

# **Studien zur Untersuchung der Interaktion von Häm und Hämopexin**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Milena Sophie Detzel**

aus

Wangen im Allgäu

Bonn 2022



"Nur mittels der Wissenschaften vom Leben kann die  
Beschaffenheit des Lebens  
von Grund auf verändert werden."

*Aldous Leonard Huxley, Schöne neue Welt, Vorwort, 1946*

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachterin: PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele M. König

Tag der Promotion: 09. Januar 2023

Erscheinungsjahr: 2023



# Inhalt

Inhalt .....	1
1. Einführung.....	4
2. Theoretischer Hintergrund .....	6
2.1 Chemie, Biologie und pharmazeutische Anwendung von Häm .....	6
2.1.1 Struktur und Funktion von Häm und Häm in Hämoproteinen...	6
2.1.2 Hämbiosynthese und Erythropoese.....	15
2.1.3 Hämtransport und Hämabbau .....	21
2.1.3 Hämbiosynthese-Krankheiten in der Therapie.....	27
2.2 Hämbestimmung und -quantifizierung .....	33
2.2.1 Chromatographische Techniken zur Hämbestimmung .....	34
2.2.2 Spektroskopische Techniken zur Hämbestimmung .....	35
2.2.3 Enzym-basierte Techniken zur Hämbestimmung .....	37
2.3 Hämopathophysiologie und -toxizität .....	40
2.3.1 Hämolyse.....	40
2.3.2 Hämolytische Funktionsstörungen.....	43
2.4 Hämbindende Proteine schützen vor Hämtoxizität.....	47
2.4.1 Akute Hämolyse.....	47
2.4.2 Reinigung der Blutzirkulation bei Hämolyse.....	48
2.5 Hämopexin als Hämbindendes Protein .....	53
2.5.1 Struktur, Funktion und Homöostase von Hämopexin.....	53

2.5.2 Interaktion von Häm und Hämopexin.....	63
3. Motivation.....	71
4. Materialien und Methoden.....	74
4.1 Materialien.....	74
4.1.1 Chemikalien.....	74
4.1.2 Puffer.....	78
4.2 Methoden.....	79
4.2.1 Synthese des Peptids 7.....	79
4.2.2 Reinheits- und Identitätsanalysen.....	83
4.2.3 Bindungsanalysen.....	86
4.2.4 Strukturanalysen.....	91
5. Ergebnisse und Diskussion.....	96
5.1 SPR Analyse von Häm und Hämopexin.....	96
5.2 Hämopexin-basierte Nonapeptide binden Häm.....	102
5.2.1 Selektion von Hämopexin basierten HBMs.....	102
5.2.2 Hämopexin-basierte Peptide binden Häm hexakoordiniert ...	106
5.3 Hämübergabe von Hämopexin-basierten Nonapeptiden.....	111
5.4 Hämaffinitätsstudie mit Hämopexin-basiertem Peptid.....	113
5.5 Hämtitration mit Hämopexin-basiertem Peptid.....	118
5.6 Hämopexin und Peptid 7 binden Häm in gemischten Modi.....	120
5.7 Das Hämopexin-basierte Peptid ist flexibel.....	124
5.8 <i>In silico</i> -Studien unterstützen die <i>in vitro</i> -Ergebnisse.....	125
5.9 Vorschlag eines Hämrekrutierungsmechanismus.....	126
6. Schlussfolgerung und Ausblick.....	130
7. Literaturverzeichnis.....	136
8. Abkürzungsverzeichnis.....	214
9. Abbildungsverzeichnis.....	218

10. Tabellenverzeichnis.....	220
11. Danksagung.....	222

## 1. Einführung

„Blut ist immer noch die beste Tinte, seinen Namen der Menschheit ins Gedächtnis zu schreiben.“ schrieben die Kunst- und Kulturhistoriker Jules und Edmond Huot de Goncourt, Namensgeber für den begehrten, französischen Literaturpreis „Prix Goncourt“, 1904 in ihrer Schrift „Ideen und Impressionen“ über die uns alle am Leben haltende, warme Flüssigkeit.<sup>2</sup> Worte wie Blutsbrüderschaft, Blutrache, Blutvergießen, Blaublütler sind seit Jahrhunderten feste Begriffe in unserem Kulturkreis, die stets mit Verbundenheit, Krieg oder Macht assoziiert sind.<sup>3,4</sup> So mächtig wie die symbolische Bedeutung des Blutes ist, so mächtig ist auch seine biologische Bedeutung. Im Schnitt 5 Liter (4,5 Liter Schnitt der Frauen bis 5,4 Liter Schnitt der Männer)<sup>5</sup> intravasales Blut besitzt jeder von den momentan 7,9 Milliarden Menschen auf der Erde, was in Summe 39,5 Milliarden Liter Blut macht! Würde man aus diesen 39,5 Milliarden Liter Blut alle Erythrocyten extrahieren, so würde man  $197,5 \cdot 10^{21}$  Erythrocyten ( $25 \cdot 10^{12}$  Erythrocyten pro Mensch) erhalten. Jeder Erythrocyt beherbergt 250 Millionen Moleküle Hämoglobin und jedes Hämoglobinmolekül wiederum besitzt vier Moleküle Häm.<sup>6-8</sup> Dies bedeutet, im Blut aller Menschen zusammen existieren rund  $1,95 \cdot 10^{32}$  Moleküle Häm. Diese beeindruckend hohe Zahl deutet auf die Wichtigkeit dieses 651,94 g/mol schweren Moleküls hin. Neben der Eigenschaft, dass Häm die für das Blut bezeichnende rote Farbe ausmacht,<sup>9</sup> hat Häm zahlreiche und vielseitige Funktionen.<sup>7,10,11</sup> Unter den WissenschaftlerInnen wird seine Stellung jedoch kontrovers diskutiert: Während es auf der einen Seite als Cofaktor von Proteinen durch Sauerstofftransport, Genregulation, sensorische und katalytische Funktionen und Signal- und Energietransduktion, zur Erhaltung der Vitalität des Körpers beiträgt, zeigt es auf der anderen Seite seine schädlichen Eigenschaften in pathologischen Zuständen wie der Hämolyse, der Thalassämie

oder der Sichelzellanämie, sobald die strenge Hämregulierung im Körper misslingt und labiles Häm in erhöhten Mengen intravaskulär auftritt.<sup>12-19</sup> Nicht umsonst hat Häm 2003 die Bezeichnung des „zweischneidigen Schwertes“ und 2009 die des „zweiseitigen Moleküls“ erhalten.<sup>20,21</sup> Labiles Häm ist in die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies involviert, die wiederum Proteine, Lipide und das Erbgut unter oxidativem Stress verändern, sowie proinflammatorische Transkriptionsfaktoren aktivieren und die Proteinexpression beeinflussen können.<sup>22-25</sup> Der menschliche Körper hat zur Eindämmung dieser schädlichen Einwirkung von Häm-induziertem oxidativen Stress einen Schutzmechanismus auf der Basis von löslichen Proteinen entwickelt.<sup>26-28</sup> Hierzu gehören die Proteine humanes Serumalbumin (HSA), Haptoglobin, Lipoproteine,  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und Hämopexin. Haptoglobin kann spezifisch, aus den Erythrocyten freigesetztes Hämoglobin binden. HSA, die Lipoproteine,  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und Hämopexin hingegen binden das unter anderem aus Methämoglobin freigesetzte Häm.<sup>26,29-32</sup> Das 1958 mithilfe von Papierelektrophorese in Seren von HämolysepatientInnen entdeckte Hämopexin besitzt eine Plasmakonzentration von 0,5-1 mg/ml. Die Konzentration kann sich in hämolytischen Zuständen beträchtlich erhöhen, da Hämopexin zu den Akut-Phaseproteinen gehört.<sup>21,33,34</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Hämopexin und dem Liganden Häm erforscht. Es existiert eine beinahe vollständige Röntgenkristallstruktur des aus Kaninchenserum isolierten Häm-Hämopexin-Komplexes (PDB: 1QHU<sup>1</sup>). Bisher wurden auch einige Histidinreste als Hämliganden vorgeschlagen,<sup>1,35,36</sup> jedoch blieb eine exakte Ermittlung der Hämbindungsstelle auf humanem Hämopexin, sowie der Stöchiometrie von Protein und Ligand, bisher aus. Da zum Beweis eine vollständige humane Röntgenkristallstruktur des Komplexes fehlt, wurden hier alternative Methoden zur Beleuchtung der Interaktion herangezogen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag leisten und Anhaltspunkte geben, die Interaktion von Hämopexin und Häm nach nun über 60 Jahren in Unklarheit, die seit der Entdeckung von Hämopexin vergangen sind,<sup>33</sup> vollständig aufzuklären.

## 2. Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Chemie, Biologie und pharmazeutische Anwendung von Häm

#### 2.1.1 Struktur und Funktion von Häm und Häm in Hämoproteinen

Porphyrine (aus dem Griechischen „πορφυροο“ für Purpur) werden aufgrund ihrer leuchtenden Farbe und ihrer Fluoreszenz als die „Extrovertierten der Chemie“ und als „Schlüssel zum Leben“ bezeichnet.<sup>37</sup> In einer künstlichen, geochemischen Atmosphäre, die Pyrrol und Formaldehyd enthält, konnten 1967 Porphyrin-ähnliche Moleküle nachgewiesen werden. Die Entstehung dieser Moleküle ist begünstigt, da ihre Bildung eine hohe Entropie besitzt.<sup>38,39</sup> Ihre Fähigkeit zur Ermöglichung von effizienten Redoxprozessen ist der Grund, warum Porphyrine für die Weiterentwicklung der Lebensformen auf der Urerde sehr wichtig gewesen sein müssen.<sup>40</sup> Porphyrine können in Fossilien und sogar auf Mondgestein nachgewiesen werden.<sup>41</sup> Ein besonderes Porphyrin, das Häm (Eisen(II)protoporphyrin IX), kann in einigen Organismen, von Bakterien bis hin zum Menschen *de novo* synthetisiert werden.<sup>42</sup> Andere Organismen, wie die Helminthen-Art *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), die Häm nicht selbst synthetisieren können, sind auf eine ernährungsbedingte Hämzufuhr angewiesen.<sup>43</sup> Im Jahre 1841 wurde der Grundstein zur Hämforschung durch J. Scherer gelegt, der Häm aus Blut isolierte.<sup>44</sup> Häm und seine Porphyrinvorläufermoleküle rückten etwas später, im frühen 20. Jahrhundert, in den Fokus der Forschung, da sie mit einer Gruppe von Krankheiten assoziiert sind – den Porphyrien.<sup>7</sup> Der erste Strukturvorschlag von Häm wurde 1912 durch den Chemiker W. Küster

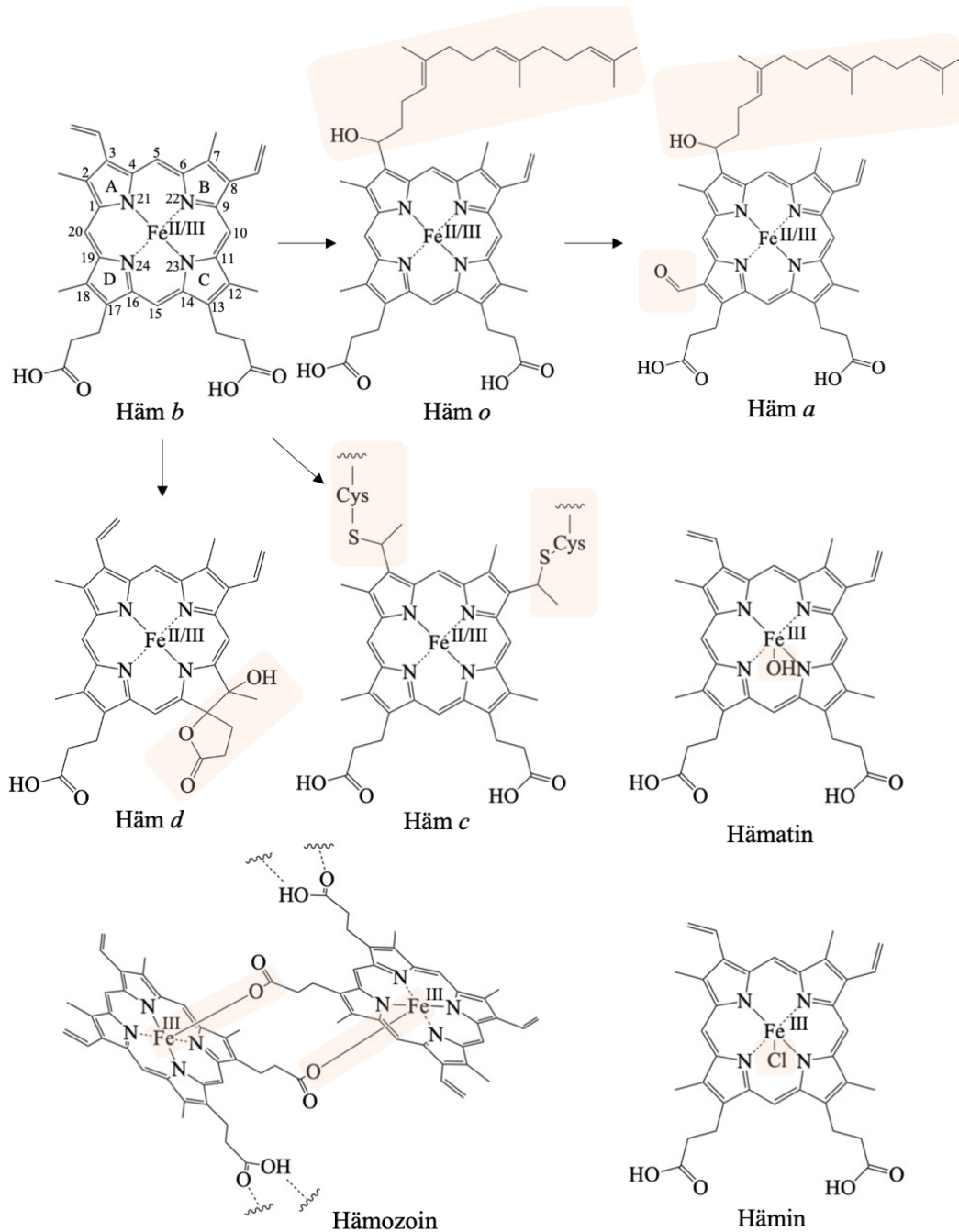
postuliert,<sup>45</sup> und 17 Jahre später gelang H. Fischer die Totalsynthese, wofür er 1930 den Nobelpreis erhielt.<sup>46,47</sup>

In biologischen Systemen ist Häm, verglichen mit Proteinen oder Nucleinsäuren, ein relativ kleines Molekül.<sup>7</sup> Es besteht aus einem ringförmigen Zusammenschluss aus vier Pyrrolmolekülen. Die Stickstoffatome der vier Pyrrole sind zueinander orientiert und können in der Mitte des Makrozyklus ein Ion chelatieren. Die Bezeichnung „zweischneidiges Schwert“ für Häm<sup>20</sup> trifft dabei nicht nur auf seine biologische Funktion, sondern auch auf die chemische Struktur zu: An den Pyrrolringen A und B des einfachsten Häms, dem Häm *b*, sind hydrophobe Methyl- bzw. Vinylgruppen und an den Pyrrolringen C und D neben Methylgruppen auch hydrophile Propionate geknüpft (Abbildung 1).<sup>7,45,46,48</sup> Häm *b* kann leicht oxidiert werden und zu Eisen (III)-Häm reagieren, weswegen die Bezeichnung Häm der Einfachheit halber in dieser Arbeit für Eisen (III)-Häm steht, außer es ist anders deklariert, oder wenn im Zusammenhang mit Hämoproteinen diskutiert wird. Die hydrophoben Eigenschaften ermöglichen dem Hämmolekül auf der einen Seite die Interaktionen im Inneren von hydrophoben Enzymtaschen, wie denen der Cytochrome.<sup>49</sup> Die hydrophilen Eigenschaften auf der anderen Seite ermöglichen die kovalente Bindung über beispielsweise Salz- oder Wasserstoffbrückenbindungen der Propionate mit Aminosäureresten von Proteinen oder transiente Bindungen des Eisenions an lösliche Moleküle oder Aminosäurereste.<sup>7</sup> Das hydrophile Eisenion kann in verschiedenen Oxidations- und Elektronen-Spinzuständen vorliegen, die den Elektronentransfer, die Katalyse von Redoxreaktionen und die Interaktion mit organischen und anorganischen Molekülen ermöglichen.<sup>7</sup> Die Oxidationszustände können vom stabilen Eisen (II) (wird als *ferrous* bezeichnet) oder Eisen (III) (wird als *ferric* bezeichnet) bis hin zum instabileren Eisen (IV) variieren.<sup>7,50,51</sup> Über Seitenkettenmodifikation oder makrozyklische Derivatisierung können aus Häm *b* verschiedene natürlich vorkommende Derivate entstehen. Die prominentesten Hämderivate sind in Abbildung 1 zu entnehmen. Häm *a* und *o* tragen stellvertretend für die Vinylgruppe einen Hydroxyethylfarnesylrest am Pyrrolring A. Häm *a* kommt in der Cytochrom *c*-Oxidase der Atmungskette vor und wurde 1975 erstmals aus Rinderherzen isoliert.<sup>52,53</sup> Im Gegensatz zu Häm *o*, das eine Methylgruppe enthält, trägt Häm *a* eine Formylgruppe am Pyrrolring D.<sup>48,52,53</sup> Häm *o* wurde zunächst in

Chinoloxygenasen der Atmungskette von *Escherichia Coli* (*E. coli*) nachgewiesen.<sup>54</sup> Häm *d* enthält anstelle eines Propionatrests ein zyklisches Spirolacton und am Pyrrolring C eine zusätzliche Hydroxylgruppe.<sup>48,55,56</sup> Es konnte als prosthetische Gruppe der Katalase Hydroperoxidase II nachgewiesen werden.<sup>57,58</sup> Häm *c* entsteht aus Häm *b* durch kovalente Bindung eines Cysteinhaltigen Proteins (wie beispielsweise Cytochrom *c* der Atmungskette oder der Photosynthese<sup>59</sup>) unter Ausbildung einer Thioetherbindung zweier Thiolgruppen des Proteins und den Vinylgruppen von Häm.<sup>48,49</sup> Das verantwortliche CXXCH-Motiv im Protein ist dabei hochkonserviert, wobei X jede beliebige Aminosäure repräsentiert und das Histidin als axialer Ligand für das Eisenion von Häm dient.<sup>12,60</sup> Kovalent gebundenes Häm *c* besitzt ein geringeres Reduktionspotential, verglichen mit Protein-gebundenem Häm *b*,<sup>59</sup> und ermöglicht damit eine Stabilisierung des Proteins.<sup>61</sup> Häm *b* ist von den oben beschriebenen Derivaten das Hämderivat mit ubiquitären und vielseitigen biologischen Funktionen.<sup>48</sup> Das Eisenion kann insgesamt sechs Liganden (Hexakoordination) koordinieren, wobei im Häm vier Ligandbindungsstellen durch die vier Pyrrole des Protoporphyrins besetzt sind. Die zwei verbleibenden Bindungsstellen sind für Liganden frei, die dem Häm erlauben mit Aminosäureresten aus Proteinen, wie beispielsweise dem Histidin in Globinen,<sup>62</sup> kleinen Gasmolekülen wie Sauerstoff und Kohlenstoffmonoxid in Hämoglobin oder Stickstoffmonoxid der löslichen Guanylatcyclase zu interagieren.<sup>7,15,31,63,64</sup> Bei der Bindung eines fünften Liganden (Pentakoordination) verändert sich die Nettoladung vom Häm-molekül unter physiologischem pH-Wert von  $\pm 0$  auf  $+1$  (Eisen (II)  $\rightarrow$  Eisen (III)). Zu diesen Derivaten zählen Hämin, das einen Chlorid- und Hämatin, das einen Hydroxyliganden pentakoordiniert gebunden hat (siehe Abbildung 1).<sup>65</sup> Nicht selten kommt es bei der Bindung von Häm an Proteine vor, dass die sechste Bindungsstelle für einen Liganden durch ein Gasmolekül oder ein Wassermolekül besetzt wird (Hexakoordination).<sup>66</sup> Die Proteine können so mithilfe von Häm Gasmoleküle binden, transportieren und speichern, oder andere Substrate für eine katalytische Reaktion binden.<sup>15,31,66,67</sup> Binden zwei Liganden eines Proteins Häm hexakoordiniert, dann ist Häm meist für den Transfer von Elektronen verantwortlich.<sup>66</sup> Eine prominente Speicherform von Häm *b* ist das Hämozoin, auch  $\beta$ -Hämatin oder Malariapigment genannt, das von intraerythrocytären Parasiten wie dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) beim Verdau von Hämoglobin gebildet wird. Hämozoin besteht aus



polymerisierten Hämatindimern die über die Eisenionen und die Sauerstoffatome der Propionate des jeweils anderen Hämatinmoleküls verknüpft sind. Durch die Verkettung der Dimere unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken entsteht ein Biokristall (Abbildung 1).<sup>68-70</sup> Die Produktion von Hämozin dient dem Malariaerreger zum Schutz vor redoxaktivem, toxischem Häm.<sup>71</sup>



**Abbildung 1** Strukturen verschiedener Hämderivate, deren Unterschiede zu Häm *b* farbig hervorgehoben sind. Die Nomenklatur der Häme, mit den Pyrrolringen A-D, den Kohlenstoffatomen 1-20 und den Stickstoffatomen 21-24 ist am Beispiel von Häm *b* dargestellt.<sup>45,46,48,72-74</sup> Die Abbildung wurde mit ChemDraw, Version 19.1 erstellt.

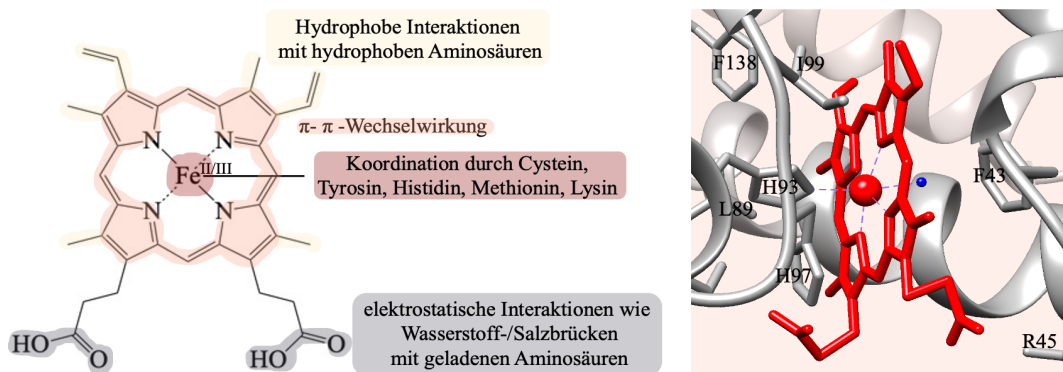
Im menschlichen Körper werden täglich rund 300 mg Häm durch Enzyme der Hämoglobinproduktion in den Erythrocyten und rund 50 mg in den Hepatocyten für die permanente Inkooperation als Cofaktoren in Proteine synthetisiert.<sup>20,21</sup> Proteine, die Häm kovalent gebunden haben, werden Hämoproteine genannt. Hämoproteine übernehmen verschiedene katalytische und sensorische Rollen in der Steroid- und Lipidsynthese, dem Gastransport, der Energieübertragung, der Genregulation, der zellulären Signaltransduktion und der Antibiotikasythese.<sup>10,12-16,75-77</sup> In Eukaryoten sind über 1503 Hämoproteine bekannt und es existieren mindestens 153 unterschiedliche Hämoproteinfamilien. Die Familien besitzen über 20 verschiedene Faltungstopologien um die Hämbindung in Hämoproteinen zu ermöglichen.<sup>66,78,79</sup> Die wohl prominentesten Hämoproteine sind Hämoglobin und Myoglobin (Abbildung 2), dessen Aufklärer der Röntgenkristallstrukturen, M. Perutz und J. C. Kendrew, 1962 mit dem Nobelpreis geehrt wurden.<sup>47,80,81</sup> Ausgesuchte Hämoproteine und ihre vielfältigen Funktionen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1:** Ausgesuchte Hämoproteine und ihre Funktionen.<sup>8,26,82–86</sup>

<b>Hämoprotein</b>	<b>Funktion des Hämoproteins</b>
Cyclooxygenase	Bildung eines Tyrosinradikals für die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin
Cytochrom <i>c</i> -Oxidase	Elektronentransport
Cytochrom P450	Oxidation von Metaboliten
Guanylatcyclase	Stickstoffmonoxid und Ca <sup>2+</sup> -Signaltransduktion
Hämoglobin	Gastransport
Katalase	Peroxid(in-)aktivierung
Ligninase	Oxidation von aromatischen Verbindungen zum Ligninabbau in Mikroorganismen
Myoglobin	Gasspeicherung
Peroxidase	Peroxid(in-)aktivierung
Stickstoffmonoxidsynthase	Oxidative Konversion von Arginin zu Stickstoffmonoxid und Citrullin
Tryptophanpyrrolase	Tryptophanoxidation

Hämoglobin ist für den Sauerstofftransport und die -speicherung im Blut verantwortlich, Myoglobin dagegen im Cytoplasma von kardialen Myocyten und Skelettmuskelfasern.<sup>87</sup> Die Bindung von molekularem Sauerstoff an Hämoglobin wird von Häm übernommen. Das von fünf Liganden koordinierte Eisen von Häm in Globinen verwandelt bei Sauerstoff-Bindung hoch-spinige Quintettspezies des Sauerstoffs in Singulettpezies.<sup>51</sup> Das Tetramer Hämoglobin weist eine sigmoidale Sauerstoffbindungskurve auf, das Monomer Myoglobin hingegen eine hyperbole Sauerstoffbindungskurve.<sup>87</sup> Die sigmoidale Bindungskurve des Hämoglobins kann anhand des positiven kooperativen Effekts erklärt werden, also einer veränderten Affinität der Untereinheiten des Hämoglobins gegenüber dem Liganden Sauerstoff,

durch eine Konformationsänderung vom T- (engl. *tense*) und R- (engl. *relaxed*) Zustand, sobald eine Untereinheit Häm bindet.<sup>88</sup> Der an Häm *b* gebundene Sauerstoff kann bei Hypoxie (verminderter Sauerstoffgehalt im Blut) oder Anoxie (verminderter Sauerstoffgehalt im Gewebe) freigesetzt werden.<sup>87,89</sup> Bei zunehmender Muskelaktivität wird außerdem angenommen, dass Myoglobin die intrazelluläre Sauerstoffkonzentration puffert.<sup>87,89</sup> Die Bindungstaschen in Hämoproteinen sind mit aromatischen und geladenen Aminosäuren wie Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Lysin angereichert, um eine Bindung von Häm zu vereinfachen.<sup>61</sup> Das Eisenion wird von elektronenreichen Aminosäuren wie Cystein, Tyrosin und Histidin, seltener Methionin und Lysin koordiniert.<sup>66</sup> Eine Übersicht über die Interaktionen von Aminosäureresten einer Bindungstasche und Häm ist Abbildung 2 zu entnehmen und am Beispiel des Myoglobins verdeutlicht.



**Abbildung 2** Häm in Interaktion mit Proteinen und Peptiden. Links: Verschieden farbig markierte Hämoprotein Interaktionen.<sup>7</sup> Rechts: Das Hämoprotein Myoglobin (PDB: 1MBN)<sup>90</sup>, in dem das Histidin 93 (lila hervorgehoben) das Eisenion von Häm koordiniert. Die Bindungstasche ist mit aromatischen (Phenylalanin 43, Histidin 97, Tyrosin 103, Phenylalanin 138), hydrophoben (Leucin 89, Isoleucin 99) und basischen (Arginin 45) Aminosäuren ausgekleidet. Die Abbildung wurde angefertigt mit ChemDraw, Version 19.1, Microsoft Power Point, Version 16.54 und UCSF Chimera, Version 1.15.

Die Veränderung des formalen Oxidationszustands des Eisenions im Häm spielt eine Schlüsselrolle bei der Ausübung der verschiedenen Funktionen von Hämoproteinen.<sup>51</sup> Die Oxidationsstufe des Eisens der enzymatisch aktiven Hämspezies in metabolisierenden Hämoproteinen wie Peroxidasen und Cytochrom P450 entspricht +5, was zwei Oxidationsstufen über der in ungebundenem Häm liegt. Eine solch hohe Oxidationsstufe ist zu instabil, um in anderweitigen, eisenhaltigen Systemen aufzutreten. Die Bildung hier kann jedoch auf eine umfangreiche Elektronenumverteilung zurückgeführt werden, die die Nettoladung des formalen  $\text{Fe}^{5+}$  stark reduziert. Die Ladungsverteilung des Protoporphyrinrings entspricht der eines  $\pi$ -Kationenradikals.<sup>51</sup> Des Weiteren hat die Änderung des Spinzustands neben dem Einfluss auf die Bindung von Sauerstoff in Globinen auch

einen Einfluss auf die Umwandlung von Substraten in Cytochrom P450-Enzymen. Der Spinzustand der eisenhaltigen Ruheform mit niedrigem Spin (Dublett) wird bei Substratbindung in ein fünfkoordiniertes System mit hohem Spin (Sextett) geändert. Die Änderung des Spinzustands erleichtert die folgende Ein-Elektronen-Reduktion im enzymatischen Zyklus.<sup>51</sup> Cytochrom P450-Enzyme sind eine Superfamilie von metabolisierenden Enzymen mit über 500 Isoenzymen.<sup>51</sup> Alle diese Enzyme koordinieren das Eisenion von Häm axial mithilfe eines proximalen Cysteinrests und fungieren als Monoxygenasen, die ein einzelnes Eisengebundenes Sauerstoffatom auf eine Vielzahl weitgehend unpolare Substituenten übertragen. Dies ermöglicht aromatische und aliphatische Hydroxylierungen, sowie Epoxidierungen oder Heteroatomoxidationen.<sup>51</sup> Die Cytochrom P450-Familie stellt die wichtigste Enzymfamilie in der Phase I-Reaktion des menschlichen Metabolismus in der Leber dar.<sup>91</sup> Phase I-Reaktionen dienen dem Körper zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Fremdstoffmolekülen und sind von hoher Bedeutung im Arzneistoffmetabolismus.<sup>92</sup> Beispielsweise wird der Wirkstoff Codein in der Leber mithilfe von Cytochrom P450-Enzymen durch Hydrolyse des Methylesters zu Morphin metabolisiert und kann dann erst seine analgetische Wirkung entfalten.<sup>93</sup>

Häm, das permanent an Proteine gebunden ist, bezeichnet man als inertes Häm, da es unter physiologischen Bedingungen schwer dissoziierbar ist oder kinetisch gehindert wird, andere Komplexe zu bilden.<sup>94</sup> Nicht-permanent an Proteine gebundenes Häm wird dagegen als labiles Hämreservoir (engl. *labile heme pool*) bezeichnet.<sup>7,95-100</sup> Dieses ist kinetisch zugänglich, leicht von Proteinen dissoziierbar und reaktionsfreudig. Labiles Häm kann sowohl aus Häm resultieren, das noch nicht an Apo-Hämoproteine gebunden hat, oder auch aus Hämoproteinen, die unter oxidativen Bedingungen Häm freigeben.<sup>26</sup> Labiles Häm ist unter physiologischem pH-Wert pentakoordiniert und trägt neben den vier vom Protoporphyrinring besetzten Koordinationsstellen an fünfter Stelle axial einen Wasser- oder Hydroxoliganden.<sup>94,101</sup> Häm kann neben seiner Funktion als Cofaktor in Proteinen in permanent gebundener Form in labiler Form selbst biologische Funktionen ausüben.<sup>26</sup> Es kann als Modulator die Expression von vielen Proteinen durch Genregulation, oder die Proliferation und Differenzierung von Zellen beeinflussen.<sup>26</sup> Man geht von einer losen, reversiblen Bindung an Proteine und

einem Eskortsystem aus Hämtransportproteinen aus, da ein Transport per Diffusion hohe Mengen an ungebundenem, also freiem Häm, zur Konsequenz hätte und dieses für die Zelle toxisch ist (Details siehe Kapitel 2.3).<sup>8,102</sup> Die lose Bindung von Häm an Proteine verläuft über kurze Sequenzmotive, die als sogenannte Hämbindende Motive (HBM) bezeichnet werden, falls die Hämbindung keinen Einfluss auf die Proteinfunktion hat. Hämregulatorische Motive (HRM) werden sie genannt, falls die Hämbindung einen Einfluss auf die Proteinfunktion hat. HBMs bzw. HRMs enthalten einen zentralen Aminosäurerest, wie Cystein, Histidin oder Tyrosin und seltener Lysin oder Methionin, der das Eisen von Häm koordiniert. Diesen zentralen Rest umgeben N- und C-terminal Aminosäuren, die die Bindung von Häm unterstützen.<sup>7,103–106</sup>

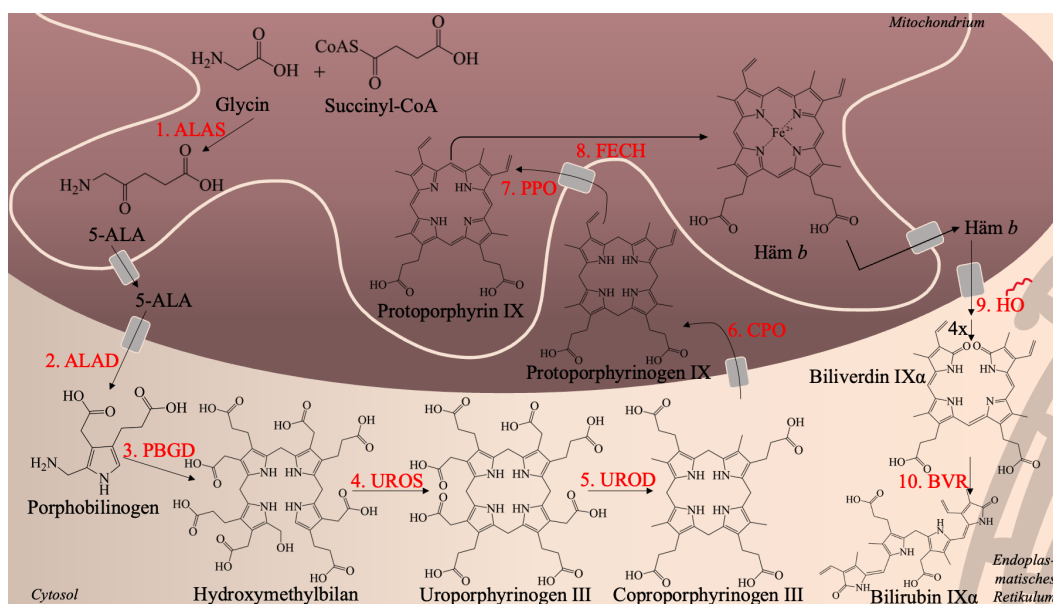
Der erste in Säugetieren gefundene Transkriptionsfaktor, der von labilem Häm reguliert wird, ist Bach1.<sup>107,108</sup> Das Targetgen des Repressors Bach1 ist unter anderem *Hmox-1*, welches für das Enzym Hämoxygenase-1 (HO1), ein Abbauenzym von Häm, codiert.<sup>86</sup> Unter normalen Umständen bildet Bach1 ein Heterodimer mit Mafproteinen (isoliert aus musculoaponeurotischem Fibrosarkom<sup>109</sup>), wie MafK. Der Bach1-MafK-Komplex bindet palindromische DNA-Abschnitte von *Hmox-1* (die sogenannten *Maf recognition elements*) und unterbindet dessen Transkription,<sup>86,108</sup> wodurch der Abbau von Häm und die Umwandlung in Eisen, Kohlenstoffmonoxid und Biliverdin verhindert wird.<sup>110</sup> Die Bindung von Bach1-MafK an die DNA wird durch die Bindung von Häm bei intrazellulärer Hämakkumulation an Bach1 über die Bindung an ein CP-haltiges HRM verhindert, gefolgt von der Dissoziation des Heterodimers, was eine Expression von HO1 zur Folge hat.<sup>108</sup> Bach1 besitzt insgesamt sechs HRMs, wobei drei bereit für eine Regulation des Bach1 nachgewiesen wurden.<sup>7</sup> Bilirubin, das Produkt aus der Reduktion von Biliverdin, hat antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften, weswegen die Regulation der Expression von HO1 durch Häm essentiell für die Bewältigung von zellulärem Stress ist.<sup>86,111</sup> Häm kann seinen eigenen Abbau weiterhin durch die De-Repression von *Hmox-1* durch die Induktion des Exports von Bach1 aus dem Zellkern mithilfe des Bach1-abhängigen Exporters *Crm1*<sup>108,112</sup> und durch die Ubiquitinylierung von Bach1 beeinflussen.<sup>113</sup> Darüber hinaus reguliert Häm nicht nur die Genregulation, sondern auch die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen. Hier sind vor

allem die neuronale Differenzierung von murinen Neuroblastomzellen, die Bildung von Erythrocyten im Knochenmark, die Differenzierung von 3T3-Broblasten in Adipozyten, sowie die Stimulierung von Fibroblastenwachstum zu nennen.<sup>26,114-117</sup>

### 2.1.2 Hämbiosynthese und Erythropoese

Häm kann neben Genen und Proteinen<sup>8,26</sup> auch seine eigene Biosynthese regulieren, indem es das geschwindigkeitsbestimmende Enzym, die Aminolevulinatsynthase 1 (ALAS1) in der Leber hemmt und den Abbau des Enzyms hochreguliert.<sup>118</sup> Häm dient dort als Repressor für die ALAS1-*messenger* Ribonucleinsäure (mRNA)-Synthese auf Höhe der Transkription, indem es die Halbwertszeit der ALAS-mRNA verkürzt und zudem als Inhibitor für den Transfer der ALAS1 vom Cytosol in die Mitochondrien dient.<sup>119-122</sup> Die Biosynthese von Häm selbst findet in den Mitochondrien (Reaktion 1 und 6 bis 8) und teilweise im Cytosol (Reaktion 2 bis 5) aller menschlichen Zellen statt, wobei acht Moleküle Glycin, sowie acht Moleküle Succinyl-CoA für die Synthese eines Häms in acht Reaktionsschritten benötigt werden.<sup>21,99</sup> Die Enzyme der Hämbiosynthese werden im Cytoplasma synthetisiert.<sup>123</sup> Bis auf die Ferrochelatase (FECH, Reaktion 8), die in ihrer Präform in die Mitochondrienmatrix verlagert, dort proteolytisch verarbeitet und mit einem Eisen-Schwefel-Cluster versehen wird, und die ALAS (Reaktion 1), verbleiben die weiteren Enzyme im Cytoplasma (Aminolevulinatdehydratase (ALAD oder auch Porphobilinogensynthase, Reaktion 2), Porphobilinogendeaminase (PBGD oder auch Hydroxymethylbilansynthase, Reaktion 3), Uroporphyrinogen-III-synthase (UROS, Reaktion 4), Uroporphyrinogen III-decarboxylase (UROD, Reaktion 5)), oder werden in das Innere des Mitochondriummembranraums transloziert (Coporphyrinogenoxidase (CPO, Reaktion 6) und Protoporphyrinogenoxidase (PPO, Reaktion 7)).<sup>121,123-132</sup> Die höchsten Hämsyntheseraten sind in Erythrocytenvorläufern im Knochenmark und in Hepatocyten der Leber zu finden.<sup>21</sup> Die Leber muss sich ständig ändernden metabolischen Umständen anpassen und in den Erythrocytenvorläufern muss die Verfügbarkeit von Eisen geregelt werden.<sup>121</sup> Hierbei ist die Rate in den sich entwickelnden Erythrocyten im Knochenmark mindestens eine Größenordnung höher als in der Leber.<sup>42</sup> Das liegt

daran, dass sich Erythrocyten gegenüber anderen Zellen in der Regulation der Häm biosynthese unterscheiden: Das betrifft vor allem den Eisenmetabolismus und die Gene für die Isoenzyme der ALAS. Das Homodimer ALAS1 kommt ubiquitär vor, das Homodimer ALAS2 hingegen lediglich in den Erythrocyten, beide besitzen aber den Cofaktor Pyridoxalphosphat.<sup>42,121,133</sup> Das Gen von ALAS1 wird sowohl in Erythrozytenvorläufern, als auch in anderen Zellen synthetisiert, jedoch ist die Expression in den Erythrozytenvorläufern, sobald die Differenzierung und die Hämoglobinsynthese initiiert ist, ausgeschaltet.<sup>123</sup> Die Synthese und die Aktivität von ALAS2 werden von Häm nicht beeinflusst, die von ALAS1 hingegen schon.<sup>134,135</sup> Es ist bisher keine Krankheit bekannt, die auf Mutationen von ALAS1 zurückzuführen sind, jedoch werden Mutationen in ALAS2 mit X-chromosomaler sideroblastischer Anämie und C-terminale Deletionen in ALAS2 mit einer erhöhten Aktivität assoziiert.<sup>136,137</sup> Einer erhöhte ALAS2-Aktivität ist mit einer X-chromosomalen Protoporphyrinurie (XLP) verknüpft.<sup>138</sup> Die ALAS katalysiert die Decarboxylierung von Glycin, gefolgt von der Kondensation mit Succinyl-CoA mit dem Produkt 5-Aminolevulinsäure (5-ALA) als ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Häm biosynthese in den Mitochondrien, wobei nebenbei Kohlenstoffdioxid und CoA entstehen (siehe Abbildung 3).<sup>139</sup> Als Cofaktor dient der ALAS Pyridoxalphosphat, das an ein Lysin geknüpft ist.<sup>140</sup> Ein Transporter für den Import von Glycin durch die innere Mitochondrienmembran ist ein 2009 identifizierter Glycintransporter, codiert durch das Gen SLC25A38.<sup>141</sup>



**Abbildung 3** Die Häm biosynthese, aufgebaut aus acht Enzymkatalysierten Reaktionen im Mitochondrium und im Cytosol, so wie der Hämabbau, aufgebaut aus zwei Enzymkatalysierten Reaktionen im Cytosol in



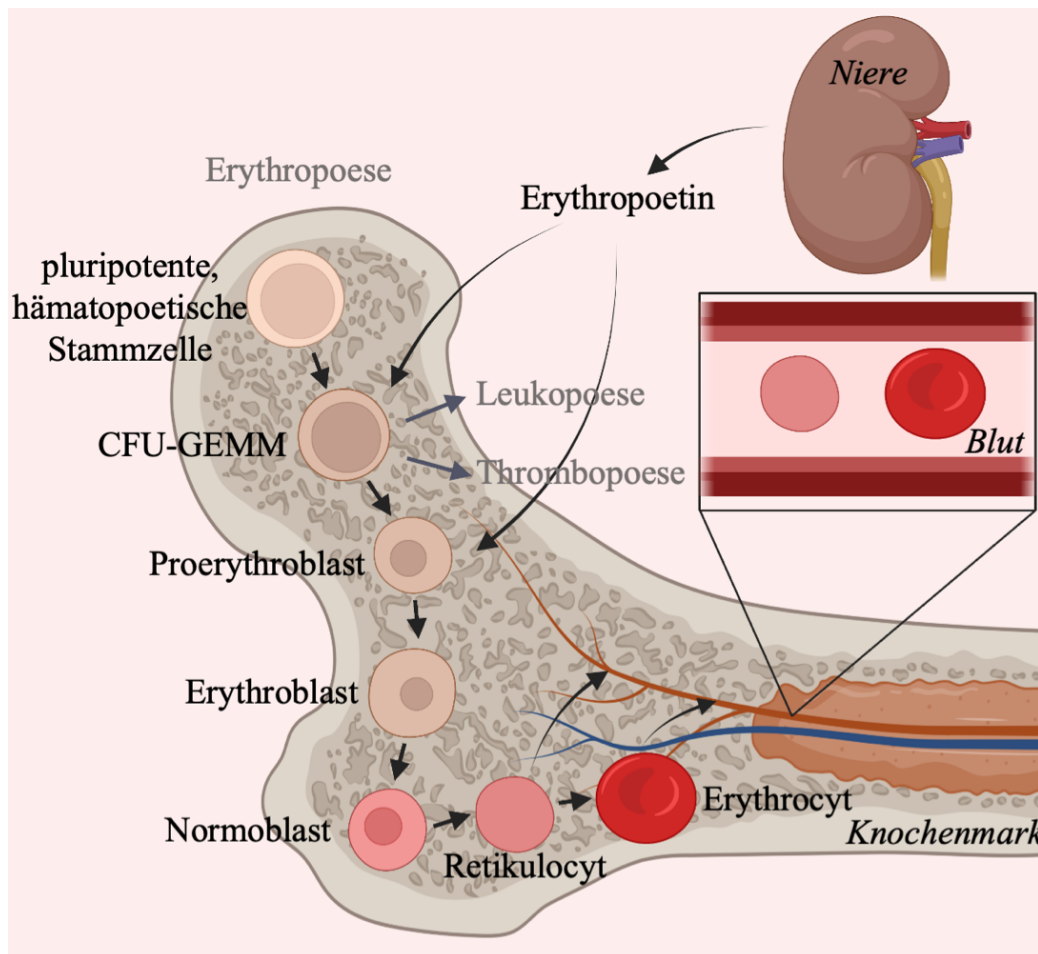
Säugetierzellen. Die Abbildung wurde angefertigt mit ChemDraw, Version 19.1 und Microsoft Power Point, Version 16.54. Erläuterungen und Erklärungen für Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen.

Die mitochondriale 5-ALA wird zunächst unter einem bisher noch unbekanntem Mechanismus in das Cytosol transportiert. Es wird diskutiert, dass der Transporter an der inneren Mitochondrienmembran *ATP-binding cassette subfamily B member 10* (ABCB10) in den Export involviert sein könnte, da eine Reduktion von ABCB10 die Transkription der Häm biosynthese beeinflusst und an Mäusen gezeigt werden konnte, dass eine Deletion der ABCB10-Gene Anämien und Protoporphyrin IX-, sowie Eisenakkumulation auslöst.<sup>118,142</sup> Hiergegen spricht, dass eine Stimulierung dieses aufgereinigten Transporters nur mit einem Hämderivat, jedoch nicht mit 5-ALA gelang.<sup>143</sup> Im Cytosol wird 5-ALA mithilfe der ALAD im zweiten Schritt der Häm biosynthese unter Dimerisierung zu Porphobilinogen umgesetzt.<sup>99,121</sup> Krankheiten mit ALAD-Mangel sind die ALAD-Porphyrurie (ADP) und die hepatorenale Tyrosinämie.<sup>121</sup> Ein potenter, kompetitiver Inhibitor von ALAD ist Succinylaceton, welches auch in der Zellkultur zur Hemmung der Häm biosynthese verwendet wird.<sup>102,121,144–149</sup> In einem weiteren Schritt entstehen in einer Kondensation mithilfe der PBGD, unter formaler Abspaltung von vier Ammoniakmolekülen aus vier Molekülen Porphobilinogen ein linearer Tetrapyrrolvorläufer mit der Bezeichnung Hydroxymethylbilan.<sup>99</sup> Es sind über 200 Mutationen im PBGD-Gen bekannt, die akute intermittierende Porphyrurie (AIP) auslösen.<sup>150</sup> UROS katalysiert die Cyclisierung von Hydroxymethylbilan zu Uroporphyrinogen III durch Inversion eines Pyrrolrings. Auch eine spontane Cyclisierung ohne Inversion zu Uroporphyrinogen I kann stattfinden, jedoch kann dieses Produkt nicht zu Häm umgesetzt werden.<sup>121</sup> Mutationen in der UROS sind mit congenitaler erythropoetischer Porphyrurie (CEP) verbunden.<sup>151</sup> Uroporphyrinogen III ist ein zentraler Knotenpunkt für verschiedene Stoffwechselprodukte. Unter anderem ist es das Ausgangsmolekül zur Synthese für Chlorophyll in Pflanzen, einem Magnesiumporphyrin-Komplex, der zur Verwertung von Solarenergie genutzt wird.<sup>38,152</sup> Für die Arbeiten zur Strukturaufklärung von Chlorophyll erhielt R. Willstätter 1915 den Nobelpreis.<sup>47</sup> Uroporphyrinogen III dient auch als Vorläufermolekül für die Synthese von Corrinen in Mikroorganismen, denen eine Methin-Brücke zwischen den Pyrrolringen A und D fehlt und die Bestandteil von Cobalthaltigem Vitamin B<sub>12</sub> sind.<sup>153</sup> Bei der Häm synthese wird Uroporphyrinogen III mithilfe der UROD unter

Abspaltung von vier Kohlenstoffdioxidmolekülen decarboxyliert und zu Coporphyrinogen III umgesetzt.<sup>154</sup> Mutationen im UROD-Gen sind mit erblicher Porphyria cutanea tarda (PCT) assoziiert.<sup>155–157</sup> Im weiteren Schritt der Hämbiosynthese wird Coproporphyrinogen III zunächst aus dem Cytoplasma zurück in die Mitochondrienmatrix transportiert. Dies geschieht mithilfe des ATP-abhängigen Porphyrin-In- und Exporters ABCB6.<sup>158,159</sup> In der Matrix selbst werden, katalysiert durch das Sauerstoffabhängige Enzym CPO, zwei der vier Propionatreste von Coproporphyrinogen III, unter Einspeisung von formal zwei Sauerstoffmolekülen und Entstehung von zwei Wasserstoffperoxidmolekülen sowie zwei Kohlenstoffdioxidmolekülen, oxidativ decarboxyliert, wodurch aus zwei Propionatgruppen zwei Vinylgruppen und somit Protoporphyrinogen IX entsteht.<sup>160</sup> Das Homodimer CPO stabilisiert das Substrat Coproporphyrinogen III in der oxidativen Umgebung der Mitochondrienmatrix solange, bis Sauerstoff auf der aktiven Seite des Enzyms hinzugelangen und die Reaktion zu Protoporphyrinogen IX vollzogen werden kann.<sup>121,161</sup> Mutationen im Enzym CPO sind verantwortlich für die hereditäre Koproporphyrinurie (HCP).<sup>162</sup> Protoporphyrinogen IX wird nach dem Transport unter unbekanntem Mechanismus durch die innere Mitochondrienmembran mithilfe der PPO zu Protoporphyrin IX oxidiert. Das Homodimer PPO mit dem nicht-kovalenten Cofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) liegt an der inneren Mitochondrienmembran und die über 100 bekannten Mutationen in diesem Enzym gehen mit variegater Porphyrie (VP) einher.<sup>163,164</sup> Die alternierenden Doppelbindungen im Protoporphyrin IX sind für die Fluoreszenz des Moleküls verantwortlich.<sup>165</sup> Der terminale Schritt der Hämbiosynthese ist die Umsetzung von Protoporphyrin IX zu Häm *b*. Diese Reaktion erfolgt mithilfe des Enzyms FECH, das die Insertion des Eisenions (Eisen (II)) in das Protoporphyringerüst übernimmt.<sup>121,123</sup> Die FECH ist ein Homodimer, das sich an der inneren Mitochondrienmembran befindet und als Cofaktor ein Eisen-Schwefel-Cluster besitzt.<sup>166,167</sup> Ihre Expression wird über den intrazellulären Eisengehalt reguliert.<sup>168</sup> In den 1980ern wurde die Hypothese aufgestellt, dass die drei terminalen Enzyme der Hämsynthese, die alle Mitochondrienmembran-assoziiert sind, einen transienten Komplex bilden um die Intermediate zu transferieren.<sup>123,131,132,169</sup> Später wurde diskutiert, dass Protoporphyrin IX lediglich in einer direkten Interaktion von der PPO an die FECH übergeben wird, jedoch konnte dies in isolierten, murinen Mitochondrien nicht gezeigt werden.<sup>121,163,169</sup> Ein

*in silico*-Modell unterstützt die vorhergesagte Interaktion von PPO und FECH.<sup>123,163</sup> Über 90 Mutationen in FECH sind mit erythropoetischer Protoporphyrinurie (EPP) verbunden.<sup>170</sup>

Vom synthetisierten Häm befinden sich rund 80 Prozent in den roten Blutkörperchen, 15 Prozent in der Leber und der verbleibende Anteil in anderen Geweben.<sup>7</sup> Während die Hämsynthese im Mitochondrium und im Cytosol der Zelle stattfindet, erfolgt die Translation der Globine, dem Proteinteil des Hämoglobins, im Cytosol.<sup>63,121</sup> Häm muss folglich für die Insertion in Globin in das Cytosol transportiert werden.<sup>171</sup> Vier Hämmoleküle assoziieren sich im Cytosol mit je zwei  $\alpha$ - und je zwei  $\beta$ -Globinketten, die anschließend zum Heterotetramer Hämoglobin zusammengefügt werden.<sup>171</sup> Die Hämsynthese, sowie die Globintranslation werden stark reguliert, um die effiziente Produktion von Hämoglobin und die Vermeidung von einer Hämakkumulation mit toxischen Folgen zu gewährleisten.<sup>28,172–174</sup> Es gibt jedoch keine Klarheit darüber, wie die Hämsynthese und die Zusammensetzung des Hämoglobins gemeinsam koordiniert werden. Eine mögliche Theorie ist die Coregulation beider Prozesse, die mit Mutationsstudien von Hämsyntheseenzymen belegt werden kann, also die Synthese von so viel Häm, wie für die Insertion in translatiertes Globin gerade benötigt wird.<sup>137,150,156,157,162,164,170,173,175</sup> Beispielsweise reguliert Häm die Funktion der *eukaryotic initiation Factor 2* (eIF2)  $\alpha$ -Kinase, die für die Initiation der Translation von Globin benötigt wird und zudem sind Fehlfunktionen oder Deletionen in nahezu allen Enzymen der Hämbiosynthese mit hämatologischen Krankheiten assoziiert.<sup>174,175</sup> Gegen diese Theorie spricht das Vorliegen von Hämtransportern in biologischen Membranen, durch die stöchiometrisch genaue Hämkonzentrationen ausbalanciert werden.<sup>173</sup> Dieses Balancesystem wird bereits in Erythroblasten und Retikulozyten, beides Erythrocytenvorläufer (Abbildung 4), genutzt um zu gewährleisten, dass sich bei der Hämoglobinsynthese im Laufe der Erythropoese kein labiles Häm anhäuft.<sup>176</sup>



**Abbildung 4** Verlauf der Erythrocyten-Entwicklung im Rahmen der menschlichen Erythropoese,<sup>177-179</sup> startend mit der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark und endend mit einem voll ausgereiften, Zellkern-losen Erythrocyten, der im Blut zirkuliert. Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com).

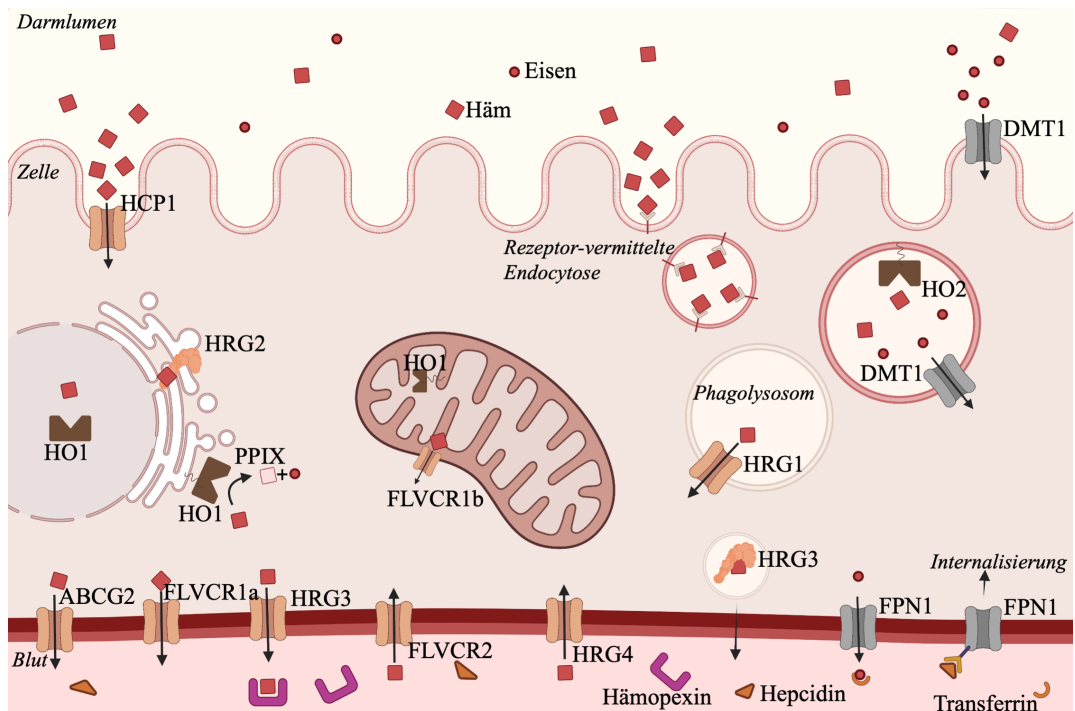
Die Erythropoese ist ein wesentlicher Bestandteil der Erythrocytenproduktion, die ca. 360 Milliarden Zellen, in denen Häm für die Insertion in Hämoproteine wie Hämoglobin synthetisiert wird.<sup>63</sup> Die Erythrocytenproduktion wird durch das Glycoprotein Erythropoetin, ein Wachstumshormon, angestoßen.<sup>177,180</sup> Erythropoetin wird hauptsächlich im proximalen Tubulus der Niere produziert und bindet an den Erythropoetinrezeptor auf der Oberfläche von myeloiden Vorläuferzellen wie den sogenannten Koloniebildenden Einheit für Granulozyten, Eosinophilen, Monozyten, Makrophagen (CFU-GEMM) und den Proerythroblasten. Die Bindung induziert die Homodimerisierung des Erythropoetinrezeptors.<sup>177,180</sup> Die Dimerisierung stimuliert über Transphosphorylierung eine Rezeptor-assoziierte Januskinase 2. In der Zelle ermöglicht die Dimerisierung die Phosphorylierung von Tyrosinen, die wiederum als Andockpunkt für *signal transducers and activators of transcription* (STAT5)

dienen, das nun aktiviert, die Transkription von erythroiden Genen anstößt.<sup>181-183</sup> Die Erythropoetinsynthese wird über den Partialdruck des Sauerstoffs im Nierengewebe reguliert, wobei Sauerstoffmangel die Erythropoetinsynthese stimuliert.<sup>182</sup> Aus CFU-GEMM entwickeln sich Erythropoetin-induziert über Zwischenstufen zunächst Proerythroblasten, die erste wahrnehmbare Vorstufe der Erythrocyten.<sup>184,185</sup> Aus ihnen entstehen Erythroblasten, die auf jeder Entwicklungsstufe die Zellkerne zurückbilden. Die letzte Erythroblastenzwischenstufe sind die Normoblasten (auch orthochromatische Erythroblasten genannt), aus denen wiederum Retikulozyten hervorgehen.<sup>177</sup> Retikulozyten enthalten keinen Zellkern, sondern ein dichtes ribosomales RNA-Netz (aus dem Lateinischen „rete“ für Netz), das für den Namen Retikulozyt verantwortlich ist.<sup>177</sup> Retikulozyten können zusammen mit den aus ihnen entstehenden Erythrocyten in peripheres Blut abgegeben werden, wo sie ihr RNA-Geflecht verlieren und sich ebenfalls zu Erythrocyten entwickeln.<sup>186</sup> Die Reifung eines Retikulozyten zum Erythrocyten beinhaltet große Änderungen der Zellform und des Zellinhalts.<sup>187</sup> So wird die Membranoberfläche verkleinert und das Cytoskelett durch die Menge diverser formgebender Membranproteine (zum Beispiel Actin, Ankyrin und Spectrin) verändert, um die für die Erythrocyten typische bikonkave, flexible, aber dennoch stabile Form zu erreichen.<sup>187,188</sup> Die bikonkave Form der Erythrocyten ermöglicht eine hohe Verformbarkeit und eine effektive Sauerstoffaufnahme mit einer geringen Diffusionsstrecke von der Membran bis ins Innere der Zelle.<sup>189</sup> Der Entwicklungsprozess eines Proerythroblasten bis hin zum Retikulozyten dauert ungefähr fünf Tage.<sup>177</sup> Ab dem Reifungsgrad des Erythroblasten wird in den Erythrocytenvorläufern zunehmend Häm im Mitochondrium, sowie Cytosol, und Globin im Cytosol synthetisiert, und anschließend das Häm und das Globin im Cytosol zu Hämoglobin zusammengesetzt.<sup>190,191</sup>

### *2.1.3 Hämtransport und Hämabbau*

Obwohl der Prozess der Häminsertion in Globin oder andere Hämoproteine von hoher biologischer Wichtigkeit ist, ist der Mechanismus wie Häm genau durch die Zelle und aus der Zelle heraus transportiert wird, oder wie es nach der

Hämbiosynthese zwei Membranen (innere und äußere Mitochondrienmembran) durchqueren kann, um aus dem Mitochondrium gelangen zu können, weitgehend obskur.<sup>192</sup> Nach dem Export aus dem Mitochondrium muss Häm verschiedene Membranbarrieren überqueren um die Eisenabsorption von Zellen zu gewährleisten, oder um für das Recycling im retikuloendothelialen System zur Verfügung zu stehen.<sup>192</sup> Die Schwierigkeit für die Identifikation von Hämtransportern ist darauf zurückzuführen, dass es anspruchsvoll ist, Häm-spezifische Transporter in Säugetierzellen zu identifizieren. Genetische und molekulare Werkzeuge fehlen hierfür und Proteine die Häm mit geringer Affinität transportieren können wechseln häufig. Des Weiteren ist es schwierig diese Daten auf einen ganzen Organismus zu beziehen und es entstehen oft unklare Ergebnisse.<sup>63,192</sup> Dennoch rückten in den letzten Jahren wenige Hämtransporter in den Fokus. Diese sind in Abbildung 5 dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Ein Transporter für den Export aus der Zelle, der schon Jahrzehnte lang bekannt ist, ist das *ATP-binding cassette subfamily G member 2* (ABCG2). In Säugetieren exportiert ABCG2 nachweislich Häm, Protoporphyrin IX und andere Porphyrine, sowie Arzneistoffe.<sup>193–196</sup> Durch Mutations- und *small interfering* RNA (siRNA)-Studien, konnte weiterhin eine Isoform des *feline leukemia virus subgroup C receptor 1b* (FLVCR1b), einem im menschlichen Körper weit verbreiteten Hämexporters, der den Hämtransport aus der äußeren Mitochondrienmembran ins Cytosol ermöglicht, identifiziert werden.<sup>197,198</sup> Im Tiermodell löst ein FLVCR1b-Mangel aufgrund der Hämtoxizität eine letale Anämie aus.<sup>191</sup> Später konnte FLVCR1a identifiziert werden, ein integral in der Zellmembran liegender Transporter, der den Hämexport aus der Zelle heraus übernimmt.<sup>198</sup> Er wurde erstmals im Jahre 2020 exprimiert und aufgereinigt, daher ist noch wenig über seine Funktion auf molekularer Ebene bekannt.<sup>198</sup> Ein weiterer Transporter, der in Homologie und Topologie der des FLVCR1-Transporters ähnelt, ist FLVCR2, siehe Abbildung 5.<sup>199</sup> Er wurde als Zellmembranständiger Hämimporter vorgeschlagen, da er Häminkonjugierte Agarose bindet und diese Bindung mit freiem Hämin konkurriert.<sup>200</sup> Außerdem wurde in FLVCR2-exprimierenden Säugetierzellen eine erhöhte Hämaufnahme beobachtet.<sup>200</sup> Mutationen im FLVCR2 konnten mit dem Fowler-Syndrom verknüpft werden, einer proliferativen, vaskulären Hirnkrankheit.<sup>201</sup>



**Abbildung 5** Übersicht über den zellulären Häm- und Eisentransport,<sup>198,200,202–207</sup> mit verschiedenen nachgewiesenen und vorgeschlagenen Häm- und Eisentransportern und deren Verteilung innerhalb der Zelle. Alle Abkürzungen werden im Text erklärt. Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und www.BioRender.com.

Das im Körper ständig zirkulierende Eisen beträgt zwischen 4 und 5 g und rührt von Recycling her, denn nur ca. 1 bis 2 g werden absorbiert und ein kleiner Teil wird im Darm aus Epithelausscheidungen, sowie über die Haut und durch weibliche Menstruation verloren.<sup>21,208</sup> Eisen kann jedoch auch über die Nahrung aus dem Darmtrakt aufgenommen werden. Studien belegen, dass Eisenionen in Form von Häm viel effizienter absorbiert werden als anorganisches Eisen.<sup>209–212</sup> Anorganisches Eisen besitzt durch natürliche Liganden wie Phytate und Tannine sowie die Tendenz zur Oxidation und Aggregation eine begrenzte Bioverfügbarkeit, während Häm löslich ist und das Eisen der Aufnahme von Zellen zur Verfügung gestellt werden kann.<sup>192,213</sup> Das meiste Häm wird im proximalen Intestinum aufgenommen. 1955 konnte zum ersten Mal die Absorption von Häm an Enterocyten gezeigt werden.<sup>214</sup> Eine erste und inzwischen veraltete Hypothese von 1979 zur Aufnahme von Häm ist die Hämrezeptor vermittelte Endocytose. Ein Hinweis darauf gab die Entdeckung eines Hämbindenden Proteins in der Mikrovillimembran des Intestinums, das später auch in Erythroleukämiezellen gefunden wurde.<sup>215</sup> Die Dissoziationskonstante für die Bindung zwischen Häm und diesem Protein beträgt laut spektroskopischer Studien  $10^{-9}$  M.<sup>216,217</sup> Häm wird in dieser Hypothese Temperatur- und ATP-abhängig intakt aufgenommen.<sup>215,218,219</sup>

Kritik an dieser Hypothese ist die Annahme, dass das aus dem in den Vesikeln freigesetzte Eisen sich dem labilen Eisengehalt der Zelle anschließen müsste und ein Anhaltspunkt für einen solchen Transportprozess bisher nicht bekannt ist.<sup>205</sup> Die andere Hypothese, die heute mehr Anerkennung findet, ist die Transportervermittelte Aufnahme von Häm.<sup>220</sup> Die Aufnahme geschieht durch einen membranständigen, Energieabhängigen Hämtransporter, der es den Enterocyten erlaubt, Häm zu erfassen. Dieser Mechanismus ist bereits seit über 50 Jahren bekannt, doch erst später konnten verantwortliche Hämtransporter identifiziert werden.<sup>220</sup> Einer davon ist das noch nicht näher strukturell charakterisierte *Heme Carrier Protein 1* (HCP1), siehe Abbildung 5, das in Enterocyten exprimiert wird.<sup>221,222</sup> Die Expression und die Aktivität von HCP1 kann durch die Anwesenheit des Hämabbauenzym HO induziert werden.<sup>222</sup> Seine physiologische Rolle als Hämtransporter wird jedoch kontrovers diskutiert, da seine Fähigkeit zum Transport von Folat zehn Mal höher ist als die von Häm.<sup>205,221,223,224</sup> Ein zweiter bisher identifizierter Hämtransporter, der in *C. elegans* gefunden wurde, ist der membranständige *Heme Responsive Gene 1* (HRG1), siehe Abbildung 5, codiert durch das Gen *Solute Carrier Family 48 Member 1* (SLC48A1)).<sup>225-227</sup> Während der Erythrophagocytose in *C. elegans* konnte nachgewiesen werden, dass HRG1 essentiell für die Makrophagen-Eisen-Homöostase und für den Hämtransport vom Phagolysosom zum Cytoplasma ist.<sup>203</sup> Diese Entdeckung machen HRG1 zu einem wahrscheinlichen Kandidaten für den lange gesuchten Transporter, der für das Recycling des Eisens von Häm in Makrophagen verantwortlich ist.<sup>203</sup> Leidet eine Maus beispielsweise an HRG1-Mangel, so kommt es in ihren retikuloendothelialen Makrophagen zur Hämozoinakkumulation, einem Hämolymer, das das reaktive Häm chemisch inert macht (Kapitel 2.1.1). Wie auch der blutverwertende Organismus *P. falciparum*, kann die Zelle in *C. elegans* durch Hämozoin die Toxizität von Häm umgehen, wenn sie keine Möglichkeit zum Hämexport, also keinen Zugang zu zellulären Entgiftungs- und Recyclingsystemen hat.<sup>72,228</sup> Zudem neigen Mäuse mit HRG1-Mangel zu einer gestörten Erythrocytenreifung und der Unfähigkeit auf Eisenmangel zu reagieren.<sup>228</sup> Weitere bisher bekannte HRG-Homologe sind HRG2, HRG3 und HRG4. Während HRG1 typischerweise im endolysosomalen Recycling zu finden ist, ist HRG4, gefunden in *C. elegans*, als Hämimporter aus dem Darmlumen in der Plasmamembran lokalisiert.<sup>206</sup> HRG3 wiederum ist für den



sekretorischen Export von Häm in *C. elegans* verantwortlich. Im Gegensatz zu den anderen HRG-Transportern binden zwei HRG3-Moleküle pro Hämolekül und eskortieren Häm in das Interstitium.<sup>206,229,230</sup> HRG2, ebenfalls nachgewiesen in *C. elegans*, ist ein Transmembranprotein und neben der apikalen Plasmamembran im endoplasmatischen Retikulum zu finden. Es übernimmt den Import von Häm durch die Membran. Es wird auch diskutiert, dass es aufgrund einer Glutathion-S-Transferasedomäne als Oxidoreduktase fungieren könnte. Diese beiden Funktionen könnten dazu dienen, Häm an der Zell- bzw. der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums erst zu reduzieren um den Eintritt in die Zelle zu ermöglichen und anschließend die Übergabe an zell- bzw. membranständige Hämoproteine zu gewährleisten.<sup>206,231,232</sup>

Eisenmangel ist das häufigste ernährungsbezogene Gesundheitsproblem auf der Welt, mit über zwei Milliarden AnämiepatientInnen.<sup>205,233</sup> Während die Wichtigkeit von Eisen aus Hämhaltiger Nahrung bereits anerkannt ist, so ist der Hämatabolismus bis zur Eisengewinnung, sowie das Entgiftungs- und Recyclingsystem für Häm bzw. Eisen innerhalb des Körpers wenig verstanden.<sup>205</sup> Eisen, das aus dem Eisen-Recycling stammt, wird durch Ferroportin (FPN1) aus der Zelle exportiert, siehe Abbildung 5, und mithilfe von Transferrin zum Knochenmark transportiert, wo neue Erythrocyten produziert werden.<sup>192,202,234,235</sup> Hepcidin, ein in der Leber produziertes Polypeptid-Hormon, kann an FPN1 binden und die Internalisierung des Transporters induzieren, was eine Hemmung des Eisenexports zur Folge hat.<sup>235</sup> Ein Hepcidinüberschuss führt zu Hypoferrämie und Entzündungsanämie.<sup>235</sup> Ein Teil des körperlichen Eisen-Entgiftungssystems beinhaltet den HO-abhängigen Hämabbau. Wiederverwertbares Häm wird aus Phagolysosomen ausgeschieden und von der HO im Cytosol umgesetzt. Die HO wird in Eukaryoten in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert, der HO1 und HO2, wobei eine dritte Isoform, die HO3 existiert, die jedoch ausschließlich im Gehirn auftritt und deren biologische Rolle und Relevanz noch unklar ist.<sup>236-241</sup> Die HO1 kann durch Häm, Metallionen, Hormone und oxidativen Stress, oder Hitzeschock induziert werden und wirkt cytoprotektiv, wohingegen die HO2 konstitutiv exprimiert wird.<sup>242-245</sup> Die HO2 hält sich nahe der Cytosoloberfläche auf, die HO1 nahe dem endoplasmatischen Retikulum, beide setzen ihre Substrate jedoch im Cytosol um und besitzen eine hohe Homologie (76 % Similarität, 55 %

Identität).<sup>246,247</sup> Die HO1 ist möglicherweise am C-Terminus im endoplasmatischen Retikulum verankert.<sup>204</sup> Manche Studien zeigen auch das Vorkommen von HO1 im Nucleus, der Plasmamembran und im Mitochondrium.<sup>248–251</sup> Die Verankerung im endoplasmatischen Retikulum wird durch Studien belegt, die die Anreicherung der HO in Mikrosomen zeigen, bei der die Membranverankerung spontan in Mikrosomenmembranen erfolgen kann, jedoch nicht in Erythrocytenmembranen. Nach tryptischem Verdau der Mikrosomenfraktion wird der N-terminale Teil der HO abgespalten, nicht jedoch der C-terminale.<sup>204,252–254</sup> Die HO, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Hämabbaus katalysiert mithilfe von Cytochrom P450, des Elektronen-Donors Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und 3 Molekülen Sauerstoff die Reaktion von Häm zu Biliverdin IX $\alpha$ , mit den Nebenprodukten Kohlenstoffmonoxid, Wasser und Eisen (Abbildung 3).<sup>255–257</sup> Das Reaktionsprodukt Kohlenstoffmonoxid, obwohl in hohen Konzentrationen toxisch, wirkt als regulatorisches Signalmolekül antioxidativ und antientzündlich.<sup>245,258–260</sup> Im Laufe der Reaktion wird ein Peroxyintermediat (Eisen (III)-O-OH) gebildet, das weiter zu meso-Hydroxyhäm reagiert und anschließend über Verdohäm zu Biliverdin IX $\alpha$  umgesetzt wird.<sup>261</sup> Biliverdin IX $\alpha$  wiederum wird sofort mithilfe der colokalisierten Biliverdinreduktase (BVR) weiter zu Bilirubin IX $\alpha$  reduziert. Biliverdin IX $\alpha$  wird dem Reaktionsgleichgewicht entzogen, da dieses Gleichgewicht ansonsten auf der Seite des Biliverdin IX $\alpha$  läge.<sup>94,241,261,262</sup> Die BVR wird als Biomarker für frühe Erkennungen von Alzheimer diskutiert, da in Seren von PatientInnen mit einer milden Alzheimererkrankung eine Konzentrationsveränderung dieses Proteins zu finden ist. Die HO1 hat bei Alzheimer nachweislich eine erhöhte Aktivität und korreliert mit der sinkenden kognitiven Funktion der PatientInnen.<sup>263</sup> Das wasserunlösliche Bilirubin IX $\alpha$  wird in das Blutplasma abgegeben und dort von HSA zur Leber transportiert, wo die Kopplung von zwei Uridindiphosphat (UDP)-Glucoronaten an die Propionatreste des Bilirubin IX $\alpha$  erfolgt.<sup>264,265</sup> Katalysiert wird diese Reaktion im endoplasmatischen Retikulum von der UDP-Glucoronyl-Transferase.<sup>264,265</sup> Das Konjugat gelangt über die Galle in den Darm, wo es von bakteriellen  $\beta$ -Glucoronidasen des Ileums, Caecums und Kolons metabolisiert und ausgeschieden wird.<sup>264</sup>

### 2.1.3 Hämbiosynthese-Krankheiten in der Therapie

Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, sind Fehlfunktionen in den acht Enzymen der Hämbiosynthese mit diversen Krankheiten assoziiert. Eine große Gruppe dieser metabolischen Funktionsstörungen wird Porphyrien genannt.<sup>19,137,266,267</sup> Der wahrscheinlich erste dokumentierte Fall von Porphyrie in der Geschichte wurde von Hippokrates von Kos in seinem Werk, übersetzt „Epidemien“, erwähnt, in dem er Symptome einer Frau aus Thasos beschreibt.<sup>7,268,269</sup> Hippokrates schreibt von Schlaf- und Appetitlosigkeit, starkem Durst und Übelkeit, Depressionen, Fieber, Krämpfe, Desorientierung, Erschöpfung und dunkel gefärbtem Urin – typischen Symptomen von PorphyriepatientInnen (Abbildung 6).<sup>269</sup> Rund 70 % aller AIP-PatientInnen, einer Porphyriefform, die durch eine PBGD-Mutation ausgelöst wird, besitzen dunkel, bzw. rötlich gefärbten Urin. Das kommt daher, dass überschüssiges ALA und PBG über die Niere ausgeschieden werden und spontan zu Porphyrin und Porphobilin polymerisieren.<sup>268</sup>

- 1 Auf Thasos hatte eine Frau von schwermütiger Veranlagung aus besonderem Anlaß einen Kummer. Da befahl sie Schlaf- und Appetitlosigkeit, starker
- 5 Durst und Übelkeit, ohne daß sie sich niederlegen mußte. Sie wohnte auf dem Flachland nahe bei Pylades.
- Am ersten Tag zu Beginn der Nacht bekam sie Angstzustände, redete viel,
- 10 litt unter Depressionen, die Temperatur war etwas erhöht. Morgens hatte sie mehrfach Krämpfe. Sooft die Krämpfe etwas nachließen, redete sie irr und führte unanständige Reden. Sie hatte
- 15 viel starke, anhaltende Schmerzen.
- Am zweiten Tag ebenso, sie konnte nicht schlafen, das Fieber stieg.
- Am dritten setzten die Krämpfe aus, doch litt sie an Schläfrigkeit und
- 20 Erschöpfung; dann wieder war sie hellwach, sprang auf, konnte sich nicht halten, führte viel irre Reden, hatte hohes Fieber; in dieser Nacht hatte sie einen starken Ausbruch von warmem
- 25 Schweiß am ganzen Körper. Sie war fieberfrei, schlief, war vollkommen klar, die Krise trat ein. Am dritten ließ sie dünnen, dunklen Urin, darin schwammen weitausbreitet runde Teilchen, die sich nicht setzten. Während der Krise gingen die Menses reichlich ab.

**Abbildung 6** Ausschnitt aus der übersetzten Schrift von Hippokrates zum wahrscheinlich ersten dokumentierten Fall von Porphyrie. Übersetzung von H. Diller.<sup>268,269</sup>

Alle Porphyrien zeichnen sich durch die Anhäufung von Porphyrinen und Porphyrinvorläufern im Körper aus.<sup>137</sup> Welche Moleküle sich jedoch im

Organismus anhäufen, hängt von der Art der Porphyrie ab.<sup>137</sup> Die Hämvorläufer häufen sich entweder im Knochenmark und in der Leber an, den Orten mit der meisten Hämbiosynthese (Knochenmark a. 80 %, Leber ca. 15 %<sup>270</sup>). Dies ist die Basis für die Klassifizierung „erythropoetisch“, oder „hepatisch“.<sup>137</sup> Hinzukommt, dass die Porphyrine photosensitiv sind und in manchen Porphyriearten eine Lichtdermatose sowie eine fragile Hautbeschaffenheit mit Blasenbildung hervorrufen können. In anderen Porphyriearten erfahren die PatientInnen eine hohe Photosensitivität mit starken Sonnenbränden nach Lichtkontakt.<sup>270</sup> Dass Porphyrine photosensitiv sind, wurde 1909 von W. Hausmann entdeckt, als Hämatoporphyrin (die Vinylgruppen sind zu Alkoholen konvertiert) bei Zugabe zu einer Kultur von Pantoffeltierchen diese photosensitiv machte.<sup>271</sup> Dieser Effekt konnte 1913 von F. Meyer-Betz am Menschen reproduziert werden, indem er sich selbst 200 mg Hämatoporphyrin spritzte und die zunehmende Photosensitivität seiner Haut beobachtete.<sup>272</sup> PorphyriepatientInnen mit Lichtdermatose sind nicht geschützt, indem sie sich in geschlossenen Räumen aufhalten, da das Licht auf der Wellenlänge der Soret-Bande (Kapitel 2.2.2) genügt, um die Porphyrine durch Fensterscheiben hindurch anzuregen.<sup>137,273</sup> Doch nicht alle Porphyrinen gehen lediglich mit Photosensitivität einher.<sup>137,274</sup> Porphyrinen manifestieren sich klinisch entweder neurologisch, in Form von akuten Attacken, oder kutan, durch die Phototoxizität der Porphyrine.<sup>137</sup> In zwei Porphyriearten treten sogar beide Phänomene auf (CPO und PPO).<sup>137</sup> Die akuten Attacken gehen mit abdominalen und muskulären Schmerzen, Übelkeit und neurologischen Symptomen wie Desorientierung oder Depressionen einher.<sup>270</sup> Es wird diskutiert, dass die Ursache der Attacken auf Läsionen des Nervensystems zurückgeht, die durch eine wahrscheinliche Neurotoxizität der ALA einhergehen.<sup>274</sup> Außer bei der ADP und der CEP treten Leberschäden als Folge der Porphyrinbelastung auf.<sup>275</sup> H. Günther war der Erste, der 1911 und 1922 die verschiedenen Formen der Porphyrinen klassifizierte.<sup>276,277</sup> Eine Übersicht zu den verschiedenen bis heute bekannten Porphyrinen und eine Zusammenfassung deren Eigenschaften ist Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2:** Übersicht über die verschiedenen Porphyrien und ihre Symptome.<sup>121,137,175,270</sup>

Enzym	Mutation	Vererbung	Porphyrieart	Klassifizierung	Symptome	Urin
ALAS	über 42 <sup>121,140</sup>	autosomal rezessiv	X-chromosomale Protoporphyririe (XLP)	erythroetisch, kutan	akute, schmerzvolle Lichtdermatose ohne Blasenbildung	normal
ALAD	E89K C132R <sup>278</sup>	autosomal rezessiv	ALAD-Porphyririe (ADP)	hepatisch, akut	neuroviszerale Attacken	ALA, Coproporphyrinogen III
PBGD	über 200 <sup>121,150</sup>	autosomal dominant	akute intermittierende Porphyrie (AIP)	hepatisch, akut	neuroviszerale Attacken	PBG, ALA, Porphyririe
UROS	über 22 <sup>121,279</sup>	autosomal rezessiv	congenitale erythroetische Porphyrie (CEP)	erythroetisch, kutan	erosive Lichtdermatose	Uroporphyrinogen I, Coproporphyrinogen III
UROD	über 11 <sup>175</sup>	autosomal dominant*	Porphyria cutanea tarda (PCT), hepatoerythropoetische Porphyrie (HEP)	hepatisch, kutan	erosive Lichtdermatose mit Blasenbildung	Uroporphyrinogen I/III
CPO	über 9 <sup>175</sup>	autosomal dominant	hereditäre Koproporphyririe (HCP)	hepatisch, akut und kutan	Lichtdermatose mit Blasenbildung und vor allem akute neuroviszerale Attacken	PBG, ALA, Porphyririe
PPO	über 140 <sup>137</sup>	autosomal dominant	variegata Porphyrie (VP)	hepatisch, akut und kutan	Akute, neuroviszerale Attacken und vor allem erosive Lichtdermatose mit Blasenbildung	PBG, ALA, Coproporphyrinogen III
FECH	über 25 <sup>175</sup>	autosomal dominant*	erythroetische Protoporphyririe (EPP)	erythroetisch, kutan	akute, schmerzvolle Lichtdermatose ohne Blasenbildung	normal

\*Vererbung ist komplex, daher nicht für alle Familien geltend.

Porphyrien gehören zu den seltenen Krankheiten, sie betreffen zum Beispiel in den USA weniger als 200 000 Menschen und >90 % der Genträger bleiben

lebenslang symptomfrei.<sup>137,275</sup> In Deutschland sind zwischen 1965 und 2017 4500 Fälle diagnostiziert worden.<sup>275</sup> Die CEP gehört mit einer Prävalenz von 1 zu 1 000 000 zu den seltenen Porphyrien.<sup>137,280</sup> Die ADP ist die seltenste Form der Porphyrien mit nur sechs dokumentierten Fällen weltweit.<sup>137</sup> Mutationen in der ALAD verursachen in den PatientInnen häufig Bleivergiftungen, weil die ALAD durch die Mutation gehindert wird, Protein-gebundenes Zink durch Blei zu ersetzen und sich das Blei dadurch ungebunden anhäuft.<sup>137,281</sup> In Europa wird die Prävalenz für die drei häufigsten Porphyrien, der PCT, AIP und der EPP auf 1 zu 10 000, 1 zu 20 000 und 1 zu 50 000 geschätzt.<sup>137,280</sup> Die EPP ist diejenige Porphyriefform, die am häufigsten in der Kindheit auftritt.<sup>137</sup> In allen Porphyrien ist die Aktivität eines Hämsynthesenzyms vermindert, außer bei der XLP. Hier ist die Aktivität der ALAS2 in Folge einer sogenannten *gain of function*-Mutation erhöht.<sup>138</sup>

Klinisch diagnostiziert werden die Porphyrien über zwei Wege: In erster Linie werden Urinproben genommen und nach lichtgeschütztem Transport auf Porphyrin und Porphyrinvorläufer (ALA und PBG) untersucht.<sup>275</sup> Die Diagnose kann photometrisch bei  $\lambda \approx 620$  nm erfolgen, oder aber über klassische, qualitative, organische Tests zum Nachweis von Porphobilinogen. Dazu gehören der Watson-Schwartz-Test und der Hoesch-Test, bei denen mithilfe des Ehrlich Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd) Porphobilinogen zu einem violetten Pigment umgesetzt werden. In semiquantitative Kits, wie dem Trace PBG Kit (Thermo Trace/DMA, Arlington, Texas) können bereits 6 mg/l PBG detektiert werden. Bei quantitativen Tests wie dem Mauzerall-Granick-Test wird ALA zu einem Pyrrol umgesetzt und später mit dem Ehrlich Reagenz zur Reaktion gebracht.<sup>150,270,282–285</sup> Da bei der XLP und EPP die Urinwerte normal sind, werden außerdem die Porphyrinkonzentration im antikoagulierten Vollblut (Erythrocyten und Plasma) bestimmt. Einer Konzentration von  $>4500$  nmol/l (Referenzbereich:  $<89$  nmol/l) spricht für eine Erkrankung an XLP oder EPP.<sup>275</sup> Stuhluntersuchungen auf Porphyrine werden zur Differenzierung von VP und HCP durchgeführt. In zweiter Linie werden Genomsequenz-Analysen durchgeführt, denn erhöhte Porphyrinausscheidungen kommen auch im Kontext von anderen Krankheiten vor, wie bei Fettleber, Hepatitis, Pankreatitis, Eisenstoffwechselstörungen, HIV-Infektionen und Hämolyse, bei denen kompensatorische Reaktionen der Erythropoese bei Hämbedarf auftreten.<sup>270,275</sup> Durch die Genanalyse können

sekundäre Porphyrinurien und Porphyrinämien von Porphyrien und die Porphyrien untereinander unterschieden werden.<sup>275,286</sup>

Die Präventivtherapie der akuten Porphyrieattacken besagt eine Vermeidung der direkten Induktion der ALAS, und eine Vermeidung von allem, was die Nachfrage der Hämbiosynthese in der Leber stimuliert.<sup>270,274,287</sup> Dazu gehören Drogen wie Alkohol und Cannabis, Rauchen, sowie Diäten und Arzneimittel, die die Cytochrom P450-Enzyme, wie CYP3A4 und CP2C9 induzieren oder porphyrinogen wirken (zum Beispiel das Antiepileptikum Phenobarbital, das Antihypertonikum Clonidin, der Calciumkanalblocker Nifedipin, die Antibiotika Rifampicin und Sulfamethoxazol oder das Gestagen Progesteron<sup>288,289</sup>).<sup>270,290</sup> Cytochrom P450-Enzyme induzieren den hepatischen Hämumsatz, da sie Häm als Cofaktor benötigen und wenn ihre Expression erhöht wird, wird gleichzeitig die Expression der ALAS erhöht.<sup>92,270,289,291</sup> Die Behandlung der akuten Attacken hat in erster Linie das Ziel die Aktivität der ALAS1 zu reduzieren.<sup>292</sup> Die Veröffentlichung einer deutschen Leitlinientherapie für die Porphyrien ist derzeit in Bearbeitung und soll 2024 publik werden.<sup>293</sup> Die Behandlung der akuten Attacken beginnt mit der Hospitalisierung der PatientInnen und der Gabe von Glucose.<sup>294</sup> Dabei werden ca. 300 bis 500 g Glucose (2 Liter einer 10 % Glucoselösung in isotonischer Kochsalzlösung), abhängig vom Körpergewicht, oral oder intravenös verabreicht.<sup>292</sup> Beim Fasten wird über den cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)/cAMP *response element-binding protein*-Signalweg die Transkription des *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1- $\alpha$*  (PGC1 $\alpha$ ) erhöht, das wiederum über die Transkriptionsfaktoren nuclearer Atmungsfaktor 1 (NRF1) und *Forkhead box protein O1* (FOXO1) die Expression der ALAS erhöht.<sup>295,296</sup> Glucose kehrt diesen Effekt durch den Antagonismus der Induktion der PGC1 $\alpha$  Expression um, indem die Glucose die Interaktion zwischen FOXO1 und PGC1 $\alpha$  stört und somit die weitere Hämsynthese, die zur Anhäufung der toxischen Hämvorläufer führt, inhibiert.<sup>295</sup> Handelt es sich um längere oder schwere Attacken und führt die Gabe von Glucose nach ein bis zwei Tagen nicht zum gewünschten Erfolg, so wird Häm verabreicht, welches klinisch effektiver ist als Glucose, jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist.<sup>292</sup> In den USA wurde Häm 1983 in Form von lyophilisiertem Hämin (Panhematin®, heute vertrieben durch die Firma Recordati

Rare Diseases Inc.) zugelassen, Europa folgte 1997 mit der Zulassung von lyophilisiertem Hämarginat (Normosang®, heute vertrieben durch die Firma Recordati Rare Diseases Germany GmbH).<sup>297</sup> Beide Medikamente werden kurz vor Verabreichung in Wasser gelöst und die Suspension intravenös verabreicht.<sup>292</sup> Es wird empfohlen, die Suspension zu filtern und nach maximal einer Stunde zu verbrauchen, sowie statt Wasser eine 25 % HSA-Lösung zu verwenden, da sich dies positiv gegen die hauptsächliche Nebenwirkung, die Thrombophlebitis erwiesen hat.<sup>292,298,299</sup> Häm inhibiert die ALAS in den Hepatocyten durch Bindung an sie und Verhinderung ihres Imports in das Mitochondrium.<sup>121,122</sup> Außerdem reguliert Häm die ALAS-Aktivität nach unten und den ALAS-Metabolismus nach oben,<sup>118</sup> indem es als Repressor für die ALAS-mRNA-Synthese auf Höhe der Transkription die ALAS-mRNA-Halbwertszeit verkürzt.<sup>119,120</sup> Es werden 3 bis 4 mg pro Kilogramm pro Tag von Normosang® bzw. Panhematin® für vier Tage lang in große Venen verabreicht, wobei eine tägliche Infusion auf 40 bis 60 Minuten konzipiert ist.<sup>292</sup> Anschließend wird die Vene mit isotonomischer Kochsalzlösung gespült.<sup>292</sup> Bei wiederkehrenden akuten Attacken wird Häm prophylaktisch alle ein bis zwei Wochen verabreicht.<sup>150,292,299,300</sup> 2019 kam das Medikament Givosiran mit dem Handelsnamen Givlaari®, vertrieben von der Firma Alnylam Pharmaceuticals Inc. zur Behandlung von akuten hepatischen Porphyrinen in den USA auf den Markt.<sup>301</sup> Das Medikament besteht aus einer siRNA, die kovalent an einen Liganden gebunden ist, der Hepatocyten adressiert und den Transport in die Hepatocyten gewährleistet.<sup>302</sup> Die siRNA richtet sich gegen die ALAS, was eine Abwärtsregulation der ALAS1-mRNA zur Folge hat, die wiederum die Akkumulation von ALA und PBG verhindert.<sup>302</sup>

Die Therapie der nicht-akuten Porphyrinen sieht etwas anders aus. Bei der PCT wird beispielsweise alle ein bis drei Wochen ein Aderlass von ca. 300 bis 400 ml zur Verringerung des Eisenspiegels empfohlen, oder alternativ eine Therapie mit Deferoxamin.<sup>292,303</sup> Deferoxamin bildet mit drei Hydroxamsäuregruppen einen Eisenkomplex, der über die Niere ausgesondert wird.<sup>304</sup> Diese Therapie kann durch eine geringe Dosis (125 mg) von peroralem Chloroquin zwei Mal die Woche ergänzt werden.<sup>292</sup> Chloroquin bildet mit Porphyrinen einen wasserlöslichen Komplex, der renal ausgeschieden werden kann.<sup>303,305</sup> Die EPP wird mit Zink- oder Titanoxidhaltiger, pigmentierter, Lichtreflektierender Sonnencreme therapiert.<sup>292</sup>



Zusätzlich kann eine tägliche Dosis von 180 bis 300 mg  $\beta$ -Carotin von Vorteil sein.<sup>292,306</sup>

Die Behandlung der Symptome erfolgt in Standarddosen.<sup>292</sup> Abdominale Schmerzen werden mit Opiaten, Acetylsalicylsäure und Paracetamol behandelt, gegen die Übel- und Müdigkeit, sowie gegen die Halluzinationen werden Neuroleptika wie Promazin oder Chlorpromazin verabreicht.<sup>270</sup> Die Angstzustände und Krämpfe werden mit Benzodiazepinen wie Lorazepam behandelt.<sup>270</sup>

## 2.2 Hämbestimmung und -quantifizierung

Je mehr Häm über die Jahre als medizinisches Präparat zur Behandlung von akuten Porphyrrien in den Vordergrund rückte, desto mehr wurde die Notwendigkeit von einer verlässlichen, qualitativen und quantitativen Hämbestimmung klar.<sup>73</sup> Häm wurde aufgrund seiner auffälligen Farbe zwar schon 1841 aus roten Blutkörperchen extrahiert, jedoch ist die Analytik von Häm auch Jahrzehnte nach der Marktzulassung des ersten Häm-haltigen Medikaments noch anspruchsvoll und nicht vollständig ausgereift.<sup>44,297</sup> Zunächst hat Häm aufgrund der großen aromatischen Porphyrin-Struktur und der Vinyl- bzw. Methylgruppen die Eigenschaft lipophil zu sein und an allen möglichen Oberflächen zu adsorbieren.<sup>46,307,308</sup> Auch in biologischen Systemen ist Häm spezifisch oder unspezifisch an Membranen oder Proteine gebunden, weswegen für die vollständige Analytik von Häm eine Unterscheidung von gebundenem, beispielsweise in Hämoproteinen, und ungebundenem Häm, beispielsweise in hämolytischen Zuständen, notwendig ist.<sup>12,73,309</sup> Außerdem hält sich Häm in verschiedenen Zellkompartimenten auf, die die Matrix der zu analysierenden Probe komplex und vielfältig machen.<sup>73,102</sup> Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde an einer Publikation mitgewirkt, die die bislang verbreitetsten Techniken und Methoden zusammenfasst.<sup>73</sup>

### 2.2.1 Chromatographische Techniken zur Hämbestimmung

Für den chromatographischen Nachweis von Häm werden *Normal Phase High Performance Liquid Chromatography* (NP-HPLC) und *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) und Kapillar-Elektrophorese (CE) verwendet.<sup>73</sup> Bei der NP-HPLC werden die Porphyrine zunächst durch Veresterung stabilisiert und wasserlöslicher gemacht, was jedoch durch unvollständige Reaktionen die Quantifizierung erschwert und weswegen die NP-HPLC gegenüber der RP-HPLC bei der Hämalyse weniger verbreitet ist.<sup>73,310,311</sup> Bei der RP-HPLC wird die Analythaltige, biologische Probe durch pH-Werteinstellung (sauer) und Zentrifugation vorbereitet, und anschließend über einen Gradienten eluiert.<sup>312,313</sup> Mit konstantem Druck wird eine mobile Phase durch eine stationäre Phase gepumpt.<sup>314</sup> Die Probe wird am Säuleneingang eingespritzt und geht in die mobile Phase über. In der Säule erfolgt die Auftrennung der Probe nach hydrophoben Interaktionen zwischen den Bestandteilen der Probe in der mobilen Phase und dem immobilisierten hydrophoben Liganden der stationären Phase.<sup>314</sup> Als stationäre Phase zur Analyse von Hämhaltigen Proben dienen C18-Säulen, die mobile Phase ist zusammengesetzt aus Methanol und Natriumphosphat, pH = 3,5, die Dauer einer Trennung beträgt rund 30 Minuten.<sup>73,313,315</sup> Die Säule wird aufgrund der Fähigkeit von Häm an Oberflächen zu adsorbieren, mit basischen Puffern gewaschen.<sup>73,308,316</sup> Die Detektion verläuft spektrophotometrisch über einen Fluoreszenz- oder Ultraviolett-Visibel (UV/Vis)-Detektor. Fluoreszenz-Detektoren eignen sich nicht für Häm, sondern lediglich für Porphyrine, da das Eisen im Häm die Fluoreszenz quencht.<sup>317</sup> Porphyrine können mit einer Wellenlänge von  $\lambda \approx 390$  bis 410 nm angeregt werden und emittieren Wellenlängen von  $\lambda \approx 600$  bis 630 nm.<sup>73,313</sup> Die Konzentration wird über die Integration der Peak-Flächen und Vergleich mit einem Standard berechnet.<sup>73</sup> Es gibt auch UPLC-Ansätze, oder Ansätze, bei denen die HPLC mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS), oder mit Fluorometrie über zwei Anregungswellen gekoppelt ist.<sup>73,228,318-322</sup> Die Unterscheidung von Protein-gebundenem und ungebundenem Häm kann mit diesen chromatographischen Techniken jedoch nicht garantiert werden.<sup>73</sup>

Eine andere chromatographische Methode zur Analytik von Häm ist die CE, bei der die Probe durch ein elektrisches Feld geleitet wird und dort nach Ladung und Größe aufgetrennt wird.<sup>73</sup> Ein interner Standard kann verwendet werden.<sup>73</sup> Dem System kann bei dieser Methode Chemilumineszenz-erzeugende Reagenzien (CL-CE) zugegeben werden und die entstehende Chemilumineszenz kann mit einem Photoelektronenvervielfacher nachgewiesen werden.<sup>73</sup> Das CL-CE-System kann mit Detektoren wie dem Diodenarray (DAD) oder einem Massenspektrometer (MS) gekoppelt werden.<sup>73,323</sup> Der Fokus der Methode liegt hier aber nicht auf der Quantifizierung sondern auf der qualitativen Analyse und ist für die Anwendung zur Hämanalytik, gegenüber der RP-HPLC auch noch nicht so weit entwickelt.<sup>73</sup>

### 2.2.2 Spektroskopische Techniken zur Hämbestimmung

Häm besitzt aufgrund seiner elektronischen Eigenschaften ein charakteristisches Absorptionsspektrum, das zu Analyse Zwecken hinzugezogen werden kann. M. Gouterman entwickelte in den frühen 1960er Jahren auf Basis von Spektren einiger Metallhaltiger Porphyrine das sogenannte vier Orbitalmodell (ähnlich dem eines zyklischen Polyens), welches besagt, dass jedes Metalloporphyrin durch B-Banden im UV-Bereich ( $\lambda \approx 350$  bis  $430$  nm) und Q-Banden im sichtbaren Bereich ( $\lambda \approx 450$  bis  $700$  nm) charakterisiert werden kann.<sup>324,325</sup> Die Banden stehen für  $\pi - \pi^*$ -Elektronenübergänge zum ersten ( $S_0 - S_1$ , Q-Banden) oder zweiten ( $S_0 - S_2$ , B-Banden) Anregungszustand.<sup>326</sup> Für die Quantifizierung von Häm ist die B-Bande um  $\lambda \approx 400$  nm, eher bekannt als Soret-Bande, benannt nach ihrem Entdecker J. Soret, von Interesse.<sup>273</sup> Die Bande kann je nach Interaktion mit Liganden wie Proteinen, pH-Wert, Temperatur oder Oxidationszustand des Eisens (je elektropositiver das Metall, desto bathochromer die Verschiebung des Spektrums<sup>325</sup>), einer batho- oder hypsochromen Verschiebung unterliegen.<sup>326,316</sup> Die Hämkonzentration kann nach Absorptionsmessung mittels UV/Vis-Spektroskopie von reinen Häm-Lösungen mit einem Lösemittelabhängigen Extinktionskoeffizienten über das Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet werden.<sup>73,328-330</sup> In komplexeren Matrices bieten sich indirekte kolorimetrische Assays, wie dem Pyridin-Hämochromogen-Assay an, bei dem Häm in alkalischer Umgebung in Anwesenheit von Pyridin zu Pyridin-

Hämochromogen umgesetzt wird.<sup>73,331,332</sup> Ein Pyridinmolekül besetzt eine der beiden freien Koordinationsstellen des Protoporphyrin-gebundenen Eisens und die Absorption des Komplexes kann bei  $\lambda \approx 557$  nm quantifiziert werden.<sup>73,331,332</sup> Auch diese Methode unterscheidet nicht zwischen labilem und Protein-gebundenem Häm.<sup>73</sup> Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von Cystein, welches eine hypsochrome Verschiebung der Soret-Bande zu  $\lambda \approx 364$  nm bewirkt.<sup>73,333</sup> Bei einer Titration der biologischen Probe mit Cystein kann labiles Häm quantifiziert werden, da Protein-gebundenes Häm das Cystein nicht bindet.<sup>73,333</sup> Ein mathematischer Ansatz ist die spektrale Dekonvolution von Hämspektren in komplexer Matrix, bei denen Häm gebunden oder/und ungebunden vorliegt.<sup>73,334</sup> Die Spektren werden mittels multilinearer Regression mit Spektren von Hämstandardkurven verglichen.<sup>73,334</sup> Dadurch sind eine akkurate Unterscheidung und Quantifizierung von labilem und gebundenem Häm bestimmbar.<sup>73,334</sup> Eine verhältnismäßig unbekannt Methode zur Hämbestimmung ist die Verwendung von Transienter Absorptions (TA)-Mikroskopie.<sup>73,335</sup> Bei einer definierten Wellenlänge wird die zeitabhängige Änderung der Absorption einer Probe beobachtet.<sup>73,335</sup> Häm wird quantifiziert, indem die Absorptionsintensität eines Pixels betrachtet wird.<sup>73,335</sup> Hiermit kann man die Verteilung von beispielsweise zellulärem Häm beobachten.<sup>73,335</sup> Durch die Wahl einer definierten Wellenlänge werden störende Hintergrundsignale ignoriert, aber auch hier wird nicht zwischen gebundenem und ungebundenem Häm differenziert.<sup>73,335</sup>

Wie in Kapitel 2.2.1 erwähnt, kann auch MS zur Hämquantifizierung hinzugezogen werden. Die Methoden für MS, darunter Ansätze für *Elektrospray Ionisation* (ESI)-MS und Fourier-Transformation Ionencyklotronresonanz (FT-ICR)-MS, beruhen vor allem auf der Analyse von Mitteln gegen Malaria, da viele Wirkstoffe davon, wie Artemisinin aus dem einjährigen Beifuß oder dem Terpen Isonitril aus marinen Schwämmen, eine Interaktion mit Häm eingehen.<sup>73,336–340</sup> Während die Ansätze oben auf den Nachweis von Häm ausgelegt sind, gibt es auch Ansätze für Matrix-assistierte Laser-Desorption/-Ionisation (MALDI)-*time of flight* (TOF)-MS und ESI-MS.<sup>73,341,342</sup> Bei der Methode für MALDI-TOF-MS wird Häm zunächst alkalisch aus der Probe extrahiert und mit einer Sinapinsäurematrix versetzt.<sup>73,342</sup> Als interner Kalibrierstandard zur Quantifizierung wird Cobalt III-Protoporphyrin verwendet.<sup>73,342</sup> Bei der ESI-MS-Methode wird Häm mit Methanol

und Ameisensäure aus der Probe extrahiert und analysiert, als Standard dient eine Hämverdünnungsreihe.<sup>73,341</sup>

Fluoreszenzspektroskopie kann für die Hämbestimmung hinzugezogen werden, wenn das Fluoreszenz-unterdrückende Eisen vorher durch Erhitzen in 2 M Oxalsäure vom Protoporphyrinring gelöst wird.<sup>73,343,344</sup> Das verbleibende Porphyringerüst und eine für den Vergleich erstellte Standardreihe wird bei  $\lambda \approx 400$  nm angeregt und die Emission bei  $\lambda \approx 662$  nm gemessen.<sup>73,343</sup> Der Fluoreszenz-unterdrückende Effekt des Eisens kann aber auch genutzt werden, indem die zu analysierende Hämhaltige Probe zu der Lösung eines Hämbindenden fluoreszierenden Molekül, wie beispielsweise ein mit 7-Azatriptophan-gekoppeltes Nonapeptid gegeben wird.<sup>73,345</sup> Das Ausmaß der Signalunterdrückung kann zur Hämquantifizierung hinzugezogen werden.<sup>73,345</sup>

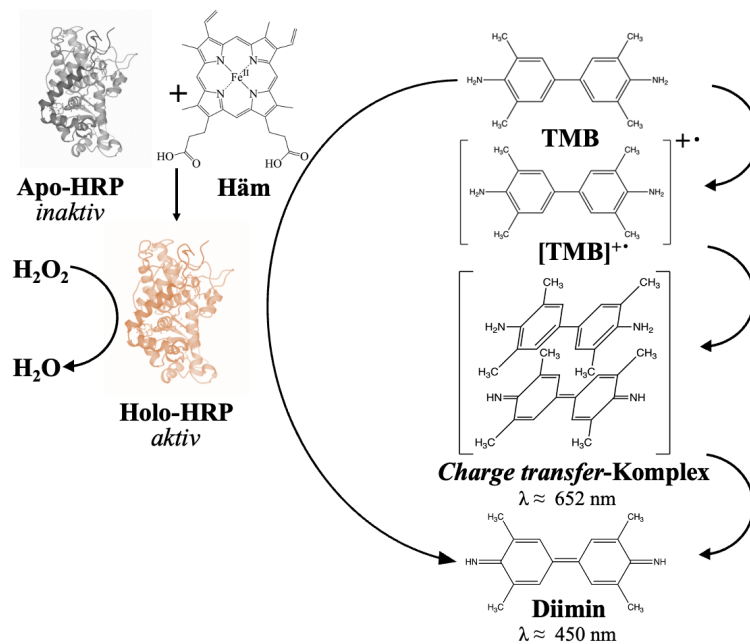
Hämkonzentrationen können auch mittels Raman-Spektroskopie bestimmt werden. Bei dieser Methode wird mit einer Wellenlänge nahe der Soret-Bande das Hämolekül zum Schwingen angeregt, was in einer Amplifikation des Signals resultiert.<sup>73</sup> Die Intensität der durch Häm verursachten Bande bei  $\nu \approx 1372$   $\text{cm}^{-1}$  kann mit einer Hämstandardkurve verglichen werden und so die Hämkonzentration ermittelt werden.<sup>73,346</sup>

Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie kann zur Untersuchung von Liganden und Proteinen genutzt werden, da sich je nach Stärke der Interaktion der Brechungsindex des Lichts, das auf das immobilisierte Protein trifft, ändert.<sup>347</sup> Ebenfalls kann es der Hämbestimmung dienen. Hier wird Häm an ein Polyacrylsäurematrix immobilisiertes Apo-Hämoglobin gebunden.<sup>73,348</sup> Da Apo-Hämoglobin ein hoch spezifischer Bindungspartner für seinen Cofaktor Häm ist, kann Häm über die Änderung des Brechungsindex, verglichen mit einer Hämstandardkurve, quantifiziert werden.<sup>16,73,348</sup>

### *2.2.3 Enzym-basierte Techniken zur Hämbestimmung*

Für die Hämbestimmung durch Enzyme und Proteine gibt es drei grundlegende Ansätze. Der erste ist die Hämquantifizierung über die Hämabhängige Aktivität von Peroxidasen, wie der Meerrettichperoxidase (HRP)

aus dem Meerrettich *Armoracia rusticana*.<sup>73,349,350</sup> Dazu wird die Hämhaltige Probe mit inaktiver Apo-HRP versetzt, die durch Bindung ihres Cofaktors Häm zur aktiven Holo-HRP umgesetzt wird.<sup>73,350,351</sup> Der aktiven HRP wird anschließend Wasserstoffperoxid und ein chromogener Oxidationspartner wie 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und *o*-Dianisidin, oder ein chemilumineszenter Oxidationspartner wie Luminol hinzugefügt.<sup>73,349,351–353</sup> Die Umsetzung des Chromogens ist abhängig von der Anwesenheit von aktiver HRP und damit von der Hämkonzentration und kann dadurch zur Hämquantifizierung hinzugezogen werden.<sup>73,351</sup> Die Oxidation von TMB mit Wasserstoffperoxid zu einem blauen *charge transfer*-Komplex kann bei  $\lambda \approx 652$  nm detektiert werden, katalysiert von der Holo-HRP.<sup>351</sup> Das Endprodukt der Oxidation ist ein gelbes Diimin.<sup>351,354</sup> Die Reaktion ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7** Hämquantifizierung mithilfe der HRP (PDB: 1HCH<sup>355</sup>). Apo-HRP wird mit Häm zunächst zu Holo-HRP umgesetzt. Die Holo-HRP setzt Wasserstoffperoxid zu Wasser um. Diese Reaktion ist mit der Oxidation von TMB über mehrere Intermediate gekoppelt.<sup>73,351,354</sup> Die Abbildung wurde angefertigt mit ChemDraw, Version 19.1, Microsoft Power Point, Version 16.54 und UCSF Chimera, Version 1.15.

Der zweite Ansatz beruht auf der Signalunterdrückung von fluoreszierenden Proteinen durch Häm. Dazu wird, ähnlich wie bei dem Hämbindenden, mit 7-Azatriptophan-gekoppelten Nonapeptid, ein Protein wie Cytochrom *b*<sub>562</sub> mit einem fluoreszierenden Protein wie dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), *enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP) oder Katushka 2 (mKate2) gekoppelt. Genannt werden diese Art von Proteinen Hämsensoren.<sup>73,345,356</sup> Die

Hämbindungsstelle auf dem Cytochrom  $b_{562}$  liegt nahe des fluoreszierenden EGFP und dessen Fluoreszenz wird als Konsequenz der Hämbindung durch den Förster Resonanz Energietransfer (FRET) unterdrückt.<sup>73,345,356</sup> Als Hämbindendes Element wird alternativ auch *cell-wall attached iron-regulated surface determinant protein* C und X1 (IsdC, IsdX1) verwendet.<sup>73,357</sup> Anstatt eines Konstrukts mit Cytochrom  $b_{562}$ , oder IsdC und IsdX1 gibt es aber auch einen Ansatz mit Peroxidasen.<sup>73,102,357</sup> Die Peroxidase-basierten Hämreporter bestehen aus Apo-HRP bzw. Apo-Ascorbatperoxidase (APX) und sind mit dem Chromogen mCherry bzw. EGFP gekoppelt.<sup>73,102</sup> Diese Reporter können zur intrazellulären, Kompartiment-spezifischen Hämdektion verwendet werden, da sie in menschlichen Zellen transfiziert und exprimiert werden und durch eine Targetsequenz in verschiedene Zellkompartimente (Cytosol, Plasmamembran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondriale Matrix und Nucleus) dringen können.<sup>102</sup> Hält sich Häm in den Kompartimenten auf, so kann der Reporter dies durch eine erhöhte Peroxidaseaktivität detektieren. Hierzu werden die Zellen lysiert und die entstandene Holo-HRP bzw. Holo-APX mit Wasserstoffperoxid und einem Chromogen wie TMB oder *o*-Dianisidin versetzt und die Umsetzung per UV/Vis-Spektroskopie bei  $\lambda \approx 440$  nm verfolgt.<sup>73,102</sup> Eine Quantifizierung von Häm wurde mithilfe der Hämreporter noch nicht vorgenommen, die Reporter dienen vorwiegend zur Verbildlichung von zellulärem Hämtransport.<sup>73,102</sup>

Der dritte und nicht weit entwickelte Ansatz beruht auf kleinen Hämbindenden, Enzym-gekoppelten Antikörperdomänen.<sup>73</sup> Bisher sind drei davon entwickelt worden und konnten *in vitro* in Enzym-gekoppelten Immunsorptionstests (ELISA), Western Blots und Immunfärbungsanalysen angewendet werden.<sup>73,100</sup> Wie die Hämreporter, könnten die Antikörperdomänen zukünftig als Werkzeug dienen um subzelluläres Häm zu detektieren, wobei erste Versuche hierzu in der Durchflusszytometrie erzielt werden konnten.<sup>73,100</sup>

Trotz der diversen Ansätze und Methoden kämpfen alle Methoden zur Hämdektion mit der Schwierigkeit der Aufarbeitung von biologischen Matrices oder der Ablösung von Häm von Hämoproteinen.<sup>73</sup> Häm ist zudem ein schwieriger Analyt, da es zum einen wenig wasserlöslich und die Tendenz zur Aggregation besitzt und zum anderen unspezifische Bindungen eingeht.<sup>73</sup> Es muss bei der Wahl der passenden Methode zwischen Kosten, Zeit und praktischen Anwendbarkeit

unterschieden werden, dennoch ist keine der oben aufgeführten Methoden final.<sup>73</sup> Der Weg zur Entwicklung einer endgültigen Methode wird anspruchsvoll sein, sich aber lohnen mit Hinblick auf die breiten pharmazeutischen, Hämbezogenen Anwendungsfelder wie der Sichelzellanämie, der Hämolyse oder Malaria.<sup>17,25,360</sup>

## 2.3 Hämopathophysiologie und -toxizität

### 2.3.1 Hämolyse

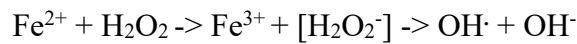
Häm, das nicht an Proteine gebunden ist, wird als labiles Hämreservoir bezeichnet.<sup>7,26,95–100</sup> Labiles Häm kann entweder aus Häm resultieren, das synthetisiert, aber noch nicht in Hämoproteine eingebaut wurde, oder aus Protein-gebundenem Häm, das unter oxidativen Bedingungen aus Hämoproteinen austritt und noch nicht von der HO abgebaut wurde.<sup>26</sup> Die im Blut zirkulierenden 2 bis  $3 \cdot 10^{13}$  Erythrocyten haben unter gesunden Bedingungen eine Lebensdauer von ca. 120 Tagen, bevor sie extravasal abgebaut werden.<sup>361</sup> Der Körper produziert über Erythropoese immer wieder neue Erythrocyten und baut gleichzeitig alte wieder ab. Dieser Lebenszyklus resultiert in einem gigantischen Umsatz von ca.  $2 \cdot 10^6$  Erythrocyten pro Sekunde.<sup>30</sup> Jeder Erythrocyt trägt rund 250 Millionen Hämoglobinmoleküle in sich und jedes diese Hämoglobinmoleküle trägt vier Hämmoleküle.<sup>362</sup> Das Globin des Hämoglobins wird bei dem kontrollierten Abbau nach 120 Tagen zu Aminosäuren hydrolysiert, die für die Proteinbiosynthese weiterverwendet werden, das Häm wird zu Eisen und Bilirubin IX $\alpha$  umgesetzt, wobei das Eisen vom Speicherprotein Ferritin aufgenommen wird.<sup>257,261,363–365</sup>

Den Prozess, wenn die Konzentration von labilem Häm, durch die Zerstörung von Erythrocyten plötzlich über die physiologische Kapazität des Körpers ansteigt, nennt man Hämolyse.<sup>25,100,309,366–371</sup> An dieser Stelle eine genaue Hämkonzentration zu nennen, bei der ein hämolytischer Zustand vorliegt, ist aufgrund der in Kapitel 2.2 erläuterten Herausforderung der Hämanalytik schwierig. Die Hämkonzentrationen in der Literatur reichen von 20  $\mu\text{M}$  bis über 350  $\mu\text{M}$ .<sup>73,372–374</sup> Erythrocyten können durch eine Vielzahl von Faktoren zerstört werden.<sup>368</sup> Dazu gehören Pathogene wie der Parasit *P. falciparum* in Folge einer Malariainfektion, Defekte in den Erythrocyten, wie beispielsweise in der



Sichelzellanämie, oder das Zuführen einer zu lange oder falsch gelagerten Blut- bzw. Erythrocytenkonserve im Krankenhaus, bei der die Erythrocyten metabolischen und oxidativen Produkten in der Flüssigkeit ausgesetzt sind und der Körper mit einer Antikörpervermittelten Komplementaktivierung reagiert.<sup>17,360,369,375,376</sup> Außerdem können mechanische Einflüsse, wie das Stoppen des Kapillarflusses und Gefäßschädigungen wie bei der Mikroangiopathie, oder der osmotische Druck die Stabilität der Erythrocyten beeinflussen.<sup>368</sup>

Man unterscheidet zwischen extravasaler Hämolyse, außerhalb der Blutbahn, und intravasaler Hämolyse, die in der Blutbahn erfolgt.<sup>177</sup> Die extravaskuläre Hämolyse beinhaltet physiologisch zum Beispiel die Hämbiosynthese in den Zellen, oder wenn Blutgefäße platzen und sich der Inhalt in die umliegenden Gewebe ergießt.<sup>73,177</sup> Bei der intravasalen Hämolyse tritt zunächst eine große Menge des 64 kDa schweren Hämoglobin aus den Erythrocyten aus.<sup>377</sup> Sind Antioxidantien in der Nähe, so wird das Eisen im Hämoglobin zunächst im Oxidationszustand +2 gehalten.<sup>378</sup> Unter harschen Bedingungen, wie einem sauren pH-Wert in Folge einer Entzündung, oder der Anwesenheit von Oxidantien, wird Hämoglobin zu Methämoglobin (Eisen (III)), oder auch Ferrihämoglobin genannt, oxidiert.<sup>30,377</sup> Dieses kann in extravasale Gebiete gelangen, oder in die Nähe von Endothelzellen.<sup>30</sup> Freies Hämoglobin kann subendotheliales Stickstoffmonoxid binden, einem endogenen Vasodilatator, und durch die Entfernung des Stickstoffmonoxids aus dem physiologischen Gleichgewicht zu einer Vasokonstriktion beitragen.<sup>379,380</sup> Methämoglobin setzt nach der Oxidation im Blutgefäß seine Hämgruppen frei, die nun labil vorliegend, katalytisch hochreaktiv und oxidativ sind.<sup>372,377</sup> Labiles Häm kann ebenso durch die Dimerisierung des Tetramers Hämoglobin entstehen.<sup>30</sup> Das freie Hämoglobin kann als Tetramer ( $2\alpha 2\beta$ ) oder Dimer ( $\alpha\beta$ ) vorliegen, beide Zustände unterliegen einem dynamischen Gleichgewicht.<sup>381</sup> Das Dimer (hauptsächlich Eisen (II)) tendiert stark zu Autoxidation und entlässt dabei labiles Häm.<sup>30</sup> Das hydrophobe Hämolekül kann in biologische Membranen interkalieren. Das Eisen des labilen Häms kann aufgrund seiner oxidativen Eigenschaften, bereits bei einer physiologischen labilen Hämkonzentration von  $10^{-5}$  M diverse Fenton-artige Reaktionen eingehen und zusammen mit Wasserstoffperoxid, einem biologischen Signalmolekül, reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), wie toxische Hydroxylradikale generieren:<sup>28,382</sup>



Das Eisenion katalysiert über ROS die Produktion von cytotoxischem 13-Linolsäure-hydroperoxid.<sup>383</sup> Dieses verändert die Membranpermeabilität und beschleunigt die Zell- bzw. Erythrocytenlyse, was einen weiteren Anstieg der labilen Hämkonzentration zur Folge hat.<sup>21,26,28,384–386</sup> Die von labilem Häm induzierten ROS schädigen außerdem Proteine und Nucleinsäuren, induzieren über *cross-linking* Proteinaggregation und den Proteinabbau, wobei sich in einer Studie vor allem das Serumprotein Hämbindendes Protein (HBP93) als anfällig für den Abbau gezeigt hat.<sup>22,26,28,387–389</sup> Häm-induzierte ROS aktivieren zudem Zell-Signalwege, sowie oxidations-empfindliche, proinflammatorische Transkriptionsfaktoren. Bei den proinflammatorischen Signalkaskaden ist der *Toll-like receptor 4* (TLR4) involviert, der Rezeptor für bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), für den Häm ein direkter Agonist sein könnte und dessen Aktivierung eine breite innate Immun-Antwort auslöst.<sup>390–393</sup> Sie ändern des Weiteren die Proteinexpression und stören membranständige Kanäle.<sup>22,26,28,387,388</sup> Neben den molekularen Schäden werden auch auf physiologischer Ebene Änderungen durch Häm-induzierte ROS verursacht: Es ändert sich unter anderem die Funktion der Niere, der Neuronen des Gehirns, und der Kardiocyten des Herzens.<sup>28</sup> In der Niere erfolgt eine renale Vasodilatation, die eine Erhöhung des renalen Blutflusses, des Urinvolumens und der Natriumausscheidung zur Folge hat.<sup>28,394,395</sup> Im schlimmsten Fall kommt es zu Nierenversagen, hervorgerufen durch Häm-induzierte renale, inflammatorische Ereignisse.<sup>28,394,395</sup> Es wurde gezeigt, dass die lokale Ausscheidung von Häm in Hämatomen oder bei Blutungen im Gehirn einen hohen toxischen Effekt auf die anliegenden Neuronen hat.<sup>28,396</sup> In einem Laborversuch starben die Neuronen bei bereits nur 3 % der labilen Hämkonzentration, die bei Blutungen normalerweise auftritt.<sup>28,396</sup> Häm wirkt außerdem toxisch auf Kardiocyten.<sup>28,397</sup>

Häm stimuliert *in vitro*, wahrscheinlich ROS- und Nekrosefaktor  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) vermittelt, die Expression von intrazellulären und extrazellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM1 und VCAM1), so wie endotheliale Leukocyten-Adhäsionsmoleküle (E-Selectin).<sup>28,398–400</sup> Die Leukocytenrekrutierung löst eine Entzündungsreaktion des Körpers aus, weswegen Häm zu den proinflammatorischen Molekülen zugeordnet werden kann.<sup>28,398–400</sup> Dies konnte *in*

*in vitro* gezeigt werden, indem man neutrophile Granulocyten, eine spezialisierte Form von Leukocyten, einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Häm aussetzte und diese mit der Expression des Chemokins Interleukin-8 reagierten.<sup>28,401</sup> Später konnte ein schwacher Effekt von Häm auf neutrophile Granulocyten zwar bestätigt werden, jedoch zweifeln die AutorInnen die Verfügbarkeit von so viel labilem Häm *in vivo*, dass es für eine Granulocytenaktivierung genügt, an.<sup>402</sup> Es wird außerdem diskutiert, dass Häm über den C-Typ-Lektinartigen Rezeptor 2 (CLEC2) Blutplättchen aktivieren kann, dies wurde *in vitro* an humanen und murinen Blutplättchen gezeigt.<sup>403</sup>

### 2.3.2 Hämolytische Funktionsstörungen

Wenn die Kapazität des Körpers Häm abzubauen versagt, kommt es zur Hämolyse (Kapitel 2.3.1). Nicht nur pathophysiologische Fehlfunktionen des Körpers können zur Anhäufung von labilem Häm führen, auch die Transfusion von Blutkonserven kann im Empfängerorganismus schwere hämolytischen Ereignisse auslösen.<sup>404</sup> Eine Transfusionseinheit Blut enthält ca.  $29 \cdot 10^{12}$  Erythrocyten. PatientInnen mit Sichelzellanämie erhalten ihr gesamtes Leben lang vier Einheiten pro Monat, Opfer von Autounfällen erhalten bis zu 50 Einheiten, KrebspatientInnen erhalten vier Einheiten während der Chemotherapie. Die Erythrocyten in den Konserven sind fragil und neigen leicht zur Hämolyse.<sup>404</sup> Hämolyse tritt abgesehen von Transfusionsbezogenen Reaktionen bei verschiedenen pathologischen Stadien wie der Sichelzellanämie, der Ischämie bei Reperfusionsverletzungen, bei Malaria, Arteriosklerose, Thalassämie, so wie bei Sepsis auf.<sup>27,31,405,406</sup> All diese Funktionsstörungen gehören zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen und gehören laut des statistischen Bundesamtes zu den Top drei der Todesursachen des Jahres 2021 in Deutschland.<sup>407</sup> Diese sollen im Folgenden erläutert werden.

Die Sichelzellanämie ist eine autosomal-codominant vererbte Hämoglobinopathie.<sup>177</sup> Überwiegend sind Menschen aus Afrika, in den USA und dem Mittelmeerraum betroffen.<sup>405,408,409</sup> Man unterscheidet zwischen der quantitativen und qualitativen Sichelzellanämie.<sup>177</sup> Bei der quantitativen Hämoglobinopathie fehlen Globinketten bei der Synthese von Hämoglobin.<sup>177</sup> Bei der qualitativen Hämoglobinopathie hingegen gibt es eine einzige Punktmutation

im Hämoglobinen, die zum fehlerhaften Einbau einer Aminosäure führt.<sup>177</sup> Die saure Aminosäure Glutaminsäure an Position sechs der  $\beta$ -Kette ist durch die hydrophobe Aminosäure Valin ersetzt. Daraus ergibt sich die Produktion eines abnormalen Hämoglobins (HbS), das aufgrund des Valins eine Konformationsänderung erfährt, wodurch ein hydrophober Knopf auf der Proteinoberfläche gebildet wird, an dem sich ein weiteres Hämoglobin anlagern kann.<sup>410</sup> Dies führt zur Polymerisation des fehlerhaften HbS und makroskopisch zu einer steifen, sichelartigen Verformung der Erythrocyten. Die Sichelzellform behindert das Durchdringen von engen Kapillaren und die Mikrozirkulation.<sup>177,410</sup> Dies endet nicht selten in der Verstopfung der Kapillaren mit Mikroinfarkten und Organschäden, Schlaganfällen oder dem Platzen der Erythrocyten mit Hämolyse zur Folge.<sup>177,411</sup> Auch eine Komplementaktivierung wird diskutiert.<sup>412</sup> Dass Hämolyse in PatientInnen mit Sichelzellanämie auftritt, wurde bereits 1924 festgestellt.<sup>18</sup> Diese entsteht aufgrund der verformten Lyse-anfälligen Erythrocyten und des austretenden Hämoglobins.<sup>409,413</sup> Die Folgen sind Symptome wie Schmerzen durch Erythrocyten-induzierte Vasookklusionen, Organschäden und Lungenhochdruck.<sup>391</sup> Therapiert wird mit Sauerstoff zur Gewährleistung der Sauerstoffversorgung der Organe, mit Transfusionen von isotonischer Kochsalzlösung oder Erythrocyten.<sup>177,414</sup>

Ischämie, also eine verminderte oder fehlende Gewebedurchblutung und das Reperfusionssyndrom tritt häufig in Folge von chirurgischen Eingriffen als Gewebetrauma auf. Bei mechanischer Ruptur von Zellen, die zum direkten Zelltod, oder dem Absterben und Verschluss von Gefäßen führt und der Ruptur von Erythrocyten, tritt Hämoglobin aus und labiles Häm induziert die ROS-Produktion, die für die indirekten Schäden verantwortlich ist.<sup>415</sup> Die ROS aktivieren proinflammatorische Leukocyten und führen zu Leberschäden oder Organversagen.<sup>415,416</sup> In einer Mausstudie zur Ischämie und dem Reperfusionssyndrom konnte die Beteiligung des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und dem TLR4-Signalweg nachgewiesen werden.<sup>417</sup> In einer anderen Arbeit konnte eine direkte Interaktion von Häm und TNF $\alpha$  nachgewiesen werden.<sup>418</sup>

Malaria wird durch den Parasiten *P. falciparum* ausgelöst, der durch Moskito-Bisse in Form von Sporoziten in den Menschen übertragen wird.<sup>419</sup> Diese Infektionskrankheit kommt überwiegend in tropischen Gebieten vor, da der Erreger

für seine Entwicklung eine Temperatur über 21 °C benötigt.<sup>420,421</sup> Über die Blutbahn gelangt der Erreger zur Leber, wo er der Entwicklungszyklus beginnt.<sup>420</sup> Eine weiterentwickelte Form des Erregers, die Merozoiten, werden wieder ins Blut entlassen, und befallen die roten Blutkörperchen, wo sie sich asexuell vermehren.<sup>420</sup> Ein Teil wird zu weiblichen und männlichen Gametocyten, die sich in Hautkapillaren anreichern und von einem Mosquito durch einen Biss wieder aufgenommen werden können.<sup>420</sup> Die beiden Formen fusionieren nach weiteren Entwicklungsschritten.<sup>420,422</sup> Das Produkt, ein Oocyst, kann sich wiederum zu Sporozoiten weiterentwickeln und auf den Menschen übertragen werden.<sup>422</sup> Vier bis acht Tage nach der Erythrocyteninvasion entwickeln sich erste Symptome wie Fieber, Zittern, Muskelkrämpfe.<sup>420,423</sup> Die Invasion von *P. falciparum* ist ein mehrstufiger Prozess und verläuft über Interaktionen diverser Rezeptoren, darunter der Rezeptor Basaigin, der *complement decay-accelerating factor* (CD55) und die parasitären, membranständigen Proteine Retikulocytbindeprotein-Homolog 5 (PfRH5), mit dem PfRH5 interagierenden Protein (PfRipr), und das Cysteinreiche protektive Antigen (PfCyRPA).<sup>420,424-426</sup> Zur Weiterentwicklung benötigt der Parasit in den Erythrocyten eine Menge Nährstoffe.<sup>420</sup> In einer speziellen Futtervakuole verdaut der Parasit Hämoglobin, was toxisches Häm freisetzt.<sup>420</sup> Dieses wird durch Proteasen und dem Häm-Detoxifikationsprotein (HDP) zu chemisch inertem Hämozoin (Kapitel 2.1.1) polymerisiert.<sup>420,427</sup> Bei PatientInnen mit Malaria tritt oft eine massive Hämolyse auf, da infizierte sowie nicht-infizierte Erythrocyten in Folge von Parasiten ausgelösten Membranveränderungen und ineffektiv ablaufender Erythropoese zerstört werden.<sup>428</sup> Dieser Umstand führt in den PatientInnen zu Anämien, und den typischen hämolytischen Begleiterscheinungen.<sup>26,28,394,395,428</sup>

Die Thalassämie wird homozygot vererbt und besagt einen Mangel an Hämoglobin im Körper, in Folge von angeborenen Defekten im Hämoglobingen.<sup>177</sup> Man unterscheidet zwischen der  $\alpha$ -Thalassämie und der  $\beta$ -Thalassämie. Bei Ersterem fehlen im Hämoglobin, bestehend aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten, Teile der  $\alpha$ -Ketten des Hämoglobins, bei Letzterem fehlen Teile der  $\beta$ -Ketten.<sup>177</sup> Ein Mangel der  $\beta$ -Ketten kommt deutlich häufiger vor. Auch hier wird mit Transfusionen von Erythrocytenkonzentraten therapiert, die zu Transfusionsbezogener Hämolyse führen können.<sup>177</sup> Bei Thalassämie wird als

Grund für die Hämolyse jedoch hauptsächlich ein Lungenhochdruck aufgeführt.<sup>406,430</sup>

Arteriosklerose besagt die Ansammlung von Plaque in arteriellen Gefäßen, zu deutsch eine Arterienverkalkung.<sup>431</sup> Komplikationen bei kardiovaskulären Krankheiten werden meist durch die Läsion von arteriosklerotischem Plaque verursacht und enden im schlimmsten Fall tödlich.<sup>432</sup> Bei der Ansammlung von Plaque an den Gefäßwänden werden auch Erythrocyten eingeschlossen. Die Umgebung innerhalb des arteriosklerotischen Plaques ist hoch-oxidativ und cytotoxisch.<sup>432</sup> Unter anderem sind Lipidhydroperoxide, Aldehyde und Carbonyle zu finden.<sup>433</sup> Diese Agentien lysieren die Erythrocyten, die das vor Oxidation geschützte Hämoglobin in die oxidative Umgebung freisetzen. Dort wird Häm über Methämoglobin freigesetzt und führt über ROS-Produktion zu hämolytischen Begleiterscheinungen.<sup>432</sup>

Die Sterblichkeit von PatientInnen mit Sepsis oder einem septischen Schock liegt trotz Intensivpflege bei 30 bis 50 %.<sup>368,434</sup> Eine Sepsis ist die übertriebene Immunreaktion des Körpers auf einen extrinsischen Stimulus.<sup>368</sup> Sie zeichnet sich durch Fieber, Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe, Hyperventilation und Leukocytose oder Leukopenie, sowie Entzündungen, Organversagen und einem kardio-vaskulären Kollaps aus.<sup>368</sup> Diese Überreaktion wird durch sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) ausgelöst, die Rezeptoren wie TLRs und C-Typ Lectinrezeptoren (CLRs) aktivieren.<sup>368,435</sup> Die Lyse von Erythrocyten wird bei der Sepsis möglicherweise durch mehrere Faktoren gefördert, wie der Invasion und Destabilisierung von bakteriellem LPS der Erythrocytenmembran, hämolytische Pathogene, oder intravaskuläre Koagulation.<sup>368</sup> Das freiwerdende Hämoglobin oxidiert zu Methämoglobin und entlässt labiles Häm, welches ROS generiert.<sup>368,436</sup> Dieses aktiviert TLR4 und darüber NFκB, welches die Vasookklusion mit anschließendem Gewebesteben fördert.<sup>393</sup>

## 2.4 Hämbindende Proteine schützen vor Hämtoxizität

### 2.4.1 Akute Hämolyse

Bei dem pathophysiologischen Zustand der intravaskulären Hämolyse platzen aus verschiedenen Gründen die zirkulierenden Erythrocyten und ergießen ihren Inhalt ins Blutplasma (Kapitel 2.3).<sup>25,100,309,366–371</sup> Der Körper hat als Reaktion auf den Umstand, während einer Hämolyse plötzlich Milliarden von Molekülen Hämoglobin ausgesetzt zu sein, im Laufe der Evolution einen effektiven Mechanismus zum Schutz vor freiem Hämoglobin und dem daraus resultierenden labilen Häm entwickelt.<sup>26,27,30,437,438</sup> Eine Übersicht hierzu ist in Abbildung 8 dargestellt. Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, kann Hämoglobin, das aus Erythrocyten ausgetreten ist, in zwei Dimere zerfallen. Das 32 kD kleine Dimer wird in erster Linie, wenn nicht von anderen Proteinen gebunden, über die glomeruläre Filtration in den Nieren ausgeschieden.<sup>439</sup> Im Tierversuch mit Schweinen und Hunden erfolge die Ausscheidung des Hämoglobindimers bereits nach zehn Minuten.<sup>440</sup> Auch ungebundenes Hämoglobintetramer kann in kleinen Mengen über die Niere austreten, im Urin kann es mit dem Eisen-Oxidationszustand +3 nachgewiesen werden.<sup>440</sup> Das Hämoglobin wird aber hauptsächlich von einem Protein namens Haptoglobin (Hp) in einem 1:1-Komplex gebunden.<sup>441</sup> Hp gehört zu den Akut-Phase-Proteinen, das heißt, die Plasmakonzentration von ~5 bis 30  $\mu\text{M}$  wird in der Anwesenheit von proinflammatorischen Cytokinen erhöht.<sup>442,443</sup> Die Dissoziationskonstante für den Hp-Hämoglobin-Komplex beträgt  $K_D = 10^{-15} \text{ M}$ .<sup>444,445</sup> Die Aufgabe von Hp ist der Schutz von extrazellulärem Hämoglobin vor oxidativen Reaktanden, die Hämoglobinvermittelte Schäden wie Nierenversagen oder vaskuläre Verletzungen auslösen.<sup>309,446</sup> *In vitro* konnte eine Bindung zwischen Hp und Häm mit sehr schwacher Assoziation nachgewiesen werden.<sup>447</sup> Hp besteht aus zwei verschiedenen  $\alpha$ -Kettentypen und einem  $\beta$ -Kettentyp, die über Disulfidbrücken zusammengehalten werden und je nach Phänotyp unterschiedlich zusammengesetzt sind: Phänotyp Hp 1-1 enthält  $(\alpha_1\beta)_2$ , Phänotyp Hp 2-1 besteht aus  $(\alpha_1\beta)_2(\alpha_2\beta)_n$ , wobei  $n=0,1,2,3,\dots$  und Phänotyp Hp 2-2 besteht aus  $(\alpha_2\beta)_n$ , wobei  $n=3,4,5,\dots$ <sup>448</sup> Die Polymorphismen des Hp sind möglicherweise für vaskuläre Komplikationen bei Diabetes-,

ArteriosklerosepatientInnen verantwortlich, da sie unter Umständen funktionelle Unterschiede zum Schutz des Hämoglobins vor oxidativen Einflüssen aufweisen.<sup>449,450</sup> Der molekulare Mechanismus dieses Schutzes ist noch nicht verstanden, es wird jedoch spekuliert, dass Hp den Zugang von Radikalen zu den Hämbindungstaschen des Hämoglobins verhindert, oder im Komplex gebunden, sogar als suizidaler Radikalfänger dienen könnte.<sup>29,451</sup> Der Hämoglobin-Hp-Komplex kann nicht über die Nieren ausgeschieden werden.<sup>452</sup> Der Komplex wird stattdessen über die Blutbahn zu Makrophagen, vor allem die, die in der Milz und Leber exprimiert sind, transportiert, und auf deren Oberfläche vom membranständigen Endocytoserezeptor *cluster of differentiation 163* (CD163) gebunden.<sup>441,453</sup> Die extrazelluläre Region des Rezeptors ist reich an Cysteinen. Ein Epitop zwischen einer der Hp- $\beta$ -Ketten und einer der Hämoglobin- $\alpha$ -Ketten konnte als hoch-affine Bindungsstelle für CD163 ( $K_D = 19$  nM) nachgewiesen werden.<sup>441,454,455</sup> Die Interaktion des Komplexes mit CD163 ist Calciumionen abhängig.<sup>454</sup> Auch Hämoglobin kann mit einer geringeren Affinität von  $K_D = 195$  nM direkt an CD163 binden.<sup>455</sup> Der Hämoglobin-Hp-Komplex wird über Endocytose internalisiert und Hämoglobin dort in Lysosomen metabolisiert. Es ist bisher nicht geklärt, ob auch CD163 im Lysosom abgebaut wird, oder zurück an die Zelloberfläche gelangt. Es wird jedoch über Rezeptor-Recycling diskutiert.<sup>453,456</sup> Die Hp-Kapazität im Plasma ist nach der Lyse von bereits 5 bis 10 ml Blut erschöpft.<sup>404</sup> Es existiert eine lösliche Form von CD163, die mit 1 bis 3 mg/Liter im Blutplasma zu finden ist, diese sollte aber aufgrund der niedrigen Konzentration dauerhaft mit dem Hämoglobin-Hp-Komplex gesättigt sein.<sup>454,457</sup> Die Expression von Hp in der Leber und CD163 in den Makrophagen ist bei inflammatorischen Ereignissen oder der Ausschüttung von proinflammatorischen Chemokinen wie IL6 erhöht.<sup>29,458</sup> Der Hämoglobin-Hp-Komplex selbst hat ebenfalls regulatorische Funktionen, zum einen induziert er die Expression der HO1 und zum anderen die von antiinflammatorischen Genen.<sup>258,459–461</sup>

#### 2.4.2 Reinigung der Blutzirkulation bei Hämolyse

Auch für große Mengen von austretendem labilen Häm im Kontext von hämolytischen Ereignissen hat der Körper einen geeigneten Schutzmechanismus



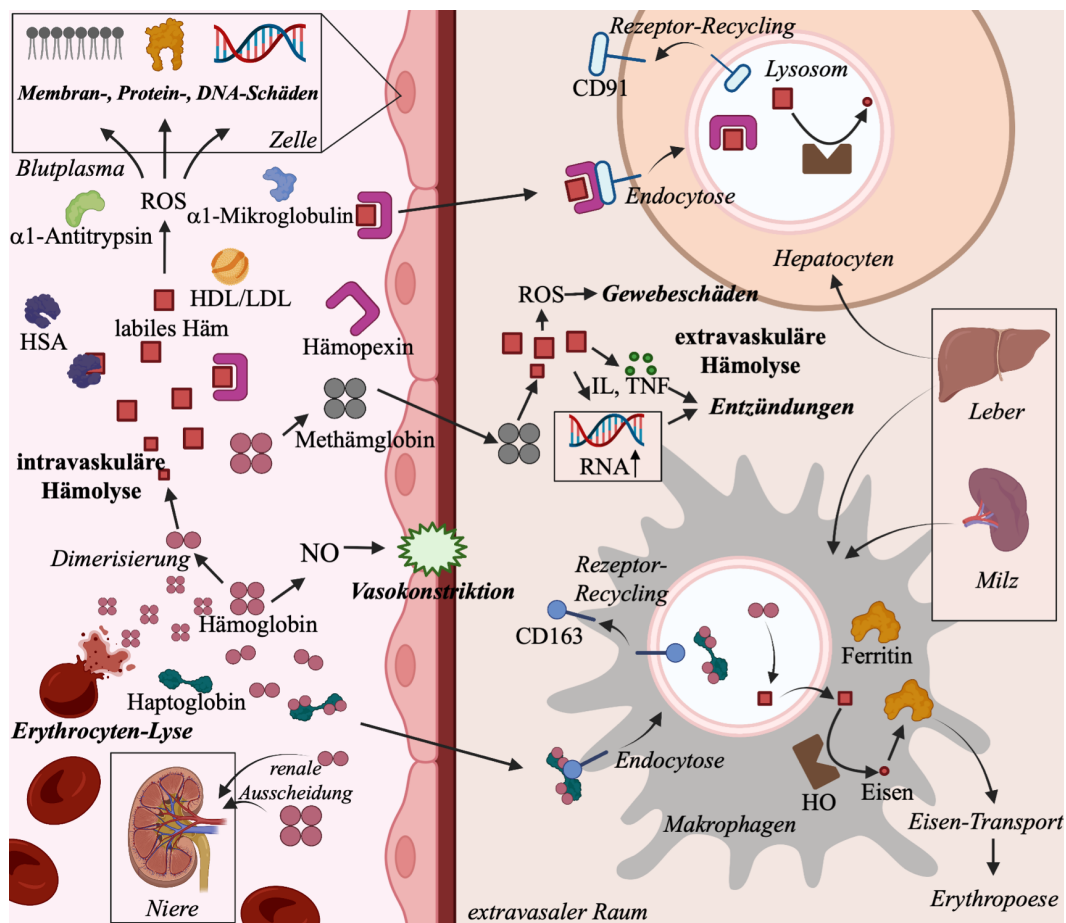
entwickelt. Dieser besteht aus einer Reihe von Proteinen (englisch *heme scavenger*), den sog. Häm-fängern, zu denen HSA, Hämopexin, die Lipoproteine *high density lipoprotein* (HDL) und *low density lipoprotein* (LDL),  $\alpha$ 1-Mikroglobulin, sowie  $\alpha$ 1-Antitrypsin (auch bekannt als  $\alpha$ 1-proteinase-Inhibitor) zählen. In Insekten ist außerdem der Häm-fänger Nitrophorin zu finden und in Ratten  $\alpha$ 1-Makroglobulin.<sup>462,463</sup> In Tabelle 3 ist eine Übersicht über die im Menschen vorkommenden Proteine dargestellt.

**Tabelle 3:** Übersicht über die Proteine des Schutzmechanismus vor labilem Häm und ihre Eigenschaften.

Protein	Molekulargewicht	Plasmakonzentration	Ermittelte Häm-Affinitäten ( $K_D$ )	Stöchiometrie (Häm:Protein)
HSA	66 kDa <sup>464</sup>	$\leq 800 \mu\text{M}$ <sup>465</sup>	40 $\mu\text{M}$ <sup>32</sup> 1 $\mu\text{M}$ <sup>466</sup> 12,6 nM <sup>447</sup> 10 nM <sup>34</sup> 0,5 nM <sup>467</sup>	1:1 <sup>32,466-469</sup> >1:1 <sup>447,468,470,471</sup>
Hämopexin	57 kDa <sup>472</sup>	$\leq 25 \mu\text{M}$ <sup>465</sup>	8 nM <sup>473</sup> 14,7 pM <sup>467</sup> $\approx 5,3 \text{ fM}$ <sup>474</sup>	1:1 <sup>35,467,473-479</sup> >1:1 <sup>1,480</sup> 2:1 <sup>481</sup>
HDL	100 bis 500 kDa <sup>482</sup>	$\leq 1,7 \text{ mM}$ <sup>483,484</sup>	291 nM <sup>466</sup> 1.) 3,4 nM 2.) 0,5 nM <sup>467</sup>	1:1 <sup>466</sup> 2:1 <sup>467</sup>
LDL	550 kDa <sup>485</sup>	$\leq 2,8 \text{ mM}$ <sup>484</sup>	49 nM <sup>466</sup> 1.) 7,7 nM 2.) 0,8 nM <sup>467</sup>	1:1 <sup>466</sup> 2:1 <sup>467</sup>
$\alpha$ 1-Antitrypsin	52 kDa <sup>486</sup>	$\leq 53 \mu\text{M}$ <sup>487</sup>	20 nM <sup>447</sup>	1:1 <sup>447</sup>
$\alpha$ 1-Mikroglobulin	33 kDa <sup>488</sup>	$\leq 2,5 \mu\text{M}$ <sup>489</sup>	14 $\mu\text{M}$ <sup>490</sup> 2 $\mu\text{M}$ <sup>491</sup> 1.) 190 $\mu\text{M}$ 2.) 7 $\mu\text{M}$ <sup>492</sup>	1:1 <sup>490</sup> 2:1 <sup>492,493</sup>

Diese Reihe von Proteinen wird auch als „Netzwerk aus endogenen Antioxidantien“ bezeichnet.<sup>494</sup> Allen voran schreiten die Lipoproteine HDL und LDL. Es konnte gezeigt werden, dass Lipoproteine wie LDL und HDL, die eigentlich für den Transport von Lipiden im Plasma verantwortlich sind, mit

geringer Affinität Häm binden können.<sup>466</sup> Es wird angenommen, dass 80 % des gesamten labilen Häms, das aus einer Hämolyse resultiert, von LDL und HDL gebunden wird. Erst dann wird das Häm an weitere Hämträger wie HSA und Hämopexin weitergegeben.<sup>467</sup> Häm wird in die Lipoproteinoberfläche der Lipoproteine gebettet, so dass die negativ geladenen Propionatgruppen mit positiven Proteinresten interagieren.<sup>466</sup> LDL und HDL liegen in einer höheren Konzentration als die anderen Hämträger im Blutplasma vor und werden jedoch von Häm in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch die entstehenden ROS oxidiert und geschädigt, wobei konjugierte Diene, Thiobarbiturate und Isoprostane entstehen.<sup>466</sup> Es wird angenommen, dass das Häm bei geschädigten Lipoproteinen zunächst an HSA weitergegeben wird.<sup>447</sup>



**Abbildung 8** Übersicht über die intra- und extravaskuläre Hämolyse, sowie das Häm- und Hämoglobin-Entgiftungssystem des Körpers.<sup>26–28,30,258,363,495</sup> Erklärungen sind dem Text zu entnehmen. Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und www.BioRender.com.

Das 66 kDa schwere HSA kann durch Hämbindung die toxischen Effekte von Häm um bis zu 60 % reduzieren.<sup>28,496</sup> Es gibt bis jetzt keine ausreichende Information über ein Hämolyse-assoziiertes Transportsystem für den Häm-HSA-

Komplex, weswegen anzunehmen ist, dass HSA als temporärer Speicherort für exzessives Häm dient.<sup>28,497</sup> Neuesten Erkenntnissen zufolge existiert jedoch ein Rezeptor namens CD71, der als Teil eines eventuellen Transportsystems für den Transport des Häm-HSA-Komplexes auf der Oberfläche von Erythroblasten und Lymphocyten dienen könnte.<sup>498</sup> Die genaue Stöchiometrie von Hämolekülen zu HSA ist nicht vollständig geklärt. Ein pentakoordinierter Häm-HSA-Komplex konnte in 1:1-Stöchiometrie kristallisiert werden, hier diente Tyr161 als Ligand für Häm, jedoch gibt es in der Zwischenzeit diverse Studien, die weitere nieder-affine Hämbindungsstellen auf HSA vorschlagen.<sup>447,468,470,471</sup>

Die Reihenfolge ob zunächst HSA Häm bindet und das Häm anschließend an Hämopexin weitergegeben oder bei erschöpfter HSA-Kapazität gebunden wird,<sup>30,499</sup> beziehungsweise *vice versa*<sup>26,363</sup> ist bisher nicht vollständig geklärt. Eine Hämübergabe von HSA an Hämopexin konnte *in vitro* gezeigt werden.<sup>474,500</sup> Diese Studien werden von der Hypothese gestützt, dass HSA in einer weitaus höheren Konzentration im Plasma gegenüber Hämopexin (siehe Tabelle 3) vorliegt, und deswegen trotz seiner geringeren Affinität zu Häm, zuerst Häm binden könnte.<sup>34</sup> Das Akut-Phase-Protein Hämopexin bindet Häm mit einer sehr hohen Affinität.<sup>473</sup> Es wird bisher von einer Affinität von  $K_D \approx 5,3$  fM und einer Stöchiometrie von 1:1 ausgegangen.<sup>474</sup> Die Aufgabe von Hämopexin ist es, den Körper vor den pro-oxidativen und proinflammatorischen Eigenschaften von Häm zu schützen.<sup>402,497</sup> Häm, das ungehindert in Endothelzellen eindringen kann, ist dazu nach Bindung von Hämopexin nicht mehr fähig.<sup>374</sup> Der Häm-Hämopexin-Komplex bindet mit einer Affinität von  $K_D \approx 0,3$  bis  $0,5$  nM an den rund 600 kDa schweren Endocytoserezeptor *low density lipoprotein related receptor 1* (LRP1), auch *cluster of differentiation 91* (CD91) genannt.<sup>495</sup> Dieser Rezeptor wird auf Makrophagen-, Neuronen- und Syncytiotrophoblastenoberflächen exprimiert.<sup>30,495</sup> Er ist als Multiligandrezeptor bekannt und bindet neben dem Häm-Hämopexin-Komplex auch *heat shock*-Proteine und den Protease-Inhibitor  $\alpha 2$ -Makroglobulin.<sup>501</sup> Die Internalisierung ist Calciumionen- und temperaturabhängig.<sup>497</sup> Es wird diskutiert, dass die Dissoziation des Komplexes aus Hämopexin und CD91 von der lysosomalen Aktivität katalysiert wird.<sup>28,502</sup> Es ist jedoch nicht bewiesen, ob beide Komplexteile in der Leber vollständig degradiert werden, oder ob Hämopexin einem Recyclingprozess unterliegt und zurück an die Zelloberfläche geleitet

wird.<sup>28,258,363,503</sup> Neuere Studien beschreiben eine Wiederverwertung des Apo-Hämopexins von acht bis zehn Mal, bevor es abgebaut wird.<sup>404</sup> Dagegen spricht eine Studie die zeigt, dass das meiste Hämopexin in Lysosomen degradiert wird und dass hohe Hämkonzentrationen bei hämolytischen Zuständen in der Regel mit niedrigen Hämopexinkonzentrationen assoziiert sind.<sup>30,495,504</sup> Der Häm-Hämopexin-Komplex hat neben der Internalisierung von Häm eine wichtige regulatorische Funktion im biologischen Organismus, die in Kapitel 2.5.1 näher beleuchtet werden soll.

Ein weiteres Protein des Antioxidantiennetzwerks ist  $\alpha$ 1-Antitrypsin, ein multifunktionaler Serinproteaseinhibitor, vor allem bekannt für die Hemmung der pulmonaren, neutrophilen Elastase.<sup>447,505</sup>  $\alpha$ 1-Antitrypsin ist ebenfalls ein Akut-Phase-Protein bei Hämolyse und bindet Häm mit einer geringeren Affinität als Hämopexin mit  $K_D = 20$  nM.<sup>506</sup>  $\alpha$ 1-Antitrypsin wird therapeutisch für die Behandlung von PatientInnen mit  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel genutzt. Bei der anfänglichen Gewinnung wurden farbliche Verunreinigungen gefunden, die später als  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Häm-Komplexe identifiziert werden konnten.<sup>447,506</sup> Menschen mit  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel sind genetisch prädispositioniert, eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) zu entwickeln.<sup>506</sup> Die Stöchiometrie des  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Häm-Komplexes beträgt 1:1 und ein Hämrekrutierungsmechanismus von unspezifischen Bindungsstellen hin zu einer hoch-affinen Bindungsstelle wurde vorgeschlagen.<sup>447</sup> Die Halbwertszeit des  $\alpha$ 1-Antitrypsin in der Zirkulation beträgt drei bis fünf Tage.<sup>447,507</sup> Die Zugabe von  $\alpha$ 1-Antitrypsin zu mit Häm behandelten Zellen bewirkt die reduzierte Aktivierung von Neutrophilen und Chemokinen. Dieser Effekt konnte *in vivo* bei Nierengeschädigten Mäusen reproduziert werden.<sup>508</sup>

$\alpha$ 1-Mikroglobulin ist in erster Linie als *house keeping*-Protein des antioxidativen Abwehrmechanismus bekannt und gehört zu den Lipokalinen, einer Gruppe farbiger, kleiner, extrazellulärer Transport- und Speicherproteine für lipophile Liganden.<sup>509,510</sup>  $\alpha$ 1-Mikroglobulin bindet freie Radikale sowie Häm und wird in nahezu allen Zellen, vor allem aber in der Leber exprimiert.<sup>493,511</sup>  $\alpha$ 1-Mikroglobulin wird von Erythrocyten internalisiert, die keine Mitochondrien zur Expression von vor ROS schützenden Proteinen enthalten, was für eine

antioxidative Funktion des  $\alpha$ 1-Mikroglobulins spricht.<sup>494</sup> Die Stöchiometrie zwischen Häm und  $\alpha$ 1-Mikroglobulin ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es wird jedoch über zwei Bindungsstellen, eine hoch-affine und eine nieder-affine, auf  $\alpha$ 1-Mikroglobulin diskutiert.<sup>492,493</sup> Die Gabe von  $\alpha$ 1-Mikroglobulin reduziert Entzündungen und Gewebeerletzungen in einem Kaninchenmodell für intraventrikuläre Hirnblutungen.<sup>512</sup> Es wird überlegt,  $\alpha$ 1-Mikroglobulin zusammen mit Hämopexin als Biomarker für erste Anzeichen einer Schwangerschaftsintoxikation (auch Präeklampsie, PE) in Hochrisikoschwangerschaften einzusetzen, da Patientinnen mit PE erhöhte fetale Hämoglobinwerte aufzeigen.<sup>513</sup>

Trotz dieses effizienten Schutzmechanismus treten nach wie vor viele Todesfälle im Zusammenhang mit Hämolyse auf. Ist die Kapazität der Hämfänger erschöpft, entlässt das ungebundene Hämoglobin große Mengen Häm (20 bis über 350  $\mu$ M bei akuter Hämolyse) in das Blutplasma und die umliegenden Gewebe.<sup>73,372-374</sup> In 1 ml Blut sind beispielsweise  $1,45 \cdot 10^{18}$  Hämoglobinmoleküle vorhanden, das ist jedoch 1000 Mal höher als die Bindungskapazität der Hp-Moleküle ( $6,82 \cdot 10^{15}$ ) und legt nahe, dass hämolytische Ereignisse nicht selten sind.<sup>404</sup> In einem Bericht des Paul-Ehrlich-Instituts werden beispielsweise allein 16 Todesfälle bei 326 Fällen von hämolytischen Transfusionsreaktionen in Deutschland in den Jahren 2016/2017 dokumentiert.<sup>514</sup> Da es nach wie vor anspruchsvoll ist, genaue Hämkonzentrationen im Plasma zu ermitteln, wird zum jetzigen Zeitpunkt von einer Hämbindungskapazität des Blutes von 1,8 mM ausgegangen.<sup>333</sup> Verglichen mit der Menge an Häm, die in den  $25 \cdot 10^{12}$  menschlichen Erythrocyten zu finden ist, ist diese Kapazität gering und benötigt einen therapeutischen Ansatz zum Schutz vor Häm-induzierten oxidativen Schäden.<sup>7</sup>

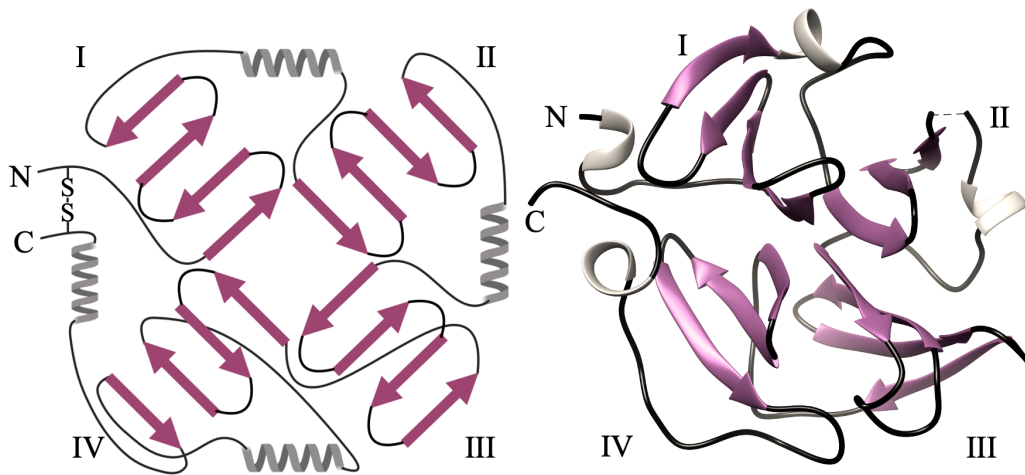
## 2.5 Hämopexin als Hämbindendes Protein

### 2.5.1 Struktur, Funktion und Homöostase von Hämopexin

Hämopexin ist aufgrund seiner hohen Affinität zu Häm wohl das bedeutendste Plasmaprotein im Schutzmechanismus gegen Hämolyse, es wiegt um

die 57 kDa und besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 439 Aminosäuren.<sup>515,516</sup> In Publikationen kommt es immer wieder zu widersprüchlichen Angaben zum Molekulargewicht von Hämopexin, es variiert von 58 bis 80 kDa. Dies rührt daher, dass Hämopexin bei der Bestimmung des Molekulargewichts über SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen ein 25 % höheres Gewicht besitzt als unter nicht-reduzierenden.<sup>517,518</sup> Entdeckt wurde es 1958 bei der Papierelektrophorese von humanem Serum durch F. Neale und von da an stetig weiter charakterisiert.<sup>33</sup> Hämopexin trägt ein Signalpeptid (M1 bis A23) mit einer Länge von 23 Aminosäuren, somit ist die Gesamtlänge des Apoproteins 462 Aminosäuren. Posttrational ist Hämopexin mit insgesamt sieben Glucosaminen verknüpft.<sup>519</sup> Es gehört zu der Familie der  $\beta$ -Globuline.<sup>516</sup> Der N-terminale Threoninrest (T24) ist mit N-Acetyl-Galactosamin O-verknüpft, innerhalb des Kette ist T29 ebenfalls O-verknüpft, es gibt außerdem fünf Asparaginreste, die mit N-Acetyl-Galactosamin N-verknüpft sind (N64, N187, N240, N246, N453).<sup>519</sup> Die Konsensussequenz für die Glycosylierungsbindungsstellen ist N-X-T/S, wobei X keine spezifische Aminosäure darstellt.<sup>353</sup> Die Röntgenkristallstrukturen von glycosyliertem (PDB: 1QJS) und nicht-glycosyliertem Hämopexin (PDB: 1QHU) aus Kaninchenserum unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, die Glycosylierung trägt also keinen großen Teil zur Strukturbildung der Tertiärstruktur bei.<sup>1</sup> Eine intermolekulare Homologieanalyse der Aminosäuresequenz ergibt zwei homologen Domänen (25 % Sequenzidentität), die über eine 20 Aminosäure lange Sequenz (englisch: *linker*) zusammengesetzt sind, die im Folgenden als Linkerpeptid bezeichnet wird.<sup>34,515</sup> Jede Domäne besteht aus je vier Wiederholungen mit rund 50 Aminosäuren Länge. Das Hämopexingen enthält 1523 Basenpaare, wovon 159 Basenpaare nicht-codierend sind.<sup>520</sup> Es wird diskutiert, dass das heutige Hämopexingen aus vier Duplikationen eines einzigen Ahnen-Exons hervorgegangen sein könnte.<sup>520</sup> Vergleicht man die Sequenz bezüglich der Länge von Introns und Exons, so liegt eine Genduplikation nahe.<sup>521</sup> Das Hämopexingen ist hoch konserviert, ein einziger biologisch nicht-signifikanter Polymorphismus ist aus zwei Allelen einer afrikanischen Population bekannt.<sup>522</sup> Auffällig an der Primärstruktur von Hämopexin sind zudem die vielen Tryptophanreste, mit insgesamt 18 an der Zahl, die in vier verschiedenen Clustern auftreten.<sup>519</sup> Einmalig an der Tertiärstruktur von Hämopexin ist der propellerartige (auch blütenblattartig genannt<sup>523</sup>) Aufbau. Jede Domäne zeigt einen Propeller, alle

Propeller einer Domäne stehen senkrecht zueinander und sind durch das Linkerpeptid (P232 bis T253) verbunden.<sup>1,515</sup> Das Propeller-Faltungsmotiv ist so beispiellos, dass es bei Auftreten in anderen Proteinen als Hämopexinartige Domäne (englisch: *hemopexin-like domain*) bezeichnet wird.<sup>502</sup> Dieses Motiv ist in Matrix-Metalloproteinasen (MMP), wie den Collagenasen oder Gelatinasen, in Vitronectin und Produkten des Proteoglycan-4-Gens zu finden.<sup>502,524,525</sup> Die Funktion dieser Domäne ist vielfältig, sie dient der Aktivierung oder Inhibition der Proteinaktivität, der Dimerisierung oder Ligandenbindung, der Substratspaltung oder der Endocytose.<sup>502</sup> Die Endocytose mancher der Proteine mit Hämopexinartigen Domänen, wie der Gelatinasen, verläuft über den selben Rezeptor, über den auch der Häm-Hämopexin-Komplex internalisiert wird, den Multiligandrezeptor LRP1/CD91.<sup>502,526</sup> Ein Propeller besteht aus vier antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern, die sich um eine imaginäre Achse drehen, so dass das erste und vierte Blatt nebeneinanderliegen und durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind.<sup>523</sup> Ein Propeller hat einen Durchmesser von 40 Å und eine Breite von 25 Å.<sup>523</sup> Insgesamt sind sechs Disulfidbrücken innerhalb von Hämopexin zu finden (C50  $\rightarrow$  C231; C149  $\rightarrow$  C154; C188  $\rightarrow$  C200; C257  $\rightarrow$  C460; C366  $\rightarrow$  C408; C418  $\rightarrow$  C435).<sup>515</sup> In der Propellermitte, auf der imaginären Achse, befindet sich orthogonal zu den Propellerblättern ein Tunnel, der aufgrund der gekrümmten Form der  $\beta$ -Faltblätter (N-terminaler Teil ist enger, C-terminaler Teil ist weiter) leicht trichterförmig verläuft.<sup>523</sup> Der Tunnel ist so konzipiert, dass immer jeweils die Carbonylgruppen und die Amidgruppen der  $\beta$ -Faltblätter in der Tunnelmitte aufeinandertreffen. Diese Zusammenstellung ermöglicht eine Bindung von Kationen und Anionen.<sup>523</sup> Am N-terminalen Ausgang des Tunnels sind auf einer Seite drei saure Aspartatreste positioniert, die als Kationenfänger ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) dienen könnten.<sup>523</sup>

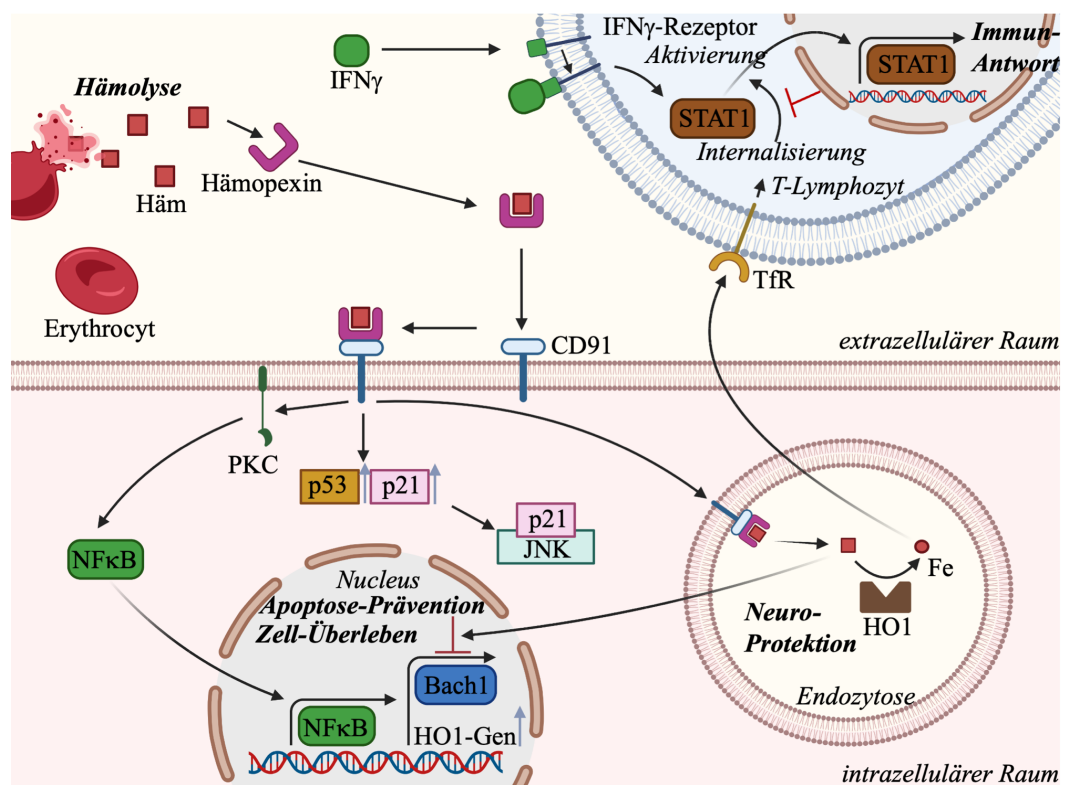


**Abbildung 9** Charakteristische Sekundärstrukturelemente in Hämopexin. Links: Topologiediagramm der Propellerdomäne, modifiziert nach Faber et al.<sup>523</sup> Die  $\alpha$ -Helices sind in grau, die antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter in lila. Der N-Terminus ist mit N, der C-Terminus mit C betitelt. Das erste und vierte der vier Propellerblätter (I bis IV) sind über eine intramolekulare Disulfidbrücke verknüpft. Rechts: 1,8 Å aufgelöste Röntgenkristallstruktur der C-terminalen Domäne von Kaninchen-Hämopexin (PDB: 1HYN).<sup>523</sup> Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54, UCSF Chimera, Version 1.15. und www.BioRender.com.

Hämopexin wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, aber auch im peripheren Nervensystem, sowie der neuralen Retina, den Skelettmuskeln und der Niere ist eine Hämopexin-Biosyntheseaktivität zu finden.<sup>527–529</sup> Hämopexin wird zu den Akut-Phase-Proteinen gezählt, dessen Expression durch Cytokine wie IL1 und IL6 und TNF $\alpha$  reguliert wird.<sup>530</sup> Dies konnte am Beispiel von murinen Nerven bei der axonalen Degeneration und Regeneration gezeigt werden. Die Expression von Hämopexin wird bei der Degeneration des Nervs spezifisch bis auf das siebenfache, verglichen mit der Expression eines intakten Nervs, hochreguliert, sowohl auf Höhe der mRNA-, als auch auf Proteinebene. Die Hämopexinexpression reduziert sich wieder bis auf ein Normalniveau, sobald der Nerv sich regeneriert, was für eine protektive Rolle von Hämopexin spricht.<sup>531</sup> Im pathologischen Fall von Hämolyse, wenn die Hämbindungskapazität der Hämfänger überstiegen wird, nimmt die Hämopexinkonzentration im Plasma akut ab, da der Häm-Hämopexin-Komplex in Zellen internalisiert wird.<sup>495,532</sup> Reduzierte Hämopexinkonzentrationen sind zudem mit hohen Konzentrationen an Lipoprotein-Oxidationsprodukten in hämolytischen Funktionsstörungen assoziiert.<sup>533</sup> Interessanterweise wird Hämopexin während der Akut-Phase-Antwort zwar bei Mäusen induziert, aber nicht im Menschen, was auf evolutionäre Unterschiede zwischen den Promotoren des Hämopexingens bei Nagetieren und Menschen hindeuten könnte,<sup>534</sup> und in Frage stellt, ob es sich bei Hämopexin



wirklich um ein Akut-Phase-Protein im klassischen Sinne handelt. Dieser artspezifische Unterschied in der Regulierung des Gens korreliert mit den Erkenntnissen von Lin et al. 2015, dass Hämopexin bei Mäusen während der Sepsis hochreguliert, beim Menschen jedoch herunterreguliert wird.<sup>535</sup> Vollständig geklärt ist diese Beobachtung bisher jedoch nicht. Mehrere Studien sprechen für eine Involvierung des Häm-Hämopexin-Komplexes in diverse Signalwege zur Apoptoseprävention, dem Zellüberleben, der Neuroprotektion und der Immunantwort.<sup>21</sup> Eine Übersicht ist Abbildung 10 zu entnehmen, eine Erklärung folgt im weiteren Text.



**Abbildung 10** Modell zur Erklärung wie der Häm-Hämopexin verschiedene regulatorische Funktionen, wie der Apoptoseprävention, dem Zellüberleben, der Neuroprotektion und der Immunantwort ausüben könnte. Modifiziert nach Tolosano et al. 2010.<sup>21</sup> Erklärungen und Abkürzungen sind dem Fließtext zu entnehmen. Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und www.BioRender.com.

In einem Mausmodell zur cerebralen Ischämie und ischämischem Schlaganfall bewirkt die Gabe von Hämopexin die Reduktionen des Infarktolumens und Verletzungen der Blut-Hirn-Schranke, sowie verbesserte neurologische Funktionen und einen Schutz der synaptischen Plastizität.<sup>536,537</sup> Es wird vermutet, dass eine neuroprotektive Funktion von Hämopexin über HO1 vermittelt wird.<sup>537</sup> In einem Zellversuch reguliert der internalisierte Häm-Hämopexin-Komplex die HO1 Expression in Monocyten und Makrophagen, sowie

die von Ferritin, Metallothionein 1 (MT1), Transferrin und dessen Rezeptor.<sup>495,538–540</sup> Die molekulare Ursache für dieses Phänomen ist bislang nicht vollständig bekannt, es wird jedoch diskutiert, dass Hämopexin in der Zelle nach Internalisierung im Komplex mit Häm das Häm entlässt und dieses an den Transkriptionsrepressor Bach1 bindet und diesen inhibiert.<sup>538</sup> Bach1 ist ein Repressor für viele Gene, wie das der HO1, die dem Körper als Antwort auf oxidativen Stress dienen.<sup>541–543</sup> Das von Hämopexin gelieferte Häm bindet an die C-terminale Region des Bach1 über zwei Cystein-Prolin (CP)-Reste und veranlasst den Ausschluss von Bach1 aus dem Zellkern und die Ubiquitylierung mit anschließendem Abbau.<sup>541,542,544</sup> Der Häm-Hämopexin-Komplex könnte außerdem eine regulatorische Funktion im Immunsystem wahrnehmen. In einem CD4<sup>+</sup>-T-Lymphocytenzellmodell aus Hämopexin-*Knockout*-Mäusen zeigen die Zellen nach Quecksilber-induzierter Autoimmunität eine abgestumpfte Reaktion auf Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), einem immun-stimulierenden Cytokin.<sup>545</sup> Grund dafür könnte sein, dass der Eisengehalt in den T-Lymphocyten, Transferrinrezeptor (TfR)-vermittelt über den IFN $\gamma$ / STAT1-Signalweg, die Empfindlichkeit gegenüber IFN $\gamma$  reguliert.<sup>546</sup> Je mehr Eisen aufgenommen wird, desto mehr IFN $\gamma$ -Rezeptoren auf der T-Lymphocytenoberfläche werden internalisiert und desto weniger reagiert die Zelle auf den Stimulus von IFN $\gamma$ . Diese Theorie wird in einer Studie bestätigt, in der die HO1-Aktivierung, also dem Enzym, das Häm metabolisiert, in Lymphocyten durch Hämderivate eine Unterdrückung von Autoimmunreaktionen auslöst.<sup>547</sup> Hämopexin-*Knockout*-Mäuse selbst produzieren signifikant weniger Autoantikörper und Immunkomplexe verglichen mit Wildtypmäusen, weil bei ihnen das labile Häm erheblich zur intrazellulären Eisenkonzentration beiträgt und die Immunantwort beeinträchtigt. Es ist also möglich, dass Hämopexin die Aktivierung von T-Lymphocyten über die Eisenabgabe aus dem Hämmolekül reguliert.<sup>21</sup> Es hat sich gezeigt, dass abgesehen davon, Häm in die Zelle zu schleusen, der Häm-Hämopexin-Komplex intrazelluläre Signalwege aktivieren könnte, die wichtig für die Zellproliferation und das Überleben sind.<sup>21</sup> Bevor der LRP1/CD91 als Rezeptor für den Komplex entdeckt wurde, zeigten mehrere Studien die Funktion des Häm-Hämopexin-Komplexes als Signalmolekül. Der Komplex stimuliert beispielsweise die Proliferation von T-Lymphocyten eines Blutkrebsmodells (Zelllinie MOLT3), was die Involvierung von Signalwegen für

das Zellwachstum vermuten lässt.<sup>548</sup> Es ist nachgewiesen, dass an einem der von dem Häm-Hämopexin-Komplex stimulierten Signalweg die Proteinkinase C (PKC)-Aktivierung beteiligt ist.<sup>548</sup> In Hepa-Zellen stimuliert der Häm-Hämopexin die Aktivierung der *c-Jun* N-terminale Kinase (JNK), auch Stress-aktivierte Phosphokinase (SAPK) genannt, und die Expression der Proteine p53 und p21, Faktoren die in das Zellüberleben und die Apoptoseprävention involviert sind.<sup>21,549</sup> Darüber hinaus veranlasst der Komplex die Translokation von NFκB aus dem Zellkern.<sup>549</sup> Auf dem Gen der HO1 wurden Bindungsstellen für NFκB gefunden, was nahelegt, dass die Expression von HO1 vom Häm-Hämopexin-Komplex induziert wird.<sup>400</sup> Weiterhin hat der Rezeptor für den Häm-Hämopexin-Komplex aufgrund seiner Funktion als Multiligandrezeptor mithilfe von verschiedenen Liganden eine zelluläre Signalwirkung: Beispielsweise bindet der gewebespezifische Plasminogenaktivator an LRP1/CD91 und veranlasst die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase 1 (MAPK1) und der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK1/2) und so die Induktion der Expression von MMP9, einem Enzym zum Abbau der extrazellulären Matrix.<sup>550</sup> Es ist zu spekulieren, dass auch der Häm-Hämopexin-Komplex einen vergleichbaren Signalwirkung über den LRP1/CD91-Rezeptor ausübt.<sup>21</sup>

Apo-Hämopexin selbst könnte antiinflammatorisch Eigenschaften haben, denn es reduziert *in vitro* die LPS-induzierte Hochregulation der proinflammatorischen Chemokine IL6 und TNFα.<sup>551</sup> Die Ergebnisse dieses Experiments werden jedoch kontrovers diskutiert, da nicht bewiesen ist, ob es sich bei dem aktiven Agens in diesem Versuch wirklich um natives Hämopexin handelt.<sup>517</sup> In einer Studie mit wiederbelebten Mäusen nach hämorrhagischem Schock verursachte die Gabe von 7,5 mg Hämopexin jedoch die Reduktion von IL6-Expression.<sup>552</sup> Auch der antiinflammatorische Effekt von Hämopexin durch Verhinderung der Interaktion von Hämoglobin-Hp in LDL gilt als noch nicht vollständig bewiesen. Hämoglobin induziert die oxidative Modifikation von LDL, ausschlaggebend für das Auslösen einer Arteriosklerose. Hämopexin inhibiert diesen Effekt.<sup>432</sup> Eine bisher nicht bewiesene Erklärung hierzu ist die Bildung eines Komplexes von Hämopexin, Hp und Hämoglobin, weitere Beweise für die antiinflammatorische Rolle von Hämopexin sind hierzu aber noch von Nöten.<sup>517,553,554</sup> Dass Hämopexin wichtig für den Schutz vor Hämolyse ist, ist

jedoch unangefochten.<sup>21,27,34</sup> Dies zeigt sich auch in einem Experiment an Hämopexin-*Knockout*-Mäusen, die 1999 im Labor von E. Tolosano erschaffen wurden.<sup>555</sup> Diese Mäuse erholen sich nach einer künstlich induzierten Hämolyse (Gabe von 20 mM Häm) weniger schnell als Wildtypmäuse und tragen zum Teil schwere Nieren- und Leberschäden davon. Sie zeigen erhöhte Konzentrationen an ROS in den Blutgefäßen, erhöhte Endothelaktivierung, sowie Entzündungen und eine geringere Stickstoffmonoxidverfügbarkeit. Außerdem akkumuliert Häm im gesamten Organismus der Mäuse, und der Häm-katabolismus in der Niere sowie die Hämexkretion in der Blase sind gestört.<sup>374,556</sup> Nur eine Induktion der HO1-Expression, bevor die Hämolyse herbeigeführt wird, verhindert in diesem Mausmodell einen Schaden der Leber, was die protektive Funktion von Hämopexin als Induktor der HO1-Expression und als Hämfänger in hämolytischen Zuständen unterstreicht.<sup>555</sup> Über die Jahre wurden Hämopexin neben der protektiven Rolle als Hämfänger diverse Enzymaktivitäten zugeordnet. Hier ist zunächst die mögliche Hyaluronidaseaktivität zu nennen. Diese Eigenschaft wurde aufgrund eines Identitätsvergleichs von porcinem Hämopexin und porciner Hyaluronidase vorausgesagt und spricht aufgrund der Ähnlichkeit dem Hämopexin die Funktion zu, Glycosaminoglycan-Hyaluronsäuren mit hohem Molekulargewicht hydrolytisch spalten zu können.<sup>557</sup> Diese Entdeckung wird jedoch angezweifelt, da durch elektrophoretische Untersuchungen eine Verunreinigung der in diesem Versuch verwendeten Hämopexinpräparate nachgewiesen werden konnte. Dennoch konnte eine Bindung von Hyaluronsäure und sauberem Hämopexin in einem Agarosegel nachgewiesen werden, nicht jedoch in Lösung.<sup>517,558</sup> Auch ein mögliches C-terminal liegendes Bindungsmotiv auf Hämopexin wurde hierzu identifiziert.<sup>517,559</sup> Eine weitere mögliche Enzymaktivität ist die Serinproteaseaktivität. Eine Verabreichung einer Proteinfraction aus Plasma von PatientInnen mit *Minimal Change* Glomeronephritis (MCNS) konnte in Ratten die Gefäßpermeabilität und in den Nieren der Nager die Proteinurie und Fusion von epithelialen Fußfortsätzen erhöhen.<sup>560–562</sup> Auf Basis dieser Studie wurde weiterhin schlussgefolgert, dass Hämopexin aufgrund der Proteaseaktivität eine Reorganisation von Aktinfasern verursacht.<sup>563</sup> Diese Befunde werden kontrovers diskutiert, da die Anwesenheit von Hämopexin in der Proteinfraction angezweifelt, die Reinheit der Proteinfraction und die Proteinkontrollen in Frage gestellt werden.<sup>517</sup> Des Weiteren wird Hämopexin eine suppressive Wirkung auf Nekrose,

also der eines Nekrose unterdrückenden Faktors zugeordnet.<sup>564</sup> Dieser Fund resultiert aus einem Experiment, in dem die Zugabe von Hämopexin den Tod von Granulocyten (engl. *polymorphonuclear leukocytes* (PMNs)) aufhielt, dessen Einleitung vorher durch den Protein-Kinase C-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) hervorgerufen wurde.<sup>564</sup> Da das Hämopexin aus Plasma aufgereinigt wurde, und sowohl Apo-Hämopexin und der Häm-Hämopexin-Komplex vorliegen, kann Hämopexin diese Fähigkeit auf dem Stand dieses Experiments nicht ausschließlich zugesprochen werden.<sup>517</sup> Eine Hypothese ist, dass Hämopexin recycelt wird und erneut als Apo-Hämopexin ins Medium abgegeben wird. Damit käme die Nekroseunterdrückung als Konsequenz durch das Entfernen von toxischem, labilem Häm aus der Umgebung.<sup>517</sup> Von derselben Gruppe, die die Nekrose unterdrückende Wirkung von Hämopexin untersucht hat (*vide supra*) wird beschrieben, dass Hämopexin und der Häm-Hämopexin-Komplex eine inhibierende Wirkung auf die Adhäsion von mit PMA-behandelten Granulocyten an Fibrinogenbeschichteten Oberflächen haben und dass sich dieser Effekt verliert, wenn der Versuch in Serum durchgeführt wird.<sup>565</sup> Für den inhibierenden Effekt wird vorgeschlagen, dass Hämopexin Metallionen aus der Lösung bindet, die für die Adhäsion anwesend sein müssen.<sup>565</sup> Eine andere mögliche Theorie ist die direkte Bindung von Hämopexin an die Granulocyten. Ein monoklonaler Antikörper mit dem Namen JEN14 inhibierte in einem Experiment die Interaktion des Häm-Hämopexin-Komplexes mit zellständigen Rezeptoren.<sup>477</sup> Das Epitop zu dem Paratop von JEN14 (Reste A145 bis R165), das auf der N-terminalen Domäne von Hämopexin liegt, wurde daraufhin JEN14-Epitop genannt.<sup>35,477</sup> Innerhalb des JEN14-Epitops befindet sich ein Sequenzmotiv (R150, G151, E151), das ähnlich zu Sequenzen auf Viren, im Fibrinogen und Fibronectin zu finden ist und dort für die Interaktion der Proteine bzw. Viren mit Zelloberflächenrezeptoren verantwortlich sein könnte.<sup>566-568</sup> Über dieses Motiv könnte Hämopexin mit den Granulocyten interagieren und eine Interaktion der Zellen mit der Fibrinogenbeschichteten Oberfläche verhindern.<sup>517</sup> Ein möglicher Rezeptor hierfür ist auf Granulocytenoberflächen bereits gefunden worden.<sup>569</sup> Bei dem umgekehrten Effekt im Serum wird angenommen, dass Hämopexin neben Metallionen einen Adhäsionsfördernden Faktor binden muss. Es wird vorhergesagt, dass die Bindung dieses Faktors über die Propellerdomäne verlaufen könnte.<sup>565</sup> Eine einfachere Erklärung für den ausbleibenden Adhäsionshemmenden Effekt von Hämopexin in

Serum ist jedoch, dass die Fülle der im Serum vorhandenen Elektrolyte und Proteine um Bindungsstellen auf der beschichteten Oberfläche konkurrieren, und nicht nur Granulocyten binden.<sup>517</sup> Darüber hinaus belegen zwei unabhängige klinische Studien, dass niedrige Hämopexinserumspiegel bei der Diagnose mit einem hohen Morbiditätsrisiko bei klinischer Sepsis verbunden sind.<sup>570,571</sup> Auch bei Sichelzellanämie sind die Hämopexinserumspiegel erniedrigt und mit einer Erschwerung der Symptome wie akute Nierenschäden, Gefäßverschlüsse, ischämische Schlaganfälle, Schmerzkrisen und Lungenhochdruck bei den PatientInnen verknüpft.<sup>409</sup> Eine Studie zeigt, dass Hämopexin in Lipoprotein-*Knockout*-Mäusen, einem Mausmodell für Arteriosklerose die Bildung der Krankheit unterbindet, da bei Hämopexinmangel signifikant mehr freies Häm, ROS und entzündungsförderndes HDL im Blutkreislauf, sowie erhöhter arteriosklerotischen Plaque am Aortensinus, einer Öffnung der aufsteigenden Aortenwurzel, im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden wurde.<sup>572</sup> Neuere Publikationen schließen eine Involvierung von Häm und Hämoproteinen wie Hämopexin als entscheidende Akteure bei verschiedenen Aspekten des Tumorstadiums und Tumorentwicklung bei Krebs nicht aus.<sup>573</sup> Es hat sich gezeigt, dass Häm Darmkrebs fördern kann und in verschiedenen Krebsarten eine verstärkte endogene Hämbiosynthese stattfindet.<sup>574</sup> Dies ist eine Strategie der Tumorzellen, um den Fluss des Citratzyklus und folglich die Rate der oxidativen Phosphorylierung zu senken und damit den oxidativen Stoffwechsel einzuschränken.<sup>575</sup> Häm könnte möglicherweise als Signalmolekül für die Krebszellen dienen, um die Mikroumgebung in Richtung eines für sie günstigen Umfelds zu gestalten. In KrebspatientInnen, vor allem in hochinvasiven Krebsarten und in Metastasen sind hohe Hämopexinplasmakonzentrationen zu finden.<sup>573,576,577</sup> Der Grund für diese Hochregulierung von Hämopexin ist unbekannt, aber eine Schlussfolgerung könnte sein, dass hohe Hämopexinwerte das Fortschreiten von Krebs fördern könnten, oder aber dass Hämopexin als Tumorrepressor fungiert und versucht Häm aus der Zirkulation zu entfernen.<sup>573,576</sup> Diese Annahmen sind jedoch spekulativ und müssen in zukünftigen Experimenten bewiesen werden.

### 2.5.2 Interaktion von Häm und Hämopexin

Nicht nur die verschiedenen Funktionen und Eigenschaften von Hämopexin werden kontrovers diskutiert, auch die Bindung von Häm und Hämopexin ist seit der Mitte des letzten Jahrhunderts umstritten.<sup>1,36,474,481,517</sup> Die Kapazität von Hämopexin für Häm beträgt im Serum rund 17  $\mu\text{M}$ .<sup>333</sup> Die erste dokumentierte Interaktion von Häm und humanem Hämopexin wurde 1964 in einer spektrophotometrischen Titration untersucht und mit einer Stöchiometrie von 1:1 (Häm:Hämopexin) charakterisiert.<sup>578</sup> Häm bildet mit Hämopexin einen *low spin*-Komplex, bei dem das Eisenion mit Proteinresten von Hämopexin interagiert. Das Absorptionsmaximum der Soret-Bande verschiebt sich bei Interaktion zu höheren Wellenlängen.<sup>579</sup> Bereits 1964 wurde sich mit der relativen Affinität von Häm zu Plasmaproteinen beschäftigt, da ein Hämtransferexperiment von humanem Hämopexin zu HSA keine Übergabe zeigte und daraus geschlossen wurde, dass Hämopexin im Vergleich zu HSA eine höhere Affinität besitzen muss.<sup>578</sup> Im Zuge der bedeutsamen Arbeit von W. Morgan und U. Müller-Eberhardt an Hämopexin wurde 1972 die Komplexbildung von Hämopexin aus Kaninchenserum und Häm bezüglich der Dissoziationskonstante und der Stöchiometrie mittels Absorptionsspektrophotometrie untersucht.<sup>473</sup> Neben Häm (Eisen-Protoporphyrin IX) wurden Derivate mit anderen Metallliganden (Cobalt und Nickel), sowie Derivate mit Substitutionen am Porphyrinring untersucht. Dabei scheint die Affinität von Hämopexin im relativen Vergleich bei Ligandaustausch stärker abzunehmen als bei Ringsubstitutionen, Hämopexin bindet die Hämderivate dennoch. Die Stöchiometrie der Interaktion von Häm und Hämopexin wurde mit 1:1 bewertet und eine Affinität von  $K_D = 8 \text{ nM}$  wurde bestimmt.<sup>473</sup> Verglichen mit anderen Hämfängern ist diese Affinität bereits sehr hoch (vgl. Tabelle 3). Hrkal et al. publizierten zwei Jahre später, 1974, eine weitere und um mehrere Dimensionen kleinere Dissoziationskonstante für den Häm-Hämopexin-Komplex von  $K_D \approx 5,3 \text{ fM}$ , die häufig mit  $K_D < 1 \text{ pM}$  zitiert wird und die höchste bisher bestimmte Affinität eines Hämfängers zu Häm darstellt.<sup>474</sup> Dieser Wert resultiert aus einem Titrationsexperiment, in dem die Hämübergabe von Ferrihämoglobin und isolierten Ketten aus Ferrihämoglobin zu humanem Hämopexin bis zum Einstellen eines Gleichgewichts untersucht wurde.<sup>474</sup> Der Transfer von Häm wird als vierstufiger

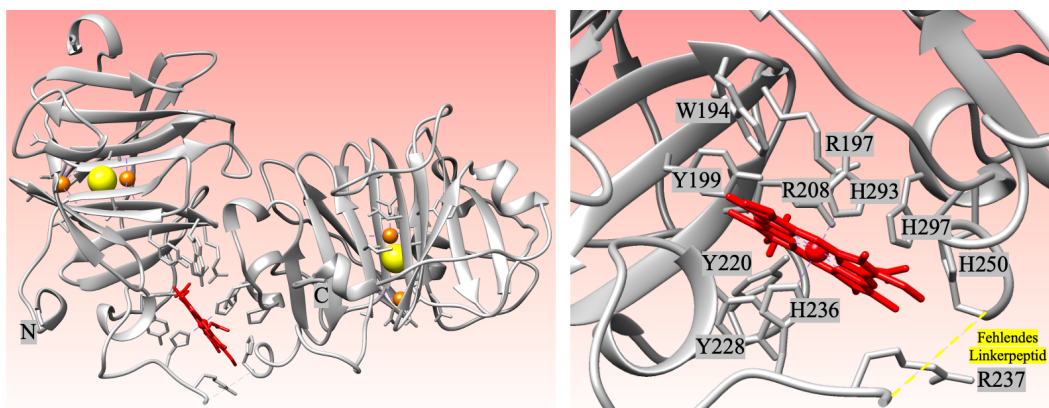
Prozess beschrieben, bei dem die vier Hämoleküle des Hämoglobins sukzessive an je vier Moleküle Hämopexin übergeben werden, die Stöchiometrie beträgt 1:1 (Häm:Hämopexin). Bei den isolierten Ketten erfolgt je ein Hämübertrag, der durch eine einzige Affinitätskonstante von  $K_A = 1,9 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1}$  beschrieben wird, basierend auf der Assoziationskonstante des Hämoglobins mit  $K_A = 1,9 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1}$ .<sup>580</sup> Umgerechnet ergibt dies den bekannten Wert von  $K_D \approx 5,3 \text{ fM}$ .<sup>474</sup> Die AutorInnen erklären die Differenz zu der früher bestimmten Dissoziationskonstante von  $K_D = 8 \text{ nM}$  damit, dass dieser Wert das untere Detektionslimit derer spektroskopischen Methode darstellen könnte.<sup>474</sup> 1999 wurde eine weitere Dissoziationskonstante von  $K_D = 14,7 \text{ pM}$  veröffentlicht, die aus einer Studie resultiert, in der aus Kaninchenserum isoliertes Hämopexin kovalent mit einem 1-Dimethylaminoaphthalen-5-sulfonyl (Dansyl)-Fluorophor markiert wurde und die Kinetik der Hämbindung durch das Eisenion im Hämvermittelten Quenchen der Fluoreszenz spektroskopisch untersucht wurde.<sup>467</sup> Dansyl-Fluorophore binden über ein Sulfonamid an Aminogruppen von Proteinen und Peptiden und fluoreszieren blau-grün.<sup>581</sup> Die Dissoziationskonstanten des Häm-Hämopexin-Komplexes wurden zum einen in heterogenen Organismen bestimmt und zum anderen reichen die erzielten Werte vom femtomolaren bis in den nanomolaren Bereich und unterscheiden sich um mehrere Dimensionen, wobei die letzte Dissoziationskonstante schon vor über 20 Jahren bestimmt wurde.<sup>467</sup> Um die Physiologie von Hämopexin darzulegen ist jedoch neben den bisher erzielten Daten zur Affinität des Komplexes auch ein Verständnis für die exakte Lokalisation der Hämbindungsstellen auf Hämopexin, sowie für der Stöchiometrie notwendig. Die Information darüber variiert indessen in der Vielzahl von Publikationen der letzten 60 Jahre.<sup>1,35,36,480,481</sup> Der Übersicht halber werden im Folgenden die Nummern der Proteinreste auf das humane Hämopexin bezogen. Einen ersten Anlass zur Vermutung einer oberflächenexponierten Position der Hämbindungsstelle auf Hämopexin gab die Tatsache, dass Hämopexin die oxidativen Fähigkeiten von Häm im gebundenen Zustand unterbindet und Hämopexin Häm aus dem Plasma „fängt“.<sup>582,583</sup> Außerdem wurde bereits 1972 eine konformationelle Änderung der Tertiärstruktur nach Hämbindung vorhergesagt und 1974 wurde anhand von Absorptions- und Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektren vorgeschlagen, dass Häm axial über zwei Starkfeldliganden koordiniert werden könnte.<sup>473,515,584,585</sup> 1984 wurde herausgefunden, dass Hämopexin eine hohe Anzahl an Histidinresten



besitzt, die als strenge Starkfeldliganden in Frage kommen.<sup>515</sup> Studien mit chemischen und photochemischen Modifikationen von Hämopexin, anschließender Aminosäureanalyse (ASA) und Edmanabbau belegen, dass Histidinreste für die Hämbindung essentiell sein müssen.<sup>516,582</sup> Ethoxyformylierung und Acetylierung von Holo-Hämopexin und der N-terminalen Domäne von Holo-Hämopexin aus Kaninchenserum führen zur Modifikation aller Histidinreste, bis auf H79 und H150, die laut der AutorInnen durch das gebundene Häm geschützt werden.<sup>35</sup> Es ist hier jedoch nicht klar, ob die Modifikation aufgrund einer konformationellen Änderung nach Hämbindung verhindert wird und diese Reste nicht mehr Oberflächenexponiert vorliegen.<sup>476</sup> Verschiedene Studien belegen, dass sich die Hämbindungsstelle auf der N-terminalen Domäne befinden soll.<sup>35,479,583</sup> H32, H79, H150 und H236 sind die einzigen Histidinreste, die innerhalb mehrerer Spezies (Mensch, Kaninchen, Ratte) konserviert sind und deshalb früh als mögliche Hämbindende Liganden in den Vordergrund rückten.<sup>476</sup> H32 und H236 wurden anhand eines Experiments als Hämliganden mit der N-terminalen Domäne von Hämopexin aus Kaninchenserum (erhalten aus dem Verdau mit Subtilisin, Reste V1 bis H236) von den AutorInnen ausgeschlossen, da sich bei proteolytischer Entfernung dieser Histidine die Fähigkeit von Hämopexin zur Hämbindung, analysiert über Absorptions-Spektroskopie, nicht ändert.<sup>475</sup> In mit Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Sf21-Zellen) exprimierten humanen Hämopexinmutanten (H79→T, H105→T, H150→T) zeigte die H79→T-Mutante ein beinahe identisches <sup>1</sup>H-Kernspinresonanz (NMR)-Spektrum zum exprimierten humanen Wildtyp-Hämopexin, weswegen H79 als möglicher Hämbindender Ligand sowie eine biaxiale Koordination außer Frage gestellt wurde.<sup>36</sup> Dies widerspricht den Ergebnissen von Morgan et al., bei denen H79 vor Modifikation durch Hämbindung geschützt wird.<sup>35</sup> In der 1995 veröffentlichten Röntgenkristallstruktur von der C-terminalen Domäne des deglycosylierten Apo-Hämopexins aus Kaninchenserum (H238 bis H456, erhalten aus Partialverdau mit Plasmin) liegen H79 und H150 nur ca. 17 Å auseinander, weswegen eine Involvierung in die Hämbindung vorgeschlagen wurde.<sup>476,523</sup> In der Mutationsstudie von Satoh et al. zeigten die Mutanten H105→T, H150→T jedoch reduzierte Affinitäten gegenüber dem Wildtyp-Hämopexin und kamen jeweils als Hämliganden in Frage.<sup>36</sup> In einem Experiment mit magnetischer zirkularer Dichroismus (MCD)- und EPR-Spektroskopie wurde eine biaxiale Koordination

von Häm mit Hämopexin und der N-terminalen Domäne von Hämopexin aus Kaninchenserum bestätigt, es wurden Unterschiede in der Hämumgebung von intaktem Hämopexin und der Domäne angemerkt. Noch weitaus interessanter ist die Vorhersage der AutorInnen, dass anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der N-terminalen Domäne die Involvierung von vier bis fünf Histidinresten bei der Hämbindung nahe liegt.<sup>476</sup> Übertragen auf die Stöchiometrie bedeutet dies, dass zunächst biaxial das Häm von zwei Histidinresten koordiniert werden könnte, was eine konformationelle Änderung des Hämopexin auslösen könnte und so zwei weitere Histidinreste zur Bindung eines weiteren Hämoleküls in räumliche Nähe bringen würde.<sup>476</sup> Damit würde die Stöchiometrie für die Bindung von Häm und Hämopexin mindestens 2:1 betragen. Dies wird von der Entdeckung einer anderen Studie unterstützt, dass sich die isolierte C-terminale Domäne von Hämopexin mit der N-terminalen Domäne rekombiniert und deren Konformation ändert. In derselben Studie wird jedoch berichtet, dass die isolierte C-terminale Domäne keine Hämbindungsaktivität besitzt.<sup>477,481</sup> In all diesen Studien gibt es keinen eindeutigen Beweis dafür, dass das Häm im humanen Hämopexin durch zwei Histidine koordiniert wird, oder dass mehr als ein Hämolekül pro Hämopexin bindet. Der Beweis für die Hexakoordination erfolgte bisher zumindest 1999 auf Basis der Röntgenkristallstruktur aus Kaninchenserum erhaltenen Häm-Hämopexin-Komplexes (PDB: 1QHU).<sup>1</sup> In dieser bis auf 2,9 Å aufgelösten Röntgenkristallstruktur koordiniert das Hämopexin Häm an einer sich signifikant von früheren Vorhersagen unterscheidenden Bindungsstelle. Die Koordination erfolgt biaxial, einer der beiden Histidinreste wurde bisher völlig unbeachtet, der andere wurde in einem früheren Proteolyseexperiment als Hämiligand ausgeschlossen.<sup>1,475</sup> Es handelt sich bei den Histidinresten um H236 und H293.<sup>1</sup> Die Bindungstasche, ist ähnlich wie in der Röntgenkristallstruktur der C-terminalen Domäne abgebildet, tunnelartig aufgebaut und mit Ionen ausgekleidet. Am Tunneleingang befindet sich eine Ansammlung saurer Reste.<sup>1,523</sup> Das Hämoleküle bindet zwischen den beiden Propellerdomänen in einer Bindungstasche, die von dem Linkerpeptid (P232 bis T253) ummantelt ist. Die Hämbindungsstelle beinhaltet acht hydrophobe Reste, wovon sieben Reste aromatisch sind. Die Propellerdomänen sind deckungsgleich (die *root mean square deviation* (RMSD)-Werte unterscheiden sich bei 98 C $\alpha$ -Atomen um 1,0 Å), jedoch unterscheiden sich die schleifenartigen Verbindungssequenzen (vgl. Abbildung 9,

schwarz markierte Schleifen) zwischen den antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern signifikant.<sup>1</sup> Diese Schleifen machen etwa die Hälfte des Moleküls aus und bilden die strukturellen Merkmale, die die Hämbindungsstelle ausbilden und die Domänenassoziation vermitteln. H236 liegt auf dem Linkerpeptid (P232 bis T253), H293 liegt auf einer Schleife der C-terminalen Domäne (H254 bis H462). Zusammen mit Häm bilden sie einen stabilen oktaedrischen Komplex, wobei das Eisen im Häm Oxidationszahl +3 besitzt.<sup>1</sup> Diese Lokalisation war zu der Zeit überraschend, da vorige Studien zeigten, dass die N-terminale Domäne mit einer Affinität im nanomolaren Bereich Häm bindet, und die C-terminale Domäne nicht.<sup>479</sup> Stabilisiert werden die Histidinreste H236 und H293 in Hämopexin durch je einen Tryptophanrest, der über  $\pi$ - $\pi$ -stacking mit dem aromatischen Histidinrest interagiert. Die Propionatreste von Häm ragen tief in die Bindungstasche, Arginin und Tyrosinreste umgeben diese (vgl. Abbildung 11).



**Abbildung 11** Röntgenkristallstruktur des Häm-Hämopexin-Komplexes. Links: Röntgenkristallstruktur des gesamten Komplexes aus Häm und des Hämopexinmoleküls (PDB: 1QHU<sup>1</sup>). In orange sind die Natrium-Ionen, in gelb die Chlorid-Ionen markiert. Die Ionen sind in den Tunneln der  $\beta$ -Faltblätter angereichert. N steht für N-terminales Ende, das C für C-terminales Ende der Hämopexinkette. Das Häm (rot) ist von den Histidinresten H236 und H293 hexakoordiniert. Rechts: Darstellung der Hämopexinreste in der Hämbindungsstelle. Die gelbe gestrichelte Linie markiert das fehlende Linkerpeptid. Genauere Informationen sind dem Text zu entnehmen. Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und UCSF Chimera, Version 1.15.

Die hydrophoben Methyl- und Vinylgruppen von Häm sind Solvensexponiert.<sup>1</sup> Auch in dieser Publikation wird geäußert, dass eine weitere Hämbindungsstelle möglich sein könnte. In einem *in silico*-Experiment mit der N-terminalen Domäne der Röntgenkristallstruktur (PDB: 1QHU) wird die Hämbindung in einer Bindungstasche am breiteren Ende des zentralen Tunnels an die Reste H105 und H150 gezeigt.<sup>1</sup> Damit bringen die AutorInnen den Vorschlag auf, dass ein weiteres Molekül an Hämopexin binden könnte, was ein weiteres Indiz für eine Stöchiometrie von 2:1 (Häm:Hämopexin) ist.

Je flexibler eine Proteinkette ist, desto schwieriger kann sie in der Röntgenkristallstruktur abgebildet werden.<sup>586</sup> Im Falle des Häm-Hämopexin-Komplexes aus Kaninchenserum, Sequenz abgebildet in Abbildung 12, sind das Signalpeptid (M1 bis S25), die 23 N-terminalen Aminosäuren (V26 bis V48) nicht abgebildet, genauso wie Teile in der Mitte der Sequenz (E124 bis Y130) und Teile des flexiblen Linkerpeptids (S241 bis Q247), das beim Kaninchen von P234 bis T253 reicht und Teil der Hämbindungstasche sind.<sup>1</sup>

1 N-	MVKASGIPIALGVWGLCWSLATVNSVPLTSAHGNVTEGESGKPEADV	54	■	Signalpeptid
55	GWSFDATTLDDNGTMLFFKDEFVWVKSHRGIRELISERWKNFIGPVDAAFRHGHT	106		
107	SVYLIKGDVWVYTS	162	■	Fehlende Teile in der Röntgenkristallstruktur
163	FFQGNRKWFWDLTGTTKERSWPAVGNCTSAIRWLGRIYCFQGNQFLRFNPVSG	222		
223	EVPPGYPLDVRDYFLSCPGRG	277	■	Linkerpeptid
278	ATYVFGSHYWRDLTNRDGN	337	■	Häm-koordinierende Reste
338	YVFLTKGGYTLVNGYPKRLEKELGSPVVISLEAVDAAFVCPGSSRLHIMAGRRL	397		
398	WWLDLKSQAQATWTELPWPHEKVDGALCMEKPLGPNVSCSTSGPNLYLIHGPNLY	456	■	Häm-koordinierende Reste
457	CYRHVDKLNAAKNLPQQRVSRLLGCTH-C	460		

**Abbildung 12** Sequenz von Hämopexin aus dem Kaninchen mit markierten fehlenden Sequenzen, dem Signalpeptid, dem Linkerpeptid, sowie den Häm-koordinierenden Histidinresten der Röntgenkristallstruktur.<sup>1</sup>

Eine Nitrierung von Hämopexin (human und murin) aus PatientInnen mit inflammatorischen Ereignissen führt zur Modifikation von vier Tyrosinresten (Y199, Y220, Y228, Y341) und einem Tryptophanrest (W117). Drei der vier Tyrosinreste befinden sich in der Hämbindungstasche (Y199, Y220, Y228). Die AutorInnen vermuten, dass Apo-Hämopexin während einer Entzündung in Regionen, die aktivierte RNS- und ROS-erzeugende Immun- und Endothelzellen enthalten, nitriert und oxidiert wird, was möglicherweise die Hämbindung verhindert und die schützende extrazelluläre antioxidative Funktion von Hämopexin beeinträchtigt.<sup>587</sup> Eine neue Publikation aus dem Jahre 2022 beleuchtet neben den bisher vorgeschlagenen H105 und H293 weitere Histidin-Reste. Mit einer Zellulosemembran-assoziierten Peptidsynthese wurden Peptide mit 10 bis 15 Aminosäuren Länge synthetisiert, die so überlappen, dass die gesamte humane Hämopexinsequenz abgedeckt wird. Nach anschließender Inkubation mit Häm und Analyse der peroxidaseartigen Aktivität von Häm, wurden die Histidinreste H373, H400, H429, H462 als besonders aktiv erachtet.<sup>667</sup>

Doch nicht nur die Hämbindung von Hämopexin ist von wissenschaftlichem Interesse, auch die Entlassung von Häm aus Hämopexin ist noch nicht ausreichend verstanden. Mithilfe der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU) wird ein Modell beschrieben, wie man sich die

Entlassung von Häm aus Hämopexin vorstellen könnte. Es ist bewiesen, dass Hämopexin eine konformationelle Änderung nach Hämbindung hin zu einer kompakteren Form erfährt, womit das Linkerpeptid Proteolyseresistent gemacht werden könnte.<sup>1,478,588,589</sup> *In vitro* erfolgt die Hämfreisetzung unterhalb von pH 5,0, vermutlich nach Protonierung eines oder beider Histidinliganden, *in vivo* könnte die Hämfreisetzung nach Bindung an CD91/LRP1 und die Internalisierung in das Zellinnere erfolgen.<sup>1,495,590</sup> Es wird vermutet, dass eine Auflösung der Hämbindungstasche durch Bewegung der Domänen und/oder des Linkerpeptids erfolgt und so zu einer Freisetzung von Häm führt.<sup>1</sup>

2007 wurden mittels Metallionen-Affinitätschromatographie zwei verschiedene nicht ineinander umwandelbare Formen von Hämopexin isoliert und spektroskopisch charakterisiert.<sup>591</sup> Ferne CD-Spektren deuten darauf hin, dass die beiden Isoformen im wesentlichen identische Sekundärstrukturen besitzen, aber ihre unterschiedliche Retention während der Metallionen-Affinitätschromatographie deutet auf leichte Unterschiede in der Exposition der Histidinreste auf der Proteinoberfläche hin. Die AutorInnen vermuten, dass Häm in der einen Form um 180° um die  $\alpha/\gamma$ -meso-Achse gedreht (Propionatreste ragen in die entgegen gesetzte Richtung), orientiert ist, als in der anderen Form, die auch aus der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum bekannt ist.<sup>591</sup> Eine Orientierung von Häm in zwei verschiedene Richtungen ist aus der HO1 bekannt.<sup>592</sup> Dies würde für zwei verschiedene Bindungsmodi von Häm auf Hämopexin sprechen. 2021 wurde die Idee der möglichen Existenz einer zweiten Hämbindungsstelle mithilfe einer spektroskopischen Studie untermauert. Rekombinantes Hämopexin, in eukaryotischen HEK293 Zellen exprimiert, und Hämopexin aus humanem Serum wurde einer CD-spektroskopischen Titration mit Häm unterzogen, wobei für beide Hämopexinvarianten vergleichbare Daten erhalten worden sind.<sup>480</sup> Die Daten zeigen ein induziertes Bisignat-CD-Soret-Bandenmuster, das für Hämopexin bei niedrigen Häm-zu-Protein-Molverhältnissen typisch ist. Bei fortlaufender Titration, über das Verhältnis 1:1 hinaus, hängt das Bandenmuster von der Menge des proteingebundenen Häms in dem Maße ab, als dass das entstehende entgegengesetzte CD-Couplet zu einer vollständigen Umkehrung des beobachteten CD-Musters führt. Die in dieser Studie gewonnenen Daten lassen auf mehr als eine Bindungsstelle auf Hämopexin schließen.<sup>480</sup> Trotz

der detaillierten Information über die Röntgenkristallstruktur über den Häm-Hämopexin-Komplex aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU<sup>1</sup>), liegt bis dato keine humane Röntgenkristallstruktur des humanen Komplexes vor. Es gibt Indizien und widersprüchliche Beobachtungen über die Hämbindungsstellen und die Stöchiometrie auf humanem Hämopexin, eine Bestätigung der Hämbindungsstellen im humanen Hämopexin gibt es bisher nicht, auch nicht bezüglich der Stöchiometrie. Dieses Wissen ist jedoch substanziell für die Aufklärung des Mechanismus des Hämtransports im Plasma, sowie die Freisetzung von Häm aus dem Komplex nach Internalisierung in den Zellen.

### 3. Motivation

Die Motivation dieser Arbeit ist es, einen Beitrag und einen Appell zur Wiederaufnahme der Grundlagenforschung zum humanen Hämopexin zu leisten. Die Forschung an Hämopexin begann mit der Entdeckung im Jahre 1958 durch F. Neale und gewann immer mehr an Bedeutung durch die ausführliche Charakterisierung der Struktur, Funktion und Regulation des Proteins in der Mitte des letzten Jahrhunderts durch die herausragenden Arbeiten von U. Müller-Eberhardt, N. Heimbürger, Z. Hrkal., A. Smith und W. Morgan.<sup>473,474,478,481,497,532,593</sup> Obwohl sich die Wissenschaft an Hämopexin nun schon seit über 60 Jahren stetig weiterentwickelt, ist man sich über die Interaktion von Häm und Hämopexin auf molekularer Ebene und über einige Eigenschaften von Hämopexin, wie die Proteaseaktivität, die Metallbindung und die proinflammatorischen Fähigkeiten immer noch uneinig.<sup>35,36,517,518,557,558,562,594</sup> Das Wissen über die Bindungsstelle von Häm und Hämopexin basiert noch heute auf Vorhersagen<sup>36,473-481</sup>, sowie der lückenhaften Röntgenkristallstruktur eines aus Kaninchenserum gewonnenen Hämopexins aus dem Jahre 1999 (PDB: 1QHU<sup>1</sup>). Die Röntgenkristallstruktur ist nicht ausreichend aufgelöst, um Teile des flexiblen Linkerpeptids zwischen den beiden Hämopexindomänen darzustellen, die als Teil der Hämbindungsstasche dienen.<sup>1</sup> Die Stöchiometrie des Häm-Hämopexin-Komplexes ist nach wie vor ungeklärt, da keine Röntgenkristallstruktur des humanen Hämopexins mit Häm verfügbar ist und mehrere Indizien für eine Stöchiometrie >1:1 (Häm:Hämopexin) vorliegen.<sup>1,480,481</sup> Eine genaue Lokalisation der möglichen multiplen Hämbindungsstellen ist unklar.<sup>35,36,481</sup> Über die Jahre wurden einige Histidinreste in Hämopexin durch diverse Experimente als Hämbindungsstellen vorgeschlagen, bis 1999 Paoli et al. die Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU) veröffentlichten, in der zwei Histidinreste (H236, H293), eine davon (H236) bis

dato überhaupt nicht beachtet, das Häm hexakoordiniert binden.<sup>1,35,36</sup> Einer der beiden Histidinreste, H236, liegt auf dem Linkerpeptid zwischen den beiden Domänen, der andere auf der C-terminalen Domäne, H293.<sup>1</sup> Das Linkerpeptid bildet durch die Konformation von Hämopexin eine Bindungstasche für das Häm aus. Eine zweifelsfreie Identifikation der Hämbindungsstellen auf humanem Hämopexin sowie eine Bestimmung der Stöchiometrie zwischen Häm und Hämopexin fehlt indessen. Hämopexin wird bereits zum jetzigen Zeitpunkt als zukünftiger Wirkstoff gegen diverse hämolytische Ereignisse gehandelt, jedoch ist die molekulare Basis der Hämbindungsstellen und der Stöchiometrie nach wie vor ungeklärt. So zeigt sich die Darreichung von Hämopexin in verschiedenen Mausmodellen als äußerst vielversprechend. Darunter befinden sich Mausmodelle für das Häm-induziertes akutes Thorax-Syndrom (schwere Komplikation der Sichelzellanämie (Eine Dosis, 1 mg pro Maus)), Sichelzellanämie (murines Hämopexingen eingebracht über das *sleeping beauty*-Transposonasesystem), schwere Sepsis (Mehrere Dosen, 50 mg pro kg),  $\beta$ -Thalassämie (0,7 mg pro Maus), Wiederbelebung nach hämorrhagischem Schock (7,5 mg pro Maus), systolische Dysfunktion induziert durch Häm (160 mg pro kg), und Trauma-induzierte Blutung (0,5 mg pro Maus).<sup>374,534,552,571,595-598</sup> In den Mäusen wurden eine geringere Sterblichkeit, eine geringere Expression von proinflammatorischen Cytokinen, reduziertes Organversagen, verminderte Gewebeschäden, sowie reduzierte Hämplasmakonzentrationen beobachtet.<sup>374,534,552,571,595-598</sup> Während es 2014 in einem Review noch hieß „*To date, we are still far from the use of heme scavengers as therapeutics and no clinical trials are ongoing*“<sup>26</sup>, so hat inzwischen das Unternehmen CSL Behring GmbH, das spezialisiert auf Plasmaproducte und deren Anwendung als Biopharmazeutika ist, am 02. November 2020 bekanntgegeben, dass aus humanem Plasma gewonnenes Hämopexin (CSL889) sowohl von der Europäischen Kommission als auch vom *office of orphan products development* der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) den *orphan drug*-Status für die Behandlung der Sichelzellanämie erhalten hat.<sup>599</sup> Seit Mai 2021 bis voraussichtlich Juli 2022 läuft hierzu die erste klinische Studie (*non fungible token* (NFT)-Nummer: NCT04285827) am Menschen in Phase I um die Sicherheit und Verträglichkeit, die Pharmakokinetik, die Pharmakodynamik von CSL889 nach einmaliger intravenöser Verabreichung bei PatientInnen mit Sichelzellanämie zu untersuchen.<sup>600</sup> Die Ergebnisse in den Mausstudien lassen auf einen erfolgreichen



Ausgang der Studie hoffen. Diese Arbeit soll einen Anstoß zum Überdenken der bisherigen Dosisansätze von Hämo­pexin in PatientInnen geben. Gerade für die Anwendung am Menschen ist eine zweifelsfreie Aufklärung der molekularen Gegebenheiten des Häm-Hämo­pexins dringend von Nöten und unumgänglich. Nicht nur die Hämo­pexindosis würde einer Anpassung unterzogen werden, eine Neubestimmte und zweifelsfreie Häm­bindungskapazität würde die Hämo­pexinforschung grundlegend beeinflussen.

## 4. Materialien und Methoden

Die im Folgenden verwendeten Aminosäuren sind L-konfiguriert und die Abkürzungen der Aminosäuren liegen der von der *international union of pure and applied chemistry* (IUPAC) und der *international union of biochemistry and molecular biology* (IUBMB) etablierten IUPAC-IUBMB *joint commission on biochemical nomenclature* (JCBN) und dem *nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology* (NC-IUBMB) zugrunde.<sup>601</sup> Die in den folgenden Tabellen aufgeführten Angaben zu den Herstellern der Chemikalien, Reagenzien und Lösungen beziehen sich auf die im Labor von Prof. Dr. Diana Imhof (Universität Bonn) durchgeführten Experimente. Ein Teil der in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurde in Kooperation mit anderen Laboratorien durchgeführt. Detaillierte Information zu den experimentellen Prozeduren der KooperationspartnerInnen sind Detzel und Schmalohr et al. 2021 und Hopp et al. 2022 zu entnehmen.<sup>602,603</sup>

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien

**Tabelle 4:** Allgemein verwendete Chemikalien.

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Dinatriumhydrogenphosphat-heptahydrat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth

2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumhihydrogenphosphat	Roth
Dinatriumdihydrogenphosphat	Roth
Natronlauge 1 M	AppliChem
Salzsäure 1 M	Merck
Trifluoressigsäure 99%	Solvay

**Tabelle 5:** Verwendete Lösemittel.

<b>Lösemittel</b>	<b>Lieferant</b>
Acetonitril HPLC-Reinheitsgrad	VWR
tert-Butanol	Alfa Aesar
Dichlormethan HPLC-Reinheitsgrad (DCM)	VWR
Diethylether	VWR
N,N-Dimethylformamid technischer und analytischer Reinheitsgrad (DMF)	VWR
Methanol HPLC-Reinheitsgrad	Fisher Scientific
Wasser HPLC-Reinheitsgrad	-

**Tabelle 6:** Verwendete Chemikalien zur Peptidsynthese, -Kopplung und -Abspaltung.

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Acetanhydrid	Fluka
Diisopropylethylamin (DIPEA)	Fluka
1,2-Ethandithiol	Fluka

2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylguanidiniumhexafluorophosphat (HBTU)	Iris Biotech
N-Hydroxybenzotriazol (HOBt)	Iris Biotech
N-Methylmorpholin (NMM)	Sigma Aldrich
N-Methylimidazol	Fluka
Phenol	Merck
Piperidin	Alfa Aesar
Thioanisol	Alfa Aesar
Trifluoressigsäure 99 %	Uvasol
Phenol	Merck

**Tabelle 7:** Verwendete Aminosäurederivate und Harze.

<b>Aminosäurederivat oder Harz</b>	<b>Lieferant</b>
Fmoc-Ala-OH*H <sub>2</sub> O	Orpegen
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Orpegen
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Orpegen
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Orpegen
Fmoc-Cys(Me)-OH	Alfa Aesar
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Orpegen
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Orpegen
Fmoc-Gly-OH	Orpegen
Fmoc-His(Trt)-OH	Orpegen
Fmoc-Ile-OH	Orpegen
Fmoc-Leu-OH	Orpegen
Fmoc-Phe-OH	Orpegen
Fmoc-Pro-OH	Orpegen

Fmoc-Ser(tBu)-OH	Orpegen
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Orpegen
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Orpegen
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Orpegen
Fmoc-Val-OH	Orpegen
Rink-Amid-MBHA-Harz (Beladung 0,53 mmol/g)	Iris Biotech

**Tabelle 8:** Verwendete Chemikalien zur Peptid-Analytik.

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Diammoniumhydrogencitrat	Merck
2',5'-Dihydroxyacetophenon	Fluka
Ethanol	Sigma-Aldrich
Protein-Kalibrierstandard I	Bruker
Puffer A, B, C, D, E, F	Laborservice Onken
Reagenz R	Laborservice Onken
Probenverdünnungspuffer	Laborservice Onken
Trifluoressigsäure 99 %	Uvasol

**Tabelle 9:** Verwendete Proteine und Chemikalien für Interaktionsstudien.

<b>Protein oder Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Hämin	Sigma-Aldrich
Hämin für SPR- und CD-Spektroskopie	Frontier Scientific
Hämopexin aus humanem Plasma	Athens Research

#### 4.1.2 Puffer

Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen.

<b>Puffer und Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Peptidsynthese und analytik</b>	
Reagenz K (Abspaltung)	0,75 g Phenol, 0,25 ml 1,2-Ethanedithiol, 0,5 ml Thioanisol
DHAP-Matrix (Analytik)	7,5 mg DHAP, 375 µl Ethanol, 125 µl Citratpuffer
Citratpuffer (Analytik)	18 mg/ml Diammoniumhydrogencitrat in Wasser
<b>Interaktionsstudien</b>	
Hämstammlösung 1mM	1mM Häm in 30 mM Natronlauge
HEPES Puffer 100 mM, pH 7,0	100 mM HEPES in Wasser
Natriumphosphat-Puffer 0,1 M, pH 7,0	30,5 ml Natriumdihydrogenphosphat 0,2 M + 19,5 ml Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 M + 50 ml Wasser
Natriumphosphat-Puffer 50 mM, pH 7,4	40,5 ml Natriumdihydrogenphosphat 0,2 M + 9,5 ml Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 M + 150 ml Wasser
PBS Puffer pH 7,4	137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat

## 4.2 Methoden

Teile der Peptide (Peptid **1** bis **6**), die in dieser Thesis für Experimente verwendet worden sind, resultieren aus der Synthese im Rahmen meiner Masterarbeit (2019),<sup>604</sup> wobei Peptid **6** im Rahmen dieser Arbeit erneut synthetisiert wurde. Die analytischen Daten der Peptide **1** bis **6** sind im Folgenden der Übersicht halber mit aufgeführt.

### *4.2.1 Synthese des Peptids 7*

#### *4.2.1.1 Manuelle Kopplung der ersten Aminosäure*

Die erste C-terminale Aminosäure Fmoc-Ile (Aminosäurenummer 66) wurde manuell bei Raumtemperatur an 0,517 g des polymeren Trägers Rink-Amid-MBHA-Harz gekoppelt (Beladung 0,53 mmol/g) um die Beladung des Harzes zu begrenzen. Dies hat den Hintergrund, dass die Peptidkette des 66 Aminosäure langen Peptids so lang ist, dass sich die Peptidenden bei der Benutzung eines Harzes mit Beladung von 0,53 mmol/g ohne Vorbehandlung an einer Harzkugel gegenseitig den Zugang zu Reaktanden in der Lösung blockieren würden. So würde es zu Syntheseabbrüchen oder Fehlsynthesen kommen, mit der Konsequenz eines hohen Ausbeuteverlusts. Die Synthese wurde in einer Spritze durchgeführt und das Inkubieren unter Schütteln. Als Kopplungsreagenz wurde HBTU in DMF verwendet und als Base DIPEA in DMF. Zur Verhinderung der Racemisierung und Erhöhung der Ausbeute wurde HOBt zugegeben.<sup>605</sup>

Das Harz wurde zunächst gewaschen, 20 min einer Quellung unterzogen, Fmoc wurde abgespalten und anschließend die erste Aminosäure für 30 min gekoppelt. Das Kopplungsreagenz setzt sich zusammen aus einem Unterschuss der Aminosäure mit 0,5 Äquivalenten Fmoc-Ile-OH, einem Unterschuss von 0,5 Äquivalenten des Guanidinium-Salzes HBTU, einem Unterschuss von 0,5 Äquivalenten HOBt und 1 Äquivalent DIPEA in DMF. Die noch freien Amine auf dem Harz wurden nach der Kopplung durch basische Acetylierung chemisch inert gemacht und das modifizierte Harz mit einem gekoppelten Fmoc-Ile anschließend

gewaschen und getrocknet und einer Beladungsbestimmung unterzogen. Das Syntheseprotokoll ist Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11:** Verwendetes Syntheseprotokoll für die manuelle Peptidsynthese.

<b>Syntheseschritt</b>	<b>Vorgehen</b>
Vorbereitung des Harzes	Trocknen <i>in vacuo</i> über Nacht Inkubation mit 6000 µl DMF Inkubation mit 6000 µl DCM Inkubation mit 3 x 6000 µl DMF
Quellen des Harzes	Inkubation mit 6000 µl DMF
Fmoc-Abspaltung	1 x Inkubation mit 6000 µl 20 % Piperidin in DMF 1 x Inkubation mit 6000 µl 20 % Piperidin in DMF
Waschen	4 x Inkubation mit 6000 µl DMF 3 x Inkubation mit 6000 µl DCM 3 x Inkubation mit 6000 µl DMF
Kopplung von Ile	Inkubation mit einem Kopplungsreagenz zusammengesetzt aus 48,43 mg Fmoc-Ile-OH, 51,98 mg HBTU, 18,52 mg HOBt, 47,74 µl DIPEA und 5000 µl DMF
Waschen	5 x Inkubation mit DMF
Acetylierung	Inkubation mit einer Mischung aus 517,17 µl Acetanhydrid und 1034,34 µl N-Methylimidazol in 1551,51 µl DMF
Waschen	4 x Inkubation mit 6000 µl DMF 3 x Inkubation mit 6000 µl DCM 3 x Inkubation mit 6000 µl DMF 3 x Inkubation mit 6000 µl DCM
Trocknen	Trocknen <i>in vacuo</i> über Nacht



## Beladungsbestimmung

Die Beladung des Harzes wurde über eine Abspaltung der Basen-labilen Fmoc-Schutzgruppe in einem genau definierten Volumen Lösemittel und das entstandene Dibenzofulven-Piperidinaddukt spektroskopisch analysiert.<sup>606</sup> Dazu wurden 20 mg des oben mit Fmoc-Ile beladenen Harzes mit DMF eine Quellung unterzogen und anschließend je 200  $\mu\text{l}$  20 % Piperidin in DMF zur Fmoc-Abspaltung zugegeben. Die Piperidinlösungen wurden in einem Kolben aufgefangen und auf das definierte Volumen von 5 ml mit 20 % Piperidin in DMF aufgefüllt. An einem UV/Vis-Spektrophotometer des Typs *Multiskan GO microplate spectrophotometer* der Firma Thermo Fisher Scientific wurde die Absorption einer 1 zu 10 Verdünnung bei  $\lambda \approx 301 \text{ nm}$  mit 20 % Piperidin in DMF als Leerwert bestimmt. Die Berechnung der Beladung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ( $\epsilon_{301} \sim 7000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).<sup>606</sup> Die Beladung für das Fmoc-Ile-gekoppelte Harz beträgt 0,1534 mmol/g.

### 4.2.1.2 Festphasenpeptidsynthese

Das Fmoc-Ile beladene Harz (Beladung 0,1534 mmol/g), *vide supra*, wurde einer automatisierten Festphasenpeptidsynthese für die Kopplung der weiteren 65 Aminosäuren unterzogen. Dazu wurde das gesamte Harz auf Reaktionsgefäß mit 50 mg pro Reaktionsgefäß aufgeteilt. Die Synthese erfolgte am Automaten *ResPep SL* der Firma Intavis Bioanalytical Instruments unter Verwendung der Fmoc/tert-Butyl-Strategie.<sup>607,608</sup> Das Synthese-Protokoll ist Tabelle 12 zu entnehmen.

**Tabelle 12:** Verwendetes Synthese-Protokoll für die Festphasenpeptidsynthese. Volumina beziehen sich auf 50 mg Harz.

Syntheseschritt	Vorgehen
Vorbereitung des Harzes	Inkubation mit 500 $\mu\text{l}$ DMF 3 x Inkubation mit 400 $\mu\text{l}$ DMF Inkubation mit 400 $\mu\text{l}$ DMF
Trocknen	durch Vakuum
<b>Zyklus pro Aminosäure</b>	

Fmoc-Abspaltung	Inkubation mit 400 µl 20 % Piperidin in DMF Inkubation mit 400 µl 20 % Piperidin in DMF
Waschen	6 x Inkubation mit 500 µl DMF
Aminosäurekopplung	Inkubation mit einem Kopplungsreagenz zusammengesetzt aus 200 µl HBTU/DMF, 50 µl NMM/DMF (1:1), 2 µl DMF, 210 µl Fmoc- Aminosäure in DMF
Waschen	Inkubation mit 500 µl DMF
Aminosäurekopplung	Inkubation mit einem Kopplungsreagenz zusammengesetzt aus 200 µl HBTU/DMF, 50 µl NMM/DMF (1:1), 2 µl DMF, 210 µl Fmoc- Aminosäure in DMF
Waschen	6 x Inkubation mit 500 µl DMF
Trocknen	durch Vakuum
<b>Finaler Zyklus</b>	
Fmoc-Abspaltung	Inkubation mit 400 µl 20 % Piperidin in DMF Inkubation mit 400 µl 20 % Piperidin in DMF Inkubation mit 400 µl 20 % Piperidin in DMF
Waschen	2 x Inkubation mit 600 µl DMF 6 x Inkubation mit 500 µl DMF 3 x Inkubation mit 600 µl DCM
Trocknen	durch Vakuum
Trocknen	Trocknen <i>in vacuo</i> über Nacht

Diese Synthese wurde auf zwei Teilsynthesen aufgeteilt und die Aminosäurekonzentration wurde aufgrund der geringen Beladung des Harzes auf 0,2 M reduziert. Für die Synthese wurde das *in vacuo* getrocknete in Kapitel 4.2.1.1 näher erläuterte mit Fmoc-Ile beladene Harz (Beladung 0,1534 mmol/g) verwendet. Die Aminosäurederivate wurden in DMF (0,2 M) gelöst. Die Fmoc-Schutzgruppen

wurden mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten. HBTU in DMF (0,2 M) diente als Kopplungsreagenz und NMM/DMF (1:1) als Base. Ab dem 15. Kopplungszyklus wurden die Kopplungszeiten verlängert. Die Zweiteilung der Synthese, sowie die Verlängerung der Kopplungszeiten ab dem 15. Zyklus hat den Grund, dass der Massezuwachs pro Harzkugel bei 65 Aminosäuren so groß ist, dass er das empfohlene Harzgewicht von ca. 50 mg pro Reaktionsgefäß weitaus überschreiten würde. Die erste Synthese erfolgte für die Kopplung von Aminosäure-Nr. 65 bis Nr. 34, die zweite Synthese für die Kopplung von Aminosäurenummer 33 bis -nr. 1. Nach der ersten Synthese wurde das mit Peptid beladene Harz getrocknet, vereinigt und erneut auf Reaktionsgefäße mit 50 mg pro Reaktionsgefäß aufgeteilt. Nach der Synthese wurde das mit Peptid beladene Harz *in vacuo* getrocknet.

#### 4.2.1.2 Abspaltung

Das Peptid und die Seitenkettenschutzgruppen wurden mithilfe von 95 % TFA in Wasser und 150 µl pro 100 mg Harz Reagenz K vom getrockneten Trägerharz abgespalten. Die Zugabe erfolgte auf Eis, anschließend wurde drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Peptid in kaltem Diethylether gefällt. Nach dreimaligem Waschen des Rohpeptids mit kaltem Diethylether wurde es in 80 % tert-Butanol in Wasser gelöst und anschließend *in vacuo* getrocknet. Das Peptid liegt am C-Terminus amidiert vor.

#### 4.2.2 Reinheits- und Identitätsanalysen

##### 4.2.2.1 präparative HPLC

Die Aufbereitung des Rohpeptids erfolgte mittels präparativer HPLC auf dem Gerät LC 8A der Firma Shimadzu, das mit einer Säule des Typs *C18-Reversed-Phase-Eurospher-100* (250\*32 mm, 5 µm Korngröße, 100 Å Porengröße) der Firma Knauer bestückt war. Für die Peptidelution wurden die Bedingungen, abgebildet in Tabelle 13, genutzt und das Eluat fraktioniert aufgefangen.

**Tabelle 13:** Bedingungen der Reinigung des Peptids mittels präparativer RP-HPLC.

<b>Parameter</b>	<b>Bedingungen</b>
Eluent A	0,1 % TFA in Wasser
Eluent B	0,1 % TFA in 90 % Acetonitril in Wasser
Gradient	0 bis 50 % Eluent B in 120 min
Injektionsvolumen	3,6 ml
Flussrate	10 ml pro min
Detektion	220 nm

#### 4.2.2.2 analytische HPLC

Die Reinheit der Peptidfraktionen aus Kapitel 4.2.2.1 wurde mittels analytischer RP-HPLC bestimmt. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14:** Bedingungen der chromatographischen Trennung mittels RP-HPLC.

<b>Parameter</b>	<b>Bedingungen</b>
Eluent A	0,1 % TFA in Wasser
Eluent B	0,1 % TFA in Acetonitril
Gradient	0 bis 60 % Eluent B in 60 min
Injektionsvolumen	0,1 ml
Flussrate	1 ml pro min
Detektion	220 nm

Die analytische HPLC entspricht dem Typ LC10AT der Firma Shimadzu, die verwendet Säulenbezeichnung lautet Vydac 218TP54 (C18-Reversed-Phase, 250\*4,6 mm, 5 µm Korngröße, 300 Å Porengröße). Die reinen Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht *in vacuo* getrocknet.

#### 4.2.2.3 Aminosäure-Analyse

Der Peptidgehalt des reinen Peptids wurde durch ASA bestimmt. Dazu wurde das Peptid mit 6 N HCl bei 110 °C für 24 h hydrolysiert, eingedampft und die Aminosäuren anschließend in Probenverdünnungspuffer (Laborservice Onken) gelöst. Nach chromatographischer Trennung der Aminosäuren mit einer Kationenaustauschersäule (*CK10M*, Partikelgröße 4 µm, Vernetzung 10 %) der Firma Mitsubishi Chemical Corporation mit einem *Eppendorf-Biotronik Amino Acid Analyzer LC 3000* der Firma Eppendorf bestimmt. Nach der chromatographischen Trennung erfolgte die Derivatisierung der einzelnen Aminosäuren mit Ninhydrin (Reagenz R, Laborservice Onken). Diese wurden bei  $\lambda \approx 440$  nm und  $\lambda \approx 570$  nm detektiert und im Vergleich zu einem Aminosäurestandard (Laborservice Onken) ausgewertet. Daraus wurde der Peptidgehalt berechnet.

#### 4.2.2.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Analyse der molaren Massen des Peptids erfolgte über MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Als Matrix diente für das Peptid DHAP. Dazu wurde frisch hergestellte DHAP-Matrix im Ultraschallbad behandelt. 2 µl des in Wasser angelösten Peptids wurden mit 2 µl 2 % TFA in Wasser gemischt. Die Zugabe von 2 µl DHAP-Matrix startete die Kristallisation und 2 µl der Suspension wurde auf den Probenträger überführt. Die Messung erfolgte an einem MALDI-TOF-Spektrometer des Typs UltrafleXtreme TOF/TOF der Firma Bruker Daltonics. Als Standard wurde der Protein-Kalibrierstandard I (Bruker) verwendet, der zur Kalibrierung des Geräts für Peptide und Proteine von 4000 kDa bis 20000 kDa dient.

Tabelle 15: Analytische Daten der in dieser Arbeit verwendeten Peptide.

Peptid	Sequenz	Masse (g*mol <sup>-1</sup> )	Retentionszeit (min)	Peptidgehalt (%)
Peptid <b>1*</b>	H-VWKS <b>H</b> KWDR-NH <sub>2</sub>	1240,72	24,91	65,0
Peptid <b>2*</b>	H-FRQ <b>G</b> HNSVF-NH <sub>2</sub>	1090,63	25,53	69,0
Peptid <b>3*</b>	H-PGR <b>G</b> H <b>G</b> HRN-NH <sub>2</sub>	985,46	12,67	66,4
Peptid <b>4*</b>	H-R <b>G</b> H <b>G</b> HRNGT-NH <sub>2</sub>	990,55	11,78	65,5
Peptid <b>5*</b>	H-RCSP <b>H</b> LVLS-NH <sub>2</sub>	1024,57	27,70	65,9
Peptid <b>6*</b>	H-RDG <b>W</b> HSWPI-NH <sub>2</sub>	1152,63	33,13	66,8
Peptid <b>7</b>	H-PGR <b>G</b> H <b>G</b> HRNGTG HGNSTHHGPEYMRC SP <b>H</b> LVLSALTSDNH GATYA FSGTHYWRL DTSRD <b>G</b> W <b>H</b> SWPI- NH <sub>2</sub>	7341,39	41,65	79,9

\*Die analytischen Daten dieser Peptide resultieren aus meiner Masterarbeit.<sup>604</sup>

### 4.2.3 Bindungsanalysen

#### 4.2.3.1 UV/Vis-Spektroskopie

##### 4.2.3.1.1 Hämaffinitätsstudie

Die Affinität des Peptids **7** zu Häm wurde anhand eines bereits etablierten Protokolls mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.<sup>609</sup> Es wurde ein UV/Vis-Spektrophotometer des Typs *Multiskan GO microplate spectrophotometer* der

Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Hämstammlösung mit einer Konzentration von 1 mM, *vide supra*, wurde 30 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert, die Hämkonzentration anhand eines Extinktionskoeffizienten von 32,482 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> ( $\lambda \approx 398$  nm in HEPES)<sup>610</sup> normalisiert und anschließend mit HEPES-Puffer (100 mM, pH 7,0) auf 100  $\mu$ M verdünnt. Das Peptid wurde mit HEPES-Puffer gelöst und auf eine Konzentration von 0,5 mM gebracht, die als Peptidstammlösung diente (finale Konzentration in der Küvette 10  $\mu$ M).

**Tabelle 16:** Pipettier-Schema für die Häminteraktionsstudie.

<b>Küvette</b>	<b>Hämkonzentration (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Hämlösung 100 <math>\mu</math>M (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Peptidstammlösung (<math>\mu</math>l)</b>	<b>HEPES- Puffer (<math>\mu</math>l)</b>
1	0	0	0	1000
2	0	0	20	980
3	0,4	4	0	996
4	0,4	4	20	976
5	2	20	0	980
6	2	20	20	960
7	4	40	0	960
8	4	40	20	940
9	10	100	0	900
10	10	100	20	880
11	15	150	0	850
12	15	150	20	830
13	20	200	0	800
14	20	200	20	780
15	25	250	0	750
16	25	250	20	730

17	30	300	0	700
18	30	300	20	680
19	35	350	0	650
20	35	350	20	630
21	40	400	0	600
22	40	400	20	580

Anhand des Pipettierschemas wurden Komplexe aus Häm und Peptid mit variablen Hämkonzentrationen (0,4 bis 40  $\mu\text{M}$ ) gebildet und diese nach 30 min Inkubation unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur spektroskopisch ( $\lambda \approx 230 \text{ nm}$  bis 750 nm) gemessen. Spektren von einzelnen Lösungen (Puffer, Häm und Peptid) wurden als Referenz aufgenommen. Die Referenzspektren wurden von dem entsprechenden Spektrum des Häm-Peptid-Komplexes für die Erstellung der Differenzspektren subtrahiert. In den Differenzspektren wurden die Werte der maximalen Absorptionsdifferenz zur Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für den Häm-Peptid-Komplex zu Nutze gezogen. Die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes unterliegt einer bereits 2008 publizierten mathematischen Funktion von Bogdan et al. 2009, die ein nichtlinearer Fit für spektroskopische Daten darstellt.<sup>611</sup>

$$\Delta A = 0,5 * \Delta \epsilon * (C_L + n * C_P + K_D) - ((C_L + n * C_P + K_D)^2 - 4 * C_L * n * C_P)$$

wobei:

$\Delta A$  Absorption der Differenzspektren bei definierter Wellenlänge

$C_L$  Ligandkonzentration (=Hämkonzentration)

$C_P$  Peptidkonzentration

$\Delta \epsilon$  Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten des Komplexes und des Liganden (=Häm)

$K_D$  Dissoziationskonstante

$n$  Mögliche Bindungsstellen des Peptids für den Liganden (=Häm)



Die Erstellung der Differenzspektren und die Berechnung des  $K_D$ -Wertes erfolgte mittels Microsoft Excel, Version 16.57 der Firma Microsoft und Graphpad Prism, Version 9.1.0 der Firma GraphPad Software.

#### 4.2.3.1.2 Hämtitrationsstudie

Für die Titration des Peptids mit Häm wurde zunächst eine Stammlösung von 5 mM Häm in 30 mM NaOH hergestellt und diese für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Hämkonzentration der Stammlösung 5 mM wurde anhand eines Extinktionskoeffizienten von  $32,482 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda \approx 398 \text{ nm}$  in HEPES)<sup>610</sup> bestimmt und diese Lösung entsprechend mit PBS-Puffer (pH 7,4) auf eine Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  verdünnt und auf Eis gestellt. Das Peptid wurde mit PBS-Puffer (pH 7,4) auf eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  verdünnt. Zu 200  $\mu\text{l}$  der 5  $\mu\text{M}$  Peptidlösung wurde 10 Mal alle 33 min je 1  $\mu\text{l}$  der Hämlösung (500  $\mu\text{M}$ ) gegeben (Hämkonzentration in Küvette ( $\mu\text{M}$ ): 2,49; 4,95; 7,39; 9,80; 12,19; 14,56; 16,90; 19,23; 21,53; 23,81). Die Volumenzunahme durch die Hämzugabe wurde als vernachlässigbar erachtet. Es wurde die Küvette des Typs *High Precision Cell* (Lichtweg 10 mm, Zentrum 8,5) der Firma Hellma Analytics für geringe Volumina verwendet. Die Absorption wurde alle 2 min zwischen  $\lambda \approx 230$  und 750 nm (1 nm-Schritte) mit dem UV/Vis-Photospektrometer des Typs *UV-3100PC* der Firma VWR gemessen. Spektren von einzelnen Lösungen (Puffer, Häm und Peptid) wurden als Referenz aufgenommen und bei der Erstellung der Differenzspektren abgezogen.

#### 4.2.3.1.3 Hämübergabestudien der Peptide 3, 5 und 6

Zunächst wurde eine Hämstammlösung 1 mM hergestellt (*vide supra*) und 30 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert, die Hämkonzentration anhand eines Extinktionskoeffizienten von  $32,482 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda \approx 398 \text{ nm}$  in HEPES)<sup>610</sup> normalisiert und anschließend mit PBS-Puffer (pH 7,4) auf 100  $\mu\text{M}$  verdünnt. Die Peptide **3**, **5** und **6** wurden mit PBS-Puffer (pH 7,4) gelöst und auf

eine Konzentration von 1 mM gebracht. Für die Studie mit äquimolaren Peptidkonzentration wurde aus Peptid **3** und Peptid **6** je ein Komplex mit Häm hergestellt durch die Zugabe von 400 µl Hämlösung (100 µM) zu 40 µl Peptidlösung 1 mM sowie die Zugabe von 1560 µl PBS-Puffer. Diese Komplexe wurden je 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Von den 2 ml Lösung wurden je 500 µl entnommen und in einer Küvette mit 500 µl einer 20 µM Lösung von Peptid **5** versetzt (Endkonzentration in der Küvette: je 10 µM Peptide, 10 µM Häm). Für die Studie mit der Stöchiometrie 1:2 (Peptid **5**:Peptid **3** bzw. **6**) wurde je ein Komplex mit Häm hergestellt durch die Zugabe von 400 µl Hämlösung (100 µM) zu 40 µl Peptid **5**lösung 1 mM sowie die Zugabe von 1560 µl PBS-Puffer. Dieser Komplex wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Von den 2 ml Lösung wurden je 500 µl entnommen und in einer Küvette mit 500 µl einer 40 µM Lösung von Peptid **3** bzw. Peptid **6** versetzt (Endkonzentration in der Küvette: 10 µM Peptid **2**, 20 µM Peptide **3** bzw. **6**, 10 µM Häm). Es wurde jede Minute für 32 Minuten lang Spektren aufgenommen ( $\lambda \approx 20$  nm bis 750 nm). Es wurde ein UV/Vis Spektrophotometer des Typs *Multiskan GO microplate spectrophotometer* der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Spektren von einzelnen Lösungen (Puffer, Häm und Peptide) wurden als Referenz aufgenommen. Die Erstellung der Differenzspektren erfolgte mittels Microsoft Excel, Version 16.57 der Firma Microsoft, Der Funktion von Bogdan et al. 2009<sup>611</sup> und Graphpad Prism, Version 9.1.0 der Firma GraphPad Software.

#### 4.2.3.2 SPR-Spektroskopie

Die SPR-Messungen wurden von K. Hampel der Firma Biaffin GmbH & Co KG im Auftrag durchgeführt. Es wurden drei Wiederholungen auf einem Instrument Biacore T200 bei 25 °C in Laufpuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05 % Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20<sup>®</sup>)) durchgeführt. Hämopexin wurde durch Aminkupplung kovalent auf einem CM5-Sensorchip (GE Healthcare) immobilisiert, die Reinheit des Proteins wurde früher durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung geprüft.<sup>604</sup> Hämopexin wurde in Acetat-Puffer (pH 4,5, 10 µg/ml) verdünnt und in eine EDC/NHS-aktivierte Durchflusszelle mit einer Durchflussrate von 10 µl pro min injiziert, bis ein

Immobilisierungsgrad von 2116 RU erreicht war. Als Referenz diente eine aktivierte bzw. deaktivierte Durchflusszelle. Die Affinitätskonstante und die kinetischen Daten wurden mit der Standardmethode *Biacore T200 Control Software*, der Firma GE Healthcare für Einzelzykluskinetik durch fünf aufeinanderfolgende Injektionen von Hämopexin mit 30  $\mu\text{l}$  pro min von Häm mit Hämkonzentrationen von 0,75 bis 12 nM ermittelt. Die Oberflächenregeneration wurde mit 10 mM NaOH durchgeführt. Die resultierenden Daten wurden mit der Biacore T200 Control Software der Firma GE Healthcare unter Verwendung eines kinetischen Global Fit 1:1-Bindungsmodells ausgewertet, da die erste, hoch-affine Hämbindungsinteraktion mit der Stöchiometrie von 1:1 (Häm:Hämopexin) charakterisiert wurde.<sup>603</sup>

#### 4.2.4 Strukturanalysen

##### 4.2.4.1 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie-Messungen wurden von mir mit einem Spektropolarimeter des Typs *JASCO J-715* der Firma JASCO Co., das der Arbeitsgruppe Prof. Dr. K. Niefind der Universität zu Köln gehört, bei einer konstanten Temperatur von 20 °C durchgeführt. Zunächst wurde eine Hämstammlösung mit einer Konzentration von 2 mM in 30 mM NaOH hergestellt und 30 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert, die Hämkonzentration anhand eines Extinktionskoeffizienten von 32,482  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda \approx 398$  nm in HEPES)<sup>610</sup> normalisiert und anschließend mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) auf 75  $\mu\text{M}$  (für Peptid:Häm-Verhältnis 1:1) bzw. 150  $\mu\text{M}$  (für Peptid:Häm-Verhältnis 1:2) verdünnt. 200  $\mu\text{l}$  jeder der Verdünnungen wurden zu einem Aliquot des Peptids **7** (Endkonzentration: 75  $\mu\text{M}$ ) hinzugefügt und die Spektren wurden nach 30 Minuten Inkubationszeit aufgenommen. Spektren von einzelnen Lösungen (Puffer, Häm und Peptid) wurden als Referenz aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Scan-Geschwindigkeit von 100 nm pro min, einer Bandbreite von 1,00 nm, einer Akkumulation von fünf Scans und einer Auflösung von 0,20 nm aufgenommen. Es wurde eine Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke verwendet und die Spektren wurden von  $\lambda \approx 180$  bis 350 nm aufgenommen. Die Basislinienkorrektur wurde mit dem Spektrum eines 50 mM

Natriumphosphat-Puffers (pH 7,4) durchgeführt, und die Elliptizität der CD-Spektren wurde in Milligrad ausgedrückt und später in molare Elliptizität ( $\theta$ ) in  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  umgerechnet. Die Daten wurden mit Microsoft Excel, Version 16.57 der Firma Microsoft und Graphpad Prism, Version 9.1.0 der Firma GraphPad Software ausgewertet.<sup>602</sup>

#### 4.2.4.2 rRaman-Spektroskopie

Die Resonanz Raman (rRaman)-Messungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. U. Neugebauer von Dr. A. Ramoji (*Center for Sepsis Control and Care* des Universitätsklinikums Jena) und Dr. B. Schmalohr (geb. Syllwasschy, ehemaliger Mitarbeiter des Arbeitskreises Prof. Dr. D. Imhof) durchgeführt. Die rRamanspektren wurden mit einem kommerziellen Mikro-Raman-Aufbau des Typs *CRM 300* der Firma WITec GmbH aufgenommen. Vor der rRamanmessungen wurden Häm anhand eines Protokolls vorbereitet.<sup>103</sup> Häm wurde in einer Konzentration von 700 mM mit 1 N NaOH gelöst und 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert und die Hämkonzentration anhand eines Extinktionskoeffizienten von  $32,482 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda \approx 398 \text{ nm}$  in HEPES)<sup>610</sup> normalisiert. Die Lösung wurde so mit 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 (*vide supra*) und Wasser verdünnt und zu dem zu analysierenden Peptid **3**, **5**, **6** und **7** bzw. Hämopexin in Feststoffform gegeben und anschließend mit 1 M HCl neutralisiert, so dass eine Endkonzentration von Häm und Peptid bzw. Protein von 400  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Für Peptid **7** und Hämopexin wurden weitere Ansätze mit einer Endkonzentration von Häm mit 800  $\mu\text{M}$  und Peptid bzw. Protein von 400  $\mu\text{M}$  angesetzt. Die Komplexe wurden weitere 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Proben Peptid **7** und Hämopexin präzipitierten während der Probenvorbereitung und es wurde von dem abzentrifugierten und neu re-suspendierten Niederschlag und von dem Überstand eine Messung durchgeführt. Spektren von einzelnen Lösungen (Puffer, Häm und Peptid) wurden als Referenz aufgenommen. Die Proben wurden in flüssiger Phase mit einem Zeiss x 10x Objektiv (NA 0,2, Laserleistung 22 mW) gemessen. Die Proben wurden in flüssigem Zustand gemessen. Dazu wurden die Proben in eine Quarzküvette ( $\sim 80 \mu\text{l}$  Probenvolumen) gegeben und auf einen Probenhalter gesetzt, der sich mit einer

Geschwindigkeit von einer Umdrehung pro min dreht. Die Anregungswellenlänge betrug 405 nm. Eine CCD-Kamera (DV401A BV-532, ANDOR, 1024\*127 Pixel) und ein Gitter von 1800 g pro mm wurden verwendet. rRamanspektren wurden in dreifacher Ausführung mit einer Integrationszeit von 30 s pro Spektrum aufgenommen und das Hintergrundrauschen mit Hilfe eines statistiksensitiven nichtlinearen *Peak-Clipping*-Algorithmus (SNIP)<sup>612</sup> reduziert. Für die Analyse wurden die GNU R-Plattform und ein selbst entwickeltes Skript verwendet.<sup>613</sup> Die Spektralbereiche (600 bis 900 cm<sup>-1</sup> und 1400 bis 1800 cm<sup>-1</sup>) wurden für die Darstellung der Spektren aufgezeichnet.<sup>602,603</sup>

#### 4.2.4.3 *In Silico Studien*

Die *in silico*-Studien wurden von Dr. A. Paul George (ehemaliger Mitarbeiter des Arbeitskreises Prof. Dr. Imhof), Dr. B. Schmalohr (ehemaliger Mitarbeiter des Arbeitskreises Prof. Dr. Imhof und Coautor der Publikation Detzel und Schmalohr et al. 2021<sup>603</sup>) und F. Steinbock (geb. Lamprecht, ehemalige Masterstudentin des Arbeitskreises Prof. Dr. D. Imhof) durchgeführt. Die *in silico*-Studien zu Apo- und Holo-Hämopexin sind Teil der Masterarbeit von F. Steinbock.<sup>614</sup>

##### 4.2.4.3.1 *Erstellung der Homologiemodelle*

Das Homologiemodell von humanem Holo-Hämopexin wurde auf Basis der Sequenz der humanen Hämopexinsequenz mithilfe der Software Yasara, Version 19.9.17 kreiert.<sup>615</sup> Für die Erstellung des Homologiemodells wurde, abhängig von verschiedenen Kriterien die in Detzel und Schmalohr et al. 2021<sup>603</sup> aufgeführt sind, die glycosylierte Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum verwendet (PDB: 1QJS<sup>1</sup>). Für die Modellierung der fehlenden Teile des Linkerpeptids wurden 50 verschiedene Konformationen untersucht und die finale Struktur des Homologiemodells über den Gesamt-*Z-Score* bewertet. Für die Modellierung des Apo-Hämopexinmodells diente das Homologiemodell des Holo-Hämopexins, bei dem das Häm entfernt wurde.<sup>603</sup> Das Homologiemodell des

Peptids 7 wurde auf Basis der Primärsequenz mit SWISS-Model vorgeschlagen, dabei fehlten 18 N-terminale Aminosäuren, die anschließend hinzugefügt wurden.<sup>616</sup> Diese Struktur wurde anschließend mithilfe eines strukturbasierten MUSTANG-Alignments in YASARA mit der Röntgenkristallstruktur (PDB: 1QHU) und des Homologiemodells verglichen.<sup>1,615,617</sup>

#### 4.2.4.3.2 Molecular Dynamics Simulationen

Die Simulationen zur molekularen Dynamik (MD-Simulationen) wurden zur Untersuchung der Konformationsstabilität und struktureller Dynamik in YASARA, Version 19.9.17 durchgeführt.<sup>615</sup> Apo- bzw. Holo-Hämopexin wurde einer 200 ns langen Gesamtatom MD Simulation.<sup>603</sup> Die verwendete Methode, autoSMILES wurde bereits in früheren Studien verwendet.<sup>618</sup> Der Simulationsaufbau umfasste eine kubische Zelle mit 10 Å Länge um den zentralen Histidinrest herum, eine Anpassung der Protonierungszustände der Aminosäurereste bei pH 7,4 erfolgte, physiologische Konzentration von Natrium- und Chloridionen wurden miteinbezogen, sowie eine Temperatur von 298 Kelvin. Details sind Detzel und Schmalohr et al. 2021 zu entnehmen.<sup>603</sup> Für die MD-Simulationen für Apo- und Holo-Hämopexin wurde alle 200 ps während der Simulation ein Schnappschuss aufgenommen und dieser mit YASARA, Version 19.9.17 und VMD, Version 1.9.3 analysiert.

#### 4.2.4.3.3 Molecular Docking Simulationen

Die Studien zum molekularen Docking wurden verwendet, um Einblicke in die Bindung von Häm an die jeweiligen Histidinreste zu gewähren und die experimentellen Ergebnisse zur Hämbindung der HBMs zu validieren.<sup>603</sup> Für Apo- bzw. Holo-Hämopexin wurde, basierend auf dem AutoDock Vina Algorithmus, ein *Ensemble Docking*-Ansatz in YASARA, Version 19.9.17 durchgeführt.<sup>615,619,620</sup> Eine kubische Zelle mit 15 Å Seitenlänge um die jeweiligen Histidinreste H236, H260 und H293 wurden für Apo- bzw. Holo-Hämopexin kreiert. Das Hämmolekül wurde 50 Mal an jeden Teil des *Ensembles* für Apo- bzw. Holo-Hämopexin

gedockt, was zu 500 Docking-Läufen pro HBM führte, die nach Bindungsenergien und einem 5 Å RMSD-Wert geclustert wurden. Die Stabilität, der durch die Studien zum molekularen Docking erhaltenen Häm-Hämopexin-Komplexe wurde anschließend in einer weiteren MD Simulation auf Stabilität überprüft. Zunächst wurde eine 500 ps *refinement* Simulation via YASARA durchgeführt um die neu geschaffenen Häm-Hämopexin-Komplexe zu validieren und die Struktur mit der niedrigsten Energie zu identifizieren.<sup>615,621</sup> Die Struktur mit der niedrigsten Energie wurde einer 20 ns MD Simulation YASARA, Version 19.9.17 unterzogen.<sup>603,615</sup>

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in zwei Forschungsartikeln zusammengefasst<sup>602,603</sup> und bauen auf ersten Studien auf, die im Rahmen von zwei Masterarbeiten (2019, 2020)<sup>604,614</sup> durchgeführt wurden. Um eine umfassende Beschreibung der Ergebnisse zu ermöglichen, werden die Erkenntnisse hier gesammelt wiedergegeben. Sollte ein Ergebnis aus einer früheren Studie resultieren, ist dies eindeutig gekennzeichnet.

### 5.1 SPR Analyse von Häm und Hämopexin

Obwohl Hämopexin in verschiedenen Organismen hoch konserviert ist, weist das Hämopexin des Kaninchens eine Gesamtidentität von ~80 %, das der Ratte ~75 % und das der Maus ~73 % verglichen mit dem menschlichen Hämopexin auf, da die Linkerpeptide sehr viel variabler sind.<sup>35,481</sup> Ein Vergleich der Hämopexinsequenz verschiedener Spezies ist in Abbildung 13 dargestellt. Da das Linkerpeptid immer wieder als essentieller Bestandteil des Hämbindungsvorgangs angesehen wird, weil nach Hämbindung diese Region wie ein Scharnier die beiden Domänen zueinander bewegen soll, kann aufgrund der Variabilität in den verschiedenen Spezies bezüglich der Eigenschaften der Hämbindung von Hämopexin nicht von einer Spezies auf die andere geschlossen werden.<sup>473,515,584,585</sup> Die erste Dissoziationskonstante von Häm und Hämopexin wurde 1972 mit  $K_D = 8 \text{ nM}$  publiziert und wurde mit aus Kaninchenserum isoliertem Hämopexin bestimmt.<sup>473</sup> Später wurden zwar Affinitäten von Häm und Hämopexin mit Hämopexin aus humanem Serum bestimmt, diese liegen jedoch mit  $K_D \approx 5,3 \text{ fM}$  und später  $K_D = 14,7 \text{ pM}$  in einem so hoch-affinen Bereich, dass es



schwer vorstellbar scheint, wie Hämopexin unter physiologischen Bedingungen im Recyclingprozess von Hämopexin Häm in den Hepatocyten entlassen soll, ohne degradiert zu werden.<sup>1,467,474,478,588</sup> Fast 50 Jahre nach der Einführung der ersten Dissoziationskonstanten für die Häm-Hämopexin-Wechselwirkung scheint es angebracht, eine Reflexion und Debatte über die früheren Analysen anzuregen und zu fördern.<sup>603</sup>

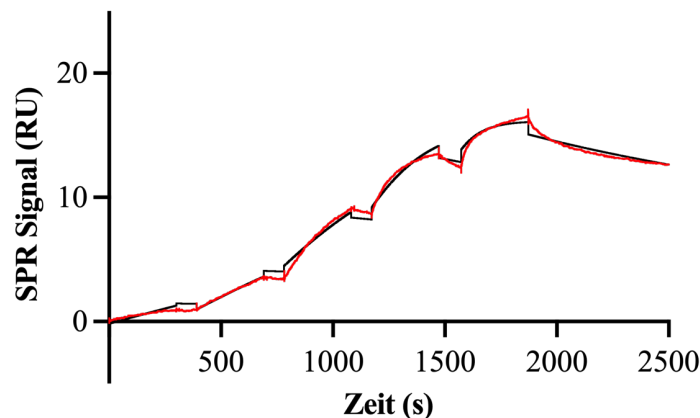
MENSCH	1MARVLGAPVALGLWSLWLAIAATPLPPTSAGNVAE---GE--TKP---DPDVTERCSD	52
MAUS	1MARTAVALNILLVLLGLCWSLAVASPLPTA--NGRVAE---VENGTKP---DSDVPEHCLD	52
KANINCHEN	1MVKASGPPIALGVWGLCWSLATVNSVPLTSAHGNVTE---GESGTKP---EADVIEQCSD	54
SCHWEIN	1MARALGTVEAPWLLGLCCSLAIHPLSLTAGPKHGAE--GRNESKP---DPDVTERCSD	54
RATTE	1MARTVVALNILLVLLGLCWSLAVANPLPAA--HETVAK---GENGTKP---DSDVIEHCSD	52
RIND	1MARALRPVALWLLGLCWSLAKAHLARAPELGHGVE---GGNVAKP---DPEVTERCSD	54
ORANGUTAN	1MARALGAPIALGLWSLWLAIAATPLPPTSAGNVAE---GE--TKP---DPDVTERCSD	52
ZEBRAFISCH	1-----MRLIQALSCLALSLSLAAPPQHKEDHSHKGPGEHGKHELHHAQLDRC-K	52
MENSCH	53GWSFDATTLLDDNGTMLFFKGEFVWKS[KWDRELISERWKN-----FPSVDAAFRQ	104
MAUS	53TWSFDAATMDHNGTMLFFKGEFVWRGHSGTRELISARWKN-----PITSVDAAFR-G	103
KANINCHEN	55GWSFDATTLLDDNGTMLFFKDEFWVWKSIRGIRELISERWKN-----FIGPVDAAFRHG	106
SCHWEIN	55GWGFDASTLDEHGAMLFFKGPSVWAGQNWTRGLISERWKN-----APSSVDAAFRRG	106
RATTE	53AWSFDATTMDHNGTMLFFKGEFVWRGHSIRGIRELISERWKN-----PVTSDAAFR-G	103
RIND	55GWGFDATTLLDEHGNMLFKGGEFVWKGHAWARQLISERWKD-----APSPVDAAFRYD	106
ORANGUTAN	53GWSFDATTLLDDNGTMLFFKGEFVWKSIRGIRELISERWKN-----FPSVDAAFRQ	104
ZEBRAFISCH	53GIEFDVAVNVEEGVPIYFFKGDHLFKGPHGKAELSNKTFPELDDHHHLGHVDAAFRMS	112
MENSCH	105---[NSVFLIKGDKVWVYPEKKEKGYPKLLQDEFPGIPSPDAAVEC[RGEQAEGVL	160
MAUS	104---PDSVFLIKEDKVVVYPEKKENGYPKLFQEEFPGIPYPPDAAVECHRGCQSEGVL	159
KANINCHEN	107---HTSVYLIKGDVWVYVTEKNEKQVYKSLQDEFPGIPPLDAAVECHRGCQDEGIL	162
SCHWEIN	107---HDRVFLIQGDKVWVYPEK-EKENPRSLQEEFPGVPSPLDAAVECHRGCQDEGVL	161
RATTE	104---PDSVFLIKEDKVVVYPEKKEKGYPKLFQEEFPGIPYPPDAAVECHRGCQSEGVL	159
RIND	107---RNSVLLIKGDKFWVYPEK-GEYKPKLQEKFPPIPLDAAVECHRGCSEHGVL	161
ORANGUTAN	105---HNSVFLIKGDKVWVYPEKKEKGYPKLLQDEFPGIPSPDAAVECHRGCQAEGL	160
ZEBRAFISCH	113SPDHHDHQFFFLDNMVFYFKHKLKDYPKLISAVFPGIPDHDLDAAVECPKPCPNNDVI	172
MENSCH	161FFQGDREWFWDLATGTMKERSWPAVGNCSALRWLGRYYCFQGNQFLRFDVPRGVEPPRY	220
MAUS	160FFQGNRKFWDFAFTRTQKERSWTVGNCTAALRWLERYCFQGNKFLRFNVTGEVPPRY	219
KANINCHEN	163FFQGNRKFWDLTGTGKERSWPAVGNCTAALRWLGRYYCFQGNQFLRFNVSVEVPPGY	222
SCHWEIN	162FFQGTHTWFWDSTTKTKERLWPAVGNCSAMRWISRYCFRGNQFLRFDPVTHGVDPKY	221
RATTE	160FFQGNRKFWDFAFTRTQKERSWPAVGNCTAALRWLERYCFQGNKFLRFNVTGEVPPRY	219
RIND	162FFQGNHTWFWDSTTKTKRSWPAVGNCSAIRNLNRYCFRGNKFLRFDPVTHGVNSTY	221
ORANGUTAN	161FFQGDREWFWDLATGTMKERSWPAVGNCSALRWLGRYYCFQGNQFLRFDVPRGVEPPRY	220
ZEBRAFISCH	173FFKGEIYHFNHMTKKVDEKFKSMPNCTGAFRYMGHYCFHGHQFSKFDPMTEVHGKY	232
<b>Linkerpeptid</b>		
MENSCH	221PRDVRDYFMPCPGRG[GH-RNGTGHGNSHTHGPEYMRCSPHLVLSALTSNDHGATYAFSG	279
MAUS	220PLDARDYFVSCPRGRGHGRPRNGTAHGNSTH--PMHSRCSPPDGLTALLSDHRGATYAFSG	277
KANINCHEN	223PLDVRDYFLSCPRGR[RS-----SHRNSTQHGHSTRCDDPLVLSAMVSDNHGATYVFSG	277
SCHWEIN	222PRDVRDYFMPSCPRGHAH--RNATHRG-----DDRCSDDLVTALLSDNHGATYAFSG	272
RATTE	220PLDARDYFISCPGRGHGKLRNGTAHGNSTH--PMHSRCNADPGLSALLSDHRGATYAFSG	277
RIND	222PRDVRDYFMPSCPRGHAH--RNATQHM-----DKRCSPHLVLSALLSDNHGATYAFSE	272
ORANGUTAN	221PRDVRDYFMPCPGRGHG[GH-RNGTGHGNGTHHGPEYMRCSPHLVLSALTSNDHGATYAFSG	279
ZEBRAFISCH	233PKEARDYFMPCPHFGSKTTDDHI-----EREQC-SRVHLDAITSDDAGNIYAFRG	281
MENSCH	280THYWRDLTSRDGWHWSPIAHQWPQGPSAVDAAFSWEKLYLVQGTQVYVFLTKGGYTLVS	339
MAUS	278SHYWRDLSSRDGWHWSPIAHHPWPQGPSTVDAAFSWDDKLYLIQGTQVYVFLTKGGNNLVS	337
KANINCHEN	278SHYWRDLTNRD[SWPIAHQWPQGPSTVDAAFSWDDKLYLIQGTQVYVFLTKGGYTLVN	337
SCHWEIN	273THYWRDLTSRDGWHWSPIDHQWSHGPSAVDAAFSWEKLYLVQGTQVYVFLTRAGYTLVD	332
RATTE	278SHYWRDLSSRDGWHWSPIAHHPWPQGPSAVDAAFSWEKLYLVQGTQVYVFLTKGGNNLVS	337
RIND	273NHYWRDLSSRDGWHWSRIEHLWVQGPSTVDAAFWDDKLYLIQGTQVYVFLTRAGYTLVK	332
ORANGUTAN	280THYWRDLTSRDGWHWSPIAHQWPQGPSTVDAAFSWEKLYLVQGTQVYVFLTKGGYTLVS	339
ZEBRAFISCH	282HFLSI--TGDKFHSDTIESEFKELHSEVDSVSYDGHFYMLKDNDDVYVYKVPKPHHLE	339
MENSCH	340GYPKRLEKEVGTPHGIILDSVDAAFICPGSSRLHIMAGRRLWLDLKSQAQTWTELPWP	399
MAUS	338GYPKRLEKELGSPPGISLETIDAFAFCPGSSRLYVSSGRRLWLDLKSQAQTWTEVSWP	397
KANINCHEN	338GYPKRLEKELGSPPVISLEAVDAAFVCPGSSRLHIMAGRRLWLDLKSQAQTWTELPWP	397
SCHWEIN	333NYPKLEKELGSPHGISLDAVDATFVCPGTSRLHVMAGRRLWLDLKSQAQPWTELPWP	392
RATTE	338GYPKRLEKELGSPPGISLDTIDAFAFCPGSSKLYVTSGRRLWLDLKSQAQTWAELSWP	397
RIND	333DYPKLEKEFGSPDGVCLHSVDAAFVCPGSSQLYIMAGQKLRDLNLGAQTWTELPWL	392
ORANGUTAN	340GYPKLEKEVGTPHGIILDSVDAAFICPGSSRLHIMAGRRLWLDLKSQAQTWTELPWP	399
ZEBRAFISCH	340GYPKLKDVLGIE----GPVDAAFVCEDDHVVHVIKQGSYIDVDLKPATPRKLVKE----	390
MENSCH	400HEKVDGALCMEKSLGPNSCSANGPGLYLHGNPNLYCYSDVEKLNAAKALPQPQNVNT-SLL	458
MAUS	398HEKVDGALC[LDKSLGPNNTCSSNGSSLYFIHGNPNLYCYSSIDKLNAAKSLPQPQKVN-SIL	456
KANINCHEN	398HEKVDGALCMEKPLGPNSCSTSGPNLYLHGNPNLYCYRHVDKLNAAKALPQPQRVS-RLL	456
SCHWEIN	393HEKVDAAALCTEKS[LGNPSCSASGLGLYIVHGHVPHVYCYKDEKLVSAKALPQPQSVN-SLL	451
RATTE	398HEKVDGALC[LKSLGPNPSCSNGPNLFFIHNPNLYCYSSIDKLNAAKSLPQPQKVN-SIL	456
RIND	393HTKVDGALC[TEKSLGPNPSCSANGLGLYLHGNPNLYCYKDEEELSKTKDLPQAQRMN-SLL	451
ORANGUTAN	400HEKVDGALCMEKSLGPNPSCSANGPGLYLHGNPNLYCYSDVEKLNAAKALPQPQNVNT-SLL	458
ZEBRAFISCH	391-----GTTTQFKRIDAAMCGPK--GVTVVIGNHFNHYDSVQVMLMAKIMPEQQKVSQQLF	443
MENSCH	459GCTH----	462
MAUS	457GCSQ----	460
KANINCHEN	457GCTH----	460
SCHWEIN	452GCHRSRGS	459
RATTE	457GCSQ----	460
RIND	452GCAPHQHS	459
ORANGUTAN	459GCTH----	462
ZEBRAFISCH	444GCDH----	447
<b>Organismus</b>		
<b>Identitäts-Vergleich mit menschlichem Hämopexin (%)</b>		
MAUS		73,43
KANINCHEN		79,96
SCHWEIN		72,65
RATTE		75,16
RIND		70,72
ORANGUTAN		98,49
ZEBRAFISCH		30,29

N-terminale Propeller-Domäne

C-terminale Propeller-Domäne

**Abbildung 13** Abgleich der Hämopexinsequenzen verschiedener Spezies. In rot sind die bisher vorgeschlagenen Häm-koordinierenden Reste im humanen Hämopexin markiert, in dunkelrot die Hämbindenden Reste in der Röntgenkristallstruktur des Kaninchen-Hämopexins. Der Abgleich wurde mithilfe des *Align-Tools* von [www.uniprot.org/603](http://www.uniprot.org/603) durchgeführt und den Sequenzen der dortigen Einträge mit den Nummern P02790 (Mensch), Q91X72 (Maus), P20058 (Kaninchen), P50828 (Schwein), P20059 (Ratte), Q3SZV7 (Rind), Q5R543 (Orangutan) und Q6PHG2 (Zebrafisch). Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Word, Version 16.58. Die Tabelle wurde aus meiner Masterarbeit übernommen.<sup>604</sup>

Die Diskrepanzen innerhalb der früheren Studien und zwischen den Annahmen über die Entlassung von Häm aus Hämopexin mit intaktem Verbleib des Proteins und der Unvereinbarkeit mit einer Affinität mit Dissoziationskonstanten im femtomolaren Bereich führt zu einer erneuten Bestimmung der Bindungseigenschaften von Häm und Hämopexin im Rahmen der vorliegenden Arbeit, beginnend mit der Charakterisierung der Bindungsaffinität mittels SPR-Spektroskopie. Schon in früheren Studien wurde SPR erfolgreich als Methode zur Bestimmung der Hämbindungseigenschaften von Hämbindenden Proteinen genutzt.<sup>623,624</sup> Die experimentellen Daten, siehe Abbildung 14, der SPR-Studie wurden mit einem kinetischen Global Fit 1:1-Bindungsmodell ausgewertet. Es resultiert aus den Ergebnissen eine hoch-affine Hämbindungsinteraktion mit einer Stöchiometrie von 1:1, die mit  $k_a = 1,14 \pm 0,24 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und  $k_d = 3,61 \pm 0,42 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  charakterisiert werden kann, und eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,32 \pm 0,04 \text{ nM}$ .<sup>603</sup>



**Abbildung 14** SPR-Daten für die SPR-spektroskopische Untersuchung von Häm in steigenden Konzentrationen mit Hämopexin. Die experimentellen Daten sind in schwarz abgebildet, der kinetischen Global Fit in rot. Die Abbildung wurde abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al. 2021<sup>603</sup> und erstellt mit GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Dieser Wert ist mehrere Dimensionen höher als die bisher bestimmten Dissoziationskonstanten von Häm und humanem Hämopexin von erst  $K_D \approx 5,3 \text{ fM}$ <sup>474</sup> und später  $K_D = 14,7 \text{ pM}$ <sup>467</sup> und niedriger als der Wert, der für die Interaktion von Häm und Hämopexin aus Kaninchenserum bestimmt wurde mit  $K_D = 8 \text{ nM}$ <sup>473</sup>. Die Stöchiometrie von 1:1 der untersuchten Interaktion mittels SPR-Spektroskopie wird jedoch lediglich dem ersten initialen Bindungsereignis zugeordnet, das bei Hämkonzentrationen von 0,75 nM bis 12 nM auftritt. Denn bei höheren Hämkonzentrationen über 100 nM verschiebt sich diese Stöchiometrie hin zu >1:1

(Häm:Hämopexin). Bereits in meiner Masterarbeit wird ein Anhaltspunkt für den Beweis einer Stöchiometrie von  $>1:1$  (Häm:Hämopexin) geliefert, da in einer spektroskopisch untersuchten Titration von humanem Hämopexin mit Häm eine Zunahme der Intensität der Soret Bande bei  $\lambda \approx 415$  nm auch bei Stöchiometrien  $>1:1$  (Häm:Hämopexin) erfolgt.<sup>604</sup> Diese Interaktion wurde mithilfe der Gleichung von Bogdan et al. 2008<sup>611</sup> mit einem  $K_D = 3,53 \pm 0,8 \mu\text{M}$  und einer Stöchiometrie von  $\sim 2:1$  (Häm:Hämopexin) bewertet.<sup>603,604</sup> Da die Gleichung von Bogdan et al. lediglich von gleichaffinen Bindungsstellen ausgeht, könnte dieser  $K_D$ -Wert ein Gemisch aus den Affinitäten mehrerer Hämbindungsstellen abdecken.<sup>603,604,611</sup> Diese Beobachtungen passen zu früheren Vorschlägen, bei denen eine weitere Hämbindungsstelle auf Hämopexin in Betracht gezogen wurde. Paoli et al. hielten durch eine *in silico*-Studie mit der N-terminalen Domäne der Röntgenkristallstruktur eine zweite Hämbindungsstelle zwischen H105 und H150 für denkbar.<sup>1</sup> *In vitro* wurde 1984 von Morgan et al. gezeigt, dass die N-terminale Domäne von Hämopexin, also die Domäne auf der die bestätigte Hämbindungsstelle zwischen H236 und H293 nicht liegt, Häm bindet.<sup>479</sup> Karnaukhova et al. zeigten in einer neueren Studie 2021 mithilfe einer CD-spektroskopischen Titration von Häm über das Verhältnis 1:1 hinaus, dass das Bandenmuster von der Menge des proteingebundenen Häms abhängt.<sup>480</sup> Bei höheren Hämkonzentrationen wurde eine vollständigen Umkehrung des CD-Musters beobachtet. Dies deutet ebenfalls auf eine zweite Hämbindungsstelle hin.<sup>480</sup> Auch nach der Entdeckung, dass sich beide Hämopexindomänen rekombinieren und die Konformation der beiden Domänen sich daraufhin ändert, könnte ein Indiz sein, dass die konformationelle Änderung nach Hämbindung die Bindung eines weiteren Hämoleküls ermöglicht.<sup>481</sup> Die genauen Bindungseigenschaften eines zweiten Hämoleküls von Hämopexin bei Hämkonzentrationen jenseits von 100 nM kann mithilfe von SPR-Spektroskopie dennoch nicht bestimmt werden, da starke unspezifische Signale eine Untersuchung unmöglich machen. Die Daten der SPR-spektroskopischen Studie und frühere Daten sprechen jedoch dafür, dass Hämopexin neben einer hoch-affinen, transiente Bindungsstelle auch eine nieder-affine transiente Bindungsstelle besitzen könnte.

Die Signalstörung bei der SPR-Spektroskopie könnte aus Hämaggregation durch die hohen Hämkonzentrationen entstehen, oder als Resultat der

schwankenden pH-Werte.<sup>46,307,308</sup> Es entsteht temporär ein stark basischer pH-Wert im Zuge der Regeneration des immobilisierten Hämopexins mit Natronlauge nach jedem Reaktionszyklus, während die Messung an sich bei physiologischem pH-Wert von pH = 7,4 durchgeführt wird.<sup>603</sup> Eine Hämkonzentration von über 100 nM zur Ermöglichung der Bindung eines zweiten Hämmoleküls ist physiologisch durchaus denkbar, da bei Hämolyse lokal große Hämkonzentrationen erreicht werden, die bisher mit bis zu 350  $\mu$ M bestimmt wurden.<sup>73,372–374</sup> Die durch SPR-Spektroskopie bestimmte Affinität von  $K_D = 0,32 \pm 0,04$  nM scheint realistischer als die zuvor bestimmten Dissoziationskonstanten im femto-<sup>474</sup> und pikomolaren<sup>467</sup> Bereich zu sein, da Hämopexin Häm nachweislich *in vitro* bei einem pH-Wert <5 entlassen kann, vermutlich nach Protonierung eines oder beider Histidinliganden.<sup>1,495,590</sup> Es wird angenommen, dass eine Auflösung der Hämbindungstasche durch Bewegung der Domänen und/oder des Linkerpeptids erfolgt und zu einer Freisetzung von Häm führt.<sup>1</sup> Eine bloße Bewegung der Domänen scheint bei einem  $K_D$ -Wert im piko- bzw. femtomolaren Bereich zu schwach zu sein um Häm von Hämopexin zu entfernen, wenn man bedenkt, dass eine Dissoziationskonstante in dieser Region die bislang höchste Affinität eines Hämbindenden Proteins für Häm darstellt.<sup>1</sup> Hämoproteine, die Häm nicht transient sondern permanent gebunden haben, weisen im Allgemeinen Hämbindungsaffinitäten mit  $K_D$ -Werten zwischen  $K_D = 100$  pM und  $K_D = 1$  fM auf, da Häm für die Funktion der Proteine nicht aus der Bindungstasche extrahiert werden muss.<sup>603,625,626</sup> Diese Definition gilt also nicht für Hämopexin. Zum einen gibt es Häm in der Zelle ab und trägt Häm nicht permanent gebunden an sich und zum anderen folgt der Häm-Einbau in Hämopexin, im Gegensatz zu Hämoproteinen keinem spezifischen Enzymkatalysierten Mechanismus. Die Hämassoziation hängt von der Hämkonzentration der Umgebung ab und erfolgt ohne Enzymbegleitung.<sup>603,627</sup> Apo-Hämopexin soll außerdem nach Internalisierung und Hämabgabe in Zellen intakt zur Zelloberfläche gelangen, was ebenfalls für die niedrigere Affinität spricht.<sup>628,629</sup> Die mittels SPR-Spektroskopie für Häm und Hämopexin bestimmte Dissoziationskonstante ist geringer als alle bisher bestimmten Dissoziationskonstanten für Häm und HSA (niedrigste:  $K_D = 0,5$  nM<sup>467</sup>). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von vorherigen Studien.<sup>500,604</sup> Dort wurde *in vitro* die Hämübergabe von HSA an Hämopexin beobachtet mit der Schlussfolgerung, dass Hämopexin eine höhere Affinität zu Häm haben muss als

HSA.<sup>500</sup> Es wird bereits diskutiert, dass dies auch unter physiologischen Zuständen so stattfinden könnte.<sup>21</sup> Im Umkehrschluss bedeutet dies jedoch auch, dass die Affinität von Hämoglobin und isoliertem Hämoglobinketten für Häm niedriger sein muss als  $K_D = 0,32 \pm 0,04$  nM, da Hämopexin *in vitro* fähig ist Häm von Hämoglobin zu übernehmen.<sup>474</sup> Auf Basis der Affinität von Häm und Hämoglobin ( $K_D$ -Wert von  $K_D \approx 53,0$  fM<sup>580</sup>) wurde schließlich die Dissoziationskonstante von  $K_D \approx 5,3$  fM bestimmt.<sup>474</sup> In der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PB: 1QHU) wird die Hämbindungsstelle von zwei Histidinresten, einer auf dem Linkerpeptid (H236) und einer auf der C-terminalen Domäne (H293) gebildet, wobei Häm biaxial gebunden wird.<sup>1</sup> Das für die Kristallisation verwendete Hämopexin wurde aus Kaninchenserum aufgereinigt.<sup>1</sup> Der mögliche zweite Hämiligand, der mit niedriger Affinität an das Protein binden würde, könnte während des Aufreinigungsprozesses verloren gegangen sein. Für die Abbildung eines möglichen zweiten Hämiliganden in der Röntgenkristallstruktur (PDB: 1QHU) wäre Hämopexin aus Kaninchenserum mit akuten hämolytischen Erscheinungen notwendig, aber auch hier könnte sich das Häm im Aufreinigungsprozess verlieren. Alternativ könnte Hämopexin in einer gesättigten Hämumgebung kristallisiert werden, oder der abzubildende Ligand könnte in Lösung in Tropfen zu den Proteinkristallen gegeben werden, bis eine Hämkonzentration, vergleichbar mit Hämkonzentrationen bei hämolytischen Ereignissen erreicht ist.<sup>630,631</sup>

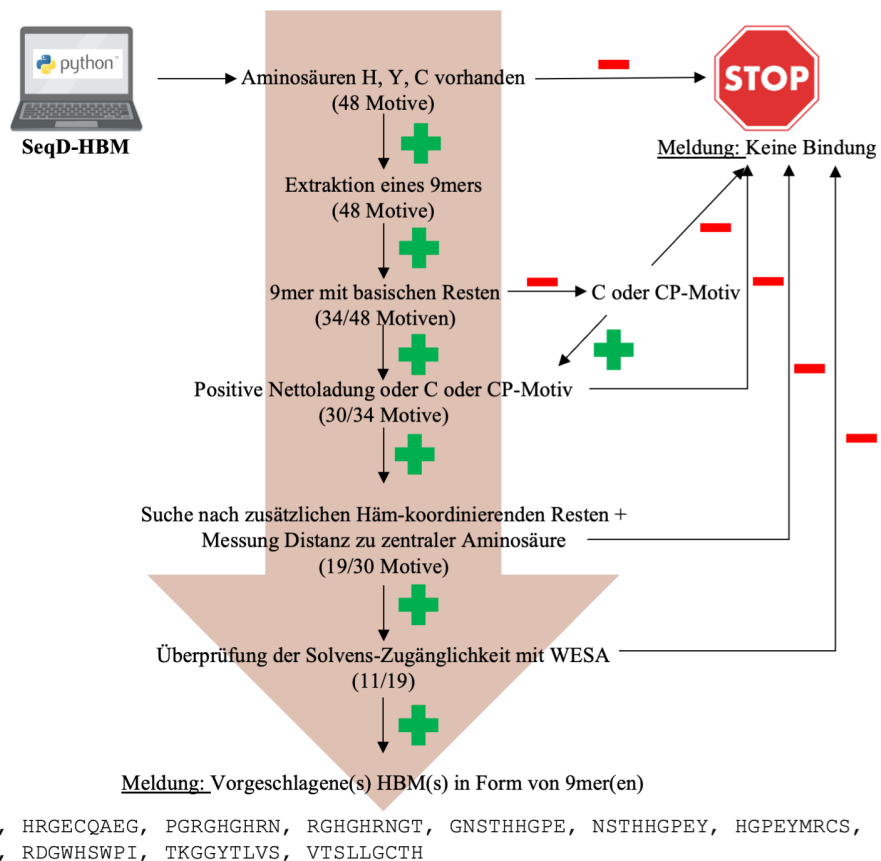
## 5.2 Hämopexin-basierte Nonapeptide binden Häm

### 5.2.1 Selektion von Hämopexin basierten HBMs

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Protein-basierte Peptidmodelle, aus neun Aminosäuren bestehend, zur Identifikation von oberflächenexponierten HBMs auf Proteinen dienen können.<sup>103,106,623,632,633</sup> Der heute weit verbreitete Begriff HBM stammt ursprünglich von einem bestimmten konservierten Motiv, das an der Häm-vermittelten Regulation von ALAS beteiligt ist.<sup>126</sup> Das bekannteste Sequenzmotiv der HBMs ist das Cystein-Prolin-Motiv, kurz CP-Motiv.<sup>634</sup> Zur Identifikation von möglichen HBMs auf humanem Hämopexin

wurde die Sequenz des humanen Hämopexin zunächst im Rahmen meiner Masterarbeit in einen 2019 im Arbeitskreis Prof. Dr. D. Imhof der Universität Bonn mit Python™ entwickelten Algorithmus mit dem Namen SeqD-HBM eingespeist, der später auch als Webapplikation mit Namen HeMoQuest bekannt wurde.<sup>106,635</sup> SeqD-HBM sucht selektiv die Proteinsequenz auf Basis verschiedener Kriterien ab und gibt neun Aminosäuren lange Sequenzabschnitte aus. Der Prozess für die Extraktion von möglichen HBMs aus der Sequenz von humanem Hämopexin ist in Abbildung 15 dargestellt.

N-MARVLGAPVALGLWSLCWSLAIATPLPPTS AHGNVAEGETKPD PDVTERCS DGWSFDATTLDDNGTMLFFKGEFVWK  
 SHKWDRELI SERWKNFPSPVDAAFRQGHNSVFLIKGDKVWVYPPEKKEKGYPKLLQDEFPGIPSPLDAAVECHRGE C  
 QAEGVLFQGDREWFWDLATGTMKERSWPAVGNCS SALLRWLG RYYCFQGNQFLRFDPVRGEVPPRYPRDVRDYFMPC  
 PGRGHGHRNGTGHGNS THHGPEYMRCS PHLVLSALTS DNHGATYAFSGTHYWR LDTSRDGWHSWPIAHQWPQGPSAV  
 DAAFSWEEKLYLVQGTQVYVFLTKGGYTLVSGY PKRLEKEVGT PHGIILDSVDAAFICPGSSRLHIMAGRRLWLDL  
 KSGAQATWTELPWPHEKVDGALCMEKSLGPN SCSANGPGLYLIHGPNLYCYS DVEKLNAAKALPQPQNVTSLLGCTH-C



**Abbildung 15** Extraktion von möglichen HBMs des humanen Hämopexins mithilfe von SeqD-HBM und der humanen Hämopexinsequenz. Abbildung abgewandelt nach Wißbrock et al. 2019.<sup>106</sup> Abbildung angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und www.BioRender.com.

Die Sequenzabschnitte enthalten Histidin, Tyrosin oder Cystein als zentrale Aminosäure oder ein CP-Motiv, die das Eisenion von Häm koordinieren. Auf Hämopexin sind Histidin, Tyrosin und Cystein-basierte Motive zu finden.<sup>603</sup> Der Sequenzabschnitt muss zudem basische Reste enthalten, die mit den

Propionatresten von Häm interagieren können und insgesamt muss der Sequenzabschnitt eine positive Nettoladung enthalten. Die Oberflächenzugänglichkeit der Sequenzmotive wird mithilfe einer Vorhersageanwendung mit dem Namen *Weighted Ensemble Solvent Accessibility* (WESA) überprüft.<sup>636,637</sup> Das mehrfach aus der Literatur bekannte Motiv um H79 (VWKSHKWDR)<sup>35,36</sup> wurde von WESA ausgeschlossen, da es auf Basis der Vorhersage nicht genug Oberflächenexponiert liegt. Das aus der Literatur bekannte Motiv um H150 (AVECHRGEC)<sup>1</sup> wurde aufgrund der intramolekularen Disulfidbrücke ebenfalls ausgeschlossen. Beide Motive wurden dennoch zu den 11 durch SeqD-HBM vorgeschlagenen Motiven für die Abarbeitung einer Synthese hinzugefügt, da durch eine konformationelle Änderung des Proteins die Motive ihre Oberflächenzugänglichkeit ändern könnten und sich die Disulfidbrücke so drehen könnten, dass der zentrale Histidinrest für Häm zugänglich wird. H79 wird mehrfach in der Literatur genannt.<sup>604</sup> Die in der 2022 publizierte Arbeit von Lechuga et al. vorgeschlagenen bisher unbekannt Motive um H373 (SSRLHIMAG), H400 (LPWPHEKVD) und H429 (LYLIHGPNL) wurden im Folgenden nicht fokussiert.<sup>667</sup> H400 (LPWPHEKVD) besitzt eine Nettoladung  $\pm 0$  und wurde deshalb vom Algorithmus ausgeschlossen, die Motive um H373 und H429 wurden aufgrund ihrer nicht vorhandenen Oberflächen-Zugänglichkeit von WESA exkludiert.

Im Rahmen meiner Masterarbeit wurden die ausgewählten Motive in Form von 13 Nonapeptiden mittels Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Fmoc/tert-Butyl-Strategie synthetisiert, wobei die Cysteine der Motive HRGECQAEG, HGPEYMRCS, RCSPHLVLS, VTSLLGCTH durch die Verwendung von Fmoc-Methyl-Cystein-OH maskiert wurden. Im Protein sind alle Cysteine in Disulfidbrücken involviert und die Methylgruppe besitzt einen ähnlichen Radius wie das Schwefelatom.<sup>638</sup> Die intramolekulare Disulfidbrücke des Motivs AVECHRGEC wurde durch Oxidation geschlossen.<sup>604</sup> Aufgereinigt wurden die Peptide mittels präparativer HPLC und charakterisiert mittels ASA, DC, und MALDI-TOF-MS, sowie die Affinität zu Häm mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. 6 der 13 Peptide, nämlich die Motive um H79, H105, H236, H238, H260 und H293, zeigen eine bathochrome Verschiebung der Soret-Bande auf etwa 420 nm, was auf eine Hämbindung hinweist und ermöglichen aufgrund der



Verschiebung die Bestimmung einer Dissoziationskonstante.<sup>603,604</sup> Alle sechs Peptide gehören zur Klasse V mit Histidin als zentral Häm-koordinierende Aminosäure, im Rahmen der Klassifizierung auf Basis eines früheren Peptidbibliothek-Screenings und zur UV-Gruppe 1, da ihre Differenzspektren bei Hämtitration ein Minimum bei rund  $\lambda \approx 370$  nm und ein Maximum bei rund  $\lambda \approx 420$  nm besitzen.<sup>103,106,609,610,632,639</sup>

Das in der Literatur von Paoli et al. vorgeschlagene Motiv um H150 (AVECHRGEC), sowie das von Lechuga et al. vorgeschlagene Motiv um H462 (VTSLLGCTH) zeigen im Nonapeptidmodell im Rahmen meiner Masterarbeit keine Hämbindung.<sup>1,603,604,667</sup> Von den 13 charakterisierten Peptiden rücken mehrere Motive, die im Folgenden und im Rahmen meiner Doktorarbeit beleuchtet werden, besonders in den Vordergrund. Die Sequenz, die Nettoladung und Lokalisation im Protein sowie die Affinitäten dieser Motive für Häm sind in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** Informationen über die Sequenz, der Nettoladung, der Lokalisation innerhalb des humanen Hämopexins und der bestimmten Dissoziationskonstante der Interaktion mit Häm zu den Peptiden 1 bis 6, abgewandelt aus meiner Masterarbeit.<sup>604</sup>

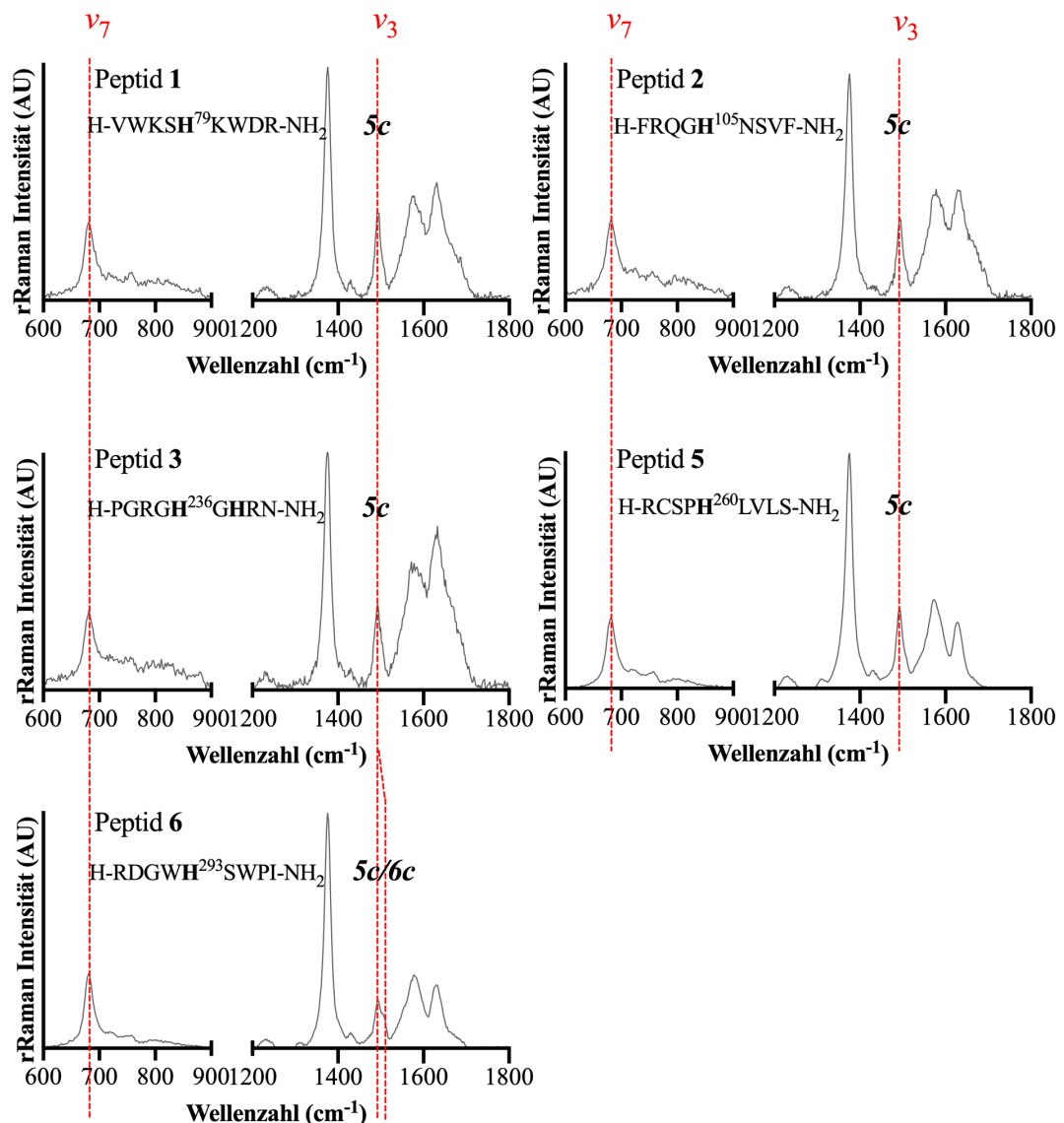
Peptid	Sequenz	Nettoladung	Lokalisation	Diss.-Konstante zu Häm
Peptid 1	H-VWKS <b>H</b> <sup>79</sup> KWDR-NH <sub>2</sub>	+3	N-terminale Domäne	3,72 ± 0,23 μM
Peptid 2	H-FRQ <b>G</b> <sup>105</sup> NSVF-NH <sub>2</sub>	+2	N-terminale Domäne	0,48 ± 0,24 μM
Peptid 3	H-PGR <b>G</b> <sup>236</sup> GHRN-NH <sub>2</sub>	+4	Linkerpeptid	3,61 ± 0,37 μM
Peptid 4	H-R <b>G</b> <sup>H<sup>238</sup>RNGT-NH<sub>2</sub></sup>	+4	Linkerpeptid	0,35 ± 0,17 μM
Peptid 5	H-RCSP <b>H</b> <sup>260</sup> LVLN-NH <sub>2</sub>	+2	C-terminale Domäne	0,16 ± 0,06 μM
Peptid 6	H-RDG <b>W</b> <sup>293</sup> SWPI-NH <sub>2</sub>	+1	C-terminale Domäne	5,67 ± 0,58 μM

Während das von Paoli et al. vorgeschlagene Motiv um H150 keine Hämbindung zeigt,<sup>1</sup> so bindet das Motiv um H105 (FRQGHNSVF, im Folgenden als Peptid **2** bezeichnet) Häm mit hoher Affinität. Dies kann mit der Anwesenheit der Nettoladung von +2 und den hydrophoben aliphatischen Resten (F, V, W) erklärt werden.<sup>106,603,604,609,667</sup> Das in der Literatur bekannte Motiv um H79 (VWKSHKWDR),<sup>35,36</sup> im Folgenden als Peptid **1** bezeichnet, zeigte eine moderate Affinität zu Häm, verglichen mit den Peptiden **2**, **4** und **6**. Das bereits in der Röntgenkristallstruktur (PDB: 1QHU) bestätigte H236 und H293, wobei letzteres in einer ebenfalls in einer neueren Studie vorgeschlagen wird,<sup>667</sup> mit den Motiven (PGRGHGHRN, im Folgenden als Peptid **3** bezeichnet und RDGWHSWPI, im Folgenden als Peptid **6** bezeichnet) zeigen lediglich eine moderate Hämaffinität.<sup>1</sup> Hier könnte die effiziente Hämbindung dennoch auf die Bildung einer spezifischen Hämbindungstasche im Proteinkontext zurückzuführen sein, die durch eine große Konformationsänderung bei Hämassoziation vermittelt wird.<sup>1,478,603</sup> Peptid **3** besitzt zwei Histidinreste mit einem Platzhalter, dies könnte ein HBM mit der Konsensussequenz HXH darstellen, da das Peptid um H238, im Folgenden als Peptid **4** bezeichnet, eine hohe Affinität zu Häm aufweist.<sup>610</sup> Das Motiv um H260 (RCSPHLVLS, im Folgenden als Peptid **2** bezeichnet) zeigt eine hohe Affinität zu Häm und repräsentiert außerdem das Peptid mit der höchsten Affinität der 13 Motive für Häm.<sup>603,604</sup> Der Affinitätsunterschied zwischen den Nonapeptidmodellen und dem Protein könnte mit der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins erklärt werden, die diese Bindungen durch hydrophobe bzw. basische Reste in der näheren Umgebung der Hämbindungsstelle unterstützt und Häm in der passenden Orientierung in die räumliche Nähe der Hämbindungsstelle geleitet wird.

### *5.2.2 Hämopexin-basierte Peptide binden Häm hexakoordiniert*

Für die weitere Charakterisierung der Peptid-Häminteraktion der Peptide **1** bis **6** wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 2-dimensionale NMR-Studien in Erwägung gezogen, die aufgrund der fehlenden Löslichkeit unter NMR-Bedingungen der Häm-Peptid Komplexe durch rRaman-Studien ersetzt wurden. rRaman-Spektroskopie etablierte sich als Standardmethode um die

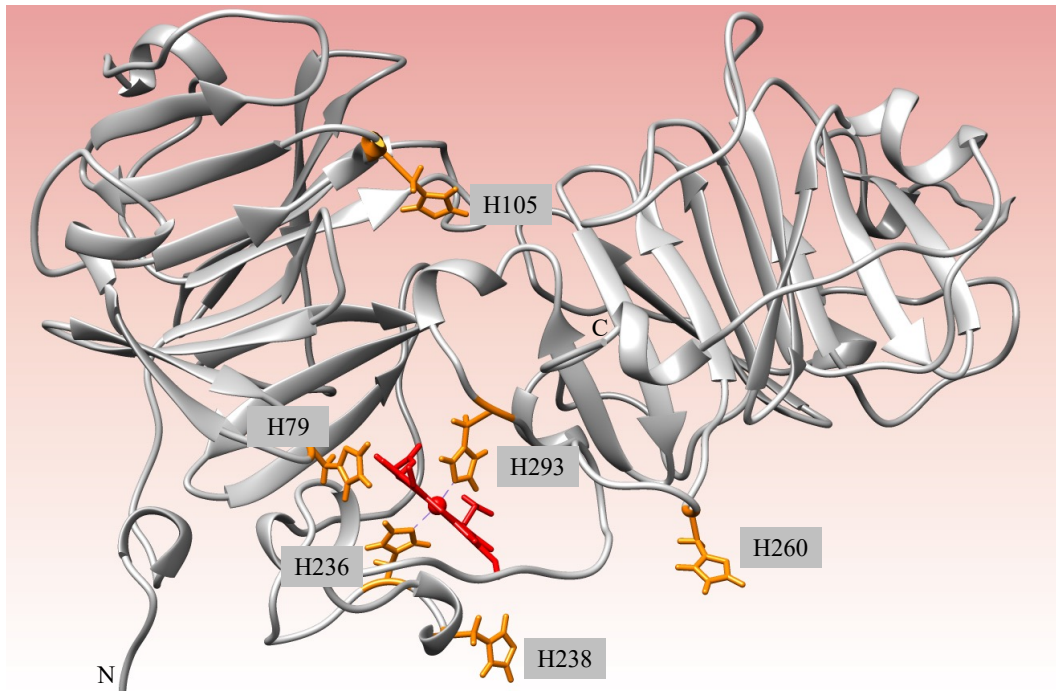
Komplexgeometrie von Häm-Peptid-Komplexen und die Koordination des zentralen Eisenions (Eisen (III)) zu untersuchen. Ishikawa et al. 2005 konnten die Koordination und die Komplex-Geometrie eines Cystein-kordinierten Komplexes aus Häm und des bakteriellen *iron response regulator protein* mithilfe von Raman-Studien aufklären.<sup>103,639–642</sup> Für die Peptide **1** bis **6** können aussagekräftige Spektren für Häm (III)-Komplexe erhalten werden, bis auf Peptid **4**, das sich als nicht löslich erwiesen hat. Die Spektren sind Abbildung 16 zu entnehmen.



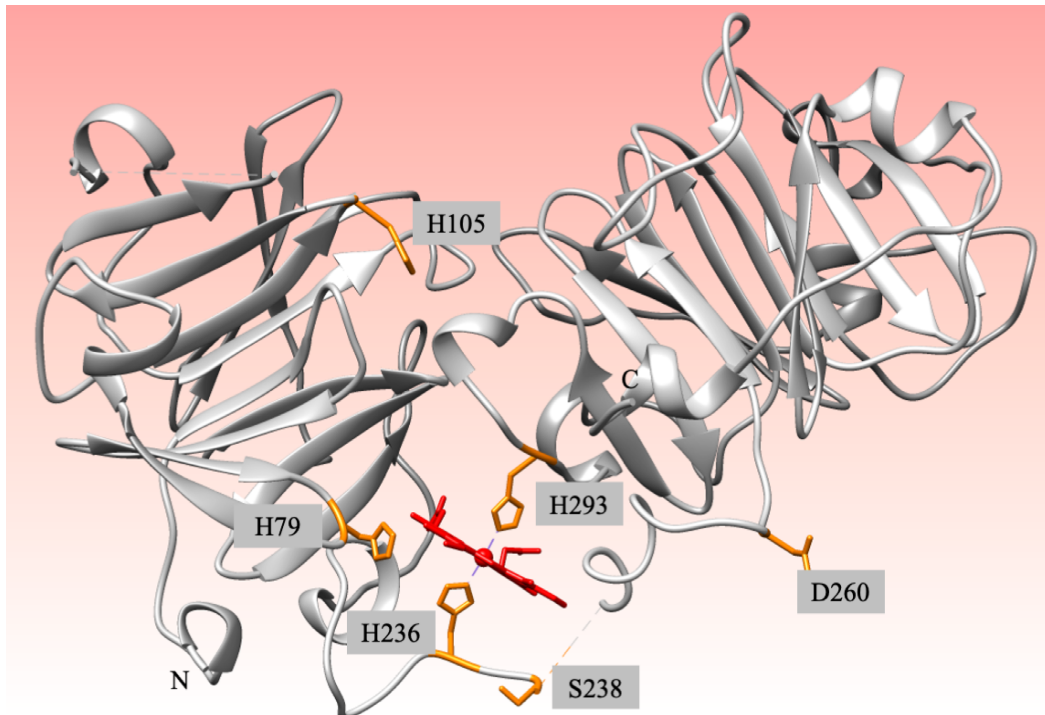
**Abbildung 16** rRamanspektren der Peptide **1** (Motiv VWKSH<sup>79</sup>KWDR), **2** (Motiv FRQKH<sup>105</sup>NSVF), **3** (Motiv PGRGH<sup>236</sup>GHRN), **5** (Motiv RCSH<sup>260</sup>LVLS) und **6** (Motiv RDGWH<sup>293</sup>SWPI). Charakteristisch für die Interaktion mit Häm ist die  $\nu_7$  und die  $\nu_3$ -Bande, deren Maxima mit roten gestrichelten Linien gekennzeichnet sind. Die Peptide sind entweder pentakoordiniert (5c), odergemischt penta- und hexakoordiniert (5c/6c). Abbildung abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al. 2021.<sup>603</sup> und erstellt mit GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Die Anregungswellenlänge beträgt 405 nm. Anregungswellenlängen nahe der Soret-Bande von Häm unterstützen selektiv die Schwingung des Eisen (III)-Häms mithilfe des Resonanz-Raman-Effekts. Diese Wellenlängen stimmen mit der Anregungswellenlänge des Elektronenübergangs des Häms überein und stehen mit diesem in Resonanz.<sup>103,346</sup> Charakteristisch für das rRaman-Spektrum von Häm-Peptid-Komplexen ist die  $\nu_7$ -Bande bei  $\approx 680 \text{ cm}^{-1}$ , ausgelöst durch Schwingungen durch  $C_b$ - $C_a$ -N-Verformung und  $C_a$ - $C_b$ -Streckung<sup>639</sup> und die dominante  $\nu_4$ -Bande bei  $\approx 1375 \text{ cm}^{-1}$ , die durch eine Pyrrol-Halbringstreckung ausgelöst wird. Weiterhin die  $\nu_3$ -Bande bei  $\approx 1490 \text{ cm}^{-1}$ , die durch asymmetrische  $C_a$ - $C_b$ -Streckung ausgelöst wird, die  $\nu_2$ -Bande bei  $\approx 1565 \text{ cm}^{-1}$ , ebenfalls ausgelöst durch symmetrische Deformation, sowie die  $\nu_{22}$ -Bande bei  $\approx 1630 \text{ cm}^{-1}$ , ausgelöst durch asymmetrische  $C_a=C_b$ -Streckung.<sup>346,643</sup> Die  $\nu_7$ -Bande intensiviert sich, je planarer der Porphyrinring vorliegt.<sup>644</sup> Ein besonderes Augenmerk liegt auf der  $\nu_3$ -Bande, die Aufschluss über den Koordinationszustand des Eisen (III)-Ions von Häm gibt.<sup>639</sup> Liegt die  $\nu_3$ -Bande bei  $\nu \approx 1490 \text{ cm}^{-1}$ , so liegt der Eisen (III)-Peptid-Komplex pentakoordiniert (5c) vor. Eine Aminosäure des Peptids dient als Koordinationsstelle für das Eisen (III) von der einen Seite und die andere Seite dient als Koordinationsstelle für einen Wasserliganden.<sup>639,642,645</sup> Ist die Bande zu höheren Wellenzahlen verschoben,  $\nu \approx 1505 \text{ cm}^{-1}$ , so repräsentiert diese Bande die hexakoordinierte Form (6c), also die Koordination des Eisen (III) von zwei Peptidresten.<sup>639,642,645</sup> Alle sechs untersuchten Peptide zeigen die dominante  $\nu_4$ -Bande und eine eindeutige  $\nu_7$ -Bande. Die Peptide **1** bis **5** zeigen scharfe  $\nu_3$ -Banden, was für eine Pentakoordination des Eisen (III) spricht. Peptid **6** zeigt eine  $\nu_3$ -Bande mit einer hin zu längeren Wellenzahlen verschobenen Schulter, was für eine gemischte Penta- und Hexakoordination, mit überwiegendem Vorliegen von Pentakoordination spricht.<sup>603</sup> Damit kann neben der UV/Vis-Spektroskopie<sup>603,604</sup> mit einer orthogonalen Methode bestätigt werden, dass die Hämopexin-basierten Nonapeptide Häm binden. Im Kontext des humanen Hämopexins könnte dies bedeuten, dass Häm, wie in der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU), durch die Reste H236 und H293 hexakoordiniert wird und ein weiterer Histidinrest auf der Oberfläche von Hämopexin für die Bindung eines weiteren Hämoleküls zur Verfügung steht.<sup>603</sup> Notwendig für die Bindung eines weiteren Histidinrests ist die Solvenz Zugänglichkeit aller möglichen

Hämbindenden Reste, so wie die exponierte Lage an der Oberfläche des Proteins. Die Lage der möglichen Histidinreste wurde mithilfe eines Homologiemodells von humanem Hämopexin, das mithilfe von SWISS-MODEL<sup>616</sup> von F. Steinbock kreiert wurde,<sup>614</sup> in Abbildung 17 und auf der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin (PDB: 1QHU) aus Kaninchenserum (Abbildung 18) visualisiert.



**Abbildung 17** Das Homologiemodell<sup>614</sup> von humanem Hämopexin ist in grau dargestellt, mit orange markierten Histidinresten und dem rot markierten Hämolekül, das von den Resten H236 und H293 koordiniert wird. Der N-Terminus ist mit N gekennzeichnet, der C-Terminus mit C. Abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al. 2021<sup>603</sup> Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und UCSF Chimera, Version 1.15.

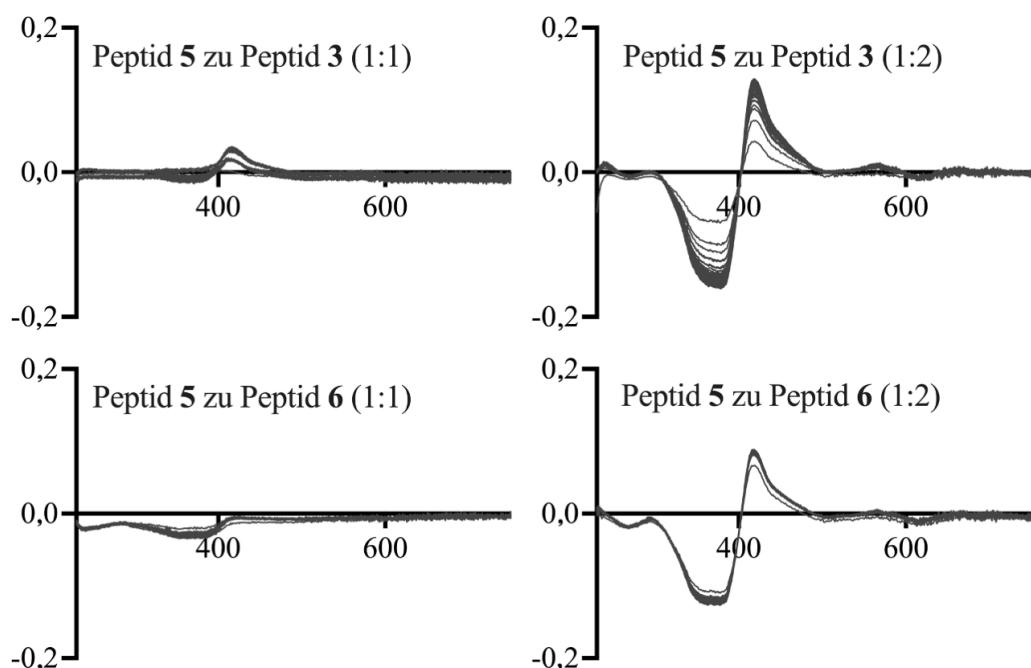


**Abbildung 18** Die Röntgenkristallstruktur von Hämopexin (PDB: 1QHU<sup>1</sup>) aus Kaninchenserum ist in grau dargestellt, mit orange markierten Histidinresten und dem rot markierten Hämolekül, das von den Resten H236 und H293 koordiniert wird. Der N-Terminus ist mit N gekennzeichnet, der C-Terminus mit C. Abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al. 2021<sup>603</sup> Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und UCSF Chimera, Version 1.15.

Die Reste H238 und H260 sind in der Sequenz des Kaninchen-Hämopexins (S238 und D260) nicht konserviert, jedoch in Säugern wie dem Orangutan (Abbildung 13). Dies könnte dafür sprechen, dass größere Säuger mit einem höheren Verwandtschafts-Grad von Hämopexin zum Menschen (Orangutan: 98,49 %) als das Kaninchen (79,96 %) <sup>646</sup> ein effizienteres Hämopexin besitzen könnten als Spezies die weniger mit dem Menschen verwandt sind. H79, H105, H260 liegen alle Oberflächenexponiert und dem Solvens zugewandt, während die Reste H236 und H293 in einer Bindungstasche tiefer im Protein liegen und H238 am Eingang der Bindungstasche. Aus dieser Beobachtung resultiert die Frage, wie die verborgenen Reste H236 und H293 und im Nonapeptid moderat-affinen Hämbindenden Motive Häm direkt aus dem Plasma fangen und binden könnten. Erklärt werden könnte dies mit der Hypothese, dass ein Transfer des Hämoleküls innerhalb des Hämopexinmoleküls erfolgen könnte. <sup>603,604</sup>

### 5.3 Hämübergabe von Hämopexin-basierten Nonapeptiden

Da das Motiv um H260 im Nonapeptidmodell die höchste Affinität (mit  $K_D = 0,16 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ) der Nonapeptide zu Häm besitzt und dieses Motiv in räumlicher Nähe zu der Bindungstasche steht, rückt dieses Motiv in den Vordergrund eines weiteren Experiments, um die Hypothese eines zweiten Oberflächenexponierten Hämoleküls auf Hämopexin zum Fangen eines weiteren Hämoleküls zu spinnen. H260 liegt auf dem Protein dem Solvens zugewandt und könnte als erste Kontaktstelle zwischen Häm und Apo-Hämopexin dienen. In einem Experiment mittels UV/Vis-Spektroskopie wird diese Hypothese unterstützt.<sup>603</sup> Zunächst wird ein äquimolarer Komplex aus dem Motiv um H260, repräsentiert durch Peptid 5, und Häm gebildet. Dieser Komplex wird jeweils mit einer Lösung von Motiv um H236, repräsentiert durch Peptid 3, und einer Lösung von Motiv um H293, repräsentiert durch Peptid 6 versetzt. Die Übergabe von Häm wird spektroskopisch untersucht.



**Abbildung 19** Differenzspektren (Hämspektrum und Kontrollen abgezogen vom Spektrum des Häm-Peptid-Komplex) des Transfers von Häm von einem 1:1 Komplex mit dem Motiv um H260, repräsentiert durch das Peptid 5, je zu den Motiven um H236, repräsentiert durch Peptid 3, und H293, repräsentiert durch Peptid 6. Einmal in äquimolarer Peptidkonzentration und einmal im Überschuss von Peptid 3 bzw. Peptid 6. Abbildung abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al. 2021.<sup>603</sup> und erstellt mit GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Wie Abbildung 19 zu entnehmen ist, wird das Experiment zunächst in äquimolaren Peptidkonzentrationen durchgeführt, also das Peptid **5** und je das Peptid **3** und **6** in gleicher Konzentration. Die Änderung der Absorption ist in Form von Differenzspektren dargestellt.<sup>603</sup> Dabei liegt der Fokus auf der Änderung der Soret-Bande von Häm bei ca. 420 nm. Bei äquimolaren Peptidkonzentrationen findet kein Hämtransfer von Peptid **5** (Motiv um H260) zu Peptid **3** (Motiv um H236) bzw. Peptid **6** (Motiv um H293) statt. Das ist vergleichbar mit den relativ zuvor bestimmten Dissoziationskonstanten, da Peptid **5** (Motiv um H260) eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 0,16 \pm 0,06 \mu\text{M}$  besitzt und Peptid **3** (Motiv um H236) eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 3,61 \pm 0,37 \mu\text{M}$ , bzw. Peptid **6** (Motiv um H293) eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 5,67 \pm 0,58 \mu\text{M}$ .<sup>603</sup> Dies spricht dafür, dass im Kontext des Proteins die Bindungsstelle zwischen H236 und H293 die zweite nieder-affine Bindungsstelle repräsentieren und die hoch-affine Bindungsstelle auf der Oberfläche, zum Beispiel bei H260 liegen könnte. Der Hämtransfer von der hoch-affinen Bindungsstelle zur nieder-affinen Bindungsstelle könnte über eine konformationelle Änderung von Hämopexin ablaufen, die die Reste der nieder-affinen Bindungsstelle (H236 und H293) in räumliche Nähe zu dem Rest der hoch-affinen Bindungsstelle (zB. H260) bringen könnte. Nach Transfers von Häm an die Reste in der Bindungstasche, könnte H260 ein weiteres Hämolekül binden.

In einer Abwandlung des Experiments werden das Peptid **3** (Motiv um H236) bzw. **6** (Motiv um H293) mit einer doppelten molaren Konzentration vorgelegt. Unter diesen Bedingungen ist ein Transfer des Hämoleküls von H60 zu H236 bzw. H293 möglich und unterstützt das eben aufgeführte Szenario. Ein Peptidüberschuss von Peptid **3** (Motiv um H236) bzw. **6** (Motiv um H293) heißt, *in vitro* mehr Moleküle im selben Volumen – die Moleküle sind sich räumlich näher. Hier ist eine Übergabe des Hämoleküls möglich.<sup>603</sup> In Verbindung mit humanem Hämopexin bedeutet dies die Übergabe von Häm von einem hoch-affinen oberflächenexponierten Rest wie H260 zu der Bindungstasche zwischen H236 und H293, die durch eine konformationelle Änderung in die räumliche Nähe von H260 gebracht werden können und die anschließende Bindung eines weiteren Häms durch H260. Für diese Idee, dass beispielsweise. H260 als transiente Hämbindungsstelle dienen könnte und anschließend in die Bindungstasche



weitergegeben wird, spricht die Koordination von Häm: Bei beispielsweise H260 liegt das Häm pentakoordiniert vor, es wäre immer noch die sechste Koordinationsstelle des Eisenions im Häm für einen weiteren Liganden frei, das Häm ist nicht chemisch inert. In der Bindungstasche liegt das Häm geschützt und durch die Hexakoordination chemisch inert gegenüber Reaktanden vor.

Der intermolekulare Hämtransfer wird durch ein schon in meiner Masterarbeit durchgeführtes Experiment unterstützt, bei dem die Übergabe von Häm-Peptid-Komplexen mit den Peptiden **2** bis **6** zu humanem Hämopexin untersucht wurde.<sup>603,604</sup> Hämopexin ist bereits im Überschuss gegenüber den Häm-Peptid-Komplexen fähig Häm von den Peptiden zu übernehmen. In der Lösung beträgt die Stöchiometrie [Häm:Peptid-Komplex]:Hämopexin ([2:2]:1). Die Absorption des Soret-Bande ist höher als wenn Hämopexin mit äquimolaren Hämmengen versetzt wird. Daraus kann geschlossen werden, dass Hämopexin zum einen mehr als ein Häm von den Peptiden übernehmen kann, zum anderen, dass ein Transfer von Häm zwischen mehreren Hämbindungsstellen in Hämopexin möglich ist. Außerdem ist Hämopexin dadurch fähig, bereits im Komplex vorliegendes Häm von anderen Resten zu übernehmen.<sup>603,604</sup> Letztere Beobachtung stimmt damit überein, dass Hämopexin Häm aus dem Komplex mit HSA übernehmen kann.<sup>474,500</sup>

#### 5.4 Hämaffinitätsstudie mit Hämopexin-basiertem Peptid

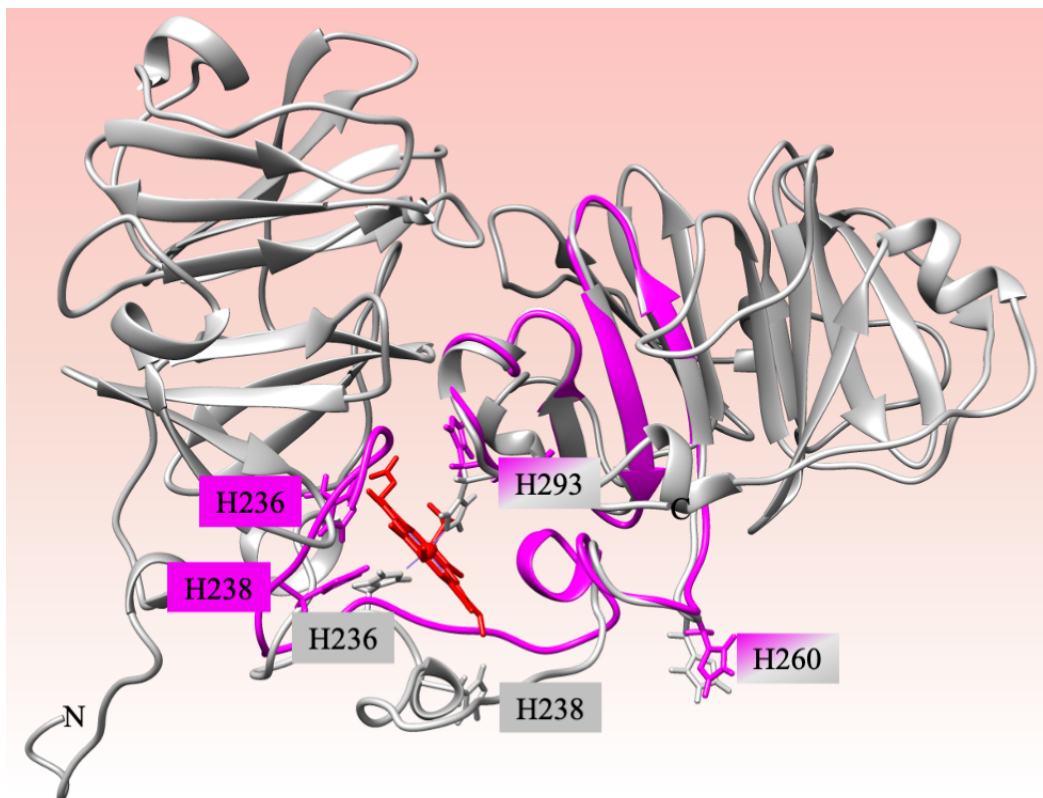
Um die Ergebnisse des Transferexperiments der Nonapeptide mit einem längeren Modellpeptid zu untermauern, ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein 66 Aminosäure langes Polypeptid synthetisiert worden, das sich über alle drei in den vorigen Studien fokussierte Motive, H236, H260 und H293, und einen weiteren Rest, H238, erstreckt (siehe Abbildung 20). H238 liegt im Protein am Eingang der Bindungstasche und sein Nonapeptidmodell mit  $K_D = 0,35 \pm 0,17 \mu\text{M}$  besitzt eine hohe Affinität zu Häm.<sup>603</sup>

H-PGRGH<sup>236</sup>GH<sup>238</sup>RNGTGHGNS<sup>260</sup>THHGPEYMRCS<sup>260</sup>PH<sup>260</sup>LVL  
SALTS<sup>293</sup>DNHGATYAFSGTHYWR<sup>293</sup>LDTSRDGW<sup>293</sup>SWPI-NH<sub>2</sub>

**Abbildung 20** Primärstruktur des Hämopexin-basierten 66 Aminosäure langen Peptids mit markierten Histidinresten, in rot die in der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum koordinierenden

Reste,<sup>1</sup> in grau die durch Nonapeptid-basierten Studien vorgeschlagenen Reste. In rosa ist das Linkerpeptid markiert.

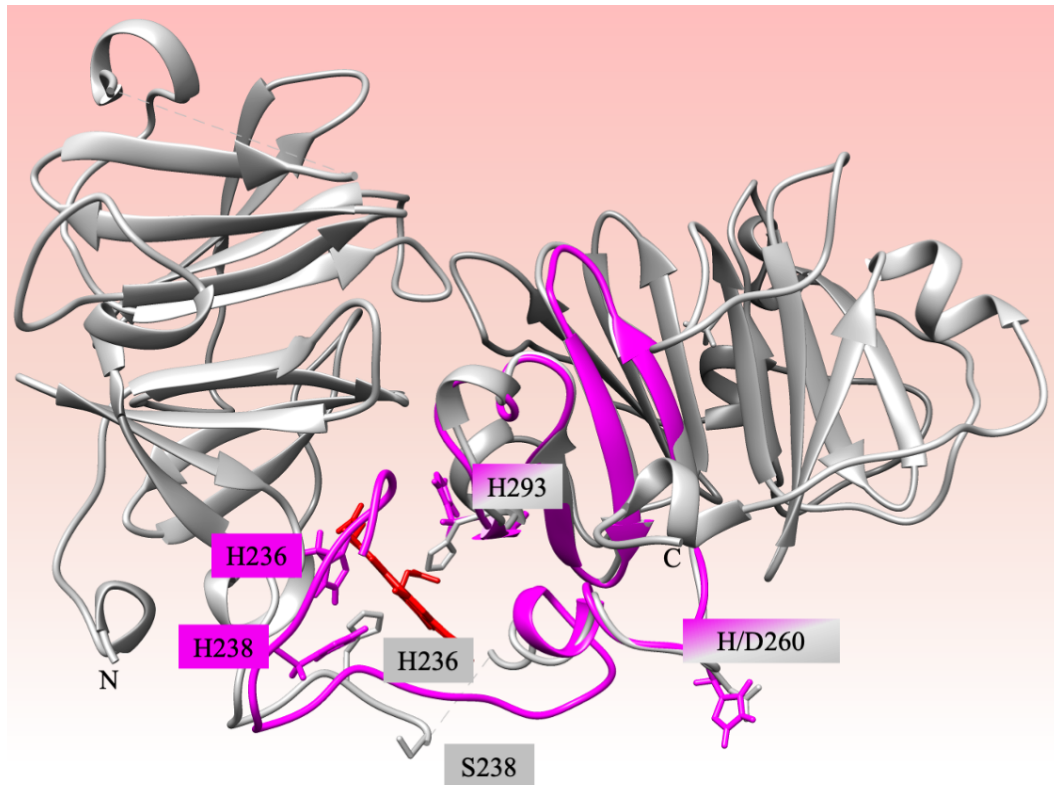
Nach der Charakterisierung des 66 Aminosäure langen Peptids, im Folgenden als Peptid 7 bezeichnet, mittels MS, HPLC und ASA, ist das Peptid zur Untersuchung der Interaktion mit Häm hinzugezogen worden. Die Struktur eines Homologiemodells des Peptids 7 ist dem korrespondierenden Teil des humanen Hämopexins sehr ähnlich:<sup>603</sup> Das Peptid repräsentiert unter anderem das Linkerpeptid, das in der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU) in Teilen nicht abgebildet ist, obwohl das Linkerpeptid essenziell für die Hämbindungstasche ist.<sup>603</sup> Eine Überlagerung des Homologiemodells des Peptids 7 und des Homologiemodells des humanen Hämopexins ist Abbildung 21 zu entnehmen.



**Abbildung 21** Überlagerung des Homologiemodells von Hämopexin und des Peptid 7. Das Homologiemodell<sup>614</sup> von humanem Hämopexin ist in grau dargestellt, das Peptid 7 ist in violett dargestellt. Die Position der jeweiligen Histidinreste ist in grau für das Protein, in violett für das Peptid dargestellt, Reste die sowohl im Protein als auch im Peptid an derselben Position liegen, sind gemischt grau und violett dargestellt. Der N-Terminus des Proteins ist mit N gekennzeichnet, der C-Terminus mit C. Abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al. 2021<sup>603</sup> Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und UCSF Chimera, Version 1.15.

Das Peptid besitzt mehrere Sekundärstrukturelemente, die auch im Homologiemodell des humanen Hämopexins zu finden sind. Dazu gehören die  $\beta$ -Faltblätter und C-terminalen  $\alpha$ -Helices. Der N-terminale Teil des Peptids ist

flexibel und besitzt, wie das Homologiemodell des humanen Hämopexins und korrespondierend zum Linkerpeptid, kein definiertes Sekundärstrukturelement. Eine Überlagerung des Homologiemodells des Peptids 7 und der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU) ist Abbildung 22 zu entnehmen.

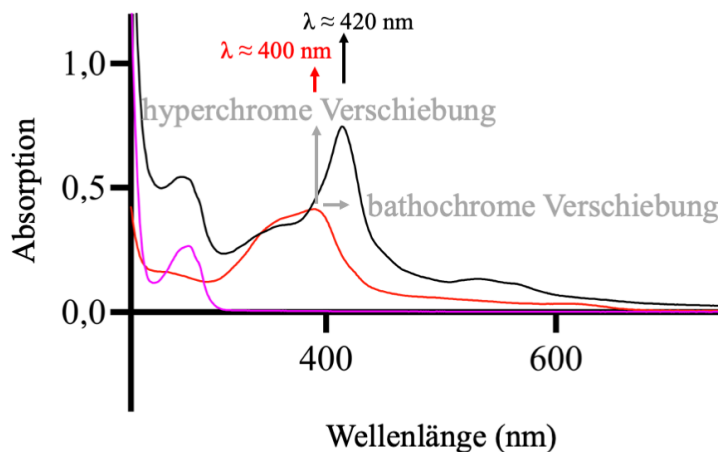


**Abbildung 22** Überlagerung des Röntgenkristallstruktur von Hämopexin und des Peptid 7. Die Röntgenkristallstruktur von Hämopexin (PDB: 1QHU<sup>1</sup>) aus Kaninchenserum ist in grau dargestellt, das Peptid 7 in violett dargestellt. Die Position der jeweiligen Histidinreste ist in grau für das Protein, in violett für das Peptid dargestellt, Reste die sowohl im Protein als auch im Peptid an derselben Position liegen, sind gemischt grau und violett dargestellt. Der N-Terminus des Proteins ist mit N gekennzeichnet, der C-Terminus mit C. Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und UCSF Chimera, Version 1.15.

Das Linkerpeptid ist mit 20 Aminosäuren (P234 bis T253) in der Röntgenkristallstruktur wesentlich kürzer als der korrespondierende Teil im menschlichen Hämopexin mit 24 Aminosäuren (P232 bis T255), bzw. dem in Peptid 7 (P1 bis T24), weswegen der N-terminale Teil des Peptids 7 nicht deckungsgleich mit der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU<sup>1</sup>) ist und die Eigenschaften von Hämopexin aus Kaninchenserum nicht auf das des humanen Hämopexins projiziert werden sollten.

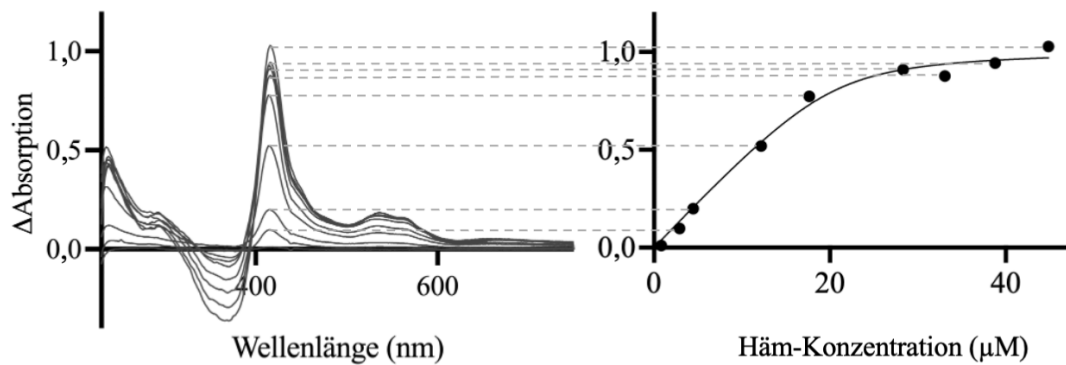
Das Peptid 7 wird zunächst einem Hämaffinitätsexperiment unterzogen, das schon in früheren Studien erfolgreich angewendet wurde.<sup>103,624</sup> Aufsteigende Konzentrationen einer HämLösung (0,4 bis 40  $\mu$ M) werden je zu einer Lösung des

Peptids 7 gegeben und die Änderung der Soret-Bande mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Die Spektren zeigen bathochrome und hyperchrome Verschiebungen (von  $\lambda \approx 400$  nm nach  $\approx 420$  nm) von der Soret-Bande, was für eine Bindung von Häm spricht.<sup>603</sup> In Abbildung 23 sind exemplarisch für eine Hämkonzentration die Spektren dargestellt, aus denen nach Abzug der Kontrollen (Peptid, Puffer, Häm) die Differenzspektren hervorgehen.



**Abbildung 23** Die generierten Rohspektren des Peptids 7 mittels UV/Vis-Spektroskopie. Das Peptid 7 (violett) mit einer Konzentration von 10  $\mu$ M, das Rohspektrum von Häm (rot) mit einer Konzentration von 10  $\mu$ M und einem Maximum von  $\lambda \approx 400$  nm, sowie das Spektrum des Komplexes (schwarz) und einem Maximum bei  $\lambda \approx 400$  nm. Die Soret-Bande von Häm im Komplex verschiebt sich im Vergleich zum Rohspektrum von Häm hyperchrom und bathochrom (in grau dargestellt). Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Für alle Hämkonzentration werden von den Spektren des jeweiligen Komplexes das Spektrum von Häm und das des Peptids abgezogen. Daraus resultieren die Differenzspektren, diese sind in Abbildung 24 dargestellt. Die Differenzspektren (links) können, im Rahmen der Klassifizierung auf Basis eines Peptidbibliothek-Screenings<sup>609</sup>, der UV-Gruppe 1 zugeordnet werden. Die Maxima (rechts) der Differenzspektren dienen als Basis für die Bestimmung der Dissoziationskonstante mit der Gleichung von Bogdan et al. 2008.<sup>611</sup>

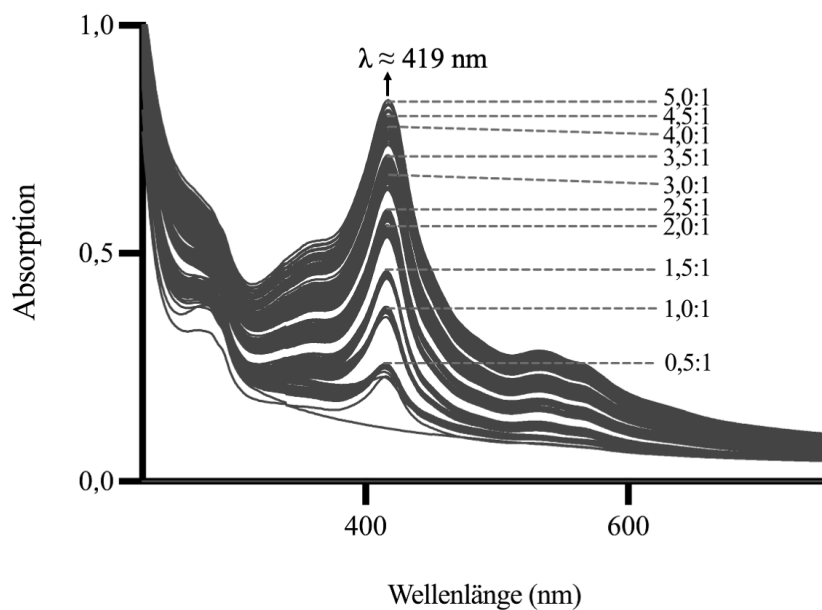


**Abbildung 24** Ausgewertete Spektren aus dem Experiment zur Hämaffinität. Links: Differenzspektrum der Häminteraktionsstudie mit Peptid 7, abgewandelt von Detzel und Schmalohr et al. 2021.<sup>603</sup> Rechts: Auftragung der Maxima der Differenzspektren gegen die Hämkonzentration. Die Maxima dienen als Grundlage zur Bestimmung der Dissoziationskonstante. Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Für die Affinität von Häm und Peptid 7 wird eine starke Bindung zu Häm beobachtet, für die eine Dissoziationskonstante von  $1,13 \pm 0,58 \mu\text{M}$  bestimmt werden kann. Die Stöchiometrie wird mit  $>1:1$  (Häm:Peptid) charakterisiert.<sup>603</sup> Diese Resultate decken sich mit der Hypothese, dass das humane Hämopexin mehr als ein Hämmolekül binden könnte. Angenommen, Hämopexin besäße eine hoch-affine Bindungsstelle und eine nieder-affine Bindungsstelle, so gibt dieses Ergebnis außerdem den Hinweis darauf, dass sich, neben der angenommenen Hämbindungsstelle zwischen H236 und H293 die zweite Hämbindungsstelle innerhalb der korrespondierenden Region zu Peptid 7 auf Hämopexin befinden könnte. Die Dissoziationskonstante von  $1,13 \pm 0,58 \mu\text{M}$  könnte einen gemischten Wert der beiden möglichen Hämbindungsstellen repräsentieren, beispielsweise einer nieder-affinen Hämbindungsstelle zwischen H236 und H293 in der tiefen Bindungstasche mit den Dissoziationskonstanten auf Basis der Nonapeptide mit H236 (Peptid 3,  $K_D = 3,61 \pm 0,37 \mu\text{M}$ ) und H293 (Peptid 6,  $K_D = 5,67 \pm 0,58 \mu\text{M}$ ) und einer hoch-affinen Bindungsstelle auf der Oberfläche des Proteins, repräsentiert beispielsweise durch H260 (Peptid 5,  $K_D = 0,16 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ) oder H238 (Peptid 4,  $K_D = 0,35 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ). H238 liegt am Eingang der Bindungstasche und ist damit nicht so Oberflächenexponiert wie H260 und kommt im physiologischen Kontext der Hämolyse als möglicher Kandidat für das „Fangen“ von Häm aus dem Blutplasma weniger in Betracht. Zudem ist die Position N240 im Protein glycosyliert und könnte die Hämbindung an H238 sterisch hindern.<sup>519</sup>

## 5.5 Hämtitration mit Hämopexin-basiertem Peptid

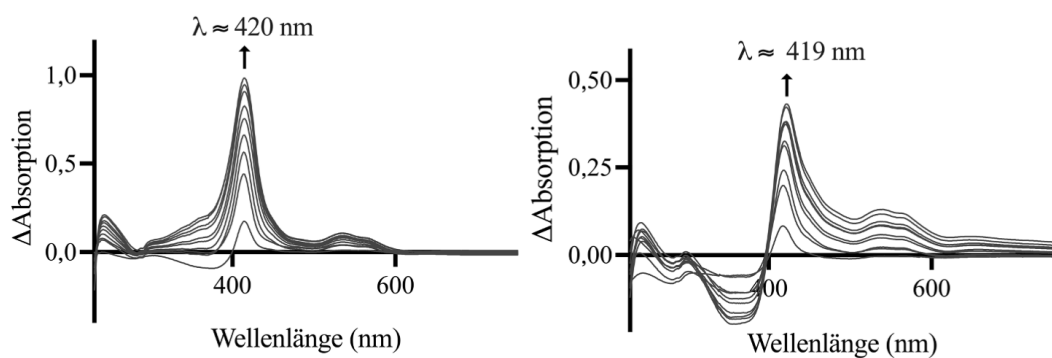
Mit humanem Hämopexin wurde im Vorfeld, im Rahmen meiner Masterarbeit, eine Titration von humanem Hämopexin mit Häm durchgeführt.<sup>604</sup> Analog zu diesem Titrations-Experiment wurde derselbe Versuchsaufbau für das Peptid 7 im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Im Gegensatz zum Versuchsaufbau der UV/Vis-Studie in Kapitel 5.4, die zur Bestimmung der Hämaffinität dient, ist das Ziel dieses Versuches, die Spektren zwischen Hämopexin und dem Peptid 7 zu vergleichen und so eine mögliche Übertragbarkeit der Ergebnisse des Peptids auf humanes Hämopexin zu untersuchen. Für die Titration ist als flüssiges Medium PBS-Puffer gewählt worden, der näher an die physiologischen Bedingungen im Blutplasma angepasst ist. Eine hochkonzentrierte Hämlösung von 500  $\mu\text{M}$  wird in kleinen Volumina zu Protein 7 titriert (Hämkonzentration von 2,5 bis 23,8  $\mu\text{M}$ ).



**Abbildung 25** Rohspektren der Titration von Häm mit Peptid 7. Durch die grau gestrichelten Linien sind die Maxima derjenigen Spektren markiert, bei denen für die jeweilige Hämzugabe keine Zunahme der Absorption mehr beobachtet wird. Die Reihenfolge des beschrifteten Verhältnisses ist Häm:Peptid. Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Nach einer Hämzugabe werden so lange kontinuierlich Spektren aufgenommen, bis sich ein Gleichgewicht in der Küvette einstellt und die Absorption sich nicht mehr verändert, respektive zunimmt. Dies geschieht nach ca. 33 Minuten, anschließend wird weitere Hämlösung zugegeben und der Vorgang

wiederholt. Die Rohspektren sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Volumenzunahme durch die Hämzugabe in der Küvette wird als vernachlässigbar klein erachtet. Je mehr Häm zugegeben wird, desto weniger stark steigt die Absorption und ab einer Konzentration von  $23,8 \mu\text{M}$  verändert sie sich nicht mehr. Spektren ( $\lambda \approx 230$  und  $750 \text{ nm}$ ) von einzelnen Lösungen (Puffer, Häm und Peptid) werden als Referenz aufgenommen und zur Erstellung von Differenzspektren abgezogen. Die Differenzspektren, die aus Spektren nach Gleichgewichtseinstellung bei jeder einzelnen Hämzugabe zu Hämopexin bzw. zu Peptid 7 resultieren, sind in Abbildung 26 abgebildet.



**Abbildung 26** Ausgewertete Spektren aus der Titration von Häm mit Hämopexin bzw. Peptid 7. Links: Differenzspektren der Titration von Häm mit humanem Hämopexin, erhalten im Rahmen meiner Masterarbeit, abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al. 2021.<sup>603,604</sup> Rechts: Differenzspektren der Titration von Häm mit Peptid 7, abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al. 2021.<sup>603</sup> Die Abbildung wurde angefertigt mit Microsoft Power Point, Version 16.54 und GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Sowohl Hämopexin als auch das Peptid zeigen ein vergleichbares und für Hämbindung typisches Maximum von ca.  $\lambda \approx 420 \text{ nm}$ . Unterhalb von  $\lambda \approx 400 \text{ nm}$  unterscheiden sich die Spektren, da die von Hämopexin sich im Positiven Absorptionsbereich befinden, die des Peptids 7 ein Minimum im Negativen bei ca.  $\lambda \approx 380 \text{ nm}$  aufweisen. Eine Erklärung könnte zum einen die unterschiedliche Länge, als auch die zusätzlichen aromatischen Aminosäuren von Hämopexin sein, die das Spektrum beeinflussen. Oberhalb von  $\lambda \approx 400 \text{ nm}$  ähneln sich das Protein- und das Peptid-Spektrum. Sie fallen langsam ab und besitzen zwei kleinere Maxima zwischen  $\lambda \approx 500$  bis  $600 \text{ nm}$ . Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das Peptid 7 einen ähnlichen Bindungsmodus wie das Protein besitzen könnte.<sup>603</sup> Aus den Spektren ergibt sich überdies ein weiterer Aufschluss: Auch nach Zugabe von Häm über das Verhältnis von 1:1 bis hin zum fünffachen Überschuss, zeigen sowohl das Protein als auch das Peptid eine Zunahme der Absorption. Dies spricht, deckend mit den Ergebnissen der SPR-Studie,<sup>603</sup> für die Bindung von mehr als einem Häm

von Protein bzw. Peptid. Vielmehr nähern sich die Maxima der Soret-Bande ab dem Verhältnis 2:1 (Häm:Peptid 7) einer Sättigung an. Dies könnte ein weiterer Hinweis sein, dass das Peptid 7 und in Konsequenz auch Hämopexin zwei Hämoleküle binden könnten, vielleicht verbunden durch eine konformationelle Änderung der Sekundärstruktur.

## 5.6 Hämopexin und Peptid 7 binden Häm in gemischten Modi

Orthogonal zu den UV/Vis-Spektroskopie-basierten Methoden wird das Peptid 7 ebenfalls einer rRaman-spektroskopischen Studie unterzogen, um den Bindungsmodus zwischen Häm und Peptid aufzuklären. Angelehnt an die UV/Vis-Studien, die einen Hinweis auf eine Stöchiometrie von 2:1 (Häm:Protein) geben, werden zwei verschiedene Komplexe untersucht. Zunächst wird ein Komplex aus einer Lösung von Peptid 7 und einer Lösung aus Häm im Verhältnis von 1:1 gebildet und untersucht. Anschließend wird die Studie im Verhältnis 2:1 (Häm:Peptid) wiederholt. Die Spektren sind Abbildung 27 zu entnehmen.

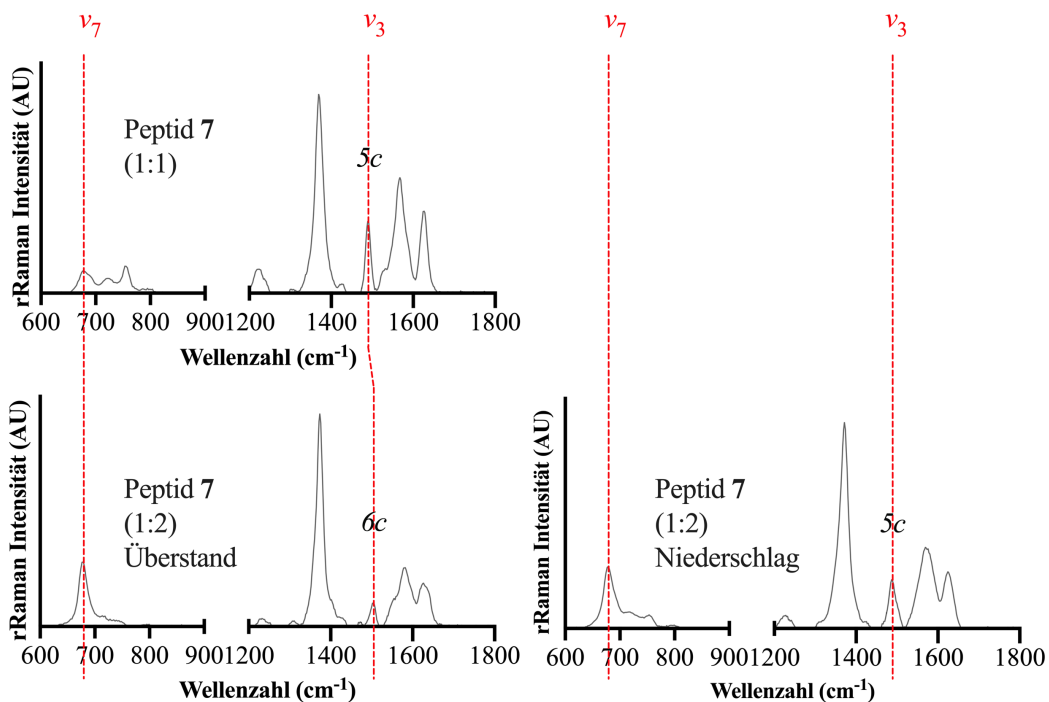


Abbildung 27 rRamanspektren des Peptids 7, oben im Verhältnis 1:1 und unten im Verhältnis 1:2 (Peptid:Häm). Der Komplex 1:2 präzipitiert während der Inkubation, weshalb der Niederschlag und der

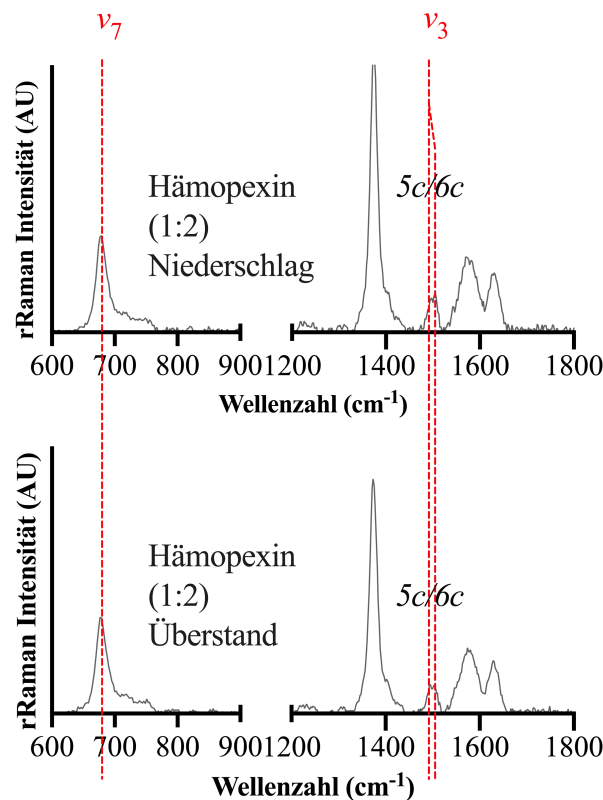


Überstand unabhängig voneinander untersucht worden sind. Charakteristisch für die Interaktion mit Häm ist die  $\nu_7$  und die  $\nu_3$ -Bande, deren Maxima mit roten gestrichelten Linien gekennzeichnet sind. Das Häm wird durch das Peptid entweder pentakoordiniert (5c), oder hexakoordiniert (6c) gebunden. Spektren unten abgewandelt nach Hopp et al. 2022.<sup>602</sup> Abbildung angefertigt mit GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Der Komplex im Verhältnis 1:1 ist pentakoordiniert, erkennbar an der klaren  $\nu_3$ -Bande, wie schon in früheren Studien gezeigt wurde.<sup>103,623,632</sup> Es könnte sich bei den Hämkoordinierenden Resten um die schon oben diskutierten oberflächen-exponierten Reste H238 oder H260 handeln, wobei H260 der am meisten Oberflächenexponierte Rest ist und sich in der Nähe von H238 im Protein eine Glycosylierungsstelle (N240) befindet, die die Hämbindung sterisch hindern könnte.<sup>519</sup> Bei der Vorbereitung des Komplexes im Verhältnis 2:1 (Häm:Peptid) präzipitiert der Komplex während der Inkubation. Eine Präzipitation durch Hämaggregation, ausgelöst durch pH-Wert-Schwankungen, schwankende Salzkonzentrationen oder das Solvens ist unwahrscheinlich,<sup>308</sup> da die Hämlösung frisch hergestellt worden ist und der Komplex im Verhältnis 1:1 nicht präzipitiert. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Präzipitation eine Konsequenz der Komplexbildung ist.<sup>602</sup> Der Überstand und der Niederschlag werden voneinander getrennt und anschließend der Überstand und der resuspendierte Niederschlag unter denselben Bedingungen gemessen. Anhand der Spektren ist festgestellt worden, dass der Niederschlag einen pentakoordinierten Komplex darstellt, während sich im Überstand ein hexakoordinierter Komplex aufhält. Dies könnte darauf hindeuten, dass der pentakoordinierte Komplex ausfällt, während der hexakoordinierte Komplex in Lösung verbleibt.<sup>602</sup> Damit hat die Hämbindung einen Einfluss auf die Löslichkeit des Peptides, was dafürspricht, dass eine konformationelle Änderung nach Hämbindung im Peptid erfolgt sein könnte, die die Orientierung der dem Solvens zugewandten Aminosäurereste ändert. Es ist wahrscheinlich, dass der hexakoordinierte Komplex durch die sich in der Bindungstasche befindenden Reste H236 und H293 repräsentiert wird und der pentakoordinierte Komplex durch H238 oder H260. Dies deckt sich mit den Dissoziationskonstanten des Nonapeptidmodells, mit H260 ( $K_D = 0,16 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ) bzw. H238 ( $K_D = 0,35 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ) als hoch-affines Hämbindendes Peptid und H236 ( $K_D = 3,61 \pm 0,37 \mu\text{M}$ ) bzw. H293 ( $K_D = 5,67 \pm 0,58 \mu\text{M}$ ) als mäßig-affines Hämbindendes Peptid (Klassifikation analog zu Brewitz et al. 2015<sup>639</sup>).

Eine Untersuchung des Bindungsmodus von Hämopexin mit einem Hämüberschuss von 2:1 (Häm: Protein) selbst ist ebenfalls vorgenommen worden.

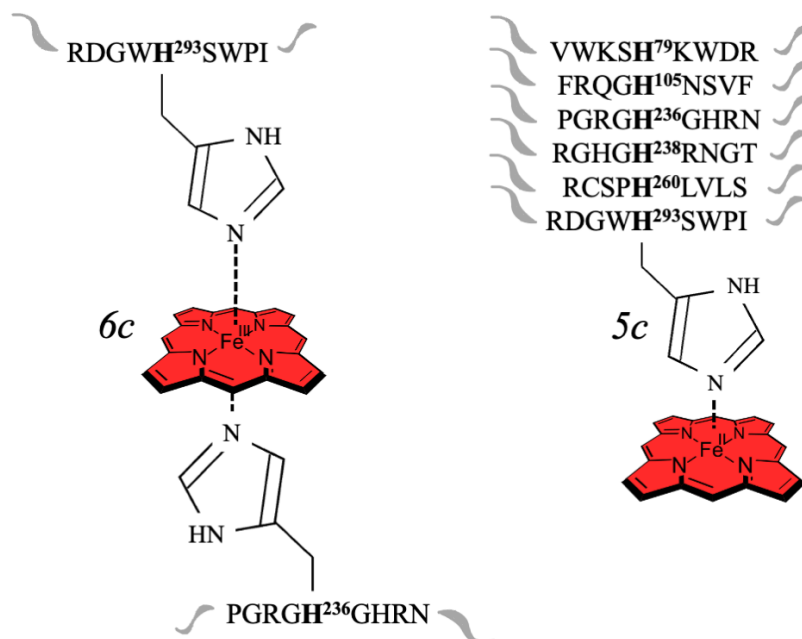
Die Beobachtung für das Peptid 7 kann auf Proteinebene bestätigt werden. Im Zuge der Inkubation präzipitierte der Komplex aus Häm und Hämopexin ebenfalls. So ist, analog zum Peptid 7 anzunehmen, dass die Hämbindung eine konformationelle Änderung im Protein hervorruft, die die Zugänglichkeit von manchen Aminosäureresten zum Solvens verändert. Nach Abtrennung des Niederschlags vom Überstand ist sowohl für den resuspendierten Niederschlag als auch für den Überstand eine rRaman-Messung erfolgt. Die korrespondierenden Spektren sind Abbildung 28 zu entnehmen.



**Abbildung 28** rRamanspektren von Hämopexin im Verhältnis 1:2 (Hämopexin:Häm). Der Komplex präzipitiert während der Inkubation, weshalb der Niederschlag und der Überstand unabhängig voneinander untersucht worden sind. Charakteristisch für die Interaktion mit Häm ist die  $\nu_7$  und die  $\nu_3$ -Bande, deren Maxima mit roten gestrichelten Linien gekennzeichnet sind. Das Häm wird von Hämopexin gemischt pentakoordiniert und hexakoordiniert (5c/6c) gebunden. Spektren unten abgewandelt nach Hopp et al. 2022.<sup>602</sup> Abbildung angefertigt mit GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Die Bindungsmodi beider Fraktionen können einer gemischten Penta- und Hexakoordination zugeordnet werden.<sup>602</sup> Im Kontext des Proteins, und im Gegensatz zur Situation in Peptid 7, bei dem das Spektrum des Niederschlags einer Pentakoordination und das des Überstands einer Hexakoordination von Häm zugeordnet werden kann, ist die Bande für die Hexakoordination von Häm in sowohl dem Überstand als auch im Niederschlag zu finden. Sie könnte durch die Bindungsstelle zwischen H236 und H293, analog der Röntgenkristallstruktur von

Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU<sup>1</sup>) repräsentiert werden. In beiden Fraktionen ist zudem ein pentakoordinierter Komplex zu finden. Hier rücken die Reste H238, das am Eingang der Hämbindungsstasche liegt und in dessen Nähe im Protein (N240) eine Glycosylierungsstelle liegt und damit unwahrscheinlicher ist, und H260, analog zum Peptid 7 weiterhin in den Vordergrund. Wobei die Reste H79, das im Nonapeptidmodell aufgrund der fehlenden Oberflächenzugänglichkeit von WESA ausgeschlossen worden ist,<sup>603,604</sup> und H105,<sup>1,667</sup> dessen Nonapeptidmodell ebenfalls eine hohe Affinität zu Häm ( $K_D = 0,48 \pm 0,24 \mu\text{M}$ ) zeigt, jedoch weiter weg als H260 von der Hämbindungsstasche liegt, als mögliche Hämbindungsstellen ohne Studien am gesamten Protein nicht final ausgeschlossen werden dürfen. Die verschiedenen möglichen Bindungsmodi, die im Protein den gemischt penta- bzw. hexakoordinierten Zustand erklären könnten, ist in Abbildung 29 dargestellt.

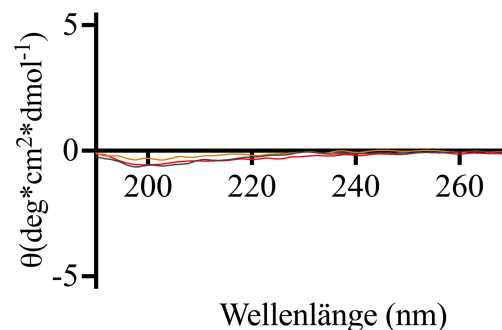


**Abbildung 29** Übersicht über die beiden Bindungsmodi, Penta- und Hexakoordination. Es sind die möglichen Histidinreste sowie die zugehörigen HBMs dargestellt. Abbildung angefertigt mit GraphPad Prism, Version 9.1.0 und Microsoft Power Point, Version 16.54.

Zusätzlich zu diesem Szenario könnte der gemischte Bindungszustand von zwei verschiedenen Hämopexinmolekülen repräsentiert werden, eines hexakoordiniert, beispielsweise durch H236 oder H293 eines pentakoordiniert durch zum Beispiel H260. Doch ist dieses Szenario bei niedrigeren Hämkonzentrationen wahrscheinlicher als bei Hämüberschussbedingungen wie denen im physiologischen Kontext der Hämolyse.<sup>602</sup>

## 5.7 Das Hämopexin-basierte Peptid ist flexibel

In einer neueren in 2021 publizierten Studie von Karnaukhova et al. wird berichtet, dass bei einer mittels CD-Spektroskopie untersuchten Titration von Häm mit Hämopexin, bei niedrigen Hämkonzentrationen nicht nur ein monolober Cotton-Effekt bei 420 nm, sondern auch ein zusätzlicher schwacher Cotton-Effekt bei 404 nm auftritt.<sup>480</sup> Höhere Hämkonzentrationen induzieren ein deutliches bisignates induziertes CD-Muster, das von den AutorInnen auf die Kopplung zwischen Hämolekülen, die an zwei Hämbindungsstellen gebunden sind, zurückzuführen ist.<sup>480</sup> Basierend auf diesem Experiment entstand die Idee, Information über den Bindungsmodus von Häm und Peptid 7 anhand einer eventuellen Änderung der Sekundärstrukturelemente nach Hämzugabe mittels CD-Spektroskopie zu erlangen. Neben dem Apo-Peptid wird der 1:1 und der 2:1 (Häm:Peptid)-Komplex untersucht. Die CD-Spektren sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30** CD-Spektren des Apo-Peptid 7 und von Komplexen aus Häm und Peptid 7. In einer Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  in schwarz, des 1:1-Komplexes (Häm:Peptid 7) in orange und des 2:1-Komplexes (Häm:Peptid 7). Keines der Spektren zeigt Sekundärstrukturelemente, was möglicherweise auf die hohe Flexibilität des Peptids zurückzuführen ist. Abbildung abgewandelt nach Hopp et al. 2022<sup>602</sup> und angefertigt mit GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Bereits eine Peptidkonzentration von ca. 0,005 mg/ml reicht für die Analyse mittels CD-Spektroskopie aus.<sup>647</sup> Auf die molare Masse von Peptid 7 bezogen bedeutet dies eine Konzentration von ca. 0,68  $\mu\text{M}$ . Es wurden Ansätze bis hin zu einer Peptidkonzentration von 75  $\mu\text{M}$  durchgeführt und alle zeigen ein ähnliches Spektrum: Ein Spektrum, bei dem keine für Sekundärstrukturelemente typische Banden zu finden sind. Wie eine negative Bande bei 222 und 208 nm und eine

positive Bande bei 193 nm für  $\alpha$ -Helices, oder eine negative Bande bei 218 nm und eine positive Bande bei 195 nm für antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, erkennbar sind.<sup>647–649</sup> Das Peptid ist zu flexibel um unter den Bedingungen für den CD-spektroskopischen Wellenlängen-Bereich CD-Signale zu verursachen und eine Berechnung der Sekundärstrukturelemente oder eine Änderung der Sekundärstrukturelemente nach Komplexbildung zu erlauben. Die Erkenntnis, dass das Hämopexin-basierte Peptid 7 flexibel ist, deckt sich mit dem Vergleich des Peptids und des Proteins. Der korrespondierende Teil auf dem menschlichen Protein besteht zu großen Teilen aus dem flexiblen Linkerpeptid (PGRGHGHRNGTGHGNSTHHGPEYM) und der C-terminalen Domäne, dessen Teile beispielsweise aufgrund der Flexibilität nicht in der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (1QHU<sup>1</sup>) abgebildet werden können.

### 5.8 *In silico*-Studien unterstützen die *in vitro*-Ergebnisse

Die *in vitro*-Studien dieser Arbeit und weitere Studien<sup>1,36,480</sup> weisen geschlossen auf mehr als eine Hämbindungsstelle auf Hämopexin hin, wobei ein zweifelsfreier struktureller Beweis aufgrund der limitierten verfügbaren Techniken bisher nicht gegeben ist.<sup>602</sup> Aus diesem Grund werden mithilfe von *in silico*-Studien im Rahmen der Masterarbeit von F. Steinbock (geb. Lamprecht)<sup>614</sup> und Arbeiten von Dr. A. Paul George und B. Schmalohr (geb. Syllwasschy) die Interaktion von Hämopexin und dem Hämopexin-basierten mit Häm beleuchtet. Zunächst wurden Homologiemodelle von Apo- und Holo-Hämopexin mithilfe von SWISS-MODEL erstellt und deren Stabilität mittels einer 200 ns langen MD-Simulation untersucht.<sup>603,616</sup> Die Dynamik von Apo- und Holo-Hämopexin ähnelt einander und die RMSD-Werte des Peptidrückgrats sind bei ca. 175 ns strukturell stabil.<sup>603</sup> Wie schon durch die Auflösung der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum bekannt (1QHU<sup>1</sup>) und durch die *in vitro*-Studien mit Peptid 7 mittels CD-Spektroskopie bestätigt, ist die strukturelle Fluktuation in der Region des Linkerpeptids am größten. Das Linkerpeptid formt eine flexible Schleife, die in die Hämbindung involviert sein könnte.<sup>603,614</sup> Gezielte Molekulare Dockingexperimente mit Apo-Hämopexin und den vorgeschlagenen Histidinresten

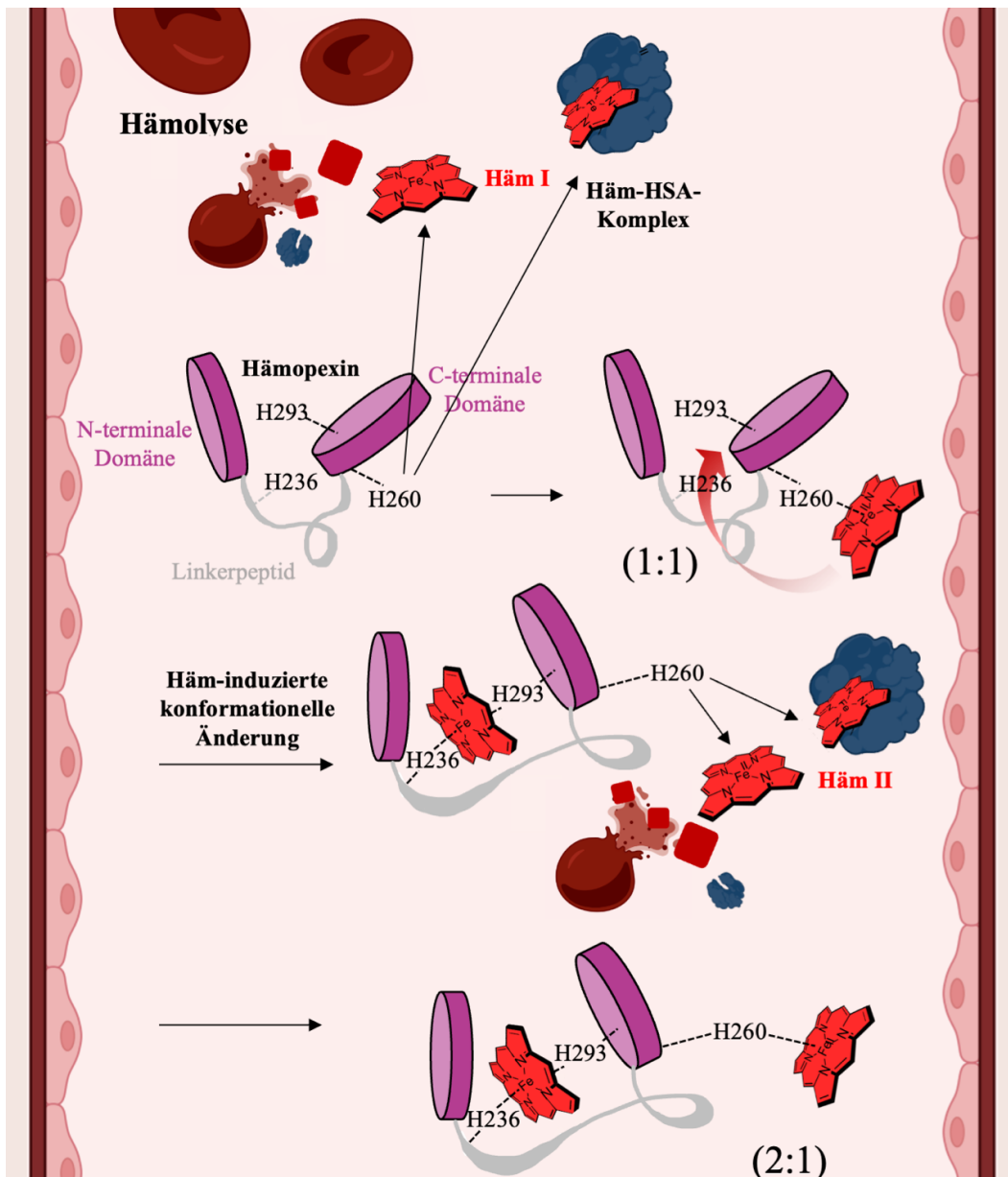
(H79, H105, H150, H236, H238, H260, H293) bestätigen die Bildung von stabilen, pentakoordinierten Komplexen zwischen Häm und H79, H238 beziehungsweise H260. Auch H105 und H150 sind im Dockingexperiment in der Lage Häm zu binden. Eine Analyse der Bindungsenergien zeigt jedoch, dass H105 und H150 im Vergleich zu den anderen HBMs schwächere Hämbindungsaffinitäten besitzen.<sup>603,614</sup> Die schwächeren Bindungsfähigkeiten von H105 und H150 lassen sich durch die Position und den suboptimalen, für Lösungsmittel zugänglichen Bereich der beiden Motive erklären. Die beiden Motive sind weder vollständig exponiert, wie im Fall von H260, noch befinden sie sich, wie H238, in der Nähe des Eingangs der Hämbindungstasche, die in der Röntgenkristallstruktur im Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU<sup>1</sup>) die Hämbindenden Reste H236 und H293 trägt.<sup>603,614</sup> Die Stabilität der Komplexe wird durch eine 500 ps lange *Refinement*-Simulation und einer weiteren 20 ns MD-Simulation untermauert.<sup>603,614</sup> Das selbe Experiment wurde ebenso für Holo-Hämopexin durchgeführt. Hier erweist sich H79 als bestes HBM für ein zweites bindendes Hämolekül. Die Bindung von Häm an H79 wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen H249 und dem Komplex stabilisiert. Auch in Holo-Hämopexin stellt H105 das schwächste HBM dar. Interessanterweise weist H150 im Holo-Hämopexin eine höhere Hämbindungsaffinität als im Apo-Hämopexin auf, die vergleichbar ist mit der von H238 und H260.<sup>603,614</sup> Die Stabilität der Komplexe wurde ebenfalls durch eine 500 ps lange *Refinement*-Simulation und einer weiteren 20 ns MD-Simulation untermauert. Die *in silico*-Studien mit Apo-, Holo-Hämopexin unterstützen die *in vitro*-Ergebnisse.

## 5.9 Vorschlag eines Hämrekrutierungsmechanismus

Aus Hämbindenden Proteinen ist bereits bekannt, dass Häm in mit aromatischen, weniger geladenen und nichtpolaren Aminosäuren angereicherten Hämbindungstasche bindet. Proteine mit solchen Hämbindungstasche unterliegen einer konformationellen Änderung nach Hämbindung.<sup>61</sup> Bereits 1972 wurde durch eine Verschiebung des Maximums der Soret-Bande nach Hämbindung von Hämopexin auf eine Häm-induzierte konformationelle Änderung des Proteins

geschlossen.<sup>473,650</sup> Die durch Häm-Bindung räumlich verkleinerte N-terminale Domäne von Hämopexin bindet an die C-terminale Domäne und löst in dieser eine konformationelle Änderung aus und der Häm-Hämopexin-Komplex wird geformt.<sup>478</sup> In dem in dieser Arbeit entwickelten Häm-Rekrutierungsmechanismus liegt der Fokus auf die spezifischen möglichen Häm-bindenden Reste für ein mögliches zweites Häm-Molekül und nicht auf der Domänen-Interaktion. Aus den *in vitro* und *in silico*-Studien der vorliegenden Arbeit kristallisieren sich H79, H150, H236, H238 und H260 und H293 als mögliche Häm-bindungsstellen heraus. H79 bindet im *in silico*-Experiment mit Holo-Hämopexin zwar Häm, rückt aber aufgrund einer moderaten Affinität für Häm im Nonapeptidmodell mit  $K_D = 3,72 \pm 0,23 \mu\text{M}$ <sup>603</sup> in den Hintergrund. Das Motiv um H150 besitzt eine intramolekulare Disulfidbrücke (C149 → C154). Im *in silico*-Experiment kann H150 Häm zwar binden, jedoch zeigt H150 im Nonapeptidmodell keine Häm-Bindung, das mit sterischer Hinderung erklärt werden kann.<sup>603</sup> Damit rückt dieser Rest für eine potenzielle Häm-Bindungsstelle ebenfalls in den Hintergrund. Die Reste H236 und H293 sind bereits aus der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin (PDB: 1QHU<sup>1</sup>) aus Kaninchenserum bekannt und sind dort der tief gelegenen Häm-Bindungstasche. <sup>1</sup> Sie könnten im humanen Hämopexin ein Häm-Molekül hexakoordiniert binden. Wenn davon ausgegangen wird, dass Häm in die Bindungstasche transferiert wird, kann, basierend auf der Orientierung auf der Oberfläche und der Fähigkeit des Restes Häm aus dem Blutplasma zu „fangen“, H238 als Bindungsinitiator vernachlässigt werden. Dieser Rest liegt tief am Eingang der bekannten Häm-Bindungstasche. Die Bindung eines zweiten Häm-Moleküls an H238 scheint ebenfalls unwahrscheinlich, da die beiden Häm-Moleküle nicht nebeneinander an H236 und H238 gebunden werden können und da N240 im humanen Protein glycosyliert ist.<sup>519</sup>

Der Rekrutierungsprozess könnte stattdessen mit dem „Fangen“ von Häm aus dem Blutplasma oder mit dem Transfer von Häm von HSA, das eine niedrigere Affinität zu Häm ( $K_D = 1 \mu\text{M}$ <sup>466</sup>) als H260 besitzt, durch den für Häm hoch-affinen Rest H260 ( $K_D = 0,16 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ) beginnen, da dieser in räumlicher Nähe der Häm-Bindungstasche liegt.<sup>602,603</sup>



**Abbildung 31** Möglicher neuartiger Hämrekrutierungsmechanismus im Blutplasma mit den aus der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU) bekannten Resten H236 und H293 in der Hämbindungstasche und dem Rest H260, das Häm aus der Lösung oder von HSA übernimmt. Abbildung abgewandelt nach Detzel und Schmalohr et al 2021<sup>603</sup> und angefertigt mit Microsoft PowerPoint, Version 16.54 und GraphPad Prism, Version 9.1.0.

Dass Häm initial aus der Lösung gebunden oder von HSA durch die Reste H236 und/oder H293 in der Hämbindungstasche übernommen wird<sup>30,474,499,500</sup> scheint unwahrscheinlich. Diese Reste liegen zum einen nicht Oberflächenexponiert und zum anderen besitzen diese Reste im Nonapeptidmodell, im Gegensatz zu H260, lediglich moderate Hämbindungsaffinitäten (H236:  $K_D = 3,61 \pm 0,37 \mu\text{M}$ , H293:  $K_D = 5,67 \pm 0,58 \mu\text{M}$ ).<sup>603,604</sup> Analog zur Literatur könnte die Bindung von Häm durch H260 eine konformationelle Änderung im Protein durch die Bewegung des Linkerpeptids verursachen, die das Häm in die aus der



Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU<sup>1</sup>) bekannte Bindungstasche zu den Resten H236 und H293 transferiert. Dies wird durch die Beobachtung der Präzipitation eines (2:1)-Komplexes aus Häm und Hämopexin unterstützt. Die Präzipitation könnte durch eine konformationelle Änderung durch Hämbindung ausgelöst werden. Die Reste H236 und H293 könnten das Häm hexakoordiniert binden. H260 könnte durch den Transfer von Häm wieder ungebunden vorliegen und einen weiteren pentakoordinierten Bindungsvorgang eingehen.<sup>603</sup> Der Häm-Transfer von H260 zu H236 bzw. H293 kann *in vitro* erfolgreich mithilfe der Nonapeptidmodelle mittels UV/Vis-Spektroskopie (Kapitel 5.3) bei einem Hämüberschuss gezeigt werden. Das zweite Hämmolekül könnte ebenfalls aus dem hämolytischen Blutplasma oder von HSA übernommen werden und könnte pentakoordiniert an H260 verbleiben. Damit würde die Stöchiometrie der Bindung 2:1 (Häm:Hämopexin), im Einklang mit den *in vitro*-Ergebnissen der SPR-Spektroskopie (Kapitel 5.1) und den Indizien aus UV/Vis-Spektroskopie (Kapitel 5.4 und 5.5) und rRaman-Spektroskopie (Kapitel 5.2.2 und 5.6) stehen. Die Idee dieses Rekrutierungsmechanismus steht im Einklang mit dem Modell einer Veränderung der Tertiärstruktur von Hämopexin, die eine Rezeptorinteraktion möglich macht, da durch die Bindung des ersten Hämmoleküls eine konformationelle Änderung erfolgen könnte.<sup>478,588,589,650</sup> Die Affinitäten dieser Motive müssen jedoch im Proteinkontext validiert werden, da auch Interaktionen über räumliche Distanzen erfolgen könnten.<sup>98,103,603,632,633,651</sup> Um eine vergleichbare Situation zum Protein zu schaffen, sind Studien mit dem 66 Aminosäure langen Peptid 7 durchgeführt worden, die die Idee des Rekrutierungsmechanismus unterstützen, da zum einen in einer Studie mittels UV/Vis-Spektroskopie mehr als ein Häm gebunden werden kann, und zum anderen mittels rRaman-Spektroskopie Häm im hexakoordinierten Zustand sowie im pentakoordinierten Zustand gebunden wird. Während der hexakoordinierte Zustand nach dem Transfer von H260 in die Bindungstasche zu H236 und H293 repräsentiert werden könnte, so könnte der pentakoordinierte Zustand das zweite Häm, gebunden an das Oberflächenexponierte H260 zeigen. Abschließend deuten sowohl die *in silico*- als auch die *in vitro*-Studien auf einen Rekrutierungsmechanismus von zwei Hämmolekülen mit H260 als zentralen Rekrutierungsbestandteil hin.

## 6. Schlussfolgerung und Ausblick

Hämopexin spielt eine wesentliche Rolle bei der Detoxifikation des Körpers von Häm, das bei hämolytischen Ereignissen aus Hämoglobin in das Blutplasma freigesetzt wird.<sup>24,30,34,472,652</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wird die molekulare Interaktion von Häm und humanem Hämopexin erneut beleuchtet, da der zuletzt publizierte  $K_D$ -Wert für Häm und Hämopexin über 20 Jahre alt ist,<sup>467</sup> bisher keine Röntgenkristallstruktur von menschlichem Hämopexin verfügbar ist und sich trotz dieser Unklarheiten Hämopexin als CSL889 (NFT-Nummer: NCT04285827) bereits in einer klinischen Studie zur Behandlung von Sichelzellanämie befindet.<sup>599,600</sup> Es erscheint kontrastreich, ein Protein im menschlichen Organismus zu testen, dessen molekulare Begebenheiten noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt sind. Dennoch wurde schon lange über die Anwendbarkeit von Hämopexin als therapeutischen Hämfänger diskutiert.<sup>24,374,603,653,654</sup>

Zunächst wurde mittels SPR-Spektroskopie die Affinität von Häm und humanem Hämopexin mit einem  $K_D$ -Wert von  $K_D = 0,32 \pm 0,04$  nM reevaluiert.<sup>603</sup> Dieser Wert ist höher als der bisher oft als  $K_D < 1$  pM zitierte  $K_D$ -Wert von  $K_D = 0,53$  fM<sup>474</sup> und erlaubt die Eingliederung von Hämopexin im physiologischen Kontext, bei dem es bisher außerordentlich erschien, dass Hämopexin mit einer so hohen Affinität für Häm dieses intakt in den Zielzellen der Leber entlässt und wieder zur Zelloberfläche gelangt um erneut in das Blutplasma abgegeben zu werden.<sup>28,258,363,503</sup> Mit einem etwas höheren  $K_D$ -Wert und einer somit niedrigeren Affinität scheint dies wahrscheinlicher zu sein. Zur Vorhersage eines erneuerten  $K_D$ -wertes wurde zudem das stöchiometrische Verhältnis von Häm und Hämopexin untersucht.<sup>602–604</sup> Die SPR-spektroskopische Studie gab ein erstes Indiz, dass mehr als ein Hämolekül an humanes Hämopexin binden.<sup>603</sup> Neben der Stöchiometrie lag vor allem der Vorschlag von genauen Hämbindungsstellen im

Fokus. Auf der Basis des Algorithmus SeqD-HBM wurden HBMs auf Hämopexin vorgeschlagen, die in Form von Nonapeptiden mit einer zentralen Hämkoordinierenden Aminosäure im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden.<sup>603,604</sup> Es wurde eine Theorie einer intramolekularen Hämübergabe entwickelt, die die Bindung von zwei Hämolekülen ermöglicht.<sup>603,604</sup> Für diese Übergabe kristallisierte sich H260 (befindet sich auf der C-terminalen Domäne) heraus, das Häm in eine Bindungstasche, die die Reste H236 (befindet sich auf dem Linkerpeptid) und H293 (befindet sich auf der C-terminalen Domäne) beherbergt, übergeben könnte.<sup>106,603,635</sup> Diese Reste binden in der Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB. 1QHU<sup>1</sup>) das Häm hexakoordiniert. Bei einem Hämüberschuss erfolgt eine Übergabe vom Peptid rund um das hoch-affine H260 ( $K_D = 0,16 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ) zu den Peptiden um H236 ( $K_D = 3,61 \pm 0,37 \mu\text{M}$ ) bzw. H293 ( $K_D = 5,67 \pm 0,58 \mu\text{M}$ ), die mittels UV/Vis-Spektroskopie als bathochrome Verschiebung der Soret-Bande detektierbar ist.<sup>603</sup> Im Vorfeld wurde mithilfe der rRaman-Spektroskopie im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Koordination von Häm der verschiedenen Peptide aufgeklärt. Alle Peptide binden Häm hexakoordiniert, H293 bindet Häm gemischt penta- und hexakoordiniert, wobei die Bande für die Hexakoordination überwiegt.<sup>603</sup> Obwohl Nonapeptide zur Vorhersage von HBMs auf Proteinen erfolgreich angewendet werden konnten,<sup>103,106,623,624,632,633,635</sup> wurde im Rahmen dieser Arbeit, um der Situation im Protein näher zu kommen, ein 66 Aminosäure langes Hämopexin-basiertes Peptid synthetisiert, das die möglichen Hämbindungsstellen H236, H260, H293 abdeckt. Auch eine Titration dieses Peptids mit Häm ergibt eine Stöchiometrie von Häm:Hämopexin (>1:1).<sup>603</sup> rRamanstudien dieses Peptids, das während der Inkubationszeit einen Niederschlag bildete, deuten auf zwei verschiedene Bindungsmodi (Penta- und Hexakoordination) in Niederschlag und Überstand hin. Im selben Experiment zeigt auch Hämopexin einen gemischten Bindungszustand von Penta- und Hexakoordination.<sup>602</sup> Auf Basis der *in vitro*-Studien konnte ein Rekrutierungsmechanismus entwickelt werden, startend mit der Bindung von Häm an das Oberflächenexponierte H260. Das Hämolekül könnte durch eine konformationelle Änderung des Proteins durch die Bewegung des Linkerpeptids in die Hämbindungstasche zu H236 und H293 transferiert werden. *In silico*-Studien zu den Nonapeptiden, einem Homologiemodell von humanem Hämopexin und dem Peptid 7 unterstützen diese Idee.<sup>602,603</sup> Das freigewordene H260 könnte ein weiteres

Häm molekül binden. Damit würde die Stöchiometrie nicht 1:1 betragen, sondern 2:1 (Häm:Hämopexin). Die Bindung von zwei Häm molekülen würde einer höheren molaren Bindungskapazität entsprechen, als in früheren Studien vorgeschlagen.<sup>35,467,473–479</sup> Dies würde im Einklang mit neueren Studien stehen, die ebenfalls darauf hinweisen, dass zwei Häm moleküle pro Hämopexin binden könnten.<sup>1,36,480</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten nicht abschließend gesehen werden. Vielmehr sollten weitere Studien durchgeführt werden, um zweifelsfrei festzustellen, welche Häm bindungsstellen tatsächlich in den Rekrutierungsmechanismus involviert sind. Hierzu könnten Mutationsstudien von Nutzen sein. Verschiedene Histidinreste in humanen Hämopexin könnten zu nicht-Häm bindenden Aminosäuren wie Alanin mutiert werden, die schon in einer früheren Studie als Histidin-Substituent verwendet wurde,<sup>623</sup> und die Häm bindenden Eigenschaften der verschiedenen Hämopexinmutanten untersucht werden. Das H260, das sich in dieser Arbeit als interessantestes Motiv herausstellte, könnte mutiert werden, aber auch Histidinreste, die durch die *in vitro*- und *in silico*-Studien in den Hintergrund rückten, wie H79, H238, H105 und H150. Es wurden in der Vergangenheit bereits Mutationsstudien mit Hämopexin durchgeführt, das mit einer Baculoviren-vermittelten Expression in Sf21-Zellen hergestellt worden ist. Das Resultat dieser Studie war, dass von den Mutanten (H79→T, H105→T, H150→T) die H79→T-Mutante ein beinahe identisches <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zum exprimierten humanen Wildtyp-Hämopexin zeigte, weswegen H79 als möglicher Häm bindender Ligand sowie eine bi-axiale Koordination außer Frage gestellt wurde.<sup>36</sup> Die im Rahmen dieser Arbeit dominierenden Reste H260, aber auch H238 wurden bei dieser Mutationsstudie nicht beachtet und sollten im Rahmen einer Mutationsstudie in Zukunft realisiert werden. Außerdem könnte versucht werden eine Röntgenkristallstruktur des Komplexes von menschlichem Hämopexin, abgesättigt mit Häm, zu generieren. Die bekannte Röntgenkristallstruktur von Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB: 1QHU<sup>1</sup>) wurde aus Plasma isoliertem Hämopexin erhalten, ohne die Bindungssituation während eines Hämüberschusses, wie es bei hämolytischen Zuständen der Fall wäre, einzuschließen. Die Röntgenkristallstruktur von humanem Hämopexin in einer abgesättigten Hämumgebung könnte einen eindeutigen Beweis liefern, ob ein zweites Häm an Hämopexin binden und vor allem wo dieses gebunden werden könnte. Die Situation im Protein könnte anders sein, als in den Studien mit den Nonapeptidmodellen oder

dem 66 Aminosäure langen Peptid 7 beobachtet. Dennoch dienen die Ergebnisse dieser Arbeit der Überdenkung der aktuellen Dosen für die Anwendung von pharmazeutischen Hämopexin in klinischen Studien. Neben der Applikation von Hämopexin bei Sichelzellanämie stehen auch weitere Anwendungsfelder zur Diskussion. Dazu gehören hämolytische Zustände wie  $\beta$ -Thalassämie oder intracerebrale Ischämie.<sup>430,653,655,656</sup> Doch bevor Hämopexin zweifelsfrei in der Klinik Anwendung findet, sollte die Situation im Körper aufgeklärt werden. Alle *in vitro*-Studien erfolgten in höheren Konzentrationen als sie in der Natur auftreten würden. Dies dient der Ermöglichung einer Detektion, die in physiologischen Konzentrationen nicht möglich wäre.<sup>603</sup> Auch der Einfluss auf die Hämbindung der Glycosylierung sollte untersucht werden. Die N-Glycosylierung verändert beispielsweise die Cadherin-vermittelte Bindungskinetik,<sup>657</sup> und auch die Wirksamkeit von Biopharmazeutika wird durch die Glycosylierung beeinflusst,<sup>658</sup> so sollte auch ein Einfluss auf die Hämbindung bei Hämopexin daher nicht unterschätzt werden. Beispielsweise erwies sich H238 im Nonapeptidmodell als hoch-affines HBM ( $K_D = 0,35 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ), im Protein befindet sich an N240 jedoch N-verknüpft ein N-Acetyl-Galactosamin.<sup>519,603</sup> Zwar zeigt sich keine Differenz der Röntgenkristallstrukturen von glycosyliertem und nicht-glycosyliertem Hämopexin aus Kaninchenserum (PDB glycosyliertes Hämopexin (1QJS, nicht-glycosyliertes: 1QHU<sup>1</sup>), jedoch sollte dieser Einfluss vor allem in Bezug auf rekombinantes Hämopexin, wie es unter anderem in Studien von Karnaukhova et al. 2021 verwendet wird, geklärt werden.<sup>480</sup> Unter anderem wird rekombinant modifiziertes Hämoglobin als Sauerstofftherapeutikum bei verschiedenen Krankheitsbildern und bei Anämien verwendet.<sup>30,659</sup> Aufgrund der herausragenden Hämbindenden Eigenschaften von Hämopexin und der hohen Affinitäten der Hämopexin-basierten Peptide könnte ein weiterer Schritt sein, Peptide zu entwickeln, die eine Peptidsequenz auf der Grundlage von Hämopexin besitzen und eine Anwendung als Hämfänger bei akuten hämolytischen Ereignissen finden könnten. Es könnte ein Peptid um die bekannte Bindungstasche von Hämopexin entworfen werden, mit Oberflächenexponierten Resten, die Häm binden und es in eine artifizielle Hämbindungstasche transferieren. Mit *in silico*-Studien könnte ein solches Peptid entworfen werden und mit *in vitro*-Studien beispielsweise mit UV/Vis-Spektroskopie dessen Hämbindung untersucht werden. Alternativ könnte ein zellgängiger Häm-Peptid-Komplex auf Basis der Hämopexin-Sequenzen

entwickelt werden, der eine pharmazeutische Anwendung zur Behandlung bei akuten Porphyrinen finden könnte. Es ist jedoch nach wie vor eine Herausforderung für WissenschaftlerInnen wirksame und sichere Biopharmazeutika in Form von Peptiden zu entwickeln. Insulin ist ein rekombinantes Polypeptidhormon, bei dem die Anwendung am Menschen gelang. Jedoch ist auch hier eine Inzidenz von 44 % für die Antikörperbildung des Körpers nach Anwendung zu finden, die einen Abfall der Wirksamkeit zur Folge hat.<sup>658</sup> Der Unterschied von biopharmazeutischen Peptiden und kleinen Molekülen ist die strukturelle Komplexität und die Glycosylierungsmuster, die erheblich die Wirksamkeit und Sicherheit beeinflussen. Das sich aktuell in der klinischen Studie befindende Hämopexin (CSL889) wird aus Plasma isoliert.<sup>599,600</sup> Dies hat den Nachteil, dass unbekannte Verunreinigungen auftreten können und eine wechselnde Qualität des Produkts auftreten kann, mit Folgen für die Sicherheit.<sup>660</sup> Es könnte eine steigende Immunogenizität auftreten, die Anaphylaxie, oder Infusionsreaktionen zur Konsequenz haben können.<sup>658,661</sup> Bei der automatisierten, nasschemischen Peptidsynthese von Hämopexin-basierten Peptiden würden kalkulierbare Nebenprodukte und Verunreinigungen mit einem wesentlich vereinfachten nötigen Qualitätssicherungsprozess entstehen. Biopharmazeutische Wirkstoffe haben eine kurze Halbwertszeit in der Zirkulation.<sup>658</sup> Um dies bei den Hämopexin-basierten Peptiden zu umgehen und die Bioverfügbarkeit der Hämopexin-basierten Peptide zu erhöhen, könnte man die Peptide modifizieren.<sup>658</sup> Hier wäre voran eine Verwendung von D-Aminosäuren anstatt L-Aminosäuren anzubringen. Es wurde gezeigt, dass D-Aminosäuren eine erhöhte Stabilität gegenüber Proteasen besitzen und somit eine erhöhte Halbwertszeit.<sup>662</sup> Die Addition von Sialinsäure wäre an ein Ende der Peptidkette denkbar, um möglichst die Tertiärstruktur des Peptids nicht zu beeinflussen. Proteine, die keine Sialinsäure am Ende der Kette tragen, werden in der Leber leicht von Asialoglycoproteinrezeptoren (ASGPR) metabolisiert.<sup>663</sup> Eine andere Möglichkeit ist die PEGylierung. Diese Technologie ist bereits etabliert und wird mit der Reaktion mit Monomethoxypolyethylenglycol vollzogen.<sup>658,664–666</sup> Durch die PEGylierung kann eine Verbesserung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften mit einer Erhöhung der Halbwertszeit erreicht werden.<sup>658</sup> Die Wirksamkeit eines neuartigen, artifiziellen auf Hämopexin-basierenden Hämefängers mit den oben genannten Modifikationen und die bereits bestehenden Hämopexin-basierten Nonapeptide, die eine hohe

Hämbindungsaffinität besitzen, dazu gehören das Peptid um H105 (FRQGHNSVF,  $K_D = 0,48 \pm 0,24 \mu\text{M}$ ), H238 (RGHGHRNGT,  $K_D = 0,35 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ), oder H260 (RCSPHLVLS,  $K_D = 0,16 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ), und das Peptid 7 mit einer ebenfalls hohen Affinität (PGRGHGHRNGTGHGNSTHHGPEYMRCSPHLVLSALTSNDHGAT YAFSGTHYWRLDTSRDGWHSWPI,  $K_D = 1,13 \pm 0,58 \mu\text{M}$ )<sup>602-604</sup> könnte zunächst in einem Mausmodell für Hämolyse getestet werden. Dabei könnte im murinen Plasma die Klärung des Blutes von labilem Häm nach Applikation des Hämfinders gemessen werden. Es existiert hierzu bereits ein passendes Hämopexin-*Knockout*-Mausmodell, das 1999 von Tolosano et al. entwickelt wurde.<sup>555</sup> Sollte die labile Hämkonzentration im Blut der Mäuse nach Applikation abnehmen, so wäre dies ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung eines Wirkstoffs zur Behandlung von akuten hämolytischen Ereignissen. Ein weiterer Schritt wäre anschließend die pharmazeutische Weiterentwicklung der Peptide, wie durch Studien zur Absorption, Distribution, Metabolisierung, und Exkretion und einer Entwicklung der Formulierung der Peptide. Auch hier ist das Wissen um die Stöchiometrie von Hämopexin zu Häm notwendig, dessen Indiz zur Aufklärung in dieser Arbeit dargelegt wurde.<sup>602-604,614</sup>

## 7. Literaturverzeichnis

1. Paoli, M., Anderson, B., Baker, H., Morgan, W. T., Smith, A., Baker, E. (1999) Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two  $\beta$ -propeller domains. *Nat. Struct. Biol.* 6, 10, 926–931. doi: 10.1038/13294. ISBN-10: -.
2. Huot de Goncourt, J., Huot de Goncourt, E. *Ideen und Impressionen*. Poeschel und Trepte, 1904. ISBN-10: -.
3. Schury, G. *Lebensflut - Eine Kulturgeschichte des Blutes*. Reclam-Bibliothek, 2001. ISBN-10: 337-9200-12-3.
4. Petermann, H. *Blut: Mythos, Magie, Medizin*. MWV Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2014. ISBN-10: 395-4661-04-7.
5. Schmidt, R. F., Lang, F., Heckmann, M. *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, 2013. ISBN-10: 364-2016-50-2.
6. D'Alessandro, A., Zolla, L. (2017) Proteomic analysis of red blood cells and the potential for the clinic: what have we learned so far? *Expert. Rev. Proteom.* 14, 3, 243–252. doi: 10.1080/14789450.2017.1291347.
7. Zhang, L. *Heme Biology: The secret life of heme in regulating diverse biological processes*. World Scientific, 2011. ISBN-10: 981-4287-92-X.
8. Korolnek, T., Hamza, I. (2014) Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism. *Front. Pharmacol.* 5, 126. doi: 10.3389/fphar.2014.00126.
9. Heinemann, I. U. Jahn, M., Jahn, D. (2008) The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 2, 238–251. doi: 10.1016/j.abb.2008.02.015.



10. Chapman, S. K., Daff, S., Munro, A. W. (1997) Heme: the most versatile redox centre in biology? 88, 39–70. doi:10.1007/3-540-62870-3\_2.
11. Mense, S. M., Zhang, L. (2006) Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Research*. 16, 8, 681–692. doi: 10.1038/sj.cr.7310086.
12. Munro, A., Girvan, H., McLean, K., Cheesman, M., Leys, D. Heme and hemoproteins. In: *Tetrapyrroles: birth, life and death*. Springer Verlag, 2009. ISBN-10: 038-7785-17-5.
13. Roberts, G. P., Kerby, R. L., Youn, H., Conrad, M. (2005) CooA: a paradigm for gas-sensing regulatory proteins. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1, 280–292. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2004.10.032.
14. Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Tsukihara, T., Ogura, T., Shimokata, K., Katayama, Y., Shimada, H. (2006) Reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*. 1757, 5, 395–400. doi: 10.1016/j.bbabbio.2006.04.028.
15. Poulos, T. L. (2006) Soluble guanylate cyclase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 6, 736–743. doi: 10.1016/j.sbi.2006.09.006.
16. Lukin, J. A., Ho, C. (2004) The structure–function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution. *Chem. Rev.* 104, 3, 1219–1230. doi: 10.1021/cr940325w.
17. Wagener, F. A., Abraham, N. G., van Kooyk, Y., de Witte, T., Figdor, C. G. (2001) Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 2, 52–54. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01609-6.
18. Sydenstricker, V. P. (1924) Further observations on sickle cell anemia. *J. Am. Med. Assoc.* 83, 1, 12–17. doi: 10.1001/jama.1924.02660010016004.
19. Bonkovsky, H. L., Guo, J.-T., Hou, W., Li, T., Narang, T., Thapar, M. (2013) Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias. *Compr. Physiol.* 3, 1, 365–401. doi: 10.1002/cphy.c120006.

20. Wagener, F. A. D. T. G., Volk, H.-D., Willis, D., Abraham, N. G., Soares, M. P., Gosse, J. A., Figdor, C. G. (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* 55, 3, 551–571. doi: 10.1124/pr.55.3.5.
21. Tolosano, E., Fagoonee, S., Morello, N., Vinchi, F. & Fiorito, V. (2010) Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antiox. Redox Signal.* 12, 2, 305–320. doi: 10.1089/ars.2009.2787.
22. Jeney, V., Balla, H., Yachie, A., Varga, Z., Vercelotti, G. M., Eato, J. W., Balla, G. (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100, 3, 879–887. doi: 10.1182/blood.v100.3.879.
23. Vercelotti, G. M., Balla, H., Balla, J., Nath, K., Eaton, J. W., Jacob, H. S. (1994) Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22, 2, 207–213. doi: 10.3109/10731199409117415.
24. Montecinos, L., Eskew, J. D., Smith, A. (2019) What is next in this “age” of heme-driven pathology and protection by hemopexin? an update and links with iron. *Pharmaceuticals* 12, 4, 144. doi: 10.3390/ph12040144.
25. Frimat, M., Boudhabhay, I., Roumenina, L. T. (2019) Hemolysis derived products toxicity and endothelium: model of the second hit. *Toxins.* 11, 11, 660. doi: 10.3390/toxins11110660.
26. Chiabrand, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S., Tolosano, E. (2014) Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front. Pharmacol.* 5, 61. doi: 10.3389/fphar.2014.00061.
27. Chiabrand, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Tolosano, E. Haptoglobin and hemopexin in heme detoxification and iron recycling. In: *Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*. Intech, 2011. doi: 10.5772/18241.
28. Kumar, S., Bandyopadhyay, U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Letters* 157, 3, 175–188. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.03.004.

29. Schaer, D. J., Buehler, P. W., Alayash, A. I., Belcher, J. D., Vercellotti, G. M. (2013) Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 121, 8, 1276–1284. doi:10.1182/blood-2012-11-451229.
30. Schaer, D. J., Vinchi, F., Ingoglia, G., Tolosano, E., Buehler, P. W. (2014) Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways - basic science, clinical perspectives, and drug development. *Front. Physiol.* 5, 415. doi: 10.3389/fphys.2014.00415.
31. Ascenzi, P., Bocedi, A., Visca, P., Altruda, F., Tolosano, E., Beringhelli, T., Fasano, M. (2005) Hemoglobin and heme scavenging. *IUBMB Life*. 57, 11, 749–759. doi: 10.1080/15216540500380871.
32. Kamal, J. K. A., Behere, D. V. (2005) Binding of heme to human serum albumin: steady-state fluorescence, circular dichroism and optical difference spectroscopic studies. *Indian J. Biochem. Biophys.* 42, 1, 7–12. ipc code: G01J 3/00.
33. Neale, F. C., Aber, G. M., Northam, B. E. (1958) The demonstration of intravascular haemolysis by means of serum paper electrophoresis and a modification of schumm's reaction. *J. Clin. Path.* 11, 3, 206–219. doi: 10.1136/jcp.11.3.206.
34. Tolosano, E., Altruda, F. (2002) Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol.* 21, 4, 297–306. doi: 10.1089/104454902753759717.
35. Morgan, W. T., Muster, P., Tatum F., Kao, S. M., Alam, J., Smith, A. (1993) Identification of the histidine residues of hemopexin that coordinate with heme-iron and of a receptor-binding region. *J. Biol. Chem.* 268, 9, 6256–6262. doi: 10.1016/S0021-9258(18)53247-6.
36. Satoh, T., Satoh, H., Iwahara, S., Hrkal, Z., Peyton, D. H., Muller-Eberhard, U. (1994) Roles of heme iron-coordinating histidine residues of human hemopexin expressed in baculovirus-infected insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 18, 8423–8427. doi: 10.1073/pnas.91.18.8423.

37. Warren, M. J., Smith, A. G. *Tetrapyrroles: birth, life and death*, Springer Verlag, **2009**. ISBN-10: 038-7785-17-5.
38. Moore, M. R. An Historical introduction to porphyrin and chlorophyll synthesis historical introduction to porphyrins and porphyrias. In: *Tetrapyrroles: birth, life and death*, Springer Verlag, **2009**. ISBN-10: 038-7785-17-5.
39. Hodgson, G. W., Baker, B. L. (1967) Porphyrin abiogenesis from pyrrole and formaldehyde under simulated geochemical conditions. *Nature*. 216, 5110, 29–32. doi: 10.1038/216029a0.
40. Mercer-Smith, J. A., Mauzerall, D. C. (1984) Photochemistry of porphyrins: a model for the origin of photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 39, 3, 397–405. doi: 10.1111/j.1751-1097.1984.tb08197.x.
41. Hodgson, G. W. (1972) Cosmochemical evolution of large organic molecules: illustrative laboratory simulations for porphyrins. *Ann. NY Acad. Sci.* 194, 86–97. doi: 10.1111/j.1749-6632.1972.tb12694.x.
42. Ponka, P. (1999) Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.* 318, 241. doi: 10.1097/00000441-199910000-00004.
43. Rajagopal, A., Rao, A. U., Amigo, J., Tian, M., Upadhyay, S. K., Hall, C., Uhm S., Mathew, K., Fleming, M. D., Paw, B. H., Krause, M., Hamza, I. (2008) Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*. 453, 198, 1127–1131. doi: 10.1038/nature06934.
44. Scherer, J. (1841) Chemisch-physiologische untersuchungen. *Ann. Chem. Pharm.* 40, 1–64. doi: -.
45. Küster, W. (1912) Beiträge zur kenntnis des bilirubins und hämins. *Z. physiol. Chem.* 82, 463–483. doi: 10.1515/bchm2.1912.82.6.463
46. Fischer, H., Zeile, K. (1929) Synthese des haematoporphyrins, protoporphyrins und haemins. *Justus Liebig's Ann. Chem.* 468, 98–116. doi: -.
47. Nobel Prize Organisation (2021) Zugriff am 19.12.2021. <https://www.nobelprize.org>.

48. Layer, G. (2020) Radical S-Adenosylmethionine Enzymes in Heme Biosynthesis. In: *Comprehensive Natural Products III*. 5, 349–363. doi: 10.1016/b978-0-12-409547-2.14805-x
49. Mavridou, D. A. I., Ferguson, S. J., Stevens, J. M. (2013) Cytochrome c assembly. *IUBMB Life*. 65, 3, 209–216. doi: 10.1002/iub.1123.
50. Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., Cygler, M., Bode, W. *Handbook of metalloproteins. handbook of metalloproteins*. West Sussex: John Wiley and Sons, Ltd., 2001. doi: 10.1002/0470028637.
51. Loew, G. H., Harris, D. L. (2000) Role of the heme active site and protein environment in structure, spectra, and function of the cytochrome P450s. *Chem. Rev.* 100, 2, 407–420. doi: 10.1021/cr980389x.
52. Caughey, W. S., Smythe, G. A., O’Keeffe, D. H., Maskasky, J. E., Smith, M. I. (1975) Heme a of cytochrome c oxidase. structure and properties: comparisons with hemes b, c, and s and derivatives. *J. Biol. Chem.* 250, 19, 7602–7622. doi: 10.1016/S0021-9258(19)40860-0.
53. Yamashita, E., Aoyama, H., Yao, M., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Tsukihara, T. (2005) Absolute configuration of the hydroxyfarnesylethyl group of haem a, determined by x-ray structural analysis of bovine heart cytochrome c oxidase using methods applicable at 2.8 Å resolution. 61, 10, 1373–1377. doi: 10.1107/S09074444905023358.
54. Saiki, K., Mogi, T., Ogura, K., Anraku, Y. (1993) In vitro heme o synthesis by the cyoe gene product from escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 268, 35, 26041–26044. doi: 10.1016/S0021-9258(19)74272-0.
55. Timkovich, R., Cork, M. S., Gennis, R. B., Johnson, P. Y. (1985) Proposed structure of heme d, a prosthetic group of bacterial terminal oxidases. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 21, 6069–6075. doi: 10.1021/ja00307a041.
56. Safarian, S., Rajendran, C., Müller, H., Preu, J., Langer, J. D., Ovchinnikov, S., Hirose, T., Kusumoto, T., Sakamoto, J., Michel, H. (2016) Structure of a bd oxidase indicates similar mechanisms for membrane-integrated oxygen reductases. *Science*. 352, 6285, 583–586. doi: 10.1126/science.aaf2477.

57. Obinger, C., Maj, M., Nicholls, P., Loewen, P. (1997) Activity, peroxide compound formation, and heme d synthesis in escherichia coli HPII catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* 342, 1, 58–67. doi: 10.1006/abbi.1997.9988
58. Murshudov, G. N., Grebenko, A. I., Barynin, V., Dauter, Z., Wilson, K. S., Vainshtein, B. K., Melik-Adamyanyan, W., Bravo, J., Ferrán, J. M., Ferrer, J. C., Switala, J., Loewen, P. C., Fita, I. (1996) Structure of the heme d of penicillium vitale and escherichia coli catalases. *J. Biol. Chem.* 271, 15, 8863–8868. doi: 10.1074/jbc.271.15.8863.
59. Kleingardner, J. G., Bren, K. L. (2015) Biological significance and applications of heme c proteins and peptides. *Acc. Chem. Res.* 48, 7, 1845–1852. doi: 10.1021/acs.accounts.5b00106.
60. Stevens, J. M., Uchida, T., Daltrop, O., Ferguson, S. J. (2005) Covalent cofactor attachment to proteins: cytochrome c biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 4, 792–795. doi: 10.1042/BST0330792.
61. Li, T., Bonkovsky, H. L., Guo, J. T. (2011) Structural analysis of heme proteins: implication for design and prediction. *BMC Struct. Biol.* 11, 13, 834–835. doi: 10.1186/1472-6807-11-13.
62. Müller-Esterl, W. *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Spektrum Akademischer Verlag, 2011. ISBN: 382-7405-34-3.
63. Severance, S., Hamza, I. (2009) Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chem Rev.* 109, 10, 4596–4616. doi: 10.1021/cr9001116.
64. Larsen, R., Gouveia, Z., Soares, M. P., Gozzelino, R. (2012) Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Front. Pharmacol.* 3, 77. doi: 10.3389/fphar.2012.00077.
65. Tsiftoglou, A. S., Tsamadou, A. I., Papadopoulou, L. C. (2006) Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol. Ther.* 111, 2, 327–345. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.10.017.

66. Fufezan, C., Zhang, J., Gunner, M. R. (2008) Ligand preference and orientation in b- and c-type heme-binding proteins. *Proteins*. 73, 3, 690–704. doi: 10.1002/prot.22097.
67. Perutz, M. F., Grossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., North, A. C. (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by x-ray analysis. *Nature*. 185, 4711, 416–422. doi: 10.1038/185416a0.
68. Coronado, L. M., Nadovich, C. T., Spadafora, C. (2014) Malarial hemozoin: from target to tool. *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*. 1840, 6, 2032–2041. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.009.
69. Schneider, E. L., Marletta, M. A. (2005) Heme binding to the histidine-rich protein II from *plasmodium falciparum*. *Biochemistry*. 44, 3, 979–986. doi: 10.1021/bi048570p.
70. Egan, T. J., Mavuso, W. W., Ross, D. C., Marques, H. M. (1997) Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *J. Inorg. Biochem*. 68, 2, 137–145. doi: 10.1016/s0162-0134(97)00086-x.
71. Kumar, S., Guha, M., Choubey, V., Maity, P., Bandyopadhyay, U. (2007) Antimalarial drugs inhibiting hemozoin ( $\beta$ -hematin) formation: a mechanistic update. *Life Sci*. 80, 9, 813–828. doi: 10.1016/j.lfs.2006.11.008.
72. Egan, T. J. (2002) Physico-chemical aspects of hemozoin (malaria pigment) structure and formation. *J. Inorg. Biochem*. 91, 1, 19–26. doi: 10.1016/s0162-0134(02)00372-0.
73. Hopp, M.-T., Schmalohr, B. F., Köhl, T., Detzel, M. S., Wißbrock, A., Imhof, D. (2020) Heme determination and quantification methods and their suitability for practical applications and everyday use. *Anal. Chem*. 92, 14, 9429–9440. doi: 10.1021/acs.analchem.0c00415.
74. Collins, D. P., Dawson, J. H. Recent history of heme-containing proteins: advances in structure, functions, and reaction intermediate determination. In: *Comprehensive inorganic chemistry II: from elements to applications*. Elsevier Ltd., 2013. ISBN-13: 9780-0-809-7774-4.

75. Pikuleva, I. A. (2006) Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 112, 3, 761–773. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.05.014.
76. Sarkis, A., Roman, R. (2004) Role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in hypertension. *Current Drug Metab.* 5, 3, 245–256. doi: 10.2174/1389200043335603.
77. Cupp-Vickery, J. R., Han, O., Hutchinson, C. R., Poulos, T. L. (1996) Substrate-assisted catalysis in cytochrome P450eryf. *Nat. Struct. Biol.* 3, 7, 632–637. doi: 10.1038/nsb0796-632.
78. Berman, H., Henrick, K., Nakamura, H. (2003) Announcing the worldwide protein data bank. *Nat. Struct. Biol.* 10, 12, 980–980. doi: 10.1038/nsb1203-980.
79. Schneider, S., Marles-Wright, J., Sharp, K. H., Paoli, M. (2007) Diversity and conservation of interactions for binding heme in b-type heme proteins. *Nat. Prod. Rep.* 24, 3, 621–630. doi: 10.1039/b604186h.
80. Green, D. W., Ingram, V. M., Perutz, M. F. Sign determination by the isomorphous replacement method. In: *The structure of haemoglobin. proceedings of the royal society of london. Series a. mathematical and physical sciences.* Royal Society, 1954. doi: 10.1098/rspa.1954.0203.
81. Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., Phillips, D. C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature.* 181, 4610, 662–666. doi: 10.1038/181662a0.
82. Seed, M. P., Willoughby, D. A. (1997) Cox-2, HO NO! cyclooxygenase-2, heme oxygenase and nitric oxide synthase: their role and interactions in inflammation. *Inflamm. Res.* 46, 8, 279–281. doi: 10.1007/s000110050187.
83. White, K. A., Marletta, M. A. (1992) Nitric Oxide Synthase Is a Cytochrome P-450 Type Hemoprotein. *Biochemistry* 31, 29, 6627–6631. doi: 10.1021/bi00144a001.
84. Kitanishi, K., Igarashi, J., Hayasaka, K., Hikage, N., Saiful, I., Yamauchi, S., Uchida, T., Ishimori, K., Shimizu, T. (2008) Heme-binding characteristics of the isolated pas-a domain of mouse per2, a transcriptional



regulatory factor associated with circadian rhythms. *Biochemistry*. 47, 23, 6157–6168. doi: 10.1021/bi7023892.

85. Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56, 3, 387–437. doi: 10.1124/pr.56.3.3.
86. Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M. M., Yamamoto, M., Igarashi, K. (2002) Hemoprotein *bach1* regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* 21, 19, 5216–5224. doi: 10.1093/emboj/cdf516.
87. Ordway, G. A., Garry, D. J. (2004) Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Exp. Biol.* 207, 20, 3441–3446. doi: 10.1242/jeb.01172.
88. Ackers, G. K., Doyle, M. L., Myers, D., Daugherty, M. A. (1992) Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science*. 255, 5040, 54–63. doi: 10.1126/science.1553532.
89. Wittenberg, J. B., Wittenberg, B. A. (2003) Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* 206, 12, 2011–2020. doi: 10.1242/jeb.00243.
90. Watson, H. C. (1969) The stereochemistry of the protein myoglobin. *Prog. Stereochem.* 85, 4, 299–321. doi: -.
91. Woodhouse, K. W., James, O. F. (1990) Hepatic drug metabolism and ageing. *Br. Med. Bull.* 46, 1, 22–35. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072387
92. McDonnell, A. M., Dang, C. H. (2013) Basic review of the cytochrome p450 system. *J. Adv. Pract. Oncol.* 4, 4, 263–268. doi: 10.6004/jadpro.2013.4.4.7.
93. Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., Roth, H. J. *Medizinische Chemie. Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*. Deutscher Apotheker Verlag, 2005. ISBN-13: 978-3-7692-6974-1.
94. Donegan, R. K., Moore, C. M., Hanna, D. A., Reddi, A. R. (2019) Handling heme: the mechanisms underlying the movement of heme within and between cells. *Free Radic. Biol. Med.* 133, 88–100. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.005.

95. Hanna, D. A., Hu, R., Kim, H., Martinez-Guzman, O., Torres, M. P., Reddi, A. R. (2018) Heme bioavailability and signaling in response to stress in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 293, 32, 12378–12393. doi: 10.1074/jbc.RA118.002125.
96. Wang, L., Vijayan, V., Jang, M.-S., Thorenz, A., Greite, R., Rong, S., Chen, R., Shushakova, N., Tudorache, I., Derlin, K., Pradhan, P., Madyaningrana, K., Madrahimov, N., Bräsen, J. H., Lichtinghagen, R., van Kooten, C., Huber-Lang, M., Haller, H., Immenschuh, S., Gueler, F. (2019) Labile heme aggravates renal inflammation and complement activation after ischemia reperfusion injury. *Front. Immunol.* 10, 2975. doi: 10.3389/fimmu.2019.02975.
97. Englert, F. A., Seidel, R. A., Galler, K., Gouveia, Z., Soares, M. P., Neugebauer, U., Clemens, M. G., Sponholz, C., Heinemann, S. H., Pohnert, G., Bauer, M., Weis, S. (2019) Labile heme impairs hepatic microcirculation and promotes hepatic injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 672, 108075. doi: 10.1016/j.abb.2019.108075.
98. Hopp, M.-T., Imhof, D. (2021) Linking labile heme with thrombosis. *J. Clin. Med.* 10, 3, 427. doi: 10.3390/jcm10030427.
99. Morimatsu, H., Takahashi, T., Shimizu, H., Matsumi, J., Kosaka, J., Morita, K. Heme Proteins, Heme Oxygenase-1 and Oxidative Stress. In *Oxidative stress: molecular mechanisms and biological effects*, IntechOpen, 2012. ISBN-13: 9789-5-351-0554-1.
100. Gouveia, Z., Carlos, A. R., Yuan, X., Aires-da-Silva, F., Stocker, R., Maghzal, G. J., Leal, S. S., Gomes, C. M., Todorovic, S., Iranzo, O., Ramos, S., Santos, A. C., Hamza, I., Gonçalves, J., Soares, M. P. (2017) Characterization of plasma labile heme in hemolytic conditions. *FEBS J.* 284, 19, 3278–3301. doi: 10.1111/febs.14192.
101. de Villiers, K. A., Kaschula, C. H., Egan, T. J., Marques, H. M. (2007) Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not  $\mu$ -oxo dimer formation. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 1, 101–117. doi: 10.1007/s00775-006-0170-1.

102. Yuan, X., Rietzschel, N., Kwon, H., Nuno, A. B. W., Hanna, D. A., Phillips, J. D., Raven, E. L., Reddi, A. R., Hamza, I. (2016) Regulation of intracellular heme trafficking revealed by subcellular reporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 35, E5144–E5152. doi:10.1073/pnas.1609865113.
103. Kühn, T., Wißbrock, A., Gorodia, N., Sahoo, N., Galler, K., Neugebauer, U., Popp, J., Heinemann, S. H., Ohlenschläger, O., Imhof, D. (2013) Analysis of Fe(III) heme binding to cysteine-containing heme-regulatory motifs in proteins. *ACS Chem. Biol.* 8, 8, 1785–1793. doi: 10.1021/cb400317x.
104. Zhang, L., Guarente, L. (1995) Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* 14, 2, 313–320. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07005.x.
105. Brewitz, H. H., Hagelueken, G., Imhof, D. (2017) Structural and functional diversity of transient heme binding to bacterial proteins. *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects.* 1861, 3, 683–697. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.12.021.
106. Wißbrock, A., Paul George, A. A., Brewitz, H. H., Kühn, T., Imhof, D. (2019) The molecular basis of transient heme-protein interactions: analysis, concept and implementation. *Biosci. Rep.* 39, 1, BSR20181940. doi: 10.1042/BSR20181940.
107. Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M., Igarashi, K. (1996) Bach proteins belong to a novel family of btb-basic leucine zipper transcription factors that interact with mafk and regulate transcription through the nf-e2 site. *Mol. Cell. Biol.* 16, 11, 6083–6095. doi: 10.1128/mcb.16.11.6083.
108. Hira, S., Tomita, T., Matsui, T., Igarashi, K., Ikeda-Saito, M. (2007) Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure. *IUBMB Life.* 59, 8, 542–551. doi:10.1080/15216540701225941.
109. Simile, M. M., Latte, G., Pascale, R. M. (2018) Maf proteins: a family of regulating and regulated molecules. *Digest. Med. Res.* 155, 557–571. doi: 10.21037/dmr.2018.10.02.

110. Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 2, 748-755. doi: 10.1073/pnas.61.2.748
111. Doré, S., Takahashi, M., Ferris, C. D., Zakhary, R., Hester, L. D., Guastella, D., Snyder, S. H. (1999) Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5, 2445–2450. doi: 10.1073/pnas.96.5.2445.
112. Suzuki, H., Tashiro, S., Hira, S., Sun, J., Yamazaki, C., Zenke, Y., Ikeda-Saito, M., Yoshida, M., Igarashi, K. (2004) Heme regulates gene expression by triggering crm1-dependent nuclear export of bach1. *EMBO J.* 23, 13, 2544–2553. doi: 10.1038/sj.emboj.7600248.
113. Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., Tokunaga, F., Iwai, K., Igarashi, K. (2007) Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor bach1. *Mol. Cell. Biol.* 27, 19, 6962–6971. doi: 10.1128/MCB.02415-06.
114. Ishii, D. N., Maniatis, G. M. (1978) Haemin promotes rapid neurite outgrowth in cultured mouse neuroblastoma cells. *Nature.* 274, 5669, 372–374. doi: 10.1038/274372a0.
115. Abraham, N. G., Jiang, A. M., Lutton, J. D., Nishimura, M., Chertkov, J. K., Levere, R. D. (1991) Comparison of hemin enhancement of burst-forming units-erythroid clonal efficiency by progenitor cells from normal and hiv-infected patients. *Acta Haematol.* 86, 4, 189–193. doi: 10.1159/000204832.
116. Chen, J.-J., London, I. M. (1981) Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell.* 26, 1, 117–122. doi: 10.1016/0092-8674(81)90039-8.
117. Verger, C., Sassa, S., Kappas, A. (1983) Growth-promoting effects of iron- and cobalt- protoporphyrins on cultured embryonic cells. *J. Cell Physiol.* 116, 2, 135–141. doi: 10.1002/jcp.1041160203.
118. Yamamoto, M., Hayashi, N., Kikuchi, G. (1982) Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the synthesis of delta-aminolevulinate

- synthase in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 3, 985–990. doi: 10.1016/0006-291x(82)91067-1.
119. Hamilton, J. W., Bement, W. J., Sinclair, P. R., Sinclair, J. F., Alcedo, J. A., Wetterhahn, K. E. (1991) Heme regulates hepatic 5-aminolevulinate synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 2, 387–392. doi: 10.1016/0003-9861(91)90428-1.
  120. Ades, I. Z., Harpe, K. G. (1981) Biogenesis of mitochondrial proteins. identification of the mature and precursor forms of the subunit of delta-aminolevulinate synthase from embryonic chick liver. *J. Biol. Chem.* 256, 9329–9333. doi: 10.1016/s0021-9258(19)52551-0.
  121. Ajioka, R. S., Phillips, J. D., Kushner, J. P. (2006) Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim. Biophys. Acta – Molecular Cell Research.* 1763, 7, 723–736. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.005.
  122. Munakata, H., Sun, J.-Y., Yoshida, K., Nakatani, T., Honda, E., Hayakawa, S., Furuyama, K., Hayashi, N. (2004) Role of the heme regulatory motif in the heme-mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinate synthase. *J. Biochem.* 136, 2, 233–238. doi: 10.1093/jb/mvh112.
  123. Hamza, I., Dailey, H. A. (2012) One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823, 9, 1617–1632. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.04.009.
  124. Schubert, H. L., Erskine, P. T., Cooper, J. B. 5-Aminolaevulinic acid dehydratase, porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III synthase. In: *Tetrapyrroles*. Springer Verlag, 2009. doi:10.1007/978-0-387-78518-9\_3.
  125. Yamauchi, K., Hayashi, N., Kikuchi, G. (1980) Translocation of delta-aminolevulinate synthase from the cytosol to the mitochondria and its regulation by hemin in the rat liver. *J. Biol. Chem.* 255, 1746–1751. PMID: 7354050.

126. Lathrop, J. T., Timko, M. P. (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science*. 259, 5094, 522–525. doi: 10.1126/science.8424176.
127. Dailey, T. A., Woodruff, J. H., Dailey, H. A. (2005) Examination of mitochondrial protein targeting of haem synthetic enzymes: In vivo identification of three functional haem-responsive motifs in 5-aminolaevulinate synthase. *Biochem. J.* 386, 2, 381–386. doi: 10.1042/BJ20040570.
128. Hunter, G. A., Ferreira, G. C. (2011) Molecular enzymology of 5-Aminolevulinate synthase, the gatekeeper of heme biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics*. 1814, 11, 1467–1473. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.12.015.
129. Elder, G. H., Evans, J. O. (1978) Evidence that the coproporphyrinogen oxidase activity of rat liver is situated in the intermembrane space of mitochondria. *Biochem. J.* 172, 2, 345–347. doi: 10.1042/bj1720345.
130. Dailey, H. A., Dailey, T. A. *The Porphyrin Handbook*. Academic Press, 2003. ISBN-13: 9780-0-809-2390-1.
131. Dailey, H. A. Conversion of coproporphyrinogen to protoheme in higher eukaryotes and bacteria. In: *Biosynthesis of heme and chlorophylls*. McGraw-Hill Publishing Co., 1990. ISBN-13: 978-0-0701-5088-1.
132. Ferreira, G. C., Andrew, T. L., Karr, S. W., Dailey, H. A. (1988) Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex. *J. Biol. Chem.* 263, 8, 3835–3839. doi: 10.1016/S0021-9258(18)69000-3.
133. Bishop, D. F., Henderson, A. S., Astrin, K. H. (1990) Human delta-aminolevulinate synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the x chromosome. *Genomics*. 7, 2, 207–214. doi: 10.1016/0888-7543(90)90542-3.
134. Sassa, S., Nagai, T. (1996) The role of heme in gene expression. *Int. J. Hematol.* 63, 3, 167–178. doi: 10.1016/0925-5710(96)00449-5.

135. Ponka, P. (1997) Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood*. 89, 1, 1–25. doi: 10.1182/blood.V89.1.1.
136. Fleming, M. D. (2002) The genetics of inherited sideroblastic anemias. *Semin. Hematol.* 39, 4, 270–281. doi: 10.1053/shem.2002.35637.
137. Ramanujam, V. M. S., Anderson, K. E. (2015) Porphyrin diagnostics-part 1: a brief overview of the porphyrias. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 86, 17201-17.20.26. doi: 10.1002/0471142905.hg1720s86.
138. Whatley, S. D., Ducamp, S., Gouya, L., Grandchamp, B., Beaumont, C., Badminton, M. N., Elder, G. H., Holme, S. A., Anstey, A. V., Parker, M., Corrigan, A. V., Meissner, P. N., Hift, R. J., Marsden, J. T., Ma, Y., Mieli-Vergani, G., Deybach, J.-C., Puy, H. (2008) C-terminal deletions in the *alas2* gene lead to gain of function and cause x-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *Am. J. Hum. Gen.* 83, 3, 408–414. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.08.003.
139. Balwani, M., Desnick, R., Porphyrins Consortium of the NIH-Sponsored Rare Diseases Clinical Research Network. X-Linked Protoporphyria. In: *GeneReviews*. University of Washington, Seattle, 2019. ISSN: 2372-0697.
140. Astner, I., Schule, J. O., van den Heuvel, J., Jahn, D., Schubert, W.-D., Heinz, D. W. (2005) Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to *xlsa* in humans. *EMBO J.* 24, 18, 3166–3177. doi: 10.1038/sj.emboj.7600792.
141. Guernsey, D. L., Jiang, H., Campagna, D. R., Evans, S. C., Ferguson, M., Kellogg, M. D., Lachance, M., Matsuoka, M., Nightingale, M., Rideout, A., Saint-Amant, L., Schmidt, P. J., Orr, A., Bottomley, S. S., Fleming, M. D., Ludman, M., Dyack, S., Fernandez, C. V., Samuels, M. E. (2009) Mutations in mitochondrial carrier family gene *slc25a38* cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat. Gen.* 41, 6, 651–653. doi: 10.1038/ng.359.
142. Seguin, A., Takahashi-Makise, N., Yien, Y. Y., Huston, N. C., Whitman, J. C., Musso, G., Wallace, J. A., Bradley, T., Bergonia, H. A., Kafina, M. D., Matsumoto, M., Igarashi, K., Phillips, J. D., Paw, B. H., Kaplan, J., Ward,

- D. M. (2017) Reductions in the mitochondrial abc transporter abcb10 affect the transcriptional profile of heme biosynthesis genes. *J. Biol. Chem.* 292, 39, 16284–16299. doi: 10.1074/jbc.M117.797415.
143. Martinez, M., Fendley, G. A., Saxberg, A. D., Zoghbi, M. E. (2020) Stimulation of the human mitochondrial transporter abcb10 by zinc-mesoporphrin. *PLoS One* 15, 11, E0238754. doi: 10.1371/journal.pone.0238754.
144. Ponka, P., Wilczynska, A., Schulman, H. M. (1982) Iron utilization in rabbit reticulocytes: a study using succinylacetone as an inhibitor of heme synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 720, 1, 96–105. doi: 10.1016/0167-4889(82)90043-x.
145. Richardson, D., Ponka, P., Vyoral, D. (1996) Distribution of iron in reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone: examination of the intermediates involved in iron metabolism. *Blood.* 87, 8, 3477-3488. doi: 10.1182/blood.V87.8.3477.bloodjournal8783477.
146. Giger, U., Meyer, U. A. (1983) Effect of succinylacetone on heme and cytochrome P450 synthesis in hepatocyte culture. *FEBS Lett.* 153, 2, 335–338. doi: 10.1016/0014-5793(83)80637-1.
147. Sassa, S., Kappas, A. (1983) Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone. *J. Clin. Invest.* 71, 3, 625–634. doi: 10.1172/jci110809.
148. Ebert, P., Hess, R., Frykholm, B. C., Tschudy, D. P. (1979) Succinylacetone, a potent inhibitor of heme biosynthesis: effect on cell growth, heme content and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of malignant murine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 4, 1382–1890. doi: 10.1016/0006-291x(79)91133-1.
149. Beru, N., Sahr, K., Goldwasser, E. (1983) Inhibition of heme synthesis in bone marrow cells by succinylacetone: effect on globin synthesis. *J. Cell. Biochem.* 21, 2, 93–105. doi: 10.1002/jcb.240210201.



150. Anderson, K. E., Bloomer, J. R., Bonkovsky, H. L., Kushner, J. P., Perach, C. A., Pimstone, N. R., Desnick, R. J. (2005) Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Ann. Intern. Med.* 142, 6, 439–450. doi: 10.7326/0003-4819-142-6-200503150-00010.
151. Erwin, A. L., Desnick, R. J. (2019) Congenital erythropoietic porphyria: recent advances. *Mol. Genet. Metab.* 128, 3, 288–297. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.12.008
152. Willows, R. D. Chlorophyll Synthesis. In: *The structure and function of Plastids*. Springer Verlag, 2007. doi:10.1007/978-1-4020-4061-0\_15.
153. Martens, J.-H., Barg, H., Warren, M., Jahn, D. (2002) Microbial production of vitamin b12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 3, 275–285. doi: 10.1007/s00253-001-0902-7.
154. Smith, A. G., Francis, J. E. (1979) Decarboxylation of porphyrinogens by rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J.* 183, 2, 455–458. doi: 10.1042/bj1830455.
155. Elder, G. H. (1998) Porphyria cutanea tarda. *Semin. Liver Dis.* 18, 1, 67–75. doi: 10.1055/s-2007-1007142.
156. Elder, G. H., Worwood, M. (1998) Mutations in the hemochromatosis gene, porphyria cutanea tarda, and iron overload. *Hepatology.* 27, 1, 289–291. doi: 10.1002/hep.510270142.
157. Sampietro, M., Piperno, A., Lupica, L., Arosio, C., Vergani, A., Corbetta, N., Malosio, I., Mattioli, M., Fracanzani, A. L., Cappellini, M. D., Fiorelli, G., Fargion, S. (1998) High prevalence of the his63qsp hfe mutation in Italian patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology.* 27, 1, 181–184. doi: 10.1002/hep.510270128.
158. Fukuda, Y., Cheong, P. L., Lynch, J., Brighton, C., Frase, S., Kargas, V., Rampersaud, E., Wang, Y., Sankaran, V. G., Yu, B., Ney, P. A., Weiss, M. K., Vogel, P., Bond, P. J., Ford, R. C., Trent, R. J., Schuetz, J. D. (2016) The severity of hereditary porphyria is modulated by the porphyrin exporter and Lan antigen abcb6. *Nat. Commun.* 7, 12353. doi: 10.1038/ncomms12353.

159. Paterson, J. K., Shukla, S., Black, C. M., Tachiwada, T., Garfield, S., Wincovitch, S., Ernst, D. N., Agadir, A., Li, X., Ambudkar, S. V., Szakacs, G., Akiyama, S.-I., Gottesman, M. M. (2007) Human abcb6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry*. 46, 33, 9443–9452. doi: 10.1021/bi700015m.
160. Stephenson, J. R., Stacey, J. A., Morgenthaler, J. B., Friesen, J. A., Lash, T. D., Jones, M. A. (2007) Role of aspartate 400, arginine 262, and arginine 401 in the catalytic mechanism of human coproporphyrinogen oxidase. *Protein Sci.* 16, 3, 401–410. doi: 10.1110/ps.062636907.
161. Phillips, J. D., Whitby, F. G., Warby, C. A., Labbe, P., Yang, C., Pflugrath, J. W., Ferrara, J. D., Robinson, H., Kushner, J. P., Hill, C. P. (2004) Crystal structure of the oxygen-dependant coproporphyrinogen oxidase (hem13p) of *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 37, 38960–38968. doi: 10.1074/jbc.M406050200.
162. Lee, D.-S., Flachsová, E., Bodnárová, M., Demeler, B., Martásek, P., Raman, C. S. (2005) Structural basis of hereditary coproporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 40, 14232–14237. doi: 10.1073/pnas.0506557102.
163. Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R., Messerschmidt, A. (2004) Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO J.* 23, 8, 1720–1728. doi: 10.1038/sj.emboj.7600189.
164. Whatley, S. D., Puy, H., Morgan, R. R., Robreau, A.-M., Roberts, A. G., Nordmann, Y., Elder, G. H., Dybach, J.-C. (1999) Variegate porphyria in western europe: identification of ppox gene mutations in 104 families, extent of allelic heterogeneity, and absence of correlation between phenotype and type of mutation. *The Am. J. Hum. Genet.* 65, 4, 984–994. doi: 10.1086/302586.
165. Rollakanti, K. R., Kanick, S. C., Davis, S. C., Pogue, B. W., Maytin, E. V. (2013) Techniques for fluorescence detection of protoporphyrin IX in skin cancers associated with photodynamic therapy. *Photonics Lasers Med.* 2, 4, 287–303. doi: 10.1515/plm-2013-0030.

166. Wu, C. K., Dailey, H. A., Rose, J. P., Burden, A., Sellers, V. M., Wang, B. C. (2001) The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* 8, 2, 156–160. doi: 10.1038/84152.
167. Medlock, A., Swartz, L., Dailey, T. A., Dailey, H. A., Lanzilotta, W. N. (2007) Substrate interactions with human ferrochelatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6, 1789–1793. doi: 10.1073/pnas.0606144104.
168. Taketani, S., Adachi, Y., Nakahashi, Y. (2000) Regulation of the expression of human ferrochelatase by intracellular iron levels. *Eur. J. Biochem.* 267, 15, 4685–4692. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01519.x.
169. Proulx, K. L., Woodard, S. I., Dailey, H. A. (1993) In situ conversion of coproporphyrinogen to heme by murine mitochondria: terminal steps of the heme biosynthetic pathway. *Protein Sci.* 2, 7, 1092–1098. doi: 10.1002/pro.5560020703.
170. Anderson, K. E. Sassa, S., Bishop, D. F., Desnick, R. J. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw Hill Medical, 2001. doi: 10.1036/ommbid.153.
171. Farid, Y., Bowman, N. S., Lecat, P. Biochemistry, hemoglobin synthesis. *StatPearls Publishing*, 2019. ISBN:-.
172. Chung, J., Chen, C., Paw, B. H. (2012) Heme metabolism and erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 19, 3, 156–162. doi: 10.1097/MOH.0b013e328351c48b.
173. Simmons, W. R., Wain, L., Toker, J., Jagadeesh, J., Garrett, L. J., Pek, R. H., Hamza, I., Bodine, D. M. (2020) Normal iron homeostasis requires the transporter slc48a1 for efficient heme-iron recycling in mammals. *Front. Genome Ed.* 2, 8. doi: 10.3389/fgeed.2020.00008.
174. Chen, J. J. (2014) Translational control by heme-regulated eIF2α kinase during erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 21, 3, 172–178. doi: 10.1097/MOH.0000000000000030.
175. Elder, G. H. (1998) Genetic defects in the porphyrias: types and significance. *Clin. Dermatol.* 16, 2, 225–233. doi: 10.1016/s0738-081x(97)00202-2.

176. Keerthivasan, G., Wickrema, A., Crispino, J. D. (2011) Erythroblast enucleation. *Stem Cells Int.* 2011, 139851. doi: 10.4061/2011/139851.
177. Michl, M. *Hämatologie basics*. Elsevier, 2019. ISBN-10: 978-34374-2112-9.
178. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., Dick, J. E. (2012) Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell.* 10, 2, 120–136. doi: 10.1016/j.stem.2012.01.006.
179. Rieger, M. A., Schroeder, T. (2012) Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 12, a008250. doi: 10.1101/cshperspect.a008250.
180. Chui, D. H. K., Djaldetti, M., Marks, P. A., Rifkind, R. A. (1971) Erythropoietin effects on fetal mouse erythroid cells. I. cell population and hemoglobin synthesis. *Blood.* 51, 3, 585–595. doi: 10.1083/jcb.51.3.585.
181. Mulcahy, L. (2001) The erythropoietin receptor. *Semin. Oncol.* 28, 2, 19–23. doi: 10.1016/s0093-7754(01)90208-8.
182. Haase, V. H. (2010) Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 299, 1, F1–F13. doi: 10.1152/ajprenal.00174.2010.
183. Jelkmann, W. (1992) Erythropoietin: Structure, control of production, and function. *Physiol. Rev.* 72, 2, 449–489. doi: 10.1152/physrev.1992.72.2.449.
184. Hayhoe, F. G. J., Flemans, R. J. Die Erythrozyten und ihre Vorstufen. In: *Atlas der hämatologischen Zytologie*, Springer Verlag, 1969. doi:10.1007/978-3-642-85674-7\_2.
185. Ellis, J., Grosveld, F. (1993) Nuclear factors regulating erythroid progenitor cell differentiation and gene expression. *Sem. Develop. Biol.* 4, 6, 359–369. doi: 10.1006/sedb.1993.1040.
186. Ney, P. A. (2011) Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr. Opin. Hematol.* 18, 3 152–157. doi: 10.1097/MOH.0b013e328345213e.
187. Liu, J., Guo, X., Mohandas, N., Chasis, J. A., An, X. (2010) Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood.* 115, 10, 2021–2027. doi: 10.1182/blood-2009-08-241182.

188. Smith, J. E. (1987) Erythrocyte membrane: structure, function, and pathophysiology. *Vet. Pathol.* 24, 6, 471–476. doi: 10.1177/030098588702400601.
189. Rein, H., Schneider, M. Die Physiologie des Blutes. In: *Einführung in die Physiologie des Menschen*, Springer Verlag, 1955. ISBN-10: 354-0079-823.
190. Doty, R. T. Phelps, S.R., Shadle, C., Sanchez-Bonilla, M., Keel, S. B., Abkowitz, J. L. (2015) Coordinate expression of heme and globin is essential for effective erythropoiesis. *Journal Clin. Invest.* 125, 12, 4681–4691. doi: 10.1172/JCI83054.
191. Keel, S. B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P. D., De Domenico, I., Vaughn, M. B., Kaplan, J., Palis, J., Abkowitz, J. L. (2008) A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science.* 319, 5864, 825–828. doi: 10.1126/science.1151133.
192. Fleming, M. D., Hamza, I. Mitochondrial heme: an exit strategy at last. *J. Clin. Invest.* 122, 12, 4328–4330. doi: 10.1172/JCI66607.
193. Doyle, L. A., Ross, D. D. (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein bcrp (abcb2). *Oncogene.* 22, 47, 7340–7358. doi: 10.1038/sj.onc.1206938.
194. Takenaka, K. Morgan, J. A., Scheffer, G. L., Adachi, M., Stewart, C. F., Sun, D., Leggas, M., Ejendal, K. F. K., Hrycyna, C. A., Schuetz, J. D. (2007) Substrate overlap between mrp4 and abcg2/bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res.* 67, 14, 6965–6972. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4720.
195. Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P., Schuetz, J. D. (2004) The stem cell marker bcrp/abcg2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* 279, 23, 24218–24225. doi: 10.1074/jbc.M313599200.
196. Desuzinges-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huché, F., Di Pietro, A., Falson, P. (2010) Abcg2 transports and transfers heme to albumin through

- its large extracellular loop. *J. Biol. Chem.* 285, 43, 33123–33133. doi: 10.1074/jbc.M110.139170.
197. Chiabrando, D., Marro, S., Mercurio, S., Giorgi, C., Petrillo, S., Vinchi, F., Fiorito, V., Fagoonee, S., Camporeale, A., Turco, E., Merlo, G. R., Silengo, L., Altruda, F., Pinton, P., Tolosano, E. (2012) The mitochondrial heme exporter flvcr1b mediates erythroid differentiation. *J. Clin. Invest.* 122, 12, 4569–4579. doi: 10.1172/JCI62422.
198. Chiabrando, D., Scietti, L., Prajica, A. G., Bertino, F., Tolosano, E., Magnani, F. (2020) Expression and purification of the heme exporter flvcr1a. *Protein Expr. Purif.* 172, 105637. doi: 10.1016/j.pep.2020.105637.
199. Brown, J. K., Fung, C., Taylor, C. S. (2006) Comprehensive mapping of receptor-functioning domains in feline leukemia virus subgroup C receptor flvcr1. *J. Virol.* 80, 4, 1742–1751. doi: 10.1128/JVI.80.4.1742-1751.2006.
200. Duffy, S. P., Shing, J., Saraon, P., Berger, L. C., Eiden, M. V., Wilde, A., Taylor, C. S. (2010) The fowler syndrome-associated protein flvcr2 is an importer of heme. *Mol. Cell. Biol.* 30, 22, 5318–5324. doi: 10.1128/MCB.00690-10.
201. Fowler, M., Dow, R., White, T. A., Greer, C. H. (1972) Congenital hydrocephalus-hydrencephaly in five siblings, with autopsy studies: a new disease. *Dev. Med. Child. Neurol.* 14, 2, 173–188. doi: 10.1111/j.1469-8749.1972.tb02575.x.
202. Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T. C., Brugnara, C., Lux, S. E., Pinkus, G. S., Pinkus, J. L., Kingsley, P. D., Palis, J., Fleming, M. D., Andrews, N. C., Zon, L. I. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 403, 6771. doi:10.1038/35001596.
203. White, C., Yuan, X., Schmidt, P. J., Bresciani, E., Samuel, T. K., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M. L., Lapierre, A., Ward, D. M., Liu, P., Fleming, M. D., Hamza, I. (2013) Hrg1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metab.* 17, 2, 261–270. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.005.

204. Gottlieb, Y., Truman, M., Cohen, L. A., Leichtmann-Bardoogo, Y., Meyron-Holtz, E. G. (2012) Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica*. 97, 10, 1489–1493. doi: 10.3324/haematol.2012.063651.
205. West, A. R., Oates, P. S. (2008) Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World J. Gastroenterol*. 14, 26, 4101–4110. doi: 10.3748/wjg.14.4101.
206. Chambers, I. G., Willoughby, M. M., Hamza, I., Reddi, A. R. (2021) One ring to bring them all and in the darkness bind them: The trafficking of heme without deliverers. *Biochim. Biophys. Acta – Molecular Cell Research*. 1868, 1, 118881. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118881.
207. Donegan, R. K., Moore, C. M., Hanna, D. A., Reddi, A. R. (2019) Handling heme: the mechanisms underlying the movement of heme within and between cells. *Free Radic. Biol. Med.* 133, 88–100. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.005.
208. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Andrews, N. C. (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 117, 3, 285–297. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00343-5.
209. Geissler, C., Singh, M. (2011) Iron, meat and health. *Nutrients*. 3, 3, 283–316. doi: 10.3390/nu3030283.
210. García, Y., Carrillo, O., Cárdenas, R., Díaz-Castro, J. (2017) Advantages of the supplementation with both a protein and heme hydrolyzate and ionic iron during iron deficiency anemia. *J. Food Nutr. Res*. 5, 1, 37–47. doi: 10.12691/jfnr-5-1-7.
211. Carpenter, C. E., Mahoney, A. W. (1992) Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 31, 4, 333–367. doi: 10.1080/10408399209527576.
212. Uzel, C., Conrad, M. E. (1998) Absorption of heme iron. *Semin. Hematol*. 35, 1, 27–34. PMID: 9460807.

213. Lynch, S. R., Skikne, B. S., Cook, J. D. (1989) Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis. *Blood*. **74**, 6, 2187–2193. doi: 10.1182/blood.V74.6.2187.2187.
214. Walsh, R. J., Kaldor, I., Brading, I., George, E. P. (1955) The availability of iron in meat: some experiments with radioactive iron. *Australas Ann. Med.* **4**, 4, 272–276. doi: 10.1111/imj.1955.4.4.272.
215. Galbraiths, R. A., Sassa, S., Kappas, A. (1985) Heme binding to murine erythroleukemia cells. evidence for a heme receptor. *J.Biol. Chem.* **260**, 22, 12198–12202. PMID: 2995365
216. Graesbeck, R., Majuri, R., Kouvonen, I., Tenhunen, R. (1982) Spectral and other studies on the intestinal haem receptor of the pig. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology.* **700**, 2, 137–142. doi: 10.1016/0167-4838(82)90089-9.
217. Graesbeck, R., Kouvonen, I., Lundberg, M., Tenhunen, R. (1979) An intestinal receptor for heme. *Scand. J. Haematol.* **23**, 1, 5–9. doi: 10.1111/j.1600-0609.1979.tb02845.x.
218. Worthington, M. T., Cohn, S. M., Miller, S. K., Luo, R. Q., Berg, C. L. (2001) Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, 6, G1172-G1177. doi: 10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1172.
219. Vaghefi, N., Guillochon, D., Bureau, F., Neuville, D., Lebrun, F., Arhan, P., Bouglé, D. (2000) The effect of cysteine and 2,4-dinitrophenol on heme and nonheme absorption in a rat intestinal model. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 11, 562–567. doi: 10.1016/s0955-2863(00)00120-0.
220. Conrad, M. E., Weintraub, L. R., Sears, D. A., Crosby, W. H. (1966) Absorption of hemoglobin iron. *Am. J. Physiol.* **211**, 1123–1130. doi: 10.1152/ajplegacy.1966.211.5.1123.
221. Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F. E., Hider, R. C., Frazer, D. M., Anderson, G. J., Vulpe, C. D., Simpson, R. J., McKire, A. T. (2005)



- Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 122, 5, 789–801. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.025.
222. Latunde-Dada, G. O., Takeuchi, K., Simpson, R. J., McKie, A. T. (2006) Haem carrier protein 1 (hcp1): expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett*. 580, 30, 6865–6870. doi: 10.1016/j.febslet.2006.11.048.
223. Andrews, N. C. (2007) When is a heme transporter not a heme transporter? when it's a folate transporter. *Cell Metab*. 5, 1, 5–6. doi: 10.1016/j.cmet.2006.12.004.
224. Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S. H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M. H., Goldman, I. D. (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 127, 5, 917–928. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.041.
225. Rajagopal, A., Rao, A. U., Amigo, J., Tian, M-, Upadhyay, S. K., Hall, C., Uhm, S., Mathew, M. K., Fleming, M. D., Paw, B. H., Krause, M., Hamza, I. (2008) Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of hrg-1 proteins. *Nature*. 453, 7198, 1127–1131. doi: 10.1038/nature06934.
226. Zhang, J., Chambers, I., Yun, S., Phillips, J., Krause, M., Hamza, I. (2018) Hrg1 promotes heme-iron recycling during hemolysis in the zebrafish kidney. *PLoS Genet*. 14, 9, E1008776. doi:10.1371/journal.pgen.1007665.
227. White, C., Yuan X., Schmidt, P. J., Bresciani, E., Samuel. T. K., Campagna, D., Hall, C., Bishop, K., Calicchio, M. L., Lapierre, A., Ward, D. M., Liu, P., Fleming, M. D., Hamza, I. (2013) Hrg1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metab*. 17, 2, 261–270. doi: 10.1016/j.cmet.2013.01.005.
228. Pek, R. H., Yuan W., Rietzschel, N., Zhang, J., Jackson, L., Nishibori, E., Ribeiro, A., Simmons, W., Jagadeesh, J., Sugimoto, H., Alam, M. Z., Garrett, L., Haldar, M., Ralle, M., Phillips, J. D., Bodine, D. M., Hamza, I. (2019) Hemozoin produced by mammals confers heme tolerance. *Elife*. 8, E49503. doi: 10.7554/eLife.49503.

229. Marciano, O., Moskovitz, Y., Hamza, I., Ruthstein, S. (2015) Histidine residues are important for preserving the structure and heme binding to the *c. elegans* Hrg-3 heme-trafficking protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 8, 1253–1261. doi: 10.1007/s00775-015-1304-0.
230. Chen, C., Samuel, T. K., Sinclair, J., Dailey, H. A., Hamza, I. (2011) An intercellular heme-trafficking protein delivers maternal heme to the embryo during development in *c. elegans*. *Cell.* 145, 5, 720–731. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.025.
231. Zhou, J. R., Bu, D.-R., Zhao, X.-F., Wu, F., Chen, X.-Q., Shi, H.-Z., Yao, C.-Q., Du, A.-F., Yang, Y. (2020) Hc-hrg-2, a glutathione transferase gene, regulates heme homeostasis in the blood-feeding parasitic nematode *hamonchus contortus*. *Parasit. Vectors.* 13, 1, 40. doi: 10.1186/s13071-020-3911-z.
232. Chen, C., Samuel, T. K., Krause, M., Dailey, H. A., Hamza, I. (2012) Heme utilization in the *caenorhabditis elegans* hypodermal cells is facilitated by heme-responsive gene-2. *J. Biol. Chem.* 287, 12, 9601–9612. doi: 10.1074/jbc.M111.307694.
233. World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention. *Assessing the iron status of populations*. WHO Library, 2004. ISBN-13: 978-9-241-5961-0.
234. Kong, W. N., Lei, Y. H., Chang, Y. Z. (2013) The regulation of iron metabolism in the mononuclear phagocyte system. *Expert Rev. Hematol.* 6, 4, 411–418. doi: 10.1586/17474086.2013.814840.
235. Nemeth, E., Tuttle, M., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., McVey Ward, D., Ganz, T., Kaplan, J. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 306, 5704, 2090-2093. doi: 10.1126/science.1104742.
236. Trakshel, G. M., Maines, M. D. (1989) Multiplicity of heme oxygenase isozymes. *J. Biol. Chem.* 264, 2, 1323–1328. doi: 10.1016/S0021-9258(19)85089-5.

237. Trakshel, G. M., Maines, M. D. (1988) Detection of two heme oxygenase isoforms in the human testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 1, 285–291. doi: 10.1016/0006-291x(88)90682-1.
238. Maines, M. D., Trakshel, G. M., Kutty, R. K. (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* 261, 1, 411–419. doi: 10.1016/S0021-9258(17)42488-4.
239. Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y., Noguchi, M. (2004) Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene.* 336, 2, 241–250. doi: 10.1016/j.gene.2004.04.002.
240. McCoubrey, W. K., Huang, T. J., Maines, M. D. (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 247, 2, 725–732. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00725.x.
241. Spencer, A. L. M., Bagai, I., Becker, D. F., P Zuiderweg, R. P., Ragsdale, S. W. (2014) Protein/protein interactions in the mammalian heme degradation pathway heme oxygenase 2. *J. Biol. Chem.* 289, 43, 29836–29858. doi: 10.1074/jbc.M114.582783.
242. Maines, M. D. (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2, 10, 2557–2568. doi: 10.1016/0014-4827(88)90042-0.
243. Maines, M. D. (1984) New developments in the regulation of heme metabolism and their implications. *Crit. Rev. Toxicol.* 12, 3, 241–314. doi: 10.3109/10408448409021604.
244. Li, C., Hossieny, P., Wu, B. J., Qawasmeh, A., Beck, K., Stocker, R. (2007) Pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 12, 2227–2239. doi: 10.1089/ars.2007.1783.
245. Maines, M. D. (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 517–554. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.517.

246. Yanatori, I., Tabuchi, M., Kawai, Y., Yasui, Y., Akagi, R., Kishi, F. (2010) Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells. *BMC Cell Biol.* 11, 39, 1–11. doi: 10.1186/1471-2121-11-39.
247. Ishikawa, K., Takeuchi, N., Takahashi, S., Matera, K. M., Sato, M., Shibahara, S., Rousseau, D. L., Ikeda-Saito, M., Yoshida, T. (1995) Heme oxygenase-2. properties of the heme complex of the purified tryptic fragment of recombinant human heme oxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 270, 11, 6345–6350. doi: 10.1074/jbc.270.11.6345.
248. Converso, D. P., Taillé, C., Carreras, M. C., Jaitovich, A., Poderoso, J. J., Boczkowski, J. (2006) Ho-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J.* 20, 8, 1236–1238. doi: 10.1096/fj.05-4204fje.
249. Slebos, D. J., Ryter, S. W., van der Toorn, M., Liu, F., Guo, F., Baty, C. J., Karlsson, J. M., Watkins, S. C., Kim, H. P., Wang, X., Lee, J. S., Postma, D. S., Kauffman, H. F., Choi, A. M. K. (2007) Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 36, 4, 409–417. doi: 10.1165/rcmb.2006-0214OC.
250. Kim, H. P., Wang, X., Galbiati, F., Ryter, S. W., Choi, A. M. K. (2004) Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J.* 18, 10, 1080–1089. doi: 10.1096/fj.03-1391com.
251. Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Wend, Y.-H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T., Gaunitz, F., Dennery, P. A. (2007) Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 282, 28, 20621–20633. doi: 10.1074/jbc.M607954200.
252. Yoshida, T., Sato, M. (1989) Posttranslational and direct integration of heme oxygenase into microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 2, 1086–1092. doi: 10.1016/0006-291x(89)92332-2.
253. Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmidt, R. (1969) Microsomal heme oxygenase. characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244, 23, 6388–6394. doi: 10.1016/S0021-9258(18)63477-5.

254. Shibahara, S., Muller, R., Taguchi, H., Yoshida, T. (1985) Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 23, 7865–7869. doi: 10.1073/pnas.82.23.7865.
255. Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. (1970) The enzymatic catabolism of hemoglobin: Stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.* 75, 3, 410–421. doi: 10.5555/uri:pii:0022214370901149.
256. Yasuda, M., Desnick, R. J. (2019) Murine models of the human porphyrias: contributions toward understanding disease pathogenesis and the development of new therapies. *Mol. Genet. Metab.* 128, 3, 332–341. doi: 10.1016/j.ymgme.2019.01.007.
257. Tenhunen, R., Marver, H., Pimstone, N. R., Trager, W. F., Cooper, C. Y., Schmid, R. (1972) Enzymatic degradation of heme. oxygenative cleavage requiring cytochrome p-450. *Biochemistry.* 11, 9, 1716–1720. doi: 10.1021/bi00759a029.
258. Vijayan, V., Wagener, F. A. D. T. G., Immenschuh, S. (2018) The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 153, 159–167. doi: 10.1016/j.bcp.2018.02.010.
259. Kim, H. P., Ryter, S. W., Choi, A. M. K. (2006) CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 411–449. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141053.
260. Bilban, M., Haschemi, A., Wegiel, B., Chin, B. Y., Wagner, O., Otterbein, L. E. (2008) Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *J. Mol. Med.* 86, 3, 267–279. doi: 10.1007/s00109-007-0276-0.
261. Kikuchi, G., Yoshida, T., Noguchi, M. (2005) Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1, 558–567. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.020.
262. Lad, L., Ortiz De Montellano, P. R., Poulos, T. L. (2004) Crystal structures of ferrous and ferrous–no forms of verdoheme in a complex with human heme oxygenase-1: catalytic implications for heme cleavage. *J. Inorg. Biochem.* 98, 11, 1686–1695. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2004.07.004.

263. Schipper, H. M., Bennett, D. A., Liberman, A., Bienias, J. L., Schneider, J. A., Kelly, J., Arvanitakis, Z. (2006) Glial heme oxygenase-1 expression in alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging*. 27, 2, 252–261. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.016.
264. Gressner, A. M., Gressner, O. A. Bilirubin. In: *Lexikon der medizinischen laboratoriumsdiagnostik*. Springer Verlag, 2019. doi:10.1007/978-3-662-48986-4\_557.
265. Halac, E., Reff, A. (1967) Studies on bilirubin udp-glucuronyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta – Enzymology*. 139, 2, 328–343. doi: 10.1016/0005-2744(67)90036-8.
266. Vannotti, A. *Porphyrine und Porphyrinkrankheiten*. Springer Verlag, 1963. ISBN-10: 364-2981-61-5.
267. Tenhunen, R., Mustajoki, P. (1998) Acute porphyria: treatment with heme. *Semin. Liver Dis.* 18, 1, 53–55. doi: 10.1055/s-2007-1007140.
268. Voswinckel, P. A (1990) constant source of surprises: acute porphyria. Two cases reported by Hippocrates and Sigmund Freud. *His. Psych.* 1, 159–168. doi: 10.1177/0957154X9000100201.
269. Baillièrè, J. B. *Epidemics BK III. Oeuvres complètes d’Hippocrat*. Libraire de l’Académie Royale de Medecine, 1841.
270. Puy, H., Gouya, L., Deybach, J. C. (2010) Porphyrias. *Lancet*. 375, 9718, 924–937. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61925-5.
271. Hausmann, W. (1909) Über die giftige wirkung des hämatoporphyrins auf warmblüter bei belichtung. *Klin. Wochenschr.* 22. doi: -.
272. Meyer-Betz, F. (1913) Untersuchungen über die biologische photodynamische wirkung des hematoporphyrins und anderer derivative des blut und gallenfarbstoffs. *Arch. Klin.* 112, 476–503. doi: -.
273. Soret, J. L. (1883) Recherches sur l’absorption des rayons ultraviolets par diverses substances. *Arch. Sci. Phys. Nat.* 484, 430–485. doi: -.

274. Meyers, U. A., Schuurmans, M. M., Lindberg, R. L. (1998) Acute porphyrias: pathogenesis of neurological manifestations. *Semin. Liver Dis.* 18, 1, 43–52. doi: 10.1055/s-2007-1007139.
275. Stölzel, U., Stauch, T., Kubisch, I. (2018) Porphyrias – what is verified? *Internist.* 59, 12, 1239–1248. doi: 10.1007/s00108-018-0509-z.
276. Günther, H. *Die bedeutung der hämatoporphyrine in physiologie und pathologie.* J. F. Bergmann-Verlag, 1922. ISBN-13: 9783-6-623-3763-9.
277. Fischer, H. (1911) Die Hämatoporphyrine. *Dtsch. Arch. f. klin. Med.* 105, 89.
278. Akagi, R., Kato, N., Inoue, R., Anderson, K. E., Jaffe, E. K., Sassa, S. (2006) delta-Aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) porphyria: the first case in north america with two novel ALAD mutations. *Mol. Genet. Metab.* 87, 4, 329–336. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.10.011.
279. Desnick, R. J., Glass, I. A., Xu, W., Solis, C., Astrin, K. H. (1998) Molecular genetics of congenital erythropoietic porphyria. *Semin. Liver Dis.* 18, 1, 77–84. doi: 10.1055/s-2007-1007143.
280. Elder, G., Harper, P., Badminton, M., Sandberg, S., Deybach, J. C. (2013) The incidence of inherited porphyrias in europe. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 5, 849–857. doi: 10.1007/s10545-012-9544-4.
281. Balwani, M., Desnick, R. J. (2012) The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Blood.* 120, 23, 4496–4504. doi: 10.1182/blood-2012-05-423186.
282. Deacon, A. C., Peters, T. J. (1998) Identification of acute porphyria: evaluation of a commercial screening test for urinary porphobilinogen. *Ann. Clin. Biochem.* 35, 6, 726–732. doi: 10.1177/000456329803500604.
283. Mauzerall, D., Granick, S. (1956) The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* 219, 1, 435–446. doi: 10.1016/S0021-9258(18)65809-0.
284. Lamon, J., With, T. K., Redeker, A. G. (1974) The hoesch test: bedside screening for urinary porphobilinogen in patients with suspected porphyria. *Clin. Chem.* 20, 11, 1438–1440. doi: 10.1093/CLINCHEM/20.11.1438.

285. Watson, C. J., Schwartz, S. (1941) A simple test for urinary porphobilinogen. *Exp. Biol.Med.* 47, 393–394. doi: 10.3181/00379727-47-13152P.
286. Stölzel, U., Stauch, T., Doss, M. O. Heme Synthesis Defects and Porphyrrias. In: *Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of inherited metabolic diseases*. Springer Verlag, 2014. doi:10.1007/978-3-642-40337-8\_33.
287. Podvinec, M., Handschin, C., Looser, R., Meyer, U. A. (2004) Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 24, 9127–9132. doi: 10.1073/pnas.0401845101.
288. The Drug Database for Acute Porphyria. (2022) Zugriff am 07.01.2022. [www.drugs-porphyria.org](http://www.drugs-porphyria.org).
289. Thunell, S., Pomp, E., Brun, A. (2007) Guide to drug porphyrogenicity prediction and drug prescription in the acute porphyrias. *Br. J.Clin. Pharmacol.* 64, 5, 668–679. doi: 10.1111/j.0306-5251.2007.02955.x.
290. Lip, G. Y. H., McColl, K. E. L., Goldberg, A., Moore, M. R. (1991) Smoking and recurrent attacks of acute intermittent porphyria. *Br. Med. J.* 302, 6775, 507–507. doi: 10.1136/bmj.302.6775.507.
291. Kumar, N., Chugh, H., Sood, D., Singh, S., Singh, A., Awasthi, A. D., Tomar, R., Tomar, V., Chandra, R. (2019) Biology of heme: drug interactions and adverse drug reactions with cyp450. *Curr. Top. Med. Chem.* 18, 23, 2042–2055. doi: 10.2174/1568026619666181129124638.
292. Harper, P., Wahlin, S. (2008) Treatment options in acute porphyria, porphyria cutanea tarda, and erythropoietic protoporphyria. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* 10, 6, 444–455. doi: 10.1007/s11938-007-0044-9.
293. AWMF-online (2022) Zugriff am 03.03.2022. [www.awmf.org/leitlinien/detail/anmeldung/1/ll/021-030.html](http://www.awmf.org/leitlinien/detail/anmeldung/1/ll/021-030.html)
294. Kauppinen, R., Mustajoki, P. (1992) Prognosis of acute porphyria: occurrence of acute attacks, precipitating factors, and associated diseases. *Medicine.* 71, 1, 1–13. PMID: 1549056.
295. Li, D. Pgc-1alpha: looking behind the sweet treat for porphyria. *Cell.* 122, 4, 487–489. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.010.



296. Puigserver, P., Spiegelman, B. M. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 (pgc-1): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24, 1, 78–90. doi: 10.1210/er.2002-0012.
297. Kostrzewska, E., Gregor, A., Tarczynska-Nosal, S. (1991) Heme arginate (normosang) in the treatment of attacks of acute hepatic porphyrias. *Mater. Med. Pol.* 23, 4, 259–262. PMID: 1842231.
298. Anderson, K. E., Bonkovsky, H. L., Bloomer, J. R., Shedlofsky, S. I. (2006) Reconstitution of hematin for intravenous infusion. *Ann. Intern. Med.* 144, 7, 537–538. doi: 10.7326/0003-4819-144-7-200604040-00023.
299. Hift, R. J., Meissner, P. N. (2005) An analysis of 112 acute porphyric attacks in cape town, south africa evidence that acute intermittent porphyria and variegate porphyria differ in susceptibility and severity. *Medicine.* 84, 1, 48–60. doi:10.1097/01.md.0000152454.56435.f3.
300. Kauppinen, R. (2005) Porphyrias. *Lancet.* 365, 9455, 241–252. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17744-7.
301. Federal Drug Agency (2019) FDA approves givosiran for acute hepatic porphyria. *Pressemitteilung.* Zugriff am 12.03.2022. [www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-givosiran-acute-hepatic-porphyria](http://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-givosiran-acute-hepatic-porphyria).
302. Scott, L. J. (2020) Givosiran: first approval. *Drugs.* 80, 3, 335–339. doi: 10.1007/s40265-020-01269-0.
303. Köstler, E., Wollina, U. (2005) Therapy of porphyria cutanea tarda. *Expert Opin.Pharmacother.* 6, 3, 377–383. doi: 10.1517/14656566.6.3.377.
304. Stockenhuber, F., Kurz, R., Grimm, G., Moser, G., Balcke, P. (1990) Successful treatment of hemodialysis-related porphyria cutanea tarda with deferoxamine. *Nephron.* 55, 3, 321–324. doi: 10.1159/000185983.
305. Tsega, E., Besrat, A., Damtew, B., Seyoum, E., Landells, J. W. (1981) Chloroquine in the treatment of porphyria cutanea tarda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 3, 401–404. doi: 10.1016/0035-9203(81)90104-8.
306. Mathews-Roth, M. M. Beta-carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. In: *The Science of*

- Photobiology* 409–440. Springer Verlag, **1982**. doi:10.1007/978-1-4684-8312-3\_14.
307. de Villiers, K. A., Kaschula, C. H., Egan, T. J., Marques, H. M. (**2007**) Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not  $\mu$ -oxo dimer formation. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 1, 101–117. doi: 10.1007/s00775-006-0170-1.
308. Asher, C., de Villiers, K. A., Egan, T. J. (**2009**) Speciation of ferriprotoporphyrin IX in aqueous and mixed aqueous solution is controlled by solvent identity, pH, and salt concentration. *Inorg. Chem.* 48, 16, 7994–8003. doi: 10.1021/ic900647y.
309. Schaer, D. J., Buehler, P. W., Alayash, A. I., Belcher, J. D., Vercellotti, G. M. (**2013**) Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood.* 121, 8, 1276–1284. doi: 10.1182/blood-2012-11-451229.
310. Seubert, A., Seubert, S. (**1982**) High-performance liquid chromatographic analysis of porphyrins and their isomers with radial compression columns. *Anal. Biochem.* 124, 2, 303–307. doi: 10.1016/0003-2697(82)90043-4.
311. Carlson, R. E., Dolphin, D. (**1976**) High pressure liquid chromatographic techniques for the separation of complex mixtures of occurring porphyrins naturally. In: *Porphyrins in human diseases*. 1st International Porphyrin Meeting, Freiburg im Breisgau, 1976. doi:10.1159/000398804.
312. Sinclair, P. R., Gorman, N., Jacobs, J. M. (**1999**) Measurement of heme concentration. *Curr. Protoc. Toxicol.* 8, 8.3. doi: 10.1002/0471140856.tx0803s00.
313. Woods, J. S., Simmonds, P. L. (**2001**) Hplc methods for analysis of porphyrins in biological media. *Curr. Protoc. Toxicol.* 8, 8.9. doi: 10.1002/0471140856.tx0809s07.
314. Shantaram Madhurkar, P., Bhawar, S. B., Kolhe, M. H. (**2021**) A Review on: RP-HPLC. *World J. Pharm. Res.* **10**, (2021). doi: 10.20959/wjpr201-20894.

315. Sato, H., Ido, K. I., Kimura, K. (1994) Simultaneous separation and quantification of free and metal-chelated protoporphyrins in blood by three-dimensional hplc. *Clin. Chem.* 40, 7, 1239–1244. PMID: 8013093.
316. Comer, J. M., Zhang, L. (2018) Experimental methods for studying cellular heme signaling. *Cells.* 7, 47. doi: 10.3390/cells7060047.
317. Hirsch, R. E. Heme-protein fluorescence. In: *Topics in fluorescence spectroscopy*. Springer Verlag, 2002. doi: 10.1007/0-306-47102-7\_10.
318. Hennig, G., Gruber, C., Vogeser, M., Stepp, H., Dittmar, S., Sroka, R., Brittenham, G. M. (2014) Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *J.Biophotonics.* 7, 7, 514–524. doi: 10.1002/jbio.201200228.
319. Garland, P., Durnford, A. J., Okemefuna, A. I., Dunbar, J., Nicoll, J. A. R., Galea, J., Boche, D., Bulters, D. O., Galea, I. (2016) Heme-hemopexin scavenging is active in the brain and associates with outcome after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 47, 3, 872–876. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011956.
320. Lübben, M., Morand, K. (1994) Novel prenylated hemes as cofactors of cytochrome oxidases. archaea have modified hemes a and o. *J. Biol. Chem.* 269, 34, 21473–21479. doi: 10.1016/S0021-9258(17)31828-8.
321. Fyrestam, J., Östman, C. (2017) Determination of heme in microorganisms using hplc-ms/ms and cobalt(III) protoporphyrin IX inhibition of heme acquisition in escherichia coli. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 6999–7010. doi: 10.1007/s00216-017-0610-5.
322. Gledhill, M. (2007) The determination of heme b in marine phyto- and bacterioplankton. *Mar. Chem.* 103, 3, 393–403. doi: 10.1016/j.marchem.2006.10.008.
323. Roche, M. E., Oda, R. P., Lawson, G. M., Landers, J. P. (1997) Capillary electrophoretic detection of metabolites in the urine of patients receiving hypoglycemic drug therapy. *Electrophoresis.* 18, 10, 1865–1874. doi: 10.1002/elps.1150181024.

324. Gouterman, M., Wagnière, G. H., Snyder, L. C. (1963) Spectra of porphyrins: part II. four orbital model. *J. Mol. Spectrosc.* 11, 1–6, 108–127. doi: 10.1016/0022-2852(63)90011-0.
325. Gouterman, M. (1961) Spectra of porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* 6, 138–163. doi: 10.1016/0022-2852(61)90236-3.
326. Uttamlal, M., Sheila Holmes-Smith, A. (2008) The excitation wavelength dependent fluorescence of porphyrins. *Chem. Phys. Lett.* 454, 223–228. doi: 10.1016/j.cplett.2008.02.012.
327. Prakash, T. P., Graham, M. J., Yu, J., Carty, R., Low, A., Chappell, A., Schmidt, K., Zhao, C., Aghajan, M., Murray, H. F., Riney, S., Booten, S. L., Murray, S. F., Gaus, H., Crosby, J., Lima, W. F., Guo, S., Monia, B. P., Swayze, E. E., Seth, P. P. (2014) Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary n-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res.* 42, 13, 8796–8807. doi: 10.1093/nar/gku531.
328. Lambert, J. H. *Photometrie. Photometria, sive de mensura et gradibus luminis 1760*, von Wilhelm Engelmann Verlag, 1892. ISBN-13: 978-1-2799-8310-2.
329. Mayerhöfer, T. G., Popp, J. (2019) Beer's law – why absorbance depends (almost) linearly on concentration. *ChemPhysChem.* 20, 4, 511–515. doi: 10.1002/cphc.201801073.
330. Mayerhöfer, T. G., Pipa, A. V, Popp, J. (2019) Beer's law – why integrated absorbance depends linearly on concentration. *ChemPhysChem.* 20, 21, 2748–2753. doi: 10.1002/cphc.201900787.
331. Omura, T. Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2385. PMID: 14209972.
332. Barr, I., Guo, F. (2015) Pyridine hemochromagen assay for determining the concentration of heme in purified protein solutions. *Bio. Protoc.* 5, 18, E1594. PMID: 27390766.

333. Noé, R., Bozinovic, N., Lecerf, M., Laacroix-Desmazes, S., Dimitrov, J. D. (2019) Use of cysteine as a spectroscopic probe for determination of heme-scavenging capacity of serum proteins and whole human serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172, 311–319. doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.013.
334. Hamm, J., Oh, J.-Y., Lebensburger, J. D., Patel, R. P. (2014) Simultaneous determination of free heme and free hemoglobin in biological samples by spectral deconvolution. *Blood.* 124, 21, 4868–4868. doi: 10.1182/blood.V124.21.4868.4868.
335. Chen, A. J., Yuan, X., Li, J., Dong, P., Hamza, I., Cheng, J.-X. (2018) Label-free imaging of heme dynamics in living organisms by transient absorption microscopy. *Anal. Chem.* 90, 6, 3395–3401. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05046.
336. Meshnick, S. R. (2002) Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int. J. Parasitol.* 32, 13, 1655–1660. doi: 10.1016/s0020-7519(02)00194-7.
337. Pashynska, V. A., van den Heuvel, H., Claeys, M. & Kosevich, M. V. (2004) Characterization of noncovalent complexes of antimalarial agents of the artemisinin-type and fe(III)-heme by electrospray mass spectrometry and collisional activation tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 8, 1181–1190. doi: 10.1016/j.jasms.2004.04.030.
338. Wright, A. D., Wang, H., Gurrath, M., König, G. M., Kocak, G., Neumann, G., Loria, P., Foley, M., Tilley, L. (2001) Inhibition of heme detoxification processes underlies the antimalarial activity of terpene isonitrile compounds from marine sponges. *J. Med. Chem.* 44, 6, 873–885. doi: 10.1021/jm0010724.
339. Charkin, O. P., Klimenko, N. M., Nguyen, P. T., Charkin, D. O., Mebel, A. M., Lin, S. H., Wang, Y.-S., Wei, S.-C., Chang, H.-C. (2005) Fragmentation of heme and hemin<sup>+</sup> with sequential loss of carboxymethyl groups: a dft and mass-spectrometry study. *Chem. Phys. Lett.* 415, 4–6, 362–369. doi: 10.1016/j.cplett.2005.09.036.
340. Nonose, S., Iwaoka, S., Tanaka, H., Okai, N., Shibakusa, T., Fuke, K. (2003) Structures and reactions of biomolecular ions produced with electrospray

- ionization. *Eur. Phys. J. – Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics*. 24, 1, 335–338. doi: 10.1140/epjd/e2003-00168-7.
341. Heller, L. E., Poepe, P. D. (2018) Quantification of free ferriprotoporphyrin IX heme and hemozoin for artemisinin sensitive versus delayed clearance phenotype plasmodium falciparum malarial parasites. *Biochemistry*. 57, 51, 6927–6934. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00959.
342. Whiteaker, J. R., Fenselau, C. C., Fetterolf, D., Steele, D., Wilson, D. (2004) Quantitative determination of heme for forensic characterization of bacillus spores using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76, 10, 2836–2841. doi: 10.1021/ac034959r.
343. Marcero, J. R., Piel, R. B., Burch, J. S., Dailey, H. A. (2016) Rapid and sensitive quantitation of heme in hemoglobinized cells. *Biotechniques*. 61, 2, 83–91. doi: 10.2144/000114444.
344. Bergmann, A., Dou, Z. (2021) Fluorescence-based heme quantitation in toxoplasma gondii. *Bio Protoc.* 11, 12. doi: 10.21769/BioProtoc.4063.
345. Newton, L. D., Pascu, S. I., Tyrrell, R. M., Eggleston, I. M. (2019) Development of a peptide-based fluorescent probe for biological heme monitoring. *Org. Biomol. Chem.* 17, 3, 467–471. doi: 10.1039/C8OB02290A.
346. Neugebauer, U., März, A., Henkel, T., Schmitt, M., Popp, J. (2012) Spectroscopic detection and quantification of heme and heme degradation products. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 10, 2819–2829. doi: 10.1007/s00216-012-6288-9.
347. Guo, X. (2012) Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review. *J. Biophotonics*. 5, 7, 483–501. doi: 10.1002/jbio.201200015.
348. Briand, V. A., Thilakarathne, V., Kasi, R. M., Kumar, C. V. (2012) Novel surface plasmon resonance sensor for the detection of heme at biological levels via highly selective recognition by apo-hemoglobin. *Talanta*. 99, 113–118. doi: 10.1016/j.talanta.2012.05.026.
349. Azevedo, A. M., Martins, V. C., Prazares, D. M., Vojinović, V., Cabral, J. M., Fonseca, L. P. (2003) Horseradish peroxidase: a valuable tool in

- biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* 9, 199–247. doi: 10.1016/s1387-2656(03)09003-3.
350. Thomas, J., Weinstein, J. D. (1990) Measurement of heme efflux and heme content in isolated developing chloroplasts. *Plant. Physiol.* 94, 3, 1414–1423. doi: 10.1104/pp.94.3.1414.
351. Atamna, H., Brahmabhatt, M., Atamna, W., Shanower, A., Dhahbi, J. M. (2015) Apohrp-based assay to measure intracellular regulatory heme. *Metallomics.* 7, 2, 309–321. doi: 10.1039/c4mt00246f.
352. Espinas, N. A., Kobayashi, K., Takahashi, S., Mochizuki, N., Masuda, T. (2012) Evaluation of unbound free heme in plant cells by differential acetone extraction. *Plant Cell Physiol.* 53, 7, 1344–1354. doi: 10.1093/pcp/pcs067.
353. Takahashi, S., Masuda, T. (2009) High throughput heme assay by detection of chemiluminescence of reconstituted horseradish peroxidase. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 12, 5, 532–535. doi: 10.2174/138620709788489028.
354. Josephy, P. D., Eling, T., Mason, R. P. (1982) The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. free radical and charge-transfer complex intermediates. *J. Biol. Chem.* 257, 7, 3669–3675. PMID: 6277943.
355. Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., Hajdu, J. (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature.* 417, 6887, 463–468. doi: 10.1038/417463a
356. Arpino, J. A. J. J., Czapinska, H., Piasecka, A., Edwards, W. R., Barker, P., Gajda, M. J., Bochtler, M., Jones, D. D. (2012) Structural basis for efficient chromophore communication and energy transfer in a constructed didomain protein scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 33, 13632–13640. doi: 10.1021/ja301987h.
357. Song, Y., Yang, M., Wegner, S. V, Zhao, J., Zhu, R. A, Wu, Y., He, C., Chen, P. R. (2015) Genetically encoded fret sensor for intracellular heme. *ACS Chem. Biol.* 10, 7, 1610–1615. doi: 10.1021/cb5009734.

358. Janas, M. M., Schlegel, M. K., Harbison, C. E., Yilmaz, V. O., Jiang, Y., Parmar, R., Zlatev, I., Castoreno, A., Xu, H., Shulga-Morskaya, S., Rajeev, K. G., Manoharan, M., Keirstead, N. D., Maier, M. A., Jadhav, V. (2018) Selection of galNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. *Nat. Commun.* 9, 1, 1–10. doi: 10.1038/s41467-018-02989-4.
359. Østergaard, M. E., Yu, J., Kinberger, G. A., Wan, W. B., Migawa, M. T., Vasquez, G., Schmidt, K., Gaus, H. J., Murray, H. M., Low, A., Swayze, E. E., Prakash, T. P. Seth, P. P. (2015) Efficient synthesis and biological evaluation of 5'-galNAc conjugated antisense oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* 26, 8, 1451–1455. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00265.
360. Abshire, J. R., Rowlands, C. J., Ganesan, S. M., So, P. T. C., Niles, J. C. (2017) Quantification of labile heme in live malaria parasites using a genetically encoded biosensor. *Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A.* 114, 11, E2068–E2076. doi:10.1073/pnas.1615195114.
361. Smith, D. W. (1980) The molecular biology of mammalian hemoglobin synthesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 10, 2, 116–122. PMID: 6992694.
362. Korolnek, T., Hamza, I. (2015) Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood.* 125, 19, 2893–2897. doi: 10.1182/blood-2014-12-567776.
363. Sassa, S. (2006) Biological implications of heme metabolism. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 38, 3, 138–155. doi: 10.3164/jcbn.38.138.
364. Belcher, J. D., Beckman, J. D., Balla, J., Vercelotti, G. M. (2010) Heme degradation and vascular injury. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 2, 223–248. doi: 10.1089/ars.2009.2822.
365. Balla, J., Vercelotti, G. M., Jeney, V., Yachie, A., Varga, Z., Eaton, J. W., Balla, G. (2005) Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 11, 1030–1043. doi: 10.1002/mnfr.200500076.



366. Dutra, F. F., Alves, L. S., Rodrigues, D., Fernandez, P. L., de Oliveira, R., Golenbock, D. T., Zamboni, D. S., Bozza, M. T. (2014) Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 39, E4110–E4118. doi: 10.1073/pnas.1405023111.
367. Martins, R., Maier, J., Gorki, A.-D., Huber, K. V. M., Sharif, O., Starkl, P., Saluzzo, S., Quattrone, F., Gawish, R., Lakovits, K., Aichinger, M. C., Radic-Sarikas, B., Lardeau, C.-H., Hladik, A., Korosec, A., Brown, M., Vaahtomeri, K., Duggan, M., Kerjaschki, D., Esterbauer, H., Colinge, J., Eisenbarth, S. C., Decker, T., Bennett, K. L., Kubicek, S., Sixt, M., Superti-Furga, G., Knapp, S. (2016) Heme drives hemolysis-induced susceptibility to infection via disruption of phagocyte functions. *Nat. Immunol.* 17, 12, 1361–1372. doi: 10.1038/ni.3590.
368. Effenberger-Neidnicht, K., Hartmann, M. (2018) Mechanisms of hemolysis during sepsis. *Inflammation.* 41, 5, 1569–1581. doi: 10.1007/s10753-018-0810-y.
369. Flegel, W. A. (2015) Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. *Transfusion.* 55, 0, S47–S58. doi: 10.1111/trf.13147.
370. Saeed, O., Jakobleff, W., Chau, M., Rangasamy, S., Algodi, M., Makkiya, M., Cruz, M., Patel, S., Murthy, S., Sims, D., Shin, J., Goldstein, D., Jorde, U. (2016) Severity of hemolysis is associated with death and ischemic stroke during veno-arterial extracorporeal membrane support. *J. Heart Lung Transplant.* 35, 4, S244. doi:10.1016/j.healun.2016.01.692.
371. Almeida Moreira, J., Rocha Laurentino, M., Pinheiro Gonçalves Machado, R., Calvacante Barbosa, M., Pinheiro Gonçalves, R., de Menezes Mota, A., Brito da Silva Rocha, L., Maria Costa Martins, A., Braga de Lima Arruda, A., Pereira de Souca, I., Oinheiro, Gonçalves, R. (2015) Pattern of hemolysis parameters and association with fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients in steady state. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 37, 3, 167–171. doi:10.1016/j.bjhh.2015.01.008.
372. Arruda, M. A., Rossi, A. G., de Freitas, M. S., Barja-Fidalgo, C., Graça-Souza, A. V. (2004) Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement

- of phosphoinositide 3-kinase, mapk and nfkb. *J. Immunol.* 173, 3, 2023–2030. doi: 10.4049/jimmunol.173.3.2023.
373. Aich, A., Freundlich, M., Vekilov, P. G. (2015) The free heme concentration in healthy human erythrocytes. *Blood Cells, Mol. Dis.* 55, 4, 402–409. doi: 10.1016/j.bcmd.2015.09.003.
374. Vinchi, F., De Franceschi, L., Ghigo, A., Townes, T., Cimino, J., Silengo, L., Hirsch, E., Altruda, F., Tolosano, E. (2013) Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation* 127, 1317–1329. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.130179.
375. Simionatto, C. S., Cabal, R., Jones, R. L., Galbraith, R. A. (1988) Thrombophlebitis and disturbed hemostasis following administration of intravenous hematin in normal volunteers. *Am. J. Med.* 85, 4, 538–540. doi: 10.1016/s0002-9343(88)80092-5.
376. Hess, J. R. (2014) Measures of stored red blood cell quality. *Vox Sang.* 107, 1, 1–9. doi: 10.1111/vox.12130.
377. Balla, J., Jacob, H. S., Balla, G., Nath, K., Eaton, J. W., Vercellotti, G. M. (1993) Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 20, 9285–9289. doi: 10.1073/pnas.90.20.9285.
378. Butt, O. I., Buehler, P. W., D’Agnillo, F. (2009) Differential induction of renal heme oxygenase and ferritin in ascorbate and nonascorbate producing species transfused with modified cell-free hemoglobin. *Antioxid. Redox. Signal.* 12, 2, 199–208. doi: 10.1089/ars.2009.2798.
379. Olson, J. S., Foley, E. W., Rogge, C., Tsai, A.-L., Doyle, M. ., Lemon, D. D. (2004) No scavenging and the hypertensive effect of hemoglobin-based blood substitutes. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 6, 685–697. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.030.
380. Minneci, P. C., Deans, K. J., Zhi, H., Yuen, P. S., Star, R. A., Banks, S. M., Schechter, A. N., Natanson, C., Gladwin, M. T., Solomon, S. B. (2005) Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated no

inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J. Clin. Invest.* 115, 3409–3417. doi: 10.1172/JCI25040.

381. Ackers, G. K., Halvorson, H. R. (1974) The linkage between oxygenation and subunit dissociation in human hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 11, 4312–4316. doi: 10.1073/pnas.71.11.4312.
382. Winterbourn, C. C. (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the fenton reaction. *Toxicol. Lett.* 82–83, 969–974. doi: 10.1016/0378-4274(95)03532-x.
383. Beppu, M., Nagoya, M. & Kikugawa, K. (1986) Role of heme compounds in the erythrocyte membrane damage induced by lipid hydroperoxide. *Chem. Pharm. Bull* 34, 5063–5070. doi: -.
384. Ryter, S. W., Tyrrell, R. M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 2, 289–309. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00223-3.
385. Grinshtein, N., Bamm, V. V., Tsemakhovich, V. A., Shaklai, N. (2003) Mechanism of low-density lipoprotein oxidation by hemoglobin-derived iron. *Biochemistry.* 42, 23, 6977–6985. doi: 10.1021/bi020647r.
386. Balla, G., Jacob, H. S., Eaton, J. W., Belcher, J. D., Vercellotti, G. M. (1991) Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler. Thromb.* 11, 1700–1711. doi: 10.1161/01.ATV.11.6.1700.
387. Balla, G., Vercollotti, G. M., Muller-Eberhard, U., Eaton, J., Jacob, H. S. (1991) Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab. Invest.* 64, 5, 648–655. PMID: 2030579.
388. Vercellotti, G. M., Balla, G., Bala, J., Nath, K., Eaton, J. W., Jacob, H. S. (1994) Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22, 2, 207–213. doi: 10.3109/10731199409117415.

389. Aft, R. L., Mueller, G. C. (1984) Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. *J. Biol. Chem.* 259, 1, 301–305. PMID: 6323403.
390. Janciauskiene, S., Vijayan, V., Immenschuh, S. (2020) Tlr4 Signaling by heme and the role of heme-binding blood proteins. *Front. Immunol.* 11, 1964. doi: 10.3389/fimmu.2020.01964.
391. Lei, J., Paul, J., Wang, Y., Gupta, M. Vang, D., Thompson, S., Jha, R., Nguyen, J., Valverde, Y., Lamarre, Y., Jones, M. K., Gupta, K. (2021) Heme causes pain in sickle mice via toll-like receptor 4-mediated reactive oxygen species- and endoplasmic reticulum stress-induced glial activation. *Antioxid. Redox Signal.* 34, 4, 279–293. doi: 10.1089/ars.2019.7913.
392. Sansing, L. H., Harris, T. H., Welsh, F. A., Kasner, S. E., Hunter, C. A., Kariko, K. (2011) Toll-like receptor 4 contributes to poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Annals Neurol.* 70, 4, 646–656. doi: 10.1002/ana.22528.
393. Belcher, J. D., Chen, C., Nguyen, J., Milbauer, L., Abdulla, F., Alayash, A. I., Smith, A., Nath, K. A., Hebbel, R. P., Vercellotti, G. M. (2014) Heme triggers Tlr4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood.* 123, 3, 377–390. doi: 10.1182/blood-2013-04-495887.
394. Rodriguez, F., Kemp, R., Balazy, M., Nasjletti, A. (2003) Effects of exogenous heme on renal function: role of heme oxygenase and cyclooxygenase. *Hypertension.* 42, 4, 680–684. doi: 10.1161/01.HYP.0000085785.40581.1A.
395. Nath, K. A., Balla, J., Croatt, A. J., Vercellotti, G. M. (1995) Heme protein-mediated renal injury: a protective role for 21-aminosteroids in vitro and in vivo. *Kidney Int.* 47, 2, 592–602. doi: 10.1038/ki.1995.75.
396. Goldstein, L., Teng, Z.-P., Zeserson, E., Patel, M., Regan, R. F. (2003) Hemin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *J. Neurosci. Res.* 73, 113–121. doi: 10.1002/jnr.10633.

397. Bhoite-Solomon, V., Kessler-Icekson-G., Shakalai, N. (1993) Myocyte Injury by Hemin. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29A, 8, 636–642. doi: 10.1007/BF02634552.
398. Wagener, F. A. D. T. G., Feldman, E., de Witte, T., Abraham, N. G. (1997) Heme induces the expression of adhesion molecules icam1, vcam-1, and e-selectin in vascular endothelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216, 3, 456–463. doi: 10.3181/00379727-216-44197.
399. Shono, T., Ono, M., Izumi, H., Jimi, S. I., Matsushima, K., Okamoto, T., Kohno, K., Kuwano, M. (1996) Involvement of the transcription factor nfkb in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 16, 8, 4231–4239. doi: 10.1128/MCB.16.8.4231.
400. Lavrovsky, Y., Schwartzman, M. L., Levere, R. D., Kappas, A., Abraham, N. G. (1994) Identification of binding sites for transcription factors nfkb and ap-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 13, 5987–5991. doi: 10.1073/pnas.91.13.5987.
401. Graça-Souza, A. V., Arruda, M. A. B., de Freitas, M. S., Barja-Fidalgo, C., Oliveira, P. L. (2002) Neutrophil activation by heme: Implications for inflammatory processes. *Blood.* 99, 11, 4160–4165. doi: 10.1182/blood.v99.11.4160.
402. Vallelian, F., Schaer, C. Q., Deuel, J. W., Ingoglia, G., Humar, R., Buehler, P. W., Schaer, D. J. (2018) Revisiting the putative role of heme as a trigger of inflammation. *Pharmacol. Res. Perspect.* 6, 2, 1–15. doi: 10.1002/prp2.392.
403. Bourne, J. H., Colicchia, M., Di, Y., Martin, E., Slater, A., Roumenina, L. T., Dimitrov, J. D., Watson, S. P., Rayes, J. (2021) Heme induces human and mouse platelet activation through c-type-lectin-like receptor-2. *Haematologica.* 106, 2, 626–629. doi: 10.3324/haematol.2020.246488.
404. Vanacore, R., Eskew, J. D., Sung, L., Davis, T., Smith, A. (2019) Safe coordinated trafficking of heme and iron with copper maintain cell homeostasis: modules from the hemopexin system. *Biometals.* 32, 3, 355–367. doi: 10.1007/s10534-019-00194-4.

405. Stuart, M. J., Nagel, R. L. (2004) Sickle-cell disease. *Lancet*. 364, 9442, 1343–1360 doi: 10.1016/S0140-6736(04)17192-4.
406. Morris, C. R., Kuypers, F. A., Kato, G. J., Lavrisha, L., Larkin, S., Singer, T., Vichinsky, E. P. (2005) Hemolysis-associated pulmonary hypertension in thalassemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1054**, 481–485. doi: 10.1196/annals.1345.058.
407. Todesursachen in deutschland – statistisches bundesamt. (2022) Zugriff am 03.02.2022. [www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](http://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html).
408. Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., Wells, I. C. (1949) Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*. 25, 110, 543–548. doi: 10.1126/science.110.2865.543.
409. Ashouri, R., Fangman, M., Burris, A., Ezenwa, M. O., Wilkie, D. J., Doré, S. (2021) Critical role of hemopexin mediated cytoprotection in the pathophysiology of sickle cell disease. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12, 6408. doi: 10.3390/ijms22126408.
410. Bunn, H. F. (1997) Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 337, 11, 762–769. doi: 10.1056/NEJM199709113371107.
411. Roseff, S. D. (2009) Sickle cell disease: a review. *Immunohematology*. 25, 2, 67–74. PMID: 19927623.
412. Roumenina, L. T., Chadebech, P., Bodivit, G., Vieira-Martins, P., Grundenwald, A., Boudhabhay, I., Poillerat, V., Pakdaman, S., Kiger, L., Jouard, A., Audureau, E., Pirenne, F., Galactéros, F., Frémeaux-Bacchi, V, Bartolucci, P. (2020) Complement activation in sickle cell disease: Dependence on cell density, hemolysis and modulation by hydroxyurea therapy. *Am. J. Hematol.* 95, 5, 456–464. doi: 10.1002/ajh.25742.
413. Hebbel, R. P., Morgan, W. T., Eaton, J. W., Hedlund, B. E. (1988) Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1, 237–241. doi: 10.1073/pnas.85.1.237.

414. Chou, S. T. (2013) Transfusion therapy for sickle cell disease: a balancing act. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2013, 439–446. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.439.
415. Hirao, H., Dery, K. J., Kageyama, S., Nakamura, K., Kupiec-Weglinski, J. W. (2020) Heme oxygenase-1 in liver transplant ischemia-reperfusion injury: from bench-to bedside. *Free Radic. Biol. Med.* 157, 75–82. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.012.
416. Hartig, W., Biesalski, H. K., Druml, W., Fürst, P. & Weimann, A. 7 Antioxidanzien. In: *Ernährungs- und Infusionstherapie* Thieme Verlag, 2004. doi:10.1055/B-0034-14164.
417. Shen, X.-D., Ke, B., Zhai, Y., Gao, F., Busuttill, R. W., Cheng, G., Kupiec-Weglinski, J. W. (2005) Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Transplant.* 5, 8, 1793–1800. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.00932.x.
418. Kupke, T., Klare, J. P., Brügger, B. (2020) Heme binding of transmembrane signaling proteins undergoing regulated intramembrane proteolysis. *Comm. Biol.* 3, 1, 73. doi: 10.1038/s42003-020-0800-0.
419. Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., Marsh, K. (2016) Malaria: biology and disease. *Cell.* 167, 3, 610–624. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055.
420. Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., Hooft van Huijsduijnen, R., van Voorhis, W. C., Wells, T. N. C. (2017) Malaria. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 3, 1, 1–24. doi: 10.1038/nrdp.2017.50.
421. Aly, A. S. I., Vaughan, A. M., Kappe, S. H. I. (2009) Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 195–221. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073403.
422. Josling, G. A., Llinás, M. (2015) Sexual development in plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 9, 573–587. doi: 10.1038/nrmicro3519.
423. Daily, J. P. (2017) Malaria 2017: update on the clinical literature and management. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 19, 8, 28. doi: 10.1007/s11908-017-0583-8.

424. Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., Chen, L., Lampe, M., Tham, W.-H., Wilson, D., Nebl, T., Marapana, D., Triglia, T., Wond, W., Rogers, K. L., Cowman, A. F. (2016) Essential role of the pfrh5/pfripr/cyrpa complex during plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. *Cell Host Microbe*. 20, 1, 60–71. doi: 10.1016/j.chom.2016.06.004.
425. Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, 'O., Kwiatkowski, D. P., Duraishingham, M. T., Rayner, J. C., Wright, G. J. (2011) Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by plasmodium falciparum. *Nature*. 480, 7378, 534–537. doi: 10.1038/nature10606.
426. Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W.-H., de Jong, N. W. M., Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Cowman, A. F., Crabb, B. S. (2015) Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. *PLoS Pathog*. 11, 2, E1004670. doi: 10.1371/journal.ppat.1004670.
427. Chugh, M., Sundararaman, V., Kumar, S., Reddy, V. S., Siddiqui, W. A., Stuart, K. D., Malhotra, P. (2013) Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in plasmodium falciparum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 14, 5392–5397. doi: 10.1073/pnas.1218412110.
428. Mohandas, N., An, X. (2012) Malaria and human red blood cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 4, 593–598. doi: 10.1007/s00430-012-0272-z.
429. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 1–2, 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
430. Atichartakarn, V., Chuncharunee, S., Archararit, N., Udomsubpayakul, U., Aryurachai, K. (2014) Intravascular hemolysis, vascular endothelial cell activation and thrombophilia in splenectomized patients with hemoglobin e/ $\beta$ -thalassemia disease. *Acta Haematol.* 132, 1, 100–107. doi: 10.1159/000355719.



431. Fishbein, M. C., Fishbein, G. A. (2015) Arteriosclerosis: facts and fancy. *Cardiovasc. Pathol.* 24, 6, 335–342. doi: 10.1016/j.carpath.2015.07.007.
432. Jeney, V., Balla, G., Balla, J. (2014) Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis. *Front.Physiol.* 5, 379. doi: 10.3389/fphys.2014.00379.
433. Li, W., Ostblom, M., Xu, L.-H., Hellsten, A., Leanderson, P., Liedberg, B., Brunk, U. T., Eaton, J. W., Yuan, X.-M. (2006) Cytocidal effects of atheromatous plaque components: the death zone revisited. *FASEB J.* 20, 13, 2281–2290. doi: 10.1096/fj.06-6114com.
434. Christaki, E., Opal, S. M. (2008) Is the mortality rate for septic shock really decreasing? *Curr. Opin. Crit. Care.* 14, 5, 580–586. doi: 10.1097/MCC.0b013e32830f1e25.
435. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30, 1, 16–34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976.
436. Victor, V., Esplugues, J., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M. (2009) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect. Disord. Drug Targets.* 9, 4, 376–389. doi: 10.2174/187152609788922519.
437. Fagoonee, S., Gburek, J., Hirsch, E., Marro, S., Moestrup, S. K., Laurberg, J. M., Christensen, E. I., Silengo, L., Altruda, F., Tolosano, E. (2005) Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading. *Am. J. Pathol.* 166, 4, 973–983. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62319-X.
438. Belcher, J. D., Chen, C., Nguyen, J., Abdulla, F., Zhang, P., Nguyen, H., Nguyen, P., Killeen, T., Miescher, S. M., Brinkman, N., Nath, K. A., Steer, C. J., Vercellotti, G. M. (2018) Haptoglobin and hemopexin inhibit vaso-occlusion and inflammation in murine sickle cell disease: role of heme oxygenase-1 induction. *PLoS One.* 13, 4, 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0196455.
439. Andersen, M. N., Mouritzen, C. V., Gabrielli, E. R. (1966) Mechanisms of plasma hemoglobin clearance after acute hemolysis in dogs: serum

- haptoglobin levels and selective deposition in liver and kidney. *Ann. Surg.* 164, 5, 905–912. PMID: 5923119.
440. Boretti, F. S., Buehler, P. W., D’Agnillo, Kluge, K., Glaus, T., Butt, O. I., Jia, Y., Goede, J., Pereira, C. P., Maggiorini, M., Schoedon, G., Alayash, A. I., Schaer, D. I. (2009) Sequestration of extracellular hemoglobin within a haptoglobin complex decreases its hypertensive and oxidative effects in dogs and guinea pigs. *J. Clin. Invest.* 119, 8, 2271–2280. doi: 10.1172/JCI39115.
441. Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K., Moestrup, S. K. (2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 409, 6817, 198–201. doi: 10.1038/35051594.
442. Frimat, M., Boudhabhay, I., Roumenina, L. T. (2019) Hemolysis derived products toxicity and endothelium: model of the second Hit. 11, 11, 660. doi:10.3390/toxins11110660.
443. Andersen, C. B. F., Stødkilde, K., Sæderup, K. L., Kuhlee, A., Raunser, S., Graversen, J. H., Moestrup, S. K. (2017) Haptoglobin. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 14, 814–831. doi: 10.1089/ars.2016.6793.
444. Bowman, B. H., Kurosky, A. (1982) Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv. Hum. Genet.* 12, 189–261. doi: 10.1007/978-1-4615-8315-8\_3.
445. McCormick, D. J., Atassi, M. Z. (1990) Hemoglobin binding with haptoglobin: delineation of the haptoglobin binding site on the alpha-chain of human hemoglobin. *J. Protein Chem.* 9, 6, 735–742. doi: 10.1007/BF01024768.
446. Gladwin, M. T., Kanas, T., Kim-Shapiro, D. B. (2012) Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. *J.Clin. Invest.* 122, 4, 1205–1208. doi: 10.1172/JCI62972.
447. Karnaukhova, E., Krupnikova, S. S., Rajabi, M., Alayash, A. I. (2012) Heme binding to human alpha-1 proteinase inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820, 12, 2020–2029. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.012.

448. Sadrzadeh, S. M. H., Bozorgmehr, J. (2004) Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Pathol. Patterns Rev.* 121, S97–S104. doi: 10.1309/8GLX5798Y5XHQ0VW.
449. Purushothaman, K. R., Purushothaman, M., Levy, A. P., Lento, P. A., Evrad, S., Kovacic, J. C., Briley-Saebo, K., Tsimikas, S., Witztum, J. L., Krishnan, P., Kini, A., Fayad, Z. A., Fuster, V., Sharma, S. K., Moerno, P. R. (2012) Increased expression of oxidation-specific epitopes and apoptosis are associated with haptoglobin genotype: possible implications for plaque progression in human atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 2, 112–119. doi: 10.1016/j.jacc.2012.04.011.
450. Melamed-Frank, M., Lache, O., Enav, B. I., Szafranek, T., Levy, N. S., Ricklis, R. M., Levy, A. P. (2001) Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood.* 98, 13, 3693–3698. doi: 10.1182/blood.v98.13.3693.
451. Pimenova, T., Pereira, C. P., Schaer, D. J., Zenobi, R. (2009) Characterization of high molecular weight multimeric states of human haptoglobin and hemoglobin-based oxygen carriers by high-mass maldi ms. *J. Sep. Sci.* 32, 8, 1224–1230. doi: 10.1002/jssc.200800625.
452. Lipiski, M., Deuel, J. W., Baek, J. H., Engelsberger, W. R., Buehler, p. W., Schaer, D. J. (2013) Human hp1-1 and hp2-2 phenotype-specific haptoglobin therapeutics are both effective in vitro and in guinea pigs to attenuate hemoglobin toxicity. *Antiox. Redox. Signal.* 19, 14, 1619–1633. doi: 10.1089/ars.2012.5089.
453. Graversen, J. H., Madsen, M., Moestrup, S. K. (2002) Cd163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 4, 309–314. doi: 10.1016/s1357-2725(01)00144-3.
454. Madsen, M., Møller, H. J., Jensby Nielsen, M., Jacobsen, C., Graversen, J. H., van den Berg, T., Moestrup, S. K. (2004) Molecular characterization of the haptoglobin-hemoglobin receptor cd163. ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J. Biol. Chem.* 279, 49, 51561–51567. doi: 10.1074/jbc.M409629200.

455. Etzerodt, A., Kjolby, M., Jensby Nielsen, M., Maniceki, M., Svendsen, P., Moestrup, S. K. (2013) Plasma clearance of hemoglobin and haptoglobin in mice and effect of cd163 gene targeting disruption. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 17, 2254–2263. doi: 10.1089/ars.2012.4605.
456. Thomsen, J. H., Etzerodt, A., Svendsen, P., Moestrup, S. K. The haptoglobin-cd163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 523652. doi: 10.1155/2013/523652.
457. Møller, H. J., Peterslund, N. A., Graversen, J. H., Moestrup, S. K. (2002) Identification of the hemoglobin scavenger receptor/cd163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood.* 99,1, 378–380. doi: 10.1182/blood.v99.1.378.
458. Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J., Schmitz, G. (2000) Regulation of scavenger receptor cd163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 67, 1, 97–103. PMID: 10648003.
459. Philippidis, P., Mason, J. C., Evans, B. J., Nadra, I., Taylor, K. M., Haskard, D. O., Landis, R. C. (2004) Hemoglobin scavenger receptor cd163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res.* 94, 1, 119–126. doi: 10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9.
460. Ugocsai, P., Barlage, S., Dada, A., Schmitz, G. (2006) Regulation of surface cd163 expression and cellular effects of receptor mediated hemoglobin-haptoglobin uptake on human monocytes and macrophages. *Cytometry A.* 69, 3, 203–205. doi: 10.1002/cyto.a.20235.
461. Schaer, C. A., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M. O., Schaer, D. J. (2006) Constitutive endocytosis of cd163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ. Res.* 99, 9, 943–950. doi: 10.1161/01.RES.0000247067.34173.1b.
462. Montfort, W. R., Weichsel, A., Andersen, J. F. (2000) Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *rhodnius prolixus* and other blood-

sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1482, 1–2, 110–118. doi: 10.1016/s0167-4838(00)00165-5.

463. Zhao, D., Wang, S.-R., Ma, W.-W., Liu, L.-J., Sun, C.-H. (2008) Alpha1-macroglobulin: a potential obesity-related factor in serum. *Med. Sci. Monit.* 14, 3, BR57-BR61. PMID: 18301350.
464. Dockal, M., Carter, D. C., Rüker, F. (2000) Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *J. Biol. Chem.* 275, 5, 3042–3050. doi: 10.1074/jbc.275.5.3042.
465. Dörner, K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Thieme Verlag, 2006. ISBN-13: ISBN 978-3-13-240280-5
466. Camejo, G., Halberg, C., Manschik-Lundin, A., Hurt-Camejo, E., Rosengren, B., Olsson, H., Hansson, G. I., Forsberg, G. B., Ylhen, B. (1998) Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of ldl with human macrophages. *J. Lipid Res.* 39, 4, 755–766. doi: 10.1016/S0022-2275(20)32564-5.
467. Miller, Y. I., Shaklai, N. (1999) Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochim. Biophys. Acta – Molecular Basis of Disease*. 1454, 2, 153–164. doi: 10.1016/s0925-4439(99)00027-7.
468. Wardell, M., Wang, Z., Ho, J. X., Robert, J., Ruker, F., Ruble, J., Carter, D. C. (2002) The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 4, 813–819. doi: 10.1006/bbrc.2002.6540.
469. Guizado, T. R. C., Louro, S. R. W., Anteneodo, C. (2012) Dynamics of heme complexed with human serum albumin: a theoretical approach. *Eur. Biophys. J.* 41, 12, 1033–1042. doi: 10.1007/s00249-012-0860-2.
470. Zunszain, P. A., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E., Curry, S. (2003) Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct. Biol.* 3, 6. doi: 10.1186/1472-6807-3-6.
471. Adams, P. A., Berman, M. C. (1980) Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin. *Biochem. J.* 191, 1, 95–102. doi: 10.1042/bj1910095.

472. Muller-Eberhard, U., Liem, H. H. (1975) Hemopexin, the heme-binding serum beta-glycoprotein. *La Ricerca in Clin. Lab.* 5, 275. doi: 10.1007/BF02910154.
473. Morgan, W. T., Muller-Eberhard, U. (1972) Interactions of porphyrins with rabbit hemopexin. *J. Biol. Chem.* 247, 22, 7181–7187. doi: 10.1016/S0021-9258(19)44611-5.
474. Hrkal, Z., Vodrážka, Z., Kalousek, I. (1974) Transfer of heme from ferrihemoglobin and ferrihemoglobin isolated chains to hemopexin. *Eur. J. Biochem.* 43, 1, 73–78. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03386.x.
475. Muster, P., Tatum, F., Smith, A., Morgan, W. T. (1991) Further characterization of structural determinants of rabbit hemopexin function. *J. Protein Chem.* 10, 1, 123–128. doi: 10.1007/BF01024662.
476. Cox, M. C., le Brun, N., Thomson, A. J., Smith, A., Morgan, W. T., Moore, G. R. (1995) Mcd, epr and nmr spectroscopic studies of rabbit hemopexin and its heme binding domain. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1253, 2, 215–223. doi: 10.1016/0167-4838(95)00163-4.
477. Morgan, W. T., Muster, P., Tatum, F. M., McConnell, J., Conway, T. P., Hensley, P., Smith, A. (1988) Use of hemopexin domains and monoclonal antibodies to hemopexin to probe the molecular determinants of hemopexin-mediated heme transport. *J. Biol. Chem.* 263, 17, 8220–8225. doi: 10.1016/S0021-9258(18)68466-2.
478. Wu, M.-L., Morgan, W. T. (1995) Thermodynamics of heme-induced conformational changes in hemopexin: role of domain-domain interactions. *Protein Sci.* 4, 1, 29–34. doi: 10.1002/pro.5560040105.
479. Morgan, W. T., Smith, A. (1984) Domain structure of rabbit hemopexin. isolation and characterization of a heme-binding glycopeptide. *J. Biol. Chem.* 259, 19, 12001–12006. doi: 10.1016/S0021-9258(20)71310-4.
480. Karnaukhova, E., Owczarek, C., Schmidt, P., Schaer, D. J., Buehler, P. W. (2021) Human plasma and recombinant hemopexins: heme binding revisited. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3, 1–18. doi: 10.3390/ijms22031199.

481. Shipulina, N., Smith, A., Morgan, W. T. (2000) Heme binding by hemopexin: evidence for multiple modes of binding and functional implications. *J. Protein Chem.* 19, 3, 239–248. doi: 10.1023/a:1007016105813.
482. Hutchins, P. M., Ronsein, G. E., Monette, J. S., Pamir, N., Wimberger, J., He, Y., Anantharamaiah, G. M., Kim, D. S., Ranchalis, J. E., Jarvik, G. P., Vaisar, T., Heinecke, J. W. (2014) Accurate quantification of high density lipoprotein particle concentration by calibrated ion mobility analysis. *Clin. Chem.* 60, 11, 1393. doi: 10.1373/clinchem.2014.228114.
483. Movva, R., Rader, D. J. (2008) Laboratory assessment of hdl heterogeneity and function. *Clin. Chem.* 54, 5, 788–800. doi: 10.1373/clinchem.2007.101923.
484. Friday, K. E., Drinkwater, B. L., Bruemmer, B., Chesnut, C., Chait, A. (1993) Elevated plasma low-density lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol levels in amenorrheic athletes: effects of endogenous hormone status and nutrient intake. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 6, 1605–1609. doi: 10.1210/jcem.77.6.8263148.
485. Bancells, C., Canals, F., Benítez, S., Colomé, N., Julve, J., Ordóñez-Llanos, J., Sánchez-Quesada, J. L. (2010) Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 51, 12, 3508. doi: 10.1194/jlr.M009258.
486. Lisowska-Myjak, B. (2005) Aat as a diagnostic tool. *Clin. Chim. Acta.* 352, 1–2, 1–13. doi: 10.1016/j.cccn.2004.03.012.
487. Brantly, M. L., Wittes, J. T., Vogelmeier, C. F., Hubbard, R. C., Fells, G. A., Crystal, R. G. (1991) Use of a highly purified alpha 1-antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient alpha 1-antitrypsin phenotypes. *Chest.* 100, 3, 703–708. doi: 10.1378/chest.100.3.703.
488. Berggård, T., Thelin, N., Falkenberg, C., Enghild, J. J., Åkerström, B. (1997) Prothrombin, albumin and immunoglobulin a form covalent complexes with alpha1-microglobulin in human plasma. *Eur. J. Biochem.* 245, 3, 676–683. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00676.x.

489. Takagi, K., Kin, K., Itoh, Y., Enomoto, H., Kawai, T. (1980) Human alpha1-microglobulin levels in various body fluids. *J. Clin. Pathol.* 33, 8, 786–791. doi: 10.1136/jcp.33.8.786.
490. Rutardottir, S., Karnaukhova, E., Nantasenamat, C., Songtawee, N., Prachayasittikul, V., Rajabi, M., Wester Rosenlöf, L., Alayash, A. I., Åkerström, B. (2016) Structural and biochemical characterization of two heme binding sites on alpha 1-microglobulin using site directed mutagenesis and molecular simulation. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics.* 1864, 1, 29–41. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.10.002.
491. Larsson, J., Allhorn, M., Åkerström, B. (2004) The lipocalin alpha 1-microglobulin binds heme in different species. *Arch. Biochem. Biophys.* 432, 2, 196–204. doi: 10.1016/j.abb.2004.09.021.
492. Karnaukhova, E., Rutardottir, S., Rajabi, M., Wester Rosenlöf, L., Alayash, A. I., Åkerström, B. (2014) Characterization of heme binding to recombinant alpha 1-microglobulin. *Front. Physiol.* 5, 365, 1–11. doi: 10.3389/fphys.2014.00465.
493. Siebel, J. F., Kosinsky, R. L., Åkerström, B., Knipp, M. (2012) Insertion of heme b into the structure of the cys34-carbamidomethylated human lipocalin alpha 1-microglobulin: formation of a [(heme)<sub>2</sub>(alpha 1-microglobulin)]<sub>3</sub> complex. *ChemBioChem.* 13, 6, 879–887. doi: 10.1002/cbic.201100808.
494. Kristiansson, A., Gram, M., Flygare, J., Hansson, S. R., Åkerström, B., Storry, J. R. (2020) The role of alpha 1-microglobulin (A1M) in erythropoiesis and erythrocyte homeostasis – therapeutic opportunities in hemolytic conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 19, 1–22. doi: 10.3390/ijms21197234.
495. Hvidberg, V., Maniecki, M. B., Jacobsen, C., Højrup, P., Møller, H. J., Moestrup, S. K. (2005) Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood.* 106, 7, 2572–2579. doi: 10.1182/blood-2005-03-1185.
496. Grinberg, L. N., O'Brien, P. J., Hrkal, Z. (1999) The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalytic activities of hemin. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1–2, 214–219. doi: 10.1016/s0891-5849(99)00082-9.



497. Smith, A., Morgan, W. T. (1981) Hemopexin-mediated transport of heme into isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 256, 21, 10902–10909. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68530-3.
498. Jennifer, B., Berg, V., Modak, M., Puck, A., Seyerl-Jiresch, M., Knig, S., Zlabinger, G. J., Steinberger, P., Chou, J., Geha, R. S., Öhler, L., Yachie, A., Choe, H., Kraller, M., Stockinger, H., Stöckl, J. (2020) Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for human heme-albumin. *Commun. Biol.* 3, 1, 1–13. doi: 10.1038/s42003-020-01294-5.
499. Pasternack, R. F., Gibbs, E. J., Hoeflin, E., Kosar, W. P., Kubera, G., Skowronek, C. A., Wong, N. M., Muller-Eberhard, U. (1983) Hemin binding to serum proteins and the catalysis of interprotein transfer. *Biochemistry.* 22, 8, 1753–1758. doi: 10.1021/bi00277a002.
500. Morgan, W. T., Heng Liem, H., Sutor, R. P., Muller-Eberhard, U. (1976) Transfer of heme from heme-albumin to hemopexin. *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects.* 444, 2, 435–445. doi: 10.1016/0304-4165(76)90387-1.
501. Stebbing, J., Savage, P., Patterson, S., Gazzard, B. (2004) All for cd91 and cd91 for all. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 1, 1–3. doi: 10.1093/jac/dkh010.
502. Piccard, H., van den Steen, P. E., Opdenakker, G. (2007) Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J. Leukoc. Biol.* 81, 4, 870–892. doi: 10.1189/jlb.1006629.
503. Smith, A., McCulloh, R. J. (2015) Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. *Front. Physiol.* 6, 187. doi: 10.3389/fphys.2015.00187.
504. Muller-Eberhard, U., Javid, J., Liem, H. H., Hanstein, A., Hanna, M. (1968) Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood.* 32, 5, 811–815. doi: 10.1182/blood.V32.5.811.811.
505. Janciauskiene, S. M., Bals, R., Koczulla, R., Vogelmeier, C., Köhnlein, T., Welte, T. (2011) The discovery of alpha 1-antitrypsin and its role in health

- and disease. *Respir. Med.* 105, 8, 1129–1139. doi: 10.1016/j.rmed.2011.02.002.
506. Karnaukhova, E. Recent advances in the research and development of alpha 1-proteinase inhibitor for therapeutic use. In: *Lung Diseases*. InTech, **2012**. ISBN-13: 978-953-51-0180-2.
507. Kalsheker, N., Morley, S.m Morgan, K. (2002) Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 2, 93–98. doi: 10.1042/bst0300093.
508. Janciauskiene, S., Tumpara, S., Wiese, M., Wrenger, S., Vijayan, V., Gueler, F., Chen, R., Madyaningrana, K., Mahadeva, R., Welte, T., Immenschuh, S., Chrostowska-Wynimko, J. (2017) Alpha 1-antitrypsin binds hemin and prevents oxidative activation of human neutrophils: putative pathophysiological significance. *J.Leukoc. Biol.* 102, 4, 1127–1141. doi: 10.1189/jlb.3A0317-124R.
509. Åkerstrom, B., Flower, D. R., Salier, J. P. (2000) Lipocalins: unity in diversity. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1482, 1–2, 1–8. doi: 10.1016/s0167-4838(00)00137-0.
510. Åkerström, B., Gram, M. (2014) A1M, an extravascular tissue cleaning and housekeeping protein. *Free Radic. Biol. Med.* 74, 274–282. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.025.
511. Larsson, J., Wingårdh, K., Berggård, T., Davies, J. R., Lögdberg, L., Strand, S. E., Åkerström, B (2001) Distribution of iodine 125-labeled alpha 1-microglobulin in rats after intravenous injection. *J. Lab. Clin. Med.* 137, 3, 165–175. doi: 10.1067/mlc.2001.112957.
512. Romantsik, O., Agyemang, A. A., Sveinsdóttir, S., Rutadóttir, S., Holmqvist, B., Cinthio, M., Mörgelin, M., Gumus, G., Karlsson, H., Hansson, S. R., Åkerström, B., Ley, D., Gram, M. (2019) The heme and radical scavenger alpha 1-microglobulin (A1M) confers early protection of the immature brain following preterm intraventricular hemorrhage. *J.Neuroinflammation*. 16, 1, 122. doi: 10.1186/s12974-019-1486-4.

513. Kalapotharakos, G., Murtoniemi, K., Åkerström, B., Hämäläinen, E., Kajantie, E., Räikkönen, K., Villa, P., Laivuori, H., Hansson, S. R. (2019) Plasma heme scavengers alpha 1-microglobulin and hemopexin as biomarkers in high-risk pregnancies. *Front. Physiol.* 10, 300. doi: 10.3389/fphys.2019.00300.
514. Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel (2016) Hämovigilanzbericht des Paul-Ehrlich-Instituts. Zugriff am 22.04.2022. [www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/newsroom/pflichtberichte/haemovigilanzberichte/haemovigilanz-bericht-2016-2017.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](http://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/newsroom/pflichtberichte/haemovigilanzberichte/haemovigilanz-bericht-2016-2017.pdf?__blob=publicationFile&v=2).
515. Takahashi, N., Takahashi, Y., Putnam, F. W. (1985) Complete amino acid sequence of human hemopexin, the heme-binding protein of serum. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1, 73–77. doi: 10.1073/pnas.82.1.73.
516. Seery, V. L., Hathaway, G., Eberhard, U. M. (1972) Hemopexin of human and rabbit: molecular weight and extinction coefficient. *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 1, 269–272. doi: 10.1016/0003-9861(72)90035-5.
517. Mauk, M. R., Smith, A., Mauk, G. (2011) An alternative view of the proposed alternative activities of hemopexin. *Protein Sci.* 20, 5, 791–805. doi: 10.1002/pro.616.
518. Mauk, M. R., Rosell, F. I., Lelj-Garolla, B., Moore, G. R., Mauk, A. G. (2005) Metal ion binding to human hemopexin. *Biochemistry.* 44, 6, 1864–1871. doi: 10.1021/bi0481747.
519. Takahashi, N., Takahashi, Y., Putnam, F. W. (1984) Structure of human hemopexin: o-glycosyl and n-glycosyl sites and unusual clustering of tryptophan residues. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7, 2021–2025. doi: 10.1073/pnas.81.7.2021.
520. Altruda, F., Poli, V., Restagno, G., Silengo, L. (1988) Structure of the human hemopexin gene and evidence for intron-mediated evolution. *J. Mol. Evol.* 27, 2, 102–108. doi: 10.1007/BF02138368.
521. Jenne, D., Stanley, K. K. (1987) Nucleotide sequence and organization of the human s-protein gene: repeating peptide motifs in the pexin family and a

- model for their evolution. *Biochemistry*. 26, 21, 6735–6742. doi: 10.1021/bi00395a024.
522. Kambio, M. I., Bunker, C. H., Nwankwo, M. U., Ferrell, R. (1993) Hemopexin: a unique genetic polymorphism in populations of african ancestry. *Hum. Biol.* 5, 4, 655–660. PMID: 8406412.
523. Faber, H. R., Groom, C. R., Baker, H. M., Morgan, W. T., Smith, A., Baker, E. N. (1995) 1.8 Å crystal structure of the c-terminal domain of rabbit serum haemopexin. *Structure*. 3, 6, 551–559. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00189-7.
524. Wallon, U. M., Overall, C. M. (1997) The hemopexin-like domain (c domain) of human gelatinase a (matrix metalloproteinase-2) requires ca<sup>2+</sup> for ribronectin and heparin binding. *J. Biol. Chem.* 272, 11, 7473–7481. doi: 10.1074/jbc.272.11.7473.
525. Knäuper, V., López-Otin, C., Smith, B., Knight, G., Murphy, G. (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *J. Biol. Chem.* 271, 3, 1544–1550. doi: 10.1074/jbc.271.3.1544.
526. van den Steen, P. E., van Aelst, I., Hvidberg, V., Piccard, H., Fiten, P., Jacobsen, C., Moestrup, S. K., Fry, S., Royle, L., Wormald, M. R., Wallis, R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Opdenakker, G. (2006) The hemopexin and o-glycosylated domains tune gelatinase b/mmp-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J. Biol. Chem.* 281, 27, 18626–18637. doi: 10.1074/jbc.M512308200.
527. Swerts, J. P., Soula, C., Sagot, Y., Guinaudy, M. J., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Duprat, A. M., Cochard, P. (1992) Hemopexin is synthesized in peripheral nerves but not in central nervous system and accumulates after axotomy. *J. Biol. Chem.* 267, 15, 10596–10600. doi: 10.1016/S0021-9258(19)50058-8.
528. Tolosano, E., Cutufia, M. A., Hirsch, E., Silengo, L., Altruda, F. (1996) Specific expression in brain and liver driven by the hemopexin promoter in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 3, 694–703. doi: 10.1006/bbrc.1996.0124.

529. Chen, W., Lu, H., Dutt, K., Smith, A., Hunt, D. M., Hunt, R. C. (1998) Expression of the protective proteins hemopexin and haptoglobin by cells of the neural retina. *Exp. Eye Res.* 67, 1, 83–93. doi: 10.1006/exer.1998.0494.
530. Prowse, K. R., Baumann, H. (1989) Interleukin-1 and interleukin-6 stimulate acute-phase protein production in primary mouse hepatocytes. *J. Leukoc. Biol.* 45, 1, 55–61. doi: 10.1002/jlb.45.1.55.
531. Madore, N., Camborieux, L., Bertrand, N., Swerts, J.-P. (1999) Regulation of hemopexin synthesis in degenerating and regenerating rat sciatic nerve. *J. Neurochem.* 72, 2, 708–715. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0720708.x.
532. Hanstein, A., Muller-Eberhard, U. (1968) Concentration of serum hemopexin in healthy children and adults and in those with a variety of hematological disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 71, 2, 232–239. doi: 10.5555/uri:pii:0022214368900504.
533. Yalamanoglu, X. A., Deuel, J. W., Hunt, R. C., Baek, J. H., Hassell, K., Redinius, K., Irwin, D. C., Schaer, D. J., Buehler, P. W. (2018) Depletion of haptoglobin and hemopexin promote hemoglobin-mediated lipoprotein oxidation in sickle cell disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 315, 5, L765–L774. doi: 10.1152/ajplung.00269.2018.
534. Immenschuh, S., Vijayan, V., Janciauskiene, S., Gueler, F. (2017) Heme as a target for therapeutic interventions. *Front. Pharmacol.* 8, 146. doi: 10.3389/fphar.2017.00146.
535. Lin, T., Maita, D., Thundivalappil, S. R., Riley, F. E., Hamsch, J., van Marter, L. J., Christou, H. A., Berra, L., Fagan, S., Christiani, D. C., Warren, H. S. (2015) Hemopexin in severe inflammation and infection: mouse models and human diseases. *Crit. Care.* 19,1, 166. doi: 10.1186/s13054-015-0885-x.
536. Dong, B., Cai, M., Fang, Z., Wei, H., Zhu, F., Li, G., Dong, H., Xiong, L. (2013) Hemopexin induces neuroprotection in the rat subjected to focal cerebral ischemia. *BMC Neurosci.* 14, 58. doi: 10.1186/1471-2202-14-58.
537. Yang, Y., Dong, B., Lu, J., Wang, G., Yu, Y. (2018) Hemopexin reduces blood-brain barrier injury and protects synaptic plasticity in cerebral

- ischemic rats by promoting epcs through the ho-1 pathway. *Brain Res.* 1699, 177–185. doi: 10.1016/j.brainres.2018.08.008.
538. Hada, H., Shiraki, T., Watanabe-Matsui, M., Igarashi, K. (2014) Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 7, 2351–2360. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.029.
539. Alam, J., Smith, A. (1989) Receptor-mediated transport of heme by hemopexin regulates gene expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 264, 30, 17637–17640. doi: 10.1016/S0021-9258(19)84616-1.
540. Smith, A. (2000) Links between cell-surface events involving redox-active copper and gene regulation in the hemopexin heme transport system. *Antioxid. Redox Signal.* 2, 2, 157–175. doi: 10.1089/ars.2000.2.2-157.
541. Zhang, X., Guo, J., Wei, X., Niu, C., Jia, M., Li, Q., Meng, D. (2018) Bach1: function, regulation, and involvement in disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 1347969. doi: 10.1155/2018/1347969.
542. Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., Igarashi, K. (2001) Heme mediates derepression of maf recognition element through direct binding to transcription repressor bach1. *EMBO J.* 20, 11, 2835–2843. doi: 10.1093/emboj/20.11.2835.
543. Dhakshinamoorthy, S., Jain, A. K., Bloom, D. A., Jaiswal, A. K. (2005) Bach1 competes with nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (are)-mediated nad(p)h:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J. Biol. Chem.* 280, 17, 16891–16900. doi: 10.1074/jbc.M500166200.
544. Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., Tokunaga, F., Iwai, K., Igarashi, K. (2007) Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor bach1. *Mol. Cell Biol.* 27, 19, 6962–6971. doi: 10.1128/MCB.02415-06.
545. Fagoonee, S., Caorsi, C., Giovarelli, M., Stoltenberg, M., Silengo, L., Altruda, F., Camussi, G., Tolosano, E., Bussolati, B. (2008) Lack of plasma

- protein hemopexin dampens mercury-induced autoimmune response in mice. *J. Immunol.* 181, 3, 1937–1947. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.1937.
546. Regis, G., Bosticardo, M., Conti, L., de Angelis, S., Boselli, D., Tamaino, B., Bernabei, P., Giovarelli, M., Novelli, F. (2005) Iron regulates t-lymphocyte sensitivity to the ifn-gamma/stat1 signaling pathway in vitro and in vivo. *Blood.* 105, 8, 3214–3221. doi: 10.1182/blood-2004-07-2686.
547. Chora, Â. A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T. F., Cardoso, S., Ho, P. P., Lowen, Y. L., Sobel, R. A., Steinman, L., Soares, M. P. (2007) Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J. Clin. Invest.* 117, 2, 438–447. doi: 10.1172/JCI28844.
548. Smith, A., Eskew, J. D., Borza, C. M., Pendrak, M., Hunt, R. C. (1997) Role of heme-hemopexin in human t-lymphocyte proliferation. *Exp. Cell Res.* 232, 2, 246–254. doi: 10.1006/excr.1997.3526.
549. Eskew, J. D., Vanacore, R. M., Sung, L. M., Morales, P. J., Smith, A. (1999) Cellular protection mechanisms against extracellular heme: heme-hemopexin, but not free heme, activates the n-terminal c-jun kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 2, 638–648. doi: 10.1074/jbc.274.2.638.
550. Hu, K., Yang, J., Tanaka, S., Gonias, S. L., Mars, W. M., Liu, Y. (2006) Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 4, 2120–2127. doi: 10.1074/jbc.M504988200.
551. Liang, X., Lin, T., Sun, G., Beasley-Topliffe, L., Cavaillon, J.-M., Warren, H. S. (2009) Hemopexin down-regulates lps-induced proinflammatory cytokines from macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 86, 2, 229–235. doi: 10.1189/jlb.1208742.
552. Graw, J. A., Mayeur, C., Rosales, I., Liu, Y., Sabbisetti, V. S., Riley, F. E., Rechester, O., Malhotra, R., Warren, H. S., Colvin, R. B., Bonventre, J. V., Bloch, D. B., Zapol, W. M. (2016) Haptoglobin or hemopexin therapy prevents acute adverse effects of resuscitation after prolonged storage of red cells. *Circulation.* 134, 13, 945–960. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019955.

553. Miller, Y. I., Smith, A., Morgan, W. T., Shaklai, N. (1996) Role of hemopexin in protection of low-density lipoprotein against hemoglobin-induced oxidation. *Biochemistry*. 35, 40, 13112–13117. doi: 10.1021/bi960737u.
554. Watanabe, J., Chou, K. J., Liao, J. C., Miao, Y., Meng, H.-H., Ge, H., Grijalva, V., Hama, S., Kozak, K., Buga, G., Whitelegge, J. P., Lee, T. D., Farias-Eisner, R., Navab, M., Fogelman, A. M., Reddy, S. T. (2007) Differential association of hemoglobin with proinflammatory high density lipoproteins in atherogenic/hyperlipidemic mice: A novel biomarker of atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 282, 32, 23698–23707. doi: 10.1074/jbc.M702163200.
555. Tolosano, E., Hirsch, E., Patrucco, E., Camaschella, C., Navone, R., Silengo, S., Altruda, F. (1999) Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice. *Blood*. 94, 11, 3906–3914. doi: 10.1182/blood.V94.11.3906.
556. Vinchi, F., Gastaldi, S., Silengo, L., Altruda, F., Tolosano, E. (2008) Hemopexin prevents endothelial damage and liver congestion in a mouse model of heme overload. *Am. J. Pathol.* 173, 1, 289–299. doi: 10.2353/ajpath.2008.071130.
557. Zhu, L., Hope, T. J., Hall, J., Davies, A., Stern, M., Muller-Eberhard, U., Stern, R., Parslow, T. G. (1994) Molecular cloning of a mammalian hyaluronidase reveals identity with hemopexin, a serum heme-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269, 51, 32092–32097. doi: 10.1016/S0021-9258(18)31605-3.
558. Hrkal, Z., Kuzelová, K., Muller-Eberhard, U., Stern, R. (1996) Hyaluronan-binding properties of human serum hemopexin. *FEBS Lett.* 383, 1–2, 72–74. doi: 10.1016/0014-5793(96)00225-6.
559. Yang, B., Yang, B. L., Savani, R. C., Turley, E. A. (1994) Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins rhamm, cd44 and link protein. *EMBO J.* 13, 2, 286–296. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06261.x.



560. Bakker, W. W., Bailer, J. F. W., van Luijk, W. H. J. (1988) A kallikrein-like molecule and plasma vasoactivity in minimal change disease. *Contrib. Nephrol.* 67, 31–36. doi: 10.1159/000415370.
561. Cheung, P. K., Klok, P. A., Baller, J. F. W., Bakker, W. W. (2000) Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney Int.* 57, 4, 1512–1520. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00996.x.
562. Bakker, W. W., Borghuis, T., Harmsen, M. C., van der Berg, A., Kema, I. P., Niezen, K. E., Kopojos, J. J. (2005) Protease activity of plasma hemopexin. *Kidney Int.* 68, 2, 603–610. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00438.x.
563. Lennon, R., Singh, A., Welsh, G. I., Coward, R. J., Satchall, S., Ni, Li, Mathieson, P. W., Bakker, W. W., Saleem, M. A. (2008) Hemopexin induces nephrin-dependent reorganization of the actin cytoskeleton in podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 11, 2140–2149. doi: 10.1681/ASN.2007080940.
564. Suzuki, K., Kato, H., Sakuma, Y., Namiki, H. (2001) Hemopexins suppress phorbol ester-induced necrosis of polymorphonuclear leucocytes. *Cell Struct. Funct.* 26, 4, 235–241. doi: 10.1247/csf.26.235.
565. Suzuki, K., Kobayashi, N., Doi, T., Hijikata, T., Machida, I., Namiki, H. (2003) Inhibition of  $mg^{2+}$ -dependent adhesion of polymorphonuclear leukocytes by serum hemopexin: differences in divalent-cation dependency of cell adhesion in the presence and absence of serum. *Cell Struct. Funct.* 28, 4, 243–253. doi: 10.1247/csf.28.243.
566. Rothwangl, K. B., Rong, L. (2009) Analysis of a conserved rge/rgd motif in hcv e2 in mediating entry. *Viol. J.* 6, 12, 1–11. doi: 10.1186/1743-422X-6-12.
567. Terentiev, A. A., Moldogazieva, N. T. (2007) Cell adhesion proteins and alpha-fetoprotein. Similar structural motifs as prerequisites for common functions. *Biochemistry.* 72, 9, 920–935. doi: 10.1134/s0006297907090027.
568. Suzuki, S., Argraves, W. S., Pytela, R., Arai, H., Krusius, T., Perschbacher, M. D., Ruoslahti, E. (1986) cDNA and amino acid sequences of the cell

- adhesion protein receptor recognizing vitronectin reveal a transmembrane domain and homologies with other adhesion protein receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 22, 8614–8618. doi: 10.1073/pnas.83.22.8614.
569. Okazaki, H., Taketani, S., Kohno, H., Tokunaga, R., Kobayashi, Y. (1989) The hemopexin receptor on the cell surface of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Struct. Funct.* 14, 1, 129–140. doi: 10.1247/csf.14.129.
570. Jung, J. Y., Kwak, Y. H., Kim, K. S., Kwon, W. Y., Suh, G. J. (2015) Change of hemopexin level is associated with the severity of sepsis in endotoxemic rat model and the outcome of septic patients. *J. Crit. Care.* 30, 3, 525–530. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.12.009.
571. Larsen, R., Gozzelino, R., Jeney, V., Tokaji, L., Bozza, F. A., Japiassú, A. M., Bonaparte, D., Marinho Cavalcante, M. M., Choram A., Ferreira, A., Marguti, I., Cardoso, S., Sepúlveda, N., Smith, A., Soares, M. P. (2010) A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci. Transl. Med.* 2, 51, 51ra71. doi: 10.1126/scitranslmed.3001118.
572. Mehta, N. U., Grijalva, V., Hama, S., Wagner, A., Navab, M., Fogelman, A. M., Reddy, S. T. (2016) Apolipoprotein e<sup>-/-</sup> mice lacking hemopexin develop increased atherosclerosis via mechanisms that include oxidative stress and altered macrophage function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 6, 1152–1163. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306991.
573. Fiorito, V., Tolosano, E. Hemopexin and cancer. (2022) *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2, 997. 10.3390/ijms23020997.
574. Fiorito, V., Chiabrando, D., Petrillo, S., Bertino, F., Tolosano, E. (2020) The multifaceted role of heme in cancer. *Front. Oncol.* 9, 1540. doi: 10.3389/fonc.2019.01540.
575. Fiorito, V., Allocco, A. L., Petrillo, S., Gazzano, E., Torretta, S., Marchi, S., Destefanis, F., Pacelli, C., Audrito, V., Provero, P., Medico, E., Chiabrando, D., Porporato, P. E., Cancelliere, C., Bardelli, A., Trusolino, L., Capitanio, N., Deaglio, S., Altruda, F., Pinton, P., Cardaci, S., Riganti, C., Tolosano, E. (2021) The heme synthesis-export system regulates the tricarboxylic acid cycle flux and oxidative phosphorylation. *Cell. Rep.* 35, 11, 109252. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109252.

576. Canesin, G., di Ruscio, A., Li, M., Ummarino, S., Hedblom, A., Choudhury, R., Krzyzanowska, A., Csizmadia, E., Palominos, M., Stiehm, A., Ebralidze, A., Chen, S.-Y., Bassal, M. A., Zhao, P., Tolosano, E., Hurley, L., Bjartell, A., Tenen, D. G., Wegiel, B. (2020). Scavenging of labile heme by hemopexin is a key checkpoint in cancer growth and metastases. *Cell. Rep.* 32, 12, 108181. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108181.
577. Suzuki, Y., Takadatem T., Mizuma, M., Shima, H., Suzuki, T., Tachibana, T., Shimura, M., Hata, T., Iseki, M., Kawaguchi, K., Aoki, T., Hayashi, H., Morikawa, T., Nakagawa, K., Motoi, F., Naitoh, T., Igarashi, K., Unno, M. (2020) Stromal expression of hemopexin is associated with lymph-node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One.* 15, 7, e0235904. doi: 10.1371/journal.pone.0235904
578. Heide, K., Haupt, H., Störiko, K., Schultze, H. E. (1964) On the heme-binding capacity of hemopexin. *Clin. Chim. Acta.* 10, 460–469. doi: 10.1016/0009-8981(64)90176-7.
579. Kuželová, K., Mrhalová, M., Hrkal, Z. (1997) Kinetics of heme interaction with heme-binding proteins: the effect of heme aggregation state. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects.* 1336, 3, 497–501. doi: 10.1016/s0304-4165(97)00062-7.
580. Banerjee, R. (1962) Thermodynamic study of the heme-globin association. II. Methemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects.* 64, 385–395. doi: 10.1016/0006-3002(62)90747-3
581. Chen, R. F. (1967) Fluorescence of dansyl amino acids in organic solvents and protein solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 120, 3, 609–620. doi: 10.1016/0003-9861(67)90526-7.
582. Morgan, W. T., Sutor, R. P., Muller-Eberhard, U. (1976) The aromatic and heme chromophores of rabbit hemopexin difference absorption and fluorescence spectra. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure.* 434, 2, 311–323. doi: 10.1016/0005-2795(76)90223-3.
583. Deeb, R. S., Muller-Eberhard, U., Peyton, D. H. (1994) Proton nmr study of the heme complex of hemopexin. *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects.* 1200, 2, 161–166. doi: 10.1016/0304-4165(94)90131-7.

584. Aisen, P., Leibman, A., Harris, D. C., Moss, T. (1974) Human hemopexin: preparation and magnetic properties. *J. Biol. Chem.* 249, 21, 6824–6827. doi: 10.1016/S0021-9258(19)42132-7.
585. Bearden, A. J., Morgan, W. T., Muller-Eberhard, U. (1974) Heme complexes of rabbit hemopexin, human hemopexin and human serum albumin: electron spin resonance and mössbauer spectroscopic studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 1, 265–272. doi: 10.1016/0006-291X(74)90562-2.
586. Day, G. M., Motherwell, W. D. S., Jones, W. (2007) A strategy for predicting the crystal structures of flexible molecules: the polymorphism of phenobarbital. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 14, 1693–1704. doi: 10.1039/b612190j.
587. Hahl, P., Hunt, R., Bjes, E. S., Skaff, A., Keightley, A., Smith, A. (2017) Identification of oxidative modifications of hemopexin and their predicted physiological relevance. *J. Biol. Chem.* 292, 33, 13658–13671. doi: 10.1074/jbc.M117.783951.
588. Smith, A., Tatum, F. M., Muster, P., Burch, M. K., Morgan, W. T. Importance of ligand-induced conformational changes in hemopexin for receptor-mediated heme transport. *J. Biol. Chem.* 263, 11, 5224–5229. doi: 10.1016/S0021-9258(18)60703-3.
589. Wu, M. L., Morgan, W. T. (1993) Characterization of hemopexin and its interaction with heme by differential scanning calorimetry and circular dichroism. *Biochemistry.* 32, 38, 7216–7222. doi: 10.1021/bi00079a018.
590. Rosell, F. I., Mauk, M. R., Mauk, A. G. (2005) pH- and metal ion-linked stability of the hemopexin-heme complex. *Biochemistry.* 44, 6, 1872–1879. doi: 10.1021/bi0480077.
591. Mauk, M. R., Rosell, F. I., Mauk, A. G. (2007) Chromatographically distinguishable heme insertion isoforms of human hemopexin. *Biochemistry.* 46, 51, 15033–15041. doi: 10,1021/bi701821a.
592. Hernández, G., Wilks, A., Paolesse, R., Smith, K., Ortiz de Montellano, P., la Mar, G. L. (1994) Proton nmr investigation of substrate-bound heme

oxygenase: evidence for electronic and steric contributions to stereoselective heme cleavage. *Biochemistry*. 33, 6631–6641. doi: 10.1021/bi00187a033.

593. Heimburger, N., Heide, K., Haupt, H., Schultze, H. E. (1964) Bausteinanalysen von humanserumproteinen. *Clin. Chim. Acta*. 10, 293–307. doi: 10.1016/0009-8981(64)90059-2.
594. Lin, T., Liu, J., Huang, F., van Engelen, T. S., Thundivalappil, S. R., Riley, F. E., Super, M., Watters, A. L., Smith, A., Brinkman, N., Ingber, D. E., Warren, H. S. (2016) Purified and recombinant hemopexin: protease activity and effect on neutrophil chemotaxis. *Mol. Med.* 22, 22–31. doi: 10.2119/molmed.2016.00006.
595. Stapley, R., Rodriguez, C., Oh, J.-Y., Honavar, J., Brandon, A., Wagener, B. M., Marques, M. B., Weinberg, J. A., Kerby, J. D., Pittet, J.-F., Patel, R. P. (2015) Red blood cell washing, nitrite therapy, and antiheme therapies prevent stored red blood cell toxicity after trauma-hemorrhage. *Free Radic. Biol. Med.* 85, 207–218. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.025.
596. Vercellotti, G. M., Zhang, P., Nguyen, J., Abdulla, F., Chen, C., Nguyen, P., Nowotny, C., Steer, C. J., Smith, A., Belcher, J. D. (2016) Hepatic overexpression of hemopexin inhibits inflammation and vascular stasis in murine models of sickle cell disease. *Mol. Med.* 22, 437–451. doi: 10.2119/molmed.2016.00063.
597. Ghosh, S., Adisa, O. A., Chappa, P., Tan, F., Jackson, K. A., Archer, D. R., Ofori-Acquah, S. F. (2013) Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J. Clin. Invest.* 123, 11, 4809–4820. doi: 10.1172/JCI64578.
598. Ingoglia, G., Sag, C. M., Rex, N., de Franceschi, L., Vinchi, F., Cimino, J., Petrillo, S., Wagner, S., Kreitmeier, K., Silengo, L., Altruda, F., Maier, L. S., Hirsch, E., Ghigo, A., Tolosano, E. (2017) Hemopexin counteracts systolic dysfunction induced by heme-driven oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 452–464. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.003.
599. Kato, G. (2020) Orphan drug designation granted for csl behring's investigational plasma-derived hemopexin therapy for sickle cell disease.

- Zugriff am 01.02.2022. [www.cslbehring.com/newsroom/2020/hemopexin-receives-orphan-drug-designation-in-eu-and-us](http://www.cslbehring.com/newsroom/2020/hemopexin-receives-orphan-drug-designation-in-eu-and-us).
600. Safety of single doses of csl889 in adult patients with sickle cell disease (2022) Zugriff am 01.02.2022. [www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04285827?term=NCT04285827&draw=2&rank=1](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04285827?term=NCT04285827&draw=2&rank=1).
  601. Liébecq, Claude, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Committee of Editors of Biochemical Journals, International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (1992) Biochemical nomenclature and related documents: a compendium. Zugriff am 07.04.2022. [www.iubmb.org/about/committees/biochemical-nomenclature-committees](http://www.iubmb.org/about/committees/biochemical-nomenclature-committees).
  602. Hopp, M.-T., Paul George, A. A., Ramoji, A., Pepanian, A., Detzel, M. S., Neugebauer, U., Imhof, D. (2022) A model peptide reveals insights into the interaction of human hemopexin with heme. *Int. J. Pept. Res.* 28, 129. doi: 10.1007/s10989-022-10441-x
  603. Detzel, M. S., Schmalohr, B. F., Steinbock, F., Hopp, M.-T., Ramoji, A., Paul George, A. A., Neugebauer, U., Imhof, D. (2021) Revisiting the interaction of heme with hemopexin. *Biol. Chem.* 402, 6, 675–691. doi: 10.1515/hsz-2020-0347.
  604. Detzel, M. S. Untersuchung der transienten bindung von häm an hämopexin. Bonn, 2019.
  605. König, W., Geiger, R. (1970) Eine neue methode zur synthese von peptiden: aktivierung der carboxylgruppe mit dicyclohexylcarbodiimid unter zusatz von 1-hydroxy-benzotriazolen. *Chem. Ber.* 103, 3, 788–798. doi: 10.1002/cber.19701030319.
  606. Eissler, S., Kley, M., Bächle, D., Loidl, G., Meier, T., Samson, D. (2017) Substitution determination of Fmoc-substituted resins at different wavelengths. *J. Pept. Sci.* 23, 10, 757–762. doi: 10.1002/psc.3021.
  607. Kates, S. A., Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis, A practical guide*. Marcel Dekker, Inc., 2000. ISBN-10: 0-8247-0359-6.

608. Burgess, K. *Solid Phase Organic Synthesis*. Wiley Verlag, **2000**. ISBN-13: 978-0-471-45845-6.
609. Kühn, T., Sahoo, N., Nikolajski, M., Schlott, B., Heinemann, S. H., Imhof, D. (2011) Determination of heme-binding characteristics of proteins by a combinatorial peptide library approach. *ChemBioChem*. 12, 18, 2846–2855. doi: 10.1002/cbic.201100556.
610. Syllwasschy, B. F., Beck, M. S., Druzeta, I., Hopp, M.-T., Ramoji, A., Neugebauer, U., Nozinovic, S., Menche, D., Willbold, D., Ohlenschläger, O., Kühn, T., Imhof, D. (2020) High-affinity binding and catalytic activity of his/tyr-based sequences: extending heme-regulatory motifs beyond cp. *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*. 1864, 7, 129603. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129603.
611. Bogdan, M., Pirnau, A. (2008) Binding interaction of indomethacin with human serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 4–5, 981–984. doi: 10.1016/j.jpba.2008.04.003.
612. Ryan, C. G., Clayton, E., Griffin, W. L., Sie, S. H., Cousens, D. R. (1988) Snip, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of pixe spectra in geoscience applications. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res.* 34, 396–402. doi: 10.1016/0168-583X(88)90063-8.
613. Team R (2018) Development core. a language and environment for statistical computing. Zugriff am 19.03.2022. [www.R-project.org](http://www.R-project.org) (2018).
614. Steinbock, F. An in silico analysis of transient heme binding to hemopexin. Bonn, **2020**.
615. Krieger, E., Vriend, G. (2014) Yasara view - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics*. 30, 20, 2981–2982. doi: 10.1093/bioinformatics/btu426.
616. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Shwede, T. (2018) Swiss-model: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W1, W296–W303. doi: 10.1093/nar/gky427.

617. Konagurthu, A. S., Whisstock, J. C., Stuckey, P. J., Lesk, A. M. (2006) Mustang, a multiple structural alignment algorithm. *Proteins*. 64, 3, 559–574. doi: 10.1002/prot.20921.
618. Kumar, A., Wißbrock, A., Bellstedt, P., Lang, A., Ramachandran, R., Wiedemann, C., Imhof, D., Ohlenschläger, O. (2019) 1H, 13C, and 15N resonance assignments of the cytokine interleukin-36beta isoform-2. *Biomol. NMR. Assign.* 13, 1, 155–161. doi: 10.1007/s12104-018-09869-4.
619. Trott, O., Olson, A. J. (2009) Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 2, 455–461. doi: 10.1002/jcc.21334.
620. Novoa, E. M., de Poupiana, L. R., Barril, X., Orozco, M. (2010) Ensemble docking from homology models. *J. Chem. Theory Comput.* 6, 8, 2547–2557. doi: 10.1021/ct100246y.
621. Krieger, E., Darden, T., Nabuurs, S. B., Finkelstein, A., Vriend, G. (2004) Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space. *Proteins*. 57, 4, 678–683. doi: 10.1002/prot.20251.
622. Align-Tool (2021). Zugriff am 01.12.2021. [www.uniprot.org/align/](http://www.uniprot.org/align/).
623. Wißbrock, A., Goradia, N. B., Kumar, A., Paul George, A. A., Köhl, T., Bellstedt, P., Ramachandran, R., Hoffmann, P., Galler, K., Popp, J., Neugebauer, U., Hampel, K., Zimmermann, B., Adam, S., Wiendl, M., Krönke, G., Hamza, I., Heinemann, S. H., Frey, S., Hueber, A. J., Ohlenschläger, O., Imhof, D. (2019) Structural insights into heme binding to IL-36alpha proinflammatory cytokine. *Sci. Rep.* 9, 1, 16893. doi: 10.1038/s41598-019-53231-0.
624. Hopp, M.-T., Alhanafi, N., Paul George, A. A., Hamedani, N. S., Biswas, A., Oldenburg, J., Pöttsch, B., Imhof, D. (2021) Molecular insights and functional consequences of the interaction of heme with activated protein C. *Antioxid. Redox Signal.* doi: 10.1089/ars.2019.7992.



625. Hargrove, M. S., Olson, J. S. (1996) The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity. *Biochemistry*. 35, 35, 11310–11318. doi: 10.1021/bi9603736.
626. Mrázová, B., Martínková, M., Martínek, V., Frei, E., Stiborová, M. (2008) Optimization of preparation of apocytochrome b5 utilizing apomyoglobin. *Interdiscip. Toxicol.* 1, 2, 190–192. doi: 10.2478/v10102-010-0037-8.
627. Ghosh, A.m Stuehr, D. J. Hsp90 and Its Role in Heme-Maturation of Client Proteins: Implications for Human Diseases. In: *Heat Shock Protein 90 in Human Diseases and Disorders*, Springer Verlag, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-23158-3\_12.
628. Potter, D., Chroneos, Z. C., Baynes, J. W., Sinclair, P. R., Gorman, N., Liem, H. H., Muller-Eberhard, U., Thorpe, S. R. (1993) In vivo fate of hemopexin and heme-hemopexin complexes in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 1, 98–104. doi: 10.1006/abbi.1993.1014.
629. Smith, A., Hunt, R. (1990) Hemopexin joins transferrin as representative members of a distinct class of receptor-mediated endocytic transport systems. *Eur. J. Cell. Biol.* 53, 2, 234–245. PMID: 1964416.
630. Mcnae, I. W., Kan, D., Kontopidis, G., Patterson, A., Taylor, P., Worrall, L., Walkinshaw, M. (2006) Studying protein–ligand interactions using protein crystallography. *Crystallogr. Rev.* 11, 61–71. doi: 10.1080/08893110500078639.
631. Müller, I. (2017) Guidelines for the successful generation of protein–ligand complex crystals. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 73, 2, 9–92. doi: 10.1107/S2059798316020271.
632. Brewitz, H. H., Gorodia, N., Schubert, E., Galler, K., Köhl, T., Syllwasschy, B., Popp, J., Neugebauer, U., Hagelueken, G., Schiemann, O., Ohlenschläger, O., Imhof, D. (2016) Heme interacts with histidine- and tyrosine-based protein motifs and inhibits enzymatic activity of chloramphenicol acetyltransferase from escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta – General. Subjects.* 1860, 6, 1343–1353. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.03.027.

633. Peherstorfer, S., Brewitz, H. H., Paul George, A. A., Wißbrock, A., Adam, J. M., Schmitt, L., Imhof, D. (2018) Insights into mechanism and functional consequences of heme binding to hemolysin-activating lysine acyltransferase hlyc from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*. 1862, 9, 1964–1972. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.06.012.
634. Shimizu, T. (2012) Binding of cysteine thiolate to the Fe(III) heme complex is critical for the function of heme sensor proteins. *J. Inorg. Biochem.* 108, 171–177. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.08.018.
635. Paul George, A. A., Lacerda, M., Syllwasschy, B. F., Hopp, M.-T., Wißbrock, A., Imhof, D. (2020) Hemoquest: a webserver for qualitative prediction of transient heme binding to protein motifs. *BMC Bioinformatics*. 21, 1, 124. doi:10.1186/s12859-020-3420-2.
636. Chen, H., Zhou, H. X. (2005) Prediction of solvent accessibility and sites of deleterious mutations from protein sequence. *Nucleic Acids Res.* 33, 10, 3193–3199. doi: 10.1093/nar/gki633.
637. Shan, Y., Wang, G., Zhou, H. X. (2001) Fold recognition and accurate query-template alignment by a combination of psi-blast and threading. *Proteins*:42, 1, 23–37. doi: 10.1002/1097-0134(20010101)42:1<23::aid-prot40>3.0.co;2-k.
638. Bondi, A. (1964) Van der waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.* 68, 441–451. doi: 10.1021/j100785a001.
639. Brewitz, H. H., Kühl, T., Gorodia, N., Galler, K., Popp, J., Neugebauer, U., Ohlenschläger, O., Imhof, D. (2015) Role of the chemical environment beyond the coordination site: structural insight into Fe(III)protoporphyrin binding to cysteine-based heme-regulatory protein motifs. *ChemBioChem*. 16, 15, 2216–2224. doi: 10.1002/cbic.201500331.
640. Spiro, T. G., Smulevich, G., Su, C. (2002) Probing protein structure and dynamics with resonance raman spectroscopy: cytochrome c peroxidase and hemoglobin. *Biochemistry*. 29, 19, 4497–4508. doi: 10.1021/bi00471a001.
641. Scholler, D. M., Wang, M. Y., Hoffman, B. M. (1979) Resonance raman and epr of nitrosyl human hemoglobin and chains, carp hemoglobin, and model

- compounds. implications for the nitrosyl heme coordination state. *J. Biol. Chem.* 254, 4072–4078. doi: 10.1016/S0021-9258(18)50697-9.
642. Ishikawa, H., Nakagaki, M., Bamba, A., Uchida, T., Hiroshi, H., O'Brian, M. R., Iwai, K., Ishimori, K. (2011) Unusual heme binding in the bacterial iron response regulator protein: spectral characterization of heme binding to the heme regulatory motif. *Biochemistry.* 50, 6, 1016–1022. doi: 10.1021/bi101895r.
643. Hu, S., Smith, K. M., Spiro, T. G. (1996) Assignment of protoheme resonance raman spectrum by heme labeling in myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 50, 12638–12646. doi: 10.1021/ja962239e.
644. Kitagawa, T., Abe, M., Kyogoku, Y., Ogushi, H., Watanabe, E., Yoshida, Z. (1976) Resonance raman spectra of metalloctaethylporphyrins. low frequency vibrations of porphyrin and iron-axial ligand stretching modes. *J. Phys. Chem.* 80, 11, 1181–1186. doi: 10.1021/j100552a012.
645. Spiro, T. G., Burke, J. M. (1976) Protein control of porphyrin conformation. comparison of resonance raman spectra of heme proteins with mesoporphyrin IX analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 18, 5482–5489. doi: 10.1021/ja00434a013.
646. Uniprot. (2019) Zugriff am 19.01.2022. <https://www.uniprot.org/uniprot/P20058>.
647. Greenfield, N. J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* 1, 6, 2876. doi: 10.1038/nprot.2006.202.
648. Greenfield, N., Fasman, G. D. (2002) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* 8, 10, 4108–4116. doi: 10.1021/bi00838a031.
649. Holzwarth, G., Doty, P. (1965) The ultraviolet circular dichroism of polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 218–228. doi: 10.1021/ja01080a015.
650. Morgan, W. T., Vickery, L. E. (1978) Magnetic and natural circular dichroism of metalloporphyrin complexes of human and rabbit hemopexin. *J. Biol. Chem.* 253, 9, 2940–2945. doi: 10.1016/S0021-9258(17)40786-1.

651. Igarashi, J., Murase, M., Iizuka, A., Pichierri, F., Martinkova, M., Shimizu, T. (2008) Elucidation of the heme binding site of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 27, 18782–18791. doi: 10.1074/jbc.M801400200.
652. Ascenzi, P., Fasano, M. (2007) Heme-hemopexin: A “chronosteric” heme-protein. *IUBMB Life*. 59, 700–708. doi: 10.1080/15216540701689666.
653. Chen, L., Zhang, X., Chen-Roetlin, J., Regan, R. F. (2011) Increased striatal injury and behavioral deficits after intracerebral hemorrhage in hemopexin knockout mice. 114, 4, 1159–1167. doi: 10.3171/2010.10.JNS10861.
654. Nath, K. A., Grande, J. P., Belcher, J. D., Garovic, V. D., Croatt, A. J., Hillestad, M. L., Barry, M. A., Nath, M. C., Regan, R. F., Vercelotti, G. M. (2020) Antithrombotic effects of heme-degrading and heme-binding proteins. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 318, H671–H681. doi: 10.1152/ajpheart.00280.2019.
655. Chen-Roetling, J., Li, Y., Cao, Y., Yan, Z., Lu, X., Regan, R. F. (2021) Effect of hemopexin treatment on outcome after intracerebral hemorrhage in mice. *Brain Res.* 1765, 147507. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147507.
656. Leclerc, J. L., Santiago-Moreno, J., Dang, A., Lampert, A. S., Cruz, P. E., Rosario, A. M., Golde, T. E., Doré, S. (2018) Increased brain hemopexin levels improve outcomes after intracerebral hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 38, 6, 1032–1046. doi: 10.1177/0271678X16679170.
657. Langer, M. D., Guo, H., Shashikanth, N., Pierce, J. M., Leckband, D. E. (2012) N-glycosylation alters cadherin-mediated intercellular binding kinetics. *J. Cell. Sci.* 125, 10, 2478–2485. doi: 10.1242/jcs.101147.
658. Ryu, J. K., Kim, H. S., Nam, D. H. (2012) Current status and perspectives of biopharmaceutical drugs. *Biotechnol. Bioprocess.* 17, 5, 900–911. doi: 10.1007/s12257-012-0095-1.
659. Silverman, T. A., Weiskopf, R. B. (2009) Hemoglobin-based oxygen carriers: current status and future directions. *Transfusion.* 49, 11, 2495–2515. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02356.x.

660. Wenzel, R. G. (2008) Biosimilars: illustration of scientific issues in two examples. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 65, 14, S9–S15. doi: 10.2146/ajhp080211.
661. Rathore, A. S. (2009) Follow-on protein products: scientific issues, developments and challenges. *Trends Biotechnol.* 27, 12, 698–705. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.09.004.
662. Carmona, G., Rodriguez, A., Juarez, D., Corzo, G., Villegas, E. (2013) Improved protease stability of the antimicrobial peptide pin2 substituted with d-amino acids. *Protein J.* 32, 6, 456–466. doi: 10.1007/s10930-013-9505-2.
663. Rensen, P. C. N., Sliedregt, L. A., Ferns, M., Kieviet, E., van Rossenberg, S. M., van Leeuwen, S. H., van Berkel, T. J., Biessen, E. A. (2001) Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 40, 37577–37584. doi: 10.1074/jbc.M101786200.
664. Jevševar, S., Kunstelj, M., Porekar, V. G. (2010) Pegylation of therapeutic proteins. *Biotechnol. J.* 5, 1, 113–128. doi: 10.1002/biot.200900218
665. Pasut, G., Veronese, F. M. (2009) Pegylation for improving the effectiveness of therapeutic biomolecules. *Drugs Today.* 45, 9, 687–695. doi: 10.1358/dot.2009.45.9.1416421.
666. Bailon, P., Won, C. Y. (2009) PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 6, 1–16. doi: 10.1517/17425240802650568.
667. Lechuga, G. C., Napoleão-Pêgo, P., Morel, C. M., Provance D. W., De-Simone, S. G. (2022) New insights into hemopexin-binding to hemin and hemoglobin. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 7, 3789. doi: 10.3390/ijms23073789.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolevulinsäure
ABCB10	<i>ATP-binding cassette subfamily B member 10</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette subfamily G member 2</i>
ADP	ALAD-Porphyrie
AIP	akute intermittierende Porphyrie
ALAD	Aminolevulinatdehydratase
ALAS	Aminolevulinatsynthase
APX	Ascorbatperoxidase
ASA	Aminosäureanalyse
ASGPR	Asialoglycoproteinrezeptor
Bach1	<i>BTB Domain and CNC Homolog 1</i>
BVR	Biliverdinreduktase
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD55	<i>complement decay-accelerating factor</i>
CD91	<i>cluster of differentiation 91</i>
CD163	<i>cluster of differentiation 163</i>
CE	Kapillar-Elektrophorese
CEP	congenitale erythropoetische Porphyrie
CFU-GEMM	Kolonie-bildende Einheit für Granulozyten, Eosinophile, Monozyten und Makrophagen
CL	Chemilumineszenz
CLEC2	C-Typ-Lektinartigen Rezeptor 2
CLRs	C-Typ Lectinrezeptoren
COPD	chronisch obstruktive Lungen-Krankheit
CPO	Coporphyrinogenoxidase
CPP	zellpenetrierenden Peptid
DAD	Diodenarray
Dansyl	1-Dimethylaminoaphthalen-5-sulfonyl
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF2	<i>eukaryotic initiation Factor 2</i>
ELISA	Enzym-gekoppelte Immunadsorption

EPP	erythroetische Protoporphyrin
EPR	Elektronenspinresonanz
ERK	Signal-regulierte Kinase
ESI	<i>Elektrospray Ionisation</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FECH	Ferrochelatase
Ferroportin	FPN1
FLVCR1b	<i>feline leukemia virus subgroup C receptor 1b</i>
FRET	Förster Resonanz Energietransfer
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
FT-ICR	Fourier-Transformation Ionenzyklotronresonanz
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamin
HBM	Hämbindendes Motiv
HbS	abnormales Hämoglobin
HBP93	Hämbindendes Protein 93
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-guanidiniumhexafluorophosphat
HCP	hereditäre Koproporphyrin
HCP1	<i>Heme Carrier Protein 1</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HDP	Häm-Detoxifikationsprotein
HEP	hepatoerythroetische Porphyrie
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HO1	Hämoxygenase 1
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
Hp	Haptoglobin
HRG1	<i>Heme Responsive Gen 1</i>
HRM	Hämregulatorisches Motiv
HRP	Meerrettichperoxidase
HSA	humanes Serumalbumin
IUPAC	<i>international union of pure and applied chemistry</i>
ICAM1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IsdC	<i>cell-wall attached iron-regulated surface determinant protein C</i>
IsdX1	<i>cell-wall attached iron-regulated surface determinant protein X1</i>
IUBMB	<i>international union of biochemistry and molecular biology</i>
JCBN	<i>joint commission on biochemical nomenclature</i>
JNK	<i>c-Jun</i> N-terminale Kinase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRP1	<i>low density lipoprotein related receptor</i>
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption/-Ionisation
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1
MCD	magnetischer zirkularer Dichroismus
MCNS	<i>Minimal Change</i> Glomerulo-Nephritis

MD	Molekulare Dynamik
mKATE	Katushka 2
MMT	Matrix-Metalloproteinase
MT1	Metallothionein 1
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mRNA	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NC-IUBMB. of	<i>nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology</i>
NFT	<i>non fungible token</i>
NfκB	Nekrosefaktor κB
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanz
NP-HPLC	<i>Normal Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
NRF1	nuclearer Atmungsfaktor 1
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PfRH5	Retikulocytbindeprotein-Homolog 5
PfRipr	PfRH5 interagierendes Protein
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-α</i>
PCT	Porphyria cutanea tarda
PE	Präeklampsie
PKC	Proteinkinase C
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	<i>polymorphonuclear leukocytes</i>
PPO	Protoporphyrinogenoxidase
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Robinucleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
rRaman	Resonanz Raman
SAPK	Stress-aktivierte Phosphokinase
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLC48A1	<i>Solute Carrier Family 48 Member 1</i>
STAT5	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TA	Transiente Absorption
TfR	Transferrinrezeptor
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TOF	<i>time of flight</i>



UDP	Uridindiphosphat
UROD	Uroporphyrinogen III-decarboxylase
UROS	Uroporphyrinogen-III-synthase
UV/Vis	Ultraviolett-Visibel
VP	variegate Porphyrie
VCAM1	extrazelluläres Adhäsionsmolekül
WESA	<i>Weighted Ensemble Solvent Accessibility</i>
XLP	X-chromosomale Protoporphyrrie

## 9. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Strukturen verschiedener Hämderivate.....	9
<b>Abbildung 2</b> Häm in Interaktion mit Proteinen und Peptiden. ....	12
<b>Abbildung 3</b> Die Hämbiosynthese, aufgebaut aus acht Enzymkatalysierten Reaktionen. ....	16
<b>Abbildung 4</b> Verlauf der Erythrocytenentwicklung im Rahmen der menschlichen Erythropoese .....	20
<b>Abbildung 5</b> Übersicht über den zellulären Häm- und Eisentransport.....	23
<b>Abbildung 6</b> Ausschnitt aus der übersetzten Schrift von Hippokrates zum wahrscheinlich ersten dokumentierten Fall von Porphyrie.....	27
<b>Abbildung 7</b> Hämquantifizierung mithilfe der HRP.....	38
<b>Abbildung 8</b> Übersicht über die intra- und extravaskuläre Hämolyse, sowie das Häm- und Hämoglobin-Entgiftungssystem des Körpers .....	50
<b>Abbildung 9</b> Charakteristische Sekundärstrukturelemente in Hämopexin.....	56
<b>Abbildung 10</b> Modell zur Erklärung wie der Häm-Hämopexin verschiedene regulatorische Funktionen ausüben könnte.....	57
<b>Abbildung 11</b> Röntgenkristallstruktur des Häm-Hämopexin-Komplexes.....	67
<b>Abbildung 12</b> Sequenz von Hämopexin aus dem Kaninchen mit markierten fehlenden Sequenzen .....	68
<b>Abbildung 13</b> Abgleich der Hämopexinsequenzen verschiedener Spezies.....	98
<b>Abbildung 14</b> SPR-Daten für die SPRspektroskopische Untersuchung von Häm in steigenden Konzentrationen mit Hämopexin.....	99
<b>Abbildung 15</b> Extraktion von möglichen HRMs des humanen Hämopexins mithilfe von SeqD-HBM und der humanen Hämopexinsequenz. ....	103

<b>Abbildung 16</b> rRamanspektren der Peptide <b>1</b> (Motiv VWKSH <sup>79</sup> KWDR), <b>2</b> (Motiv FRQKH <sup>105</sup> NSVF), <b>3</b> (Motiv PGRGH <sup>236</sup> GHRN), <b>5</b> (Motiv RCSH <sup>260</sup> LVLS) und <b>6</b> (Motiv RDGWH <sup>293</sup> SWPI) .....	107
<b>Abbildung 17</b> Das Homologiemodell von humanem Hämopexin.....	109
<b>Abbildung 18</b> Die Röntgenkristallstruktur von Hämopexin.....	110
<b>Abbildung 19</b> Differenzspektren .....	111
<b>Abbildung 20</b> Primärstruktur des Hämopexin-basierten 66 Aminosäure langen Peptids mit markierten Histidinresten.....	113
<b>Abbildung 21</b> Überlagerung des Homologiemodells von Hämopexin und des Peptid 7 .....	114
<b>Abbildung 22</b> Überlagerung des Röntgenkristallstruktur von Hämopexin und des Peptid 7 .....	115
<b>Abbildung 23</b> Die generierten Rohspektren des Peptids <b>7</b> mittels UV/Vis-Spektroskopie.....	116
<b>Abbildung 24</b> Ausgewertete Spektren aus dem Experiment zur Hämaffinität...117	
<b>Abbildung 25</b> Rohspektren der Titration von Häm mit Peptid <b>7</b> .....	118
<b>Abbildung 26</b> Ausgewertete Spektren aus der Titration von Häm mit Hämopexin bzw. Peptid <b>7</b> .....	119
<b>Abbildung 27</b> rRamanspektren des Peptids <b>7</b> .....	120
<b>Abbildung 28</b> rRamanspektren von Hämopexin im Verhältnis 1:2 (Hämopexin:Häm) .....	122
<b>Abbildung 29</b> Übersicht über die beiden Bindungsmodi, Penta- und Hexakoordination.....	123
<b>Abbildung 30</b> CDSpektren des Apo-Peptid <b>7</b> und von Komplexen aus Häm und Peptid <b>7</b> .....	124
<b>Abbildung 31</b> Möglicher neuartiger Hämrekrutierungsmechanismus.....	128

## 10. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Ausgesuchte Hämoproteine und ihre Funktionen.....	11
<b>Tabelle 2</b> Übersicht über die verschiedenen Porphyrien und ihre Symptome.....	29
<b>Tabelle 3</b> Übersicht über die Proteine des Schutzmechanismus vor labilem Häm und ihre Eigenschaften.....	49
<b>Tabelle 4</b> Allgemein verwendete Chemikalien.....	74
<b>Tabelle 5</b> Verwendete Lösemittel.....	75
<b>Tabelle 6</b> Verwendete Chemikalien zur Peptidsynthese, -Kopplung und -Abspaltung.....	75
<b>Tabelle 7</b> Verwendete Aminosäurederivate und Harze.....	76
<b>Tabelle 8</b> Verwendete Chemikalien zur Peptid-Analytik.....	77
<b>Tabelle 9</b> Verwendete Proteine und Chemikalien für Interaktionsstudien.....	77
<b>Tabelle 10</b> Verwendete Puffer und Lösungen.....	78
<b>Tabelle 11</b> Verwendetes Syntheseprotokoll für die manuelle Peptidsynthese.....	80
<b>Tabelle 12</b> Verwendetes Synthese-Protokoll für die Festphasenpeptidsynthese..	81
<b>Tabelle 13</b> Bedingungen der Reinigung des Peptids mittels präparativer RP-HPLC.....	84
<b>Tabelle 14</b> Bedingungen der chromatographischen Trennung mittels RP-HPLC..	84
<b>Tabelle 15</b> Analytische Daten der in dieser Arbeit verwendeten Peptide.....	86
<b>Tabelle 16</b> Pipettier-Schema für die Häminteraktionsstudie.....	87

**Tabelle 17** Informationen über die Sequenz, der Nettoladung, der Lokalisation innerhalb des humanen Hämopexins.....105

## 11. Danksagung

Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert hat mir, als ich nicht mehr an mich selbst glaubte, gezeigt, dass meine Fähigkeiten, meine bisherige Arbeit einen Wert haben. Ihr gilt mein tiefster Dank für die Betreuung in den letzten Monaten. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Gabriele M. König für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken. Bereits während meines Master-Studiums zeigte sie mir jeden Freitagmorgen im Rahmen der Vorlesung „Pharmazeutischen Biologie“, wie spannend die Eigenschaften von Pflanzen deutscher Vorgärten sein können. Mein ausdrücklicher Dank gilt ebenso Prof. Dr. Tanja Schneider, die ich während meines Master-Studiums, im Rahmen der Vorlesung „Pharmazeutische Mikrobiologie“ kennenlernen durfte und in deren Praktikum ich das Arbeiten mit Mikroorganismen erlernen durfte. Außerdem gilt mein Dank PD Dr. Gregor Kirfel, der mit den oben Genannten die Promotionskommission bildet. Des Weiteren möchte ich gerne dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), dem Bonner Graduiertenzentrum (BGZ) und der Bonn International Graduate School of Drug Sciences (BIGS DrugS, hier danke ich vor allem Dorothee Müssemeier) danken, die meinen Konferenz-Besuch der International Congress on Porphyrins and Porphyrins (ICPP) 2019, Mailand, Italien und den Besuch der Gordon Research Konferenz (GRC) 2020, Newport, USA, die aufgrund der Pandemie leider nicht stattfand, finanziell unterstützten und die Teilnahme an zahlreichen interessanten Workshops ermöglichten. Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Diana Imhof, die mir die Teilnahme an mehreren Konferenzen ermöglichte, die einen großen Einfluss auf meine wissenschaftliche und persönliche Entwicklung hatte und in deren Laboren ich viele in dieser Arbeit aufgeführten Experimente durchführen durfte.

Manche Projekte der vorliegenden Arbeit erfolgten in Kooperation, diesen WissenschaftlerInnen gilt mein besonderer Dank. Hier sind vornan Prof. Dr. Ute

Neugebauer und Dr. Anuradha Ramoji (*Center for Sepsis Control and Care* des Universitätsklinikums Jena, Jena) für die Durchführung der rRaman-spektroskopischen Studien zu nennen. Dr. Ajay Abishek Paul George (BioSolveIT, Sankt Augustin), Dr. Benjamin Schmalohr (geb. Syllwasschy, ehemaliger Mitarbeiter des Arbeitskreises Prof. Dr. Imhof) und Francèl Steinbock (geb. Lamprecht, ehemalige Mitarbeiterin des Arbeitskreises Prof. Dr. Imhof) danke ich für die Durchführung der *in silico*-Studien. Für die Durchführung der SPR-spektroskopischen Studien danke ich Dr. Kornelia Hampel (Biaffin GmbH & Co.KG, Kassel).

Ein letzter Dank gilt meinen FreundInnen, ehemaligen KollegInnen und meiner Familie, die in den letzten Monaten mehr zuhören als reden mussten. Meiner Mutter, die gerne sagt: „Am Ende wird alles gut. Wenn es nicht gut ist, ist es nicht das Ende.“ (Autor anonym), meinem Vater, der auf die schwierigsten Fragen immer einen klugen Rat hat, meinen Geschwistern, die mein Leben mit viel Humor bereichern und meinem Freund, der immer für mich da ist.