

ANGEWANDTE CHEMIE

84. Jahrgang 1972

Heft 14

Seite 649–688

Genetische Aspekte zur Hämoglobinsynthese

Von Berthold Schmidt^[*]

Herrn Professor Fritz Straßmann zum 70. Geburtstag gewidmet

Der Blutsfarbstoff Hämoglobin (Hb) liegt in den roten Blutzellen in hoher Konzentration vor. Er eignet sich daher besonders gut für die Erforschung genetisch bedingter Änderungen an Proteinmolekülen. Im Gegensatz zum monomeren Myoglobin (Mb) des Muskels ist der Blutsfarbstoff tetramer. Es gibt verschiedene Untereinheiten, die zu Hb-Typen unterschiedlicher Eigenschaften zusammentreten können. Wahrscheinlich stammt die Information für alle Hämproteide von einem Urgen ab. Dubletten dieses Urgens haben sich unterschiedlich entwickelt und codieren heute verschiedene Proteinindividuen. Am Hb-Molekül lässt sich feststellen, welche Folgen eine Mutation für Konformation und Funktion eines Proteinmoleküls haben kann.

1. Einleitung

Das Hämoglobin (Molekulargewicht 64 500) ist ein Chromoproteid (mit Häm als prosthetischer Gruppe), das in einer Gesamtmenge von knapp 1 kg im menschlichen Organismus den O₂-Transport zwischen Lunge und atmendem Gewebe und größtenteils den CO₂-Transport in umgekehrter Richtung besorgt. In reversibler Bindung tritt O₂ an das Häm-Eisen (Fe²⁺-Protoporphyrin) heran, ohne daß im Schutz der koordinativen Fe—N(Histidin)-Bindung das Eisen oxidiert wird (Abb. 1).

Das Hämoglobin (Hb) repräsentiert mit 2.8×10^8 Molekülen in einer roten Blutzelle (Erythrocyt) etwa 95% der Eiweißtrockensubstanz dieser Zelle. Daher kann Hämoglobin ohne vorgeschaltete Reinigungsschritte, die immer mit einer Teildenaturierung verbunden sind, auf genetisch bedingte Mikroheterogenitäten oder Abnormalitäten, die mit klinischen Symptomen einhergehen können, untersucht werden. Elektrophoretisch kann man Hämoglobintypen

durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten unterscheiden. Mit Hilfe des finger-print-Verfahrens lassen sich Sequenzunterschiede in einzelnen Peptidketten feststellen,

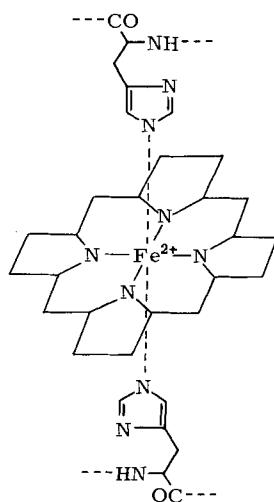


Abb. 1. Bindung des Häm-Eisens im Hämoglobin. Die Koordinationszahl 6 wird durch vier Pyrrol-N und zwei Imidazol-N von Histidin-Resten der Globinkette als Liganden erreicht.

[*] Prof. Dr. Dr. B. Schmidt
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität
65 Mainz, Postfach 3980

wenn man nach einem tryptischen Abbau das Hydrolysat zweidimensional chromatographisch und elektrophoretisch entwickelt. Die genaueste Unterscheidung ist durch eine vergleichende Brutto- oder Sequenzanalyse der Aminosäurezusammensetzung der Peptidketten möglich.

Außerdem lassen sich durch eine vergleichende biochemische Paläogenetik evolutionäre Zusammenhänge aufzeigen: Man kann praktisch nie aus fossilem Material Eiweißspuren isolieren. An „lebenden Fossilien“ lassen sich jedoch Proteine untersuchen und durch Vergleich der Aminosäuresequenz mit neuzeitlichen homologen, d. h. funktionsgleichen Proteinen in Beziehung setzen.

Die von der Natur angestellten genetischen „Experimente“, die für den Menschen je nach Erbgang zu pathologischen Erscheinungen (Hämoglobinopathien) unterschiedlichen Ausmaßes führen, erzeugen beim Hämoglobin-Molekül Veränderungen in Synthesegeschwindigkeit^[1] und Aminosäuresequenz^[2]. Dadurch sind Rückschlüsse möglich, welche Bedeutung einzelnen Aminosäuren für Konforma-

tion, Quartärstruktur und für die funktionelle Beeinflussung des erythrocyten-gebundenen Hb zukommt.

Im Erythrocyten des Erwachsenen findet man neben der Hauptkomponente Hämoglobin A₁ noch 1.5 bis 4% Hämoglobin A₂ (A = adult). Jeder Hämoglobin-Typ hat eine ausgeprägte Quartärstruktur und stellt ein Tetramer dar. Der dreidimensionale Bau wurde von Perutz^[3-8] am Pferdehämoglobin aufgeklärt. Das kugelige Molekül (64 × 55 × 50 Å³) besteht aus vier paarweise gleichen Peptidketten. Diese Globinuntereinheiten enthalten jeweils ein Häm und bilden durch nicht-kovalente Bindungen (schwache Wechselwirkungen) das Tetramere^[3, 5, 7]. HbA₁ besteht aus zwei α- und zwei β-Ketten: α₂β₂. Die Begleitkomponente HbA₂ ist durch α₂δ₂ zu beschreiben. Während der Embryonalentwicklung dominiert ein HbF: α₂γ₂ (F = fetal), dem ein α₂ε₂-Typ (im ersten Drittel) vorausgeht. Beginnend mit dem letzten Drittel der Embryogenese bis zum Ende des ersten Lebensjahres wird HbF allmählich durch HbA₁ ersetzt (Abb. 2).

Tabelle 1. Abnormitäten im Hb-Aufbau [2].

Nr.	Name [a]	Aminosäure-Wechsel [b]	auftretende Störung
1	Hb Sabine	β ⁹¹ (F 7) Leu → Pro	Konformationsstörung der Globinuntereinheit
2	Hb Santa Ana	β ⁸⁸ (F 4) Leu → Pro	
3	Hb Genova	β ²⁸ (B 10) Leu → Pro	
4	Hb Leiden	β ⁶ oder ⁷ (A 3) Glu-Ausfall	
5	Hb Freiburg	β ²³ (B 5) Val-Ausfall	
6	Hb Borås	β ⁸⁸ (F 4) Leu → Arg	
7	Hb Sydney	β ⁶⁷ (E 11) Val → Ala	
8	Hb Köln	β ⁹⁸ (FG 5) Val → Met	
9	Hb Toulouse	β ⁶⁶ (E 10) Lys → Glu	Ladungsumkehrung, Störung des α ¹ β ¹ -Kontakts
10	Hb Philly	β ³⁵ (C 1) Tyr → Phe	Verlust eines H-Donators (Wasserstoffbrücke)
11	Hb Rainier	β ¹⁴⁵ (HC 2) Tyr → His	Störung des α ¹ β ² -Kontaktes
12	Hb Yakima	β ⁹⁹ (G 1) Asp → His	
13	Hb Kansas	β ¹⁰² (G 4) Asn → Thr	
14	HbS	β ⁶ (A 3) Glu → Val	Polyaggregation
15	HbC	β ⁶ (A 3) Glu → Lys	
16	Hb Bristol	β ⁶⁷ (E 11) Val → Asp	β ⁶³ His HO ₂ C (Asp)
17	HbM Milwaukee	β ⁶⁷ (E 11) Val → Glu	Aufreten von Methämoglobin (HbM) oder Hämiglobin
18	HbM Iwate	α ⁸⁷ (F 8) His (prox.) → Tyr	
19	HbM Boston	α ⁵⁸ (E 7) His (dist.) → Tyr	
20	HbM Hyde Park	β ⁹² (F 8) His (prox.) → Tyr	
21	HbM Saskatoon	β ⁶³ (E 7) His (dist.) → Tyr	
22	Hb Zürich	β ⁶³ (E 7) His → Arg	Imidazol-N durch Guanidyl-N ersetzt: Gefahr einer medikamentösen Methämoglobinämie
23	Hb Hiroshima	β ¹⁴³ (H 21) His → Asp	für saure Effektoren fehlt basischer Angriffsort: festere O ₂ -Bindung

[a] Anomale Hämoglobine werden gewöhnlich mit einem Orts- oder Personennamen gekennzeichnet, der mit ihrem erstmaligen Nachweis in Zusammenhang steht.

[b] Eine Kennzeichnung der Art β⁹¹ besagt, daß es sich um die Aminosäureposition 91 der β-Kette handelt, während F7 die siebente Position des Helixabschnittes F kennzeichnet.

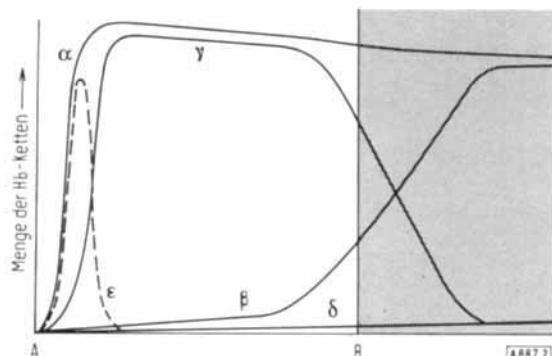


Abb. 2. Synthese der Hb-Untereinheiten während der Embryonalentwicklung (A-B) und nach der Geburt (B) [4].

Fehler im Aufbau des Hämoglobins machen sich meist durch Funktionsausfälle und klinische Symptome bemerkbar, die in wechselnder Ausprägung einzeln oder nebeneinander auftreten können (Tabelle 1).

Unbeständigkeit des Hb gegen Oxidation. Es entsteht aus Hämoglobin (Fe^{2+}), Hämiglobin oder Methämoglobin (Fe^{3+}), das nicht mehr in der Lage ist, Sauerstoff zu transportieren.

Erhöhte oder erniedrigte O_2 -Bindungskapazität. Es ist eine wesentliche Eigenschaft des Hb, daß ein O_2 -Transport möglich ist, d. h. O_2 -Aufnahme unter den Bedingungen des O_2 -Partialdruckes in der Lunge und O_2 -Abgabe an andere Hämoproteide (O_2 -Depot) im Gewebe. Durch Veränderung im Hb-Molekül kann sich die Festigkeit der O_2 -Bindung erhöhen (Tabelle 1, Nr. 11, 12), so daß am Bedarfsort keine O_2 -Abgabe möglich ist. Umgekehrt wird bei einer zu lockeren O_2 -Bindung (Tabelle 1, Nr. 13) nur ungenügend O_2 gebunden und transportiert.

Instabilität des Hb kann die mittlere Lebensdauer (120 Tage) des Erythrocyten als Hb-Träger erheblich verkürzen: hämolytische Anämie. Dabei findet eine vermehrte Ausschleusung unreifer Erythrocyten (=Reticulocyten) aus dem roten Knochenmark, dem Bildungsort der Hb-tragenden Blutzellen, statt. Außerdem tritt eine Gelbfärbung der Haut (Ikterus) durch die Gallenfarbstoffe auf, die beim erhöhten Hb-Abbau vermehrt anfallen.

2. Genetische Information

Man nimmt an^[9, 10], daß sich die Information für die heutigen Varianten der Hämoproteide, d. h. von Substanzen, die O_2 binden (Myoglobin) oder transportieren (α -, β -, γ -, δ -Untereinheiten des Hämoglobins) können, von einem phylogenetisch alten Gen herleitet. Aus Aminosäurevergleichen zwischen heute zugänglichen Hämoproteiden schließt man, daß dieses Urgen ein Protein mit 154 Aminosäuren (oder mehr) codiert haben könnte.

Die meisten Gene liegen in den Chromosomen einer Zelle in mehrfacher „Ausfertigung“ vor. Dadurch kann die Zelle einen Proteintyp mit Hilfe ihres Syntheseapparates schnell vermehren. Ursache dieser Vielfalt sind Genverdoppelungen, die sich im Lauf der Zeit gebildet haben.

Aus diesen Gendubletten können durch Mutationen, die einzelne Genloci getrennt treffen, veränderte Gene hervorgehen, die eine veränderte Information für die Proteinsynthese enthalten. Durch weiter fortschreitende Eigenständigkeit (Wanderung abgespaltener Genabschnitte, Verlust von Basentriplets) können Gene entstehen, die die Information für homologe Proteine anstelle identischer Individuen enthalten.

Das älteste Hämoproteid aus der homologen Mb/Hb-Gruppe ist das Myoglobin (Mb). Dieser „Muskelfarbstoff“ ist ein monomeres Hämoproteid. Seine Peptidkette besteht aus 153 Aminosäuren (Molekulargewicht 17000). Vom Mb des Pottwals wurde die Sequenz aufgeklärt^[11]. Die dreidimensionale Struktur wurde am Mb des Pferdes von Kendrew^[12, 13] ermittelt.

Vergleicht man die Aminosäuresequenz der Globinuntereinheiten des Hb mit der des Mb, so findet man an 120 ± 5 Positionen Unterschiede^[14]. Nur in rund 30 Positionen stimmen die Aminosäuren überein. Die Variation ± 5 ergibt sich, wenn man Pottwal-Mb mit den Untereinheiten aller bisher untersuchten Wirbeltier-Hb-Typen vergleicht. Sie besagt, daß sich Speciesunterschiede wie eine Fehlerbreite gegenüber der Aussage ausnehmen, daß sich die Mb-Kette von der Hb-Untereinheit in 120 Aminosäurepositionen unterscheidet.

Pauling^[15] hat versucht, aus diesen Aminosäure-Unterschieden zu berechnen, welche Zeiträume in der Evolution für solche Änderungen benötigt werden. Voraussetzung seiner Überlegungen ist folgende: Vergleicht man die Aminosäuresequenz der Globinuntereinheiten von Säuger-Hb (Pferd, Schwein, Rind, Kaninchen), so ergeben sich zwischen α - und β -Kette Unterschiede an 22 Positionen. Wenn sich jede Kette eigenständig entwickelt hat, so sind das 11 Änderungen/Kette. Geht man davon aus, daß die Entwicklung der höheren Säuger vor etwa 80 Millionen Jahren ihren Ursprung nahm, so ergibt sich für jede Mutation (d. h. für jede Änderung) ein Zeitraum von 7 Millionen Jahren. Für sehr weit zurückliegende Ereignisse empfiehlt es sich, mit der nächsthöheren Größenordnung zu rechnen, also mit 10 Millionen Jahren pro Aminosäuredifferenz.

Wendet man den 10^7 -Jahre-Wert auf die Myoglobin/Globin-Differenz an, so ergibt sich, daß die Mb/Hb-Aufspaltung $(120/2) \times 10^7 = 600 \pm 50$ Millionen Jahre zurückliegt. „Momentaufnahmen“ in dieser Entwicklung liefern Tierspecies, die sich seit ihrem ersten Auftreten nur wenig entwickelt haben. Die ältesten Hb-Formen lassen sich an solchen „lebenden Fossilien“ studieren. Aus Rundmäulern^[*] (Inger, Neunauge) sind monomere Hb-Typen mit 146 Aminosäuren isoliert worden^[16, 17].

Aus dem Urgenpool hat sich zunächst die Information für das Myoglobin (Mb) entwickelt, gekennzeichnet durch den Verlust eines Basentriplets, der bei späteren Gendubletten erhalten blieb. Die genetische Information für die Synthese alter Hämoproteide vom Hb-Typ zeigt die gleiche Deletion wie beim Mb, zusätzlich aber noch einen weiteren Verlust, der vielleicht durch eine Genverschiebung eingetreten ist: Die frühen monomeren Hb-Typen weisen gegenüber dem

[*] Rundmäuler (Cyclostomata) sind die ältesten Wirbeltiere (noch ohne Unterkiefer). Sie entstanden vor 450 Millionen Jahren.

Mb am C-terminalen Kettenende ein Minus von sieben Aminosäuren auf. Das primitive Wirbeltier-Hb zeigt im oxygenierten Zustand wie das Mb monomeren Charakter.

Aus dem Genpool für die nur schwach aggregationsfähige Urform des monomeren Hb hat sich wahrscheinlich die Information der α -Kette entwickelt, die ebenfalls keine Neigung zur Aggregation mit ihresgleichen zeigt. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen erkennt man, daß im α -Hb wie beim Mb und Ur-Hb eine Deletion innerhalb der Kette eingetreten ist und C-terminal eine Verkürzung um sechs Aminosäuren. Für die α -Untereinheit charakteristisch sind zwei weitere „Auslassungen“ von zusammen sechs Aminosäuren, was die für die α -Kette typische Zahl von 141 Aminosäuren ergibt.

Wesentlich später als die Information für die α -Untereinheit entstand aus dem Genpool die Information für die Synthese von Nicht- α -Ketten. Der spätere Zeitpunkt ist anzunehmen, weil sich die Nicht- α -Ketten von der α -Kette nur in 85 ± 10 Positionen^[14] unterscheiden. *Pauling* nimmt an, daß sich α -Gen und Nicht- α -Gen vor 380 Millionen Jahren getrennt haben.

Alle Nicht- α -Ketten zeigen die für die Globinuntereinheiten typische C-terminale Verkürzung um 6 Aminosäuren gegenüber dem Mb. Es fehlt ihnen die „alte“ Triplettdelletion, wie sie beim Mb und Ur-Hb auftritt. Statt dessen tritt eine für die Nicht- α -Ketten typische Deletion von zwei Triplets auf. Die charakteristische Länge der Nicht- α -Ketten ergibt sich damit zu 154 (Urgen) – 6 – 2 = 146 Aminosäuren.

Das älteste Nicht- α -Gen ist das β -Gen, das die Information für die Synthese der β -Kette trägt. Weitere Nicht- α -Globintypen haben sich wahrscheinlich aus Dubletten des β -Gens entwickelt, denn sie weisen eine größere Ähnlichkeit mit der β -Kette auf.

Aus Dubletten des β -Gens bildete sich zunächst die Information für die Synthese der γ -Untereinheiten. Aus 42 ± 6 Aminosäure-Differenzen zwischen β - und γ -Kette ergibt sich nach den Überlegungen von *Pauling*, daß die Abspaltung des γ -Gens aus dem β -Genpool vor etwa 150 Millionen Jahren stattgefunden hat. Das γ -Gen blieb in unmittelbarer Nachbarschaft zum β -Gen. Aus dem β - γ -Genverband spaltete sich vor 35 Millionen Jahren das δ -Gen ab^[19]. Auch hier ergibt sich die Zeitangabe durch die Anwendung der *Paulingschen* Überlegungen auf die Differenz von 10 Aminosäuren zwischen δ - und β -Kette.

Die enge Nachbarschaft der β -Genfamilie im Genom^[19] ergibt sich aus experimentellen Befunden. Zwischen der Transkription von β - und γ -Gen muß ein Zusammenhang bestehen, dergestalt, daß γ -Globin die Synthese von β -Globin unterdrückt. Wenn die Synthese der γ -Ketten langsam erlischt, fällt auch die Hemmung der β -Globinsynthese fort, und diese nimmt zu in dem Maß, wie die γ -Globinsynthese abnimmt (vgl. Abb. 2)^[20]. Die Nachbarschaft zwischen β - und δ -Gen ist noch enger. Untersucht man die hormonelle Beeinflussung (durch Erythropoetin^[21]) der Hb-Synthese, so stellt man fest, daß die Synthesegeschwindigkeiten von β - und δ -Kette im konstanten Verhältnis 40:1^[22] wachsen. Die größere Synthesegeschwindigkeit der β -Kette kann verschiedene Ursachen haben: 1. Der Transport der gleichen Aminosäure kann durch verschie-

dene tRNS erfolgen^[23, 24]. Ein Minus an einem tRNS-Typ kann zu einem Minus in der Synthese eines Proteins führen. 2. Es ist denkbar, daß bei der jüngeren δ -Kette Komplikationen bei der Faltung auftreten. 3. Die mRNS oder ihre ribosomalen Addukte können für die einzelnen Globinuntereinheiten verschieden stabil sein^[11]. Welche dieser Ursachen tatsächlich vorliegt, ist noch unbekannt.

Für die enge Nachbarschaft von β - und δ -Gen spricht auch das Auftreten von hybriden Globinuntereinheiten, die in der Nicht- α -Kette N-terminal δ -Struktur und C-terminal β -Struktur haben. Drei solcher Hybride sind bisher bekannt^[25, 26].

Von einem ε -Typ, der im ersten Drittel der embryonalen Hb-Synthese auftritt (Abb. 2) ist nur wenig bekannt. Er verschwindet, wenn die Synthese der γ -Ketten einsetzt, wie später die Synthese der γ -Ketten erlischt, sobald β -Ketten synthetisiert werden.

Wenn auch bis zu 120 Positionen in der Sequenz der homologen Hämproteide je nach phylogenetischem Alter verschieden besetzt sein können, so sind doch 11 Positionen in allen bisher untersuchten Peptidketten immer identisch besetzt^[10], darunter die beiden Histidin-Reste, die eine Häm-Bindung garantieren, und in deren Nähe ein Prolin, das verhindert, daß sich in der Nähe des Häm-Bindungs-ortes eine störende Helixformation bildet.

Die Globinuntereinheiten vom Nicht- α -Typ zeigen auch im oxygenierten Zustand die Eigenschaft der Aggregation. Es können sich Homo- und Heterotetramere bilden. Homotetramere vom Typ β_4 treten unter pathologischen Bedingungen auf und sind zum O_2 -Transport wesentlich ungeeigneter als das Heterotetramere $\alpha_2\beta_2$, das in der Phylogenie der Vertebraten erstmals mit der Bildung des Unterkiefers auftritt. Untersucht wurde ein solches altes Hb beim Karpfen, einem Knochenfisch^[18].

3. Veränderungen in der Synthesegeschwindigkeit

Die Hb-Synthese erfolgt nach der Embryonalentwicklung unter physiologischen Bedingungen nur in einem Zelltyp des roten Knochenmarks, in den (Pro)Erythroblasten. In diesen kernhaltigen Vorstufen des (im Säugern) später kernlosen Erythrocyten kann die zur Hb-Synthese erforderliche Information aus dem Genom vollständig abgerufen werden, d. h. nur hier können für alle Teilschritte der Hb-Synthese die Voraussetzungen geschaffen werden. Unklar ist, wie die zelluläre Hb-Synthese beendet wird. Wahrscheinlich reprimiert Hb nach seiner Synthese entsprechende Genomabschnitte, so daß die weitere Transkription unterbunden wird. Die Globinsynthese läuft noch so lange weiter, wie intakte messenger-RNS für alle Peptidtypen^[27] vorhanden ist und ein funktionierender ribosomaler Apparat zur Verfügung steht (vgl. Abb. 3).

Während der Transkription werden von der DNS im Genom die für die Synthese der Globinuntereinheiten notwendigen Teilkopien in Form von messenger-RNS angefertigt. Jeder Genabschnitt, der eine Peptidkette codiert, liefert eine besondere mRNS (Cistron). Die verschiedenen unicistronalen mRNS für die Synthese von Globinunter-

einheiten besitzen eine bemerkenswert lange Lebensdauer in der Größenordnung von Tagen. Man kann sie aus Reticulocyten isolieren, die längst keinen Kern mehr besitzen, und kann mit ihnen in eiweißsynthetisierenden *in-vitro*-Systemen Hb (N-terminal beginnend) synthetisieren^[28].

Bei der Translation der mRNS-Information in α -Untereinheiten stellt man unter den Polysomen (=Funktionsaggregate der Ribosomen für die Translation einer mRNS) meist Pentamere fest, während sich bei der Synthese von β -Untereinheiten Hexamere nachweisen lassen. Vielleicht bietet die um 15 Nucleotide längere β -mRNS den Platz für ein zusätzliches Ribosom.

Die stöchiometrische Aggregation von α - und β -Ketten zum fertigen Tetrameren erfolgt auf ribosomalem Niveau^[29-31]. Wie bei der Myoglobin-Synthese, lösen sich die fertigen α -Ketten von den Ribosomen ab und werden ins Cytosol entlassen. Sie bilden keine Tetramere, können aber bei pathologischer Überfüllung verklumpen (β -Thalassämie). Unter physiologischen Bedingungen treten die freien α -Ketten mit den längeren, noch wachsenden Globinuntereinheiten der β -Familie in Wechselwirkung, worauf sich $\alpha\beta$ -Dimere von den Polysomen ablösen^[29-33]. Man glaubt heute nicht mehr, daß sich die β -Untereinheiten selbstständig ablösen und die Termination der α -Untereinheiten beeinflussen^[34-36]. Die $\alpha\beta$ -Dimeren treten dann mit dem Häm-Pool^[37-39] des Cytosols in Wechselwirkung^[40]. Obgleich monomeres α -Globin kein Häm bindet^[32], ist die Häm-Affinität zum α -Globin größer als zur β -Untereinheit^[41, 42], so daß sich zuerst die α - und dann die β -Untereinheiten mit dem Häm beladen.

Eine unterschiedliche Bereitstellung der Globinuntereinheiten ergibt sich meist durch Verminderung der Synthesegeschwindigkeit einer Untereinheit. In der α -Thalassämie wird ein Unterschuß an α -Ketten synthetisiert^[11]. Da das α -Gen isoliert im Genom vorliegt^[43], ist die Bereitstellung der Nicht- α -Ketten nicht gehemmt. Die Synthesegeschwindigkeit der β -Ketten liegt dann um den Faktor 1.5 bis 3 höher. Unter diesen Bedingungen bilden die Nicht- α -Ketten Homotetramere^[44], und in den Erythrocyten läßt sich ein HbH (β_4) nachweisen^[45, 46]. Diese funktionell minderwertige Hb-Form ist instabil und neigt zu Verklumpungen, die man als Heinzsche Einschlußkörperchen (in den Erythrocyten) nachweisen kann. Da die Synthesestörung schon während der Embryonalentwicklung auftritt, erfolgt hier auch eine Autoaggregation der γ -Ketten und es erscheint ein Hb-Bart (γ_4)^[47].

Bei der β -Thalassämie ist die Synthesegeschwindigkeit der β -Ketten vermindert. α -Ketten werden in ausreichender Menge synthetisiert und ins Cytosol entlassen. Es bilden sich aber keine α_4 -Tetramere, doch treten Verklumpungen auf^[48]. Durch die enge Nachbarschaft der β -Familie im Genom ist es möglich, daß eine teilweise Auffüllung des β -Pools erfolgen kann, wenn beispielsweise das γ -Gen nicht abgeschaltet wird. Es ergibt sich eine Persistenz von HbF, indem die γ -Ketten auch nach der Geburt den α -Ketten für eine Tetramerenbildung zur Verfügung stehen. Auch die Synthese von δ -Ketten ist unter diesen Bedingungen erhöht, so daß bei einem Minus an HbA₁ vermehrt HbF und HbA₂ angetroffen werden.

4. Ersatz einzelner Aminosäuren

Während Änderungen in der Synthesegeschwindigkeit der Globinuntereinheiten wahrscheinlich auf ribosomalem Niveau stattfinden, greifen Punktmutationen, die den Ersatz einzelner Aminosäuren zur Folge haben können, im Genom an. Hier ist (Abb. 3) jede Aminosäure durch ein

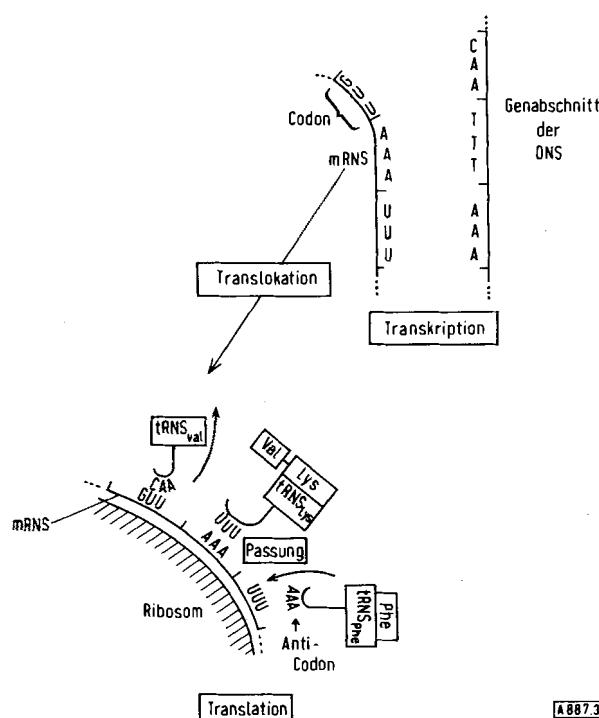


Abb. 3.

Schema der Protein-Synthese: rechts oben wird an einem freigelegten Genabschnitt der DNS enzymatisch die mobile mRNS synthetisiert (Transkription). Die mRNS wandert zum Ribosom, d. h. zum eiweißsynthetisierenden Apparat (Translokation). In einem Passungsvorgang (nach dem Gesetz der Basenpaarung) gelangt das Anticodon der mit Aminosäuren beladenen Transfer-RNS (tRNS) zum Codon der mRNS (Translation). Die neu herangebrachte Aminosäure (hier Phenylalanin durch tRNS_{Phe}) wird an den schon synthetisierten Peptidrest (hier Valin-Lysin) angeheftet.

Basentriplett codiert. Die meisten Aminosäuren sind nur durch die ersten beiden Basen „ihrer“ Triplets festgelegt. Bei einigen ist die Wahl der dritten Position völlig frei, meistens kann eine von zwei Basen erscheinen, ohne daß dadurch die Codierung unsicher wird.

So wird beispielsweise die Aminosäure Glycin (Gly) durch das mRNS-Codon GGX repräsentiert, wobei X=A, G, C oder U sein kann. Nur eine Aminosäure, das Methionin (Met), wird eindeutig (durch das Codon AUA) codiert.

Daraus ergibt sich, daß nicht jede Punktmutation, d. h. jeder Basenaustausch, im Gen zu einem Aminosäure-Wechsel in der Proteinkette führen muß. Wenn es in der dritten Position des Codon zu einem tolerierten Basenwechsel (whobbling) kommt, ändert sich an der Art der Aminosäure nichts. Dagegen tritt ein Aminosäure-Wechsel fast immer bei Basenfehlern in den beiden ersten Positionen des Codons ein: GA_G → GU_G bewirkt einen Übergang Glutaminsäure → Valin (Glu → Val), der zum Auftreten von HbS (Sichelzellenanämie) führt, wenn er in Position 6 der β -Kette erfolgt.

Bisher wurden in Globinuntereinheiten mehr als 100 Aminosäure-Wechsel gefunden, davon mehr in den β -Ketten^[15, 50] als in den α -Ketten, wahrscheinlich weil die Oxygenierung des Hb durch eine Konformationsänderung der β -Untereinheit gefördert wird und Veränderungen in der β -Kette daher klinisch eher manifest werden. Damit ist nicht gesagt, daß die am häufigsten *gefundenen* Mutationen mit den am häufigsten *aufgetretenden* Mutationen identisch sind, da man nach molekularen Veränderungen nur sucht, wenn pathologische Symptome auftreten. In tolerierten Mutationen können andere Typen des Basenaustausches häufiger vorkommen^[49].

Am häufigsten wird im Codon A gegen G ausgetauscht. Ein Beispiel ist AA_G^A (Lys) \rightarrow GA_G^A (Glu). Für die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten bedeutet dieser Austausch eine Umladung (Lys = $-\text{NH}_3^+$, Glu = $-\text{CO}_2^-$). Der umgekehrte Austausch (G gegen A) ist ebenso häufig: GG_C^U (Gly) \rightarrow GA_C^U (Asp). Aus einer neutralen Aminosäure mit geringstem Raumbedarf (Glycin) wird dabei eine polare (Asparaginsäure), die ionische Beziehungen eingehen oder Wasserstoffbrücken bilden und durch diese Eigenschaften Störungen bewirken kann.

Projiziert man diesen Austausch zweier Purinbasen (A und G) des Codons ins Genom, so entspricht er dort einer „Verwechslung“ zwischen den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin, die ihre Ursache auch in einer Störung der Übertragung von Amino- und Methylgruppen im Zellkern haben kann (Abb. 4).

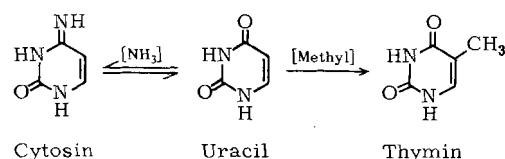


Abb. 4. Die beiden wichtigsten Pyrimidinbasen der Nucleinsäuren. Sie sind verknüpft durch enzymatische Aminierung und Methylierung.

Der Ersatz einer polaren Seitenkette, die ionische Beziehungen aufbaut, wird immer zu einer Konformationsänderung führen, besonders dann, wenn eine Ladungsumkehrung eintritt (Tabelle 1, Nr. 9).

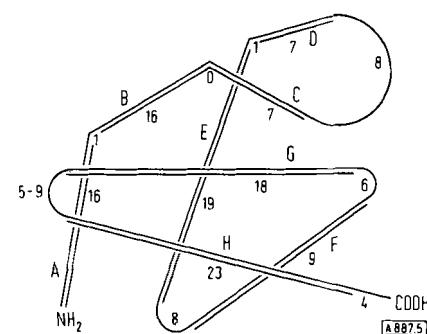
Auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptidstrukturen oder zwischen den Seitenketten einzelner Aminosäuren, z. B. zwischen phenolischem Hydroxyl (Tyr) und einem Heteroatom (Carboxyl-O, Ring-N), werden bei Wegfall eines Partners zusammenbrechen.

5. Die Globinuntereinheit

Die Globinuntereinheiten des Hb haben eine charakteristische Konformation, die der des Mb sehr ähnlich ist^[12]. 75% der Sekundärstruktur bestehen aus Helixstrukturen, die sich in acht Abschnitte A bis H (siehe Abb. 5) gliedern^[66].

Im Inneren der Struktur herrschen hydrophobe Kontakte vor, besonders zwischen den Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin^[5, 51, 52]. Der Ersatz solcher

Aminosäuren durch andere mit polaren Seitenketten kann zur Auflösung der Konformation führen. Findet der gleiche Austausch an der Moleküloberfläche statt, so wird die Konformation nur wenig beeinflußt (Tabelle 1, Nr. 6). Beim Ersatz einer Aminosäure durch eine andere kann schon der unterschiedliche Raumbedarf genügen, um die Konformation zu labilisieren (Tabelle 1, Nr. 7, 8), oder die für einen Konformationsabschnitt typische α -Helix kann unterbrochen werden (auch durch den Ausfall einer Aminosäure), was gleichfalls zu instabilen Hb-Typen führt (Tabelle 1, Nr. 1–3, 4, 5).



5.1. Globin-Globin-Kontakte

Neben den polaren und unpolaren Wechselwirkungen innerhalb einer Globinuntereinheit müssen in ihrer Außenzone Seitenketten von Aminosäuren die Bildung von Kontakten zwischen den Untereinheiten ermöglichen, damit sich die Quartärstruktur aus vier Untereinheiten bilden kann. Die Art der Wechselwirkung zwischen den vier Monomeren ist verschieden. Es existiert ein festerer Bindungstyp $\alpha^1\beta^1$ und $\alpha^2\beta^2$ und ein lockerer Globin-Globin-Kontakt $\alpha^1\beta^2$ und $\alpha^2\beta^1$. Im Fall $\alpha^1\beta^1$ nähern sich 110 Atome aus Seitenketten von 34 Aminosäuren auf einen Abstand $< 4 \text{ \AA}$. Im Fall $\alpha^1\beta^2$ ergeben sich Kontaktstellen (mit einem Abstand $< 4 \text{ \AA}$) zwischen 80 Atomen aus den Seitenketten von 19 Aminosäuren. Die Dissoziation des Tetrameren in dimere Untereinheiten führt zum „festeren“ $\alpha^1\beta^1$ -Dimeren^[53]: $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha^1\beta^1$. Die unterschiedliche Bindungsfestigkeit zwischen den Untereinheiten ist Voraussetzung für Konformationsänderungen des Hb-Moleküls: die beiden $\alpha^1\beta^1$ -Dimeren können aufeinander gleiten. Diese Konformationsänderung ermöglicht eine allosterische Aktivierung der Oxygenierung (O_2 -Beladung) und mittelbar der Desoxygenierung (O_2 -Abgabe) des Hb im Erythrocyten. Im desoxygenierten Zustand zeigt die Konformation der β -Kette ein lockeres, im oxygenierten ein dichteres Gefüge. Die Konformationskompression^[8] tritt ein, indem sich die Häm-Tasche aufweitet und eine koordinative Fe—N-Bindung reversibel durch eine Bindung Fe— O_2 ersetzt wird.

Die optimal reversible O_2 -Beladung ist nur dem Heterotetrameren $\alpha_2\beta_2$ möglich. Die Homotetrameren β_4 und γ_4 binden O_2 fester und zeigen keine allosterische Förderung

der O_2 -Bindung^[54]. HbF ($\alpha_2\gamma_2$) bindet O_2 fester als HbA₁, da zur Versorgung des fetalen Kreislaufs ein niedrigerer O_2 -Partialdruck zur Verfügung steht. Ist die O_2 -Bindung zu fest, wie bei den Homotetrameren, so ist die O_2 -Abgabe im Gewebe, z. B. an Mb, und damit ein O_2 -Transport nicht möglich.

Werden Aminosäuren ersetzt, die für die Bildung der Quartärstruktur wesentlich sind, so können die $\alpha^1\beta^1$ -Kontakte (Tabelle 1, Nr. 9) oder die $\alpha^1\beta^2$ -Kontakte (Tabelle 1, Nr. 10–13) labilisiert werden.

Statt zur Auflösung der Quartärstruktur kann ein Aminosäureersatz auch zu einer verstärkten Aggregationsneigung führen. Da bei den Nebenvalenzkräften, die den Zusammenhalt des Tetrameren garantieren, die hydrophoben Wechselwirkungen bei weitem überwiegen^[7], kann ein Überschuss an unpolaren Seitenketten auch zu höheren Aggregaten führen. Die Bildung von Hb-Polymeren hat makroskopisch eine Verklumpung des Hb mit einem entsprechenden Funktionsausfall im O_2 -Transport zur Folge. Die verstärkte Aggregationsneigung ist vor allem beim desoxygenierten Hb festzustellen, da hier eine lockere Konformation Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten erleichtert. Das bekannteste Beispiel eines pathologischen Hb-Typs mit einem Aminosäureaustausch an der Moleküloberfläche ist das Sichelzellen-Hb (Tabelle 1, Nr. 14, 15): Der Ersatz der negativ geladenen Seitenkette des Glu durch das unpolare Val führt zur Bildung eines überschüssigen hydrophoben Zentrums, das eine Polyaggregation einleiten kann. Die Hb-Verklumpung hat ein Schrumpfen des Zellvolumens zur Folge, und es bildet sich die charakteristische Sichelzellenform der Erythrocyten.

5.2. Häm-Globin-Kontakt

Am empfindlichsten für die Funktion des Hb sind Störungen in der Aminosäuresequenz, die sich in unmittelbarer Nähe zum Bindungsort des Häm befindet. Essentiell sind: 1. Ein Prolin, das die Bildung einer helicalen Struktur in diesem Bereich unterbindet. 2. Zwei Histidine in diesem Bereich, deren Imidazol-N der koordinativen Absättigung des Fe^{2+} dient. 3. Die Seitenketten anderer Aminosäuren, z. B. $\beta^{41}Phe$, $\beta^{42}Phe$, in der Nähe der Histidin-Reste. Sie leisten einen Beitrag zur Aufrechterhaltung eines hydrophoben Milieus, in das das plane Häm eingebettet ist (Abb. 6). Wird dieses hydrophobe Milieu gestört (schon Störungen ohne Ladungseffekte genügen), so kann dadurch der Abbau des Hb eingeleitet werden (Tabelle 1, Nr. 7, 8). Auffälliger sind die labilisierenden Effekte beim Einbau von Aminosäuren mit polaren Gruppen. Taucht eine negative Ladung (Tabelle 1, Nr. 17) in der Häm-Tasche auf, so sind die Voraussetzungen geschaffen für die Stabilisierung eines dreiwertigen Fe. Unter physiologischen Bedingungen tritt bei der Oxygenierung eine in der Größenordnung einiger % liegende autokatalytische Oxidation des Fe^{2+} (Hämoglobin) zum Fe^{3+} (Hämoglobin, HbM) ein. Durch die Hämoglobinreduktase, die NADP-abhängig arbeitet, wird das Fe^{3+} wieder reduziert. Die Reduktionsäquivalente werden vom Kohlenhydratstoffwechsel des Erythrocyten bereitgestellt. Bietet sich eine negative Ladung zur Stabili-

sierung des Fe^{3+} an, so kann keine enzymatische Reduktion erfolgen. Das Hämoglobin fällt für den O_2 -Transport aus. Tritt das Proton einer Carboxygruppe oder der H-Donator einer Wasserstoffbrücke mit der Elektronenlücke des Häm-Fe in Konkurrenz um das Imidazol-N (His), so kommt die

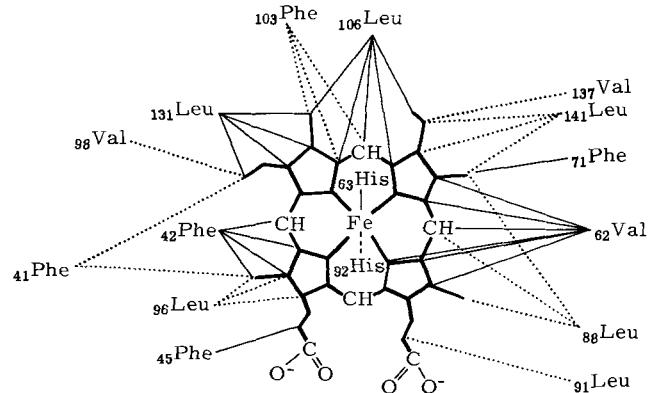


Abb. 6. Häm-Globin-Kontakte [7]. Das Schema zeigt, welche Aminosäure-Seitenketten der β -Kette mit dem in der β -Untereinheit gelegenen Porphinsystem des Häm in Wechselwirkung treten. Ausgezogene Linien führen zu oberhalb, punktierte Linien zu unterhalb der Häm-Ebene gelegenen Aminosäuren. Die Zahlen geben die Stellungen der Aminosäuren in der β -Kette an.

Fe—N(His)-Bindung nicht zustande, und eine Oxidation ist möglich (Tabelle 1, Nr. 16). Ein Verlust der Fe—N-Bindung durch Ersatz des Histidins führt immer zur Oxidation des Fe und zum Auftreten von HbM. Alle vier denkbaren Möglichkeiten eines His-Ersatzes „spielt“ die Natur durch: In α - und β -Ketten kann jeweils das proximale oder das distale His ersetzt werden (Tabelle 1, Nr. 18–21). Vertritt ein N-haltiger Ligand das Imidazol-N, z. B. Guanidyl-N (Arg) (Tabelle 1, Nr. 22), so ist das Fe anfälliger für eine Oxidation als in Bindung mit His. Unter Einwirkung von Nitroderivaten (Medikamente) kann es zu einer Methämoglobinämie kommen.

6. Effektoren

Allosterische Konformationsänderungen an Enzymproteinen können die Aktivität des Enzyms wesentlich verändern. Man nennt Stoffe, die solche Veränderungen an der Konformation eines Proteins bewirken, Effektoren.

Auch die Funktion des Hb-Moleküls kann durch Effektoren beeinflusst werden: Eine beginnende Oxygenierung fördert die weitere O_2 -Aufnahme im Sinne einer allosterischen Aktivierung (Abb. 7). Ebenso kann die Desoxygenierung gefördert werden: In einer Höhlung des Moleküls, die bei der Tetramerisierung frei bleibt, finden sich basische Seitengruppen ($\beta^{143}His$), die einen Angriff des CO_2 (Bohr-Effekt) durch die Bildung von Carbiminogruppierungen ermöglichen^[55, 57]. Fehlt ein solcher Angriffspunkt (Tabelle 1, Nr. 23), so ist eine Desoxygenierung erschwert^[58, 60].

Durch Untersuchungen an erythrocyten-gebundenem und freiem Hb konnte man Unterschiede in der O_2 -Bindungs-

festigkeit feststellen (siehe Abb. 7). Im Erythrocyten des Säugers findet sich ein Glykolysemetabolit in hoher Konzentration, der in anderen glykolyzierenden Geweben nur in katalytischer Menge vorkommt: das 2,3-Diphosphoglycerat (DPG). In einer 1:1-Bindung an basischen Funktionen (His) des Heterotetrameren $\alpha_2\beta_2$ ^[62] leitet DPG

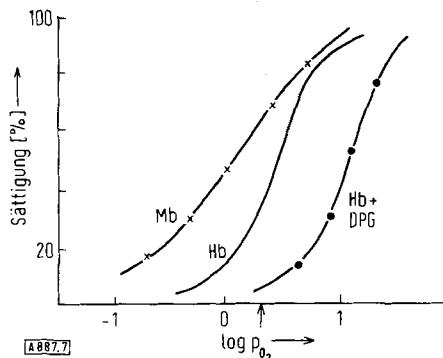


Abb. 7. O₂-Bindungskurven. Bei dem im Gewebe herrschenden O₂-Partialdruck (?) ist das tetramere Hb nur wenig mit O₂ beladen, während große Mengen an Mb gebunden sind – entsprechend den Funktionen von Hb (O₂-Transport) und Mb (O₂-Depot). Besonders vorteilhaft gestaltet sich die Dissoziation des O₂ von Hb, wenn es im Erythrocyten gebunden ist. (—●—), d. h. in Anwesenheit von 2,3-Diphosphoglycerat (DPG) [62].

innerhalb des Erythrocyten eine Konformationsänderung ein, die die O₂-Bindung lockert und die Desoxygengierung fördert^[63–65]. Im Vogelerythrocyten wird die Funktion des DPG von einem Inosit-hexaphosphat^[62] wahrgenommen. Diese allosterische Beeinflussung durch saure Effektoren ist nur an den phylogenetisch jüngsten $\alpha_2\beta_2$ -($\alpha_2\delta_2$)-Tetrameren möglich^[61] (beim HbF liegt anstelle von $\beta^{143}\text{His}$ ein $\alpha^{138}\text{Ser}$ oder $\gamma^{143}\text{Ser}$ vor). Auch die Homotetrameren β_4 und γ_4 zeigen keinen Bohr-Effekt und keine O₂-Lockierung durch DPG^[54].

Eingegangen am 10. März 1971 [A 887]

- [1] D. J. Weatherall, *Annu. Rev. Med.* **19**, 217 (1968).
- [2] E. R. Huehns, *Annu. Rev. Med.* **21**, 157 (1970).
- [3] M. F. Perutz, M. B. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will u. A. C. T. North, *Nature* **185**, 416 (1960).
- [4] M. F. Perutz, *Sci. Amer.* **211**, Heft 5, S. 11 (1964).
- [5] M. F. Perutz, J. C. Kendrew u. H. C. Watson, *J. Mol. Biol.* **13**, 669 (1965).
- [6] M. F. Perutz u. H. Lehmann, *Nature* **219**, 902 (1968).
- [7] M. F. Perutz, H. Muirhead, J. M. Cox u. L. C. G. Goaman, *Nature* **219**, 131 (1968).
- [8] H. Muirhead, J. M. Cox, L. Mazzarella u. M. F. Perutz, *J. Mol. Biol.* **28**, 117 (1967).
- [9] E. Zuckerkandl u. L. Pauling in M. Kasha u. B. Pullmann: *Horizons of Biochemistry*. Academic Press, New York 1962, S. 189.
- [10] E. Zuckerkandl, *Sci. Amer.* **212**, Heft 5, S. 110 (1965).
- [11] A. B. Edmundson, *Nature* **205**, 883 (1965).
- [12] J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips u. V. C. Shore, *Nature* **185**, 422 (1960).
- [13] C. L. Nobbs, H. C. Watson u. J. C. Kendrew, *Nature* **209**, 339 (1966).
- [14] C. Nolan u. E. Margoliash, *Annu. Rev. Biochem.* **37**, 727 (1968).
- [15] H. Lehmann u. R. G. Huntsman: *Man's Haemoglobins*. North Holland Publishing Co, Amsterdam 1966.
- [16] V. Rudloff, M. Zelenik u. G. Braunitzer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **344**, 284 (1966).
- [17] G. Braunitzer, *J. Cell. Comp. Physiol. Suppl. I*, 1 (1966).

- [18] K. Hilse, U. Sorger u. G. Braunitzer, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **344**, 166 (1966).
- [19] C. Baglioni, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 1880 (1962).
- [20] C. L. Conley, D. J. Weatherall, S. N. Richardson, M. K. Shepard u. S. Charache, *Blood* **21**, 261 (1963).
- [21] A. Carmena, D. Howard u. F. Stohlman, Jr., *J. Clin. Invest.* **46**, 1043 (1967).
- [22] R. M. Winslow u. V. M. Ingram, *J. Biol. Chem.* **241**, 1144 (1966).
- [23] B. Weisblum, S. Benzer u. R. W. Holley, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 1449 (1962).
- [24] H. A. Itano, *J. Cell. Comp. Physiol. Suppl.* **67**, 65 (1966).
- [25] D. Labie, W. A. Schroeder u. T. H. J. Huisman, *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 428 (1966).
- [26] W. Ostertag u. E. W. Smith, *Eur. J. Biochem.* **10**, 371 (1969).
- [27] S. Granick u. R. D. Levere, *Fed. Proc.* **23**, 222 (1964).
- [28] H. M. Dintzis, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 565 (1961).
- [29] J. R. Schaeffer, P. K. Trostle u. R. F. Evans, *Science* **158**, 488 (1967).
- [30] J. R. Schaeffer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 647 (1967).
- [31] A. L. Cline u. R. M. Boch, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 321 (1966).
- [32] C. L. Baglioni u. T. Campana, *Eur. J. Biochem.* **2**, 480 (1967).
- [33] A. S. Tavill, A. I. Grayzel, I. M. London, M. K. Williams u. G. A. Vanderhoff, *J. Biol. Chem.* **243**, 4987 (1968).
- [34] B. Colombo u. C. Baglioni, *J. Mol. Biol.* **16**, 51 (1966).
- [35] E. R. Huehns u. E. M. Shooter, *Nature* **193**, 1083 (1962).
- [36] C. Baglioni in J. H. Taylor: *Molecular Genetics*. Academic Press, New York 1963, Bd. 1, S. 405.
- [37] S. Granick u. R. D. Levere in C. V. Moore u. E. B. Brown: *Progress in Hematology*. Grune & Stratton, New York 1964, S. 1.
- [38] I. M. London, G. P. Bruns u. O. Karibian, *Medicine (Baltimore)* **43**, 789 (1964).
- [39] J. Lascelles, *J. Gen. Microbiol.* **23**, 487 (1960).
- [40] L. Felicetti, B. Colombo u. C. Baglioni, *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 380 (1966).
- [41] K. H. Winterhalter, *Nature* **211**, 932 (1966).
- [42] K. H. Winterhalter u. D. A. Deranleau, *Biochemistry* **6**, 3136 (1967).
- [43] S. Ohno: *Evolution by Gene Duplication*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1970.
- [44] J. G. Clegg u. D. J. Weatherall, *Nature* **215**, 1241 (1967).
- [45] R. E. Benesch, H. M. Ranney, R. Benesch u. G. M. Smith, *J. Biol. Chem.* **236**, 2926 (1961).
- [46] D. A. Rigas, R. D. Koler u. E. E. Osgood, *Science* **121**, 372 (1956).
- [47] S. Ohno u. M. Morrison, *Science* **154**, 1034 (1966).
- [48] E. R. Huehns, E. M. Shooter u. N. Dance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5**, 362 (1961).
- [49] H. Lehmann u. R. W. Carrell, *Brit. Med. Bull.* **25**, 14 (1969).
- [50] V. M. Ingram: *The Haemoglobins in Genetics and Evolution*. Columbia University Press, New York 1963.
- [51] W. Kauzmann, *Advan. Protein Chem.* **14**, 1 (1959).
- [52] I. M. Klotz, *Brookhaven Symp. in Biol.* **13**, 25 (1960).
- [53] M. A. Rosemeyer u. E. R. Huehns, *J. Mol. Biol.* **25**, 253 (1967).
- [54] E. Antonini, *Physiol. Rev.* **45**, 123 (1965).
- [55] M. F. Perutz, H. Muirhead, L. Mazzarella, R. A. Crowther, J. Greer u. J. V. Kilmartin, *Nature* **222**, 1240 (1969).
- [56] J. V. Kilmartin u. L. Rossi-Bernardi, *Nature* **222**, 1243 (1969).
- [57] J. V. Kilmartin u. L. Rossi-Bernardi: *Conference on Carbon Dioxide*, Haverford, Pennsylvania, 1968.
- [58] M. F. Perutz, *Nature* **224**, 269 (1969).
- [59] H. B. Hamilton, I. Iuchi, T. Miyaji u. S. Shibata, *J. Clin. Invest.* **48**, 525 (1969).
- [60] K. Imai, *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 543 (1968).
- [61] C. H. De Verdier u. L. Garby, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **23**, 149 (1968).
- [62] R. Benesch u. R. E. Benesch, *Nature* **221**, 618 (1969).
- [63] A. Chanutin u. R. R. Curnish, *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 96 (1967).
- [64] R. Benesch, R. E. Benesch u. C. I. Yu, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **59**, 526 (1968).
- [65] R. Benesch u. R. E. Benesch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 162 (1967).
- [66] M. F. Perutz, *J. Mol. Biol.* **13**, 646 (1965).
- [67] H. C. Watson u. J. C. Kendrew, *Nature* **190**, 670 (1961).