</sup> modifizierten Form. Die von zahlreichen Autoren, zuletzt Ettore<sup>15</sup>, beobachtete Unzuverlässigkeit dieser Aktivitätsbestimmung wurde in hohem Grade von der Qualität des destillierten Wassers abhängig gefunden. Bei Verwendung von glasredestilliertem Wasser wurden die Resultate bedeutend reproduzierbarer. Bei der unten zu besprechenden Messung der Wärmedenaturierung wird nochmals hierauf eingegangen werden.

Prinzipiell wurde zur Bestimmung der Aktivität eines mit dem freien Protein zu kombinierenden Hämins folgendermassen verfahren: Die Restaktivität des freien Proteins (beruhend auf ungespaltenen Anteilen des ursprünglichen Enzyms) wurde gemessen. Nun wurden 2 gleiche Proben der Proteinlösung (beide von pH 7,1) mit einem Überschuss der in 0,1 N NaOH gelösten und mit Phosphat auf pH 7,1 gebrachten Lösung von Protohäm in einerseits und dem zu untersuchenden Häm in andererseits versetzt. Nach 1 Tag Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurden die Aktivitäten der beiden Lösungen gemessen.

## RESULTATE

### 1. A k t i v i t ä t

Für die peroxydatische Aktivität nach erfolgter Rekombination mit dem freien Protein wurden die folgenden Werte gefunden.

Die Abweichungen von den früher von Theorell<sup>2</sup> für Deutero- und Mesoperoxydase veröffentlichten Werten sind relativ gering. Die Aktivität des Aza-

\* Diese Häm inlösungen sind nur etwa 1 Tag bei 0° haltbar.

	Gemessen	Nach Theorell u. Mitarb. <sup>2</sup>
Deutero-Peroxydase	56 ± 2 %	62 %
Meso-Peroxydase	63 ± 2 »	53 »
Aza-Peroxydase	20 ± 2 »	—
Chlorin e <sub>6</sub> -Peroxydase	0 %	0 »
Phäophorbid a-Peroxydase	0 »	0 »

hämins ist hier zum ersten Mal gemessen worden. Ob eine Verbindung „Phäophorbid a-Peroxydase“ realiter existiert ist zweifelhaft, wie unten gezeigt wird.

## 2. S p e k t r e n

Aus den Spektren der Hämine und der zugehörigen Peroxydase lassen sich folgende Tatsachen ablesen: Die Soretbande wird durch die Kupplung des Hämins mit dem freien Protein um 6 (Azahämin) bis 40 m $\mu$  (Protohämin) nach Rot verschoben. Gleichzeitig nimmt die spezifische Absorption am Gipfel der Bande um 9 (Azahämin) bis 77 % (Protohämin) zu. Die CN-Verbindungen (soweit gemessen) weisen ein um etwa 20 m $\mu$  nach Rot verschobenes Maximum auf und eine etwas erhöhte spez. Absorption. Die Spektren der künstlichen Peroxydase ähneln denjenigen von natürlicher Meerrettich-Peroxydase (Abb. 2). Sie zeigen alle die typische Soretbande, wenn auch nie mit gleicher Intensität wie bei der Meerrettich-Peroxydase selbst. Typisch ist weiterhin das Minimum bei 300—320 m $\mu$ , sowie der oben erwähnte „Sattel“ zwischen 260 und 280 m $\mu$ .

## 3. R e k o m b i n a t i o n

Der Verlauf der Rekombination wurde zunächst am Beispiel des in natürlicher Peroxydase eingebauten Protohämins studiert. Die Wellenlänge grösster Absorptionszunahme  $\lambda_{\Delta\epsilon=\max}$  liegt bei 406 m $\mu$ . Aus praktischen Gründen (Berechnung der Endkonzentration an Peroxydase u. a.) wurde meist bei 402 m $\mu$  gemessen. Die Kurven zeigen alle das für eine Reaktion I. Ordnung charakteristische Bild, wie aus Abb. 3 hervorgeht. In diesem typischen Beispiel wurde unter den folgenden Bedingungen gearbeitet: [Protein] = 7,6  $\mu$ Mol/l; [Protohämin] = 15  $\mu$ Mol/l; Temperatur 25°;  $\lambda = 402$  m $\mu$ . Resultate:  $\Delta\epsilon = 0,306$ ; Halbwertszeit der Rekombination 4,2 Minuten.

In weiteren Versuchen wurden die Konzentrationen des Proteins und des Hämins geändert. Die Protohämin-Konzentrationen lagen zwischen 3,2—22  $\mu$ Mol/l, diejenigen von Protein zwischen 7,6 und 20  $\mu$ Mol/l, und das Verhältnis

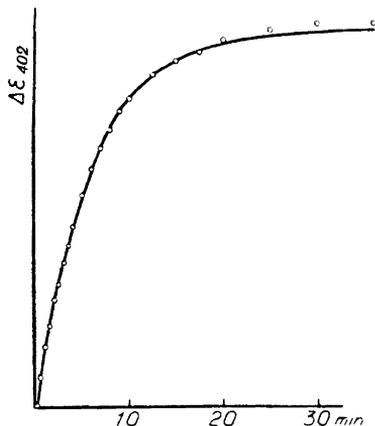


Abb. 3. Protohämmin + Protein.  
 $t = 24^\circ$ . HWZ = 4,2 Min.

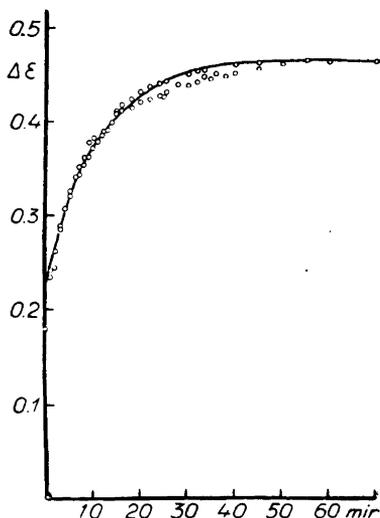


Abb. 4. Deuterohämmin + Protein.  
 $t = 24^\circ$ . HWZ = 8 Min.

$\frac{[\text{Hämmin}]}{[\text{Protein}]}$  war = 0,16—2,8. Die Temperatur lag stets zwischen 20 und 26°. Die Resultate aller Versuche waren qualitativ die gleichen. Dagegen zeigte es sich, dass die Geschwindigkeit der Rekombination von Fall zu Fall sehr verschieden ist. Die Halbwertszeit schwankte in so weiten Grenzen wie 1,1—7,0 Minuten.

Rekombination des Proteins mit Mesohämmin gab ebenfalls Kurven I. Ordnung mit Halbwertszeiten zwischen 2,4 und 8,5 Minuten. Deuterohämmin gab eine Zeit für 50 % Rekombination von 3 bis 8 Minuten. Bei der Kombination mit Deuterohämmin zeigte sich eine merkwürdige Erscheinung: Ungefähr  $\frac{1}{2}$  des erreichten Endwertes maximaler Absorptionszunahme wurde augenblicklich nach Zugabe des Hämins erreicht, jedenfalls vor der ersten Messung (30 Sekunden nach der Zugabe); der Rest der Absorptionszunahme erfolgte gemäss der normalen I. Ordnung-Reaktion, vgl. Abb. 4. Die Ursache der ersten, schnellen Reaktion soll in einer späteren Arbeit quantitativ untersucht werden.

Die Rekombination mit Azahämmin wurde nur wenige Male ausgeführt. Die Extinktions-Zeit-Kurve eines typischen Experiments zeigt wieder den Verlauf einer Reaktion I. Ordnung mit einer Halbwertszeit von 2,6 Minuten.

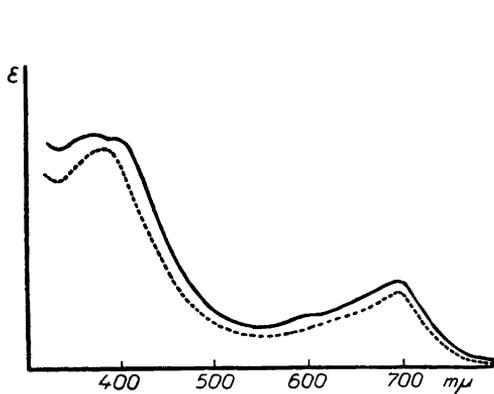


Abb. 5. Absorptionsspektren von  
 — Phäophorbid  $\alpha$ -Häm in + Protein  
 --- Phäophorbid  $\alpha$ -Häm in allein

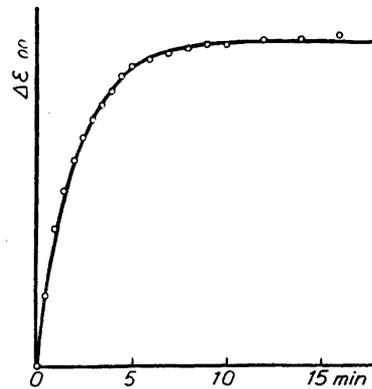


Abb. 6. Verlauf der Kombination zwischen  
 Phäophorbid  $\alpha$ -Häm in und Protein.  
 $t = 24^\circ$ . HWZ = 1,2 Min.

#### 4. Der Sonderfall des Phäophorbid $\alpha$ -Häm ins

Theorell, Bergström und Åkeson<sup>2</sup> hatten schon festgestellt, dass der sichtbare Teil des Spektrums der meisten von ihnen untersuchten Hämine sich bei Zugabe von freiem Peroxydase-Protein verändert. Sie fanden im Prinzip 3 Gruppen von Häminen:

1. Solche, die mit dem freien Protein reagieren unter Farbänderung und Auftreten von Aktivität im Purpurogallintest. Hierher gehören: Protohäm in, Deuterohäm in und Mesohäm in. Neu hinzugekommen ist nun auch Azahäm in.

2. Solche, die mit dem freien Protein wohl Farbänderung, aber keine Aktivität geben, wie Chlorin  $e_6$ -Häm in, Phyllohäm in, Pyrrohäm in und Rhodohäm in.

3. Solche, die weder Farbänderung noch Aktivität geben, nämlich Hämatohäm in und Phäophorbid  $\alpha$ -Häm in.

Es war nun von Interesse zu untersuchen, wie sich die Hämine der 3. Gruppe quantitativ gegenüber dem freien Protein verhalten. Die Reaktion des Hämatohäm ins soll in einem anderen Zusammenhang beschrieben werden. Das Phäophorbid  $\alpha$ -Häm in wurde hier näher untersucht und zeigte folgendes Verhalten:

Wie Abb. 5 zeigt, verändert sich das Spektrum von Phäophorbid  $\alpha$ -Häm in nur wenig durch die Reaktion mit der freien Proteinkomponente der Meerrettich-Peroxydase. Dass der Unterschied aber reel ist, zeigt die Abb. 6. Die Kurve zeigt den zeitlichen Verlauf der Rekombination, der die bekannte

Form der Reaktion I. Ordnung zeigt. Offenbar hat also eine Umsetzung stattgefunden.

Wie fest die Bindung zwischen Protein und Phäophorbid  $\alpha$ -Hämin ist, wurde nun an Hand von Konkurrenzversuchen festgestellt. Dazu wurde folgendermassen verfahren: Eine Lösung des freien Proteins wurde zuerst mit einem leichten Überschuss an Protohämin versetzt und die Aktivität gemessen. Dies gab ein Mass für die Konzentration an aktivem Protein. Nun wurden 3 Proben der gleichen Proteinlösung abgemessen. Probe 1 wurde mit 0,8 Mol, Probe 2 mit 1,6 Mol Phäophorbid  $\alpha$ -Hämin versetzt, Probe 3 unverändert gelassen. Nach 20 Stunden wurde die Aktivität gemessen, die, wie erwartet 0 % war. Die Proben 1—3 wurden in je 4 Teile geteilt und mit 0, 0,8, 1,6 und 5 Mol Protohämin versetzt. Die Aktivitätsmessung nach 24 Stunden gab innerhalb der Fehlergrenzen volle Rekombination. Vgl. Abb. 7.

Das Protohämin verband sich also mit dem Protein, als ob das Phäophorbid  $\alpha$ -Hämin nicht vorhanden gewesen wäre.

#### DIE THERMOSTABILITÄT DER FREIEN PROTEINKOMPONENTE

Wie oben erwähnt, wurde versucht, einen Überschuss an freiem Protein durch Erwärmen zu deaktivieren oder denaturieren. Als sich zeigte, dass dies nicht mit der erwarteten Leichtigkeit gelang, wurde eine systematische Untersuchung der Stabilität des freien Proteins gegen Wärme notwendig. Die Versuche wurden gleichzeitig auch mit ungespaltener Peroxydaselösung durchgeführt.

Das verwendete Präparat war eine dialysierte Lösung krystallisierter Meerrettich-Peroxydase von der P. Z. 1020. Die ungespaltene Peroxydase und die freie Proteinkomponente wurden in etwa 0,02 *M* Phosphatpuffer von pH 7,1 gelöst. Die Konzentration betrug für die Peroxydase 0,20  $\mu$ Mol/l und für das Protein 0,17  $\mu$ Mol/l (auf aktives Protein berechnet). Die Proben wurden je 15 Minuten auf Temperaturen zwischen 40 und 100° erwärmt und anschliessend sofort unter fliessendem Wasser abgekühlt. Die Aktivität der Peroxydaselösungen wurde sofort gemessen, während die Proteinlösungen alle mit einem Überschuss der gleichen Protohäminlösung (pH 7,1) versetzt wurden. Die Aktivität dieser Lösungen wurde am folgenden Tage gemessen.

Bei der Ausführung dieser Versuchsreihe stiessen wir zunächst auf sehr grosse, unregelmässige Schwankungen der gemessenen Aktivitäten. Es wurde dann der Einfluss des destillierten Wassers untersucht und gefunden, dass bei Verwendung von aus Glas redestilliertem Wasser sowohl die Hitze-Denaturierung wie auch der Purpurogallintest reproduzierbar verliefen und ein vernünftiges Bild ergaben.

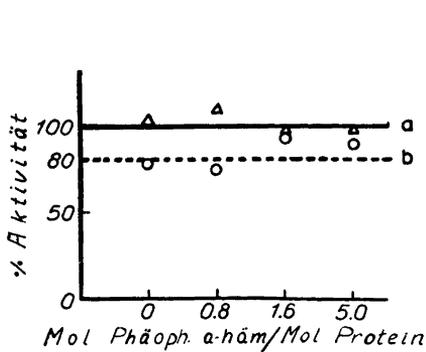


Abb. 7. Peroxydaseaktivität nach Zugabe von Protohämin zum inaktiven Phäophorbid a-Hämin — Protein.

a. 1,6 Mol Protohämin  $\Delta$   
b. 0,8 Mol »  $\circ$

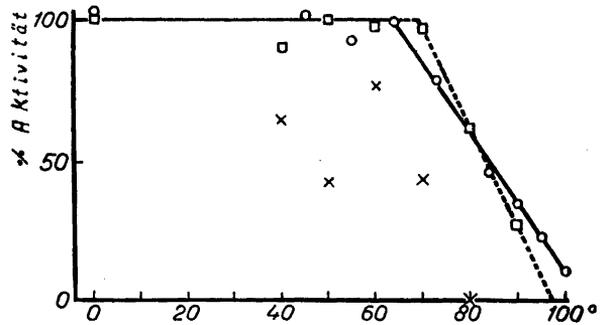


Abb. 8. Einfluss von Wärme auf

$\circ$  — Peroxydase (glasdest. Wasser)  
 $\square$  --- freie Protein komponente (glasdest. Wasser)  
 $\times$  Werte mit gewöhnlichem dest. Wasser

Abb. 8 zeigt die erhaltenen Resultate: Die Meerrettich-Peroxydase ist bis 63° gegen 15 Minuten Erwärmung völlig beständig, die Aktivität fällt aber dann bei höherer Temperatur steil ab und erreicht den Nullpunkt bei etwas über 100°. Dies bestätigt die Messungen von Herrlinger und Kiermeier<sup>12</sup> an einem Präparat von der P. Z. 73, die fanden, dass die Aktivität bei Erwärmung auf über 60° schnell absinkt. Die Erscheinung der Aktivitätsregeneration wurde nicht von neuem untersucht, da dies schon ausserhalb des Rahmens dieser Arbeit lag.

Die freie Proteinkomponente zeigte erstaunlicherweise eine etwas höhere Schwelle, die Inaktivierung setzt erst bei 69° ein. Der Abfall ist dann aber steiler und erreicht den Nullpunkt bei etwa 98°. Einige Werte von Bestimmungen mit „gewöhnlichem“ destilliertem Wasser sind zum Vergleich mit eingezeichnet.

#### DISKUSSION

Das Studium des zeitlichen Verlaufes von Rekombinationen von Häminen mit der freien Proteinkomponente von Meerrettich-Peroxydase zeigt, dass es sich dabei um eine im gewöhnlichen Spektrophotometer zu verfolgende Umsetzung handelt, die der Kurvenform nach eine Reaktion I. Ordnung darstellt. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Theorell und Paul<sup>4</sup>, dass auch die Spaltung der Peroxydase in wässriger HCl eine Reaktion I. Ordnung ist.

Zwei beobachtete Tatsachen bedürfen einer Erklärung: Bei der Rekombination mit Deuterohämin tritt zuerst ein „Sprung“ in der Kurve auf, d. h. die erste Hälfte der Extinktionszunahme wurde in einer unter den gewählten Bedingungen unmessbar kurzen Zeit erreicht. Ob daraus geschlossen werden kann, dass sowohl eine ionogene, wie auch eine langsame „organische“ Reaktion vor sich geht, wird sich erst nach einem genaueren Studium mit verfeinerten Messmethoden zeigen lassen. Unerklärt ist weiterhin, dass die Halbwertszeiten der Rekombination in weiten Grenzen schwanken, etwa zwischen 1 und 10 Minuten. Diese Schwankungen treten bei ein und demselben Hämin und identischen Proteinpräparationen auf. Sie sind nicht nachweisbar abhängig von der Konzentration der beiden Komponenten oder anderen bekannten messbaren Faktoren. Vorläufig kann für dieses Phänomen keine experimentell belegte Erklärung gegeben werden.

Die Beobachtungen am Phäophorbid  $\alpha$ -Hämin führen zu folgenden Schlussfolgerungen: Die Tatsache, dass sich das sichtbare Spektrum des Phäophorbid  $\alpha$ -Hämins, im Handspektroskop beobachtet, bei der Zugabe von freiem Protein nicht ändert<sup>2</sup>, bedeutet noch nicht, dass keinerlei Reaktion stattfindet. Die Messungen zeigen, dass die Extinktion in einem messbaren Zeitraum gesetzmässig ansteigt. Dass die Bindung aber nicht an der für die aktiven Peroxydase spezifischen Stelle des Proteins stattfindet, geht aus der glatten Kuppelung der so erhaltenen Lösungen mit Protohämin hervor, die auf keinerlei Gleichgewichts- oder Verdrängungsreaktion schliessen lässt. Dass die Kombination Phäophorbid  $\alpha$ -Hämin-Protein zu keinem peroxydatisch wirksamen Produkt führt, wurde bestätigt.

Eine Untersuchung der spektralen Änderungen im sichtbaren Spektralbereich bei der Rekombination dürfte in der Zukunft Aufschluss darüber geben, ob sich 2 oder auch mehrere verschiedene Rekombinationsreaktionen optisch voneinander trennen lassen.

Die Feststellung, dass die freie Proteinkomponente eine hohe Resistenz gegen Hitze zeigt, war recht überraschend. Es war früher festgestellt worden<sup>2</sup>: „In contradiction to peroxidase itself, the free protein is sometimes rather unstable. Even precipitation with ammonium sulfate and dialysis may sometimes denature it. However, it is stable for several days at + 4°C, if it is dissolved in bicarbonate after the precipitation with HCl-acetone, without any further treatment.“

Die Resistenz gegen „Dialyse und Ammoniumsulfatfällung“ scheint von der Qualität des Wassers abzuhängen, da bei Verwendung von reinem, glasredestilliertem Wasser eine Denaturierung nicht beobachtet wurde.

In welcher Weise „schlechtes“ dest. Wasser auf die Erwärmungsversuche und den Purpurogallintest einwirkt, ist schwer zu sagen. Immerhin geht man

wohl nicht in der Vermutung fehl, dass Spurenmetalle die Reaktionen stören. Untersuchung des Destillationsrückstandes (50 cm<sup>3</sup>) von 10 Liter gewöhnlichem dest. Wasser gab keine sichere positive Reaktion auf Cu und Zn (Na-diäthyl-dithiocarbaminat) und ebensowenig eine Fällung mit S<sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und Cl<sup>-</sup>. Bei der hohen Empfindlichkeit von Hämoproteiden gegen Metallionen ist aber eine Störung durch Mengen an Metallen möglich, die noch unter der Empfindlichkeitschwelle der durchgeführten Analysen liegen. Die Thermoresistenz des freien Proteins ist in aus reinem redestillierten Wasser bereiteten Pufferlösungen nach unseren Untersuchungen eine bedeutend höhere als auf Grund obigen Zitates vermutet worden war.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Meerrettich-Peroxydase wurde mit HCl-Aceton in Hämin und freies Protein gespalten. Hierauf wurde mit verschiedenen synthetischen Häminen gekuppelt, wobei sich teils aktive, teils inaktive „künstliche Peroxydasen“ bildeten. Die Kupplungsreaktion wurde spektrophotometrisch verfolgt; es wurde dabei gefunden, dass es sich um eine zeitlich messbare Reaktion, sehr wahrscheinlich I. Ordnung, handelt.

Verschiedene künstliche Peroxydasen wurden präparativ in genügenden Mengen hergestellt, um das Spektrum messen zu können. Folgende Aktivitäten wurden für die rekombinierten Peroxydasen gefunden:

Proto-Peroxydase	100 %	Aza-Peroxydase	20 %
Deutero-Peroxydase	56 »	Phäophorbid a-Peroxydase	0 %
Meso-Peroxydase	63 »	Chlorin e <sub>8</sub> -Peroxydase	0 %

Mit Phäophorbid a-Hämin und Protohämin wurden Konkurrenzversuche angestellt, die zeigten, dass eine Umsetzung des freien Proteins mit Phäophorbid a-Hämin die Kupplung mit Protohämin in keiner Weise hindert.

Die Thermostabilität von Meerrettich-Peroxydase und der aus ihr gewonnenen Proteinkomponente wurde untersucht und gefunden, dass bei 15 Minuten Erwärmung Peroxydase bis 62°, dass freie Protein bis 69° praktisch voll aktiv bleiben. Die Gegenwart von Verunreinigungen, wahrscheinlich Spurenmetallen, im destillierten Wasser ist von grossem Einfluss auf die Messresultate, sowohl was die Desaktivierung selbst betrifft als auch im Purpurogallintest.

Der eine von uns (A.C.M.) ist der schweizerischen »Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie« zu grossem Dank verpflichtet, da diese Arbeit nur durch ein 2-jähriges Stipendium von seiten dieser Stiftung möglich wurde. A.C.M. dankt ferner den

zahlreichen Anregungen und Ratschlägen von seiten der Kollegen im hiesigen Institut, vor allem dem I. Assistenten K. G. Paul.

Die Analyse wurde vom Mikroanalysenlaboratorium der *Medicinsk-kemiska Institution, Universitetet, Uppsala* (Leitung W. Kirsten) ausgeführt.

#### LITERATUR

1. Theorell, H. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **B 14** (1940) no. 20.
2. Theorell, H., Bergström S., und Åkeson Å. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **A 16** (1942) no. 13.
3. Theorell, H. *Adv. Enzymology* **7** (1947) 265.
4. Theorell, H., und Paul, K. G. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **A 16** (1944) no. 12.
5. Theorell, H. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **A 16** (1942) no. 2.
6. Keilin, D. und Mann, T. *Proc. Roy. Soc. London* **B 114** (1934) 210.
7. Fischer, H. und Orth, H. *Die Chemie des Pyrrols*. Bd. II, Teil 2. Leipzig (1940) 440.
8. Zaleski, *Z. physik. Chem.* **43** (1904) 11.
9. Fischer, H., und Bäumlner, R. *Ann.* **474** (1929) 65.
10. Lemberg, R., und Holden, H. F. *Austr. J. exper. biol. med. science* **21** (1943) 239.
11. Diemair, W., und Häusser, H. *Z. anal. Chem.* **122** (1941) 12.
12. Herrlinger, F., und Kiermeier, F. *Biochem. Z.* **317** (1944) 1.
13. Theorell, H. *Enzymologia* **10** (1942) 250.
14. Willstätter, R., und Stoll, A. *Ann.* **416** (1918) 21.
15. Ettori, J. *Biochem. J.* **44** (1949) 35.

Eingegangen am 31. Dezember 1949.