

# Die Kooperativität bei der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindung: Messungen mit Hilfe der <sup>13</sup>C-NMR-Spektrometrie

## The Cooperativity of the CO<sub>2</sub> Hb Binding: Measurement by <sup>13</sup>C-NMR Spectrometry

O. Burkhard und W. K. R. Barnikol

Physiologisches Institut der Universität Mainz, Saarstraße 21, D-6500 Mainz

Z. Naturforsch. **34 c**, 1112–1120 (1979); eingegangen am 2. Juli/21. August 1979

The detailed structure of the CO<sub>2</sub> Hb binding curve is of considerable physiological interest, because the carbamino derivatives, which are formed by the reaction of CO<sub>2</sub> with Hb, are responsible for the well known Haldane effect.

Under physiological conditions CO<sub>2</sub> binds to the four terminal NH<sub>2</sub>-groups of the protein chains of Hb and it is generally assumed, that there exists no cooperativity between these groups.

To examine whether this assumption is correct or not, we have measured the CO<sub>2</sub> Hb binding curve over a wide PCO<sub>2</sub>-range (from 0 kPa to about 70 kPa) by using <sup>13</sup>C-NMR spectrometry. Morrow and coworkers (1976) have shown that carbamino-Hb causes a specific NMR signal. The quantitative analysis of the NMR spectra were done according to the method of internal standard. By analyzing mixtures of known composition, we were able to show that this method is working. So we had to use the following equation:

$$Z = \frac{(I/I_{\text{Hb}})}{(I/I_{\text{Hb}})_{\text{max}}}$$

Z is the CO<sub>2</sub> saturation of Hb, I is the intensity of the carbamino signal, and I<sub>Hb</sub> is the intensity of the carbons of Hb, which are involved in the amide binding. (I/I<sub>Hb</sub>)<sub>max</sub> is (I/I<sub>Hb</sub>) at high PCO<sub>2</sub>, where Hb is completely saturated by CO<sub>2</sub>.

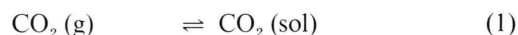
For our experiments we used solutions of human desoxygenated Hb, which were equilibrated with a mixture of N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. The CO<sub>2</sub> contained 90% <sup>13</sup>C-isotope. The pH was adjusted by titration to 7.2. The NMR measurements were mainly done with a Varian XL 100 NMR spectrometer.

The CO<sub>2</sub> Hb binding curve, we have measured, is S-shaped and has an average Hill value ( $\bar{n}$ ) of 2.1. This result is quite striking with respect to the findings of other groups. A Hill value of 2.1 proves that CO<sub>2</sub> like O<sub>2</sub> binds to Hb in a cooperative manner. The discrepancy to the results of other groups may be explained by the fact that these authors measured the CO<sub>2</sub> Hb binding curve only at comparatively low PCO<sub>2</sub>. In our opinion one can only get reliable n-values from the whole CO<sub>2</sub> Hb binding curve.

### Einleitung

CO<sub>2</sub> ist ein Abfallprodukt des Stoffwechsels und wird durch das Blut vom Gewebe zur Lunge transportiert und dort an die Außenluft abgegeben. Hämoglobin übt einen deutlichen Einfluß auf den CO<sub>2</sub>-Transport des Blutes aus. Die Wechselwirkung von Hämoglobin (Hb) mit CO<sub>2</sub> bildet weiterhin die Ursache dafür, daß der O<sub>2</sub>-Austausch in Lunge und Gewebe vom Partialdruck CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub>) abhängt. Dieses Phänomen wird als Haldane-Effekt bezeichnet. Die CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve spielt für das Verständnis des CO<sub>2</sub>-Transportes und des Haldane-Effektes eine entscheidende Rolle.

Die theoretische Grundlage für die meisten Arbeiten zur CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve bildet ein einfaches Reaktionsschema, wie es z. B. von Kilmartin und Rossi-Bernardi [1] formuliert wurde. Unter physiologischen Bedingungen werden im wesentlichen die folgenden Reaktionen berücksichtigt:



Sonderdruckanforderungen an Dr. O. Burkhard.  
0341-0382/79/1200-1112 \$ 01.00/0

Reaktion (1) beschreibt die Bildung von hydratisiertem CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> (g) bedeutet gasförmiges CO<sub>2</sub>



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

und CO<sub>2</sub> (sol) solvatisiertes CO<sub>2</sub>. Die Reaktionen (2), (3), (4) und (5) beschreiben allgemein bekannte Prozesse und bedürfen keiner weiteren Erläuterung. Wie Reaktion (6) zeigt, reagiert CO<sub>2</sub> mit den freien NH<sub>2</sub>-Gruppen von Hb unter Bildung eines Derivates der Carbaminsäure, sogenanntes Carbamino-Hb. Kilmartin und Rossi-Barnardi [2] und später Morrow *et al.* [3] konnten zeigen, daß sich CO<sub>2</sub> unter physiologischen Bedingungen ausschließlich an die terminalen NH<sub>2</sub>-Gruppen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins bindet. Erst bei höheren pH-Werten erfolgt auch eine Reaktion mit  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppen.

Unter der Bedingung, daß die Ionenstärke und der pH-Wert konstant gehalten werden, läßt sich das angegebene Reaktionsschema weiter vereinfachen:



mit:  $\text{HbCO}_2 = \text{HbNHCOO}^-$  und  $\text{Hb} = \text{HbNH}_2 + \text{HbNH}_3^+$ .

Für die Reaktion (7) kann man eine effektive Gleichgewichtskonstante ( $\lambda$ ) definieren, die von der H<sup>+</sup>-Konzentration abhängt und sich aus den Gleichgewichtskonstanten für die Reaktion (5) und (6) berechnen läßt:

$$\lambda = \frac{C_{\text{HbCO}_2}}{C_{\text{Hb}} \cdot C_{\text{CO}_2}} \quad (8)$$

$C_{\text{CO}_2}$  bedeutet die Konzentration von CO<sub>2</sub>. Analog sind auch die Größen  $C_{\text{HbCO}_2}$  und  $C_{\text{Hb}}$  definiert. Für die CO<sub>2</sub>-Sättigung des Hämoglobins (7) folgt somit:

$$Z = \frac{C_{\text{HbCO}_2}}{C_{\text{HbCO}_2} + C_{\text{Hb}}} = \frac{\lambda C_{\text{CO}_2}}{1 + \lambda C_{\text{CO}_2}} \quad (9)$$

Wenn diese Vorstellungen zutreffen, wie allgemein angenommen wird, dann muß man bei der Auftragung von  $1/Z$  gegen  $1/\text{CO}_2$  eine Gerade erhalten, deren Steigung den Wert  $1/\lambda$  und deren Achsenabschnitt den Wert 1 annimmt. Der Hill'sche Parameter ( $n$ ) muß in diesem Fall im ganzen Sättigungsbereich den Wert 1 annehmen:

$$\frac{1}{Z} = 1 + \frac{1}{\lambda} \frac{1}{C_{\text{CO}_2}}, \quad (10)$$

$$n \equiv \frac{d \log (Z/(1-Z))}{d \log P_{\text{CO}_2}} = 1. \quad (11)$$

Die Auswertung der Meßergebnisse nach Gleichung (10) und (11) ermöglicht es, das obige Modell zu überprüfen.

## Meßmethoden der Vorgänger

In mit CO<sub>2</sub> begasten Hämoglobinlösungen befinden sich CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und HbCO<sub>2</sub>. Die Gesamtkonzentration an CO<sub>2</sub> ( $C_{\text{CO}_2}^*$ ), die sich z. B. mit der van Slyke-Methode erfassen läßt, kann nach Gleichung (12) berechnet werden:

$$C_{\text{CO}_2}^* = C_{\text{CO}_2} + C_{\text{HCO}_3^-} + C_{\text{HbCO}_2} \quad (12)$$

Zur Messung der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve muß man jedoch ein Verfahren benutzen, welches die direkte Bestimmung der Größe  $C_{\text{HbCO}_2}$  gestattet. Von Ferguson und Roughton ist dieses Problem zuerst gelöst worden [4, 5]. Die Methode von Ferguson und Roughton hat später einige wesentliche Modifikationen erfahren (vgl. Perella *et al.* [6, 7]).

Perella *et al.* [6] berichteten weiterhin über eine andere Methode zur Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve, die auf kinetischen Messungen beruht. Die Grundlage für dieses Verfahren bilden die Arbeiten von Forster *et al.* [8], die die Kinetik der Anlagerung von CO<sub>2</sub> an Hämoglobin untersucht haben.

Beide Methoden haben den schwerwiegenden Nachteil, daß während der Messung das Gleichgewicht drastisch gestört ist. Zudem wird  $C_{\text{HbCO}_2}$  als Differenz gemessen (siehe Gleichung (12)). Weiterhin ist es mit beiden Methoden nur schwer möglich, auch bei hohen CO<sub>2</sub>-Sättigungen zu messen. Die Messung der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve über den ganzen Sättigungsbereich wäre jedoch gerade für die Überprüfung von Modellen interessant, denn die CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve charakterisiert in modellfreier Darstellung den molekularen Mechanismus der CO<sub>2</sub>-Hb-Reaktion, ganz in Analogie zur O<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve.

Die Messung der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve mit Hilfe der <sup>13</sup>C-NMR-Spektrometrie eröffnet neue Möglichkeiten. Denn bei dieser Methode erhält man für HbCO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> je ein eigenes Signal. Damit überhaupt ein HbCO<sub>2</sub>-Peak beobachtet werden kann, muß man jedoch die Lösung mit CO<sub>2</sub> begasen, das angereichertes <sup>13</sup>C-Isotop enthält. Es ist dann sehr einfach möglich, im Gleichgewicht die Konzentration von HbCO<sub>2</sub> zu bestimmen. Weiterhin gestattet es die NMR-Spektrometrie auch, im Bereich hoher Sättigungen die CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve zu erfassen.

Die ersten qualitativen <sup>13</sup>C-NMR-Spektren an Hb-Lösungen unter Verwendung von <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Gas

wurden von Matwigoff und Needham [9] veröffentlicht. Von Morrow *et al.* wurde dann in einigen Publikationen die qualitative Interpretation der <sup>13</sup>C-NMR-Spektren eingehend diskutiert [10, 11, 3]. Matthew *et al.* [12] haben bereits über die quantitative Analyse der <sup>13</sup>C-NMR-Spektren berichtet. Diese Autoren gingen jedoch von dem oben angegebenen Modell aus und bestimmten durch Anpassung der theoretischen Kurve an die Meßwerte mit Hilfe eines Computers die Modellparameter (z. B.  $\lambda$ ). Sie haben nicht den ersten Schritt getan und die Gültigkeit des Modells überprüft.

### Eigene Methodik

#### *Präparation der Lösung:*

Zur Präparation der Hb-Lösung wurde einem gesunden Nichtraucher jeweils etwa 10 ml Venenblut entnommen, mit Heparin ungerinnbar gemacht und etwa 24 h bei 37 °C inkubiert. Die gepackten Erythrocyten wurden kryolysiert, 4 ml Kryolysat wurden für je ein Experiment genommen. Anschließend wurde die Hb-Lösung mit 4 ml einer sogenannten Verdünnungslösung und mit etwa 1 ml einer Chloramphenicol-Lösung ( $\sim 3,4 \text{ mmol l}^{-1}$ ) versetzt. Die Verdünnungslösung wurde durch Lösen verschiedener Salze in D<sub>2</sub>O hergestellt. Sie war so beschaffen, daß das ionale Milieu im Inneren des Erythrocyten weitgehend simuliert ist (Na<sup>+</sup>: 12 mmol l<sup>-1</sup>; Mg<sup>2+</sup>: 3,28 mmol l<sup>-1</sup>; K<sup>+</sup>: 76,0 mmol l<sup>-1</sup>; Cl<sup>-</sup>: 78,9 mmol l<sup>-1</sup>; HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: 5,7 mmol l<sup>-1</sup>; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 12 mmol l<sup>-1</sup>). Um Membranbestandteile aus der Lösung zu entfernen, wurde bei 17000 U/min<sup>-1</sup> ( $\cong 18400 \text{ g}$ ) zentrifugiert und der Überstand über Millipore Filter (Porenweite 0,22  $\mu\text{m}$ ) filtriert.

Die so präparierte Hb-Lösung wurde dann in ein spezielles Tonometer gegeben. Dieses wurde anschließend etwa 20mal evakuiert und wieder mit N<sub>2</sub> begast. Durch diesen Prozeß gelang es, die Hb-Lösung sowohl von CO<sub>2</sub> als auch von O<sub>2</sub> zu befreien. Dann wurde die gewünschte Menge an <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> zugegeben und mit N<sub>2</sub> auf Barometerdruck aufgefüllt. Das verwendete <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> wurde von der Fa. Sharp und Dohme geliefert und enthielt zu 90% das Kohlenstoffisotop <sup>13</sup>C.

Das Tonometer besitzt einen Ansatz, der mit einer Silikon-Membran verschlossen ist. Diese Membran kann man mit Kanülen durchstechen, um durch Titration den pH-Wert der Hb-Lösung zu

korrigieren oder um Proben für die Blutgasanalyse zu entnehmen. Durch Zusatz von Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> wurden letzte Spuren von O<sub>2</sub> beseitigt. Die Äquilibration mit dem <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>-Gasgemisch erfolgte bei 37 °C.

#### *Einstellung und Messung der Parameter*

Der Partialdruck von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wurde mit dem Blutgasanalysator der Fa. Instrumentation Laboratory (Modell IL 213) oder der Fa. Radiometer Copenhagen (Modell BMS 3 MK 2) gemessen.

Zur Messung der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve muß die Ionenstärke, der pH-Wert und die Hb-Konzentration konstant gehalten werden. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 0,5 N KOH auf pH  $\approx 7,2$  eingestellt. Hierbei mußten zwangsläufig Variationen bezüglich der Ionenstärke in Kauf genommen werden. Bei niedrigen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken betrugen diese Änderungen weniger als 10%. Bei hohen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken (PCO<sub>2</sub> > 27 kPa) ist das Hämoglobin bereits weitgehend mit CO<sub>2</sub> aufgesättigt. Hier wird die Sättigung durch Änderung der Ionenstärke nur geringgradig beeinflusst.

#### *Messung und Auswertung der NMR-Spektren*

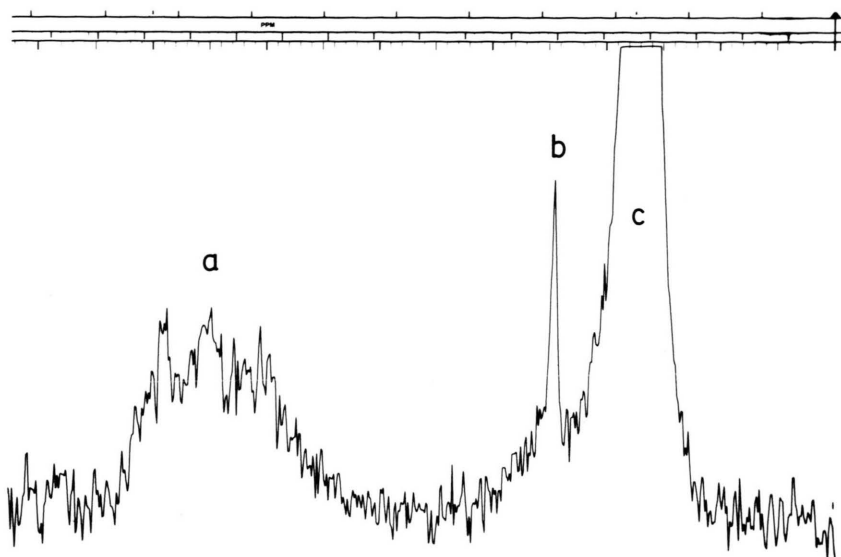
Die <sup>13</sup>C-NMR-Messungen wurden vorwiegend an einem NMR-Gerät der Fa. Varian (Typ XL 100) bei der Fa. Ch. Boehringer/Ingelheim durchgeführt. Die <sup>13</sup>C-Resonanz lag bei 25,2 MHz, das Magnetfeld betrug 23,4 KG ( $\cong 2,34 \text{ Tesla}$ ). Es wurden 30000 bis 80000 Pulse summiert. Die Messung erfolgte bei 37 °C.

Ein typisches NMR-Spektrum ist in Abb. 1 dargestellt, wobei nur ein Teil des Spektrums gezeigt ist.

Die Zuordnung der einzelnen Peaks läßt sich leicht mit Hilfe der Daten von Morrow *et al.* [3] durchführen. Peak a entspricht den C-Atomen des Hämoglobins, die in einer Amid-Bindung involviert sind. Die Intensität dieses breiten Peaks ist also ein Maß für die Hb-Konzentration. Peak b entspricht dem Carbamino-Hb. Peak c wird durch HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen verursacht.

Bei der quantitativen Auswertung der <sup>13</sup>C-NMR-Spektren müssen einige Faktoren berücksichtigt werden. Die Intensität des NMR-Signals wird nämlich durch NOE (Nuclear Overhauser Effekt) und durch apparative Parameter merklich beeinflusst. Um derartige Störungen möglichst zu vermeiden, wurden alle Spektren unter gleichen Bedingungen

Abb. 1. Typisches <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum einer desoxygenierten Hb-Lösung, welche mit <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> begast wurde.



aufgenommen. In diesem Fall gilt für die Intensität des Signals einer bestimmten Kernspezies ( $I_K$ ) die Gleichung (13):

$$I_K = f_K f_u C_K. \quad (13)$$

$f_K$  ist ein für die Kernspezies spezifischer Faktor und  $f_u$  ein Faktor der den Einfluß von Geräteparametern berücksichtigt und der von Messung zu Messung variieren kann.  $C_K$  ist die Konzentration der Kernspezies  $K$ . Für die Auswertung der Resultate eignet sich im vorliegenden Fall besonders die Methode des inneren Standards. Bei diesem Verfahren wird das Signal der zu analysierenden Verbindung auf das Signal einer in der Probe in bekannter Konzentration vorhandenen Referenzsubstanz ( $I_{\text{ref}}$ ) bezogen:

$$\frac{I_K}{I_{\text{ref}}} = \frac{f_K}{f_{\text{ref}}} \frac{C_K}{C_{\text{ref}}} = k \frac{C_K}{C_{\text{ref}}}. \quad (14)$$

$I_{\text{ref}}$ ,  $f_{\text{ref}}$  und  $C_{\text{ref}}$  haben die gleiche Bedeutung wie die Größen  $I_K$ ,  $f_K$  und  $C_K$  und gelten für die Referenzsubstanz. Wichtig ist, daß bei der Auswertung nach Gleichung (14) der Faktor  $f_u$  verschwindet.  $k$  ist ein Proportionalitätsfaktor. Als Maß für die Intensität eines Signals wurde das Integral über dieses Signal genommen.

Um experimentell zu zeigen, daß die Auswertung der NMR-Daten gemäß Gleichung (14) zulässig ist,

wurden Lösungen vermessen, die gleichzeitig Dioxan, Kaliumacetat, Methanol, Glycerin und Aceton in bekannten Konzentrationen enthielten. D<sub>2</sub>O diente als Lösungsmittel. Dioxan wurde als Referenzsubstanz gewählt. Für die Auswertung dieser Experimente wurden die folgenden Abkürzungen eingeführt:  $I = I_K$ ;  $I_D = I_{\text{ref}}$ ;  $C = C_K$ ;  $C_D = C_{\text{ref}}$ .

In den Abb. 2, 3 und 4 ist ( $I/I_D$ ) gegen den Quotienten ( $C/C_D$ ) aufgetragen. Nach Gleichung (14) muß eine Gerade resultieren, die durch den Koordinatenursprung verläuft.

Die experimentellen Befunde zeigen eindeutig, daß Gleichung (14) im Rahmen der Reproduzierbarkeit erfüllt ist. Die Methode des inneren Standards eignet sich also sehr gut für die quantitative Auswertung von <sup>13</sup>C-NMR-Spektren. Der Meßfehler beträgt 5–10%. Die Einwaagekonzentration der einzelnen Verbindungen betrug größenordnungsmäßig etwa 400 mmol l<sup>-1</sup>, die Konzentration der einzelnen <sup>13</sup>C-Kernspezies somit etwa 4 mmol l<sup>-1</sup>. Dies entspricht auch ungefähr der Größenordnung der Konzentration des <sup>13</sup>C-Carbamino-Hämoglobins.

Bei der Messung der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve wurden die C-Atome des Hämoglobins als innerer Standard gewählt, die in einer Amid-Bindung involviert sind.  $I_{\text{HB}}$  bedeutet also die Intensität der Bande a von Abb. 2 (d. h. das Integral über diese Bande).  $I$  ist die Intensität des Carbamino-Signals, also die Intensität des Peak b. Unter Verwendung

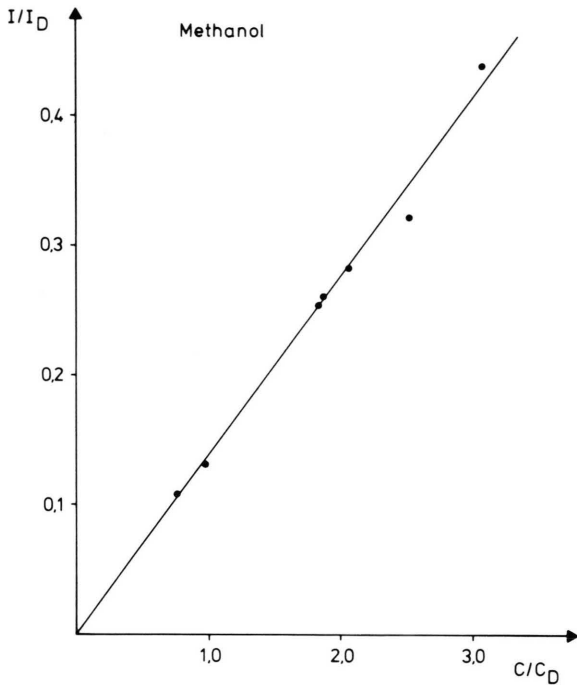


Abb. 2. Abhängigkeit von  $(I/I_D)$  von  $(C/C_D)$  für Methanol.  $I$  = Intensität der CH<sub>3</sub>-<sup>13</sup>C-Atome des Methanols;  $I_D$  = Intensität der CH<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C-Atome des Dioxans;  $C$  = Konzentration des Methanols;  $C_D$  = Konzentration des Dioxans.

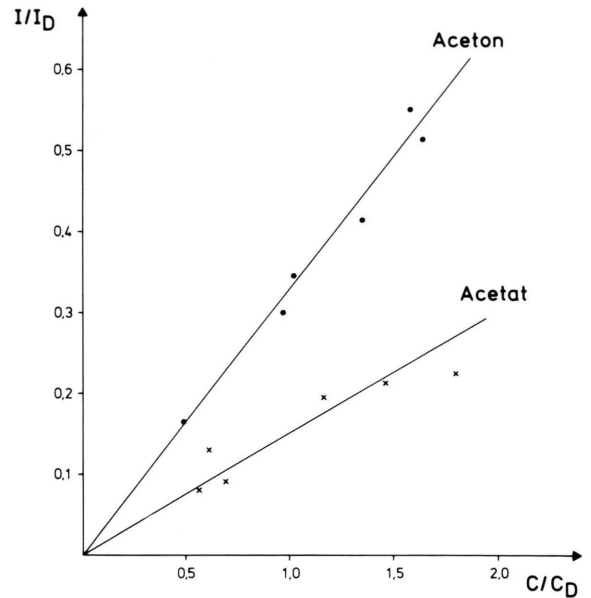


Abb. 4. Abhängigkeit von  $(I/I_D)$  von  $(C/C_D)$  für Aceton und Acetat.  $I$  = Intensität der CH<sub>3</sub>-<sup>13</sup>C-Atome des Acetons bzw. des Acetats;  $I_D$  = Intensität der CH<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C-Atome des Dioxans;  $C$  = Konzentration des Acetons bzw. Acetats;  $C_D$  = Konzentration des Dioxans.

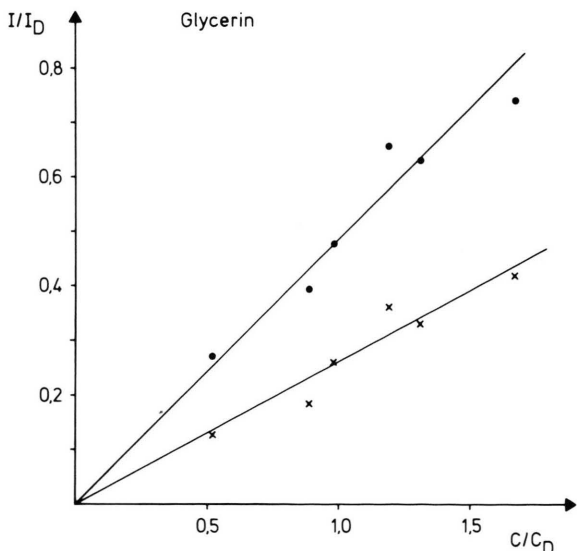


Abb. 3. Abhängigkeit von  $(I/I_D)$  von  $(C/C_D)$  für die beiden Kernspezies von Glycerin. ●●● = CH<sub>2</sub>-OH-Gruppen; ××× = CHOH-Gruppe.  $I$  = Intensität der CH<sub>2</sub>OH-<sup>13</sup>C-Atome bzw. der CHOH-<sup>13</sup>C-Atome des Glycerins;  $I_D$  = Intensität der CH<sub>2</sub>-<sup>13</sup>C-Atome des Dioxans;  $C$  = Konzentration des Glycerins;  $C_D$  = Konzentration des Dioxans.

von Gleichung (14) folgt nun direkt für die CO<sub>2</sub>-Sättigung von Hb:

$$\frac{I}{I_{Hb}} = k \frac{C_{HbCO_2}}{C_{HbCO_2} + C_{Hb}} = k Z. \quad (15)$$

Für hohe CO<sub>2</sub>-Partialdrucke muß die CO<sub>2</sub>-Sättigung des Hämoglobins den Wert 1 annehmen, d. h.  $I/I_{Hb}$  muß dann einen maximalen und konstanten Wert haben. Aus  $(I/I_{Hb})_{max}$  läßt sich die Konstante  $k$  bestimmen. Hierbei bedeutet  $(I/I_{Hb})_{max}$  den Wert von  $(I/I_{Hb})$  bei hohen CO<sub>2</sub>-Partialdrucke. Es gilt also:

$$Z = \frac{(I/I_{Hb})}{(I/I_{Hb})_{max}}. \quad (16)$$

Die CO<sub>2</sub>-Sättigung des Hämoglobins wurde gemäß Gleichung (16) berechnet.

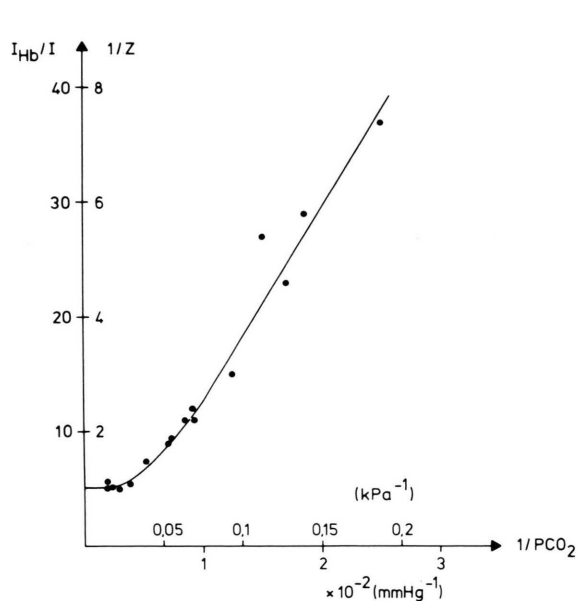
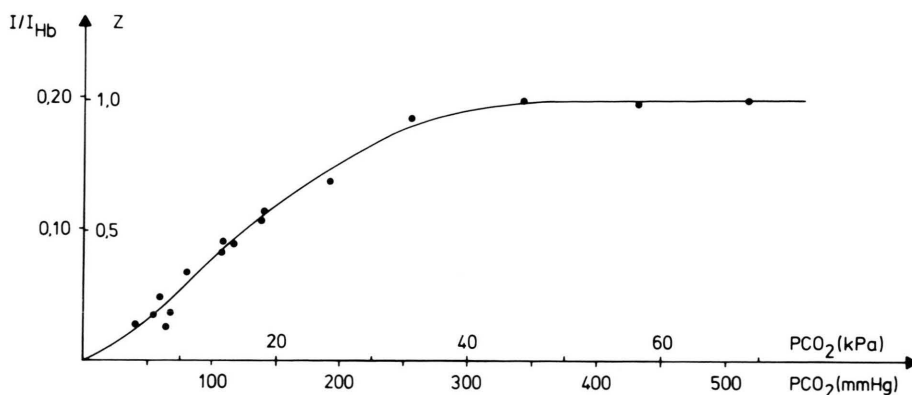
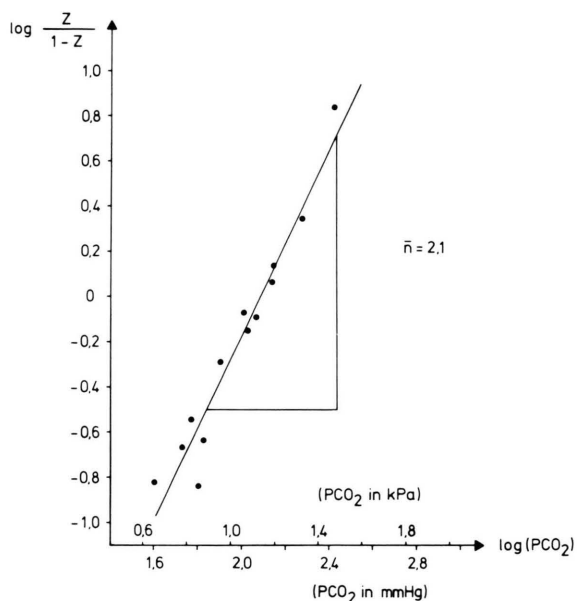
### Ergebnis der Messungen

Abb. 5 zeigt die gemessene CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve. Die Untersuchungen haben sich über einen großen PCO<sub>2</sub>-Bereich erstreckt. Für CO<sub>2</sub>-Partialdrucke größer als 30 kPa ( $\approx 220$  mmHg) ist Hämoglobin praktisch vollständig mit CO<sub>2</sub> gesättigt. Der

Abb. 5. CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve.

pH = 7,19 ± 0,02

Temp. = 37°C

C<sub>Hb</sub> = 11,1 ± 2,5 g/dlAbb. 6. 1/Z in Abhängigkeit von 1/PCO<sub>2</sub>.Abb. 7.  $\log(Z/(1-Z))$  in Abhängigkeit von  $\log PCO_2$ .

Halbsättigungsdruck ( $PCO_{2;0,5}$ ) beträgt 16 kPa ( $\approx 120$  mmHg). Es fällt auf, daß die Form der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve nicht eine Hyperbel ist, wie es die einfache Theorie voraussagt, sondern eine S-Form aufweist.

Wie eingangs erwähnt wurde, sollte die Auftragung von  $1/Z$  gegen  $1/PCO_2$  eine Gerade ergeben. In Abb. 6 ist dieser Zusammenhang dargestellt. Experimentell resultiert ein Kurvenverlauf, der sich keinesfalls durch eine Gerade approximieren läßt.

Der Hillische Parameter ( $n$ ) bildet ein weiteres Kriterium für die Gültigkeit des einfachen Modells.

In Abb. 7 ist die Größe  $\log(Z/(1-Z))$  in Abhängigkeit von  $\log PCO_2$  aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden liefert den mittleren Hillischen Parameter ( $\bar{n}$ ). Es wurde für  $\bar{n}$  ein Wert von  $2,1 \pm 0,2$  gefunden. Dieses Ergebnis weicht entscheidend von den Resultaten anderer Autoren ab. So berichteten Perella *et al.* [6], daß  $\bar{n} = 0,92$  ist.

### Diskussion der Resultate

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren wurde eine S-förmige CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve



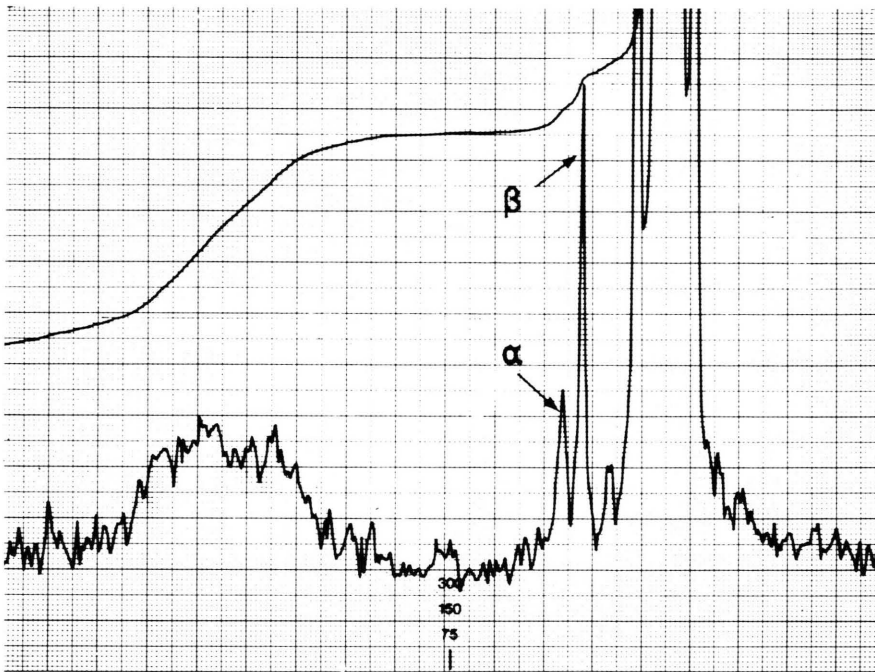


Abb. 8. <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum einer desoxygenierten mit <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> begasten Hb-Lösung bei voller CO<sub>2</sub>-Sättigung und pH = 7,57.

gefunden. Dies bedeutet, daß bei der Reaktion von CO<sub>2</sub> mit Hb homologe kooperative Wechselwirkungen auftreten. Nur bei kooperativen Wechselwirkungen kann  $\bar{n} > 1$  werden. Somit wird jede Bindungsstelle des Hämoglobins für CO<sub>2</sub> durch die übrigen CO<sub>2</sub>-Bindungsstellen merklich beeinflusst. Einfache Vorstellungen, wie sie eingangs diskutiert wurden, stehen somit eindeutig im Widerspruch zu den experimentellen Befunden.

Einwände, daß apparative Parameter oder Fehler in der Auswertung zu diesem Resultat führen, können ausgeschlossen werden. Die Experimente mit den Gemischen verschiedener Substanzen zeigen eindeutig, daß die Auswertung nach Gleichung (15) und somit auch nach Gleichung (16) zuverlässig ist.

Das Carbamino-Signal wird aber von zwei unterschiedlichen R-NH<sup>13</sup>COO<sup>-</sup>-Gruppen verursacht. Für R kann man nämlich die  $\alpha$ -Kette oder die  $\beta$ -Kette einsetzen. Es ist natürlich nicht selbstverständlich, daß das Signal der  $\alpha$ -NH<sup>13</sup>COO<sup>-</sup>-Gruppen ( $\cong \alpha$ -<sup>13</sup>C-Signal) mit der gleichen Empfindlichkeit gemessen wird, wie das Signal der  $\beta$ -NH<sup>13</sup>COO<sup>-</sup>-Gruppen ( $\cong \beta$ -<sup>13</sup>C-Signal).

Morrow *et al.* [3] haben gezeigt, daß sich bei hohen pH-Werten die  $\alpha$ -<sup>13</sup>C- und  $\beta$ -<sup>13</sup>C-Signale auflösen lassen. Es wurde daher bei einem pH-Wert von 7,58 und einem PCO<sub>2</sub> von 35 kPa das <sup>13</sup>C-NMR-

Spektrum einer mit <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> begasten, desoxygenierten Hb-Lösung gemessen. Abb. 8 zeigt einen Ausschnitt von dem erhaltenen NMR-Spektrum. Peak  $\alpha$  entspricht dem  $\alpha$ -<sup>13</sup>C- und Peak  $\beta$  dem  $\beta$ -<sup>13</sup>C-Signal.

Die Integration ergab, daß im Rahmen der Meßgenauigkeit die Intensitäten beider Signale gleich sind. Da bei einem PCO<sub>2</sub> von 35 kPa Hb vollständig aufgesättigt ist, folgt zwangsläufig, daß das  $\alpha$ -<sup>13</sup>C- und  $\beta$ -<sup>13</sup>C-Signal mit gleicher Empfindlichkeit gemessen werden.

Weiterhin werden bei einem pH von 7,2 selbst bei hohen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken (> 27 kPa) nur vier CO<sub>2</sub>-Moleküle an ein Hb-Molekül gebunden. Die ausgiebigen Untersuchungen von Morrow *et al.* [3] zeigen nämlich, daß erst bei einem pH 7,5 und mittleren PCO<sub>2</sub>-Werten eine merkliche Reaktion von CO<sub>2</sub> mit  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppen erfolgt. Da ein typisches Sättigungsverhalten beobachtet wurde (d. h. die CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve verläuft für PCO<sub>2</sub> > 30 kPa parallel zur PCO<sub>2</sub>-Achse) ist bei pH = 7,2 und PCO<sub>2</sub> > 30 kPa die Bindung von CO<sub>2</sub> an  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppen zumindest in dem beobachteten Bereich vernachlässigbar. Das NMR-Signal der  $\epsilon$ -Carbamino-Gruppe sollte auch einen weiteren Peak ergeben, der sich von dem Signal der vier terminalen Carbamino-Gruppen unterscheiden läßt. Ein solcher Peak wurde unter den angegebenen Bedingun-

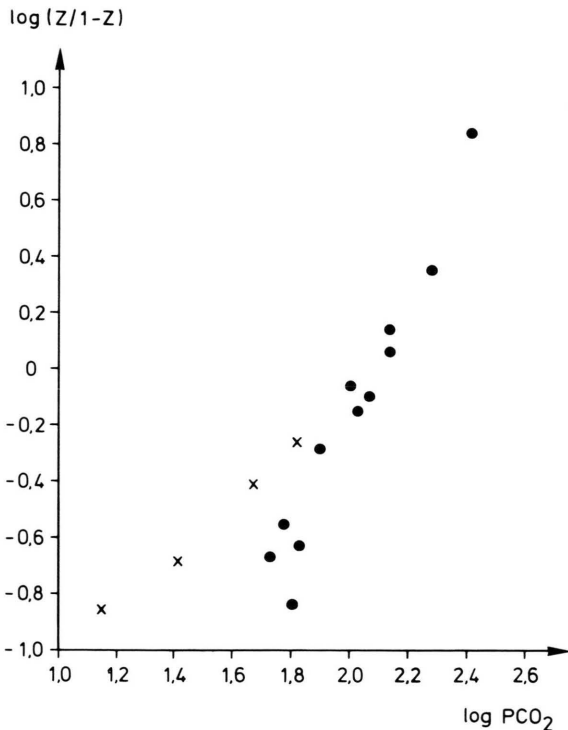


Abb. 9. Abhängigkeit von  $\log(Z/(1-Z))$  von  $\log PCO_2$ . ●●● = eigene Werte ( $\bar{n} = 2,1$ ); xxx = Werte von Perella *et al.* [ $\bar{n} = 0,92$ ].

gen nicht beobachtet. Die Annahme, daß Hb für einen  $PCO_2$  größer als 27 kPa mit CO<sub>2</sub> voll aufgesättigt ist, ist somit gerechtfertigt.

Es wird auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet, daß die Anlagerung von CO<sub>2</sub> nicht nach dem einfachen Modell erfolgt (vgl. [6, 7, 13]). Allerdings ließ sich das Ergebnis dieser Autoren sehr leicht durch die Annahme erklären, daß CO<sub>2</sub> sich an die  $\alpha$ -Ketten mit einer anderen Bindungskonstanten anlagert als an die  $\beta$ -Ketten. Es wurden also zwei unabhängige Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität angenommen. Es war jedoch nicht erforderlich, kooperative Wechselwirkungen zu postulieren. In diesem Fall muß, wie sich auch theoretisch zeigen läßt, der Hillsche Parameter kleiner als 1 sein. Dies konnte auch von diesen Autoren experimentell verifiziert werden. Unser Ergebnis ( $n = 2,1 > 1$ ) muß als Beweis dafür gewertet werden, daß die Anlagerung von CO<sub>2</sub> an Hb einem völlig anderen Mechanismus folgt.

Nachdem gezeigt wurde, daß die <sup>13</sup>C-NMR-Methode keinen systematischen Fehler aufweist, bleibt

nun die Frage zu klären, warum so große Abweichungen zu den Resultaten anderer Autoren auftreten. Hierzu wurden in Abb. 9 die Daten von Perella *et al.* [6] in die Hill-Auftragung zusammen mit eigenen Werten eingezeichnet. Perella *et al.* [6] haben unter ähnlichen Bedingungen ihre Untersuchungen durchgeführt. Daher ist ein direkter Vergleich der Meßergebnisse möglich.

Abb. 9 zeigt deutlich, daß Perella *et al.* [6] die CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve nur in einem relativ engen Sättigungsbereich untersucht haben. Dies erscheint der wesentliche Grund für die beobachteten Abweichungen zu sein.

Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge ist es angebracht, kurz die sogen.  $n(S)$ -Funktion zu diskutieren, und zwar für die O<sub>2</sub>-Hb-Bindung. Die Ergebnisse sind auf CO<sub>2</sub> direkt übertragbar. Die detaillierte Analyse der O<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve hat ergeben, daß der Hillsche Parameter ( $n$ ), betrachtet man den gesamten Bereich der Sättigung, nicht konstant ist. Es wird noch nicht einmal im mittleren Sättigungsbereich ein annähernd konstanter  $n$ -Wert gefunden, wie es von der Adair-Hypothese vorausgesagt wird (vgl. [14, 15]). Deshalb ist es richtiger und sinnvoller, soweit es die Meßgenauigkeit zuläßt, nicht einen mittleren Hillschen Parameter  $\bar{n}$  anzugeben, sondern den Hillschen Parameter in Abhängigkeit von der O<sub>2</sub>-Sättigung des Hämoglobins ( $S$ ) aufzutragen. Die Kurve, die hierbei erhalten wird, wird als  $n(S)$ -Funktion bezeichnet. Typische  $n(S)$ -Funktionen sind deutlich asymmetrisch und weisen 2–3 Maxima auf.

Der mittlere Hillsche Parameter ( $\bar{n}$ ) wird üblicherweise als Mittelwert der  $n$ -Werte über einen Sättigungsbereich von etwa 20% bis etwa 80% angegeben. Charakteristisch für die gemessene  $n(S)$ -Kurve ist die Tatsache, daß die  $n(S)$ -Funktion gerade bei niedrigen O<sub>2</sub>-Partialdrücken erheblich vom mittleren Hillschen Parameter nach unten abweicht. Auch durch theoretische Überlegungen kann gezeigt werden, daß besonders große Abweichungen von  $\bar{n}$  gerade bei sehr niedrigen oder sehr hohen Sättigungen zu erwarten sind.

Für die CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve läßt sich in analoger Weise eine  $n(Z)$ -Funktion definieren. Aufgrund der geringen Meßgenauigkeit kann jedoch in diesem Fall nur ein  $\bar{n}$  angegeben werden. Qualitativ wird sich jedoch die  $n(Z)$ -Kurve ähnlich wie die  $n(S)$ -Kurve verhalten. Perella *et al.* [6] haben die CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve gerade in einem ungünsti-



gen Bereich ausgewertet. Wahrscheinlich ist dies die Ursache dafür, daß diese Autoren einen zu kleinen *n*-Wert gefunden haben.

Durch die Messung über einen großen PCO<sub>2</sub>-Bereich war es erst möglich, neue Aspekte aufzudecken. Die Angabe eines mittleren Hillschen Parameters ist zudem nur dann sinnvoll, wenn man einen Sättigungsbereich zwischen 20 und 80% auswerten kann.

Wesentlich ist auch, daß in die Darstellung der Ergebnisse primär kein Modell hineingetragen wurde. Diese modellfreie Betrachtungsweise hat erst die Aufdeckung der positiven Kooperativität der CO<sub>2</sub>-Hb-Bindung ermöglicht und unterscheidet sich in dieser Beziehung entscheidend von der Analyse von Matthew *et al.* [12].

Die üblichen Vorstellungen zur CO<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurve müssen aufgrund der vorliegenden Befunde erheblich modifiziert werden. Im Grunde war auch eine nichtkooperative CO<sub>2</sub>-Hb-Bindung nicht zu erwarten, nachdem lange bekannt ist, daß erstens die O<sub>2</sub>-Hb-Bindung stark positiv kooperativ ist, und daß zweitens zwischen CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Bindung eine enge Wechselbeziehung besteht.

#### Danksagung

Wir danken Herrn Dr. Pook und Herrn Pryss von der Fa. Ch. Boehringer/Ingelheim für die Durchführung der NMR-Messungen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

- [1] J. V. Kilmartin u. L. Rossi-Bernardi, *Physiol. Rev.* **53**, 836 – 890 (1973).
- [2] J. V. Kilmartin u. L. Rossi-Bernardi, *Biochem. J.* **124**, 31 – 45 (1971).
- [3] J. S. Morrow, J. B. Matthew, R. J. Wittebort u. F. R. N. Gurd, *J. Biol. Chem.* **251**, 477 – 484 (1976).
- [4] J. K. W. Ferguson u. F. J. W. Roughton, *J. Physiol. (London)* **83**, 68 – 86 (1934).
- [5] J. K. W. Ferguson, *J. Physiol. (London)* **88**, 40 – 55 (1936).
- [6] M. Perella, L. Rossi-Bernardi u. F. J. W. Roughton, *Proc. of the Alfred Benzon Symp. IV* (1971).
- [7] M. Perella, D. Bresciani u. L. Rossi-Bernardi, *J. Biol. Chem.* **250**, 5413 – 5418 (1975).
- [8] R. E. Forster, H. P. Constantine, M. R. Craw, H. H. Rotman, R. A. Klocke u. D. Thyrum, *J. Biol. Chem.* **243**, 3317 – 3326 (1968).
- [9] N. A. Matwigoff u. T. E. Needham, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**, 1158 – 1164 (1972).
- [10] J. S. Morrow, P. Keim, R. B. Visscher, R. C. Marschall u. F. R. N. Gurd, *Proc. Nat. Acad. Science USA* **70**, 1414 – 1418 (1973).
- [11] J. S. Morrow, P. Keim u. F. R. N. Gurd, *J. Biol. Chem.* **249**, 7484 – 7494 (1974).
- [12] J. B. Matthew, J. S. Morrow, R. J. Wittebort u. F. R. N. Gurd, *J. Biol. Chem.* **252**, 2234 – 2244 (1977).
- [13] M. Perella, J. V. Kilmartin, J. Fogg u. L. Rossi-Bernardi, *Nature* **256**, 759 – 761 (1975).
- [14] W. K. R. Barnikol u. O. Burkhard, *Pflügers Arch.* **373**, R 45 (1978).
- [15] W. K. R. Barnikol u. O. Burkhard, 12. FEBS-Meeting, Dresden, 1978.