

tion. The ratio of two for hemin to protein was used, thus ensuring that the native apoprotein was saturated with the prosthetic group. All protein concentrations were based upon micro-Kjeldahl determinations.

The activity of unsplit HRP has been determined for four preparations and $\Delta A_{490} \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ was found to be 10.6, 11.4, 12.1, and 11.8, average 11.5.

Fig. 1 confirms the observation that the hemin that is nonspecifically attached to the apoprotein is removed by an anion exchanger. The hemin bound as the prosthetic group of HRP and the hemin present in excess of the protein moiety differ in their effects on the light absorption in the Soret band region. At 280 $m\mu$, however, no such difference can be seen. The activity of the recombined HRP in Fig. 1 was found to be $12.4 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$.

Table 1. Enzymatic activities of some artificial peroxidases.

Hemin	Positions of the carboxyl groups in the porphyrin ring	Activity $\Delta A_{490} \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$	Positions of the α -band of pyridine hemo-chromogen, $m\mu$
Protohemin IX	6,7	11.5	557
Hematohemin IX	6,7	15.5	548
Mesohemin IX	6,7	15.7	547
Deuterohemin IX	6,7	6.1	545
Diacetyldeuterohemin IX	6,7	0.3	582
Mesohemin I	6,8	0.4	547
Coprohemin I	2,4,6,8	0.1	548
Coprohemin III	2,4,6,7	0.1	548

When seven different preparations of protohemin were used in recombination experiments with the same batch of apoprotein, the activities of the holoenzymes were found as 9.9 ± 0.8 (S.D.). Since all activity values are based on nitrogen determinations, the somewhat low value may be caused by a partial inactivation of the apoprotein.

Some results with various hemins are given in Table 1. Mesohemin IX peroxidase and hematohemin IX peroxidase were 1.3 times more active than the unsplit peroxidase, whereas deuterohemin IX peroxidase

was only 0.5 times as active. Diacetyldeuterohemin IX does combine with the apoenzyme, as reported previously², but the resulting hemoprotein is inactive in this assay. The hemins with propionic acid residues in the six and eight positions are inactive, probably because of inability to react in an adequate way with the apoprotein. In the case of the four-carboxylic hemins the lack of activity may depend upon the nature of the hemin polymer.

There seems to be some correlation between the spectrum and the enzymatic activities of the meso-, hemato-, proto-, and diacetyldeuterohemin IX peroxidases.

A full report will be published.

1. Theorell, H., Bergström, S. and Åkeson, Å. *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* **16A** (1942) No 13.
2. Gjessing, E. C. and Sumner, J. B. *Arch. Biochem.* **1** (1943) 1.
3. Theorell, H. and Maehly, A. C. *Acta Chem. Scand.* **4** (1950) 422.
4. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **12** (1958) 1312.
5. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **12** (1958) 1611.
6. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **8** (1954) 649.

Received June 18, 1959.

Deuterohäminperoxydase

K. G. PAUL

Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska avdelningen, Stockholm, Schweden

H. S. GEWITZ und W. VOLKER

Max Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem, Deutschland

In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Meerrettichperoxydase — Apoeiweiss (Apo-MRP) sich mit gewissen Häminen kuppeln lässt, wobei peroxydatisch aktive Verbindungen entstehen¹. So geben Proto-, Meso- und Hämatohämin IX, die alle Propionsäuren in den Stellungen 6 und 7 besitzen, aktive Peroxydasen, während Diacetyldeuterohämin IX zwar gekuppelt wird, die Verbindung ist aber peroxydatisch inaktiv². Deuterohä-

min IX-Peroxydase ist nun etwa halb so aktiv wie Protohämiperoxydase. Meso-hämipin I, das Propionsäuren an den Stellungen 6 und 8 besitzt, bildet keine Peroxydase².

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Deuterohämipinomere bzw. -homologe sowie Cytodeuterohämipin*, die als Porphyrinester aus früheren Arbeiten^{4,5} zur Verfügung standen, in ihrem Verhältnis zu Apo-MRP untersucht.

Die Porphyrinester wurden mit 7 M HCl im Eisschrank verseift und in Hämine mittels Ferroacetat in Eisessig überführt. Die Einheitlichkeit der Hämine wurde papierchromatographisch mit silikonierten Papieren (Whatman Nr. 1), *n*-Propanol-Wasser-Pyridin 1:55:4 und aufsteigender Front geprüft⁶. Cytohämipin teilte sich dabei so auf, dass der grösste Teil überhaupt nicht wanderte, der kleinere Teil mit R_F etwa 0,1. Ein Streifen mit abnehmender Intensität war aber bis an R_F 0,8 sichtbar. 2,3,4-H-6,7-Propionsäurehämipin zeigte einen schwachen Schwanz, die übrigen

* Cytodeuterohämipin bezeichnet die Verbindung, die aus Cytohämipin (die Wirkungsgruppe des sauerstoffübertragenden Ferments, der Cytochromoxydase) durch Schmelzen mit Resorcinol erhalten wird³.

Hämine aber wanderten als gut begrenzte Flecke.

Für jede Kuppelung wurde 1,0 ml Puffer (0,03 M Phosphat, pH 7,1), 0,5 ml Apo-MRP und 0,16 μ Mole des betreffenden Hämins in 0,1 ml 0,05 M NaOH abgemessen. Die Lösung von Apo-MRP war 160 μ M (Kjeldahlbestimmung), und davon waren nach der Bestimmung mit Protohämipin etwa 70 % nativ. Das Verhältnis Gesamthämipin/Gesamtprotein war also 2,0. Kuppelung geschah während 40 Std. im Kühlschrank. Für die Aktivitätsmessung, die nach der Mesidinmethode⁸ ausgeführt wurde, wurden immer 0,03 ml einer 15-fachen Verdünnung des Gemisches verwendet. In der Tabelle sind die Aktivitäten als Extinktionszuwachs pro Minute für eine mikromolare Enzymkonzentration im Rohr mit Mesidin und Peroxyd (2 + a ml⁸) ausgedrückt (ΔA).

Die Ergebnisse, im Tabelle 1 gesammelt, zeigen:

1. Die beiden Deuterohämipin IX-Präparate geben die gleiche Aktivität und zwar etwa die Hälfte davon was mit Protohämipin erreicht wird. Auch zeigen sie dieselben R_F -Werte. Die verwendeten Methoden scheinen also zuverlässig zu sein. Da inaktivierter Eiweiss sich mit Häminen nicht spezifisch kuppelt⁷ kann die teilweise

Tabelle 1. Ergebnisse der Papierchromatographie und der Aktivitätsbestimmung. Alle Hämine besaßen Methylgruppen in den Stellungen 1 und 5, übrige Substituenten gehen aus der Tabelle hervor.

V = Vinyl, Et = Äthyl, Me = Methyl, S = Propionsäure

Substituent in Stellung						R_F	Aktivität in	
2	3	4	6	7	8		$\Delta A_{490} \text{ m}\mu \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$	% von Protohämipin-Peroxydase
V	Me	V	V	S	Me	0,40	7,5	100
H	Me	H	S	S	Me ¹⁾	0,49	3,9	52
H	Me	H	S	S	Me ²⁾	0,50	3,8	51
H	H	Et	S	S	Me	0,46	1,2	16
H	H	H	S	S	Me	0,56	0,3	4
H	Me	H	S	Me	S	0,68	0,04	0,5
H	H	Me	S	Me	S	0,66	0,08	1
Cytohämipin						0,1?	1,2	16 (0) ³⁾
Cytodeuterohämipin						0,52	0,4	5

1) Durch Eiseneinführung in Deuteroporphyrin IX erhalten.

2) Aus Protohämipin IX durch Resorcinolschmelze erhalten.

3) Vgl. Text.

Inaktivierung des Apoeiweisses die relativen Aktivitäten der artifiziellen Peroxydase nicht beeinflussen.

2. Die R_F -Werte der Deuterohäminisomere mit Propionsäuren in den 6- und 8-Stellungen sind höher als der des Deuterohämins IX, wo die Säuregruppen in 6- und 7-Stellung stehen. Dasselbe wurde auch bei den Mesohämnen beobachtet, wo die 6,7- und 6,8-Isomere die R_F -Werte 0,55 bzw. 0,70 gaben. Weil mit umgekehrten Phasen chromatographiert wurde bedeutet dies, dass die beiden Karboxylgruppen der 6,7-Isomere einander stärker beeinflussen bei ihrer Ionisation als die der 6,8-Isomere. pH der Eluierungsflüssigkeit ist etwa 7,5.

3. Die beiden Deuterohäminisomeren mit Propionsäuren in den 6- und 8-Stellungen geben keine Aktivität. Die Deuterohäminhomologen, die in 4-Stellung äthyl- bzw. wasserstoffsubstituiert sind, geben beide geringere Aktivität als Deuterohämin selbst. Das Homolog mit drei freien β -Stellungen erwies die schwächste Peroxydaseaktivität.

4. Das Chromatogram des zur Verfügung stehenden Cytohäminpräparates wurde von unbekanntem Faktoren beeinflusst sodass sich keine gut abgegrenzte Flecken zeigten; es enthüllte aber, dass das Präparat nicht einheitlich war. Cytohämin ergab 16 % der Aktivität die mit Protohämin gefunden wurde. Lichtabsorptionsmessungen des Pyridinhämochromogens zeigten aber einen Gehalt von 7 % Protohämin in dem Cytohäminpräparat ($D_{587} = 0,860$, $D_{557} = 0,309$ und $D_{540} = 0,255$. β_{587} cyto. = 6,4, β_{557} Protoh. = 8,0, β_{540} Protoh. = 2,3, alle β -Werte $\times 10^3 \text{cm}^2 \text{Mole}^{-1}$. Die Absorption bei 587 μ des Protohämochromogens ist zu vernachlässigen.) Spektroskopisch war eine schwache Bande bei 557 μ unterschiedbar. Da ein zweifacher Überschuss von Cytohämin im Verhältnis zum Eiweiss eingesetzt wurde, lässt sich die für Cytohämin beobachtete Aktivität vollständig durch den Protohämingehalt erklären. Cytohämin gibt also mit Apo-MRP keine peroxydatisch aktive Verbindung.

5. Der R_F -Wert des Cytodeuterohämins, der die Gegenwart von zwei Karboxyl-

gruppen im Molekül bestätigt², war von denen des Deuterohämins IX, des 2,3,4-H-Hämins und des 2,3-H-4-Et-Hämins klar abweichend. Diese Beobachtung unterstützt den früheren Schluss, dass Cytodeuterohämin mit keiner dieser Verbindungen identisch sei. Es ist von Interesse, dass Cytodeuterohämin, das nach der Bromierung zu beurteilen drei freie β -Stellungen besitzt³, dieselbe Peroxydaseaktivität wie das 2,3,4-H-6,7-Propionsäure-Hämin hervorrufen kann. Die Tatsache, dass Cytodeuterohämin eine zwar schwache aber doch gut messbare Peroxydaseaktivität erregte, deutet an, dass es Propionsäuren in den Stellungen 6 und 7 oder in zwei Stellungen in demselben Abstand von einander besitzt. Das verwendete Cytodeuterohämin stammte aus Cytohämin mit 7 % Protohämin, war aber über seinen mehrmals chromatographierten und kristallisierten Porphyrinester gereinigt und enthielt deshalb wahrscheinlich kein Deuterohämin IX.

Professor Otto Warburg sei für seine Interesse gedankt. K.G.P. dankt auch für Gastfreundschaft.

K. G. Paul dankt *Statens naturvetenskapliga forskningsråd* für ein Reisestipendium.

1. Theorell, H., Bergström S. und Åkeson A. *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* **16A** (1942) Nr. 3.
2. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **13** (1959) 1239.
3. Warburg, O. und Gewitz H. S. *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler* **288** (1951) 1; **292** (1953) 174.
4. Warburg, O., Gewitz, H. S. und Völker, W. *Z. Naturforsch.* **10 b** (1955) 541.
5. Gewitz, H. S. und Völker, W. *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler* **302** (1955) 119.
6. Chu, T. C. und Chu, E. J.-H. *J. Biol. Chem.* **212** (1955) 1.
7. Paul, K. G. *Acta Chem. Scand.* **12** (1958) 1611.
8. Paul, K. G. und Avi-Dor, Y. *Acta Chem. Scand.* **8** (1954) 649.

Eingegangen am 19. Juni 1959.