

## UNTERSUCHUNGEN ZUR REAKTIVITÄT VON MetHb-UNTEREINHEITEN

J. BLANCK und W. SCHELER

*Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Greifswald, DDR*

Received 23 June 1969

The kinetics of methaemoglobin substitution reactions have been investigated by the stopped-flow technique. Biphasic reactions have been observed with adult and fetal methaemoglobin. This behaviour is attributed to different reactivities of the chain types. The investigations give evidence of an increasing chain reactivity in the sequence  $\alpha$ -chain  $<$   $\beta$ -chain  $<$   $\gamma$ -chain. The differences increase with the size of the substituting ligand, indicating steric effects.

### 1. Einleitung

Die kinetische Untersuchung von Hämoglobinreaktionen wurde in den letzten 20 Jahren unter verschiedenen Gesichtspunkten intensiv betrieben. Gegenwärtig werden vorwiegend Probleme der Reaktivität der verschiedenen Hb-Untereinheiten sowie deren wechselseitiger Beeinflussung bearbeitet. Die vorliegenden Untersuchungen an Methämoglobinen (MetHb) sollen hierzu beitragen. Wir untersuchten die Bindung der Liganden  $F^-$ ,  $CN^-$ ,  $OCN^-$ ,  $N_3^-$  und Imidazol an adultes und foetales menschliches Methämoglobin (MetHb A, MetHb F). Diese Reaktionen sind Substitutionsprozesse zweiter Ordnung, wobei das Eisen-koordinierte Wasser in Position 6 der Komplexstruktur des Hämins gegen den jeweiligen Liganden ausgetauscht wird [1].

### 2. Material und Methoden

MetHb A und MetHb F gewannen wir durch intraerythrozytäre Nitritoxidation [2]. MetHb F wurde an CM-Zellulose aus Nabelschnurblut fraktioniert. Die pH-Stabilität der Versuchslösungen war durch Borax-Phosphat-Puffer ( $J = 0,3$ ) pH = 7,0 gewährleistet. Die Versuche wurden mit einer stopped-flow-Apparatur (Totzeit 10 msec) durchgeführt. Bezogen auf die MetHb-Konzentration wurde mit einem Ligan-

denüberschuss gearbeitet; dadurch waren ausschliesslich pseudomonomolekulare Reaktionen zu analysieren. Im Umsatz/Zeit-Diagramm wurde als Umsatzparameter  $\log x_g/(x_g - x)$  ( $x$  = Komplexkonzentration zur Zeit  $t$ ,  $x_g$  = Gleichgewichtskonzentration des Komplexes bei  $t \rightarrow \infty$ ) aufgetragen.

### 3. Ergebnisse

Bei der Analyse der MetHb A Reaktionen fanden wir Anomalitäten in der Umsatz/Zeit-Charakteristik. Während für die Bindungsprozesse am monomeren Metmyoglobin (Pferd) [3] sowie am ebenfalls monomeren Neunaugen MetHb [4] die entsprechenden Reaktionsgeraden gewonnen wurden, erhielten wir hier abwärts gekrümmte Reaktionskurven, die eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstante beim Fortschreiten der Reaktion anzeigten. Bereits Jung beschrieb ein derartiges Verhalten für die Azid-Reaktion und nahm als Ursache Hämin-Hämin-Wechselwirkungseffekte an [5]. Diese können jedoch für MetHb ausgeschlossen werden [6]. Abb. 1 zeigt die Reaktionskurven für MetHb A im Umsatz/Zeit-Diagramm. Durch lineare Transformation der Zeitachse wurde auf einheitliche Anfangssteigung normiert. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die zweite Phase der Reaktionen auf einen gemeinsamen Ordinaten-schnittpunkt bei 0,3 extrapoliert werden kann. Das

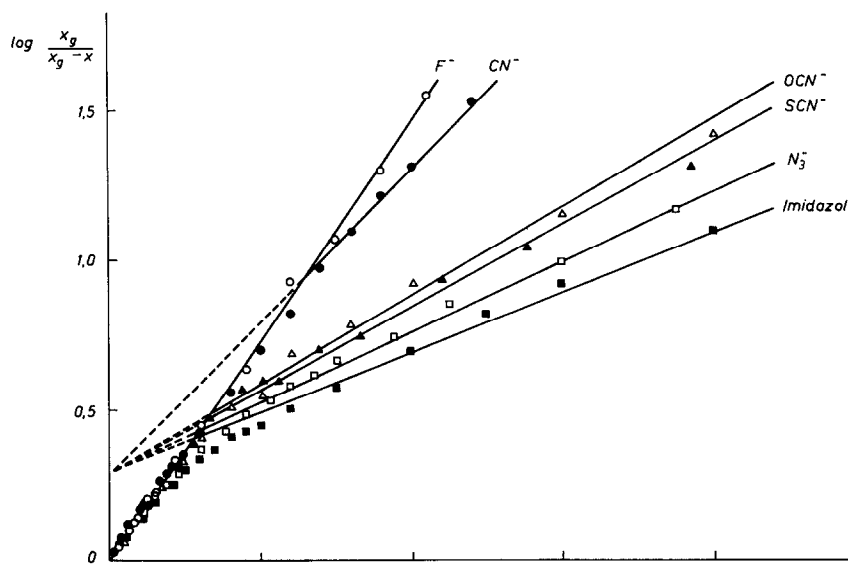


Abb. 1. Umsatz/Zeit-Kurven von Komplexbildungsreaktionen am MetHb A. Borax-Phosphat-Puffer ( $J = 0,3$ ) pH = 7,0;  $t = 20-21^\circ$ . Ordinate:  $\log x_g/(x_g-x)$ ;  $x$  = Komplekonzentration zur Zeit  $t$ ,  $x_g$  = Gleichgewichtskonzentration  $t \rightarrow \infty$ . Abszisse: Zeit (liganden-spezifisch auf gleiche Anfangssteigung transformiert).

Tabelle 1

Partialgeschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  für die biphasische Komplexbildung ( $k$ -Werte für die Gesamtreaktion wurden aus der Anfangssteigung der Reaktionskurven im Umsatz/Zeit-Diagramm berechnet). Borax-Phosphate-Puffer ( $J = 0,3$ ) pH = 7,0;  $t = 20-21^\circ$ .

	Ligand	$k$	$k_1$	$k_2$	$k_1/k_2$
MetHb A	$F^-$	4,8	5,9	3,7	1,6
	$CN^-$	$1,6 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	2,2
	$OCN^-$	$1,3 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$4,3 \times 10^1$	5,0
	$N_3^-$	$7,6 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$	5,2
	Im	$7,7 \times 10^1$	$1,3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^1$	6,2
MetHb F	$F^-$	7,4	$1,0 \times 10^1$	4,4	2,4
	$CN^-$	$2,5 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	2,6
	$OCN^-$	$2,2 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	$4,9 \times 10^1$	8,0
	$N_3^-$	$1,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^2$	9,8
	Im	$1,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^1$	12,0
Semi-MetHb A	$N_3^-$			$4,0 \times 10^2$	

Dimension von  $k$ ,  $k_1$ ,  $k_2 = [M^{-1} \text{ sek}^{-1}]$ .

Tabelle 2

Verhältnis der Partialgeschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  der biphasischen Komplexbildung ( $k$ -Werte für die Gesamtreaktion wurden aus der Anfangssteigung der Reaktionskurven im Umsatz/Zeit-Diagramm berechnet). Borax-Phosphat-Puffer ( $I = 0,3$ ) pH = 7,0;  $t = 20-21^\circ$ ; MetHb A.

Ligand	pK'	$k$ [ $M^{-1} \text{ sek}^{-1}$ ]	$k_1/k_2$
Imidazol	1,85	$7,7 \times 10^1$	6,2
<i>N</i> -Methylimidazol	1,05	$9,5 \times 10^1$	6,8
<i>N</i> -Äthylimidazol	0,42	$6,1 \times 10^1$	8,4
<i>N</i> -Vinylimidazol	0,66	$1,4 \times 10^2$	5,8

spricht für das Vorliegen zweier unabhängiger Partialreaktionen, von denen jede 50% der Gesamtreaktion ausmacht. Es liegt nahe, dieses Verhalten auf eine unterschiedliche Reaktivität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten zurückzuführen. Diese Differenzierung nimmt mit der Grösse des Liganden zu (Tabelle 1), wie auch die zusätzlichen Untersuchungen mit substituierten Imidazolen belegen (Tabelle 2). Offensichtlich spielen hier sterische Effekte eine Rolle.

Die Versuche wurden auf säulenchromatographisch gereinigtes MetHb F ausgedehnt. Wiederum fanden wir einen entsprechenden biphasischen Verlauf der

Ligandenbindung (Tabelle 1). Während die jeweils langsamere Reaktionsphase mit der am MetHb A annähernd übereinstimmte, verlief die erste Partialreaktion schneller als am MetHb A. Dieser Befund weist auf eine zunehmende Kettenreaktivität in der Reihenfolge  $\alpha$ -Kette <  $\beta$ -Kette <  $\gamma$ -Kette hin. Die stärkere Differenzierung der Kettentypen beim MetHb F kommt zahlenmässig im Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten beider Partialreaktionen  $k_1/k_2$  – wie sie in Tabelle 1 enthalten sind – zum Ausdruck. Liegen die Werte beim MetHb A zwischen 1,6 und 6,2, so finden wir beim MetHb F Werte zwischen 2,4 und 12.

Winterhalter et al. [7] konnten funktionelle Unterschiede zwischen den MetHb A-Kettentypen nachweisen. Sie fanden einen schnellen Hämintransfer von den  $\beta$ -Ketten des normalen Hb A auf die  $\alpha$ -Ketten zugegebenen Globins. Demzufolge ist die Hämin-Protein-Bindung in den  $\alpha$ -Ketten fester als in den  $\beta$ -Ketten. Ausgehend von diesen Ergebnissen haben wir MetHb A mit dem 2,5- bzw. 5-fachen Globinüberschuss [8] inkubiert und die Azidkinetik des Inkubates geprüft. Wir erhielten in beiden Fällen eine homogene Reaktion (Abb. 2). Es kann daher angenommen werden, dass hier ein vollständiger Übergang

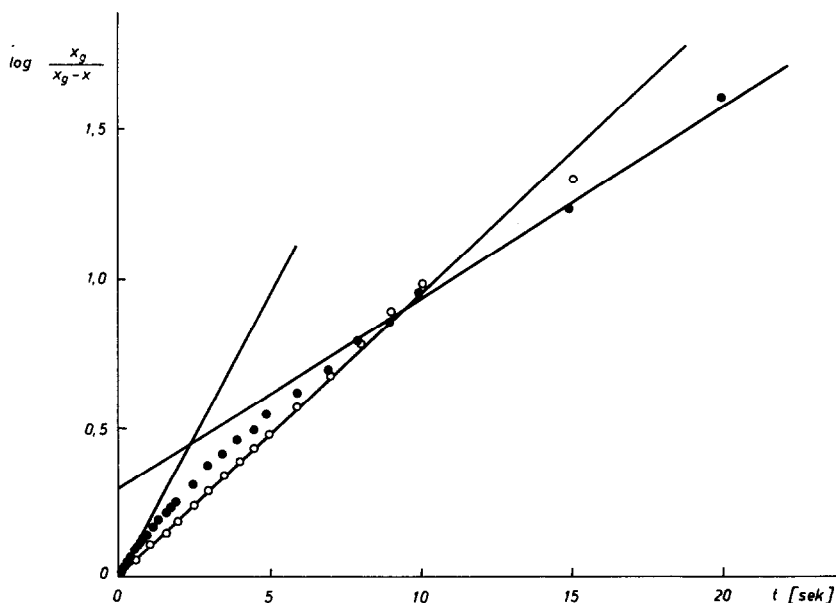


Abb. 2. Umsatz/Zeit-Kurven von Komplexbildungsreaktionen am MetHb A (●) sowie am MetHb A-Inkubats mit 5-fachem Globinüberschuss (○). Versuchsbedingungen wie in Abb. 1.

des  $\beta$ -Ketten-Hämins auf die freien  $\alpha$ -Ketten erfolgt war. Die Geschwindigkeit der Reaktion an dem so erhaltenen Semi-MetHb ( $\alpha_2^{\text{Hämin}}\beta_2^-$ ) liegt etwa 50% höher als die der entsprechenden  $\alpha$ -Ketten-Reaktion im MetHb A (Tabelle 1).

Die vorliegenden Befunde lassen sich zu folgenden Aussagen zusammenfassen:

(1) Die Übereinstimmung der zweiten Reaktionsphase für MetHb A ( $\alpha_2^{\text{Hämin}}\beta_2^{\text{Hämin}}$ ) und MetHb F ( $\alpha_2^{\text{Hämin}}\beta_2^{\text{Hämin}}$ ) sowie die schnellere erste Phase beim MetHb F belegen eine zunehmende Kettenreaktivität in der Reihenfolge  $\alpha$ -Kette <  $\beta$ -Kette <  $\gamma$ -Kette.

(2) Entsprechend dem geringeren Reaktivitätsunterschied zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten liegen die Verhältniszahlen für die Partialgeschwindigkeitskonstanten der biphasischen Ligandenbindung  $k_1/k_2$  für MetHb A zwischen 1,6 und 6,2, wegen des grösseren Reaktivitätsunterschiedes zwischen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Ketten für MetHb F jedoch zwischen 2,4 und 12.

(3) Die Zunahme des  $k_1/k_2$ -Quotienten mit der Grösse des Liganden weist auf sterische Ursachen der Reaktivitätsunterschiede hin. Das gilt von allem für die  $\alpha$ -Kette.

(4) Die geringe Zunahme der  $\alpha$ -Ketten-Reaktion im Semi-MetHb ( $\alpha_2^{\text{Hämin}}\beta_2^-$ ) verglichen mit der des MetHb A deutet auf eine unterschiedliche Beeinflussung der  $\alpha$ -Ketten durch häminfreie bzw. häminhaltige  $\beta$ -Ketten hin.

#### 4. Diskussion

Für unsere Interpretation der MetHb-Reaktionen sprechen auch die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen anderer Autoren. So wurde die ursprüngliche Konzeption der 4-Stufen-Reaktionen von Hämoglobinen mit 4 prosthetischen Gruppen [9] bereits durch Antonini eingeschränkt [10]. Er fand, dass  $\alpha\beta$ -Dimere sich kinetisch wie tetramere Moleküle verhalten. Wir untersuchten die Azid-Reaktion am dialysierten MetHb A — wo eine Aufspaltung in Dimere angenommen werden kann [11] — und stellten auch hier eine Übereinstimmung mit der Kinetik für tetramere Moleküle bei mittlerer Ionenstärke fest. Auf eine funktionelle Differenzierung der Kettentypen weisen u.a. die Arbeiten von Beychock et al. hin [12]. Sie fanden bei der Unter-

suchung des Zirkulardichroismus am Hb A, dass die  $\alpha$ -Ketten eine höhere Elliptizität bei 260 und 410 nm besitzen als die  $\beta$ -Ketten. Dieser Befund weist ebenfalls auf eine relativ schwächere Häm-Protein-Bindung in den  $\beta$ -Ketten hin, da MetHb-Komplexe mit high-spin-Charakter — d.h. also mit relativ geringerer Häm-Protein-Wechselwirkung — eine geringere Elliptizität aufweisen als entsprechende low-spin-Verbindungen. Die geringere Wechselwirkung in den  $\beta$ -Ketten aber könnte die Ursache für eine bessere Zugänglichkeit der prosthetischen Gruppe sein. Hayashi [13] konnte an MetHb M-Varianten zeigen, dass die Substitution von Histidin durch Tyrosin in beiden Kettentypen die Affinität zu anionischen Liganden wie  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{CN}^-$  und  $\text{F}^-$  stark herabsetzt.  $\alpha$ -Ketten-Substitution ist dabei wirksamer als eine solche in der  $\beta$ -Kette. Der grössere Abfall in der Azidaffinität verglichen mit der des Zyanids wird ebenfalls auf die Anionengrösse zurückgeführt. Kinetische Untersuchungen zur Azidbindung an M-Methämoglobin durch Epstein und Stryer [14] ergaben, dass im  $\alpha$ -abnormen Iwate-Hämoprotein nur die normalen  $\beta$ -Ketten den Liganden binden, während im  $\beta$ -abnormalen Hydepark-Typ Azid nur an die  $\alpha$ -Ketten gebunden wird. Die Geschwindigkeitskonstanten beider Reaktionen differieren etwa 40-fach, der höhere Wert kommt hierbei der  $\beta$ -Kette zu. In diesem Ergebnis ist sicherlich der Beitrag der Partnerkette ( $n$ ) zur jeweiligen Kettenreaktivität enthalten. Eine derartige Beeinflussung durch die Partnerkette oder durch deren Bausteine wurde durch Winterhalter et al. [15] sowie durch Parkhurst und Gibson [16] nachgewiesen. In diesem Sinne sollten auch die erwähnten Unterschiede bei der Azid-Bindung an MetHb A ( $\alpha_2^{\text{Hämin}}\beta_2^{\text{Hämin}}$ ) und Semi-MetHb ( $\alpha_2^{\text{Hämin}}\beta_2^-$ ) verstanden werden.

Editor's note: The non-equivalence of  $\alpha$  and  $\beta$  chains was also observed in the kinetics of oxidation of ferrohaemoglobin by E. Antonini, M. Brunori and J. Wyman, *Biochemistry* 4 (1965) 545.]

#### Literatur

- [1] L. Stryer, J. C. Kendrew und H. C. Watson, *J. Mol. Biol.* 8 (1964) 96.
- [2] W. Scheler, *Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin, math.-naturwiss. R.* 7 (1957/58) 223.

- [3] J.Blanck, W.Graf und W.Scheler, *Acta Biol. Med. Ger.* 7 (1961) 323.
- [4] J.Behlke, J.Blanck und W.Scheler, *In Vorbereitung.*
- [5] F.Jung, *Biochem. Z.* 329 (1957) 155.
- [6] J.Blanck und W.Scheler, *Acta Biol. Med. Ger.* 17 (1966) 821.
- [7] K.H.Winterhalter und D.A.Deranleau, *Biochemistry* 6 (1967) 3136.
- [8] H.J.Thiele, J.Behlke und W.Scheler, *Acta Biol. Med. Ger.* 12 (1964) 19.
- [9] G.S.Adair, *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A* 109 (1925) 292.
- [10] E.Antonini, E.Chiancone und M.Brunori, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 4360.
- [11] J.Behlke, W.Lampe und W.Scheler, *In Vorbereitung.*
- [12] S.Beychok, I.Tyama, R.Benesch und R.Benesch, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 2460.
- [13] A.Hayashi, A.Shimizu, T.Suzuki und Y.Yamamura, *Biochim. Biophys. Acta* 240 (1967) 251.
- [14] H.F.Epstein und L.Stryer, *J. Mol. Biol.* 32 (1968) 113.
- [15] K.H.Winterhalter, G.Amiconi und E.Antonini, *Biochemistry* 7 (1968) 2228.
- [16] L.Y.Parkhurst und Q.H.Gibson, *Fed. Proc.* 27 (2) (1968) 525.