

## Hämine verschiedener Strukturen als Bakterienwuchsstoffe

K. G. PAUL und E. THOFERN

*Biokemiska institutionen, Karolinska institutet, Stockholm, Schweden; Hygiene-Institut der Universität Göttingen, Bundesrepublik Deutschland*

Eine früher beschriebene häminheterotrophe, streptomycinresistente Mutante von *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* SG 511 kann statt Protohäm in IX Hämato- und Mesohäm in IX, dagegen nicht Mesohäm in I und Diacetyldeuterohäm in IX, für ihre Hämoproteidsynthese ausnützen.

Jensen und Thofern haben eine streptomycinresistente häminheterotrophe Mutante des *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* S. G. 511 isoliert<sup>1,2</sup>, die imstande ist, die Apoproteine ihrer Hämoproteide aufzubauen und mit Häminen zu kuppeln. Die Synthese der Holohämoproteide ist aber nur nach der Zugabe von Häm in möglich.

Es ist mit einigen Hämoproteiden gelungen die reversible Spaltung in Häm in und Eiweiss durchzuführen<sup>3-5</sup>. Nicht nur Protohäm in sondern auch gewisse andere Hämine können die spezifische Wirkung wiederherstellen<sup>6,7</sup>, aber nur solche, die Propionsäuren an den Stellungen 6 und 7 (»Reihe IX») besitzen<sup>8</sup>. Die 6,8-Isomeren (»Reihe I») dagegen geben inaktive, auf Anionenaustauschern spaltbare Verbindungen<sup>9</sup>. Aber nicht alle dikarboxyligen Hämine der Reihe IX geben aktive Verbindungen. Bei Meerrettichperoxydase scheint eine Beziehung zwischen Aktivität und Spektrum vorzuliegen, indem die Aktivität geringer wird je langwelliger die  $\alpha$ -Bande im Hämochromogenspektrum liegt. Diacetyldeuterohäm in IX, z.B., ruft keine Peroxydaseaktivität hervor obwohl es eine feste Verbindung, ein wahres Holohämoprotein, mit Apo-Meerrettichperoxydase bildet<sup>9</sup>.

Es war nun von Interesse herauszufinden, ob auch die Mutante eine Isomerispezifität aufwies und ob auch eine Beziehung zwischen Häm in spektrum und den Lebensäusserungen der Mutante bestände.

### MATERIALIEN UND METHODEN

Die wachsende Mutante gibt auf Nähragar (2 % Agar in 1.5 % Caseinpepton — 1 % Glukose — Na-Phosphatpuffer 67 mM, pH 7.6) einen hauchdünnen Rasen, der ringsum ein Stanzloch mit der zu prüfenden Lösung einen Wachstumshof, einen Hemmhof oder

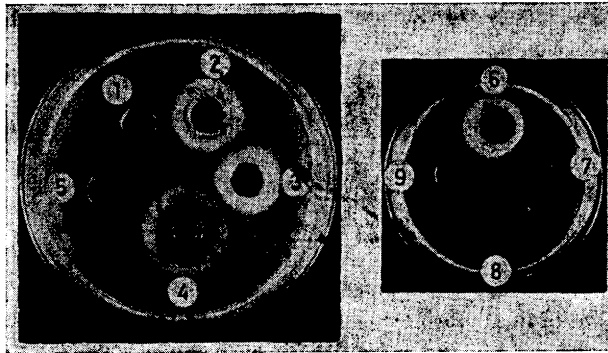


Abb. 1. Wachstumsförderung von verschiedenen Häminen in Stanzlochtest. Die Löcher enthielten:

- |                    |  |
|--------------------|--|
| 1. Natriumkarbonat | 6. Protohämin IX   |
| 2. Protohämin IX   | 7. Diacetyldeuterohämin IX<br>( $2,5 \times 10^{-9}$ Mole) |
| 3. Hämatohämin IX  | 8. Diacetyldeuterohämin IX<br>( $5 \times 10^{-11}$ Mole)  |
| 4. Mesohämin IX    | 9. Natriumkarbonat   |
| 5. Mesohämin I     |  |

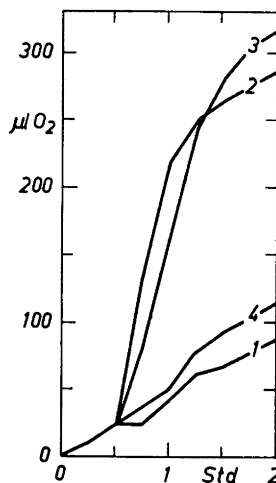


Abb. 2. Sauerstoffverbrauch ruhender Zellen der Mutante nach Zusatz verschiedener Hämine.

1. Ohne Hämin
2. Protohämin IX nach 30 min ( $6 \mu\text{M}$ )
3. Mesohämin IX nach 30 min ( $6 \mu\text{M}$ )
4. Mesohämin I nach 30 min ( $9 \mu\text{M}$ )

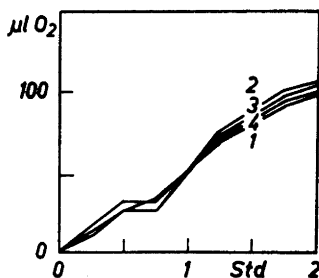


Abb. 3. Sauerstoffverbrauch ruhender Zellen der Mutante nach Zusatz von verschiedenen Häminen.

1. Ohne Hämin
2. Mesohämmin I nach 30 min (Endkonzentration im Gefäss 1,8  $\mu\text{M}$ )
3. Wie 2 + Mesohämmin IX nach 60 min (1  $\mu\text{M}$ )
4. Wie 2 + Protohämmin IX nach 60 min (1,2  $\mu\text{M}$ ).

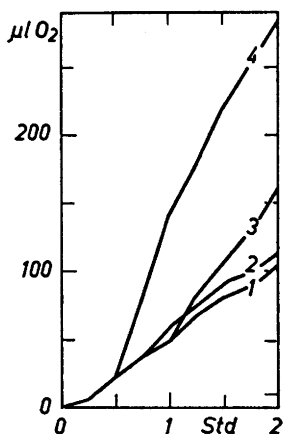


Abb. 4. Sauerstoffverbrauch ruhender Zellen der Mutante nach Zusatz von Diacetyldeuterohämmin IX.

1. Ohne Hämin
2. Diacetyldeuterohämmin IX nach 30 min (25  $\mu\text{M}$ )
3. Wie 2 + Protohämmin IX nach 60 min (5  $\mu\text{M}$ )
4. Protohämmin IX nach 30 min.

keine Veränderung zeigt. Von der Häminlösungen (0,05–0,10 mM in 0,1 M Natriumkarbonat) wurden 0,05 ml pro Loch abgemessen. Die Platten wurden nach 20 Std bei 37°C abgelesen.

Die ruhende Mutante, in der obigen Bouillon ohne Agar anaerob vorgezchtet und mit Kochsalzlösung und Puffer gewaschen, zeigt in Manometerversuchen eine mässige Sauerstoffaufnahme. Sie wurde während 30 min verfolgt ehe die Häminlösung eingekippt wurde. Bei dem Kippen erschien meistens eine  $\text{CO}_2$ -Freisetzung (siehe z. B. Abb. 3). Für die Messungen wurden verwendet 5 mg von Bakterien, als Trockengewicht

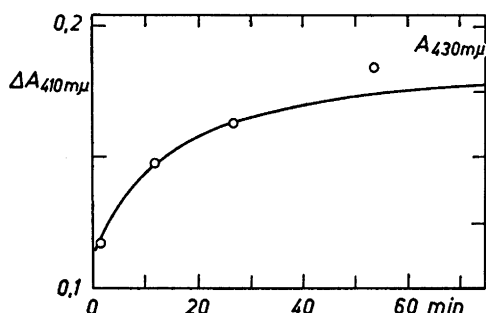


Abb. 5. Lichtabsorption- und Aktivitätszunahme während der Reaktion zwischen Apomeroerythrinperoxydase und Hämatohämin. Probeküvette: 0,02  $\mu$  Mole Protein + 0,03  $\mu$  Mole Hämatohämin in 3,7 ml 0,1 M Na - Phosphat, pH 7,1. Referenzküvette: Dasselbe ohne Protein. Lichtabsorption: Ordinate links und Kurve. In den Aktivitätsmessungen wurden 0,15 ml des Küvetteninhaltes für die Purpurogallinreaktion verwendet, 250 ml Äther. Ordinate rechts und Cirkel (Zusammen mit Y. Avi-Dor, 1952).

berechnet, 67 mM Na-Phosphat von pH 7,6, 100 mM Glukose, Luft als Gasphase, 37°C und 110 Oscillationen pro Minute. Anschliessend an die Atmungsversuche wurde die Katalaseaktivität bei 0–2°C titrimetrisch bestimmt<sup>19</sup> und als ml 10 mN Wasserstoffperoxyd ausgedrückt, die in 12 min zerlegt werden.

Sämtliche Hämine ausser Hämatohämin waren als Porphyrinester chromatographiert, nach Verseifung mittels Äther – HCl gereinigt und in Hämine mittels Ferroacetat in Eisessig überführt.

Die Kuppelung in Abb. 5 geschah wie früher beschrieben<sup>9</sup>.

## ERGEBNISSE

Die Ergebnisse sind in Abb. 1–5 und in Tabelle 1 gesammelt.

Tabelle 1. Katalaseaktivitäten der Gefässinhalte in Abb. 2–4.

Abbildung	Kurve	Hämine	Katalaseaktivität	
			ml 10 mN H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /12 min	
2	1	Ohne Zusatz	0,07	
	2	PH IX	1,20	
	3	MH IX	0,85	
	4	MH I	0,01	
3	1	Ohne Zusatz	0,08	
	2	MH I	0,10	
	3	MH I + MH IX	0,13	
	4	MH I + PH IX	0,47	
4	1	Ohne Zusatz	0,00	0,03
	2	DiAcDH IX	0,06	0,19
	3	PH IX	0,46	0,38
	4	DiAcDH IX + PH IX	0,33	0,20

## DISKUSSION

Die Beobachtungen in den Agar-Stanzlochtesten und in den Manometerversuchen mit den anschliessenden Katalasebestimmungen stimmen insofern gut überein, dass von den geprüften Häminen nur Proto-, Meso- und Hämatohämin IX positive Reaktionen hervorrufen, Mesohämin I und Diacetyldeuterohämin IX aber nicht. In Vorversuchen zeigte sich auch Deuterohämin IX als wirksam. Es ist unwahrscheinlich, dass die Mutante Enzyme für die Umwandlung der Meso-, Deutero- und Hämatohämine — nicht aber Diacetyldeuterohämin — in Protohämin parat hat. Man könnte deshalb vermuten, dass die zugesetzten Hämine unverändert eingebaut werden. Solche artifizielle Hämoproteide sind in der Natur früher nicht gefunden worden. Hämin a kann aus den Bakterien nach Protohäminzugabe isoliert werden<sup>11</sup>, ob die zugegebenen Protohäminmoleküle in Hämin a übergehen ist aber nicht eindeutig beantwortet. Für die Identifizierung der prosthetischen Gruppen müssen die gebildeten Hämoproteide von dem Überschuss an zugesetztem Hämin isoliert werden. Solche Versuche mit Verwendung von <sup>14</sup>C/<sup>59</sup>Fe-Hämin sind im Gange.

Genau jene Hämine sind für die Mutante nutzbar, die mit Apo-Meerrettichperoxydase aktive Verbindungen geben<sup>8</sup>. Dies ist um so bemerkenswerter da nach Protohäminzugabe mehrere Hämoproteide zu finden sind<sup>12</sup>. Unter den verwendeten Bedingungen wird die steigernde Wirkung des Protohämins auf die Sauerstoffaufnahme durch Diacetyldeuterohämin reduziert, zu 78 und 56 % in Doppelbestimmungen in Abb. 4; die Katalasebestimmungen gaben 72 und 47 %. In Abb. 1 sieht man zwischen den Löchern 6 und 7 eine gerade Begrenzung. Diese Befunde deuten eine Konkurrenz zwischen den beiden Häminen an. In dieser ist es wegen der Spektren zu erwarten, dass Protohämin fester als Diacetyldeuterohämin gebunden wird. Die Hemmung in Abb. 4 wurde mittels einem fünffachen Überschuss an Diacetyldeuterohämin erhalten. Da weiter Mesohämin I die Bakterien gegen die IX-Isomeren vollständig blockiert, muss man das Vorkommen von spezifischen Haftstellen, reaktiven Gruppen, in den Bakterien annehmen. Es ist an sich nicht überraschend, dass Mesohämin I als Wuchsstoff oder Co-Faktor nicht verwendbar ist, da bisher alle in der Natur gefundenen Hämoproteide Hämine der Reihe IX enthalten.

Die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs der ruhenden Mutante nach Häminzugabe (Abb. 2) kommt schnell, noch schneller als die Aktivitätszunahme nach dem Vermischen von Hämin mit Apoperoxydase (Abb. 5). Dies könnte mit einer unspezifischen Redoxwirkung vom Hämin erklärt werden. Der Unterschied zwischen den vier untersuchten Häminen der Reihe IX wäre dadurch zu verstehen, nicht aber die Unfähigkeit Mesohämins I Sauerstoffaufnahme und Wachstum zu fördern, auch nicht die oben erwähnte Konkurrenz.

Bei den auf Agar aerob wachsenden Bakterien begrenzt die Diffusion des Hämins den Wachstum, daher werden die Zeitverhältnisse unklarer. In den inneren Teilen des Wachstumshofs verschwand mit allen drei Häminen der Wachstum mehr oder weniger. Da aber diese leere Zone bei Mesohämin am breitesten war, kann Mangel an CoA, das für den bakteriellen Einbau von Protohämin in die Katalase notwendig sein soll<sup>13</sup>, oder an anderen Co-Faktoren

kaum die Ursache sein. Von den drei Häminen zeigt Hämatohämin in Wasserlösungen eine hohe Polymerisierung, Mesohämin eine niedrigere. Dementsprechend diffundiert Mesohämin weiter als die beiden anderen, und die Ausdehnung der leeren Zone mag damit verbunden sein. In Stanzlochversuchen mit Kobaltporphyrinen und *Lactobacillus lactis* Dorner bewirkten die Hämato- und Protoverbindungen Wachstum, Meso dagegen Hemmung<sup>14</sup>.

Alle bisherigen Ergebnisse wären durch die Annahme, dass die Bakterien spezifische Apoeiweissmoleküle besitzen, die ihre Haftgruppen oberflächlich tragen, erklärt. Sie schliessen aber auch beinahe aus, dass die Zunahme der Sauerstoffaufnahme nach Häminzugabe durch eine Kette von Hämin-Redoxkatalysatoren stattfindet, fastmehr scheint es sich um nur ein Hämoprotein zu handeln. Die Peroxydasewirkung der Katalase könnte hier die Funktion einer terminalen Oxydase einnehmen.

In den hier beschriebenen Versuchen (Abb. 2—4) wurden die Bakterien während der Phase ihres schnellsten Wachstums geerntet. Zu dieser Zeit sollten sie also, nachdem was oben gesagt wurde, Apokatalase enthalten. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass eine Beziehung zwischen Wachstum und Peroxydase- bzw. Katalaseaktivität vorliegen könnte. Es ist schon längst bekannt, dass Kürbiskotyledone an Katalase sehr reich sind<sup>15</sup>; eine nähere Untersuchung<sup>16</sup> ergab das Katalasemaximum zwischen den 6. und 8. Tag bei 15°C in Erbsenpflanzen. Auch in tierischen Geweben sind ähnliche Beobachtungen gemacht worden. Während der Oestradiol-induzierten Uterushyperplasie steigt bei Mäusen die Peroxydaseaktivität stark an<sup>17,18</sup>. Ein eingehender Vergleich zwischen den durch Peroxydase und Zytochrome bedingten Sauerstoffaufnahmen während der verschiedenen Phasen des Wachstums wäre von Interesse. Aus der allgemeinen Verbreitung und der hohen Katalaseaktivität in den Erythrozyten geht aber hervor, dass die Wirkung der Hydroperoxydasen nicht nur mit Wachstum verknüpft sein können.

Die Untersuchung wurde von *Statens naturvetenskapliga forskningsråd*, Schweden (K. G. P.) und die *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (E. Th.) unterstützt.

#### REFERENZEN

1. Jensen, J. und Thofern, E. *Z. Naturforsch.* **8 b** (1953) 599.
2. Jensen, J. und Thofern, E. *Z. Naturforsch.* **8 b** (1953) 604.
3. Theorell, H. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **14 B** (1940) No. 20.
4. Theorell, H. und Åkeson, Å. *Ann. Acad. Fennicae Ser. A II Chem.* **60** (1955) 303. Vgl. auch Rossi-Fanelli, A. und Antonini, E. *Arch. Biochem. Biophys.* **77** (1958) 478.
5. Rossi-Fanelli, A., Antonini, E. und Caputo, A. *Biochim. et Biophys. Acta* **28** (1958) 221. Vgl. auch Rossi-Fanelli, A. und Antonini, E. *Arch. Biochem. Biophys.* **80** (1959) 299.
6. Theorell, H., Bergström, S. und Åkeson, Å. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **16 A** (1942) No. 13.
7. Gjessing, E. C. und Sumner, J. B. *Arch. Biochem.* **1** (1943) 1.
8. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **13** (1959) 1239.
9. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **12** (1958) 1611.
10. Sumner, J. B. and Somers, G. F. *Chemistry and Methods of Enzymes*. 2nd ed., Academic Press, New York, 1953, p. 27.
11. Jensen, J. und Thofern, E. *Z. Naturforsch.* **9 b** (1954) 596.

12. Kiese, M., Kurz, H. und Thofern, E. *Biochem. Z.* **330** (1958) 541.
13. Jensen, J. *J. Bacteriol.* **73** (1957) 324.
14. Bahidi, Z. G., Sjöström, A. G. M. und Paul, K. G. *Exptl. Cell. Research* **3** (1952) 489.
15. Zeile, K. in Bamann, E. und Myrbäck, K. (Ed.) *Die Methoden der Fermentforschung*, Band 3, 2626. G. Thieme, Leipzig, 1941.
16. Goksöyr, J., Boeri, E. und Bonnichsen, R. K. *Acta Chem. Scand.* **7** (1953) 657.
17. Martin, A. P., Neufeld, H. A., Lucas, F. V. und Stotz, E. *J. Biol. Chem.* **233** (1958) 206.
18. Paul, K. G. und Wiqvist, N. *Experientia* **16** (1960) 421.

Eingegangen am 2. April 1960.