Nachweis einer Katalase-Hemmung durch Formaldehyd in vitro

B. A. F. STUMM-TEGETHOFF und A. H. M. VAN DER LOO

Genetisches Institut der Universität Nijmegen (Niederlande)

(Z. Naturforsch. **24 b**, 657—658 [1969]; eingegangen am 7. Januar 1969)

Mutationsversuche an *Drosophila melanogaster*^{1, 2} machen wahrscheinlich, daß die mutagene Wirkung von Formaldehyd in saurem Milieu sowie einiger Säuren, auf Katalase-Hemmung beruht. Eine Folge dieser Hemmung wäre eine Anhäufung von H_2O_2 und von Peroxyden, deren Mutagenität schon früher beschrieben wurde³⁻⁶. Um diese Arbeitshypothese zu stützen, haben wir die hier wiedergegebenen in-vitro-Experimente durchgeführt.

In Anlehnung an bekannte Katalase-Nachweismethoden⁷ wurde die Katalase-Aktivität spektrophotometrisch bestimmt. Bei 240 μ wurde die Abnahme der optischen Dichte als Folge des Substratabbaues durch Katalase gemessen. Als Substrat diente 0,314 M H_2O_2 -Lösung in Sørensen-Puffer, pH 7,02, wovon 3 ml in

die Meßküvetten gegeben wurden. Katalase aus Rinderleber der Fa. Boehringer mit einer spezifischen Aktivität von 39000 U/mg wurde so verdünnt, daß 4,75 U/ μ l in den Versuch genommen wurden. Die Abnahme der optischen Dichte infolge der Reduktion von H_2O_2 durch die zugefügte Katalase wurde in Abständen von 10 sec 3 min lang gemessen. Die Küvettemperatur des UV-Spektrophotometers (Zeiss, PMQ II) betrug konstant 20 °C ($\pm 0,2$ °C).

Die Resultate sind Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchsreihen. Die Konzentration der Substanzen, deren Einfluß auf die Katalase-Aktivität zu untersuchen war, wurde so gewählt, daß sie mit der im Mutationsversuch verwendeten Lösungen übereinstimmte. Die Stammlösungen für Formaldehyd, Ameisen-, Essig- und Salzsäure waren so eingestellt, daß nach Hinzufügen der Substanzen zu den 3 ml H_2O_2 -Lösung die Endkonzentration in der Küvette 0,05%, 0,025%, 0,1%, 0,1% bzw. 0,01% betrug. Zur Herstellung dieser Stammlösungen diente ebenfalls Sørensen-Puffer, pH 7,02 als Verdünnungsmittel. Die H_2O_2 -Lösung wurde mit den auf Hemmwirkung zu untersuchenden Substan-

Schema 1. Darstellung der Mittelwerte (ohne Berücksichtigung der Abweichung) der Extinktionsabnahme/10 sec. Den berechneten Werten liegen mindestens 3 Versuchsserien zugrunde.

Schema 2. Darstellung der Mittelwerte (ohne Berücksichtigung der Abweichung) der Extinktionsabnahme/10 sec. Den berechneten Werten liegen mindestens 3 Versuchsreihen zugrunde.

¹ B. STUMM-TEGETHOFF, Naturwissenschaften **51**, 646 [1964].

² Publikation in Vorbereitung.

³ F. H. SOBELS, Z. ind. Abst.- u. Vererb. **86**, 399 [1955].

⁴ F. H. SOBELS, Nature [London] **177**, 979 [1956].

⁵ F. H. SOBELS and J. W. J. M. SIMONS, Z. ind. Abst.- u. Vererb. **87**, 735 [1956].

⁶ F. H. SOBELS, Radiat. Res. Suppl. **3**, 171 [1963].

⁷ H. LÜCK, in: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962.

zen versetzt und gut gemischt, dann 1. der pH-Wert und 2. die Extinktion gemessen und sofort die Katalase zugefügt.

Die Ergebnisse sind in Schemata 1 und 2 zusammengestellt und geben den Einfluß der untersuchten Stoffe auf die Katalase-Aktivität wieder.

Alle untersuchten Agenzien hemmen die Katalase.

AGNER und THEORELL⁸ weisen eine Katalase-Hemmung durch Anionen nach. LÜCK⁹ findet, daß die Abhängigkeit vom pH-Wert Dissoziationsgrad und Konstitution der Säure und die Katalase-Hemmung entscheiden. Das Aktivitätsoptimum der Katalase liegt bei pH 7. Wir wählten daher pH 7,02 für den Kontrollversuch. Inwieweit die sich ergebende Zunahme der H-Ionen-Konzentration bei Zugabe von Säuren oder anderen Substanzen und die damit verbundene Herabsetzung des pH-Wertes oder andererseits der Dissoziationsgrad der Säure für die Katalase-Hemmung anzusprechen sind, braucht durch unsere Versuche nicht entschieden zu werden. Die Tatsache des Auftretens einer Katalase-Hemmung allein genügt, um eine Anhäufung von H_2O_2 zu bewirken, die mutagene Folgen haben kann. Obwohl LÜCK¹⁰ mit viel geringeren Konzentrationen (für $HCOOH$: 0,002 M) als wir (für $HCOOH$: 0,265 M) und feststehendem pH-Wert (4,5) arbeitet, findet auch er, daß die Ameisensäure von allen durch ihn getesteten Stoffen die stärkste Katalase-Hemmung aufweist. Für

unsere Versuche war die Festlegung auf einen bestimmten pH-Wert nicht von Bedeutung, da sich bei allen aus der Zusammensetzung der Reaktionsgemische ergebenden pH-Werten eine mehr oder weniger starke Katalase-Hemmung zeigte. Mit LÜCK stimmen wir auch darin überein, daß in bezug auf Essigsäure eine Fehlinterpretation der Ergebnisse möglich ist, da Essigsäure durch das vorhandene H_2O_2 oxydiert wird. Dies würde die geringere Hemmwirkung von CH_3COOH gegenüber $HCOOH$ erklären.

Die vorliegenden Versuche bestätigen eine Katalase-Hemmung durch Formaldehyd bei niedrigen pH-Werten; bei pH-Werten > 7 bleibt Formaldehyd ohne nennenswerten Einfluß auf die Katalase. Durch Zugabe von Säuren, die jede bereits für sich eine Katalase-Hemmung bewirken, wobei $HCOOH$ die stärkste, HCl die geringste Hemmung zeigt, wird die Katalase-Hemmung durch Formaldehyd verstärkt, jedoch kann nicht von einer additiven Wirkung der Substanzen gesprochen werden. Die Ergebnisse stimmen weitgehend überein mit dem Maß der Mutationsempfindlichkeit von *Drosophila melanogaster* für diese Substanzen^{1, 2} und verstärken daher den Eindruck, daß die Katalase-Hemmung, die zu einer Anhäufung von H_2O_2 und damit zur Entstehung von mutagenen Peroxyden führt, durch Formaldehyd bei niedrigem pH-Wert bzw. Säuren hervorgerufen wird.

⁸ K. AGNER and H. THEORELL, Arch. Biochem. **10**, 321 [1946].

⁹ H. LÜCK, Naturwissenschaften **44**, 423 [1957].

¹⁰ H. LÜCK, Biochem. Z. **328**, 411 [1957].