

Die Biosynthese des Hämins

Von Prof. Dr.-Ing. KARL ZEILE

C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim a. Rhein*)

Die Verwendung isotope markierter Bausteine hat den Weg der Biosynthese des Hämins in den wesentlichen Zügen aufgedeckt. Dieser Weg zweigt über die Succinyl-Verbindung des Co-Enzym A aus dem Tricarbonsäure-Cyclus ab. δ -Aminolävulinsäure, sehr wahrscheinlich Porphobilinogen und Uroporphyrin bilden weitere Zwischenstufen der Synthese. Die gesamte Synthese läßt sich in vitro in Vogelbluthämolysaten reproduzieren, die demnach sämtliche für die einzelnen Syntheseschritte notwendigen Fermentkomponenten enthalten. Die bevorzugte Entstehung der Isomerenreihe III wird erörtert.

Einleitung

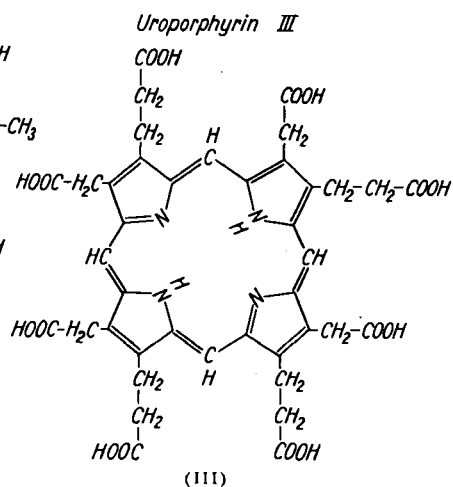
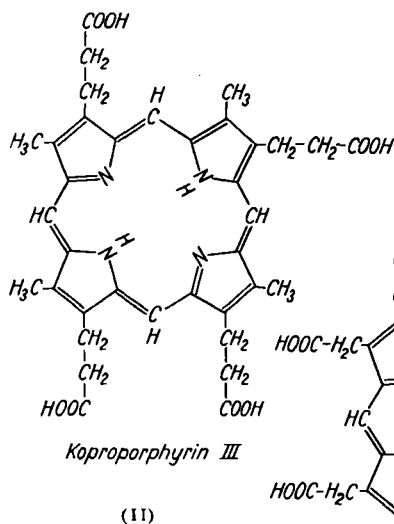
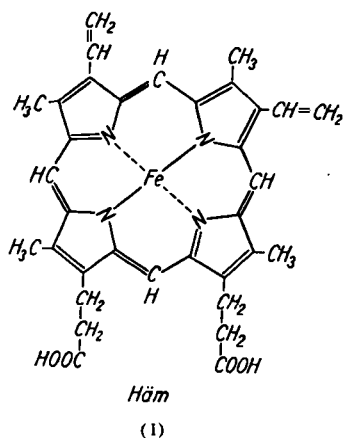
Vor 25 Jahren war das Konstitutionsproblem der Farbkomponente des Blutfarbstoffes durch *Hans Fischer* im Sinne der klassischen Organischen Chemie mit der Synthese des Hämins abgeschlossen worden. Etwa gleichzeitig begannen sich unsere Kenntnisse von den biologisch-katalytischen Fähigkeiten des Hämin-Typs zu erweitern. Während man früher seine ausschließliche Aufgabe in der reversiblen Sauerstoff-Bindung im Hämoglobin sah, brachten in der zweiten Hälfte der 20iger Jahre die Untersuchungen *Warburgs* die Erkenntnis von der Hämin-Natur des universell verbreiteten Sauerstoff-übertragenden Ferments der Atmung und diejenigen von *Keilin* deckten die Bedeutung der ebenso weit verbreiteten Cytochrome im Oxydationsstoffwechsel auf. Hämin wurde als Wirkgruppe der Katalasen und Peroxydasen erkannt.

Neben dieser mehr auf funktionelle Zusammenhänge abgestellten Entwicklungsrichtung trat in den letzten Jahren das Thema der Biosynthese des Hämins zunehmend in den Vordergrund.

Formel (I) gibt die Konstitution des „Häm“ wieder. Es ist die Eisen(II)-Komplexverbindung des Protoporphyrins und als solche die eigentliche prosthetische Gruppe des Blutfarbstoffes. Während das „Hämin“ im engeren Sinne das Chlorid der Eisen(III)-Komplexverbindung ist, die stabile und gut kristallisierte Abscheideform der Blutfarbstoffkomponente, bezeichnet man als Hämine bzw. Häme ganz allgemein die entsprechenden Eisen-Komplexverbindungen beliebiger Porphyrine. Schließlich benützt man die Bezeichnung Hämin im weitesten Sinne als Sammelbegriff für Por-

phyrin-Eisenkomplexsalze ohne Rücksicht auf die Wertigkeitsstufe und die Art der mit dem Eisen verbundenen Liganden.

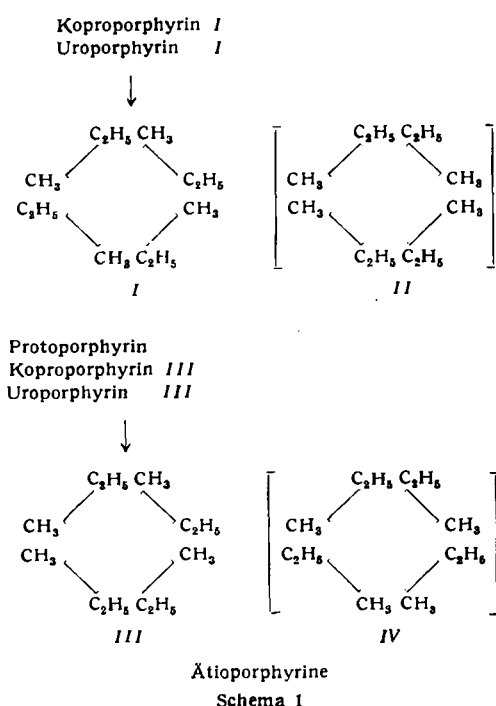
Obwohl es sich im folgenden um das Hämin im Sinne der Farbkomponente des Blutfarbstoffes handelt, müssen zwei weitere, natürlich vorkommende Porphyrin-Typen, Koproporphyrin (II) und Uroporphyrin (III) hier erwähnt werden.



In allen drei Formeln sind die Seitenketten, wenn auch in verschiedenen Abwandlungen, nach dem gleichen Reihenfolgeprinzip angeordnet: Die Vinyl-Gruppen des Protoporphyrins erscheinen im Koproporphyrin als Propionsäure-Reste, darüber hinaus sind im Uroporphyrin die Methyl-Gruppen zu Essigsäure-Resten carboxyliert. Die verschiedenen Isomeren, die sich durch wechselnde Reihenfolge der Seitenketten ableiten lassen, werden unter völliger Decarboxylierung und Hydrierung der Seitenketten

*) Vorgetragen auf der Tagung der *Hans-Fischer-Gesellschaft* in München am 5. März 1954.

nach einer von *Hans Fischer* getroffenen Einteilung auf die 4 möglichen „Ätio“-porphyrine mit je zwei Methyl- und Äthyl-Seitenketten zurückgeführt (Schema 1)**).



Demnach gehören die Formelbilder (I), (II) und (III) zum Ätio-Isomerenstamm III. Hämin und freies Protoporphyrin sind nur als Abkömmlinge des Ätio-Isomerenstammes III in der Natur aufgefunden worden; hingegen kennt man von Kopro- und Uroporphyrin auch noch den natürlichen Typus I, nicht jedoch II und IV. Andererseits hat man weder Kopro- noch Uroporphyrin als natürliches Eisenkomplexsalz angetroffen.

Alle früheren Überlegungen über mögliche Mechanismen einer Biosynthese des Häms entbehrten tragfähiger experimenteller Unterlagen. Als richtig hat es sich indes erwiesen, die Häm-Synthese in Zusammenhang mit den natürlich vorkommenden Porphyrinen Kopro- und Uroporphyrin zu betrachten; als gesichert gilt ferner die Vorstellung, daß die Porphyrin-Typen I und III schon zu Beginn der Biosynthese verschieden angelegt sein müssen, denn eine nachträgliche gegenseitige Umwandlung ist nach allen chemischen Erfahrungen auszuschließen.

I. Der Einbau isotonenmarkierter Bausteine in Protoporphyrin

Eine fruchtbare Erforschung der Biosynthese war nun mit Hilfe der Isotopenmethodik möglich, die in der Hand *Schönheimers* bereits ein weites Feld erschlossen hatte und die sich auch hier wieder hervorragend bewähren sollte. Besonders gefördert wurde das Problem in den USA – um nur einige Namen zu nennen – durch *Rittenberg*, *Shemin*, *Wittenberg*, *London* und *Kumin* an der Columbia University New York sowie von *Grinstein*, *Kamen*, *Mikoff* und *Moore* an der Washington University St. Louis. In England arbeiten daran *Neuberger* und *Muir* am Kings College London und *Rimington*, *Cookson*, *Dresel* und *Falk* an der Nuffield Unit for Research for Pyrrole Pigment Metabolism, London.

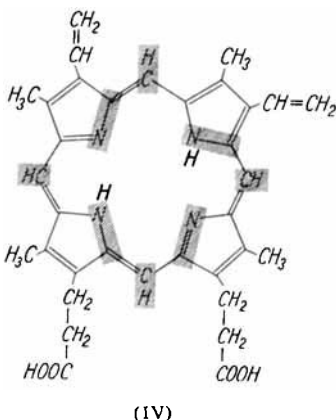
***) Zur Unterscheidung von der Numerierung der Formeln mit eingeklammerten römischen Zahlen ist die Bezifferung der Ätioporphyrintypen kursiv gesetzt.

In einer ersten Etappe wurde das Hämin daraufhin untersucht, welche isotonenmarkierten Bausteine sich in der fertigen Molekel wiederfinden lassen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1.

| Atomart | Substanz | Einbau |
|-----------------|--|---|
| D | CD ₃ -COOH | Seitenketten ¹⁾ |
| ¹⁵ N | H ₂ ¹⁵ N-CH ₂ -COOH ¹⁵ N-Serin | 4 Pyrrol-N-Atome ^{2, 3)} |
| | ¹⁵ N-Prolin, Glutamin-S., Leucin, ¹⁵ NH ₄ | minimal ^{3, 4)} |
| ¹⁴ C | H ₂ N-CH ₂ - ¹⁴ COOH H ₂ N- ¹⁴ CH ₂ -COOH | nicht feststellbar ⁵⁾ 4 α-C, 4 Methin-C-Atome ^{6, 7, 8)} |
| | H ₃ - ¹⁴ C-COOH H ₃ C- ¹⁴ COOH | übrige C-Atome ^{7, 8)} |

Tabelle 1
Isotopenversuche in der Biosynthese des Blutfarbstoffs

Besonderes Interesse wurden den Stickstoff-liefernden Aminosäuren zugewandt. Nach unseren heutigen Kenntnissen über die enzymatisch-reversiblen Beziehungen zwischen Glykokoll und Serin ist die gegenseitige Vertretbarkeit der beiden Aminosäuren verständlich¹⁰⁻¹⁴⁾. Charakteristisch ist, daß das Carboxyl-C-Atom des Glykokolls nicht ins Porphyrin-Gerüst eingebaut wird; auch die Methin-Brücke, die die Pyrrol-Kerne verbindet, stammt aus der Methylene-Gruppe der Aminosäure. Formel (IV) zeigt in den schraffierten Bereichen die aus Glykokoll stammenden Molekelbezirke; der Rest leitet sich aus anderen Kohlenstoffquellen, z. B. Essigsäure her.



II. Die Abzweigung des Synthesewegs aus dem Tricarbonsäure-Cyclus

Die Zusammenhänge zwischen der Hämin-Synthese und dem allgemeinen Zellstoffwechsel wurden durch die Untersuchungen von *Shemin* und *Wittenberg*¹⁵⁾ aufgeklärt, und zwar durch die quantitativ vergleichende Überprüfung des Einbaus von Essigsäure mit radioaktiver ¹⁴C-Markierung in der Methyl-Gruppe und solcher mit der Markierung in der Carboxyl-Gruppe.

Ganz entscheidend wurden diese Arbeiten durch die Entdeckung einer in vitro-Synthese von Häm auf biologischem Weg¹⁶⁾ gefördert. Normalerweise vollzieht sich die Hämoglobin-Synthese beim Säugetier in den kernhaltigen

- ¹⁾ K. Bloch u. D. Rittenberg, J. biol. Chemistry 159, 45 [1945].
- ²⁾ D. Shemin u. D. Rittenberg, ebenda 166, 621 [1946].
- ³⁾ D. Shemin, I. M. London u. D. Rittenberg, ebenda 183, 767 [1950].
- ⁴⁾ H. M. Muir u. A. Neuberger, Biochem. J. 45, 163 [1949].
- ⁵⁾ M. Grinstein, M. D. Kamen u. C. V. Moore, J. biol. Chemistry 179, 359 [1949].
- ⁶⁾ K. I. Altman, G. W. Casarett, R. E. Masters, T. R. Noonan u. K. Salomon, ebenda 176, 319 [1948].
- ⁷⁾ H. M. Muir u. A. Neuberger, Biochem. J. 45, XXXIV [1949]; 47, 97 [1950].
- ⁸⁾ J. Wittenberg u. D. Shemin, J. biol. Chemistry 185, 103 [1950].
- ⁹⁾ N. S. Radin, D. Rittenberg u. D. Shemin, ebenda 184, 745 [1950].
- ¹⁰⁾ D. Elwin u. D. B. Sprinson, ebenda 184, 475 [1950].
- ¹¹⁾ G. W. E. Plaut, J. J. Belheil u. H. A. Lardy, ebenda 184, 795 [1950].
- ¹²⁾ W. Sakami, ebenda 176, 995 [1948]; 179, 495 [1949].
- ¹³⁾ P. Siekowitz u. D. M. Greenberg, ebenda 180, 845 [1949].
- ¹⁴⁾ Zusammenfassung bei D. L. Drabkin, Physiol. Rev. 31, 345 [1951].
- ¹⁵⁾ D. Shemin u. J. Wittenberg, J. biol. Chemistry 192, 315 [1951].
- ¹⁶⁾ D. Shemin, I. M. London u. D. Rittenberg, ebenda 183, 757 u. 767 [1950].

Jugendformen der Erythrocyten, solange sie sich noch im Knochenmark aufhalten. In den reifen, kernlosen, im Blut kreisenden Erythrocyten ist die Synthese abgeschlossen; das Hämoglobin liegt dort fest bis zum Abbau der

kreisenden Blut nach seiner Entfernung aus dem Gefäßsystem Hämoglobin synthetisieren. Das bedeutet, daß durch Zugabe isotonenmarkierter Bausteine zu entnommenem Blut nachträglich isotonenmarkiertes Hämoglobin entsteht.

Die Fähigkeit zur Synthese hält über Tage an, wenn auch mit fallenden Umsätzen; am ersten Tag beträgt sie noch 0,4% des Gesamtbestandes. Sogar im Hämolytat, also in Lösung, vollzieht sich die Hämoglobin-Synthese. Die Vorteile einer solchen Methodik gegenüber der Verwendung eines Gesamtorganismus liegen auf der Hand.

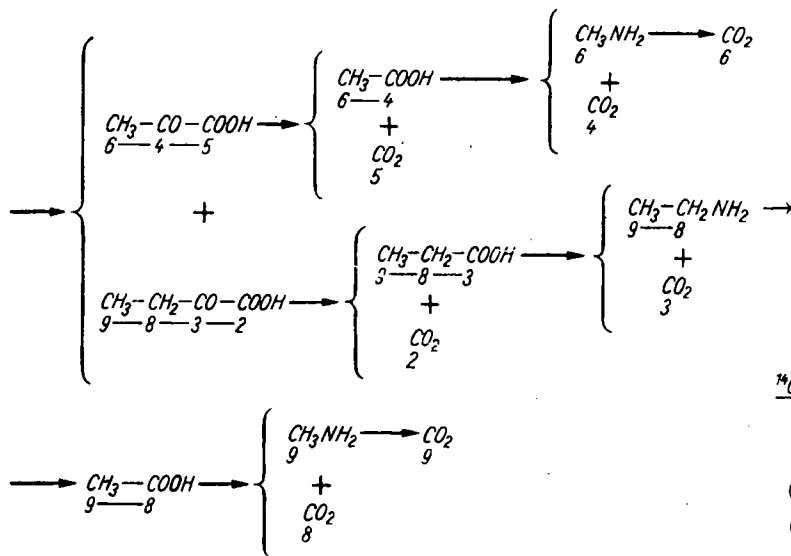
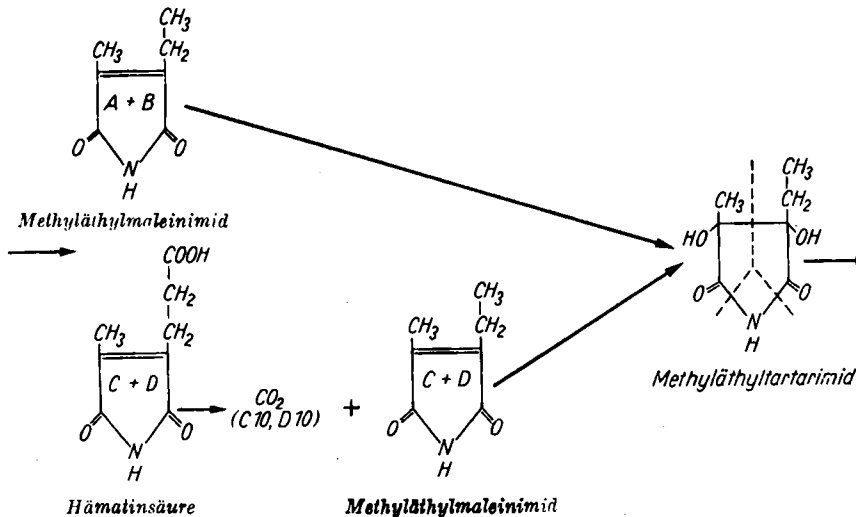
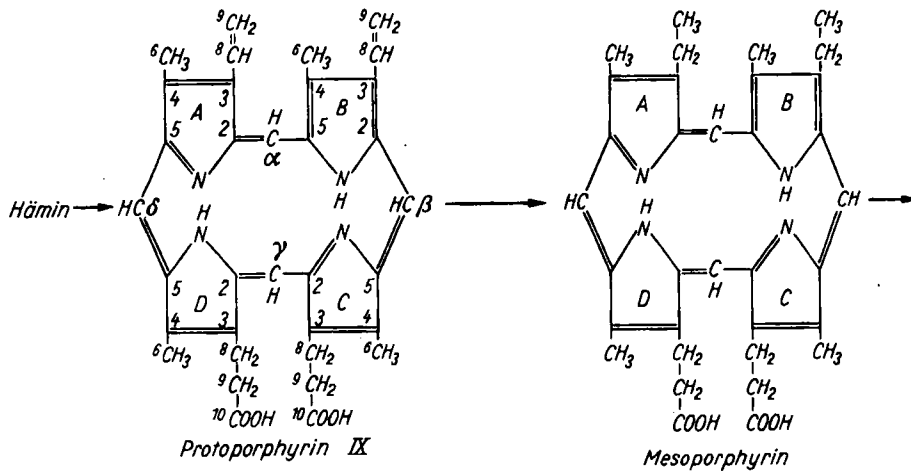
Eine weitere wichtige methodische Voraussetzung für die Bestimmung der lokalen Isotopenkonzentrationen in den Pyrrol-Ringen des Häms war der systematische und quantitative Abbau der Molekel unter Freilegung eines jeden einzelnen Kohlenstoffatoms¹⁸⁾. Er vollzieht sich nach dem angegebenen Schema 2; als Ergebnis wird schließlich die Radioaktivität von Carbonat-Proben bestimmt, die streng jedem C-Atom der vier Pyrrol-Ringe zuzuordnen sind.

Protoporphyrin, das als Blutfarbstoff aus isotonenmarkierter Essigsäure durch biologische in vitro-Synthese aufgebaut wurde, zeigte nach dem Totalabbau die im Schema 3 angegebenen radioaktiven Werte für die einzelnen C-Atome:

Die eingeklammerten Zahlen bedeuten vergleichbare, unter Berücksichtigung aller Versuchsumstände korrigierte Relativwerte als Anzahl der pro min im Geiger-Zähler gemessenen Impulse. Die eingekreisten Zahlen bedeuten die Bezifferung der entsprechenden Atome in allen 4 Ringen; in den Ringen A und B mit Vinyl-Gruppen entfallen sinngemäß die C-Atome (10), die fehlenden Nummern (7) würden den Carboxyl-C-Atomen des Uroporphyrins entsprechen.

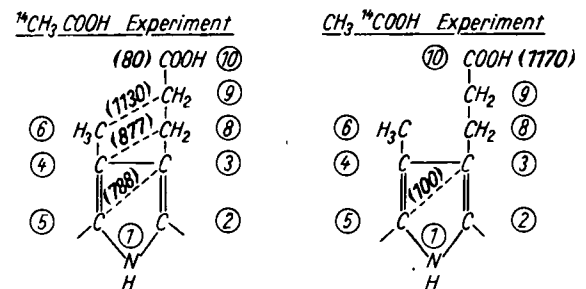
Es wurde folgendes gefunden: Die Gesamtaktivität der Ringe A und B ist unter sich gleich und unter Berücksichtigung des Fehlens von jeweils einer Carboxyl-Gruppe gleich C und D.

Alle C-Atome des Protoporphyrins, ausgenommen die acht aus Glykokoll stammenden, sind von der Essigsäure ableitbar, und zwar (4), (6), (8), (9) aus Methyl, (3) und (5) vorwiegend aus Methyl, (10) in den Ringen C und D vorwiegend aus Carboxyl.



Schema 2

Erythrocyten im Laufe der Blutmauserung. Die Erythrocyten der Vögel sind kernhaltig und reich an Jugendformen; im Entenblut finden sich davon bis zu 20%. Shemin und Rittenberg fanden, daß diese Erythrocyten auch im



Verteilung der ¹⁴C-Aktivität in Protoporphyrin aus C-markierter Essigsäure

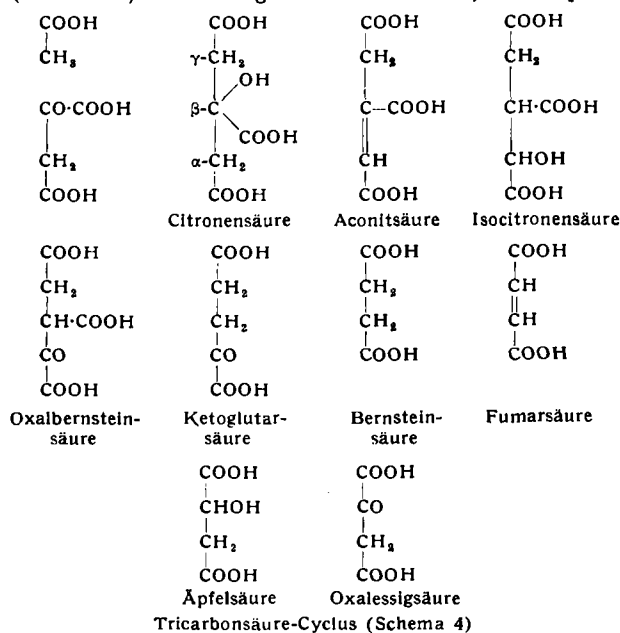
Schema 3

Auch die einzelnen C-Atome in den Ringen A und B und die entsprechenden in C und D haben paarweise dieselbe Aktivität. Die Zuordnung der C-Atome der „rechten“ und „linken“ Pyrrol-Ringseite erfolgt über ihre Abwandlung zu Brenztrauben- bzw. Ketobuttersäure (s. Schema 2). Daraus folgt, daß sich alle vier Pyrrol-Kerne des Protoporphyrins, gleichgültig, ob sie Carboxyl-Gruppen tragen oder nicht, von einer gemeinsamen Vorstufe ableiten und ferner, daß die beiden Seitenstücke eines Pyrrol-Kernes aus ein und derselben Verbindung aufgebaut sind.

Zum Aufbau der „Methyl“-Seite ist mindestens eine C₃-Verbindung nötig, für die andere Seite, die den Propionsäure-Rest trägt, eine C₄-Verbindung, ohne das aus Glykokoll stammende C-Atom (2). Da die Bausteine nach dem vorhergehenden identisch sein müssen, ist zu entscheiden, ob primär die C₄-Verbindung zur Verfügung steht, die die Carboxyl-Gruppe verliert, oder die C₃-Verbindung, die nachträglich carboxyliert wird. Die Entscheidung läßt sich durch den quantitativen Vergleich der beiden Versuchsreihen mit Methyl- und Carboxyl-markierter Essigsäure treffen. Der Vergleich ist zulässig, da für beide Versuchsreihen die gleiche Synthesegeschwindigkeit durch Mitverwendung von ¹⁵N-markiertem Glykokoll gesondert bewiesen wurde. Die Carboxyl-Gruppe (10) im Carboxyl-Isotopenversuch besitzt die gleiche Aktivität, wie die Methyl-Gruppe (9) im Methyl-Isotopenversuch. Deshalb kann die Carboxyl-Gruppe nicht nachträglich eingebaut sein. Andernfalls wäre die Aktivität der Carboxyl-Gruppe erheblich geringer, denn bei Carboxylierungsversuchen mit ¹⁴C-haltigem Carbonat wurden nur Spuren von Radioaktivität im Häm gefunden^{9, 17)}.

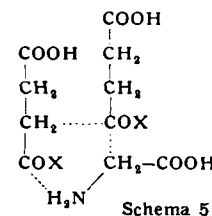
Weiter folgt, daß mindestens die C-Atome (9) und (10) aus einer intakten Essigsäuremolekel stammen und daß die Methyl- und Vinyl-Gruppen ursprünglich während der Synthese Carboxyl-Gruppen getragen haben.

Nachdem schon früher Lemberg und Legge¹⁸⁾ sowie Neuberg und Muir⁷⁾ die Ketoglutarsäure als möglichen Baustein für das Protoporphyrin diskutiert hatten, fanden Shemin und Wittenberg¹⁵⁾ in einem unsymmetrisch gebauten Succinyl-Derivat, das im Tricarbonsäure-Cyclus (Schema 4) aus Ketoglutarsäure entsteht, eine C₄-Ver-



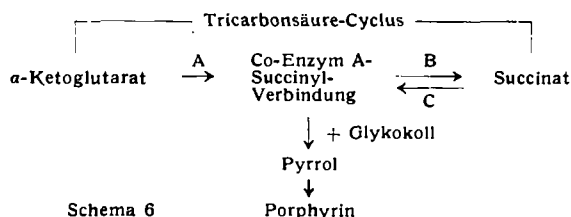
Tricarbonsäure-Cyclus (Schema 4)

bindung, die die Bauelemente der Essigsäure enthält und die eine mit dem Experiment zu vereinbarende Aktivitätsverteilung vorhersehen läßt. Sie formulierten den Aufbau des Pyrrol-Systems nach Schema 5. Inzwischen gilt es als gesichert, daß es die Succinyl-Verbindung des Coenzym A ist, die den Übergang von Ketoglutarsäure zu Bernsteinsäure vermittelt.



Schema 5

Schema 6 gibt diejenige Stelle des Tricarbonsäure-Cyclus wieder, an der die Abzweigung des Synthesewegs zum Porphyrin über die Succinyl-Komponente eintritt.



Schema 6

Wenn Zwischenstufen des Tricarbonsäure-Cyclus zum Einbau in das Protoporphyrin verwendet werden, dann muß sich die im Cyclus eingespielte Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Porphyrin-C-Atomen widerspiegeln. Dabei ist zu beachten, daß die zugeführte Essigsäure beim ersten Durchgang durch den Cyclus (Schema 4) ausschließlich zum Aufbau des γ-C-Atoms und der daran haftenden Carboxyl-Gruppe, also nur der „oberen“ Molekelhälfte der Citronensäure und ihrer Folgeprodukte dient und nicht, wie wegen des symmetrischen Baues der Citronensäure vermutet werden könnte, auch in der „unteren“ Hälfte erscheint. Dieses asymmetrische Verhalten der Citronensäure, gewissermaßen eine enzymatische Fixierung der betreffenden Molekelpartien, ist experimentell auf mehrfache Weise gesichert¹⁹⁻²³⁾.

Würde nun der ausschließlich aus Ketoglutarsäure im Sinn der Richtung A (Schema 6) entstandene Succinyl-Rest zum Pyrrol-Aufbau verwendet, so wäre nach Ablauf mehrerer Cyclen eine relative Verteilung der Aktivität auf die einzelnen C-Atome nach Tabelle 2 zu erwarten (Ausgangsaktivität der Essigsäure willkürlich als 10 angenommen).

| Ausgangsaktivität = 10 | | ¹⁴ CH ₃ COOH | | | | CH ₃ - ¹⁴ COOH | | | |
|------------------------|-----|------------------------------------|----|-----|----|--------------------------------------|----|----|----|
| Zahl der Cyclen. | | 1 | 2 | 3 | ∞ | 1 | 2 | 3 | ∞ |
| COOH | ⑩ | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| CH ₂ | ⑨ ⑧ | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CH ₂ | ⑧ ④ | 0 | 5 | 7,5 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C=O | ③ ⑤ | 0 | 5 | 7,5 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| COOH | | 0 | 0 | 2,5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 5 |

Tabelle 2

Diese Verteilung trifft nicht streng zu, denn im Methyl-Isotopenversuch trägt die Carboxyl-Gruppe (10) eine geringe Aktivität und die C-Atompaare (8) (4) und (3) (5) sind verschieden aktiv; im Carboxyl-Isotopenversuch zeigt das Paar (3) (5) deutliche Aktivität. Diese Verhältnisse erklären sich damit, daß in gewissem Umfang Bernsteinsäure über die Gleichgewichtsreaktion BC (Schema 6)

¹⁹⁾ J. M. Buchanan u. A. B. Hastings, *Physiol. Rev.* 26, 120 [1946].
²⁰⁾ H. G. Wood, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 13, 201 [1948].

²¹⁾ A. G. Ogston, *Nature [London]* 162, 963 [1948].

²²⁾ V. Lorber, M. F. Utter, H. Rudney u. M. Cook, *J. biol. Chemistry* 185, 689 [1950].

²³⁾ P. E. Wilcox, C. Heidelberger u. V. R. Potter, *Abstr. Amer. Chem. Soc.*, 117th Meeting, 26C (Philadelphia, April 1950).

¹⁷⁾ A. W. J. Bufton, R. Bentley u. C. Rimington, *Biochem. J.* 43, [1948].

¹⁸⁾ R. Lemberg u. J. W. Legge, *Hematin Compounds and bile pigments*, New York [1949].

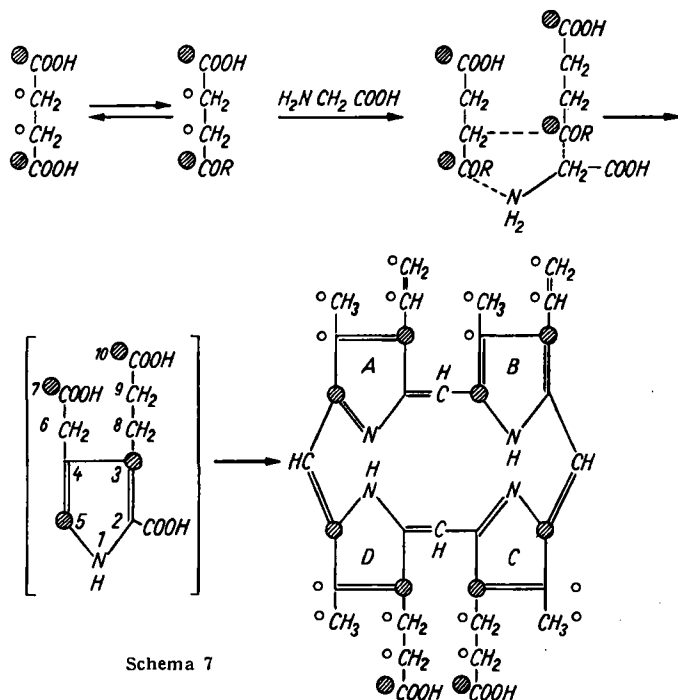
sich am Pyrrol-Aufbau beteiligt. Dabei tritt eine Umkehrung der symmetrisch gebauten Bernsteinsäure-Molekel ein, so daß im Methyl-Isotopenversuch die inaktive Carboxyl-Gruppe der eingeführten Essigsäure, im Carboxyl-Isotopenversuch die aktive Carboxyl-Gruppe ihren Beitrag zum C-Atompaar (3) (5) stellen. Da in beiden Versuchsreihen die Geschwindigkeiten gleich groß sind, sind auch die Aktivitätsdifferenzen innerhalb der Fehlergrenzen gleich (80–100).

Wenn diese Ableitungen zutreffen, dann muß es möglich sein, markierte Bernsteinsäure unmittelbar zum Häm-Aufbau zu verwenden, und zwar lassen sich hierfür die beiden oben erörterten Reaktionswege voraussehen (Schema 6): 1.) direkt über die CoA-Succinyl-Verbindung (Reaktionsweg C), 2.) indirekt auf dem Umweg über den Tricarbonsäure-Cyclus²⁴).

Im Carboxyl-Isotopenversuch verliert die Bernsteinsäure auf dem Umweg über den Cyclus beide Carboxyl-Gruppen. Dieser Weg bringt also zusätzlich keinen Beitrag zur Aktivität im Endprodukt; seine Blockierung, die durch Malonat möglich ist, sollte demnach nicht zu bemerken sein. Tatsächlich sind die Aktivitäten im Häm bei der Synthese aus Carboxyl-markierter Bernsteinsäure mit und ohne Malonat dieselben. Die Aktivität der Methylen-Kohlenstoffatome der Bernsteinsäure bleibt jedoch auch auf dem Umweg erhalten. Eine Verlegung dieses Weges durch Malonat muß sich in einer Aktivitätsminderung äußern, die wirklich zu beobachten ist.

Nach Schema 7 läßt sich bei der Synthese mit Carboxyl-markierter Bernsteinsäure folgende Aktivitätsverteilung im Protoporphyrin erwarten:

40 % in den Pyrrol-Ringen A und B
60 % in den Pyrrol-Ringen C und D



Schema 7

Verteilung ¹⁴C-markierter C-Atome (●) im Protoporphyrin.
(○ bedeuten aus Bernsteinsäure stammende, nicht markierte C-Atome)

Auch hier hat das Experiment die Voraussage ausgezeichnet bestätigt.

Aus allem ist überzeugend dargetan, daß sich die Pyrrolring-Hälften des Protoporphyrins aus Succinyl-

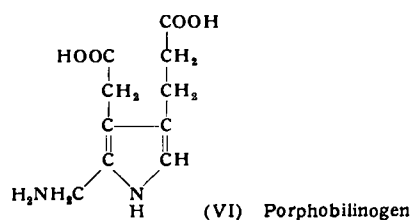
²⁴) D. Shemin u. S. Kumin, J. biol. Chemistry 198, 827 [1952].

Resten aufbauen; diese können entweder unmittelbar aus zugeführter Bernsteinsäure stammen oder über den Tricarbonsäure-Cyclus z. B. aus Essigsäure, ganz allgemein aus jeder im Tricarbonsäure-Cyclus verwertbaren Verbindung.

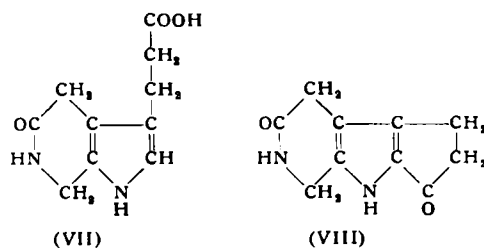
III. 8-Aminolävulinsäure, Porphobilinogen, Uroporphyrin als Zwischenstufen

Die nächste Frage ist, wie sich der weitere Aufbau des Pyrrol-Systems unter Verwendung von Glykokoll vollzieht und wie schließlich die Verknüpfung der Kerne über die Methin-Brücken zustande kommt. Dieses Problem wurde indirekt durch die Strukturaufklärung des Porphobilinogens entscheidend gefördert.

1939 hatten Waldenström und Vahlquist²⁵) aus dem Harn von Patienten mit akuter Porphyrie, einer Krankheit mit vermehrter Porphyrin-Ausscheidung, eine farblose Substanz isoliert, die beim Kochen in saurer Lösung neben einer dunkel gefärbten Substanz Porphyrin bildet. Die dunkle Substanz wurde als Porphobilin, das farblose Ausgangsprodukt als Porphobilinogen bezeichnet. Das entstandene



(VI) Porphobilinogen



(VII)

(VIII)

Porphyrin erwies sich in der Hauptsache als Uroporphyrin III neben wenig Uroporphyrin I. Das Porphobilinogen war noch nicht rein; man vermutete ein Isomerengemisch und schloß aus der Diffusionsgeschwindigkeit auf eine Molekülgröße mit zwei Pyrrol-Kernen. Nach weiteren Versuchen zur Charakterisierung durch Hawkinson und Watson²⁶) gelang Ende 1952 Westall²⁷) die Abscheidung des kristallisierten Porphobilinogens. 1953 wurde schließlich der Konstitutionsbeweis durch Cookson und Rimington^{28, 29}) im Sinn der Formel (VI) erbracht.

Die Verbindung liefert ein Lactam (VII) und ein Lactam-Lacton (VIII). Das chemische Verhalten der Substanz war erneut im Sinne der Beobachtung Waldenströms bestätigt worden: Beim Stehen in anorganischer Pufferlösung entsteht Porphobilin, über das noch nichts Näheres bekannt ist, beim Erhitzen in saurer Lösung, optimal in 0,3–0,5 n HCl, entsteht im wesentlichen Uroporphyrin III neben geringen Mengen eines anderen Isomeren.

In Anlehnung an die Ergebnisse von Shemin und Wittenberg zogen Cookson und Rimington für den Aufbau des

²⁵) J. Waldenström u. B. Vahlquist, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 260, 184 [1939].

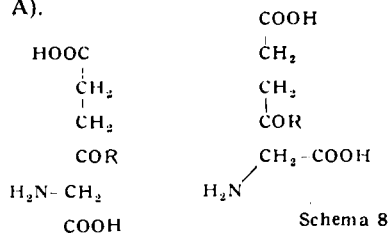
²⁶) V. H. Hawkinson u. C. J. Watson, Science [Washington] 115, 496 [1952].

²⁷) R. G. Westall, Nature [London] 170, 614 [1952].

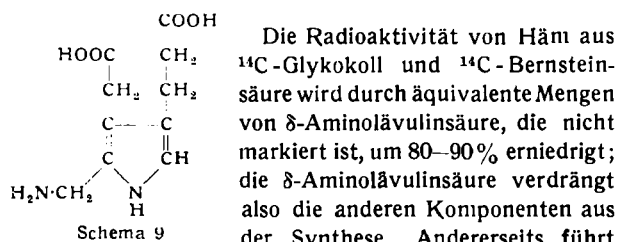
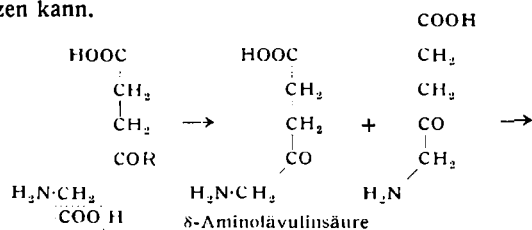
²⁸) G. H. Cookson u. C. Rimington, ebenda 171, 875 [1953].

²⁹) G. H. Cookson, ebenda 172, 457 [1953].

Phorphobilinogens Schema 8 in Betracht ($R =$ Rest des Coenzym A).



Wenig später berichteten *Shemin* und *Russell*³⁰⁾, daß δ -Aminolävulinsäure die früher ermittelten Substrate der Häm-Synthese, „aktives“ Succinat und Glykokoll ersetzen kann.



Die Radioaktivität von Häm aus ^{14}C -Glykokoll und ^{14}C -Bernsteinsäure wird durch äquivalente Mengen von δ -Aminolävulinsäure, die nicht markiert ist, um 80–90% erniedrigt; die δ -Aminolävulinsäure verdrängt also die anderen Komponenten aus der Synthese. Andererseits führt die Markierung der δ -Aminolävulinsäure mit ^{15}N und ^{14}C in der δ -Stellung zu einem viel isotenreicheren Häm, als es aus markiertem Glykokoll entsteht. Die Steigerung geht bis zum 44fachen Wert. δ -Aminolävulinsäure erleichtert also die Synthese erheblich und zeigt alle Merkmale eines Zwischenproduktes. Die Bildung der δ -Aminolävulinsäure wird aus Schema 9 verständlich.

Die Ergebnisse wurden später durch *Neuberger* und *Scott*³¹⁾ dadurch gesichert, daß andere denkbare Kondensationsprodukte aus Glykokoll und Bernsteinsäure, wie z.B. Succinylglycin und Succinyl-aminolävulinsäure als Bausteine für die Synthese ausgeschlossen werden konnten.

Es bleibt die Frage nach der Bedeutung des Porphobilinogens als mögliche Zwischenstufe auf dem Weg von der Aminolävulinsäure zum fertigen Porphyrin. Einen interessanten Beitrag hierzu brachten die Beobachtungen von *Falk*, *Dresel* und *Rimington*³²⁾ über das Verhalten von Porphobilinogen im Kückenblut-hämolyt. Hier handelt es sich nicht um Isotopenversuche, da das Porphobilinogen noch nicht in markierter Form zugänglich war. Die Autoren fanden, daß Porphobilinogen bei Belüftung in Uro-, Kopro- und Protoporphyrin übergeht; es handelt sich um Konzentrationen von etwa $10 \gamma/\text{cm}^3$.

Die Umwandlung in Protoporphyrin, das Grundporphyrin des Häms, verläuft zu 60%. Das Ergebnis der Synthese kann hier nur durch die Bestimmung der freien Porphyrine neben dem ursprünglich im Blut vorhandenen Häm ermittelt werden. Die fehlenden 40% Protoporphyrin dürften weiter durch Eisen-Einführung in Häm umgewandelt werden und sich damit dem Nachweis in dem großen vorhandenen Überschuß entziehen.

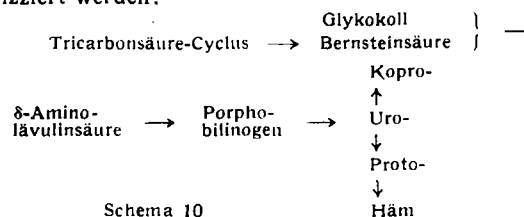
Unter Stickstoff entsteht kein Protoporphyrin, vielmehr sammeln sich Uro- und Koproporphyrin an. Bei Nachbe-

lüftung eines solchen Gemisches wandelt sich nur das Uroporphyrin – nicht Kopro- – in Protoporphyrin um. Demgemäß entsteht auch im Kückenblut-hämolyt aus zugesetztem Uroporphyrin bei der Belüftung bis zu 50% Protoporphyrin, nicht dagegen aus Koproporphyrin.

Die Beobachtungen sind aus zweierlei Gründen interessant: Sie zeigen den möglichen Übergang von Porphobilinogen in Porphyrin, der bislang nur im Reagenzglas zu demonstrieren war, unter physiologischen Bedingungen und sie decken die genetischen Beziehungen der drei physiologisch wichtigen Porphyrin-Typen untereinander auf. Die Stufe des Uroporphyrins wird in jedem Falle durchlaufen; durch Decarboxylierung und Dehydrierung – deswegen die aeroben Bedingungen – entsteht aus ihm Protoporphyrin. Die Bildung von Koproporphyrin, die allein durch Decarboxylierung des Uroporphyrins zustande kommt, stellt einen Nebenweg dar, denn von hier besteht kein Übergang zum Protoporphyrin (vgl. Schema 10).

Neuberger und *Scott*³¹⁾ fanden, daß ebenso wie Porphobilinogen auch δ -Aminolävulinsäure die gleichen Porphyrine im Kückenbluthämolyt bildet und von *Dresel* und *Falk*³³⁾ wurde bei dieser Reaktion mit überschüssiger δ -Aminolävulinsäure neben Uro-, Kopro- und Protoporphyrin Porphobilinogen identifiziert. Damit wurde δ -Aminolävulinsäure auch als Vorstufe des Porphobilinogens gekennzeichnet (Schema 9).

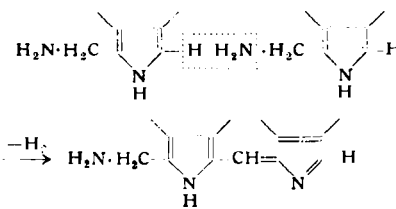
Nach den bisherigen Ergebnissen kann für die Biosynthese des Blutfarbstoffs folgender Weg nach Schema 10 skizziert werden:



Ob dabei nun tatsächlich die fertig ausgebildete Stufe des Porphobilinogens bei der normalen biologischen Synthese obligatorisch durchlaufen wird, ist noch nicht streng bewiesen. Es ist nicht auszuschließen, daß die Anlage der kernverbindenden Methin-Gruppen noch vor dem eigentlichen Pyrrol-Ringschluß geschieht und es nur unter besonderen, z. B. pathologischen Verhältnissen, zu Ausbildung des Porphobilinogens kommt, das allerdings selbst ebenfalls leicht in Porphyrin übergeht.

IV. Das Isomerenproblem

Es bleibt vorläufig eine offene Frage, warum sich der Porphyrin-Typ *III* unter natürlichen Bedingungen in so bevorzugtem Ausmaß bildet. Man schätzt¹⁴⁾ das Verhältnis der in der Biosynthese erzeugten Mengen von Porphyrinen *III* und *I* auf etwa 1500:1. Zur Vereinfachung der Diskussion sei unterstellt, daß tatsächlich Porphobilinogen eine obligate Zwischenstufe des Synthesewegs darstellt. Dann ist analog zum bekannten Verhalten von Pyrrol- α -carbinolen formal die Ausbildung einer Methin-Gruppe als eine NH_3 -Abspaltung zwischen 2 Porphobilinogen-Molekeln unter gleichzeitiger Dehydrierung zu betrachten (Schema 11):



Schema 11

³⁰⁾ D. Shemin u. C. Russell, J. Amer. chem. Soc. 75, 4873 [1953].

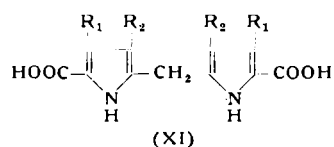
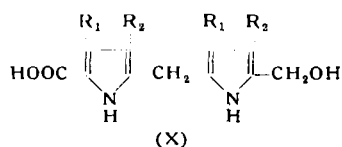
³¹⁾ A. Neuberger u. J. J. Scott, Nature [London] 172, 1093 [1953].

³²⁾ J. E. Falk, E. I. B. Dresel u. C. Rimington, ebenda 172, 292 [1953].

³³⁾ E. I. B. Dresel u. J. E. Falk, ebenda 172, 1185 [1953].

Ein solches Schema ließe vermuten, daß aus Porphobilinogen nur der Typ *I* entstehen kann, bei dem gleichsinnig jeweils die Aminomethyl-Gruppe in die α -Stellung des Nachbarkerns eingreift und so die konsequent alternierende Anordnung der β -Substituenten verursacht. Das analoge Problem liegt der Uroporphyrin-Synthese nach Treibs und Off³⁴⁾ zugrunde, bei der aus einem Pyrrol (IX) Uroporphyrin *III* entsteht.

Die Autoren erklären den Vorgang damit, daß $-\text{COOH}$ und $-\text{CH}_2\text{OH}$ ungefähr gleich schnell abgespalten werden und die Pyrrol- α -methingruppe mit der Methylol-Gruppe und mit Formaldehyd rascher reagiert als obige Spaltungen erfolgen. Die Carbinol-



Gruppe, die an noch intakten Pyrrol-Kernen haftet, hat dann die Wahl, entweder auf der Seite der Essigsäure- oder der Propionsäure-Gruppe teilweise abgebauter Molekeln einzugreifen. So entstehen — offenbar in etwa gleichen Mengen — zwei verschiedene Pyrromethane (X) (XI).

³⁴⁾ A. Treibs u. W. Off, Naturwiss. 40, 476 [1953].

³⁵⁾ Fischer-Orth: Chemie des Pyrrols, Leipzig 1937 Bd. II/1, 504.

Doch bedarf es spezieller Annahmen, um die Bevorzugung der Mischreaktion der Dipyrromethane (X) und (XI) vor ihrer Selbstkondensation zu begründen, wodurch allein die überwiegende Bildung des Typs *III* verständlich würde. Analoge Verhältnisse gelten auch für die Biosynthese des Uroporphyrins aus Porphobilinogen, doch scheinen weitere Überlegungen verfrüht, solange wir noch nicht wissen, ob überhaupt der Zusammenschluß zur Porphin-Molekel aus 2 Dipyrromethan- bzw. Methen-Bausteinen erfolgt oder aus 4 einzeln aneinander gereihten Pyrrol-Einheiten. Tatsache ist jedenfalls, daß auch der formal naheliegend erscheinende Weg der alternierenden Verknüpfung zum Uroporphyrintyp *I* gelegentlich im biologischen Geschehen beschränkt wird: Die große Menge Uroporphyrin, die der berühmte im Jahre 1925 verstorbene Porphyr-Patient Petry ausgetrennt hatte³⁵⁾, gehörte überwiegend dem Typ *I* an.

Wenn auch die letzten Phasen des Zusammenbaues des Porphingerüsts noch Fragen offen lassen, so besitzen wir doch heute schon einen recht instruktiven Überblick über die wesentlichen Vorstufen der biologischen Häminsynthese. Das experimentelle Tatsachenmaterial hierzu wurde, gerade in letzter Zeit, in rascher Folge von vorläufigen Kurzmitteilungen veröffentlicht; man kann mit Interesse der Bekanntgabe weiterer experimenteller Einzelheiten entgegensehen. Das Thema der Biosynthese des Hämins ist ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie sich schwierig erscheinende Probleme elegant lösen lassen, sobald die Zeit mit neuen methodischen Voraussetzungen dafür reif geworden ist.

Eingeg. am 24. Juni 1954 [A 614]

Die Biosynthese des Chlorophylls

Von Prof. Dr.-Ing. habil. WALTER SIEDEL

Frankfurt (M.)-Höchst, Farbwerke Hoechst AG*)

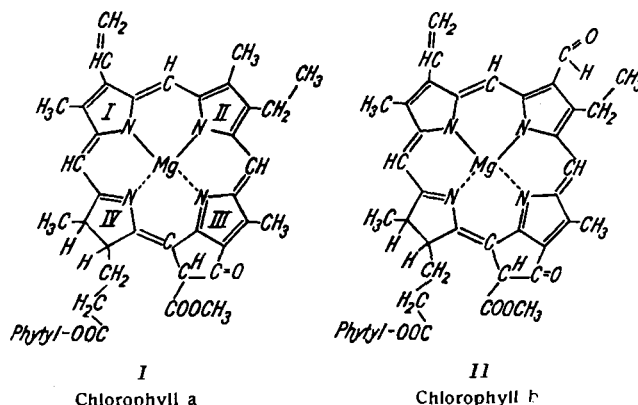
In den letzten Jahren wurden mit Hilfe der Isotopentechnik und durch die Züchtung von Chlorella-Mutanten wesentliche neue Erkenntnisse über die Chlorophyll-Synthese der lebenden Pflanze gewonnen. So ließ sich zeigen, daß Chlorophyll aus dem Protoporphyrin entsteht und dieses über die gleichen Zwischenprodukte gebildet wird wie im menschlichen und tierischen Organismus. Phylogenetisch scheint der Blutfarbstoff älter zu sein als das höher entwickelte Chlorophyll.

Einleitung

Wie die vorstehenden Ausführungen von K. Zeile zeigen, ist das Problem der biologischen Bildung des Häms, der prosthetischen Gruppe des roten Blutfarbstoffes, als weitgehend gelöst anzusehen. Was den zweiten, gleicherart wichtigen Pyrrol-Farbstoff der Natur, das Chlorophyll, betrifft, so sind heute ebenfalls schon tiefe Einblicke in das Wesen seiner biologischen Bildung erzielt worden¹⁾.

Selbstverständlich gehen die Versuche, Zwischenstufen der Chlorophyll-Bildung zu fassen und auf diesem Wege die einzelnen Phasen der Chlorophyll-Synthese in der Pflanze zu klären, schon viele Jahre zurück. Mit Hilfe der klassischen Methoden der organischen Chemie hat man aber nur wenig Positives erreicht und mußte den Schluß ziehen, daß die Bildung des Chlorophylls in der Pflanzenzelle sehr schnell vor sich geht. Man glaubte auch schon frühzeitig, annehmen zu dürfen, daß der Aufbau des Chlorophylls, bzw. der Chlorophylle a und b, deren Strukturen von Hans Fischer²⁾ und seiner Schule 1939 end-

gültig im Sinne der Formeln I und II festgelegt worden sind, aus verhältnismäßig niedermolekularen Bausteinen erfolgt.



Nur eine Substanz wurde als Vorstufe des Chlorophylls gefaßt, das Protochlorophyll. Es wurde 1893 von N. A. Monteverde³⁾ in Keimpflanzen, die im Dunkeln herangezogen worden waren, ebenso in etiolierten Pflanzen ent-

*) Vorgetragen auf der Tagung der Hans-Fischer-Gesellschaft, am 5./6. März 1954 in München.

¹⁾ K. Egle, Naturwiss. 40, 569 [1953].

²⁾ H. Fischer u. H. Wenderoth, Liebigs Ann. Chem. 537, 170 [1939].

³⁾ N. A. Monteverde, Scripta horti Petropol. 13, 201 [1893].