

Zum gegenwärtigen Stand der Hämoglobin-Forschung^[**]

Von Gerhard Buse^[*]

Herrn Professor Gerhard Braunitzer zum 50. Geburtstag gewidmet

Bis heute ist Hämoglobin ein bevorzugtes Objekt der molekularen Biologie. Die Untersuchungen dieses Moleküls gipfeln in der vollständigen atomaren Beschreibung seiner Struktur in verschiedenen Funktionszuständen und sind beispielhaft für die Erforschung von anderen Biopolymeren. Die Kenntnis der Anatomie dieses Proteins setzt uns allerdings noch nicht in den Stand, quantitative Voraussagen über seine Funktion zu machen.

1. Einleitung

Der rote Blutfarbstoff Hämoglobin ist eines der bestuntersuchten Makromoleküle. Mehr als 500 Veröffentlichungen zu diesem Thema erschienen in den vergangenen zwei Jahren^[1]. Der konzentrierten Bearbeitung dieses Proteins verdankt die Molekularbiologie viele Erkenntnisse. Im folgenden kann nur ein großer Überblick gegeben werden, zudem ist die Auswahl subjektiv: Wir haben uns vorwiegend unter proteinchemischen Gesichtspunkten mit diesem Molekül befaßt.

Der Name „Hämoglobin“ in der Überschrift soll als Familienbegriff aufgefaßt werden: Dazu gehören die Myoglobine und – wie sich neuerdings gezeigt hat – das Erythrocyruorin der Insekten, möglicherweise auch das Leguminosen-Hämoglobin^[2]. Diese Verwandtschaft ist durch die reversible O₂-Bindung am Fe²⁺-Coenzym, dem Protoporphyrin IX^[3] und durch Übereinstimmungen in

Primär- und Tertiärstruktur begründet. Von den zahlreichen anderen in der Natur vorkommenden Häm-Proteinen, vor allem den Cytochromen, ließ sich bisher eine genetische Verwandtschaft zum Hämoglobin nicht nachweisen. Eine Ausnahme stellt vielleicht Cytochrom b 562 aus *E. coli* dar^[4].

Die molekularbiologischen Untersuchungen der Hämoglobine begannen mit der Röntgen-Strukturanalyse des Myoglobins bei 6 Å und wenig später bei 2 Å Auflösung^[5]. Es folgte die Konformationsanalyse des Hämoglobins durch Perutz et al.^[6], die zeigte, daß dieses Molekül aus 2×2 myoglobinähnlichen Untereinheiten zusammengesetzt ist ($\alpha_2\beta_2$). Braunitzer et al.^[7] veröffentlichten 1961 die Primärstruktur des menschlichen Hämoglobins, und Ingram^[8] gelang die molekulare Interpretation der Sichelzellenanämie als genetischer Defekt dieses Moleküls. Im Gefolge dieser Arbeiten wurden Verfeinerungen der Röntgen-Strukturen von Myoglobin und Hämoglobin bis zur atomaren Auflösung sowie vier weitere Röntgen-Strukturanalysen veröffentlicht, etwa 35 Primärstrukturen angegeben und über 100 Hämoglobinanomalien aufgedeckt.

Untersuchungen zur Funktion dieses Moleküls werden heute mit einer großen Zahl physikochemischer Methoden vorangetrieben. Dazu gehören kinetische Untersuchungen durch schnelle Mischung der Reaktanten sowie durch Temperatur- und Feldsprungmethoden, Blitzlichtphotolyse, IR-Spektroskopie, Messungen der optischen Rotationsdispersion (ORD) und des Circular dichroismus (CD), Polarographie, Elektronenspinresonanz- (ESR) und seit neuerem Kernresonanz-Spektroskopie (NMR). Die bedeutenden Beiträge dieser Methoden können hier nicht im einzelnen aufgeführt werden; sie wurden kürzlich zu-

[*] Dr. G. Buse
Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Neue Anschrift:
Institut für Physiologische Chemie der Technischen Hochschule
51 Aachen, Alter Maastrichter Weg 1

[**] An Abkürzungen werden verwendet:

Mb: Myoglobin
Hb: Hämoglobin
 α , β , γ , δ , ϵ : Peptidketten (Untereinheiten) der Hämoglobine
RNA: Ribonucleinsäure
DNA: Desoxyribonucleinsäure
NA...B...C...HC: Helicale und interhelicale Bereiche der Hämoglobine und Myoglobine
His β , F 8 (97): Bezeichnung der Position einer Aminosäure, hier: Histidin der β -Kette in Pos. 8 der F-Helix, Pos. 97 der Sequenz
pMB: *p*-Chlorquecksilberbenzoat
2,3-DPG: 2,3-Diphosphoglycerinsäure

sammenfassend referiert^[9]. Ziel der Untersuchungen ist es, die Funktion dieses Proteins auf molekularer Ebene zu erklären und in ihrer genetischen Entstehung und Wandlung zu begreifen.

2. Die Primärstruktur und ihre Variabilität

2.1. Biosynthese

Die Biosynthese des Hämoglobins wurde am Kaninchen-Reticulocyten-System untersucht. Es gelang, 9s-RNA der Polysomenfraktion von Mäuse-Reticulocyten in einem zellfreien Kaninchen-Reticulocyten-System zur Synthese von Hb- β -Ketten zu verwenden. Dies war die erste durch mRNA von Säugern in einem zellfreien System bewirkte Proteinbiosynthese^[10]. Kaninchen-Globin läßt sich im *E.-coli*-System mit Kaninchen Reticulocyten-RNA *in vitro* gewinnen: ein glänzender Beweis für die Universalität des genetischen Codes. Hierbei ist N-Acetyl-Valyl-tRNA essentiell; sie initiiert die Synthese am Val NA 1 α , β (1)^[11]. Andere Versuche zeigten, daß die am N-Terminus beginnende Biosynthese verzögert wird, wenn nach etwa 90 Syntheseschritten kein Häm in die räumliche Struktur des Moleküls eingelagert werden kann, ein Hinweis darauf, daß die von den Ribosomen abgegebenen N-terminalen Anteile des Proteins sich bereits vor der endgültigen Ablösung vom Synthesort räumlich orientieren.

Die so synthetisierte Peptidkette enthält die Information für die räumliche Faltung und Hämbindung des Moleküls, bedingt also dessen Eigenschaften. Sie ist colinear mit der Sequenz der DNA-Codons der zugehörigen Gene. Diese können bisher nicht direkt untersucht werden, wurden aber im Falle der dipteren Insektengattung *Chironomus* auf einem Chromosomenarm lokalisiert^[12]. Hinweise für die Colinearität lassen sich aus einigen Befunden der Sequenzanalyse von Hämoglobin^[13] und anderen Proteinen ableiten.

2.2. Primärstrukturen

Untersuchungen am Pottwal-Myoglobin und am Hämoglobin des Menschen hatten bereits die grundlegenden Typen von Peptidketten gezeigt, die Myoglobine und Hämoglobine der Wirbeltiere kennzeichnen. In den monomeren Myoglobinen ist mit 153 Aminosäuren der längste Kettentyp verwirklicht. Die bisher bekannt gewordenen Sequenzen sind verwandt, ihnen fehlt Cystein. Im menschlichen Myoglobin ist Position 9 deletiert, die Kette besteht also nur aus 152 Aminosäuren^[14] (s. Tabelle 1). Hämoglobine zeigen noch bei Vögeln, Amphibien und Knochenfischen den tetrameren Aufbau aus α - und β -Ketten, die in der Regel aus 141 bzw. 146 Resten bestehen. Hier kommt Cystein vor, es werden aber keine Disulfidbrücken ausgebildet. Der N-Terminus ist in einigen Fällen acetyliert. Derartige Angaben werden seit 1967 von Dayhoff et al. im „Atlas of Protein Sequence and Structure“ gesammelt^[19].

Der Mensch hat außer dem Hämoglobin A und dem Myoglobin eine Reihe anderer Hämoglobine, so das fötale

F-Hämoglobin, das anstelle der beiden β -Ketten γ -Ketten enthält ($\alpha_2\gamma_2$)^[16]. Nach der Geburt werden die γ -Ketten nicht mehr synthetisiert. Wahrscheinlich entspricht dem fötalen Hämoglobin auch ein fötales Myoglobin^[15]. Ferner hat der Erwachsene neben dem HbA etwa 2% HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$)^[17], das eine weitere Nicht- α -Kette – die δ -Kette – enthält, und in sehr frühen embryonalen Stadien beobachtet man ein embryonales Hämoglobin ($\alpha_2\varepsilon_2$)^[18] mit der noch nicht genau bekannten ε -Kette. Die Ontogenie dieser Ketten zeigt Abbildung 1.

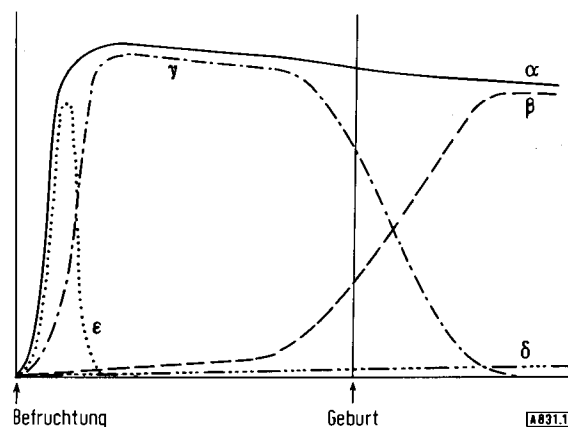


Abb. 1. Ontogenie der menschlichen Hämoglobine (nach Betke, aus [74]).

Einen tieferen Einblick in die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion gibt die vergleichende Analyse phylogenetisch distanter Hämoglobine. Das Hämoglobin des Meeresneunauges (*Petromyzon marinus*), eines primitiven kieferlosen Wirbeltieres, ist als HbO₂ monomer und als Hb polymer. Das Globin des nahe verwandten Flußneunauges (*Lampetra fluviatilis*) besteht aus einer Folge von 146 Aminosäuren, deren Homologie zu den oben genannten Hämoglobinen schwerer feststellbar ist (s. Tabelle 1). Die Sequenz beginnt mit neun Resten, für die es bei anderen Hämoglobinen keine Entsprechung gibt. Verkürzt ist das Molekül im C-terminalen Bereich, wo Deletionen bis zu zehn Aminosäuren eingetreten sind^[20]. Die zahlreichen monomeren und dimeren Hämoglobine des Insekts *Chironomus thummi* weichen noch stärker ab. Sie sind in der Hämolymphe der wasserlebenden Larven frei gelöst. Dieses erste bisher untersuchte Avertebraten-Hämoglobin hat eine Peptidkette aus nur 136 Aminosäuren: die Deletionen liegen im N- und C-terminalen Teil der Kette^[21].

Während bei den bisher bekannten Wirbeltier-Hämoglobinen und -Myoglobinen noch sieben Aminosäuren in übereinstimmenden Positionen gefunden werden, reduziert sich ihre Zahl beim Vergleich mit dem Insekten-Hämoglobin weiter auf drei bis vier. Hier zeigt sich, daß die Natur mit einem völlig veränderten Satz von Bauelementen das gleiche Ziel erreicht. Aber trotz der großen Unterschiede zu Vertebraten-Sequenzen läßt sich eine Ähnlichkeit besonders im N-terminalen Bereich nicht übersehen. Sie berechtigt zu der in Tabelle 1 verwendeten Schreibweise als Ausdruck einer entfernten phylogenetischen Verwandtschaft. Überraschend ist, daß die aus den Untersuchungen an Wirbeltieren bekannte Trp-Sequenz

Tabelle 1. Homologe Zuordnung der Peptidketten einiger Hämoglobine. α -Hum, β -Hum: Peptidketten des menschlichen Hb A [7]; α -Karp.: α -Kette des Karpfen-Hb [71]; Mb-Hum: Human-Myoglobin [14]; Lamp. fl.: *Lampetra-fluviatilis*-Hb [20]; CTT III: Komponente III der Hämoglobine von *Chironomus th. th.* [21]. Die in diesen Peptidketten übereinstimmend angeordneten sechs Reste wurden umrahmt. NA-A-B...HC — helicale (unterstrichen) und interhelicale Bereiche.

		10		20		25
α -Hum.		Val-	Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr-Asn	-Val-Lys-Ala-Ala-Trp-Gly-		
α -Karp.		Ser-	Leu-Ser-Asp-Lys-Asp-Lys-Ala-Ala	-Val-Lys-Ile-Ala-Trp-Ala-		
β -Hum.		Val-His-	Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala	-Val-Thr-Ala-Leu-Trp-Gly-		
Mb-Hum.		Gly-	Leu-Ser-Asx-(Gly,Glx)-Trp-Gln-	-Val-Leu-Asx-Val-Trp-Gly-		
Lamp. fl.	Pro-Ile-Val-Asp-Ser-Gly-Ser-Pro-Ala-Val-	Leu-	Ser-Ala-Ala-Glu-Lys-Thr-Lys	-Ile-Arg-Ser-Ala-Trp-Ala-		
CTT III		Leu-	Ser-Ala-Asp-Gln-Ile-(Ser,Thr)-Val-Gln-Ala-Ser-Phe-Asp-			
		NA	1	A	10	
	30		40		50	
Lys-Val-Gly-Ala-His-Ala-Gly-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-Ala	Leu-Glu-Arg-Met-Phe-Leu-Ser-Phe	Pro-Thr-Thr-Lys-				
Lys-Ile-Ser-Pro-Lys-Ala-Asp-Asp-Ile-Gly-Ala-Glu-Ala	Leu-Gly-Arg-Met-Leu-Thr-Val-Tyr	Pro-Gln-Thr-Lys-				
Lys-Val-Asn-	-Val-Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala	Leu-Glu-Arg-Leu-Leu-Val-Val-Tyr	Pro-Trp-Thr-Gln-			
Lys-Val-Glu-Pro-(Asp,Ile, Ala, Gly, His, Gly, Glx,Glx)-Val	Leu-Ile-Arg-Leu-Phe-Lys-Gly-His	Pro-Glu-Thr-Leu-				
Pro-Val-Tyr-Ser-Asn-Tyr-Glu-Thr-Ser-Gly-Val-Asp-Ile	Leu-Val-Lys-Phe-Phe-Thr-Ser-Thr	Pro-Ala-Ala-Gln-				
Lys-Val Lys-	-Gly-Asp-Pro-Val-Gly-Ile	Leu-Tyr-Ala-Val-Phe-Lys-Ala-Asp	Pro-Ser-Ile-Met-			
	16	1	B	10	16	1
						C
	60		70		75	
Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-	Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Lys-Gly-His-Gly-					
Thr-Tyr-Phe-Ala-His-Trp-Ala-Asp-Leu-Ser-Pro-	Gly-Ser-Gly-Pro-Val-Lys-	-His-Gly-				
Arg-Phe-Phe-Glu-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Thr-Pro-Asp-Ala-Val-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-Lys-Ala-His-Gly-						
Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Phe-Lys-His-Leu-Lys-Ser-Glu-Asp-Glu-Met-Lys-Ala-Ser-Glu-Asp-Leu-Lys-Lys-His-Gly-						
Glu-Phe-Phe-Pro-Lys-Phe-Lys-Gly-Met-Thr-Ser-Ala-Asp-Glu-Leu-Lys-Lys-Ser-Ala-Asp-Val-Arg-Trp-His-Ala-						
Ala-Lys-Phe-Thr-Gln-Phe-Ala-Gly-Lys-Asp-Leu-Glu-Ser-Ile-Lys-Gly-Thr-Ala-Pro-Phe-His-Ile-Glu-Ala-						
	7	1	D	7	1	E
	80		90		100	
Lys-Lys-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala-						
Lys-Lys-Val-Ile-Met-Gly-Ala-Val-Gly-Asp-Ala-Val-Ser-Lys-Ile-Asp-Asp-Leu-Val-Gly-Gly-Leu-Ala-Ser-						
Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Phe-Ser-Asp-Gly-Leu-Ala-His-Leu-Asp-Asn-Leu-Lys-Gly-Thr-Phe-Ala-Thr-						
Ala-Thr-Val-Leu-Thr-Ala-Leu-Gly-Gly-Ile-Leu-Lys-Lys-Lys-Gly-His-His-(Glx,Ala, Glx)-Ile-Lys-Pro-						
Glu-Arg-Ile-Ile-Asn-Ala-Val-Asn-Asp-Ala-Val-Ala-Ser-Met-Asp-Asp-Thr-Glu-Lys-Met-Ser-Met-Lys-Asp-						
Asn-Arg-Ile-Val-Gly-Phe-Phe-Ser-Lys-Ile-Ile-Gly-Glu-Leu-Pro-Asn-Ile-Glu-Ala-Asp-Val-Asn-Thr-						
	12	13	20	EF	1	
	110		120		125	
Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-His-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-						
Leu-Ser-Glu-Leu-His-Ala-Ser-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Ala-Asn-Phe-Lys-Ile-Leu-Ala-Asn-His-Ile-Val-Val-						
Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Val-Cys-						
Leu-Ala-Glx-Ser-His-Ala, Thr)-Lys-His-Lys-Val-Pro-Ile-Lys-Tyr-(Leu, Glu, Phe, Ile, Ser, Glu, Ser, Ile, Val, Asp-						
Leu-Ser-Gly-Lys-His-Ala-Lys-Ser-Phe-Gln-Val-Asp-Pro-Gln-Tyr-Phe-Lys-Val-Leu-Ala-						
Phe-Val-Ala-Ser-His-Lys-Pro-Arg-Gly-Val-Thr-His-Asx-Glx-Leu-Asx-Asx-Phe-Arg-Ala-Gly-Phe-Val-Ser-						
	F	8	FG	1	G	10
	130		140		150	
Thr-Leu-Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Leu-Ala-Ser-Val-						
Gly-Ile-Met-Phe-Tyr-Leu-Pro-Gly-Asp-Phe-Pro-Pro-Glu-Val-His-Met-Ser-Val-Asp-Lys-Phe-Phe-Gln-Asn-Leu-						
Val-Leu-Ala-His-His-Phe-Gly-Lys-Glu-Phe-Thr-Pro-Pro-Val-Gln-Ala-Ala-Tyr-Gln-Lys-Val-Val-Ala-Gly-Val-						
Val, Leu, Glu)-Ser-Lys-His-Pro-Gly-Asx-Phe-Gly-Ala-Asp-Ala-Glx-Gly-Ala-Met-Asx-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-						
-Val-Ile-Ala-Asp-Thr-Val-Ala-Ala-Gly-Asp-Ala-Gly-Phe-Glu-Lys-Leu-Ser-Met-Cys-Ile-						
Tyr-Met-Lys-Ala-His-Thr-Asp-Phe-Gly-Ala-Glu-Ala-Ala-Ala-Trp-Gly-Thr-Leu-(Ala,Asp, Thr, Phe-						
	19	GH	1	10	H	
	160					
Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg	-	-	-	-	-	
Ala-Leu-Ala-Leu-Ser-Glu-Lys-Tyr-Arg	-	-	-	-	-	
Ala-Asn-Ala-Leu-Ala-His-Lys-Tyr-His	-	-	-	-	-	
Arg-Lys-Asp-Met-Ala-Ser-Asp-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-Phe-Gln-Gly	-	-	-	-	-	
Ile-Leu-Met-Leu-Arg-Ser-Ala-Tyr	-	-	-	-	-	
Phe)-Gly-Met-Ile-Phe-Ser-Lys-Met	-	-	-	-	-	
	H	20	HC			

(A10–15) hier in den C-terminalen Bereich der Kette (H5–10) verlagert worden ist^[22].

Auch *Chironomus*-Hämoglobine enthalten kein Cystein. Zu den bei Wirbeltieren invarianten Resten gehört das Tryptophan A12, das einen dem Häm nebengeordneten hydrophoben Kern des Moleküls bildet, Glycin B6, das aufgrund des Fehlens einer Seitenkette als einzige Aminosäure zwischen der B-Helix und der überlagernden D-Helix Platz findet, Prolin in C2, das die Ecke zum Übergang in die C-Helix bildet, Phenylalanin CD1 in engem π -Bindungskontakt zum Häm, Histidin E7, der distale Hämkontakt, dem man ursprünglich eine funktionelle Bedeutung gegeben hatte, Histidin F8, die proximale Hämbindung, und Tyrosin HC2, das für die Fixierung der H-Helix am Molekül und für die Allosterie des tetrameren Hämoglobins (s. Abschnitt 3.2) notwendig ist. Substitutionen von Trp A12, Gly B6, His E7 und Tyr HC2 beim Insekten-Hämoglobin zeigen, daß die Entwicklung hier andere Wege gegangen ist. Aminosäuren wie Val NA1 α und His HC3 β , die für die pH-abhängige O₂-Bindung bei Mammalien-Hämoglobin (Bohr-Effekt) wichtig sind, fehlen ganz. Trotzdem zeigt dieses monomere Hämoglobin eine deutliche Abhängigkeit der O₂-Bindung vom pH-Wert. Bei dimeren Komponenten dieser Larval-Hämoglobine findet sich sogar der größte bisher gemessene Bohr-Effekt^[23].

2.3. Evolution und Polymorphismus der Globine

Die Unterschiedlichkeit der Globinsequenzen verschiedener Tierarten entspricht dem Verwandtschaftsgrad der Träger. Zuerst erkannten *Zucker кандl* und *Pauling*^[24] diesen Zusammenhang am Vergleich der Sequenzen der α -Ketten des Pferdes und des Menschen, die sich in 18 Positionen unterscheiden. Nimmt man für beide Arten seit ihrer Divergenz von einem gemeinsamen Vorfahren vor etwa $90 \cdot 10^6$ Jahren eine ähnliche Substitutionsgeschwindigkeit der Hämoglobine an, so haben sich die α -Ketten beider Arten um durchschnittlich neun Aminosäuren vom α -Kettentyp des gemeinsamen Vorfahren entfernt: Durchschnittlich alle $10 \cdot 10^6$ Jahre wurde eine Aminosäure ausgetauscht.

Die Entwicklung dieses Grundgedankens führte in den letzten Jahren zum systematischen Vergleich von Primärstrukturen homologer Proteine mit dem Ziel, die Phylogenie der Arten abzuleiten. Zwar hat die vergleichende Morphologie hier bereits weitgehend Klarheit geschaffen, doch bietet diese neue Methode einige offenkundige Vorteile:

1. Dem Austausch einer Aminosäure liegt die Änderung einer Base in einem Codon der DNA zugrunde. Diese Punktmutation ist die kleinste genetisch mögliche Änderung, die „Einheit“ der Evolution (Mutation und Selektion). Sie ist also quantifizierbar, die anfallenden Daten können mit Computern gesammelt und ausgewertet werden.
2. Aus dem Vergleich mehrerer Sequenzen kann die Sequenz des gemeinsamen Vorfahren abgeleitet werden. Im Gegensatz zu den meisten Fossilien kennzeichnen diese Strukturen genau die Verzweigungspunkte der Phylogenie.

3. Im Prinzip können alle Proteine vergleichend untersucht werden; die insgesamt zugängliche Information ist daher größer als bei Anwendung der relativ groben morphologischen Kriterien.

4. Es zeigt sich, daß die Aminosäuren bei verschiedenen Proteinen verschieden schnell ausgetauscht werden. Man kann also die Evolution in einem Protein mit geringer Substitutionsgeschwindigkeit über sehr große Zeiträume (bis zu $3 \cdot 10^9$ Jahren; Stammbildung) untersuchen; in einem anderen Protein mit hoher Substitutionsgeschwindigkeit über kürzere Zeiträume (Artbildung). Das Hämoglobin gehört zu den Proteinen mit mittlerem Zeitraster.

Zur Zeit werden die Voraussetzungen solcher Untersuchungen wie Kriterien der Homologie und Konvergenz, Einfluß der Generations- und Mutationsgeschwindigkeit sowie Genduplikation und Deletion diskutiert^[25]. Auch die Frage, ob unterschiedliche Aminosäuresequenzen eines Proteins aufgrund von Mutation und Selektion oder zum größeren Teil nur durch Mutation entstehen, ist noch nicht geklärt^[26]. Aus Genduplikationen resultiert eine Vermehrung des genetischen Materials. Sie ist entscheidend für die Entstehung von Proteinen mit neuen Funktionen^[70]. Nach *Ingram* war ein Ur-Hämoglobin-Gen im Erbgut des Tierreichs, aber erst mit der Entstehung höherer Wirbeltiere ermöglichten Genduplikationen die Differenzierung zum β -Kettentyp (β - ϵ) und zur α -Kette. Die zunehmende Verkürzung dieser Polypeptide gegenüber dem Myoglobin deutet hierbei die zunehmende Spezialisierung zur Untereinheit eines kooperativen Tetramers (s. Abschnitt 3.2) an.

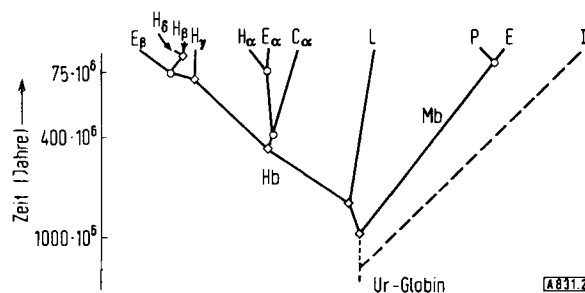


Abb. 2. Stammbaum der Globine (verändert nach *Dayhoff* et al. [19]). Eingezeichnet sind α -, β -, γ -, δ -Peptidketten von Mensch (H), Pferd (E), Karpfen (C), Flußneunauge (L), Pottwal (P) und *Chironomus th.* (I). Hb = Hämoglobin, Mb = Myoglobin. Vierecke an den Verzweigungen bedeuten Duplikationen der Globin-Gene, Kreise kennzeichnen die Entwicklung der Kettentypen, die aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nur für wenige Beispiele eingezeichnet ist. Die Zeitskala ist vorläufig.

Abbildung 2 zeigt einen Stammbaum, wie er sich aus einigen sehr unterschiedlichen Globinsequenzen ableiten läßt^[19]. Mindestens ein Gen ist der Informationsträger für eine Peptidkette. Man muß also beim Menschen mit wenigstens sechs globinsynthetisierenden Genen rechnen. Aus Untersuchungen am Hb-F, bei denen eine ganz-zahlige Relation der ausgetauschten Aminosäuren gefunden wurde^[27], schließen die Autoren auf wenigstens zwei Gene eines γ -kettensynthetisierenden Typs. Daß es sich dabei nicht um Fehler der Proteinbiosynthese handelt, konnte durch Bastardisierungsversuche mit Mäusen gesichert werden^[28]. So muß man annehmen, daß mehr als

sechs Gene die Information „Hämoglobin“ enthalten und unter bestimmten Bedingungen auch realisieren. Dies bestätigt auch der Befund, daß anämische Ziegen ein zusätzliches stark O₂-bindendes Hämoglobin synthetisieren^[29]. Den ausgeprägtesten Polymorphismus eines Hämoglobins überhaupt finden wir bei *Chironomus*-Larven, aus deren Hämolymphe wenigstens zwölf Komponenten chromatographisch und elektrophoretisch abtrennbar sind; darüber hinaus wurden in einheitlichen Fraktionen noch mehrfacher Austausch neutraler Aminosäuren und Variationen der Peptidkettenlänge beschrieben^[21]. Die Vielfalt dieser Strukturen macht sie zu geeigneten Objekten für vergleichende Untersuchungen mit physikochemischen Methoden. Auch deutet sich hier ein Weg an, die Diskrepanz zwischen der Anzahl von einem höheren Organismus synthetisierter Proteine und der um ein Vielfaches größeren Informationskapazität der DNA zu verstehen.

Die Methoden der Sequenzanalyse sind nur bei sehr sorgfältiger Arbeit geeignet, feine Unterschiede in Primärstrukturen aufzudecken. Die gegenwärtigen Methoden der Proteintrennung sind damit ohnehin überfordert. Mit der Automatisierung des Edmanschen Abbaus^[30] ist hier vielleicht ein entscheidender methodischer Schritt gelungen. In den nächsten Jahren sollten weitere Sequenzen – auch von hochmolekularen Hämoglobinen^[31] – bekannt werden und Mikroheterogenitäten in schon geläufigen Sequenzen gefunden werden.

Die kovalente Struktur eines Proteins, wie sie durch Biosynthese entsteht, enthält die Information für die räumliche Faltung und Funktion des Moleküls. Akzeptiert man diese These, so hat man sich einerseits den Weg zum genetischen Verständnis eines Proteins als Produkt eines langen Evolutionsprozesses mit Mutation und selektiver Anpassung eröffnet, steht aber andererseits vor der Aufgabe, die Eigenschaften dieser Stoffe aus ihrer Primärstruktur herauszulesen. Von diesem Ziel ist die theoretische Chemie zur Zeit weit entfernt. Kann man es erreichen, so ist man – die Fähigkeit zur Synthese von Proteinen vorausgesetzt – in der Lage, die unübertroffenen Leistungen der Biokatalysatoren auch für andere Zwecke, etwa der chemischen Technologie und der Medizin, einzusetzen. Die vergleichende Untersuchung von Primärstrukturen hat damit – besonders am variablen Hämoglobin – nicht nur einen phylogenetischen, sondern auch einen theoretisch-chemischen Zweck; sie zeigt, wie verschieden die Bausteine eines Proteins zusammengefügt werden können, ohne die Grundfunktion und Konformation wesentlich zu variieren: Es erscheint möglich, durch vergleichende Analyse homologer Sequenzen bisher unbekannte Gesetzmäßigkeiten der Proteinstruktur zu finden.

2.4. Anomale Hämoglobine

Die oben genannte Primärstruktur des Hämoglobins A wird normalerweise rassenunabhängig bei allen Menschen gefunden. Sie ist Artbesitz der menschlichen Erdbevölkerung, ja sogar das Hämoglobin des Schimpansen ist identisch aufgebaut. Abweichungen davon werden als

anomale Hämoglobine beschrieben; sie sind in vielen Fällen Ursache von Krankheiten. Nachdem es gelang, die Anomalie des Sichelzellenhäoglobins (HbS) als Aminosäureaustausch ($\alpha_2\beta_2$ 6 Glu → Val) durch kombinierte Elektrophorese und Verteilungschromatographie der tryptischen Peptide (fingerprint) von HbS und HbA zu identifizieren^[8], wurden bis heute über hundert andere Anomalien bekannt^[32]. Ihre Erklärung durch vererbte Punktmutationen und – im Falle von Deletionen – nicht-homologes Kreuzen (crossing over) der DNA (Austausch von Bruchstücken) ist allgemein akzeptiert, wenn auch noch keiner direkten Untersuchung zugänglich. Von 2217 möglichen Ein-Punkt-Mutationen^[25] ist damit bereits nach wenigen systematischen Untersuchungen ein signifikanter Teil beschrieben worden. Man kann erwarten, daß die anderen Mutationen – soweit überhaupt mit dem Leben vereinbar – ebenfalls im Laufe der Zeit gefunden werden. Aus diesen Untersuchungen wurde errechnet, daß im Durchschnitt jeder 600. Mensch Träger eines

Tabelle 2. Einige anomale Hämoglobine (s. auch Abschnitt 3.3).

Name	Position	Austausch
Freiburg	β B5(23)	Val → 0
E	β B8(26)	Glu → Lys
Genf	β B10(28)	Leu → Cys
Philly	β C1(35)	Tyr → Phe
Hammersmith	β CD1(42)	Phe → Ser
Turin	α CD1(43)	Phe → Val
M Boston	α E7(58)	His → Tyr
M Saskatoon	β E7(63)	His → Tyr
Zürich	β E7(63)	His → Arg
M Milwaukee	β E11(67)	Val → Glu
Sydney	β E11(67)	Val → Ala
M Iwate	α F8(87)	His → Tyr
M Hyde Park	β F8(92)	His → Tyr
J Cape Town	α Fb4(92)	Arg → Glu
Chesapeake	α Fb4(92)	Arg → Leu
Gun Hill	β F7-FG4(91-97)	darin 5 Reste → 0 Lys, His, Asp, Cys, Leu deletiert
Köln	β FG5(98)	Val → Met
Kansas	β G4(102)	Asn → Thr
Hiroshima	β H21(143)	His → Asp
Rainier	β HC2(145)	Tyr → His

anormalen Hämoglobins ist. Tabelle 2 gibt einige Beispiele wieder, die besonders zum Verständnis der Funktion des Moleküls beitragen (s. auch Abschnitt 3.3). Betrachtet man die gesamte Liste dieser Veränderungen, so fällt auf, daß die ausgetauschten Reste sich meist durch ihre Ladung unterscheiden. Dies ist in der Untersuchungsmethode – der Elektrophorese – begründet; der Austausch neutraler Reste ist nur schwer zu entdecken. Neben dem Austausch wurden Deletionen eines oder mehrerer Aminosäurereste wie in den Hämoglobinen Freiburg und Gun Hill, ferner eine Hybridisierung der β - und δ -Ketten^[13] im Hämoglobin Lepore beschrieben.

3. Raumstrukturen und Funktion

3.1. Die Tertiärstruktur

Die Kenntnis der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Hämoglobins und anderer Proteine verdanken wir in erster Linie der Röntgen-Analyse.

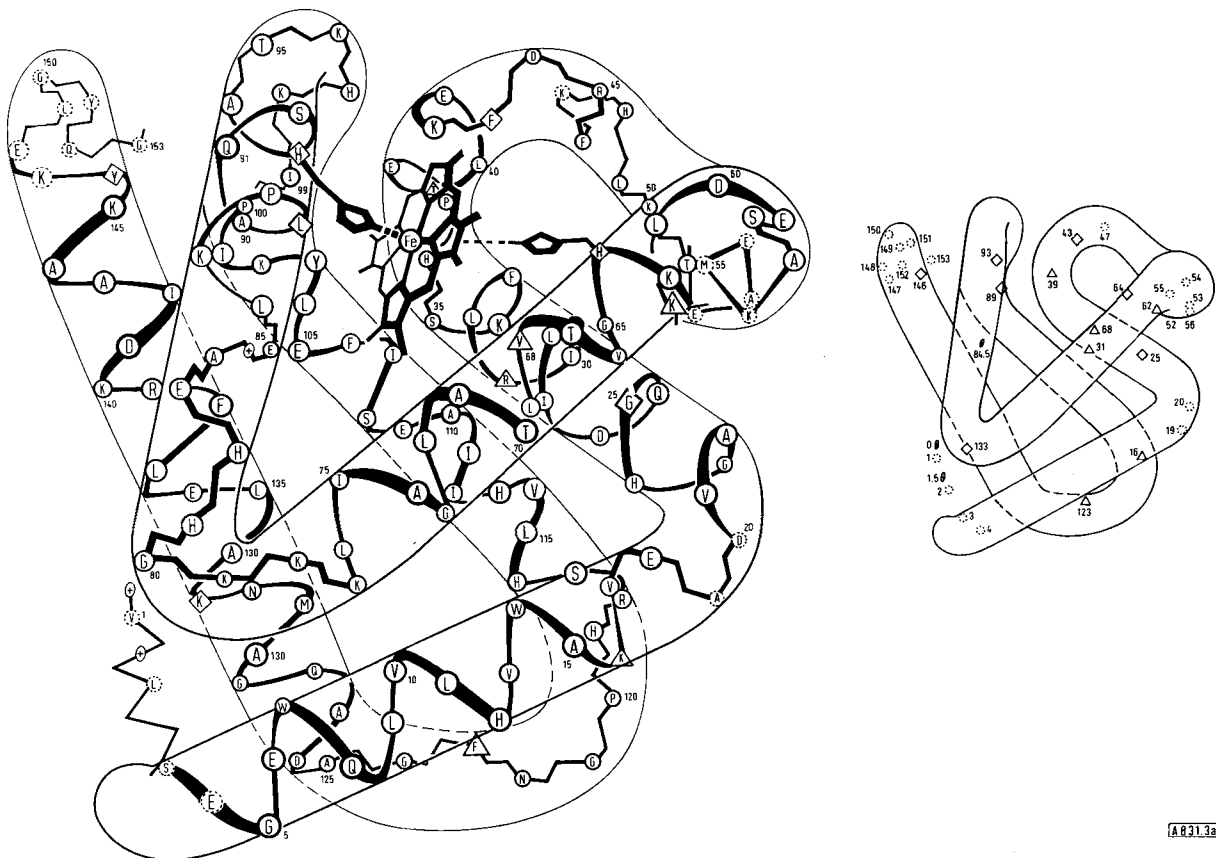


Abb. 3a. Konformationsschema des Pottwal-Myoglobins (nach Dickerson aus Dayhoff et al. [19]). Die Aminosäuren sind mit ihren Ein-Buchstaben-Symbolen eingetragen. In der Nebenzzeichnung bedeuten Δ : invariante Reste in Wirbeltier-Globinen außer dem von *Lampetra fluviatilis*; \circ : Reste, die in einigen Wirbeltier-Globinen deletiert sind; \diamond : invariant in allen Wirbeltier-Globinen; \oplus : Insertionen.

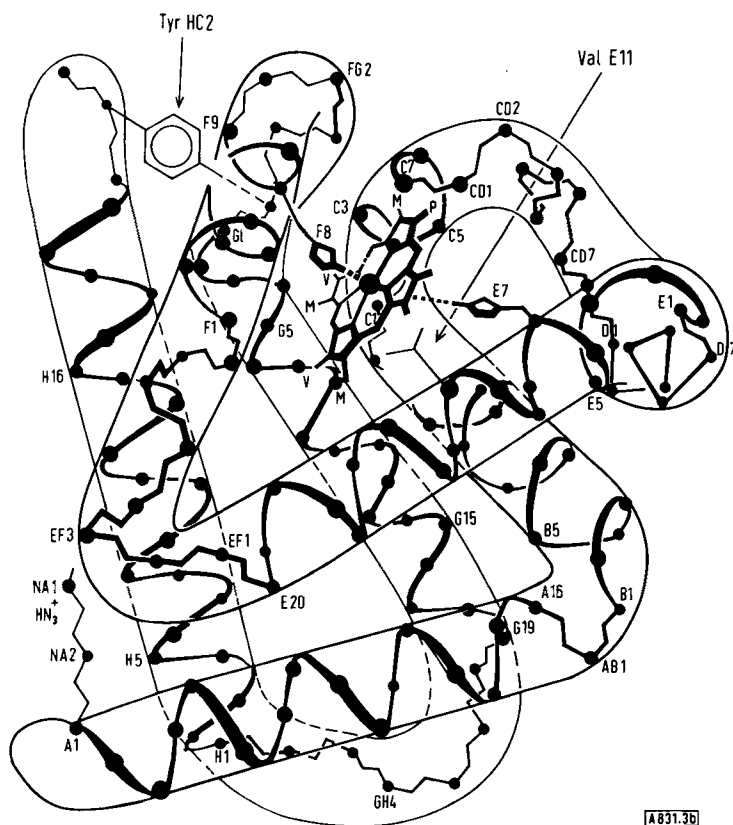


Abb. 3b. Konformationsschema der β -Kette des Hb A; eingezeichnet sind helicale Positionen und die Lage des Tyr HC2 (nach Perutz [64]).

Die Aufklärung der Konformation des Pottwal-Myoglobins^[5] hatte den räumlichen Aufbau dieses Moleküls gezeigt: Das globuläre Protein hat zu mehr als 70% helicale Struktur, die sich in acht Bereiche (A, B...H) gliedert (Sekundärstruktur); die Kette ist in charakteristischer Weise um das Häm gefaltet (Abb. 3a). Der Kontakt zum Häm wird durch ein Stickstoff-Atom der Imidazolseitenkette des His F8 (5. Koordinationsstelle des Häm- Fe^{2+}), durch Wasserstoffbrücken des Proteins zu den Propionssäureresten des Häms und vor allem durch van-der-Waals-Kräfte (hydrophobe Wechselwirkungen) mit den nach innen gewandten lipophilen Aminosäureresten des Proteins hergestellt. Der dichtgepackte hydrophobe Kern wird vom umgebenden Wasser durch hydrophile Seitenketten abgeschirmt und in Lösung gehalten. Die 6. Koordinationsstelle des Fe^{2+} ist im oxygenierten Zustand mit O_2 besetzt (HbO_2), im desoxygenierten Zustand frei (Hb). Wird Häm-Eisen oxidiert (Fe^{3+}), so ist das Molekül nicht mehr funktionsfähig; die 6. Koordinationsstelle ist jetzt mit Wasser besetzt, das eine Wasserstoffbrücke zum Histidin E7 ausbildet.

Eine dem Myoglobin ähnliche Tertiärstruktur haben auch die Untereinheiten des Hämoglobins (α, β -Ketten) (Abb. 3b)^[6], das *Chironomus*-Hämoglobin sowie die Hämoglobine von *Glycera dibranchiata* und *Petromyzon marinus*^[34] – also alle bisher röntgenographisch untersuchten Hämoglobine oder deren Untereinheiten. Im einzelnen

zeigen sich geringe Abweichungen, wie sie zum Teil schon aus der Betrachtung der homologen Primärstrukturen abzuleiten sind: Die α -Kette kann aufgrund ihrer Deletionen D2–6 keine D-Helix ausbilden, und sowohl α - als auch β -Typ sind C-terminal gegenüber dem Myoglobin verkürzt. Das Insekten-Hämoglobin zeigt weitere Verkürzungen; so fehlt eine Windung der Helix B. Dies hat zur Folge, daß die A-Helix über Phe A12 näher an das Zentrum des Moleküls geknickt ist. CD-Messungen zeigen, wie die Verkleinerung des Restes A12 Trp→Phe diese Korrektur erleichtert^[35]. Die Helix H ist durch eine Deletion „aufgeweicht“ und geknickt, das C-terminale Ende zeigt entsprechend dem Fehlen des Tyr H22 (\cong HC2 der α, β -Ketten) eine andere Konstruktion mit Met^[33].

Die hier gefundenen Änderungen sind am ausgeprägtesten unter allen Hämoglobin-Tertiärstrukturen. Aber obwohl dieses Molekül in der Primärstruktur kaum noch Ähnlichkeiten mit dem Hämoglobin oder Myoglobin der Säugetiere hat, ist – unbeschadet eines phylogenetischen Abstandes von mehr als 10^9 Jahren – die Konstruktion eines reversibel O_2 -bindenden Proteids dieselbe geblieben. Dies gilt besonders für die allgemeine Anordnung der apolaren Häm-Kontakte, z.B. des Phenylalanins CD1, und für die proximale Bindungsstelle des Häm-Eisens His F8. Das distale Histidin E7 scheint eine Entwicklung der Vertebraten zu sein, deren Bedeutung aber nicht mehr klar ist, nachdem man die Struktur des Insekten-Hämoglobins kennt. Räumlich ist die 6. Koordinationsstelle des Fe^{2+} hier etwas leichter zugänglich, was die veränderte Kinetik der Ligandenbindung und Autoxidation erklärt^[36]. Einzelheiten der Röntgen-Strukturen von *Glycera*- und *Petromyzon*-Hämoglobin stehen noch aus.

Eine interessante Ergänzung der eben genannten Untersuchungen ist die Neutronenbeugungsanalyse des Pottwal-Myoglobins, das aus einer ammoniumsulfathaltigen D_2O -Lösung kristallisiert wurde^[38]. Das Ergebnis stimmt bis auf die Lage einiger Aminosäureseitenketten gut mit den Befunden der Röntgen-Analyse überein.

3.2. Quartärstruktur und Funktion

Erforderte bereits die Untersuchung der monomeren Hämoglobine einen großen methodischen Aufwand, so mußte dieser bei der schwierigen Untersuchung der Quartärstruktur, also der nichtkovalenten Bindungen (hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbeziehungen und Wasserstoffbrücken) der Untereinheiten zur tetrameren Funktionseinheit der Wirbeltier-Hämoglobine, noch übertraffen werden. Eine solche regulative Organisation ist bei vielen Enzymen zu finden, und die Möglichkeit, sie am Beispiel des Hämoglobins zu studieren, hat diesem den Namen eines „Enzyms ehrenhalber“ eingebracht.

Die Assoziation der vier Untereinheiten des Wirbeltier-Hämoglobins kann leicht beeinflußt werden. Meistens können Experimente am Hämoglobin nicht in einer Konzentration durchgeführt werden, die der in den Erythrocyten entspricht. Ja, vielfach muß unter Bedingungen gearbeitet werden, bei denen das Hämoglobin bereits weitgehend in Dimere oder Monomere gespalten ist. Die genaue Berücksichtigung dieses Sachverhaltes ist schwierig,

da das Dissoziationsverhalten des Hämoglobins bis heute nicht eindeutig geklärt ist.

Die Dissoziation ist symmetrisch, d.h. aus Hämoglobin mit zwei α - und zwei β -Ketten entstehen zwei Untereinheiten mit je einer α - und einer β -Kette. Zu berücksichtigen ist, daß dabei prinzipiell $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_2$ - oder $\alpha_1\beta_2$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Dimere^[*] entstehen könnten (s. Abb. 4). Am

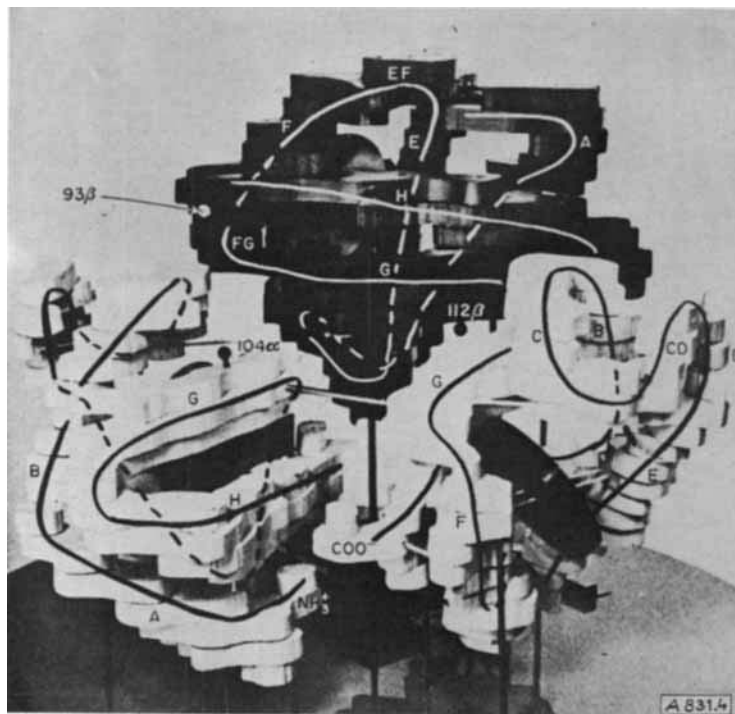


Abb. 4. Aufbau des Hämoglobins nach der 5,5-Å-Röntgen-Struktur (aus Muirhead et al. [37]). Zur besseren Übersicht wurden die Untereinheiten auseinandergerückt, der Verlauf der Peptidkette eingezeichnet und eine β -Kette im Vordergrund des Bildes entfernt.

$\alpha_1\beta_1$ -($\alpha_2\beta_2$)-Kontakt sind 34 Aminosäuren mit etwa 110 hydrophoben Bindungen (Distanz hydrophober Gruppen $< 4 \text{ Å}$), am $\alpha_1\beta_2$ -($\alpha_2\beta_1$)-Kontakt 19 Aminosäuren (80 Atomkontakte) beteiligt^[37]. Wahrscheinlich findet die Dissoziation in Dimere am $\alpha_1\beta_2$ -Kontakt statt, führt also zu $\alpha_1\beta_1$ -($\alpha_2\beta_2$)-Dimeren^[39, 43]. Neue Arbeiten an Hybrid-Hämoglobinen mit der isoelektrischen Fokussierung zeigen weiter, daß diese symmetrische Aufspaltung sowohl am ligandenfreien Hämoglobin als auch im ligandenträgenden (HbO_2 , $HbCO$, $HbFe^{3+}CN^-$ u.a.) in gleicher Weise erfolgt^[40].

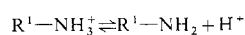
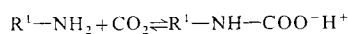
Ein $\alpha_1\beta_2$ -Dimeres sollte zwei Liganden nicht unabhängig binden^[41], da der Kontakt, der die Wechselwirkung der beiden Bindungsorte vermittelt, erhalten bleibt^[42]. Versucht man die vorliegenden Ergebnisse am Hb A zusammenzufassen, so ergibt sich folgendes: HbO_2 (oder Hämoglobin mit anderen Liganden) dissoziiert in Lösungen mit hohen Salzkonzentrationen (1.0 bis 2.0 mol/l NaCl), in sauren ($pH < 4.7$) und in alkalischen Lösungen ($pH > 9.0$) in Dimere und wahrscheinlich zum Teil in Monomere. Ligandenfreies Hämoglobin dissoziiert weit weniger^[44–46]. Eine vollständige Dissoziation in Monomere ist schwer zu erreichen, gelingt aber, wenn die SH-

[*] Die Indices 1 und 2 dienen hier ausnahmsweise zur Unterscheidung der beiden α - oder β -Ketten.

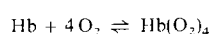
Gruppen mit *p*-Chlorquecksilberbenzoat (pMB) blockiert werden. Von dieser Technik der Isolierung nativer Untereinheiten des Hb A über die pMB-Derivate^[47] erwartete man Aufschluß über Unterschiede in der Funktion der α - und β -Ketten. Obwohl zahlreiche Untersuchungen vieler Arbeitsgruppen mit Methoden wie Ultrazentrifugation, Membran-Osmometrie, Gelfiltration u. a. vorliegen, sind diese Ergebnisse insgesamt noch unbefriedigend. Dies mag auch an der Schwierigkeit liegen, vergleichbare Präparate herzustellen.

Durch die physikalisch-chemischen Untersuchungen am Hämoglobin soll vor allem das Problem der regulierten Sauerstoff-Bindung geklärt werden. Zur Bindung der vier Liganden (4 O₂, 4 CO usw.) am Häm müssen alle vier Bindungsorte zusammenwirken (homotrope Wechselwirkung). Dieser Vorgang wurde ungenau auch als Häm-Häm-Wechselwirkung bezeichnet. Die kleinste Entfernung zweier Häm-Eisenatome (α_1 – β_2) beträgt aber 25 Å, so daß eine direkte Wechselwirkung zwischen ihnen nicht möglich ist; diese wird vielmehr durch Konformationsänderungen des Proteins vermittelt (Allosterie). Ausgehend von der hyperbolen Sauerstoff-Bindungskurve des Myoglobins und dem sigmoiden Verlauf dieser Kurve beim Hämoglobin^[48] (s. auch Abb. 7) gilt es, nicht nur die Art der reversiblen Bindung des O₂-Moleküls an die 6. Koordinationsstelle des Häm-Eisens zu beschreiben, sondern auch das Zusammenwirken der Untereinheiten im Hämoglobin (kooperative O₂-Bindung) – für das die sigmoide Bindungskurve charakteristisch ist – zu verstehen. Darüber hinaus sollten sich der Bohr-Effekt (Protonenabgabe bei Sauerstoff-Bindung) und die Herabsetzung der Sauerstoff-Affinität durch die stöchiometrische Bindung von Polyphosphaten, besonders der in den Erythrocyten in hoher Konzentration vorhandenen 2,3-Diphosphoglycerinsäure (2,3-DPG)^[49], erklären lassen.

Der Rücktransport des Stoffwechsel-Endprodukts CO₂ in den Erythrocyten wird ebenfalls zu etwa 60% vom Hämoglobin übernommen; das Kohlendioxid reagiert dabei mit den N-terminalen NH₂-Gruppen zum Carbamat^[50].



Sowohl bei der CO₂-Bindung als auch bei der O₂-Aufnahme werden Protonen abgegeben. Die Reaktion mit H⁺, 2,3-DPG oder anderen (Poly)-Phosphaten und wahrscheinlich auch CO₂ hängt demnach von der O₂-Bindung ab. Hier vermittelt das Protein zwischen verschiedenen Bindungsorten (heterotrope Wechselwirkung). Diese Stoffe kann man auch als allosterische Effektoren bezeichnen. Sie haben alle Affinität zum ligandenfreien Hämoglobin. Myoglobin verhält sich anders, und die Insekten-Hämoglobine nehmen eine Zwischenstellung ein. Empirisch wird die Reaktion



durch die Hill-Gleichung beschrieben,

$$Y = Kp^n / (1 + Kp^n)$$

in der Y die prozentuale Sauerstoff-Sättigung des Hb und p den O₂-Partialdruck darstellen.

Der Hill-Koeffizient *n* beträgt für Myoglobin und für isolierte α - und β -Ketten 1^[51], kann theoretisch bei vollständiger Kooperativität der vier Bindungsorte 4 werden und hat beim menschlichen Hämoglobin den Wert 2.8.

Eine Untersuchung der Kinetik der Ligandenbindung erfordert theoretisch bereits die Bestimmung von acht Geschwindigkeitskonstanten^[52] aus einem Reaktionsablauf, wenn ein einfaches Schema zugrunde gelegt wird, das nur die Bindung von vier Liganden an vier Bindungsorte in Betracht zieht. Das ist zur Zeit nicht möglich. Im wesentlichen wurden zwei vereinfachende kinetische Modelle entwickelt, um die kooperative Bindung zu beschreiben^[53, 54]. Sowohl der „konzertierte“ Reaktionsablauf, der die Umwandlung der Quartärstruktur als „Alles-oder-Nichts-Reaktion“ beschreibt, als auch der sequentielle, bei dem die veränderte Quartärstruktur aus einer Folge von abhängigen Konformationsänderungen der Untereinheiten („induced fit“) resultiert, entsprechen aber nur zum Teil den bisher vorliegenden Ergebnissen. Durch kinetische Untersuchungen mit Temperatur- und Feldsprungmethoden gelingt die Auflösung des komplexen Vorgangs in einige Relaxationsglieder, die der O₂-Bindung sowie inter- und intramolekularen Konformationsänderungen zugeordnet werden^[55].

Einen bedeutenden methodischen Beitrag zu diesem Problem lieferten Gibson und Parkhurst^[56]. Sie machten sich die Eigenschaft des HbCO zunutze, unter Belichtung kurzfristig in Hb und CO zu dissoziieren. Dann ist das Hb-Molekül – oder sind einige Untereinheiten – ligandenfrei, aber noch in der gleichen Konformation wie im HbCO. Mit solchen Untersuchungen gelingt eine Differenzierung der Ligandenbindung: Dissoziation und Bindung der ersten drei Liganden sind die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der homotropen Wechselwirkung.

ORD- und CD-Untersuchungen^[57] zeigen klar, daß sowohl die O₂-Bindung als auch die Assoziation der Untereinheiten von Konformationsänderungen des Moleküls begleitet werden^[58]. Insgesamt haben α - und β -Ketten andere Eigenschaften als Hämoglobin. pH-abhängige Konformationsänderungen wurden auch bei monomeren und dimeren Insekten-Hämoglobinen beobachtet^[59]. Desoxygeniertes Hämoglobin ist zum Unterschied von allen anderen Formen mit zwei- oder dreiwertigem Eisen (in denen Wasser oder andere Liganden wie CN[–] gebunden sind) ligandenfrei. Magnetochemische Methoden und die ESR-Spektroskopie sind geeignet, um den Bindungszustand am Häm-Eisen zu charakterisieren^[60]. Die Einführung von Spin-Markierungen an bestimmten Bindungsstellen des Globins, z. B. am Cys(93) β , erlaubt aber auch, Konformationsänderungen in den Untereinheiten bei O₂-Bindung zu beobachten^[61].

Röntgenographische^[62] und mößbauer-spektrometrische Untersuchungen^[63] entschieden die Frage der Bindung eines O₂-Moleküls am Fe²⁺ zugunsten der Modelle von Pauling: Das Sauerstoff-Molekül bildet gegen die Häm-Scheibe einen Winkel von 120°. Untersuchungen an ligandenfreien und ligandentragenden Formen des Eisen-Komplexes und an Modells-substanzen lassen vermuten,

daß im Desoxyhämoglobin das zentrale Eisen-Atom etwa 0.8\AA in Richtung F8 aus der Ebene der Häm-Scheibe herausgetreten ist^[64]. In der Oxy-Form befindet es sich in der Häm-Ebene. Monomeres Desoxy-Hb und HbCO von *Chironomus* zeigen nur eine Bewegung des Fe^{2+} von 0.2\AA relativ zum Häm^[65].

Entscheidende Beiträge zur Aufklärung der Allosterie auf molekularer Ebene, des Bohr-Effektes und der Wirkung von 2,3-DPG kamen bisher aus der Röntgen-Strukturanalyse. Die 1967 von Perutz et al. veröffentlichte vergleichende 5.5-\AA -Auflösung des Pferde-Oxyhämoglobins und des menschlichen Desoxyhämoglobins hatte ergeben, daß die Oxygenierung des Moleküls zu einer Umorientierung der Untereinheiten führt, derart, daß sich der Abstand der Fe-Atome der Häm-Gruppen $\beta_1\beta_2$ um fast 7\AA ändert, wobei die Kontakte an $\alpha_1\text{--}\beta_2$ sowie $\beta_1\text{--}\alpha_2$ in eine andere sterische Orientierung übergehen^[37]. Obwohl es logisch

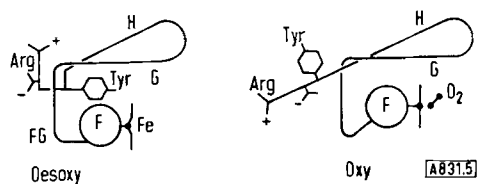


Abb. 5. Schema der Strukturänderung einer Untereinheit des Hämoglobins bei O_2 -Aufnahme (nach Perutz [64]).

gefordert werden mußte, hatten sich bei der 5.5-\AA -Auflösung noch keine Veränderungen der Tertiärstruktur gezeigt. Erst bei 2.8-\AA -Auflösung ergaben sich Details, mit denen der sterische Verlauf der Konformationsumwandlung beschrieben werden konnte^[64]. Aus energetischen

Aufnahme vollzieht. Die Bewegung teilt sich dem proximalen His F8 mit. Dadurch wird die F-Helix in das Innere des Moleküls gezogen und nähert sich der Helix H (Abb. 5).

Wesentlich für die nun folgende Konformationsänderung der Untereinheiten ist das bei allen Wirbeltieren invariante Tyrosin HC2: Im Desoxyhämoglobin bildet die Seitenkette dieser Aminosäure eine Wasserstoffbrücke zum Amid-Stickstoff des Val FG5, und der hydrophobe Ring des Tyr ist apolar von Helix H und F eingeschlossen. Diese Verankerung des C-terminalen Teils der H-Helix wird durch die Annäherung der Helix F unmöglich gemacht; Tyr wird aus seiner Position herausgedrängt, der C-terminale Teil der Helix H wird frei, und die von den C-terminalen Resten der α - und β -Ketten ausgehenden Salzbrücken öffnen sich. Gesprengt werden die Bindungen der α -Carboxygruppen von Arg HC3(141) α_1 zur Aminogruppe von Val NA1(1) α_2 sowie des Guanidinium-Ions desselben Arginins zur β -Carboxygruppe der Asparaginsäure in H9(126) α_2 ; die Verknüpfung zwischen α -Carboxygruppe des His HC3(146) β_1 und ϵ -Aminogruppe des Lys C5(40) α_2 sowie die Salzbrücke des Imidazoliumkerns von His HC3 zur β -Carboxygruppe Asp FG1(94) β_1 werden gelöst. Auch die Ionenbeziehung, die 2,3-DPG in der hydrophilen Zentralhöhle des tetrameren Hämoglobin-Moleküls zu Seitenketten der β -Ketten ausbildet - es sind dies Val NA1(1), Lys EF6(82), His H21(143) - werden beim Übergang zum oxygenierten Hämoglobin instabil.

Ein Beweis für die Annahme, daß die C-terminalen Aminosäuren der α - und β -Ketten und die Bindung der 2,3-DPG für die Konformation des Hämoglobins und damit für die Sauerstoff-Bindung von Bedeutung sind, kann in der Tatsache gesehen werden, daß die Abspaltung des Histi-

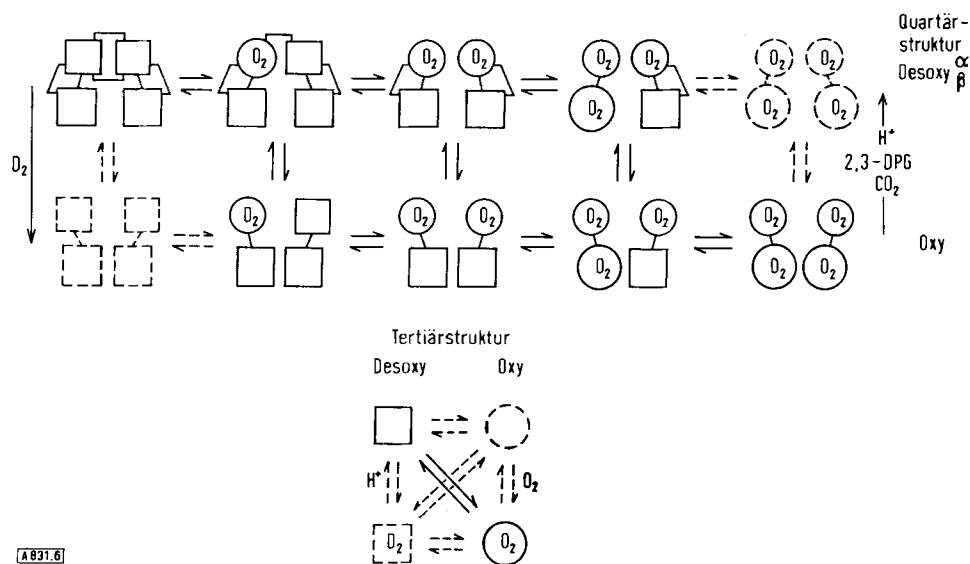


Abb. 6. Schema der Konformationsänderung des Hämoglobins beim Übergang zum HbO_2 ; Quartärstruktur und Tertiärstruktur (nach Perutz [64]).

Gründen - die gesamte Änderung der freien Energie ΔG° des Hämoglobins bei Sauerstoff-Aufnahme beträgt $10\text{--}12\text{ kcal/mol}$ - spielt hierbei die Lösung intramolekularer Salzbrücken eine große Rolle.

Der Auslöser ist die Bewegung des zentralen Eisen-Atoms in die Ebene des Häm-Rings hinein, die sich bei Sauerstoff-

dins und des Arginins den Hill-Koeffizienten auf $n \approx 1$ herabsetzt und daß die Entfernung der 2,3-DPG die Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins erhöht. Die Entfernung des C-terminalen Histidins der β -Ketten bewirkt außerdem eine Herabsetzung des Bohr-Effekts um die Hälfte^[73]. Ähnlich wirkt sich eine Blockierung des N-terminalen Val NA1 aus^[50].

Die H^+ -Freisetzung geschieht durch die Annäherung des His HC3(146) β und wahrscheinlich auch des His H5(122) α an negative bzw. positive Gruppen im desoxygenierten bzw. oxygenierten Zustand. Der pK-Wert dieser Histidine und des Val NA 1 α wird so stark verändert, daß pro Häm-Ligand 0.7 Protonen vom Molekül abdissoziieren^[66].

Da rein sterisch eine Bindung an Häm-Eisen für den Liganden Sauerstoff im Falle der α -Ketten einfacher zustande kommen kann als im Fall der β -Ketten, mag man annehmen, daß zunächst eine Oxygenierung der beiden α -Ketten des Moleküls stattfindet. Dabei wandeln sich diese Untereinheiten jeweils in der eben beschriebenen Weise von der Konformation der desoxygenierten in die der oxygenierten Moleküle um. Die Konformationsumwandlung einiger Untereinheiten fördert die Bereitschaft des gesamten Moleküls, die Quartärstruktur zu ändern. Die sich nun anschließende Umorientierung der β -Ketten erleichtert die Zugänglichkeit ihrer Eisen-Atome für den Sauerstoff, und das gesamte Molekül wird jetzt, mit vier Molekülen Sauerstoff beladen, in Form des oxygenierten Hämoglobins vorliegen (Abb. 6). Auch dieser Reaktionsablauf enthält Elemente von beiden oben genannten Modellvorstellungen. Im einzelnen mag die Reaktion je nach Milieu unterschiedlich ablaufen; die sterischen Mechanismen sollten die gleichen bleiben. Ferner gibt es keine Anzeichen dafür, daß diese an Kristallen gewonnenen Daten nicht auch für das gelöste Protein gelten.

Aus der Tatsache, daß die Röntgen-Strukturanalyse bis in feine Details des molekularen Aufbaus einzudringen vermag und diese sich sogar hinsichtlich ihrer Bedeutung für dynamische Prozesse im Molekül interpretieren lassen, kann einerseits der fundamentale Wert dieser Methode auch für die Funktionsanalyse der Proteine abgeleitet werden; andererseits erhebt sich die Forderung nach anderen ergänzenden Methoden, die dynamische Parameter von Proteinen in Lösung direkt erfassen, die aber nicht bei einer globalen Betrachtung der Moleküle stehen bleiben, sondern ebenfalls bis in die atomaren Dimensionen vordringen können. Sehr vielversprechend sind die Ergebnisse, die in letzter Zeit mit der hochauflösenden kernmagnetischen Resonanzspektroskopie erzielt wurden: Es gelang, Signale einzelner Aminosäureseitenketten – besonders der funktionell wichtigen Histidine – zu identifizieren und erste Schritte einer eingehenden Analyse zu gehen. Auch hier erleichtert ein Vergleich zwischen Hämoglobinen mit unterschiedlicher Primärstruktur und in verschiedenen Bindungszuständen eine Interpretation der Ergebnisse^[67, 68].

3.3. Funktionsstörungen des Hämoglobins

Es ist ein faszinierendes Ziel, die Anomalien einiger Hämoglobine am röntgenographisch gewonnenen Modell verstehen zu lernen^[69]. Aus der Fülle des Materials können hier nur wenige Beispiele gegeben werden. Hierbei schälen sich einige allgemeine Ergebnisse heraus:

a) Der Austausch polarer Reste an der Oberfläche des Moleküls ist (bei Heterozygoten) meist nicht von klinischen Symptomen begleitet, z.B. bei Hb I. Toronto $\alpha A3(5)$ Ala \rightarrow Asp; Hb E Saskatoon $\beta B4(22)$ Glu \rightarrow Lys.

b) Unpolare Seitenketten im Inneren des Moleküls können kaum ohne Einbußen an Funktionsfähigkeit und Stabilität verändert werden; dies gilt besonders für die Umgebung des Häms (60 Atomkontakte): Hb Turin $\alpha CD1(43)$ Phe \rightarrow Val verliert zwei CH-Kontakte am Häm und ist instabil. Verschärft ist die Situation beim Hb Hammersmith $\beta CD1(42)$ Phe \rightarrow Ser, bei dem nicht nur die beiden hydrophoben Kontakte verlorengegangen sind, sondern zusätzlich eine polare Seitenkette eingeführt wird: Wasser tritt in die Häm-Tasche ein, und Häm wird abgespalten.

c) Austausch von Aminosäuren an den Kontakten der Untereinheiten und den N- und C-Termini beeinflussen die Funktion (Allosterie, Bohr-Effekt, O_2 -Affinität u.a.) und die Dissoziation in Untereinheiten. Veränderungen am $\alpha_1\beta_1$ -($\alpha_2\beta_2$ -)Kontakt, z.B. Hb E $\beta B8(26)$ Glu \rightarrow Lys, sind im allgemeinen ohne Einfluß auf die Wechselwirkung der Untereinheiten im Gegensatz zu Veränderungen am $\alpha_1\beta_2$ -($\alpha_2\beta_1$ -)Kontakt, z. B. Hb Chesapeake $\alpha FG4(92)$ Arg \rightarrow Leu mit herabgesetzter Wechselwirkung und erhöhter O_2 -Affinität. Dieses Hämoglobin hat aber noch einen Bohr-Effekt, der beim Hb Hiroshima $\beta H21(143)$ His \rightarrow Asp zusätzlich vermindert ist (Abb. 7).

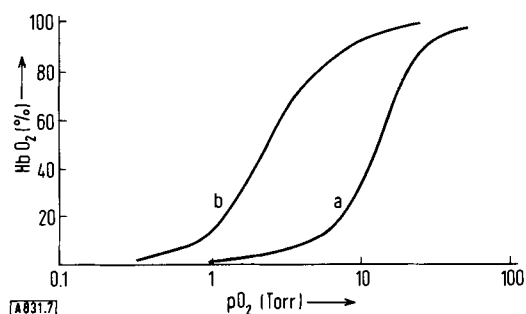


Abb. 7. O_2 -Bindungskurven des Hb A (a) und des Hb Hiroshima (b) bei pH = 7.4 in 0.1 mol/l Phosphatpuffer und 20°C (nach Imai [72]).

d) Eine besondere Gruppe bilden die Hb-M-Typen, bei denen die Eigenschaften des Bindungsortes so verändert sind, daß Häm-Eisen als Fe^{3+} vorliegt (Met-Hämoglobin) und kein O_2 bindet. Hb Milwaukee $\beta E11(67)$ Val \rightarrow Glu bildet eine Ionenbindung mit dem Eisen und stabilisiert es als Fe^{3+} . Der Austausch des distalen His E7 oder des proximalen His F8 gegen Tyr der α - oder β -Ketten hat in allen vier möglichen Fällen die Oxidation zu Fe^{3+} und damit den Verlust der O_2 -Bindungsfähigkeit zur Folge. Auch hier entstehen vermutlich Ionenbindungen zum Fe^{3+} . Im Hb Zürich $\beta F8(92)$ His \rightarrow Arg dagegen ist zwar ebenfalls das distale His substituiert, aber die Funktion ist nicht wesentlich gestört; es liegt kein Met-Hb vor. Arginin paßt nicht in die Häm-Tasche und ragt in die Lösung. Hier zeigt sich, daß die distale Seitenkette nicht unbedingt für eine reversible O_2 -Bindung erforderlich ist. Dies entspricht den Befunden am Insekten-Hämoglobin. Im einzelnen ist keineswegs jeder Austausch einer Aminosäure in seinen Auswirkungen auf molekularer Ebene durchschaubar, und eine genaue funktionelle Prüfung kann nur selten vorgenommen werden. Es wäre zweckmäßig, wenn diese Anomalien systematisch erfaßt würden und gegebenenfalls Blutkonserven ihrer Träger für medi-

zinische und wissenschaftliche Zwecke gesammelt würden. Auch hier könnten Arbeiten am roten Blutfarbstoff wegweisend sein für die Untersuchung molekularer Defekte an anderen Proteinen, die sicher in den kommenden Jahren gefunden werden. Eine kausale Therapie dieser krankhaften Veränderungen ist zur Zeit nicht möglich.

Eingegangen am 5. Mai 1971 [A 831]

- [1] Auskunft vom Deutschen Institut für medizinische Information und Dokumentation, Köln.
- [2] G. Sievers, persönliche Mitteilung.
- [3] H. Fischer u. K. Zeile, *Liebigs Ann. Chem.* **468**, 98 (1929).
- [4] E. Itagaki u. L. P. Hager, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 1013 (1968).
- [5] H. C. Watson u. I. C. Kendrew, *Nature* **190**, 670 (1961).
- [6] M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will u. A. T. C. North, *Nature* **185**, 416 (1960).
- [7] G. Braunitzer, G. Gehring-Müller, N. Hilschmann, K. Hilse, G. Hobom, V. Rudloff u. B. Wittmann-Liebold, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **325**, 283 (1961).
- [8] V. M. Ingram, *Biochem. Biophys. Acta* **28**, 539 (1958).
- [9] E. Antonini u. M. Brunori, *Annu. Rev. Biochem.* **39**, 977 (1970).
- [10] R. E. Lockard u. I. B. Lingrel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 204 (1969).
- [11] D. G. Laycock u. I. A. Hunt, *Nature* **221**, 1118 (1969).
- [12] H. Tichy, *Chromosoma* (Berlin) **29**, 131 (1970).
- [13] D. Labie, W. A. Schroeder u. T. H. J. Huisman, *Biochem. Biophys. Acta* **127**, 428 (1966).
- [14] I. L. Hill, C. M. Harris, I. F. Naylor u. W. M. Sanne, *J. Biol. Chem.* **244**, 2182 (1969).
- [15] J. Musil, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 1372 (1970).
- [16] W. A. Schroeder, J. R. Shelton, J. B. Shelton, J. Cormick u. R. T. Jones, *Biochemistry* **2**, 992 (1963).
- [17] R. T. Jones, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **29**, 297 (1964).
- [18] E. R. Huehns u. E. M. Shoter, *J. Med. Genetics* **2**, 48 (1964).
- [19] M. O. Dayhoff et al.: *Atlas of Protein Sequence and Structure*. McGregor & Werner, Silverspring, Md 20901 (USA) 1969.
- [20] G. Braunitzer u. H. Fujiki, *Naturwissenschaften* **56**, 322 (1969).
- [21] G. Buse, S. Braig u. G. Braunitzer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 1686 (1969).
- [22] G. Braunitzer, G. Buse u. S. Braig, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 1477 (1969).
- [23] H. Sick u. K. Gersonde, *European J. Biochem.* **7**, 273 (1969).
- [24] E. Zuckerkandl u. L. Pauling, *Acta Chem. Scand.* **17**, 9 (1963), Suppl.
- [25] I. C. King u. T. H. Jukes, *Science* **164**, 788 (1969).
- [26] R. C. Richmond, *Nature* **225**, 1025 (1970).
- [27] W. A. Schroeder, T. H. Huisman, J. R. Shelton, J. B. Shelton, E. F. Kleihauer, A. M. Dozy u. B. Robberson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **60**, 537 (1968).
- [28] K. Hilse u. R. A. Popp, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **61**, 930 (1968).
- [29] H. R. Adams, E. M. Boyd, J. B. Wilson, A. Miller u. T. H. J. Huisman, *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 398 (1968).
- [30] T. Edman u. G. Begg, *European J. Biochem.* **1**, 80 (1967).
- [31] H. Nakajima u. G. Braunitzer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 1 (1967).
- [32] H. Lehmann u. R. W. Carrell, *Brit. Med. Bull.* **25**, 14 (1969).
- [33] R. Huber, O. Epp u. H. Formanek, *Naturwissenschaften* **56**, 362 (1969).
- [34] E. A. Padlan u. W. E. Love, *Nature* **220**, 376 (1968).
- [35] A. Wollmer u. G. Buse, *FEBS-Letters*, im Druck.
- [36] W. Scheler u. J. Fischbach, *Acta Biol. Med. Germ.* **1**, 194 (1958).
- [37] H. Muirhead, J. M. Cox, L. Mazzarella u. M. F. Perutz, *J. Mol. Biol.* **28**, 117 (1967).
- [38] B. P. Schoenborn, *Abstracts 8th Intern. Congress of Biochem.* **3**, 1970.
- [39] S. J. Edelstein u. Q. H. Gibson in: *Symp. on Heme and Heme-Proteins*. Academic Press, New York 1969.
- [40] C. M. Park, *J. Biol. Chem.* **245**, 5390 (1970).
- [41] E. Antonini, M. Brunori, E. Chiancone u. J. Wyman in: *Symp. on Heme and Heme-Proteins*. Academic Press, New York 1969.
- [42] M. F. Perutz, J. Muirhead, J. M. Cox, L. C. G. Goaman, F. S. Malhenes, E. L. McGaudy u. L. E. Webb, *Nature* **219**, 29 I, 131 II, 1968.
- [43] M. A. Rosemeyer u. E. R. Huehns, *J. Mol. Biol.* **25**, 253 (1967).
- [44] E. Chiancone, L. M. Gilbert, G. A. Gilbert u. G. L. Kellett, *J. Biol. Chem.* **243**, 1213 (1968).
- [45] J. W. Goers u. V. N. Schumaker, *J. Mol. Biol.* **54**, 125 (1970).
- [46] S. J. Edelstein, M. J. Rehmer u. J. S. Olson, *J. Biol. Chem.* **245**, 4372 (1970).
- [47] E. Bucci u. C. Fronticelli, *J. Biol. Chem.* **240**, 551 (1965).
- [48] A. Rossi Fanelli, E. Antonini u. A. Caputo, *Advan. Protein Chem.* **19**, 73 (1969).
- [49] R. Benesch, R. E. Benesch u. Ch. I. Yu, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **59**, 526 (1968).
- [50] J. V. Kilmartin u. L. Rossi-Bernardi, *Nature* **222**, 1234 (1969).
- [51] M. Brunori, R. W. Noble, E. Antonini u. J. Wyman, *J. Biol. Chem.* **241**, 5238 (1966).
- [52] G. S. Adair u. M. E. Adair, *Proc. Roy. Soc. B* **120**, 422 (1936).
- [53] J. Monod, L. Wyman u. J. P. Changeaux, *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
- [54] D. E. Koshland, G. Nemethy u. D. Filmer, *Biochemistry* **5**, 365 (1966).
- [55] T. M. Schuster u. G. Ilgenfritz, *Nobel Symp.* **11**, 181. Almquist u. Wiksell Förlag AB, Stockholm 1969.
- [56] Q. H. Gibson u. L. J. Parkhurst, *J. Biol. Chem.* **243**, 5521 (1968).
- [57] M. Brunori, J. Engel u. T. M. Schuster, *J. Biol. Chem.* **242**, 773 (1967).
- [58] S. Beychok, J. Tyuma, R. E. Benesch u. R. Benesch, *J. Biol. Chem.* **242**, 2460 (1967).
- [59] K. Gersonde, H. Sick u. A. Wollmer, *European J. Biochem.* **15**, 237 (1970).
- [60] K. Gersonde, *J. Mol. Biol.* **42**, 285 (1969).
- [61] S. Ogawa, H. M. McConnell u. H. Horwitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **61**, 401 (1968).
- [62] H. C. Watson u. C. L. Nobs in: *19. Mosbacher Koll. Ges. Biol. Chem.* Springer, Berlin 1969.
- [63] H. Eicher u. A. Trautwein, *J. Chem. Phys.* **50**, 2540 (1969).
- [64] M. F. Perutz, *Nature* **228**, 726 (1970).
- [65] R. Huber, O. Epp u. H. Formanek, *J. Mol. Biol.* **52**, 349 (1970).
- [66] R. B. Gray, *J. Biol. Chem.* **245**, 2914 (1970).
- [67] R. G. Shulman, S. Ogawa, K. Wüthrich, T. Yamane, J. Peisach u. W. E. Blumberg, *Science* **165**, 251 (1969).
- [68] R. G. Shulman, K. Wüthrich, T. Yamane, D. J. Patel u. W. E. Blumberg, *J. Mol. Biol.* **53**, 143 (1970).
- [69] M. F. Perutz u. H. Lehmann, *Nature* **219**, 902 (1968).
- [70] S. Ohno: *Evolution by Gene Duplication*. Springer, Berlin 1970.
- [71] K. Hilse u. G. Braunitzer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **349**, 433 (1968).
- [72] K. Imai, *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 543 (1968).
- [73] J. V. Kilmartin u. J. Wootton, *Nature* **228**, 760 (1970).
- [74] G. Braunitzer, *Naturwissenschaften* **54**, 407 (1967).