

Hämoproteinoide mit peroxidatischer und katalatischer Aktivität

The Peroxidatic and Catalatic Activity of Hemoproteinoids

KLAUS DOSE und LAILA ZAKI

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt (Main)

(Z. Naturforsch. 26 b, 144—148 [1971]; eingegangen am 2. November 1970)

Hemoproteinoids related to contemporary porphyrin-dependent peroxidases were synthesized under simple conditions. The peroxidative activity of hematin increased by a factor of 50 if the hematin was bound to proteinoids whereas the catalatic activity of hematin decreased rather under the same conditions. The peroxidative activity of hemoproteinoids particularly increased with their lysine content whereas the catalatic activity especially decreased in proteinoids with high phenylalanine content. The isoelectric points of the lysine-rich peroxidic hemoproteinoids were about 8. Their relatively broad pH-activity optimum was about pH 7.0. The molecular weights were a little below 20 000. Hematin content and amino acid composition of the synthetic materials were varied greatly. The substrate specificity appeared as broad as that of biogenous peroxidases, e. g., horseradish peroxidase. Among the many substrates was NADH. The possible importance of the peroxidative oxidation of NADH-type coenzymes by primitive heterotrophic organisms or prebiological systems in an anaerobic environment is discussed.

Proteinoiden sind thermisch synthetisierte Polymere von Aminosäuren¹. Die thermische Kondensation wird in der Regel durch Erhitzen trockener Aminosäuregemische über den Siedepunkt des Wassers durchgeführt. Auch geochemisch plausible Kondensationsmittel wie Polyphosphate oder Dicyandiamid^{2, 3} sind in Simulationsexperimenten zur präbiotischen Bildung von „Urproteinen“ verwandt worden. Die so synthetisierten Polymere haben in der Tat eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit Proteinen². Auch schwache katalytische Aktivitäten konnten ihnen zugeschrieben werden. Man hat gefunden, daß sie hydrolytische, decarboxylierende

und transaminierende Reaktionen beschleunigen^{4–12}.

Proteinoiden mit definierbaren prosthetischen Gruppen wurden bisher jedoch noch nicht hergestellt. Als eine in diesem Zusammenhang besonders interessante Gruppe erschien uns das Eisen-Porphyrin-System. Sehr wahrscheinlich traten die Metall-Porphyrin-Systeme bereits sehr früh in der Evolution primitiver Redox-Systeme auf¹³. Hierfür spricht nicht nur die außergewöhnliche geochemische Stabilität bestimmter Metall-Porphyrin-Komplexe, sondern auch der Befund, daß Porphyrine^{14–18} ähnlich den Aminosäuren^{19–23} unter möglichen geochemischen Bedingungen relativ leicht gebildet wer-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. K. DOSE, MPI f. Biophysik, D-6000 Frankfurt a. M. 70, Kennedyallee 70. chem. Biophysics 118, 265 [1967].

- ¹ T. HAYAKAWA, C. R. WINDSOR u. S. W. FOX, Arch. Biochem. Biophysics 118, 265 [1967].
- ² S. W. FOX, Encyclopedia Polymer Sci. Technol. 9, 284 [1968].
- ³ K. HARADA u. S. W. FOX, in: The Origins of Prebiological Systems (S. W. FOX, ed.), p. 289, Academic Press, New York 1965.
- ⁴ D. L. ROHLFING u. S. W. FOX, Arch. Biochem. Biophysics 118, 127 [1967].
- ⁵ D. L. ROHLFING u. S. W. FOX, Arch. Biochem. Biophysics 118, 122 [1967].
- ⁶ T. OSHIMA, Arch. Biochem. Biophysics 126, 478 [1968].
- ⁷ D. H. DURANT u. S. W. FOX, Federat. Proc. 25, 342 [1966].
- ⁸ S. W. FOX u. G. KRAMPITZ, Nature [London] 203, 1362 [1964].
- ⁹ H. G. HARDEBECK, G. KRAMPITZ, and L. WULF, Arch. Biochem. Biophysics 123, 72 [1968].
- ¹⁰ D. L. ROHLFING, Arch. Biochem. Biophysics 118, 468 [1967].
- ¹¹ G. KRAMPITZ, W. HAAS u. S. BAARS-DIEHL, Naturwissenschaften 55, 345 [1968].
- ¹² G. KRAMPITZ, S. BAARS-DIEHL, W. HAAS u. T. NAKASHIMA, Experientia [Basel] 24, 140 [1968].
- ¹³ M. CALVIN, Amer. Scientist 44, 248 [1956]; Science [Washington] 130, 1170 [1959]; Perspect. Biol. Med. 5, 147 [1962].
- ¹⁴ A. SZUTKA, Nature [London] 202, 1231 [1964].
- ¹⁵ G. W. HODGSON u. B. C. BAKER, Nature [London] 216, 29 [1967].
- ¹⁶ A. A. KRASNOVSKI u. A. V. UMRICHINA, Dokl. Acad. Nauk. SSSR 155, 691 [1964].
- ¹⁷ G. W. HODGSON and C. PONNAMPERUMA, Proc. nat. Acad. Sci. USA 59, 22 [1968].
- ¹⁸ I. I. SCOTT, Biochem. J. 62, 6 [1956].
- ¹⁹ S. L. MILLER, Science 117, 528 [1953]; J. Amer. chem. Soc. 77, 2351 [1955].
- ²⁰ K. DOSE u. B. RAJEWSKY, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 25, 225 [1957].
- ²¹ K. DOSE u. S. RISI, Z. Naturforsch. 23b, 581 [1968].
- ²² W. GROTH u. H. V. WEYSENHOFF, Naturwissenschaften 44, 510 [1957].
- ²³ S. W. FOX u. K. HARADA, Science [Washington] 133, 1923 [1961].

den, z. B. durch Einwirkung elektrischer Entladungen auf gasförmige Mischungen von Methan, Ammoniak und Wasser¹⁷.

Selbst bei Abwesenheit von molekularem Sauerstoff in der primitiven Atmosphäre würden peroxidatische Katalysatoren in primitiven Organismen prinzipiell einen oxidativen Abbau organischer Substrate ermöglichen, sofern Hydrogenperoxid zur Verfügung steht. In der Hydrosphäre der primitiven Erde konnte Hydrogenperoxid durch Radiolyse bzw. Photolyse des Wassers ständig neu gebildet werden.

In dieser Arbeit wird u. a. gezeigt, daß Hämoproteinoide in der Tat als Träger primitiver Redoxvorgänge in einer anaeroben Umgebung in Betracht gezogen werden können.

Material und Methoden

Herstellung der Hämoproteinoide

In den meisten Fällen wurden die Hämoproteinoide analog zum Verfahren von FOX und HARADA durch Kondensation bei 180° (2 h, N₂) hergestellt²⁴. Neben den Aminosäuren enthielten die Ansätze 0,25 bis 2% Häm·HCl (Schuchardt, München). Die Rohprodukte wurden nach dem Auflösen im 10-fachen Volumen Wasser 3 Tage gegen dest. Wasser dialysiert. Die Ausbeuten an Polymeren lagen zwischen 1 und 8 Prozent.

In einer anderen Serie von Syntheseversuchen wurden die Aminosäuren mit 0,25 bis 2% Häm·HCl kondensiert, indem man diese Mischung zunächst mit der gleichen Menge sauren Natriumpolyphosphats (hergestellt durch Erhitzen einer 1:1-Mischung von NaNH₄HPO₄ und (NH₄)₂HPO₄ auf 300° und wenig Wasser zu einem Teig verknetete und diesen 3 Tage unter N₂ auf 110° erhitzte. Die weitere Aufarbeitung geschah dann wie oben angegeben. Die Ausbeuten lagen bei 1 bis 3 Prozent. Die katalatischen und peroxidatischen Aktivitäten dieser Produkte waren jedoch geringer als die der bei 180° hergestellten Polymeren. Die in dieser Arbeit mit Nummern bezeichneten Polymeren wurden sämtlich bei den höheren Temperaturen hergestellt.

Aktivitätsmessungen

Die kinetische Untersuchung der Oxydation von Guajakol nach CHANCE und MAEHLY²⁵ wurde grundsätzlich als Test für die Bestimmung der Peroxidaseaktivität angewendet. Typische Testbedingungen waren:

2,89 ml 0,1 M K-phosphatpuffer pH 7,0, 0,05 ml 0,22-proz. Lösung von Guajakol in Wasser, 0,02 ml 0,5-proz. wäßrige Lösung des Proteinoids, auslösen der Reaktion durch Zusatz von 0,04 ml einer verdünnten Lösung von Perhydrol (0,1 ml Perhydrol, Merck, auf 100 ml Wasser), Messung der optischen Dichte bei 436 nm und 25°.

Die katalatischen Aktivitäten wurden bestimmt, indem man die zeitliche Abnahme der Konzentration des Hydrogenperoxids verfolgte. Hydrogenperoxid wurde durch Titration mit Kaliumpermanganat²⁶⁻²⁸ oder durch die Farbreaktion mit Titanylsulfat²⁹⁻³¹ bestimmt. Die Zusammensetzung der Testlösungen entsprach der des Peroxidase-Tests (ohne Guajakol).

Die Aminosäurenanalyse der Hämoproteinoide führten wir nach GUNDLACH et al.³² durch unter Benutzung eines Technicon-Analysators.

Die Bestimmung des Hämatingehaltes erfolgte aus der Absorption im Bereich der Soret-Bande bei 410 nm (pH 7,0). Ein mm Extinktionskoeffizient von 47 wurde zugrunde gelegt. Diese Werte wurden verglichen mit dem Eisengehalt der einzelnen Präparate. Für Hämatin (MG 633,32) wurde ein Eisengehalt von 8,9 g-% angenommen. Es zeigte sich, daß der Eisengehalt der Hämoproteinoide der Intensität der Soret-Bande im Bereich um 410 nm proportional ist. Anzeichen für eine wesentliche Änderung dieser Bande durch Wechselwirkung mit dem Proteinoid (pH 7,0) wurden nicht gefunden.

Die Molekulargewichte einiger Hämoproteinoide wurden durch Gelfiltration (Bio-Gel P-2, P-4, P-6 und P-10 von Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal., und Sephadex G-50 und G-75, fine, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt³³.

Die elektrophoretischen Eigenschaften wurden durch Papierelektrophorese oder durch Elektrophorese in Acrylamid-Gel in Diäthylbarbiturat-Puffer (pH 8,6) und Borat-Puffer (pH 7,0–10,5) bestimmt. Die Lage der peroxidatischen Fraktion nach Trennung durch Papierelektrophorese wurde durch Besprühen mit einer Mischung von 0,1 ml verd. H₂O₂ und 0,1 ml 0,013 M NADH in 2,8 ml 0,1 M K-phosphatpuffer verfolgt. Das gebildete NAD wurde auf Grund seiner Fluoreszenz

²⁴ S. W. FOX u. K. HARADA, in: Analytical Methods of Protein Chemistry (P. ALEXANDER and H. P. LUNDGREN, eds.), Vol. IV, p. 129 Pergamon Press, Oxford 1966.

²⁵ B. CHANCE and A. C. MAEHLY, in: Methods in Enzymology (S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, eds.), Vol. 2, p. 769, Academic Press, New York 1955.

²⁶ R. K. BONNICHSEN, B. CHANCE u. H. THEORELL, Acta chem. scand. 1, 685 [1947].

²⁷ H. LÜCK, in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.-U. BERGMAYER, ed.), Verlag Chemie, Weinheim 1962.

²⁸ J. P. KALTENBACH, E. B. RADEKE, E. T. NISHIMURA, and S. H. SIDRIQUI, Cancer Res. 26, 580 [1966].

²⁹ H. ERLNMEYER, R. ZELL, H. BRINTZINGER u. B. PRIJS, Helv. chim. Acta 47, 792 [1964].

³⁰ A. C. EGERTON, A. J. EVERETT, G. J. MINKOFF, S. RUDRANKACHANA u. K. C. SALVOJA, Analytica chim. Acta [Amsterdam] 10, 422 [1954].

³¹ H. SIGEL u. V. MÜLLER, Helv. chim. Acta 49, 671 [1966].

³² H. G. GUNDLACH, S. MOORE u. W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 238, 622 [1963].

³³ H. DETERMANN, „Gelchromatographie“, Springer-Verlag, Berlin 1967.

im UV-Licht erkannt. Die Papierelektrophorese wurde auch zur Abschätzung der Lage der isoelektrischen Punkte benutzt; d. h., es wurde der pH-Wert bestimmt, bei dem eine vorgegebene Fraktion (nach Korrektur bezüglich Elektrosmose und Dochteffekte) keine Beweglichkeit zeigte.

Mikrobiologische Tests zeigten, daß sämtliche Proben steril waren.

Resultate

Aminosäurezusammensetzung

Einige typische Analysenergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Auffällig ist der hohe Lysingehalt der meisten Produkte. Trotzdem zeigen selbst sehr lysinreiche Präparate nur isoelektrische Punkte von höchstens 9,5. Titrationsversuche ergaben, daß der größte Teil der Aminogruppen des Lysins maskiert ist. Die N-Kjeldahl-Werte der Polymeren liegen zwischen 12 und 14,5%; zwischen 50 bis 65% des Materials wird bei 105° in 18 Stdn. durch 6 N HCl zu Aminosäuren hydrolysiert.

Peroxidase- und Katalase-Aktivität

Abb. 1 zeigt einen typischen Vergleich der peroxidatischen Aktivität des Hämatins und des Hämoproteinoids 83a (gleiche Konzentration an Hämatin, basierend auf Fe-Gehalt und optischer Dichte).

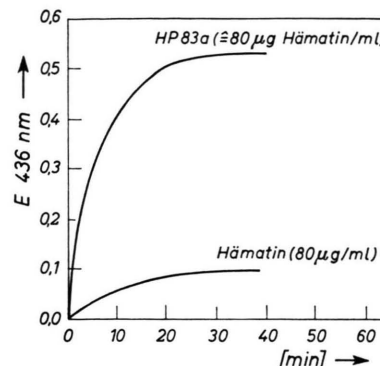


Abb. 1. Steigerung der peroxidatischen Aktivität des Hämatins durch Bindung an Proteinoid 83a (Guajakol-Test). Die Kurven erreichen Sättigungswerte infolge der Umsetzung des H_2O_2 . Auch die Katalase-Aktivität des Hämoproteinoids führt zugleich zu einer starken Abnahme des H_2O_2 . Durch Zusatz von H_2O_2 lassen sich die Reaktionen erneut starten.

In Tab. 2 sind einige charakteristische Ergebnisse über die peroxidatische und katalatische Aktivität verschiedener Proteinoiden zusammengefaßt. Die katalatische Aktivität des Hämatins scheint durch den Einbau in ein Proteinoid stets erniedrigt zu werden. Dieser Effekt wird besonders durch die Gegenwart von Phenylalanin verstärkt³⁴. Die höchste peroxidatische Aktivität zeigen Proteinoiden mit einem Lysin-Gehalt von etwa 90 Prozent. Der Effekt des Histidins ist gering. Das Leuchsche

Aminosäure	83a		87b		79a		47a		73a	
	R *	P **	R	P	R	P	R	P	R	P
Asp + Asn	1,0	1,5	1,0	1,2	1,0	3,0	15,4	17,5	41	40
Thr	0,9	0,3	0,9	tr. *	0,9	tr.	1,3	1,3	0,9	tr.
Ser	0,8	0,3	0,8	tr.	0,8	tr.	8,1	1,7	0,8	tr.
Glu + Gln	1,1	1,6	1,1	tr.	1,1	7,8	8,6	13,1	41	15,7
Pro	0,9	tr.	0,9	tr.	0,9	tr.	1,2	tr.	0,9	tr.
Gly	0,6	1,6	0,6	2,9	0,6	7,4	7,8	22,5	0,5	1,1
Ala	0,7	1,0	0,7	1,6	0,7	5,8	0,9	8,8	0,7	1,9
Val	0,9	tr.	0,9	tr.	0,9	4,6	1,2	tr.	0,9	tr.
1/2(Cys) ₂	1,9	tr.	1,9	tr.	1,9	3,7	21,6	2,1	1,8	1,8
Met	1,2	tr.	1,2	tr.	1,2	4,7	1,6	tr.	1,2	13
Ile	1,0	tr.	1,0	0,6	1,0	5,2	1,4	tr.	1,0	1,2
Leu	1,0	0,7	1,0	1,4	1,0	5,5	1,4	2,1	1,0	2,0
Tyr	1,4	1,5	1,4	2,3	1,4	tr.	1,9	tr.	1,4	1,8
Phe	1,3	tr.	1,3	3,0	1,3	7,5	1,7	3,9	1,3	2,6
Lys	81,0	89,5	1,1	15,8	1,1	12,3	8,6	23,0	1,9	19
His	1,6	0,8	1,2	5,8	81,0	26,8	15,7	6,4	1,2	1,0
Trp	—	—	1,5	tr.	1,5	tr.	—	—	1,6	tr.
Arg	1,3	tr.	81,1	65,6	1,3	6,1	1,8	2,8	1,3	1,1

Tab. 1. Aminosäurezusammensetzung ausgewählter Hämoproteinoiden (P) und ihrer Ausgangsmischungen (R). * R = Aminosäuremischung vor der Kondensation. ** P = Dialysiertes Produkt (hydrolysierbarer Anteil). tr. = Spuren.

³⁴ W. LAUTSCH, W. BROSER, E. HÖFLING, H. GNICHTEL, E. SCHRÖDER, R. KRÜGER, J. WOLDT, G. SCHULZ, R. WIECHERT, W. BANDEL, G. KURTH, H.-H. KRAEGE, W. GEHR-

MANN, K. PRATER, G. PARSIEGLA, R. PASEDAG u. W. HUNGER, Kolloid-Z. **144**, 82 [1955].

Probe	Relative Aktivität pro Mol Fe-Porphyrin Aktivität des Hämatins=1		Zusammensetzung der Materialien	
	Peroxidase [25°]	Katalase [37°]	Hämatin * (Gewicht) [%]	Vorherrschende Aminosäuren (Gewicht) des Gesamtteils der Aminosäuren [%]
Hämin (Fe ³⁺)Cl, Hämatin	1,0 **	1,0 ***	100	
83a	30	0,5	15	90 Lys (Tab. 1)
83b	50	0,5	2	90 Lys (wie 83a, Tab. 1)
73b	25	0,5	15	80 Lys
73b (nach 60' bei 100°)	50	0,5	15	80 Lys
87b	20	0,5	15	16 Lys, 6 His, 66 Arg (Tab. 1)
79a	10	0,5	12	12 Lys, 27 His, 6 Arg (Tab. 1)
79b	1	0,3	15	keine basischen Aminosäuren
73a	10	0,2	20	66 Asp-Glu, 19 Lys (Tab. 1)
47a	5	0,5	20	Neutrales Proteinoid, 23 Lys (Tab. 1)
68b	15	0,05	15	Phe : Lys = 1 : 1
87a	30	0,5	10	95 Lys (thermisches Polylysin)
91	15	0,5	6	Hämin, erhitzt mit thermischem Polylysin
92	1	0,5	2,5	Hämatin, erhitzt mit L e u c h s'schem Polylysin
63	0	0	0	Neutrales Proteinoid
63 + 10% hem	4,4	1,0	10	Neutrales Proteinoid

Tab. 2. Katalatische und peroxidatische Aktivität verschiedener Hämoproteinoide. * Für die Hämoproteinoide wurden die Werte auf Grund der Absorption bei 410 nm und des Fe-Gehaltes berechnet. ** Peroxidase-Aktivität (Guajacol-Test nach CHANCE und MAEHL²⁵) 0,03 Einheiten/mg: Purpurogallin-Zahl/mg etwa 1,6. *** Katalase-Aktivität Umsatzzahl in Mol Substrat/Mol Fe $\approx 0,05 \text{ sec}^{-1}$.

Polylysin gibt ein wesentlich weniger aktives Präparat als thermisches Polylysin. Auch durch Wechselwirkung des freien Hämatins mit neutralen (nicht jedoch basischen) Proteinoiden kann in wäßriger Lösung die peroxidatische Aktivität des Hämatins geringfügig gesteigert werden (Tab. 2, Polymer 63).

Peroxidase-Aktivität und Hämatin-(Eisen-)Gehalt

Der Eisenporphyrin-Farbstoff kann durch Extraktion mit Pyridin oder saurem Aceton nicht vom Proteinoid entfernt werden. Die Bindung an das Proteinoid ist beständig gegen 6 N HCl (2 h bei 20°). 0,25 bis 2% Hämatin in der Reaktionsmischung liefern Produkte mit einem Porphyringehalt von 2 bis 20 Prozent. In Abwesenheit der Aminosäuren wird das Hämatin unter den Kondensationsbedingungen nicht polymerisiert. Die höchsten Aktivitäten zeigen lysinreiche Hämoproteinoide mit einem Eisen-Porphyringehalt von etwa 2 bis 3 Prozent. Bei einem Mol.-Gew. dieser Hämoproteinoide von etwa 20 000 ergibt sich für einen Hämatingehalt von etwa 3% ein Molverhältnis von 1 : 1.

pH-Optimum, Isoelektrischer Punkt, Elektrophorese und Gelfiltration

Abb. 2 zeigt das pH-Aktivitätsdiagramm (Guajacol als Substrat) für Hämoproteinoid 73b. Das Diagramm ist typisch für alle bisher untersuchten Pro-

teinoide. Der isoelektrische Punkt der aktiveren Hämoproteinoide (Lysingehalt 80 bis 90%) liegt bei etwa pH 8.

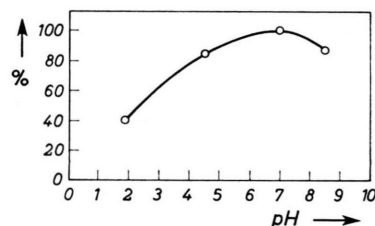


Abb. 2. pH-Aktivitätsdiagramm eines lysinreichen Hämoproteinoids (Guajacol-Test).

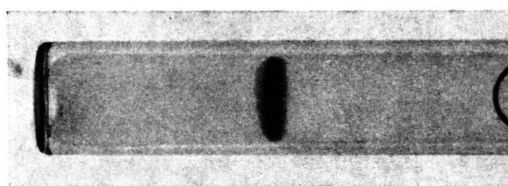


Abb. 3. Acrylamid-Gel-Elektrophorese von Hämoproteinoid 83a bei pH 8,6. Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B. Auch auf Grund der Elektrophorese bei pH 4,5 und der Gelfiltration erweist sich das Präparat als homogen.

Abb. 3 gibt einen Eindruck von der überraschend hohen elektrophoretischen Homogenität der hier vorgestellten Hämoproteinoide. Dasselbe Präparat (83a) hat auf Grund der Gelfiltration ein Mol.-Gew. von etwa 18000 ± 10 Prozent. Es erwies sich auch als homogen in bezug auf das gelchromatographische Verhalten.

NADH als Substrat der Peroxidase-Reaktion

Die genannten Hämoproteinoide katalysieren nicht nur die peroxidatische Oxydation des Guajakols und anderer aromatischer Phenole. Auch NADH wird wirkungsvoll zu NAD oxydiert. Der Test wurde wie im Fall des Guajakols ausgeführt; nur wurden statt der Guajakollösung 0,02 ml einer 0,013 M NADH-Lösung dem Testgemisch zugefügt. Ein Grammatom Eisen des Hämoproteinoids 83a oxydiert NADH etwa 15-mal schneller als die äquivalente Menge Eisen in freiem Hämatin. Die spezifische Aktivität des Proteinoids 83a ist 2,2 μ Mol NADH/mg/min.

Zur Kinetik der peroxidatischen und katalatischen Aktivität

Wegen Verbrauchs des H_2O_2 kommen die Reaktionen nach einigen Min. zum Stillstand (Abb. 1). Wie auch Abb. 1 zeigt, baut Hämin den größeren Teil des H_2O_2 über die Katalase-Reaktion ab. Die Reaktionen können mit praktisch der gleichen Umsatzrate neu gestartet werden, wenn wieder die entsprechende Menge H_2O_2 zugegeben wird. Hohe Konzentrationen an H_2O_2 hemmen die Systeme. Dieses Verhalten erschwert eine Bestimmung der Michaelis-Konstanten. Diese Verhältnisse scheinen denen der entsprechenden Hämoproteinoide verwandt zu sein^{26, 35-37}. Auf der anderen Seite wurden peroxidatische Umsetzungen noch mit 10^{-6} M H_2O_2 beobachtet. Die Hämoproteinoide werden durch klassische Häm-Inhibitoren gehemmt; z. B. inaktivierte $3 \cdot 10^{-4}$ M Hydroxylamin die peroxidatische Aktivität von HP 83a zu 90 Prozent. Erhitzen der reinen Hämoproteinoid-Lösung (15 bzw. 60 min auf 100°) führt zu einer beträchtlichen Aktivierung der Peroxidase-Eigenschaften (bei HP 73b Verdoppelung der Aktivität). Die Katalase-Eigenschaft wird hierdurch nicht signifikant verändert.

Diskussion

Eine bis zu 50-fache Steigerung der peroxidatischen Aktivität des Hämatins durch Einbau in Proteinoide wurde beobachtet. Dieser Effekt ist abhängig von der Aminosäurezusammensetzung der Proteinoide. Bemerkenswerterweise zeigen die lysinrei-

chen Polymere (und nicht die histidinreichen) die höchste Aktivität. Die Aminogruppen des Lysins liegen aber in keinem der lysinreichen Polymeren frei vor*. Durch Reaktion einer Aminogruppe mit zwei benachbarten Peptidbindungen könnten sich unter den hier genannten Kondensationsbedingungen Imidazol-Derivate bilden. Weitere Versuche müssen diese Frage klären. Versuche zur Synthese von Hämoproteinoiden mit einer Aminosäurezusammensetzung, die z. B. derjenigen der Katalase aus Rinderleber entspricht, führten nicht zu Produkten mit signifikanter Aktivität. In Abwesenheit von basischen Aminosäuren wird die peroxidatische Aktivität des eingebauten Hämins nicht wesentlich gesteigert (Tab. 2, 79b). Die Frage nach dem Mechanismus der Aktivitätssteigerung durch Erhitzen in wäßriger Lösung bedarf weiterer experimenteller Klärung. Ein Zusammenhang mit der Hydrolyse von Imiden ist denkbar³⁸. Hämoproteinoide mit höherem Eisenporphyringehalt (über 10%) dürften Polymere des Hämins enthalten; nicht jedoch z. B. das relativ aktive Hämoproteinoid 83b (2% Hämin; Tab. 2).

Energetisch gesehen ist die peroxidatische Oxydation von NADH keine besonders effektive Reaktion³⁹. Falls jedoch Hämoproteinoide des hier vorgestellten Typs bereits in präbiologischen Systemen auftraten, dann hätten diese Katalysatoren in Verbindung mit Vorläufern des NADH selbst in anaerober Umgebung und bei geringer H_2O_2 -Konzentration einen primitiven oxidativen Stoffwechsel ermöglicht. In diesem Zusammenhang erscheint es wesentlich, daß durch die Bindung des Eisenporphyrins an Proteinoide nur die peroxidatische Aktivität, nicht aber die katalatische Aktivität gesteigert wird. Durch eine einfache katalatische Spaltung des Hydrogenperoxids ginge dessen hohes Oxydationspotential zunächst weitgehend nutzlos verloren, dagegen ermöglicht die peroxidatische Aktivität eine spezifische Ausnutzung dieses Oxydationspotentials.

Die Autoren danken Herrn Dr. S. W. FOX für zahlreiche Diskussionen, Frau Dr. G. HORNECK für die mikrobiologischen Tests, Fräulein C. BRAND für die Durchführung der Aminosäureanalysen und Herrn E. FRIEDRICH für seine Hilfe bei der Synthese der Hämoproteinoide.

³⁵ H. VON EULER u. K. JOSEPHSON, *Auf.* **455**, 1 [1927].

³⁶ K. G. STERN, *Z. physiol. Chem.* **209**, 176 [1932].

³⁷ K. G. STERN, *J. biol. Chemistry* **112**, 661 [1936].

* Dose et al., in Vorbereitung.

³⁸ D. L. ROHLFING, Ph. D. Dissertation, Florida State University 1964.

³⁹ K. G. PAUL, in: *The Enzymes* (P. D. BOYER, H. LARDY, and K. MYRBÄCK, eds.), p. 263, Academic Press, New York 1963.