

## DER EINFLUSS VON LIGANDEN AUF DEN ASSOZIATIONSGRAD DES DESOXY-HÄMOGLOBINS DER FLUSSNEUNAUGEN (*LAMPETRA FLUVIATILIS* L.)

J. BEHLKE und W. SCHELER

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

Received 6 February 1970

In alkaline aqueous solution, the sedimentation coefficients of DeoxyHb, HbO<sub>2</sub> and HbCO of *Lampetra fluviatilis* L. are  $1.9 \pm 0.1$  S. This value corresponds to a molecular weight of about 17,000, i.e. the value of a single haem polypeptide chain. In weak acidic conditions, both the non-liganded DeoxyHb and the liganded forms, HbO<sub>2</sub> and HbCO, associate to form dimers and oligomers. The monomer-oligomer transitions of these compounds take place at different pH values: DeoxyHb  $\text{pH}_{0.5} \sim 6.7$ ; HbO<sub>2</sub> and HbCO  $\text{pH}_{0.5} \sim 5.9$ . With respect to the association modus, the equilibrium:  $4 \text{ Hb} \rightleftharpoons 2 \text{ Hb}_2 \rightleftharpoons \text{Hb}_4$  may be preferred.

### 1. Einleitung

Das DesoxyHb der Seeneunaugen (*Petromyzon marinus*) liegt im alkalischen Milieu in Form singulärer Hämopolypeptidketten vor, mit zunehmender H<sup>+</sup>-Konzentration assoziieren die Protomeren zu dimeren und oligomeren Einheiten. Durch Oxygenierung des DesoxyHb im pH-Bereich zwischen 6–7 wird eine Spaltung in die Monomeren hervorgerufen [1]. Das DesoxyHb der Flußneunaugen (*Lampetra fluviatilis*) assoziiert im schwach sauren Milieu gleichfalls, während die MetHb-Form selbst bis pH 4,5 stets monomer vorliegt [2, 3]. Um zu prüfen, inwieweit Oxydation bzw. Ligandierung des zentralen Fe-Atoms des DesoxyHb das Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht der Protomeren in gleicher Weise und gleichen Ausmaß beeinflussen, studierten wir den Effekt von O<sub>2</sub> bzw. CO auf das Sedimentationsverhalten von Flußneunaugen-DesoxyHb in Abhängigkeit vom pH.

### 2. Methodik

Aus dem Blut frisch gefangener Lampreten wurde HbO<sub>2</sub> nach einer früher beschriebenen Methode präpariert [2]. Durch Begasen mit CO wurde HbCO erhalten. Sedimentationsuntersuchungen führten wir mit einer analytischen Ultrazentrifuge G 110, MOM Budapest, durch [4]. Die Sedimentationskoeffizienten,

S<sub>20,w</sub>, wurden in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bzw. in Abhängigkeit vom pH studiert. Als Puffer dienten 0,13 M Borax-Phosphat- bzw. 0,1 M Azetat-Puffer. Theoretische Sedimentationskoeffizienten eines assoziierten Hb (S<sub>n</sub>) lassen sich für eine definierte Zahl assoziierter Einheiten (n) aus der Sedimentationskonstanten der monomeren Einheit (S<sub>1</sub>) gemäß folgender Beziehung errechnen [5]:  $S_n = S_1 \times n^{2/3}$ .

### 3. Ergebnisse und Diskussion

1. DeoxyHb, HbO<sub>2</sub> und HbCO von *Lampetra fluviatilis* besitzen im alkalischen Milieu identische Sedimentationskoeffizienten. Sie betragen  $1,9 \pm 0.1$  S (Abb. 1). Das entspricht einem Molekulargewicht von etwa 17 000. Das aus der Aminosäurezusammensetzung zu errechnende Molekulargewicht liegt bei 16 450 [6]. Unter diesen Bedingungen liegen alle Formen des Flußneunaugen-Hb, einschließlich der MetHb- und der MetHb-Liganden-Formen [3] monomer vor.

2. Im schwach sauren Milieu assoziieren sowohl DesoxyHb, HbO<sub>2</sub> und HbCO, nicht aber MetHb (Abb. 1). Die Lage des Assoziationsgleichgewichtes ist stark pH-abhängig. Die Assoziation des DesoxyHb setzt bereits bei pH < 7,5, die von HbO<sub>2</sub> und HbCO erst bei pH < 6,5 stärker sein. Die Assoziationsreaktion ist eine Häm-gekoppelte Funktion. Offensichtlich wird sie vom

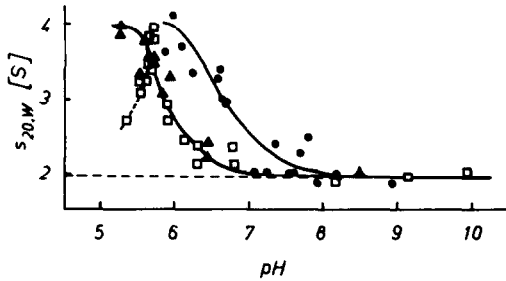


Abb. 1. pH-Funktion der Sedimentationskoeffizienten von Neunaugen-DesoxyHb(●), -HbCO(▲), -HbO<sub>2</sub>(◻) und -MetHb (gestrichelte Linie entsprechend [3]). Hb-Konzentration für die einzelnen Derivate: DesoxyHb 2,5–5,0 g/l, HbO<sub>2</sub> 2,5–17,5 g/l und HbCO 2,5–14,5 g/l. Puffer: 0,13 M Borax-Phosphat bzw. 0,1 M Azetat.

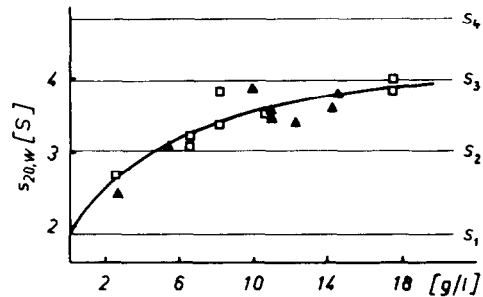


Abb. 2. Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten von Neunaugen-HbO<sub>2</sub>(◻) und -HbCO(▲), pH 5,3–5,8. Puffer: 0,1 M Azetat. Die theoretischen Werte für die Sedimentationskonstanten monomerer (S<sub>1</sub>), dimerer (S<sub>2</sub>), trimerer (S<sub>3</sub>) und tetramerer Einheiten (S<sub>4</sub>) wurden als Horizontalen eingezeichnet.

Ionisationsgrad eines Aminosäurerestes, der vom elektronischen Zustand des Fe abhängt, gesteuert. Der  $pK'$ -Wert dieser ionisierenden Gruppe liegt im DesoxyHb um 6,7, im HbO<sub>2</sub> und HbCO um 5,9. Die Lage dieses  $pK'$ -wertes spricht für die Beteiligung von Histidin-Imidazol. Die Tendenz seiner Verschiebung zu niedrigeren Werten bei Bindung von O<sub>2</sub> und CO entspricht dem bekannten alkalischen Bohreffekt bei der O<sub>2</sub>-bzw. CO-Anlagerung an Säuger-Hb.

3. Zwischen dem Einfluß von O<sub>2</sub> und CO auf die Sedimentation des DesoxyHb besteht kein signifikanter Unterschied. Die Erhöhung der H<sup>+</sup>-Konzentration beschleunigt die Autoxydation des HbO<sub>2</sub>, während das HbCO deutlich stabiler ist. Das entstehende MetHb ist monomer [2, 3]. Durch den zunehmenden MetHb-Gehalt fallen die  $S_{20,w}$ -Werte für HbO<sub>2</sub> bei pH < 5,8 wieder ab (vgl. Abb. 1).

4. Die Assoziation der Protomeren scheint eine komplexe Reaktion zu sein. In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration steigt der mittlere Assoziationsgrad auf etwa 3 (vgl. Abb. 2). Aus den bisherigen Untersuchungen läßt sich nicht zwischen den Möglichkeiten

- a                      b
- (1)  $4 \text{ Hb} \rightleftharpoons 2 \text{ Hb}_2 \rightleftharpoons \text{Hb}_4$  oder
- (2)  $n \text{ Hb} \rightleftharpoons (\text{Hb})_n$  mit  $n = 3$  differenzieren. Beobachtungen über die Assoziation der MetHb-Liganden-Komplexe von *Lampetra fluviatilis* sprechen für Gleichung (1); denn in jenem Fall erfolgt ausschließlich eine Di-

merisation entsprechend Teilgewicht (1a) [3]. Für den Assoziationsmodus (1) spricht auch, daß in den Kristallen von DesoxyHb und HbO<sub>2</sub> der Seeneunaugen 4 oder 8 Protomere pro asymmetrische Einheit vorliegen [7]. Allerdings sind auch Kristallformen mit 6 (HbCO, MetHb.CN) bzw. 12 Protomeren (MetHb.CN) pro Einheitszelle beschrieben worden [8].

5. Beim Vergleich der Assoziationsstendenz von Lampreten-HbO<sub>2</sub>, HbCO und MetHb ist bemerkenswert, daß Oxydation und Ligandierung des Eisens im DesoxyHb sich unterschiedlich auf die Protein-Protein-Wechselwirkungen der Protomeren auswirken. Die Elektronendichteverteilung oberflächlicher Aminosäurereste, die den Protein-Protein-Kontakt herstellen, unterscheidet sich somit bei Oxydation und Ligandierung des Zentralatoms. Das spricht für leichte Konformationsunterschiede der Hämopolypeptidketten in den verschiedenen Lampreten-Hb-Formen. Unsere Befunde korrelieren mit den Ergebnissen von Hendrickson, Love und Murray [8], die für Seeneunaugen-Hb-Kristalle reproduzierbare Unterschiede im Beugungsdiagramm in Abhängigkeit vom Oxydationszustand des Fe und dessen Ligandierung beschrieben.

Fräulein I.Nennmann und Frau I.Wandt danken wir für wertvolle technische Assistenz.

**Literatur**

- [1] R.W.Briehl, J. Biol. Chem. 238 (1963) 2361.
- [2] J.Behlke und W.Scheler, Acta Biol. Med. Ger. 21 (1968) 739.
- [3] J.Behlke und W.Scheler, in Vorbereitung.
- [4] J.Behlke und W.Scheler, European J. Biochem. 3 (1967) 153.
- [5] C.D.Cox, Arch. Biochem. Biophys. 129 (1969) 106.
- [6] G.Buse, S.Braig und G.Braunitzer, Z. Physiol. Chem. 349 (1969) 1686.
- [7] J.Greer, M.F.Perutz und N.Rumen, J. Mol. Biol. 18 (1966) 547.
- [8] W.A.Hendrickson, W.E.Love und G.C.Murray, J. Mol. Biol. 33 (1968) 829.