

# Über die Identifizierung von enzymatisch gebildetem Hämin aus Protoporphyrin und Eisen

Von

G. Schäfer, W. Schmidtman und K. H. Weiner

Aus dem Institut für Flugmedizin der Deutschen Versuchsanstalt für Luftfahrt e. V., Bad Godesberg  
Leiter: Professor Dr. S. Ruff

(Der Schriftleitung zugegangen am 1. Dezember 1961)

Die biologische Synthese von Hämin\*, der prosthetischen Gruppe einiger Chromoproteide, ist in ihren wesentlichen Stufen bekannt. Der letzte Schritt der Synthese, die Inkorporierung von Eisen in Protoporphyrin oder Protoporphyrinogen, ist in den letzten Jahren als enzymatischer Prozeß beschrieben worden, wenngleich auch eine nichtfermentative Synthese angenommen wurde<sup>1</sup>. Vor allem durch die Verwendung von Radio-Isotopen (<sup>59</sup>Fe, <sup>14</sup>C) konnte der Nachweis erbracht werden, daß Hämolyat von Vogelerythrocyten<sup>2</sup>, Knochenmark (Kaninchen) oder Leberhomogenat (Ratten)<sup>3</sup> und Lebermitochondrien (Ratten)<sup>4</sup> den Eisen-Einbau katalysieren. Labbe et al.<sup>5</sup> bezeichnen dieses häminsynthetisierende Ferment als Iron-Protoporphyrin-Chelating Enzyme (IPCE).

Auf Grund unserer Vorstellung, daß eine Änderung der IPCE-Aktivität sich letztlich in einer Beeinflussung der Erythropoese äußern müßte, haben wir den „Wirkungsmechanismus“ und die Eigenschaften dieser Reaktion näher untersucht (Veröffentlichung in Vorbereitung).

Organhomogenate von Kaninchen werden mit Protoporphyrin (gelöst in 0,1m Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Puffer) und <sup>59</sup>Fe(III)-Citrat für 2 und mehr Stdn. bei 38° unter Stickstoffbegasung inkubiert, die entstandene Protoporphyrin-Eisenverbindung unter Zugabe von Trägerhämin (aus Blut) auskristallisiert und die  $\gamma$ -Strahlung des <sup>59</sup>Fe im Szintillationszähler mit Bohrlochkristall gemessen. Ansätze mit gekochtem Homogenat zeigten keinen Einbau von Radioeisen.

Für die Darstellung von Protoporphyrin verwenden wir Hämin als Ausgangssubstanz, das nach der Teichmannschen Reaktion durch Behandlung von Blut mit kochsalzhaltigem Eisessig gewonnen wird<sup>6</sup>. Hämin läßt sich in heißer Ameisensäure unter Zugabe von Eisenpulver als Reduktionsmittel in Protopor-

\* Wir verwenden im folgenden den Ausdruck Hämin für Protoporphyrin-Eisenkomplex-Verbindungen ohne Rücksicht auf die Wertigkeit des Eisens oder die Bindung des Eisens an seine Liganden.

<sup>1</sup> T. Heikel, W. H. Lockwood u. C. Rington, *Nature* [London] **182**, 313 [1958]; S. Granick u. D. Mauzerall, *J. biol. Chemistry* **232**, 1119 [1958].

<sup>2</sup> A. Goldberg, H. Aschenbrucker, G. E. Cartwright u. M. M. Wintrobe, *Blood* **11**, 821 [1956]; R. C. Krueger, J. Mesnick u. J. R. Klein, *Arch. Biochem. Biophysics* **64**, 302 [1956]; H. C. Schwartz, G. E. Cartwright u. M. M. Wintrobe, *Clin. Res. Proc.* **5**, 29 [1957].

<sup>3</sup> S. Schwartz u. K. Ikeda, in *Ciba Conference on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism*, J. & A. Churchill Ltd., London 1955.

<sup>4</sup> G. Nishida u. R. F. Labbe, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **31**, 519 [1959].

<sup>5</sup> R. F. Labbe u. N. Hubbard, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **41**, 185 [1960].

<sup>6</sup> M. Schalfjew, nach Hoppe-Seyler/Thierfelder, *Handb. d. physiol.-u. pathol.-chem. Analyse*. Bd. IV/2, S. 926, Springer-Verlag, Heidelberg 1960.

phyrin überführen<sup>7</sup>. Ammoniumacetat fällt aus der sauren Protoporphyrinlösung ein Rohprodukt von Protoporphyrin, dessen weitere Reinigung nach Fischer<sup>7</sup> mit zu großem Verlust verbunden ist (s. auch l. c.<sup>8</sup>). Wir reinigten auf folgendem Wege: Das Rohprodukt wird in Äthanol gewaschen, abzentrifugiert, getrocknet, in Eisessig aufgenommen, im Vak. auf etwa  $\frac{1}{3}$  des Volumens eingedampft und mit 40proz. Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt. Das ausfallende Na-Salz des Protoporphyrins wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in wenig konzentrierter Salzsäure gelöst. Die Lösung wird mehrere Male mit Pyridin/Chloroform 1:3 ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden im Vak. zur Trockene eingedampft.

### Protoporphyrin-Spektrum

in Chloroform: 631,5; 604,8; 575,7; 541,9; 507,5 m $\mu$ .

in Piridin: 395,3 m $\mu$ .

Der molare Extinktionskoeffizient in 0,1*M* Trispuffer/1,5*n* HCl 1:1 bei 407 m $\mu$  beträgt  $1,41 \times 10^5$  (l · Mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>).

Das Protoporphyrin ist in 0,1*M* Trispuffer gut löslich und die Lösung im Kühlschrank mehrere Tage gut haltbar.

Die Isolierung des während der Inkubation entstandenen Protoporphyrin-Eisen-Komplexes geschieht über Trägerhäm in aus je 10 ml Vollblut. Das „Gesamthäm in“ (synthet. Verbindung und Trägerhäm in) ist optisch rein.

Spektren: In 0,1*N* KOH ( $\lambda_{\max}$ ): 645,0; 590,5; 539,5 m $\mu$ .

In Pyridin (0,003proz. Lösung sofort gemessen,  $\lambda_{\max}$ ): 565,0; 530,5 m $\mu$ .

In Pyridin unter Zusatz von Hydrazin (sofort gemessen,  $\lambda_{\max}$ ): 557,0; 526,0 m $\mu$ .

Eine weitere Identifizierung wurde papierchromatographisch und radiochromatographisch durchgeführt: Es wird in einem zylindrischen Gefäß (50 × 25 cm) mit zentral durchbohrtem Schliffdeckel aufsteigend chromatographiert. Filterpapier (Whatman Nr. 1) 45 × 2 cm; Startfleck 3 cm von unterem Rand entfernt. Die zu untersuchenden Substanzen („Gesamthäm in“, authent. Häm in, Protoporphyrin, <sup>59</sup>Fe-Citrat) werden in Pyridin gelöst und mit der Blutzuckerpipette aufgetragen. Laufmittel: 2,6-Lutidin/Wasser oder wassergesätt. Kollidin. Die Chromatographie erfolgt in Ammoniakatmosphäre: 5 ml konz. Ammoniak werden  $\frac{1}{2}$  Stde. vor Versuchsbeginn neben dem Laufmittel in den Behälter eingebracht. Der Schliffdeckel wird durch einen schraubbaren Spannung auf dem Chromatographiegefäß fixiert, um ein Lüften des Deckels (aufgrund des hohen Innendruckes) und somit ein Zusammenbrechen der Atmosphäre zu vermeiden. Der sternförmige Hohlglasrechen für die Aufhängung der Papierstreifen steht mit einem Quecksilberüberdruckventil von 2,5 cm Höhe in Kommunikation. Nach dem Eintauchen der Streifen (0,5 cm) in das Laufmittel wird für 15—17 Stdn. bei Raumtemperatur (19—21°) chromatographiert.

Das von Kehl und Stich<sup>9</sup> angegebene Lösungsmittelsystem 2,6-Lutidin/Wasser 1:1 trennte Porphyrin und Häm in bei kleinen  $R_F$ -Wert-Differenzen in gut abgegrenzte Flecken, während das Mischungsverhältnis 5:3 (l. c.<sup>10</sup>) bei größeren  $R_F$ -Wert-Differenzen eine weniger scharfe Abgrenzung bewirkte. Mit wassergesätt. Kollidin erreichten wir größere  $R_F$ -Wert-Differenzen, gleichzeitig aber auch eine stärkere Schwanzbildung, s. Tabelle.

Authent. Häm in und das aus dem Ansatz isolierte „Gesamthäm in“ sind chromatographisch identisch. Der „Gesamthäm in“-Fleck und das Impulsmaximum des

<sup>7</sup> H. Fischer u. B. Pützer, diese Z. 154, 39 [1926].

<sup>8</sup> M. Grinstein u. C. J. Watson, J. biol. Chemistry 147, 667 [1943].

<sup>9</sup> R. Kehl u. W. Stich, diese Z. 289, 6 [1951].

<sup>10</sup> L. Eriksen, Scand. J. clin. Lab. Invest. 5, 155 [1953].

*R<sub>F</sub>*-Werte von Protoporphyrin und Hämin bei verschiedenen Laufmitteln.

Laufmittel	Protoporphyrin	Hämin
2.6-Lutidin/Wasser 1:1 . . . . .	0,90	0,80
2.6-Lutidin/Wasser 5:3 . . . . .	0,79	0,62
wassergesätt. Kollidin . . . . .	0,70	0,40

Radiochromatogramms liegen an gleicher Stelle. Gemessen wurde die  $\beta$ -Strahlung des inkorporierten  $^{59}\text{Fe}$  im Methandurchflußzähler.  $^{59}\text{Fe}$ -Citrat zeigt keine Wanderung.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die wertvolle Unterstützung dieser Arbeit.

**Zusammenfassung**

Eine abgeänderte Darstellung von Protoporphyrin wurde beschrieben. Protoporphyrin und Eisen werden fermentativ in eine Komplexverbindung übergeführt; diese Verbindung wurde spektrophotometrisch, papierchromatographisch und radiochromatographisch als Hämin identifiziert.

**Summary**

A modified preparation of protoporphyrin is described. Protoporphyrin and iron were converted enzymically into haemin (identified by spectrophotometry, paper chromatography, and radiochromatography).

*Dr. G. Schäfer, Deutsche Versuchsanstalt für Luft- u. Raumfahrt e. V., Institut für Flugmedizin, 532 Bad Godesberg, Kölner Str. 70.*