

# ANGEWANDTE CHEMIE

88. Jahrgang 1976  
Heft 24  
Seite 821–858

## Molekulare Aspekte der Sichelzellen-Krankheit

Von Michael R. Waterman und G. Larry Cottam<sup>[\*]</sup>

Sichelzell-Hämoglobin (Hämoglobin S) enthält in Position 6 der  $\beta$ -Kette Valin anstelle von Glutaminsäure. Die Konformationen von Hämoglobin S und normalem Erwachsenen-Hämoglobin (Hämoglobin A) unterscheiden sich nur wenig. Sauerstofffreies Hämoglobin S bildet unter Eigenassoziation eine flüssig-kristalline Phase, die die Erythrocyten zu einer sickelartigen Gestalt verformt und somit die klinischen Symptome der Sichelzellanämie hervorruft. In diesem Gel stehen Desoxyhämoglobin-S-Monomere und -Polymere im Gleichgewicht. Man weiß, daß der Polymerisationsprozeß einen negativen Temperaturkoeffizienten hat und vom pH-Wert sowie besonders stark von der Hämoglobin-S-Konzentration abhängt. Die Triebkraft für die Polymerisation von Desoxyhämoglobin S ist anscheinend die Entropiezunahme. Die Reaktion läuft in zwei kinetischen Phasen ab, einer Verzögerungsperiode und einem raschen Polymerisationsprozeß. Das Polymer besteht aus Röhrchen, die aus sechs oder acht nebeneinander liegenden, helixförmig gewundenen Strängen aus Desoxyhämoglobin S aufgebaut sind. Der Windungsabstand („pitch“) beträgt 3000 Å. Die genaue Natur der Kontakte zwischen den Hämoglobin-S-Molekülen ist noch nicht bekannt. Die anschließende Ausrichtung der Röhrchen führt zu den in S/S-Erythrocyten beobachteten Tactoiden. Zwar sind noch viele Einzelheiten der Polymerbildung und der Struktur nicht aufgeklärt worden, doch hat man bereits mehrere Versuche zur chemischen Beeinflussung der Sichelbildung durchgeführt. Allerdings ist bisher noch keine befriedigende chemische Behandlungsmethode gefunden worden.

### 1. Einführung

Über die Sichelzellanämie wurde erstmals 1910 von *Herick*<sup>[1]</sup> berichtet. Er beschrieb einen Patienten mit länglichen, sickelförmigen roten Blutkörperchen. In einer ausgedehnten Untersuchung zeigte *Neel*<sup>[2]</sup>, daß die Sichelzellen-Krankheit nach den Mendelschen Gesetzen vererbt wird, wie es *Huck*<sup>[3]</sup> zuvor schon angenommen hatte. *Neel* führte die Existenz klinisch gutartiger Formen (Sichelzell-Merkmal) darauf zurück, daß die Individuen heterozygot bezüglich Hämoglobin S sind, während Individuen mit Sichelzellanämie homozygot

bezüglich Hämoglobin S sind. Bis zur ersten chemischen Beschreibung der Krankheit und der Erkenntnis, daß sie von einem anomalen Hämoglobin-Molekül herrührte, mußte man jedoch die Entwicklung elektrophoretischer Techniken abwarten, mit deren Hilfe es *Pauling* et al. 1949<sup>[4]</sup> gelang, Sichelzell-Hämoglobin von normalem Hämoglobin zu trennen.

1957 konnte *Ingram* durch Anwendung von Peptidkartierungs-Techniken die genauen chemischen Unterschiede zwischen Hämoglobin A und Hämoglobin S bestimmen. Normales Erwachsenen-Hämoglobin (Hämoglobin A) enthält vier Polypeptidketten: zwei gleiche  $\alpha$ -Ketten aus 141 Aminosäureresten und zwei gleiche  $\beta$ -Ketten aus 146 Aminosäureresten ( $\alpha_2\beta_2$ ). *Ingram* gelang der Nachweis, daß sich Hämoglobin S durch den Austausch einer Aminosäure von Hämoglobin A unterscheidet. In der  $\beta$ -Kette ist die Glutaminsäure in Position 6 (vom Amino-Ende her) durch Valin ersetzt<sup>[5]</sup>. Davon

[\*] Prof. Dr. M. R. Waterman [+] und Prof. Dr. G. L. Cottam  
Department of Biochemistry, Southwestern Medical School  
The University of Texas Health Science Center  
Dallas, Texas 75235 (USA)

[+] Korrespondenzautor.

abgesehen stimmen alle Aminosäuren in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von Hämoglobin S mit denen in Hämoglobin A überein. Das heißt, Hämoglobin S enthält neben zwei normalen  $\alpha$ -Ketten zwei anomale  $\beta$ -Ketten ( $\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}}$ ). Individuen mit dem Sichelzell-Merkmal haben Hämoglobin S und Hämoglobin A, während Individuen mit Sichelzellanämie nur Hämoglobin S aufweisen.

Die klinischen Symptome der Sichelzellanämie – Anämie und akute Ischämie sowie Infarktbildung im Gewebe und damit chronischer Ausfall der Organfunktion – sind eine Folge der sichelartigen Verformung der Zellen. Dieses Phänomen ist seinerseits auf die Polymerisation von Desoxyhämoglobin-S-Molekülen<sup>[\*]</sup> innerhalb der Erythrocyten zurückzuführen. Nach der Sauerstoffabgabe an das Gewebe vereinigen sich die resultierenden Desoxyhämoglobin-S-Moleküle zu langen Fasern, die die Erythrocyten-Membran zu einer sichelartigen Gestalt deformieren (Abb. 1). Die Polymerisation macht sich

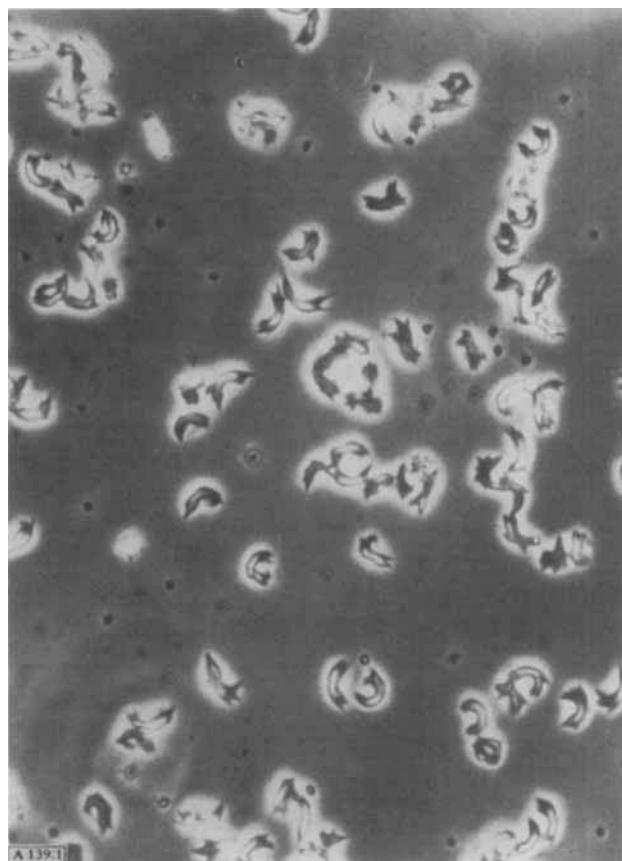


Abb. 1. Mikroskopische Aufnahme von sichelförmigen Erythrocyten. Aus diesen Erythrocyten wurde der Sauerstoff mit einer 1proz.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung chemisch entfernt.

als Gelbildung bemerkbar. Im Gegensatz hierzu bleibt normales Erwachsenen-Hämoglobin unter diesen Bedingungen in Lösung. Sichelzellen sind weniger geschmeidig als normale rote Blutkörperchen und werden leicht in Kapillarschichten eingeschlossen. Dies führt zu einer Verstopfung der Blutbahn und schließlich zur Gewebsschädigung. In den vergangenen Jahren sind zahlreiche klinische Untersuchungen über die Sichelzellanämie veröffentlicht worden, die nicht Gegenstand dieses Aufsatzes sein können. Auf einige neuere Übersichtsaufsätze<sup>[6–10]</sup> sei hingewiesen.

[\*] Die Bezeichnung Desoxyhämoglobin wird hier verwendet, wenn hervorgehoben werden soll, daß es sich um sauerstofffreies Hämoglobin handelt.

Die Anzahl der Untersuchungen über die biochemischen und biophysikalischen Aspekte der Sichelzellen-Krankheit ist kürzlich explosionsartig angestiegen, vor allem in den Vereinigten Staaten. Hier soll ein Überblick über die wichtigsten Aspekte dieser Arbeiten gegeben werden. Der Polymerisationsvorgang ist so komplex, daß ein großer Teil dieser Arbeiten rein phänomenologischer Natur ist. Die mit verschiedenen experimentellen Methoden gewonnenen Ergebnisse sind jedoch konsistent, und man lernt nach und nach, die grundlegenden strukturellen, kinetischen und thermodynamischen Aspekte dieser komplizierten Wechselwirkung zwischen Proteinmolekülen zu verstehen. Es ist zu hoffen, daß sich daraus nützliche klinische Methoden zur Behandlung dieser molekularen Krankheit ergeben werden.

## 2. Frühe Untersuchungen der Gelbildung

Im Anschluß an die Aufklärung der Primärsequenz von Hämoglobin S wurden bis zu diesem Jahrzehnt relativ wenige biochemische Untersuchungen zur Bestimmung der Natur des Aggregationsprozesses durchgeführt. Seit 1970 ist der Aggregationsprozeß mit einer Vielzahl von physikalischen Methoden geprüft worden, um seine komplexe Natur zu enträtselfen. Die Grundlage für die jüngsten Experimente bilden jedoch einige entscheidende Beobachtungen aus den Jahren zwischen 1950 und 1970.

Die erste dieser Beobachtungen stammt von *Harris*. Er fand, daß die Viskosität von lysierten roten Blutkörperchen aus Individuen mit Sichelzellanämie bei der Desoxygenierung beträchtlich zunimmt. Bei der Lyse der Erythrocyten konnte er eine mit der Sauerstoffabgabe einhergehende konzentrationsabhängige Viskositätsänderung nachweisen. Bei hohen Hämoglobin-S-Konzentrationen (235 mg/ml) beobachtete er einen halbfesten, gelähnlichen Zustand, dessen optische Doppelbrechung derjenigen von Erythrocyten ähnelte<sup>[11]</sup>. Diese Gelbildung, die durch Wiederanlagerung von Sauerstoff rückgängig gemacht werden kann<sup>[12]</sup>, tritt sogar in Gegenwart anderer Hämoglobine wie Hämoglobin A ein<sup>[13]</sup>. Eine Mindestmenge an Hämoglobin S muß allerdings vorhanden sein (vgl. auch Tabelle 5). Man hat auch auf die diagnostische Bedeutung der Gelbildung für die Identifizierung von Hämoglobin S hingewiesen.

Eine weitere wichtige Beobachtung machte *Itano*. Er zeigte, daß sich Desoxyhämoglobin S in 2.24 M Phosphatpuffer bei  $\text{pH}=7.0$  wesentlich schlechter als Desoxyhämoglobin A löst<sup>[14]</sup>. Die verminderte Löslichkeit von Desoxyhämoglobin S in konzentrierter Salzlösung ist von mehreren Wissenschaftlern bei der Untersuchung der Parameter des Polymerisationsprozesses ausgenutzt worden<sup>[15–17]</sup>. Darauf hinaus wurde auf dieser Basis eine Löslichkeitsmethode zum Nachweis von Hämoglobin S in Massen-Screening-Programmen entwickelt.

1957 untersuchte *Allison* erneut die Viskositätsänderungen und zeigte, daß die Oxyhämoglobine S und A sowie Desoxyhämoglobin A über einen Konzentrationsbereich von 5 bis 250 mg/ml und einen Temperaturbereich von 0 bis 40°C die gleichen Viskositätscharakteristiken besitzen. Dagegen verhielt sich Desoxyhämoglobin S völlig anders. Lösungen mit Konzentrationen über 120 mg/ml zeigten beim Erwärmen auf über ca. 15°C einen steilen Viskositätsanstieg. Beim Abkühlen ging die Viskosität wieder zurück<sup>[18]</sup>. Die Umkehrung dieses Vorganges durch Temperaturerniedrigung ist eine außeror-

dentlich wichtige Eigenschaft, auf die seitdem in praktisch jeder Untersuchung zurückgegriffen wurde. Andererseits fand man bei jeder oberhalb ca. 15°C liegenden Temperatur einen steilen Viskositätsanstieg bei Erhöhung der Hämoglobin-S-Konzentration (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Spezifische Viskositäten  $\eta_{sp}$  von wässrigen Lösungen der Desoxyhämoglobine A und S als Funktion der Konzentration c bei 37°C [18].

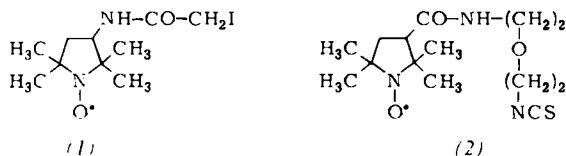
Desoxyhämoglobin A		Desoxyhämoglobin S	
c [mg/ml]	$\eta_{sp}$	c [mg/ml]	$\eta_{sp}$
50	1.5	50	1.5
110	5	100	4.5
200	20	115	5.7
275	41	125	8.5
		130	43.5
		150	Gel

Einen wertvollen Beitrag lieferte Murayama mit der Vorstellung, daß der negative Temperaturkoeffizient der Gelbildung ein Maß für die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen bei der Polymerisation ist<sup>[19]</sup>. Dies steht im Einklang mit dem Austausch der Aminosäure Glutaminsäure gegen Valin; mehrere Versuche, Arzneimittel gegen die Sichelzellen-Krankheit zu entwerfen, beruhten auf diesem Gedanken. Zusammenfassend ergaben diese frühen Untersuchungen, daß die Gelbildung ein stark konzertierter Prozeß ist, der von der Temperatur, der Hämoglobin-Konzentration und dem Sauerstoffdruck abhängt.

### 3. Unterschiede zwischen Hämoglobin S und A

Der vielleicht enttäuschendste Aspekt bei der Untersuchung der Aggregation von Desoxyhämoglobin S ist die Tatsache, daß sich die Hämoglobin-S-Moleküle im Polymer und in Lösung in ihren physikalischen Eigenschaften anscheinend nicht unterscheiden. Sorgfältige Untersuchungen auch mit Hilfe der polarisierten Absorptions-Spektroskopie<sup>[20]</sup> ergaben, daß sich die optischen Eigenschaften der Hämgruppe bei der Polymerisation nicht ändern. Andere Teile des Moleküls sind durch Spinmarkierungs-Experimente mit Nitroxiden erforscht worden; Konformationsänderungen aufgrund der Polymerisation konnten nicht festgestellt werden. Hämoglobin A wurde an den Cystein-Resten in Position 93 der β-Kette mit Nitroxiden substituiert, um die Konformationsänderungen während

der reversiblen Bindung eines Liganden durch Elektronenspinresonanz verfolgen zu können<sup>[21, 22]</sup>. An entsprechend substituiertem Hämoglobin S konnte man den gleichen Oxy-Desoxy-Übergang wie an Hämoglobin A beobachten; die Spektren einer Desoxyhämoglobin-Lösung niedriger Konzentration und eines in konzentrierter Lösung entstandenen Gels sind dagegen gleich<sup>[23]</sup>. Abbildung 2 veranschaulicht dieses Ergebnis. Daraus folgt, daß die Polymerisation die Region um die β<sub>93</sub>-Cystein-Reste in Desoxyhämoglobin S nicht beeinflußt; Teile der Proteinoberfläche bleiben also unverändert. Vorläufige Untersuchungen mit 3-[2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethyl]-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxyl (2) zur



Spinmarkierung deuten darauf hin, daß die N-terminalen Reste der β-Ketten von Hämoglobin S ebenfalls unempfindlich gegenüber Änderungen sind, die mit der Aggregation einhergehen können<sup>[24]</sup>. Für die Enthalpie-Änderung bei der Polymerisation wurde ein relativ kleiner Wert geschätzt. Auch dies spricht gegen eine große Konformationsänderung der Desoxyhämoglobin-S-Moleküle während der Gelbildung<sup>[25, 26]</sup>. Es versteht sich von selbst, daß die vergebliche Suche nach einer Eigenschaft der Hämoglobin-S-Moleküle, die sich mit der Polymerisation ändert, die Untersuchung dieses Prozesses kompliziert.

Bezüglich der Unterschiede zwischen Hämoglobin S und Hämoglobin A sind kürzlich zwei interessante Beobachtungen gemacht worden. Asakura et al. stellten fest, daß Oxyhämoglobin S bei mechanischem Schütteln sehr viel weniger stabil als Oxyhämoglobin A ist<sup>[27]</sup>. Da diese Instabilität nur die oxygenierte Form betrifft, ist sie ein starker Hinweis auf Konformationsunterschiede zwischen Oxyhämoglobin S und Oxyhämoglobin A. Ho et al. entdeckten durch hochauflösende <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie, daß sich die pK-Werte von drei Oberflächen-Histidylresten in Desoxyhämoglobin S von den pK-Werten der entsprechenden Reste in Desoxyhämoglobin A geringfügig unterscheiden<sup>[28]</sup>. Die größte Differenz betrug 0.2 pK-Einheiten. Zwar ist die Zuordnung dieser Reste nicht vollständig gelungen, doch spiegeln die Ergebnisse lokale Konformationsunterschiede an der Oberfläche von Desoxyhämoglobin S und Desoxyhämoglobin A wider. Man muß daher folgern, daß es Strukturunterschiede zwischen gelöstem Hämoglobin S und Hämoglobin A gibt, die aber sehr klein sind und deshalb bisher nicht zum Studium des Polymerisationsprozesses herangezogen werden konnten. Bis jetzt muß man die Polymerisation anhand der Änderungen von physikalischen Eigenschaften der Lösung untersuchen.

Auch die Techniken der Immunologie können zum besseren Verständnis der feinen Konformationsunterschiede zwischen Hämoglobin S und Hämoglobin A führen. Kürzlich wurde die β-Kette von Hämoglobin S benutzt, um die Bildung von Antikörpern anzuregen<sup>[32]</sup>. Man konnte dann durch Affinitätschromatographie eine für den N-terminalen Bereich dieser β-Kette spezifische Antikörper-Population isolieren. Kreuz-Reaktivität mit der β-Kette von Hämoglobin A oder mit der α-Kette wurde nicht beobachtet<sup>[33]</sup>. Diese Methode könnte für die Entdeckung und Quantifizierung von Hämoglobin

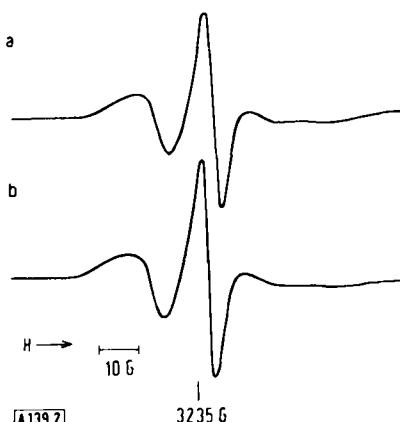


Abb. 2. Elektronenspinresonanz-Spektrum von Desoxyhämoglobin S, das an den β<sub>93</sub>-Cystein-Resten mit 3-(2-Iod-acetamido)-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxyl (1) spinmarkiert ist. a) Probe mit 53 mg/ml (kein Gel), b) Probe mit 283 mg/ml (Gel). Die Spektren wurden bei 23°C aufgenommen.

S und für das Studium von Konformationsunterschieden zwischen Hämoglobin A und Hämoglobin S von Nutzen sein.

Da die Funktion des Hämoglobins stark von seiner Konformation abhängt, sollte man durch Messung der Funktion kleine Konformationsunterschiede zwischen den beiden Hämoglobinen feststellen können. Die Sauerstoff-Bindungsparameter in verdünnten Lösungen von Hämoglobin S und Hämoglobin A ließen sich allerdings nicht unterscheiden<sup>[29]</sup>. Unterschiedliche Sauerstoff-Bindungsparameter von Hämoglobin S und Hämoglobin A wurden in Vollblut beobachtet<sup>[30, 31]</sup>. Hämoglobin S enthaltendes Blut hat eine signifikant niedrigere Sauerstoffsättigung; dies ist höchstwahrscheinlich auf die Aggregation von Desoxyhämoglobin S zurückzuführen, die zur Stabilisierung der T-(Desoxy-)Konfiguration beiträgt und die Gleichgewichtskurve nach rechts verschiebt. Die klinischen Folgen der Beziehung zwischen dem Ausmaß dieser Verschiebung und Parametern der roten Blutkörperchen wie etwa Volumen, Hämoglobin-Konzentration und 2,3-Diphosphoglycerat-Konzentration sind nicht völlig klar. Die Verschiebung der Gleichgewichtskurve kann sehr wohl bedeutende Auswirkungen auf die Schwere der Krankheit haben.

#### 4. Kinetische und thermodynamische Untersuchungen

Die Kinetik des Sol-Gel-Übergangs ist vor kurzem mit zahlreichen Methoden untersucht worden. Stark verschiedene Techniken wie Viskositätsmessung<sup>[34, 35]</sup>, Kalorimetrie<sup>[36]</sup>, Messungen der Doppelbrechung<sup>[36]</sup>, der Trübung<sup>[37]</sup>, der Linienbreite im NMR-Spektrum des Lösungsmittels Wasser<sup>[38]</sup> und der transversalen Relaxationszeiten der Wasserprotonen<sup>[39]</sup> haben übereinstimmend gezeigt, daß die Polymerisation in einer Desoxyhämoglobin-S-Lösung beim Erwärmung von 4°C auf Raumtemperatur oder darüber nicht sofort, sondern erst nach einigen Minuten einsetzt. Die Gelbildung nach dieser Verzögerungsperiode läuft schnell ab. Die Länge der Verzögerungsperiode hängt von der Hämoglobin-Konzentration und der Temperatur ab, auf die das System erwärmt wird. Die Verzögerungszeit  $t_d$  für den Polymerisationsprozeß läßt sich ausdrücken durch

$$1/t_d = \gamma S^n$$

Darin ist  $S$  das Übersättigungsverhältnis (gesamte Hämoglobin-S-Konzentration dividiert durch die minimale, für die Gelbildung erforderliche Konzentration);  $n$  und  $\gamma$  sind von den experimentellen Bedingungen unabhängige Parameter<sup>[36]</sup>. Die

Tabelle 2. Überblick über die mit verschiedenen Methoden gemessenen Verzögerungszeiten  $t_d$  bei der Polymerisation von Desoxyhämoglobin S.

Methode oder gemessene Eigenschaft	Temperatur- sprung [°C]	Hämoglobin-S- Konzentration [mg/ml]	$t_d$ [min]	Lit.
Kalorimetrie	0→20	233	50	[36]
Optische Doppel- brechung	0→20	233	50	[36]
Trübung	2→30	200	5	[37]
Viskosität	2→25	176	36	[34]
Viskosität	2→21	208	12	[35]
NMR-Linienbreite von Wasserprotonen	0→21.5	267	10	[38]
Transversale Relaxationszeit von Wasserprotonen	4→37	170	20	[39]

Konstante  $\gamma$  hat den Wert  $10^{-6}$  s. Der Betrag von  $n$  entspricht der Anzahl der Monomere in der keimbildenden Spezies und ist hoch, mindestens 30. In Tabelle 2 sind nach verschiedenen Methoden und unter verschiedenen Bedingungen beobachtete Verzögerungszeiten zusammengestellt.

Obwohl die angewendeten Techniken möglicherweise verschiedene Aspekte des Polymerisationsvorganges erfassen, wird eine signifikante Verzögerungszeit in allen Fällen gefunden. Die Dauer der Verzögerungsperiode ist temperaturabhängig, und offensichtlich nimmt die reziproke Verzögerungszeit logarithmisch mit steigender Temperatur zu<sup>[38]</sup>. Vergleicht man die Temperaturabhängigkeit der Verzögerungszeit, wie sie aus der optischen Doppelbrechung, der Trübung und der reziproken Amplitude des Kernresonanzsignals des Wassers ermittelt wurde, so zeigt sich, daß alle drei Techniken ähnliche Resultate ergeben<sup>[38]</sup>. Die Verzögerungszeit steht auch in reziproker Beziehung zu einer sehr hohen Potenz ( $\approx 30$ ) der Hämoglobin-Konzentration. Eaton et al. schlugen deswegen ein Modell vor, in dem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Bildung von thermodynamisch instabilen Keimen aus ungefähr 30 Desoxyhämoglobin-S-Molekülen ist<sup>[20]</sup>. Die Verzögerungszeit hat wichtige klinische Auswirkungen, die in Abschnitt 7 erörtert werden.

Kinetisch gesehen hängt die Polymerisation der Desoxyhämoglobin-S-Moleküle stark von ihrer Konzentration, der Temperatur und wahrscheinlich auch von anderen Parametern, z. B. dem pH-Wert, ab. Die Konzentrationsabhängigkeit scheint auf zweierlei Weise zum Ausdruck zu kommen: zum einen durch die Verzögerungszeit vor dem Beginn der Polymerisation, zum anderen durch die Geschwindigkeit, mit der

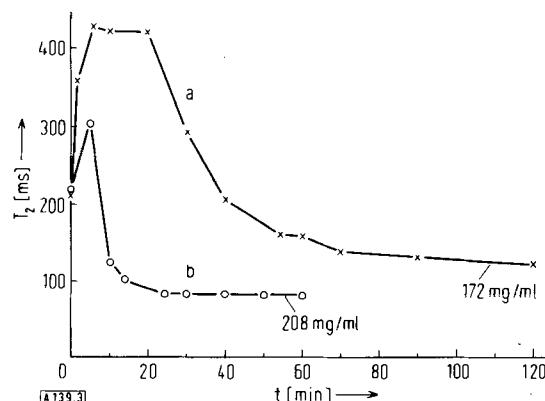


Abb. 3. Transversale Wasserprotonen-Relaxationszeiten ( $T_2$ ) als Funktion der Zeit bei zwei Hämoglobin-S-Konzentrationen (a: 172 mg/ml, b: 208 mg/ml). Die  $T_2$ -Werte zur Zeit Null wurden bei 4°C gemessen, alle anderen  $T_2$ -Werte bei 37°C. Der pH-Wert betrug in beiden Proben 7.0. Hämoglobin S wurde durch Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  in der Desoxy-Form gehalten [39].

die Polymerbildung fortschreitet. In Abbildung 3 sind die Wasserprotonen-Relaxationszeiten ( $T_2$ ) als Funktion der Zeit bei der Polymerisation von Desoxyhämoglobin S aufgetragen. Wie man sieht, geht die Verzögerungszeit  $t_d$  mit steigender Hämoglobin-Konzentration stark zurück (172 mg/ml: 20 min, 208 mg/l: 5 min), und die Geschwindigkeit der Polymerbildung nimmt zu. Selbstverständlich ist diese Konzentrationsabhängigkeit nicht spezifisch für Hämoglobin S. Aus Abbildung 4 erkennt man, daß bei Zugabe von 40 mg/ml Hämoglobin A zu einer Lösung von 170 mg/ml Hämoglobin S die Verzögerungszeit auf ähnliche Weise abnimmt und die Polymerisationsgeschwindigkeit ansteigt. Die Ergebnisse ähneln denen,

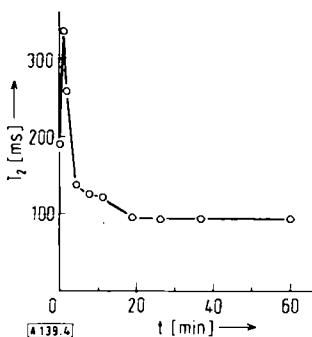


Abb. 4. Transversale Wasserprotonen-Relaxationszeiten ( $T_2$ ) als Funktion der Zeit in einer Lösung aus 170 mg/ml Hämoglobin S + 40 mg/ml Hämoglobin A. Die anderen Bedingungen entsprachen den in Abb. 3 beschriebenen [39].

die man mit einer Lösung von 208 mg/ml Hämoglobin S erhält (Abb. 3 b)<sup>[39]</sup>. Die feineren Aspekte der Kinetik der Hämoglobin-S-Polymerisation müssen noch erforscht werden. Insbesondere hat man bisher noch keine Lösungen untersucht, in denen Hämoglobin S in der gleichen Konzentration wie in Erythrocyten vorlag.

Wie oben bereits erwähnt, schätzt man, daß die keimbildende Spezies mindestens 30 Hämoglobin-Moleküle enthält<sup>[20]</sup>. Untersuchungen der Gleichgewichtseigenschaften des Desoxyhämoglobin-S-Systems befaßten sich größtenteils mit der Frage, ob kleine Aggregate aus einigen Hämoglobin-S-Molekülen am Sol-Gel-Übergang beteiligt sind. Durch Gleichgewichtszentrifugation erhielt man widersprüchliche Daten. Beobachtungen mit einer Schlierenoptik zeigten vor der Gelbildung eine Übergangszone (Prä-Gel), die Zwischenstufen zugeschrieben werden könnten<sup>[40]</sup>. Beobachtungen mit einem Rayleigh-Interferometer ergaben dagegen keine Hinweise auf Aggregate mit weniger als 20 Hämoglobin-Molekülen; man kann daraus schließen, daß der Polymerisationsprozeß stark konzertiert abläuft<sup>[41]</sup>. Lichtstreuungsexperimente sprachen für die Existenz von Prä-Gel-Aggregaten in Lösung und eher für einen linearen als für einen konzertierten Polymerisationsprozeß<sup>[42]</sup>.

Aus Messungen der Spin-Gitter-Relaxationsgeschwindigkeiten der Protonen des Lösungsmittels Wasser wurde abgeschätzt, daß bei 10°C 90 % der Desoxyhämoglobin-S-Moleküle in Lösung bleiben, während sie bei 35°C praktisch alle in das Gel eingebaut werden<sup>[43]</sup>. Zentrifugationsversuche deuten darauf hin, daß das Gel aus Desoxyhämoglobin-S-Monomeren im Gleichgewicht mit einer festen polymeren Phase besteht<sup>[26, 44]</sup>. Die Messung der longitudinalen Relaxationszeiten ( $T_1$ ) der Wasserprotonen läßt darauf schließen, daß innerhalb der Erythrocyten Wechselwirkungen zwischen den Oxyhämoglobin-S-Molekülen auftreten<sup>[45]</sup>.

Die Bestimmung der transversalen Relaxationszeiten ( $T_2$ ) der Wasserprotonen hat sich beim Studium des Aggregationsprozesses von Desoxyhämoglobin S bewährt und vor kurzem die Widersprüche um die Prä-Gel-Aggregate etwas aufgeklärt<sup>[46-49]</sup>. Bei diesem Verfahren wird die Änderung des  $T_2$ -Wertes als Funktion der Zeit verfolgt (siehe Abb. 3 und 4). Die Technik eignet sich sowohl für intakte Erythrocyten als auch für Lösungen von isoliertem Hämoglobin<sup>[46]</sup>. Sie wurde angewendet, um z. B. den Einfluß des pH-Wertes<sup>[48]</sup> und potentieller Mittel gegen die Sichelzellen-Krankheit<sup>[50]</sup> auf den Polymerisationsprozeß zu untersuchen. Zur Erklärung der beobachteten Abnahme von  $T_2$  wurde das Modell der drei Wasserbereiche vorgeschlagen<sup>[47]</sup>: Freies Wasser, Hydratationswasser und „wirbelfrei“ gebundenes Wasser. In Tabelle

3 sind neben den Molenbrüchen von Wasser in jedem Bereich die charakteristischen Korrelationszeiten  $\tau_c$  angegeben. Durch die Polymerisation nimmt die Korrelationszeit des „wirbelfrei“ gebundenen Wassers zu, was zur beobachteten Verringerung der Relaxationszeit  $T_2$  führt. Somit ist der verkleinerte  $T_2$ -Wert eine Funktion des Polymerisationsgrades in der Desoxyhämoglobin-S-Lösung.

Tabelle 3. Die drei Wasserbereiche innerhalb intakter Erythrocyten [47].

Wasserbereich	Molenbruch	Korrelationszeit $\tau_c$ [s]
Freies Wasser	0.98	$3 \times 10^{-11}$
Hydratationswasser	0.013 bis 0.015	$2 \times 10^{-9}$ bis $4 \times 10^{-9}$
„Wirbelfrei“ gebundenes Wasser	0.002	$\geq 10^{-7}$

Es fragt sich nun, wie hoch der Polymerisationsgrad sein muß, damit sich die beobachteten Änderungen von  $T_2$  ergeben. Dazu berechnete man die Korrelationszeit für ein lineares Modell-Polymer und verglich sie mit den bei Desoxyhämoglobin-S-Lösungen beobachteten Werten<sup>[49]</sup>. Die Korrelationszeit von Oxyhämoglobin S beträgt  $2.23 \times 10^{-8}$  s; für polymerisiertes Desoxyhämoglobin S wurden  $2.64 \times 10^{-7}$  s gefunden<sup>[49]</sup>. Aus Tabelle 4 kann man entnehmen, daß eine lineare

Tabelle 4. Berechnete Korrelationszeiten  $\tau_c$  unter Annahme einer linearen Polymerisation von Desoxyhämoglobin S [49]. Der Berechnung wurde kugelförmiges Hämoglobin mit 64 Å Durchmesser zugrundegelegt. Der Assoziationsgrad gibt die Zahl der Moleküle im linearen Polymer an und ist auch gleich dem Achsenverhältnis.

Assoziationsgrad	$\tau_c$ [s]
1	$2.23 \times 10^{-8}$
2	$5.20 \times 10^{-8}$
3	$9.14 \times 10^{-8}$
4	$1.35 \times 10^{-7}$
5	$1.81 \times 10^{-7}$
6	$2.27 \times 10^{-7}$
7	$2.75 \times 10^{-7}$

Assoziation von einem bis sieben Hämoglobin-S-Molekülen zur beobachteten Spanne der Korrelationszeiten führen kann. Demnach wirken sich Ereignisse in der Anfangsphase der Polymerisation auf die gemessenen transversalen Relaxationsgeschwindigkeiten der Wasserprotonen aus. Gestützt wird dieses Ergebnis durch den Befund, daß man für S/S-Erythrocyten einen  $n$ -Wert von 2.5 erhält, wenn man die Änderung von  $T_2$  als Funktion der Oxyhämoglobin-Konzentration mißt und in einem Hill-Diagramm aufträgt. Deshalb läßt sich in diesem speziellen Fall die Desoxygenierung von Hämoglobin mit Hilfe dieser Technik messen<sup>[49]</sup>. Da Beginn und Geschwindigkeit der Polymerisation stark konzentrationsabhängig sind, darf man auf die Existenz von Zwischenstufen schließen. Das Verständnis ihrer Bildung und ihres Verschwindens ist für das Gesamtverständnis des Polymerisationsvorganges unentbehrlich.

Thermodynamische Messungen schließen die Existenz kleiner Polymere nicht aus. Die Enthalpie der Polymerisation beträgt 2 bis 4 kcal/mol<sup>[25, 26]</sup>; man nimmt an, daß die bei 20°C um etwa 25 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> zunehmende Entropie die treibende Kraft für die Reaktion ist<sup>[26]</sup>. Diese Entropieänderung ist kleiner als bei anderen biologischen Polymerisationsprozessen und läßt sich mit der Existenz von stabilen, kleinen Polymeren vereinbaren<sup>[26]</sup>.

Minton hat für die Gelbildung von Hämoglobin S ein thermodynamisches Zwei-Stufen-Modell vorgeschlagen<sup>[51-54]</sup>. In diesem Modell liegt monomeres Desoxyhämoglobin S vor, bis eine kritische Konzentration erreicht wird. Oberhalb dieser Konzentration bilden sich durch einen der Fällung thermodynamisch äquivalenten Prozeß stäbchenähnliche Mikroröhrchen. Die stäbchenartigen Aggregate richten sich dann spontan aus und bilden das Gel, sobald ihr Volumenanteil einen kritischen Wert überschreitet. Der kritische Volumenanteil hängt von der Länge der stäbchenartigen Formen in Lösung ab; je länger sie sind, desto niedriger ist der für die Ausrichtung notwendige Volumenanteil. Dieses Modell soll mit den experimentellen Beobachtungen im Einklang stehen und ist sowohl auf die chemische Inhibierung der Gelbildung als auch auf den Einfluß von Oxyhämoglobin S auf die Gelbildung angewendet worden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Aggregation von Desoxyhämoglobin S ein konzentrations- und temperaturabhängiger Vorgang ist, der aus mehreren unterscheidbaren Schritten besteht und dessen Triebkraft die Entropiezunahme ist. Die Polymerisation setzt erst nach einer Verzögerungsperiode ein. Während dieser Verzögerungsperiode scheinen sich keine stabilen niedermolekularen Polymere zu bilden. Dagegen entstehen sie offensichtlich während der Aggregationsphase des Gesamtorgangs und dienen als Vorläufer der aus mehr als 30 Hämoglobin-Molekülen aufgebauten keimbildenden Spezies. Angesichts dessen, was man über die im nächsten Abschnitt beschriebene Struktur des Polymers weiß, muß es

kinetische Prozesse geben, wie etwa die Ausrichtung der Röhrchen, die vom Gesamtprozeß getrennt betrachtet werden müssen.

## 5. Die Struktur der Kristalle und Fasern

Die Struktur des Desoxyhämoglobin-S-Polymers hat erhebliches Interesse gefunden, denn man erwartet, daß sich bei Kenntnis der Faserstruktur und insbesondere der intermolekularen Kontakte der Aminosäuren möglicherweise eine spezifische Substanz gegen die Sichelzellenbildung entwerfen läßt. Zahlreiche Einzelheiten der Faserstruktur sind elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 5) zu entnehmen. Aus den Aufnahmen geht hervor, daß Desoxyhämoglobin S in Erythrocyten und in Lösung Röhrchen mit einem äußeren Durchmesser von ungefähr 170 Å bildet<sup>[19, 55, 56]</sup>. Die Untersuchungen zeigen, daß die Fasern durch Ausrichten und Zusammenlagern der Röhrchen zustandekommen. Finch et al.<sup>[57]</sup> sowie Edelstein et al.<sup>[58]</sup> fanden Hinweise dafür, daß in den Röhrchen Ringe aus sechs Hämoglobin-Molekülen helixförmig aufeinanderge stellt sind. Die beiden Untersuchungen hatten zwar bezüglich der helicalen Anordnung und der Ausrichtung der Röhrchen nicht genau das gleiche Ergebnis, doch zeigt das aus diesen Studien abgeleitete Modell, daß es drei Arten von intermolekularen Hämoglobin-Kontakten gibt, die zur Faserbildung führen. Die Kontaktstellen befinden sich a) oben und unten an den Hämoglobin-Einheiten, wo sie für die Zusammenlagerung

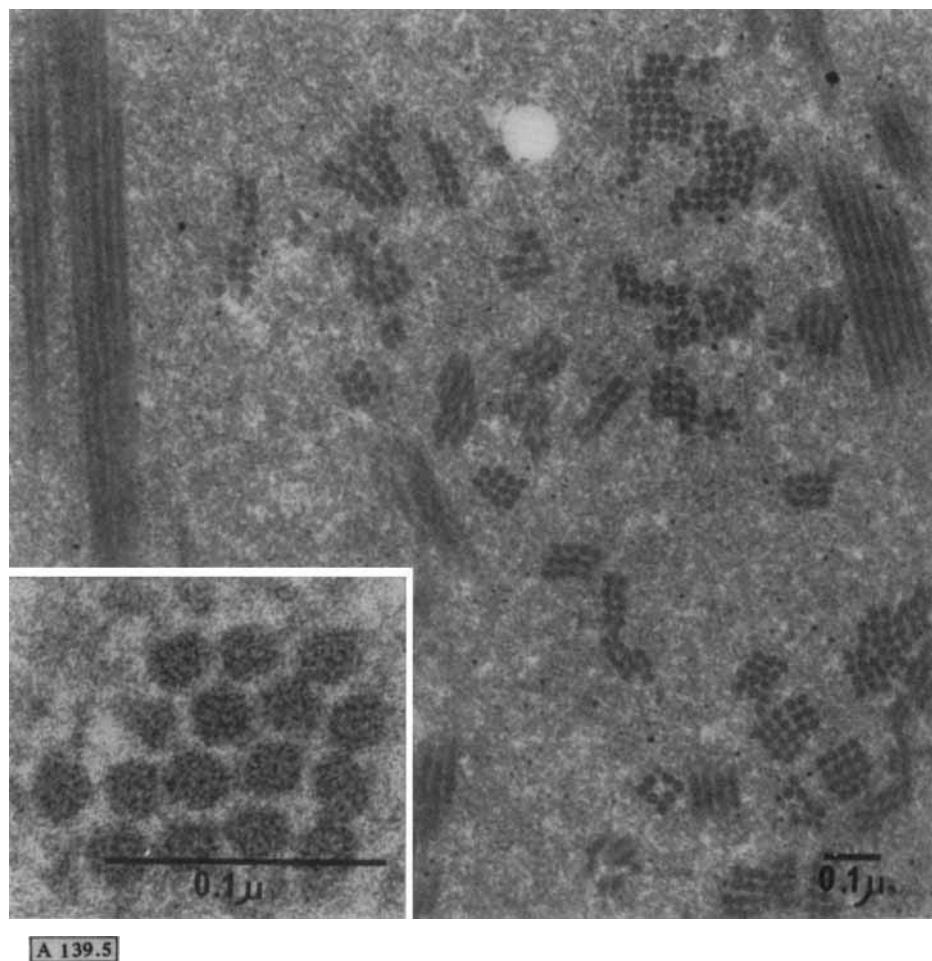
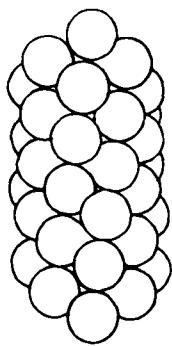


Abb. 5. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines zellfreien Lysats von S/S-Erythrozyten während der Desoxygenierung. Man sieht sowohl die Fasern als auch ihre Querschnitte (aus [69]).

in Richtung der Längsachse sorgen, b) an den Seiten der Hämoglobin-Einheiten, wo sie die Ringbildung bewirken, und schließlich gibt es c) Kontakte zwischen den Röhrchen, wodurch es zur Ausrichtung und damit zur Faserbildung kommt. Neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß die Röhrchen nicht sechs-, sondern achtsträngig sind (Abb. 6) und daß die benachbarten Stränge in der Röhrchen-Längsachse um eine halbe Identitätsperiode versetzt gegeneinander angeordnet sind<sup>[59]</sup>.



A139.6

Abb. 6. Modell der achtsträngigen Desoxyhämoglobin-S-Faser, wie es aus Röntgen- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen abgeleitet wurde. Jeder Kreis stellt ein Desoxyhämoglobin-S-Molekül dar.

Es ist noch nicht bekannt, welche Aminosäuren an diesen Wechselwirkungen beteiligt sind; dagegen gibt es bereits einige Informationen über die Kontaktstellen zwischen Desoxyhämoglobin-S-Molekülen. Von Desoxyhämoglobin-S-Gelen konnten Röntgenbeugungsmuster erhalten werden<sup>[60]</sup>, und kürzlich wurde die Struktur von kristallinem Desoxyhämoglobin S bei 5 Å und bei 3 Å Auflösung bestimmt<sup>[61, 62]</sup>. Interessanterweise stimmen viele Daten aus der 3 Å-Röntgenstrukturanalyse gut mit elektronenmikroskopischen Daten und anderen Informationen über die Faserstruktur überein. So ermittelten z. B. Hofrichter et al. 1973 durch Messung der Absorption von polarisiertem Licht den maximalen Winkel (23°), der zwischen der Röhrchenachse und der x-Achse der Moleküle bestehen kann<sup>[20]</sup>. Im Kristall beträgt dieser Winkel weniger als 10°. Darüber hinaus fand man, daß mehrere der bekannten Stellen des Moleküls, die den Gelbildungsprozeß beeinflussen, intermolekulare Kontaktstellen im Kristall sind. Zum Beispiel ist einer der  $\beta_6$ -Reste an den Seiten-Kontakten beteiligt, ebenso einer der  $\beta_{7,8}$ -Reste. Im Hämoglobin C<sub>Harlem</sub> gibt es neben dem Glu → Val-Austausch in Position 6 der  $\beta$ -Kette auch einen Asp → Asn-Austausch an  $\beta_{7,8}$ . Dies führt zu einer Erhöhung der für die Gelbildung erforderlichen Konzentration<sup>[63]</sup>. Mehrere andere Stellen, die – wie Untersuchungen an anomalen Hämoglobinen schließen lassen – an intermolekularen Kontaktten beteiligt sein könnten, zeichnen sich ebenfalls durch ihre kristallographischen Daten aus. Ferner unterscheiden sich die Strukturen von Desoxyhämoglobin S und Desoxyhämoglobin A in der  $\beta_6$ -Region nicht wesentlich voneinander. Aus den kristallographischen Daten läßt sich ein Modellröhrchen konstruieren, das viele Ähnlichkeiten mit dem oben beschriebenen achtsträngigen Modell aufweist. Man nimmt außerdem an, daß das Röhrchen aus Doppelsträngen besteht, in denen die Moleküle um die halbe Identitätsperiode versetzt angeordnet sind<sup>[62]</sup>.

Weitere Untersuchungen zur Kartierung der intermolekularen Kontaktstellen wurden mit Hybridhämoglobinen durchgeführt, die aus mutierten  $\alpha$ -Ketten und Hämoglobin-S- $\beta$ -Ketten

bestanden<sup>[17]</sup>. Dabei wurde die Löslichkeit der Hybridhämoglobine bestimmt, um den Einfluß der anomalen  $\alpha$ -Kette auf den Polymerisationsprozeß beurteilen zu können. Die Ergebnisse dieser Studien scheinen mit den durch Röntgenstrukturanalyse und Elektronenmikroskopie gewonnenen Daten im Einklang zu stehen. Zudem sind die Resultate zum Teil mit denen der Computer-Näherung konsistent, die an einem Modell zur Bestimmung der intermolekularen Kontaktstellen ausgeführt wurde<sup>[64]</sup>.

Zwar müssen noch viele Einzelheiten der Desoxyhämoglobin-S-Faser bestimmt werden, doch steht fest, daß die Faser aus Röhrchen besteht, die aus Strängen aus Desoxyhämoglobin-S-Molekülen aufgebaut sind. An den Kontaktten zwischen den Molekülen und zwischen den Strängen sind wahrscheinlich nicht viele Aminosäuren beteiligt, so daß ein Großteil der Oberfläche des Hämoglobin-Moleküls vom Lösungsmittel umgeben ist. Die Kräfte, die die Röhrchenbildung bedingen, ändern die meßbaren Eigenschaften der Hämoglobin-Moleküle nicht. Die tubulären Fasern sind thermodynamisch dennoch stabil genug, um der Erythrocyten-Membran eine sichelförmige Gestalt aufzuzwingen.

## 6. Nicht-gelierende Hämoglobine

Während Homozygotie bezüglich Hämoglobin S (Sichelzellanämie) oft mit schweren klinischen Symptomen verbunden ist, handelt es sich bei der Heterozygotie bezüglich Hämoglobin S (Sichelzell-Merkmal) um einen klinisch gutartigen Zustand. Daher wurde der Einfluß nicht-gelierender Hämoglobine, z. B. Hämoglobin A und F (fötales Hämoglobin), auf den Polymerisationsprozeß eingehend untersucht<sup>[13, 65, 66]</sup>.

In Erweiterung der Arbeit von Singer und Singer<sup>[13]</sup> haben Bookchin und Nagel<sup>[65, 66]</sup> für diese Art der Untersuchung eine seither häufig angewendete Technik entwickelt. Bei diesen Experimenten wird die minimale Gelierungskonzentration (MGC) unter spezifischen Bedingungen (0.15 M Phosphatpuffer, pH = 7.35, 25 °C) gemessen. Unter der MGC versteht man die Hämoglobin-Konzentration, unterhalb der keine Gelbildung stattfindet. Bei Anwendung festgelegter Bedingungen ist es möglich, außer dem Einfluß von nicht-gelierenden Hämoglobinen auf die MGC auch potentielle Substanzen mit Antisichelzell-Aktivität und Mutationen im Hämoglobin-S-Molekül an anderen Positionen als  $\beta_6$  zu studieren.

Tabelle 5. Einfluß von nicht-gelierenden Hämoglobinen (Hb) auf die minimale Gelierungskonzentration (MGC) [60, 61] von Desoxyhämoglobin S. Die normale Hämoglobin-Konzentration in den Erythrozyten beträgt 320 bis 340 mg/ml.

Hämoglobin-Zusammensetzung	MGC [mg/ml]
100 % HbS	235 bis 248
50 % HbS + 50 % HbA	301
50 % HbS + 50 % HbF	353 bis 366
100 % HbC <sub>Harlem</sub> [a]	362
50 % HbS + 50 % Hb Korle-Bu [b]	355 bis 361

[a] HbC<sub>Harlem</sub> enthält zwei Substitutionen in der  $\beta$ -Kette ( $\beta_6^{\text{Glu} \rightarrow \text{Val}}$  und  $\beta_{7,8}^{\text{Asp} \rightarrow \text{Asn}}$ ).

[b] Hb Korle-Bu enthält eine Substitution in der  $\beta$ -Kette ( $\beta_7^{\text{Asp} \rightarrow \text{Asn}}$ ).

Tabelle 5 zeigt den Einfluß von nicht-gelierenden Hämoglobinen auf die MGC von Hämoglobin S. Die beiden Hämoglobine A und F erhöhen die MGC erheblich, wobei Hämoglobin F wirksamer ist als Hämoglobin A. Außerdem führt auch

der Asp→Asn-Austausch an  $\beta_{73}$  (Hb Korle-Bu, Hb C<sub>Harlem</sub>) zu einer deutlichen Zunahme der MGC. Bei gleichen Anteilen Hämoglobin S und Hämoglobin A entspricht die MGC ungefähr der Hämoglobin-Konzentration in den Erythrocyten, während Hämoglobin F diese Konzentration über die in den Erythrocyten gefundene hinaus steigert. So ist es zu erklären, daß Zellen, die etwa gleiche Mengen an Hämoglobin A und Hämoglobin S enthalten und bei vollständiger Desoxygenierung in vitro eine sichelförmige Gestalt annehmen, in vivo wahrscheinlich deswegen keine Sichelbildung erleiden, weil die Sauerstoff-Konzentration hierfür noch zu hoch ist. Deshalb ist die übliche Hämoglobin-Zusammensetzung beim Sichelzell-Merkmal (45 % Hämoglobin S und 55 % Hämoglobin A) eine klinisch gutartige Bedingung. – Außerdem kann man Tabelle 5 entnehmen, daß ein Aminosäure-Austausch an einer von der  $\beta_6$ -Position weit entfernten Stelle die MGC erheblich beeinflussen kann. Dies ist auf die zahlreichen Aminosäuren-Kontakte, die für die Faserbildung nötig sind, zurückzuführen.

Auf welche Weise nicht-gelierende Hämoglobine die MGC ändern, ist unbekannt. Man hat allerdings in Mischungen aus Hämoglobin A und Hämoglobin S Hybride ( $\alpha_2\beta_a\beta_s$ ) beobachtet<sup>[67]</sup>, und es wurde experimentell gezeigt, daß die MGC unter den Entstehungsbedingungen der Hybride ansteigt, jedoch nicht bis zu dem Wert, der in Abwesenheit der Hybride beobachtet wird<sup>[68]</sup>. Nicht-gelierende Hämoglobine könnten demnach als solche und als Hybride in die Faserstruktur eingebaut werden; die letztgenannte Kombination führt zu einer Erhöhung der MGC, erlaubt aber noch die Gelbildung<sup>[69]</sup>. Natürlich muß der mögliche Einfluß von Hybriden auf die Gelbildung in Hämoglobin-Mischungen noch weiter untersucht werden.

Die Steigerung der MGC durch nicht-gelierende Hämoglobine reicht jedoch nicht zur Erklärung der klinischen Unterschiede zwischen Sichelzellanämie und Sichelzell-Merkmal aus. Die Hämoglobin-Konzentration in normalen Erythrocyten liegt zwischen 320 und 340 mg/ml. Aus Tabelle 5 ergibt sich, daß 50 % Hämoglobin F anstelle von 50 % Hämoglobin A sehr günstig wären, da die MGC über die normale Hämoglobin-Konzentration der roten Blutkörperchen hinaus gesteigert würde. 50 % Hämoglobin F kommen jedoch äußerst selten vor. Andererseits erhöhen auch 50 % Hämoglobin A die MGC, aber nicht über die normale Hämoglobin-Konzentration der Erythrocyten hinaus. Man schätzt, daß zwischen 8 und 10 % der schwarzen Bevölkerung in den Vereinigten Staaten ungefähr 45 % Hämoglobin S und 55 % Hämoglobin A haben (Sichelzell-Merkmal), und man weiß, daß die Erythrocyten dieser Personen nach vollständigem Sauerstoffentzug sichelförmig werden. Daher muß Hämoglobin A außer der Steigerung der MGC noch eine andere Funktion haben.

Kürzlich wurde aus den gemessenen Relaxationszeiten der Wasserprotonen abgeleitet, daß die Polymerisation in S/S-Erythrocyten sofort und gleichzeitig mit der Desoxygenierung einsetzt<sup>[49]</sup>. In heterozygoten Erythrocyten (A/S oder C/S) verzögert sich der Beginn der Polymerisation, bis ein kritischer Desoxyhämoglobin-Spiegel erreicht ist. Die Höhe des kritischen Desoxyhämoglobin-Spiegels hängt von der Hämoglobin-S-Menge in den Erythrocyten ab; je größer sie ist, desto niedriger ist der zum Start der Polymerisation notwendige Desoxyhämoglobin-Spiegel.

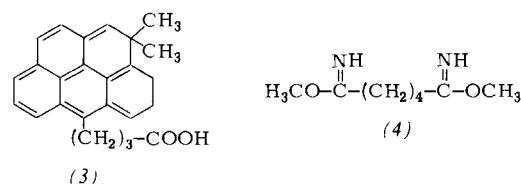
Man kann daraus schließen, daß nicht-gelierende Hämoglobine mindestens zwei wichtige Funktionen im Polymerisationsprozeß haben, die zum Teil dafür verantwortlich sein müssen,

daß das Sichelzell-Merkmal eine klinisch gutartige Bedingung ist. Die nicht-gelierenden Hämoglobine erhöhen die MGC und sie erhöhen den Desoxyhämoglobin-Spiegel, der vor Beginn des Polymerisationsvorgangs erreicht werden muß. Man erhofft sich von nicht-gelierenden Hämoglobinen auch, daß sie die Kinetik des Polymerisationsprozesses günstig beeinflussen, d. h. ihn verlangsamen.

## 7. Chemische Beeinflussung der Gelbildung

Ein wichtiges Ziel des Studiums der molekularen Aspekte der Desoxyhämoglobin-S-Polymerisation ist es, eine chemische Behandlungsmöglichkeit dieser schweren und weit verbreiteten Krankheit zu finden. Im Hinblick auf das, was man über die Polymerisation weiß, wurden mehrere Verbindungen auf ihre Anti-Sichelzell-Aktivität hin studiert. Die untersuchten Substanzen lassen sich in zwei Klassen einteilen: die einen bilden mit Hämoglobin S eine kovalente Bindung, die anderen beeinflussen den Polymerisationsvorgang ohne eine solche Bindung. Beispiele für nicht-kovalent eingreifende Substanzen sind Harnstoff<sup>[70]</sup>, organische Lösungsmittel<sup>[71]</sup>, Alkylharnstoffe<sup>[72]</sup>, Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Asparaginsäure<sup>[73]</sup> sowie 2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[c,d]pyren-6-buttersäure (3)<sup>[74]</sup>. Obwohl diese Verbindungen, die keine kovalenten Hämoglobin-S-Derivate bilden, in vitro unterschiedlich starke Aktivitäten gegen Sichelzellen entfalten, gibt es keinen schlüssigen Beweis, daß eine von ihnen die klinischen Symptome dieser Krankheit mildert. Bei mehreren dieser Verbindungen muß die Toxizität noch festgestellt werden.

Die am gründlichsten untersuchten kovalent eingreifenden Substanzen sind Cyanat<sup>[75–77]</sup>, Carbamylphosphat<sup>[78]</sup> und die bifunktionelle vernetzende Verbindung Dimethyladipimidat (4)<sup>[79]</sup>. Während die Toxizität der Verbindung (4) noch nicht



eindeutig geklärt ist, hat man Cyanat umfassend untersucht und an diesem Beispiel die beiden Hauptprobleme der kovalenten Modifikation erkannt: Es ist schwierig, in vivo ausschließlich Hämoglobin kovalent zu modifizieren, und zwar so, daß die Sauerstofftransport-Funktion nicht beeinträchtigt wird. Man wird daher versuchen, von den Aminosäuren einer Art nur einige zu modifizieren. Zum Beispiel hat man festgestellt, daß Cyanat bei der Behandlung von Erythrocyten zum großen Teil in das Hämoglobin eingebaut wird, und zwar vorwiegend in die Valinreste am Amino-Ende. Eine kleine Menge Cyanat wird aber auch an andere Proteine gebunden. Dies hat schädliche klinische Nebenwirkungen zur Folge, besonders am Nervensystem und am Auge. Aus Untersuchungen über die Carbamylierung von Hämoglobin S sind viele Prinzipien abgeleitet worden, die kürzlich von Manning<sup>[80]</sup> diskutiert wurden und die auch auf andere Untersuchungen, in denen die kovalente Modifizierung von Hämoglobin versucht wird, anwendbar sein sollten. Hämoglobin S wird in erster Linie an den Valinresten am Amino-Ende carbamyliert, wobei die Valinreste der  $\alpha$ -Kette schneller reagieren als die der  $\beta$ -Kette. Die Anti-Sichelzell-Wirkung von Cyanat scheint von zwei Effekten herzurühren:

ren. Durch Modifizierung der  $\alpha$ -Kette in der Nähe des Amino-Endes entsteht ein Hämoglobin S mit einer höheren Sauerstoffaffinität, das nur bei niedrigeren Sauerstoffdrücken polymerisiert<sup>[81]</sup>. Carbamyliert man andererseits die Reste der  $\beta$ -Kette in der Nähe des Amino-Endes, so nimmt die MGC von Hämoglobin S deutlich zu<sup>[81]</sup>. Eine kovalente Modifikation kann demnach vielfache Auswirkungen auf den Polymerisationsvorgang haben.

Bis heute hat man keine den Polymerisationsprozeß beeinflussende Substanz gefunden, die sich zur allgemeinen klinischen Behandlung der Sichelzellanämie eignete. Das bedeutet jedoch nicht, daß es eine solche Verbindung nicht gibt, und die Suche nach einem Mittel, das spezifisch die Gelbildung unterbindet oder verlangsamt, wird fortgesetzt werden. Sie wird umso rascher vor sich gehen, je mehr Kenntnisse man über die biochemischen Aspekte dieses Prozesses gewinnt.

Die oben genannten Verbindungen wurden untersucht, weil sie die Sichelbildung der Zellen unter verminderter Sauerstoffdruck verhindern können. Eaton et al. stellten kürzlich die interessante Hypothese auf, daß sich die klinischen Symptome der Sichelzellanämie durch Beeinflussung der in kinetischen Studien beobachteten Verzögerungszeit (siehe Abschnitt 4) mildern ließen<sup>[82]</sup>. Möglicherweise könnte die Verzögerungszeit durch irgendeine Behandlung soweit verlängert werden, daß sie länger würde als die Zeit, die die roten Blutkörperchen für den Durchgang durch den Blutkreislauf brauchen ( $\approx 15$  s). Unter diesen Umständen wäre die Reoxygenierung von Hämoglobin S der Vorgang, der die Sichelzellbildung verhinderte. Diese Hypothese öffnet der klinischen Untersuchung und der Grundlagenforschung fruchtbare Tätigkeitsfelder: Welche Rolle spielt die Verzögerungszeit für die Schwere der Krankheit, und welche Störungen in der Umgebung des Hämoglobins vermögen die Verzögerungszeit zu verlängern?

Letzten Endes mag die Lösung des Problems der Sichelzellanämie in der Aufklärung des Vorgangs liegen, die der Umstellung von der Synthese des fötalen Hämoglobins (Hämoglobin F) zur Synthese des Erwachsenen-Hämoglobins bewirkt. Da Erwachsene noch die Fähigkeit haben, fötales Hämoglobin zu synthetisieren, könnte es eines Tages möglich sein, die Synthese dieses Hämoglobins in Gang zu setzen und dadurch homozygote S/S-Individuen in heterozygote S/F-Individuen umzuwandeln. Da das Sichelzell-Merkmal eine klinisch gutartige Bedingung ist, werden in den kommenden Jahren in dieser Richtung besondere Anstrengungen gemacht werden.

## 8. Schlußbetrachtung

Die Autoren hoffen, daß Chemiker durch diesen etwas auswählenden Übersichtsaufsatz einen Einblick in die chemischen Vorgänge erhalten, die für die klinischen Symptome der Sichelzellanämie verantwortlich sind. Darüber hinaus wird der Leser neben den noch zu lösenden Problemen hoffentlich auch erkennen, mit welcher Energie diese Probleme in zahlreichen Laboratorien bearbeitet werden. Ohne übermäßig optimistisch zu sein, darf man erwarten, daß man gegen Ende dieses Jahrzehnts die strukturellen, kinetischen und thermodynamischen Merkmale der Eigenassoziation von Desoxyhämoglobin S viel besser verstehen wird und daß eine chemische Lösung des Problems in Sicht sein wird. Wahrscheinlich wird die Behandlung der Krankheit mehrere Phasen durchlaufen, die jeweils auf

tieferen Erkenntnissen der biochemischen und biophysikalischen Aspekte von Hämoglobin S basieren.

*Die Autoren danken der Sickle Cell Disease Branch des National Heart and Lung Institute, National Institutes of Health, für den Contract No. NOI-HB-2-2954. Einer von uns (M. R. W.) dankt den National Institutes of Health darüber hinaus für den Research Grant RO1-AM16188. Herrn Dr. John F. Bertles, der die elektronenmikroskopische Aufnahme für Abbildung 5 zur Verfügung stellte, sind die Autoren zu besonderem Dank verpflichtet.*

Eingegangen am 15. Juni 1976 [A 139]  
Übersetzt von Dr. Peter Puster, Ludwigshafen

- [1] J. B. Herrick, Arch. Intern. Med. 6, 517 (1910).
- [2] J. V. Neel, Science 110, 64 (1949).
- [3] J. G. Huck, Bull. Johns Hopkins Hosp. 34, 335 (1923).
- [4] L. Pauling, H. A. Itano, S. J. Singer u. I. C. Wells, Science 110, 543 (1949).
- [5] V. M. Ingram, Nature 180, 326 (1957).
- [6] D. G. Nathan u. H. A. Pearson: Hematology of Infancy and Childhood. Saunders, Philadelphia 1974, S. 419.
- [7] F. I. D. Konotey-Ahulu, Arch. Intern. Med. 133, 611 (1974).
- [8] S. Charache, Arch. Intern. Med. 133, 698 (1974).
- [9] P. F. Milner, Clinics in Haematol. 3, 289 (1974).
- [10] R. D. Levere: Sickle Cell Hemoglobin and Other Hemoglobinopathies. Academic Press, New York 1975.
- [11] J. W. Harris, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75, 197 (1950).
- [12] K. Singer u. I. Chernoff, Blood 7, 47 (1952).
- [13] K. Singer u. L. Singer, Blood 8, 1008 (1953).
- [14] H. A. Itano, Arch. Biochem. Biophys. 47, 148 (1953).
- [15] G. L. Cottam u. M. R. Waterman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1157 (1973).
- [16] R. Benesch, R. E. Benesch u. S. Yung, Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 261 (1973).
- [17] R. E. Benesch, S. Yung, R. Benesch, J. Mack u. R. G. Schneider, Nature 260, 219 (1976).
- [18] A. C. Allison, Biochem. J. 65, 212 (1957).
- [19] M. Murayama, Science 153, 145 (1966).
- [20] J. Hofrichter, D. G. Hendricker u. W. A. Eaton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3604 (1973).
- [21] J. C. A. Boeyens u. H. M. McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 22 (1966).
- [22] S. Ogawa u. H. M. McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 19 (1967).
- [23] M. R. Waterman, K. Yamaoka u. G. L. Cottam, Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 1058 (1974).
- [24] M. R. Waterman, K. Yamaoka u. G. L. Cottam: Proceedings of the First National Symposium on Sickle Cell Disease. DHEW Pub. No. 75-723, Bethesda 1974, S. 121.
- [25] P. D. Ross, J. Hofrichter u. W. A. Eaton, J. Mol. Biol. 96, 239 (1975).
- [26] B. Magdoff-Fairchild, W. N. Poillon, T.-I. Li u. J. F. Bertles, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 990 (1976).
- [27] T. Asakura, T. Ohnishi, S. Friedman u. E. Schwartz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1594 (1974).
- [28] C. Ho, L. W.-M. Fung, K.-L. C. Lin, G. S. Supinski u. K. J. Wiechelman: Proceedings of the Symposium on the Molecular and Cellular Aspects of Sickle Cell Disease. DHEW Pub., Dallas 1976, im Druck.
- [29] A. Riggs u. M. Wells, Biochim. Biophys. Acta 50, 243 (1961).
- [30] M. Seakins, W. N. Gibbs, P. F. Milner u. J. F. Bertles, J. Clin. Invest. 52, 422 (1973).
- [31] R. M. Winslow: Proceedings of the Symposium on the Molecular and Cellular Aspects of Sickle Cell Disease. DHEW Pub., Dallas 1976, im Druck.
- [32] J. G. Curd, D. Ludwig u. A. N. Schechter, J. Biol. Chem. 251, 1283 (1976).
- [33] J. G. Curd, N. S. Young u. A. N. Schechter, J. Biol. Chem. 251, 1290 (1976).
- [34] R. Malfia u. J. Steinhardt, Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 887 (1974).
- [35] W. Harris u. H. B. Bensusan, J. Lab. Clin. Med. 86, 564 (1975).
- [36] J. Hofrichter, P. D. Ross u. W. A. Eaton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4864 (1974).
- [37] K. Moffat u. Q. H. Gibson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 237 (1974).
- [38] W. A. Eaton, J. Hofrichter, P. D. Ross, R. G. Tschudin u. E. D. Becker, Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 538 (1976).
- [39] M. R. Waterman u. G. L. Cottam, Arch. Biochem. Biophys., im Druck.
- [40] R. W. Briehl u. S. Ewert, J. Mol. Biol. 80, 445 (1973).

- [41] R. C. Williams, Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1506 (1973).
- [42] W. W. Wilson, M. R. Luzzana, J. T. Penniston u. C. S. Johnson, Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1260 (1974).
- [43] T. R. Lindstrom u. S. H. Koenig, J. Magn. Reson. 15, 344 (1974).
- [44] R. W. Briechl: Proceedings of the Symposium on the Molecular and Cellular Aspects of Sickle Cell Disease. DHEW Pub., Dallas 1976. im Druck.
- [45] T. R. Lindstrom, S. H. Koenig, T. Boussios u. J. F. Bertles, persönliche Mitteilung (1976).
- [46] G. L. Cottam, K. M. Valentine, K. Yamaoka u. M. R. Waterman, Arch. Biochem. Biophys. 162, 487 (1974).
- [47] B. C. Thompson, M. R. Waterman u. G. L. Cottam, Arch. Biochem. Biophys. 166, 193 (1975).
- [48] A. H. Chuang, M. R. Waterman, K. Yamaoka u. G. L. Cottam, Arch. Biochem. Biophys. 167, 145 (1975).
- [49] G. L. Cottam u. M. R. Waterman, Arch. Biochem. Biophys., im Druck.
- [50] M. R. Waterman, K. Yamaoka, A. H. Chuang u. G. L. Cottam, Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 580 (1975).
- [51] A. P. Minton, J. Mol. Biol. 82, 483 (1974).
- [52] A. P. Minton, J. Mol. Biol. 95, 289 (1975).
- [53] A. P. Minton, Biophys. Chem. 1, 387 (1974).
- [54] A. P. Minton: Proceedings of the Symposium on the Molecular and Cellular Aspects of Sickle Cell Disease. DHEW Pub., Dallas 1976, im Druck.
- [55] C. A. Stetson, J. Exp. Med. 122, 341 (1966).
- [56] J. G. White, Arch. Intern. Med. 133, 545 (1966).
- [57] J. T. Finch, M. F. Perutz, J. F. Bertles u. J. Dobler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 718 (1973).
- [58] S. J. Edelstein, J. N. Telford u. R. H. Crepeau, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1104 (1973).
- [59] S. J. Edelstein, R. Josephs, R. H. Crepeau, J. N. Telford u. G. Dykes: Proceedings of the Symposium on the Molecular and Cellular Aspects of Sickle Cell Disease. DHEW Pub., Dallas 1976, im Druck.
- [60] B. Magdoff-Fairchild, P. H. Swerdlow u. J. F. Bertles, Nature 229, 217 (1972).
- [61] B. C. Wishner, K. B. Ward, E. E. Lattman u. W. E. Love, J. Mol. Biol. 98, 179 (1975).
- [62] B. C. Wishner, J. C. Hanson, W. M. Ringle u. W. E. Love: Proceedings of the Symposium on the Molecular and Cellular Aspects of Sickle Cell Disease. DHEW Pub., Dallas 1976, im Druck.
- [63] R. M. Bookchin, R. L. Nagel u. H. M. Ranney, J. Biol. Chem. 242, 248 (1967).
- [64] C. Levinthal, S. J. Wodak, P. Kahn u. A. K. Dadicarian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1330 (1975).
- [65] R. M. Bookchin, R. L. Nagel u. A. M. Ranney, Biochim. Biophys. Acta 221, 373 (1970).
- [66] R. M. Bookchin, R. L. Nagel, J. Mol. Biol. 60, 263 (1971).
- [67] R. M. Macleod u. R. J. Hill, J. Biol. Chem. 248, 100 (1973).
- [68] K. Moffat, Science 185, 274 (1974).
- [69] J. F. Bertles, R. Rabinowitz u. J. Dobler, Science 169, 375 (1970).
- [70] R. M. Nalbandian, R. L. Henry, P. L. Wolf u. F. R. Camp, Ann. Clin. Lab. Sci. 1, 26 (1971).
- [71] M. R. Waterman, K. Yamaoka, L. Dahm, J. Taylor u. G. L. Cottam, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2222 (1974).
- [72] D. Elbaum, R. L. Nagel, R. M. Bookchin u. T. T. Herskowitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4718 (1974).
- [73] J. A. Sophianopoulos, A. J. Sophianopoulos, J. S. Knowles u. R. J. Hill, Arch. Biochem. Biophys. 173, 517 (1976).
- [74] C. L. Natta, persönliche Mitteilung (1976).
- [75] A. Cerami u. J. M. Manning, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1180 (1971).
- [76] F. G. DeFuria, D. R. Miller, A. Cerami u. J. M. Manning, J. Clin. Invest. 51, 566 (1972).
- [77] C. K. Lee u. J. M. Manning, J. Biol. Chem. 248, 5861 (1973).
- [78] L. M. Kraus, A. Rasod u. A. P. Kraus, Adv. Exp. Med. Biol. 28, 279 (1972).
- [79] B. H. Lubin, V. Pena, W. C. Menteer, E. Byrum, T. B. Bradley u. L. Packer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 43 (1975).
- [80] J. M. Manning u. A. M. Nigen: Proceedings of the Symposium on the Molecular and Cellular Aspects of Sickle Cell Disease. DHEW Pub., Dallas 1976, im Druck.
- [81] A. M. Nigen, N. Njikam, C. K. Lee u. J. M. Manning, J. Biol. Chem. 249, 6611 (1974).
- [82] W. A. Eaton, J. Hofrichter u. P. D. Ross, Blood 47, 621 (1976).

## Ist Gold-Chemie aktuell?

Von Hubert Schmidbaur<sup>[\*]</sup>

Die im Titel dieses Fortschrittsberichts aufgeworfene Frage wird im folgenden Zug um Zug mit einem klaren Ja beantwortet: Von kompaktem Gold, Clustern von Goldatomen in niederen Valenzzuständen, den Verbindungen von Au<sup>I</sup>, Au<sup>II</sup>, Au<sup>III</sup> und Au<sup>IV</sup>, Organogoldderivaten, Ylid- und Carbenkomplexen bis hin zur katalytischen Aktivität des Golds erschließt sich ein lange Zeit vernachlässigtes Gebiet der Chemie, auf dem noch manche Entdeckung zu machen ist.

### 1. Einleitung

#### 1.1. Historisches

Metallisches Gold gilt von alters her als der Inbegriff materiellen Wertes. Die nach wie vor ungebrochene Übung, dieses Metall für Münzzwecke zu verwenden (wenn schon nicht für den direkten Zahlungsverkehr, so doch zur wertbeständigen und spekulativen Geldanlage), die wenigstens teilweise noch gültige Beziehung der echten Zahlungsmittel zu bestimmten nationalen Goldrücklagen (Fort Knox!) und schließlich die unangefochtene Bevorzugung des Golds als Grundelement von Schmuckgegenständen sind dafür naheliegender Grund und unübersehbarer Ausdruck. Daraus erwuchs schon früh

nicht nur für den Laien, sondern auch für den Chemiker die Vorstellung, daß dem Gold unter den Elementen eine Sonderstellung einzuräumen sei. Nicht selten trifft man auf das Vorurteil, daß die Beschäftigung mit der Gold-Chemie mangelndes Einschätzungsvermögen für die Realitäten erkennen lasse, da an eine Nutzbarmachung von Gold und seinen Verbindungen für andere als die eingangs angeführten Zwecke nicht zu denken wäre. Die Frage nach der „Relevanz“ müßte deshalb hier vorsorglich am besten ganz ausgeklammert werden.

In diesem Sinne mag man auch durch eine allgemeine Übersicht über die wichtigsten Elementkombinationen bestärkt werden, die zeigt, daß in den meisten chemischen Systemen das elementare Gold gegenüber seinen Verbindungen thermodynamisch deutlich bevorzugt ist<sup>[1]</sup>. Die Natur selbst hat Gold also als Edelmetall im wahrsten Sinne des Wortes prädestiniert. Mit Ausnahme der Kombinationen mit den stark oxidierenden

[\*] Prof. Dr. H. Schmidbaur  
Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität  
Arcisstraße 21, D-8000 München 2