

Interaction of Human Globin with Hemin-Containing Liposome

Jong-Woo Lee[†]

School of Alternative Medicine and Health Science, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

The globin in cytosol receives the heme in mitochondria and folds to the hemoglobin within erythrocyte. Two mechanisms have been proposed that the heme was transferred post-translationally or cotranslationally to the globin. In this research, how the globin in cytosol receives post-translationally the heme from membranes was studied according to pH and phospholipid composition. Globins dissolved in various pH buffer solutions (pH 3~7) were rapidly added into the bulk of egg phosphatidylcholine 100% or 60% liposomes containing hemin in pH 7 buffer solution. Hemin was very highly transferred to globin at pH 4 and 6. Also, hemin was more efficiently transferred to globin in egg phosphatidylcholine 100% than in 60% liposomes.

Key Words: Hemoglobin, Protein folding, Heme, Liposome

서 론

Hemoglobin은 적혈구 내의 산소운반 단백질로 주된 기능은 호흡에 의해 들어온 산소를 세포 내로 운반하고, 체내에서 대사 결과로 생산된 이산화탄소를 폐로 운반하는 것이다. 이러한 hemoglobin은 2개의 α chain과 2개의 β chain으로 구성된 4차 구조를 이루고 있으며 각각의 chain에 하나씩의 heme이 비공유 결합되어 있다 (Craescu et al., 1990; Gelin and Karplus, 1977). 미성숙 적혈구에서 globin (hemoglobin에서 heme이 제거된 단백질)은 리보솜에 의해 합성되어져 $\alpha\beta$ dimer의 형태로 세포질에 존재하지만, heme은 미토콘드리아의 내막에 위치한 ferrochelatase에 의해 protoporphyrin IX 안에 철분이 포획되면서 형성되어 미토콘드리아 막에 존재한다 (Fuhr and Gengozian, 1973; Granick and Beale, 1978; Grayzel et al., 1966; Hunt et al., 1972; Nathan et al., 1961; Ponka et al., 1973; Schwartz et al., 1959; Taketani and Tokunaga, 1982). 이렇게 세포질과 미토콘드리아 막에 각각 존재하는 globin과 heme은 서로 상호작용하여 globin이 heme을 포획함으로써 최종적으로 hemoglobin으로 folding하게 된다.

여기에서 heme이 globin으로 삽입되는 과정뿐만 아니라 hemoglobin의 subunit assembly에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔음에도 불구하고, hemoglobin tetramer assembly 전체 과정의 어떤 단계에서 heme이 globin으로 삽입되는지에 대한

자세한 특성은 아직 알려지지 않았다 (Bunn, 1987; Gibson and Antonini, 1963; Leutzinger and Beychok, 1981). 그러나, globin이 heme을 포획하여 hemoglobin으로 folding되는 과정에 대해서 두 가지 기작이 제안되었다. 첫번째가 globin이 합성되어지는 중간 과정에 heme이 globin 안으로 결합되어진다는 cotranslational folding mechanism이고 (Komar et al., 1993; 1997), 두번째는 globin이 모두 합성되어진 후에 미토콘드리아에서 합성되어진 heme이 globin으로 이동되어 결합한다는 post-translational folding mechanism이다 (Javaherian and Beychok, 1968; Jennings and McDonald, 2002; Leutzinger and Beychok, 1981; Morris and Liang, 1968).

pH에 따른 globin과 리포솜 사이의 상호작용에 대한 연구 결과에 따르면, globin은 낮은 pH에서 보다 더 unfolding되어 있고 pH 5 이하의 낮은 pH에서 인지질과 높은 상호작용을 하여 높은 [인지질]/[단백질] 몰 비율에서는 막 융합을 일으키고 낮은 [인지질]/[단백질] 몰 비율에서는 막 단편화를 일으키는 것이 보고되었다 (Hahn and Kim, 1991; Lee and Kim, 1992). 또한, phosphatidylserine (PS)이나 phosphatidylethanolamine (PE)이 함유된 경우에 globin β subunit의 N 말단이 주로 관여하여 막 융합을 유도하는 것으로 보고되었다 (Hahn and Kim, 1991). 이와 같이 낮은 pH의 globin이 리포솜과 상호작용한다고 알려져 있을 뿐만 아니라 egg phosphatidylcholine (PC) 60%는 미토콘드리아 외막과 유사한 인지질 조성을 가지고 있어서 미토콘드리아 외막의 모델막으로 사용될 수 있다고 제안되었고 (Lee, 2005), 이러한 특징을 이용하여 pH 3의 globin이 pH 7의 hemin 함유 리포솜과 상호작용하여 hemin이 리포솜에서 globin으로 빠르게 이동하는 것이 보고되었다 (Lee, 2005). 이러한 결과들은 hemoglobin의

*논문 접수: 2005년 6월 7일

수정재접수: 2005년 9월 5일

[†]교신저자: 이종우 (우) 560-759 전북 전주시 완산구 효자동3가 1200, 전주대학교 의생명환경대학 대체건강관리학부

Tel: 063-220-2676, e-mail: jwlee@jj.ac.kr

folding 과정이 post-translational folding mechanism에 의하여 진행될 수 있음을 지지하는 것이다. 이에 따라 본 연구에서는 hemin을 함유한 리포솜과 globin 사이의 상호작용을 통한 hemin의 이동 과정을 pH와 리포솜의 인지질 조성에 따라 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 리포솜 제조

리포솜은 vortex 법을 사용하여 multilamellar vesicle (MLV)로 제조하였고, 이 리포솜의 구성 인지질로 egg PC 60%와 egg PC 100%를 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. MLV를 제조하기 위하여, chloroform에 용해된 egg PC를 vial에 넣은 후에 질소가스로 chloroform을 날려 보내 얇은 지질막을 만들고, 여기에 다양한 pH (pH 4~7)의 완충액을 적당량 넣고 격렬하게 vortex하였다. 또한, hemin의 이동을 관찰하기 위하여 사용한 형광물질인 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenehexanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (β -py-C₆-HPC)을 Molecular Probes 사 (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였고, 이 β -py-C₆-HPC를 egg PC 60%에 100/1 (w/w)로 혼합하여 같은 방법으로 pH 7에서 MLV를 제조하였다.

여기서 사용한 pH 7 완충액은 Tris HCl을 사용하여 20 mM로 만들었다. 또한, pH 6 완충액은 NaH₂PO₄을 사용하였고, pH 5와 pH 4 완충액은 sodium acetate를 사용하여 10 mM로 만들었다. 이렇게 제조된 리포솜의 인지질 농도는 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입한 Inorganic Phosphorus Assay Kit를 사용하여 결정하였다. 리포솜 내에 hemin을 포획시키기 위한 hemin 용액은 hemin을 0.01 M NaOH에 용해하여 제조하였으며, 이 때 사용한 hemin 용액은 매 실험 때마다 새롭게 제조하여 사용하였다.

2. Globin의 제조

Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 사람의 hemoglobin으로부터 methyl ethyl ketone 법을 이용하여 globin을 제조하였고 (Teale, 1959), 이렇게 제조한 globin을 여러 pH 완충액에 용해하여 사용하였다. pH 4~7 완충액은 리포솜 제조에서 사용한 완충액과 동일한 것을 사용하였고, pH 3 완충액은 glycine을 사용하여 10 mM로 제조하였다. 이렇게 제조된 globin의 농도는 280 nm에서의 흡광도 ($\epsilon_{\lambda, \max} = 12.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, monomer 기준)를 측정하여 결정하였다 (Antonini and Brunori, 1971).

3. pH 변화에 따른 hemin 이동의 측정

Egg PC 60%와 형광물질인 β -py-C₆-HPC를 100/1 (w/w)로

혼합하여 여러 pH (pH 7~4)에서 제조한 리포솜 (0.15 mg/mL)을 fluorescence cell에 2 mL 첨가하였다. 그런 후에 37°C를 유지하면서 작은 magnetic bar를 사용하여 적당한 속도로 stirring를 하면서 spectrofluorometer (Kontron, SFM 25)를 사용하여 시간에 따른 형광세기의 변화를 측정하였다. 이 때 사용한 excitation wavelength는 343 nm이고, emission wavelength는 377 nm였다.

적당한 시간이 경과된 후 리포솜 용액에 hemin (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 재빨리 첨가하고 형광세기의 변화를 관찰하였다. Hemin이 리포솜 내로 포획되어지면, β -py-C₆-HPC의 형광과 hemin의 흡광 사이에 fluorescence energy transfer가 일어나서 β -py-C₆-HPC의 형광세기가 감소하게 된다. Hemin이 리포솜에 충분히 포획되어져 형광의 세기가 일정하게 안정된 값을 나타내면, pH 3에서 제조된 globin 용액 (175 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 40배 희석하여 각각 재빨리 첨가하고 형광세기의 변화를 관찰하였다. 이 때, 리포솜 내에 포획된 hemin이 globin으로 이동되면, fluorescence energy transfer가 감소하게 되어 β -py-C₆-HPC의 형광이 증가하게 된다.

4. 리포솜의 인지질 조성에 따른 hemin 이동의 측정

pH 7에서 egg PC 60%와 egg PC 100%로 각각 제조한 리포솜 (1.34 mg/mL)에 hemin 용액 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 첨가하여 리포솜의 인지질막 내부의 소수성 영역에 hemin을 포획시켰다. 이렇게 제조한 hemin 함유 리포솜에 다양한 pH (pH 7~3)의 globin 용액 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 40배 희석하여 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 충분히 반응을 시켰다. 그런 후에 원심분리기 (Hanil, Micro 17R+)를 이용하여 17,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하고 상층액을 취하였다. Globin으로 이동된 hemin의 Soret band를 확인하기 위하여, 이 상층액의 UV-visible absorbance spectrum (250 nm~700 nm)을 UV-visible Spectrophotometer (Perkin Elmer, LAMDA16)를 사용하여 측정하였다. 또한, globin으로 이동된 hemin에 의한 Trp 형광의 quenching 정도를 측정하기 위하여, 같은 상층액의 fluorescence emission spectrum (280 nm~420 nm)을 280 nm에서 excitation하여 spectrofluorometer (Kontron, SFM 25)로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. pH에 따른 globin의 hemoglobin으로의 folding

다양한 pH (pH 7~4)에서 제조된 β -py-C₆-HPC 함유 리포솜 용액에 hemin을 적당량 첨가한 후에 시간에 따라 377 nm에서의 형광세기의 변화를 측정하였다. Fig. 1의 결과에 따르면, 리포솜 용액에 hemin을 첨가하면 hemin이 리포솜의 소수성 내부로 이동됨에 따라 β -py-C₆-HPC의 형광세기가 감

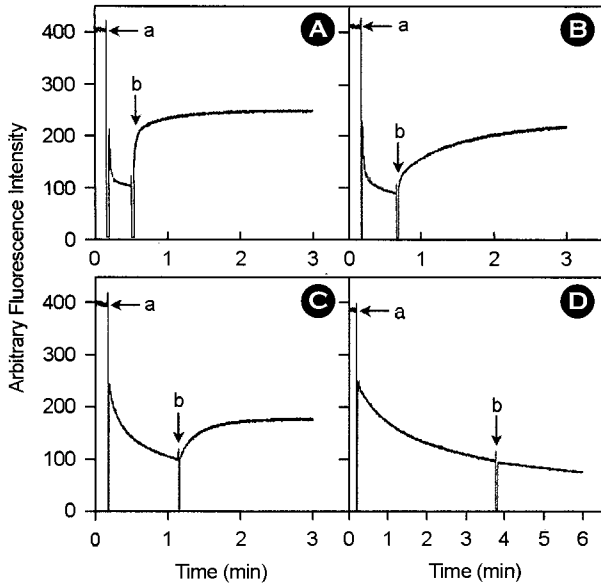


Fig. 1. Kinetics of hemin transfer from the lipid bilayer of liposomes to globin at various pH conditions. Globins dissolved in pH 3 buffer solution was added (arrow b) to liposomes containing hemin in pH 7 (A), pH 6 (B), pH 5 (C) and pH 4 (D) buffer solution, respectively, after the addition of hemin (arrow a).

소하였다. 이러한 형광세기의 감소, 즉 리포솜의 소수성 내부로의 hemin 이동 정도는 리포솜 용액의 pH가 낮을수록 느리게 진행되었다. 형광세기가 일정한 값으로 낮아진 후에 pH 3에 용해된 globin 용액을 40배 희석하여 첨가하면 형광세기가 다시 증가하는 경향을 보였다. 이러한 형광세기의 증가는 리포솜 내부의 hemin이 globin으로 이동되었음을 의미한다. 그러나, 리포솜 용액의 pH가 낮을수록 형광세기의 증가 경향이 감소하였고, 결국 리포솜 용액의 pH가 4인 경우에는 형광의 세기가 전혀 변하지 않았다. 이러한 현상은 hemin 함유 리포솜의 pH가 낮아질수록 globin으로 이동되는 hemin의 양이 감소하기 때문이거나 globin으로 hemin이 이동되어 형성된 hemoglobin이 리포솜과 긴밀하게 상호작용하기 때문인 것으로 보인다.

Globin과 3차 구조가 유사한 myoglobin과 apomyoglobin의 리포솜과의 상호작용에 대한 연구 결과에 따르면, myoglobin은 pH 5 이하에서 리포솜과 강하게 상호작용하지만 pH 7에서는 상호작용하지 않고, apomyoglobin은 myoglobin 보다는 약하지만 pH 5 이하에서 뿐만 아니라 pH 7에서도 상호작용하는 것으로 보고되었다 (Choi et al., 1992; Lee and Kim, 1992). Myoglobin과 구조가 유사한 hemoglobin이 myoglobin과 유사하게 인지질과 상호작용한다고 가정한다면, 리포솜의 pH가 낮아져서 globin과 리포솜이 상호작용하는 환경의 pH가 낮아졌을 때, 리포솜에 포획된 hemin이 globin으로 이동은 되지만 이로 인하여 형성된 hemoglobin이 리포솜과 계

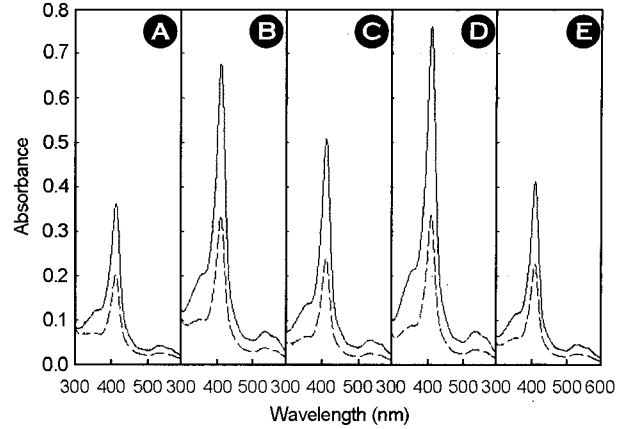


Fig. 2. UV-visible absorbance spectrum of the hemoglobin folded after interaction of globin with hemin-containing liposome. The globin was dissolved in pH 7 (A), pH 6 (B), pH 5 (C), pH 4 (D) and pH 3 (E) buffer solution. And the lipid composition of the liposome was egg PC 60% (-----) and egg PC 100% (—).

속 상호작용하면서 결합되어 있을 것으로 보인다. 따라서, 리포솜 내의 형광이 hemin에 의하여 계속 영향을 받게 되어 형광의 세기가 증가하는 경향이 감소하는 것으로 유추된다. 그러나, 이러한 사실을 증명하기 위해서는 서로 상호작용하는 hemin 함유 리포솜과 globin 사이의 binding test가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

2. 리포솜의 인지질 조성에 따른 globin의 hemoglobin으로의 folding

미토콘드리아 외막의 대부분을 구성하는 인지질인 PC와 PE가 hemin이 globin으로 이동하는데 미치는 영향을 관찰하기 위하여, egg PC 60% (PC 60%와 PE 약 40%로 구성)와 egg PC 100%로 제조된 리포솜에 hemin을 각각 포획시킨 후, hemin 함유 리포솜과 globin 사이의 상호작용을 pH 변화에 따라 관찰하였다.

우선, pH 7에서 egg PC 60%로 제조된 리포솜에 존재하는 hemin이 다양한 pH의 globin으로 이동되는 양상을 UV-visible absorbance spectrum으로 관찰하였다. Fig. 2에 나타난 결과에 따르면, globin이 hemin 함유 리포솜으로부터 hemin을 포획하여 folding된 hemoglobin의 Soret band (411 nm)가 pH에 따라 다양한 흡광 세기를 나타냈다. 즉 pH 7→3→5→6→4의 순으로 Soret band의 흡광 세기가 증가하였으며 이러한 흡광 세기는 globin으로 이동된 hemin의 양에 비례하는 것이 pH 7보다는 globin이 약간 unfolding된 pH 6에서 globin으로의 hemin 이동이 급등하였으며, pH가 낮아질수록 globin으로의 hemin 이동이 감소하였으나, 예외적으로 molten globular structure를 형성하는 것으로 보이는 pH 4에서 globin으로의 hemin 이동이 높게 나타났다.

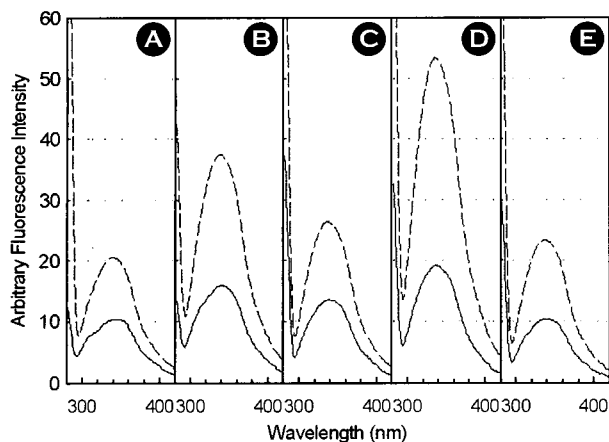


Fig. 3. Fluorescence emission spectrum of the hemoglobin folded after interaction of globin with hemin-containing liposome. The globin was solved at pH 7 (A), pH 6 (B), pH 5 (C), pH 4 (D) and pH 3 (E) buffer solution. And the lipid composition of the liposome was egg PC 60% (-----) and egg PC 100% (—).

다음으로 egg PC 100%로 제조된 리포솜에 존재하는 hemin이 다양한 pH의 globin으로 이동되는 양상을 같은 방법으로 관찰하였다. Fig. 2의 결과에 따르면, 미토콘드리아 외막과 유사한 인지질 조성을 갖는 egg PC 60%를 사용한 실험에서와 유사한 경향이 관찰되었으나, 그 이동량이 현격히 증가하였다. 즉, PE의 부재가 globin으로의 hemin 이동을 향상시킨 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 PE가 heme protein의 folding에 관여하는 non-protein chaperone의 기능을 가지고 있다는 보고와 상반되는 것으로 보인다 (Bogdanov and Dowhan, 1998; 1999; Bogdanov et al., 1996; Debnath et al., 2003). 그러나, hemin이 globin으로 이동되는 과정이 hemoglobin이 안정된 구조를 형성하는 과정과는 독립적인 과정인 것으로 가정한다면, 리포솜을 구성하는 PE가 globin으로의 hemin 이동량을 감소시킨다 할지라도 이 이동으로 folding된 hemoglobin을 안정화시킬 수도 있을 것으로 생각된다. 결국, 생체는 globin으로의 hemin 이동 효율이 높은 것을 선택하기 보다는 최종적으로 folding된 hemoglobin이 보다 더 안정된 구조로 효과적인 기능을 수행하도록 하는 환경을 선택한 것으로 해석되어질 수 있을 것이다.

앞에서 관찰한 UV-visible absorbance spectrum의 결과를 보완하기 위하여 리포솜에서 globin으로의 hemin 이동을 fluorescence emission spectrum을 통해 관찰하였다. 즉, globin으로 hemin이 이동되었을 때 hemin에 의해서 globin의 Trp 형광이 quenching되는 현상을 이용하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 Trp의 fluorescence emission peak가 337 nm에서 관찰되었고, 이러한 emission peak의 크기는 globin으로 이동된 hemin의 양에 반비례하게 나타났다. 이 결과에서, egg PC 100%와 60% 모두의 fluorescence emission spectrum이 앞서

관찰한 UV-visible absorbance spectrum과 유사한 경향을 보였고, egg PC 60%의 경우가 egg PC 100%의 경우보다 globin으로 hemin이 이동하는 정도가 훨씬 낮게 관찰되었다.

이상의 결과들을 종합해 보면, 미토콘드리아의 내막에서 일어나는 proton pumping이 미토콘드리아의 외부 pH를 7보다 약간 낮춰줄 가능성이 있으며, 이러한 pH의 감소는 앞서 관찰된 것처럼 globin으로의 heme 이동을 향상시켜 줄 것으로 보인다. 또한, 미토콘드리아 외막의 바깥쪽에 존재하는 PE가 안쪽으로 이동되도록 조절된다면 미토콘드리아 외막에 있는 heme이 globin으로 이동하는 현상이 촉진될 것으로 보인다.

미토콘드리아의 heme이 globin으로 이동되는 post-translational folding 과정에서 Smith와 Morgan (1981)은 단백질 운반체가 필요하다고 제안하였으며, Rose 등 (1985)은 단백질 운반체의 도움 없이도 heme이 globin으로 이동될 수 있다고 제안하였다. 본 실험에서 관찰한 결과들에 따르면, post-translational folding 과정은 단백질 운반체의 도움없이도 진행될 수 있음을 시사한다. 그러나, 이 과정에서 단백질 운반체가 관여할 가능성을 완전히 배제할 수는 없을 것으로 생각된다. 즉, 이미 미토콘드리아에 존재하는 heme은 pH 변화와 미토콘드리아 외막의 인지질 조성의 변화에 따른 post-translational folding 과정을 통해 globin으로 이동할 수 있으며, 이 과정에서 단백질 운반체의 도움을 받아 heme의 이동이 더욱 정교하게 조절될 수도 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Antonini E, Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. (Neuberger A, Tatum EL, Eds). 1971. pp 44-45. North Holland Publishing. Amsterdam.
- Bogdanov M, Dowhan W. Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. *Embo J.* 1998. 17: 5255-5264.
- Bogdanov M, Dowhan W. Lipid-assisted protein folding. *J Biol Chem.* 1999. 274: 36827-36830.
- Bogdanov M, Sun J, Kaback HR, Dowhan W. A phospholipid acts as a chaperone in assembly of a membrane transport protein. *J Biol Chem.* 1996. 271: 11615-11618.
- Bunn HF. Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype. *Blood* 1987. 69: 1-6.
- Choi YH, Lee JW, Kim H. Interaction of oxymyoglobin and apomyoglobin with phospholipid vesicles at low pH. *Mol Cells.* 1992. 2: 75-81.
- Craescu CT, Mispelter J, Blouquit Y. Coupling of tertiary and qua-

- ternary changes in human hemoglobin: a 1D and 2D NMR study of hemoglobin Saint Mandé (beta N102Y). *Biochemistry* 1990. 29: 3953-3958.
- Debnath D, Bhattacharya S, Chakrabarti A. Phospholipid assisted folding of a denatured heme protein: effect of phosphatidylethanolamine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 301: 979-984.
- Fuhr JE, Gengozian N. Coordination of heme and globin synthesis in primate reticulocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1973. 320: 53-58.
- Gelin BR, Karplus M. Mechanism of tertiary structural change in hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977. 74: 801-805.
- Gibson QH, Antonini E. Rates of reaction of native human globin with some hemes. *J Biol Chem*. 1963. 238: 1384-1388.
- Granick S, Beale SI. Hemes, chlorophylls, and related compounds: biosynthesis and metabolic regulation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1978. 46: 33-203.
- Grayzel AI, Horchner P, London IM. The stimulation of globin synthesis by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966. 55: 650-655.
- Hahn KH, Kim H. Fusion and fragmentation of phospholipid vesicles by apohemoglobin at low pH. *J Biochem (Tokyo)*. 1991. 110: 635-640.
- Hunt T, Vanderhoff G, London IM. Control of globin synthesis: the role of heme. *J Mol Biol*. 1972. 66: 471-481.
- Javaherian K, Beychok S. Subunit interactions in the conformational change of horse apohemoglobin on binding of hemin. *J Mol Biol*. 1968. 37: 1-11.
- Jennings TM, McDonald MJ. Esterification of the propionate groups promotes alpha/beta hemoglobin chain homogeneity of CN-hemin binding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. 293: 1354-1357.
- Komar AA, Kommer A, Krasheninnikov IA, Spirin AS. Cotranslational heme binding to nascent globin chains. *FEBS Lett*. 1993. 326: 261-263.
- Komar AA, Kommer A, Krasheninnikov IA, Spirin AS. Cotranslational folding of globin. *J Biol Chem*. 1997. 272: 10646-10651.
- Lee JW. Refolding of acid-unfolded globin to hemoglobin. *J Exp Biomed Sci*. 2005. 11: 85-88.
- Lee JW, Kim H. Fragmentation of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles by apomyoglobin. *Arch Biochem Biophys*. 1992. 297: 354-361.
- Leutzinger Y, Beychok S. Kinetics and mechanism of heme-induced refolding of human alpha-globin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981. 78: 780-784.
- Morris AJ, Liang K. Interaction of globin and heme during hemoglobin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 1968. 125: 468-479.
- Nathan DG, Piomelli S, Gardner FH. The synthesis of heme and globin in the maturing human erythroid cell. *J Clin Invest*. 1961. 40: 940-946.
- Ponka P, Borova J, Neuwirt J. Accumulation of heme in mitochondria from rabbit reticulocytes with inhibited globin synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1973. 304: 715-718.
- Rose MY, Thompson RA, Light WR, Olson JS. Heme transfer between phospholipid membranes and uptake by apohemoglobin. *J Biol Chem*. 1985. 260: 6632-6640.
- Schwartz HC, Hill RL, Cartwright GE, Wintrobe MM. The stimulation of heme synthesis by globin. *Biochim Biophys Acta*. 1959. 36: 567-568.
- Smith A, Morgan WT. Hemopexin-mediated transport of heme into isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1981. 256: 10902-10909.
- Taketani S, Tokunaga R. Purification and substrate specificity of bovine liver-ferrochelatase. *Eur J Biochem*. 1982. 127: 443-447.
- Teale FW. Cleavage of the haem-protein link by acid methylketone. *Biochim Biophys Acta*. 1959. 35: 543.