

Die Kooperativität bei der CO₂-Hb-Bindung: Messungen mit Hilfe der ¹³C-NMR-Spektrometrie

The Cooperativity of the CO₂ Hb Binding: Measurement by ¹³C-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 CO₂ Hb binding curve is of considerable physiological interest, because the carbamino derivates, which are formed by the reaction of CO₂ with Hb, are responsible for the well known Haldane effect.

Under physiological conditions CO₂ binds to the four terminal NH₂-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 CO₂ Hb binding curve over a wide PCO₂-range (from 0 kPa to about 70 kPa) by using ¹³C-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 CO₂ saturation of Hb, I is the intensity of the carbamino signal, and I_{Hb} is the intensity of the carbons of Hb, which are involved in the amide binding. (I/I_{Hb})_{max} is (I/I_{Hb}) at high PCO₂, where Hb is completely saturated by CO₂.

For our experiments we used solutions of human desoxygenated Hb, which were equilibrated with a mixture of N₂ and CO₂. The CO₂ contained 90% ¹³C-isotope. The pH was adjusted by titration to 7.2. The NMR measurements were mainly done with a Varian XL 100 NMR spectrometer.

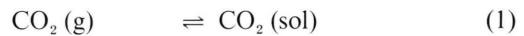
The CO₂ Hb binding curve, we have measured, is S-shaped and has an average Hill value (*n̄*) of 2.1. This result is quite striking with respect to the findings of other groups. A Hill value of 2.1 proves that CO₂ like O₂ binds to Hb in a cooperative manner. The discrepancy to the results of other groups may be explained by the fact that these authors measured the CO₂ Hb binding curve only at comparatively low PCO₂. In our opinion one can only get reliable *n*-values from the whole CO₂ Hb binding curve.

Einleitung

CO₂ 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 CO₂-Transport des Blutes aus. Die Wechselwirkung von Hämoglobin (Hb) mit CO₂ bildet weiterhin die Ursache dafür, daß der O₂-Austausch in Lunge und Gewebe vom Partialdruck CO₂ (PCO₂) abhängt. Dieses Phänomen wird als Haldane-Effekt bezeichnet. Die CO₂-Hb-Bindungskurve spielt für das Verständnis des CO₂-Transportes und des Haldane-Effektes eine entscheidende Rolle.

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

Die theoretische Grundlage für die meisten Arbeiten zur CO₂-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:



Reaktion (1) beschreibt die Bildung von hydratisiertem CO₂. CO₂ (g) bedeutet gasförmiges CO₂



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 digitized 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 CO₂ (sol) solvatisiertes CO₂. Die Reaktionen (2), (3), (4) und (5) beschreiben allgemein bekannte Prozesse und bedürfen keiner weiteren Erläuterung. Wie Reaktion (6) zeigt, reagiert CO₂ mit den freien NH₂-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 CO₂ unter physiologischen Bedingungen ausschließlich an die terminalen NH₂-Gruppen der α - und β -Ketten des Hämoglobins bindet. Erst bei höheren pH-Werten erfolgt auch eine Reaktion mit ϵ -NH₂-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 (λ) definieren, die von der H⁺-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_{CO_2} bedeutet die Konzentration von CO₂. Analog sind auch die Größen C_{HbCO_2} und C_{Hb} definiert. Für die CO₂-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 CO₂ begasten Hämoglobinlösungen befinden sich CO₂, HCO₃⁻ und HbCO₂. Die Gesamtkonzentration an CO₂ ($C_{\text{CO}_2}^*$), 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 CO₂-Hb-Bindungskurve muß man jedoch ein Verfahren benutzen, welches die direkte Bestimmung der Größe C_{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 CO₂-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 CO₂ an Hämoglobin untersucht haben.

Beide Methoden haben den schwerwiegenden Nachteil, daß während der Messung das Gleichgewicht drastisch gestört ist. Zudem wird C_{HbCO_2} als Differenz gemessen (siehe Gleichung (12)). Weiterhin ist es mit beiden Methoden nur schwer möglich, auch bei hohen CO₂-Sättigungen zu messen. Die Messung der CO₂-Hb-Bindungskurve über den ganzen Sättigungsbereich wäre jedoch gerade für die Überprüfung von Modellen interessant, denn die CO₂-Hb-Bindungskurve charakterisiert in modellfreier Darstellung den molekularen Mechanismus der CO₂-Hb-Reaktion, ganz in Analogie zur O₂-Hb-Bindungskurve.

Die Messung der CO₂-Hb-Bindungskurve mit Hilfe der ¹³C-NMR-Spektrometrie eröffnet neue Möglichkeiten. Denn bei dieser Methode erhält man für HbCO₂, CO₂ und HCO₃⁻ je ein eigenes Signal. Damit überhaupt ein HbCO₂-Peak beobachtet werden kann, muß man jedoch die Lösung mit CO₂ begasen, das angereichertes ¹³C-Isotop enthält. Es ist dann sehr einfach möglich, im Gleichgewicht die Konzentration von HbCO₂ zu bestimmen. Weiterhin gestattet es die NMR-Spektrometrie auch, im Bereich hoher Sättigungen die CO₂-Hb-Bindungskurve zu erfassen.

Die ersten qualitativen ¹³C-NMR-Spektren an Hb-Lösungen unter Verwendung von ¹³CO₂-Gas

wurden von Matwigoff und Needham [9] veröffentlicht. Von Morrow *et al.* wurde dann in einigen Publikationen die qualitative Interpretation der ¹³C-NMR-Spektren eingehend diskutiert [10, 11, 3]. Matthew *et al.* [12] haben bereits über die quantitative Analyse der ¹³C-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. λ). 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 D₂O hergestellt. Sie war so beschaffen, daß das ionale Milieu im Inneren des Erythrocyten weitgehend simuliert ist (Na⁺: 12 mmol l⁻¹; Mg²⁺: 3,28 mmol l⁻¹; K⁺: 76,0 mmol l⁻¹; Cl⁻: 78,9 mmol l⁻¹; HPO₄²⁻: 5,7 mmol l⁻¹; HCO₃⁻: 12 mmol l⁻¹). Um Membranbestandteile aus der Lösung zu entfernen, wurde bei 17000 U/min⁻¹ ($\cong 18400 \text{ g}$) zentrifugiert und der Überstand über Millipore Filter (Porenweite 0,22 µm) filtriert.

Die so präparierte Hb-Lösung wurde dann in ein spezielles Tonometer gegeben. Dieses wurde anschließend etwa 20mal evakuiert und wieder mit N₂ begast. Durch diesen Prozeß gelang es, die Hb-Lösung sowohl von CO₂ als auch von O₂ zu befreien. Dann wurde die gewünschte Menge an ¹³CO₂ zugegeben und mit N₂ auf Barometerdruck aufgefüllt. Das verwendete ¹³CO₂ wurde von der Fa. Sharp und Dohme geliefert und enthielt zu 90% das Kohlenstoffisotop ¹³C.

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 Na₂S₂O₄ wurden letzte Spuren von O₂ beseitigt. Die Äquilibrierung mit dem ¹³CO₂/N₂-Gasgemisch erfolgte bei 37 °C.

Einstellung und Messung der Parameter

Der Partialdruck von CO₂ und O₂ 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 CO₂-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 CO₂-Partialdrucken betragen diese Änderungen weniger als 10%. Bei hohen CO₂-Partialdrucken (PCO₂ > 27 kPa) ist das Hämoglobin bereits weitgehend mit CO₂ aufgesättigt. Hier wird die Sättigung durch Änderung der Ionenstärke nur geringgradig beeinflußt.

Messung und Auswertung der NMR-Spektren

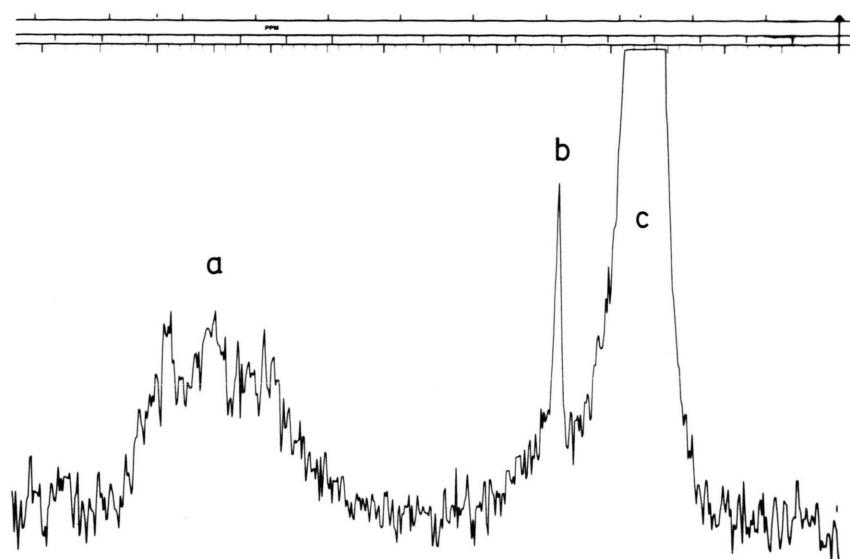
Die ¹³C-NMR-Messungen wurden vorwiegend an einem NMR-Gerät der Fa. Varian (Typ XL 100) bei der Fa. Ch. Boehringer/Ingelheim durchgeführt. Die ¹³C-Resonanz lag bei 25,2 MHz, das Magnetfeld betrug 23,4 KG ($\cong 2,34 \text{ Testa}$). Es wurden 30000 bis 80000 Pulse summiert. Die Messung erfolgte bei 37 °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 HCO₃⁻-Ionen verursacht.

Bei der quantitativen Auswertung der ¹³C-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 ¹³C-NMR-Spektrum einer desoxygениerten Hb-Lösung, welche mit ¹³CO₂ 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_{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_{ref} , f_{ref} und C_{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. D₂O 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 ¹³C-NMR-Spektren. Der Meßfehler beträgt 5–10%. Die Einwaagekonzentration der einzelnen Verbindungen betrug größtenteils etwa 400 mmol l⁻¹, die Konzentration der einzelnen ¹³C-Kernspezies somit etwa 4 mmol l⁻¹. Dies entspricht auch ungefähr der Größenordnung der Konzentration des ¹³C-Carbamino-Hämoglobins.

Bei der Messung der CO₂-Hb-Bindungskurve wurden die C-Atome des Hämoglobins als innerer Standard gewählt, die in einer Amid-Bindung involviert sind. I_{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

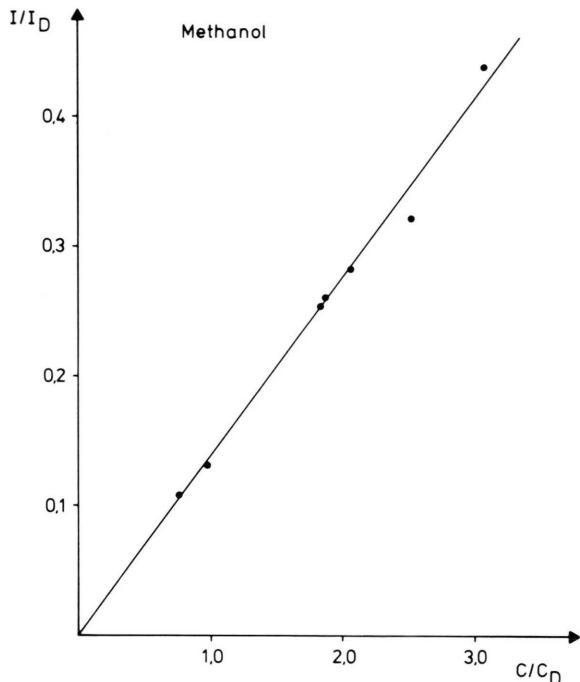


Abb. 2. Abhängigkeit von (I/I_D) von (C/C_D) für Methanol. I = Intensität der CH_3^{13}C -Atome des Methanols; I_D = Intensität der CH_2^{13}C -Atome des Dioxans; C = Konzentration des Methanols; C_D = Konzentration des Dioxans.

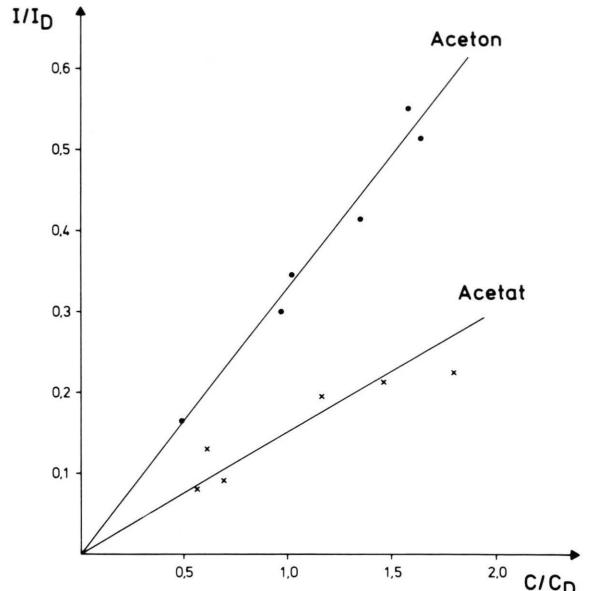


Abb. 4. Abhängigkeit von (I/I_D) von (C/C_D) für Aceton und Acetat. I = Intensität der CH_3^{13}C -Atome des Acetons bzw. des Acetats; I_D = Intensität der CH_2^{13}C -Atome des Dioxans; C = Konzentration des Acetons bzw. Acetats; C_D = Konzentration des Dioxans.

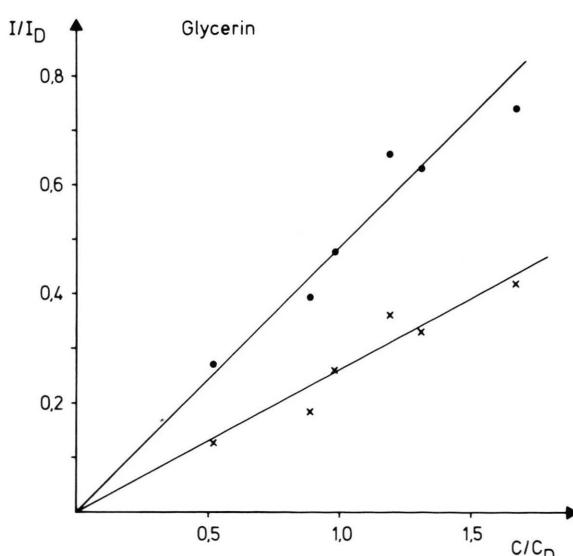


Abb. 3. Abhängigkeit von (I/I_D) von (C/C_D) für die beiden Kernspezies von Glycerin. ●●● = CH_2-OH -Gruppe; ××× = CHOH -Gruppe. I = Intensität der $\text{CH}_2\text{OH}^{13}\text{C}$ -Atome bzw. der CHOH^{13}C -Atome des Glycerins; I_D = Intensität der CH_2^{13}C -Atome des Dioxans; C = Konzentration des Glycerins; C_D = Konzentration des Dioxans.

von Gleichung (14) folgt nun direkt für die CO₂-Sättigung von Hb:

$$\frac{I}{I_{\text{Hb}}} = k \frac{C_{\text{HbCO}_2}}{C_{\text{HbCO}_2} + C_{\text{Hb}}} = k Z. \quad (15)$$

Für hohe CO₂-Partialdrucke muß die CO₂-Sättigung des Hämoglobins den Wert 1 annehmen, d. h. I/I_{Hb} muß dann einen maximalen und konstanten Wert haben. Aus $(I/I_{\text{Hb}})_{\text{max}}$ läßt sich die Konstante k bestimmen. Hierbei bedeutet $(I/I_{\text{Hb}})_{\text{max}}$ den Wert von (I/I_{Hb}) bei hohen CO₂-Partialdrucken. Es gilt also:

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

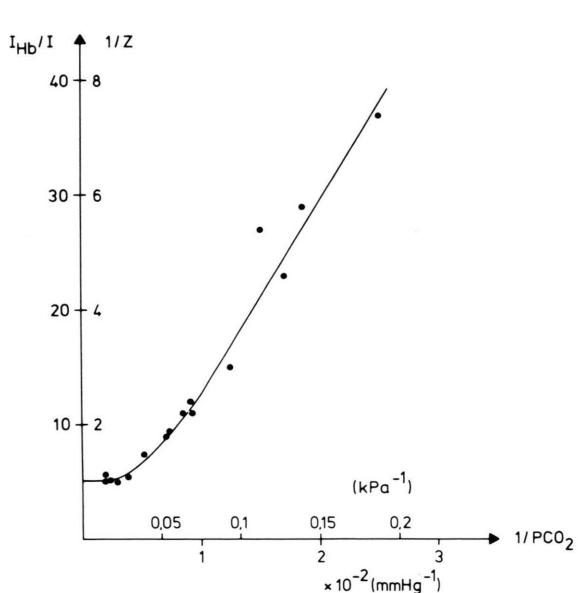
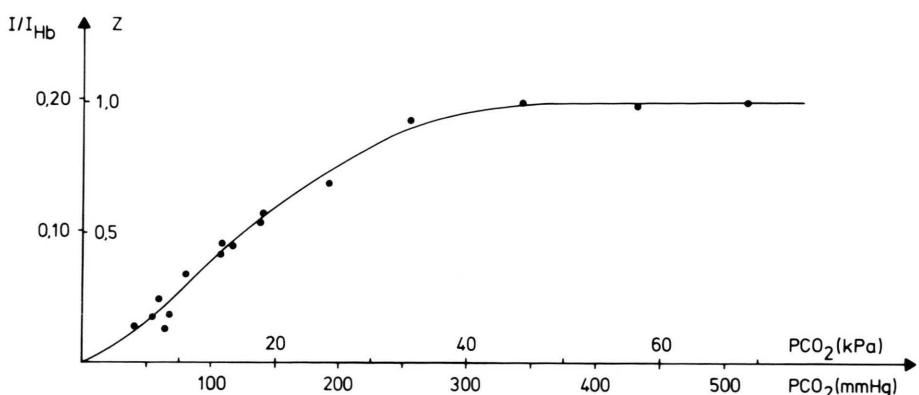
Die CO₂-Sättigung des Hämoglobins wurde gemäß Gleichung (16) berechnet.

Ergebnis der Messungen

Abb. 5 zeigt die gemessene CO₂-Hb-Bindungskurve. Die Untersuchungen haben sich über einen großen PCO₂-Bereich erstreckt. Für CO₂-Partialdrücke größer als 30 kPa (≈ 220 mmHg) ist Hämoglobin praktisch vollständig mit CO₂ gesättigt. Der

Abb. 5. CO₂-Hb-Bindungskurve.

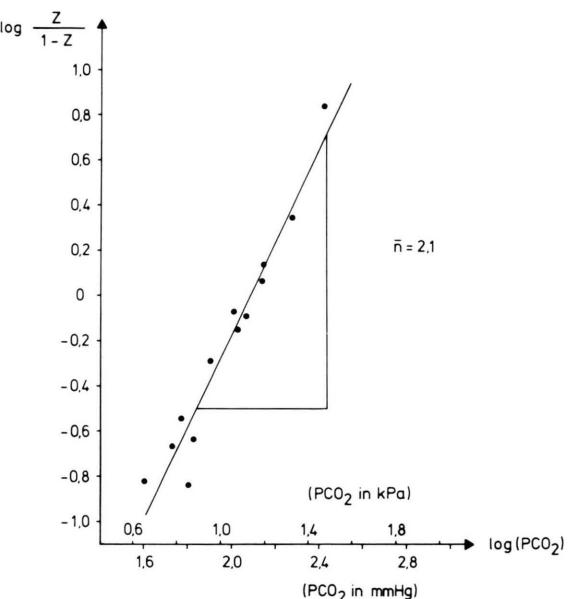
pH = 7,19 ± 0,02 Temp. = 37°C C_{Hb} = 11,1 ± 2,5 g/dl

Abb. 6. 1/Z in Abhängigkeit von 1/PCO₂.

Halbsättigungsdruck ($PCO_{2;0,5}$) beträgt 16 kPa (\approx 120 mmHg). Es fällt auf, daß die Form der CO₂-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/PCO₂ eine Gerade ergeben. In Abb. 6 ist dieser Zusammenhang dargestellt. Experimentell resultiert ein Kurvenverlauf, der sich keinesfalls durch eine Gerade approximieren läßt.

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

Abb. 7. log (Z/(1-Z)) in Abhängigkeit von log PCO₂.

In Abb. 7 ist die Größe $\log (Z/(1-Z))$ in Abhängigkeit von $\log PCO_2$ aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden liefert den mittleren Hillschen 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 CO₂-Hb-Bindungskurve

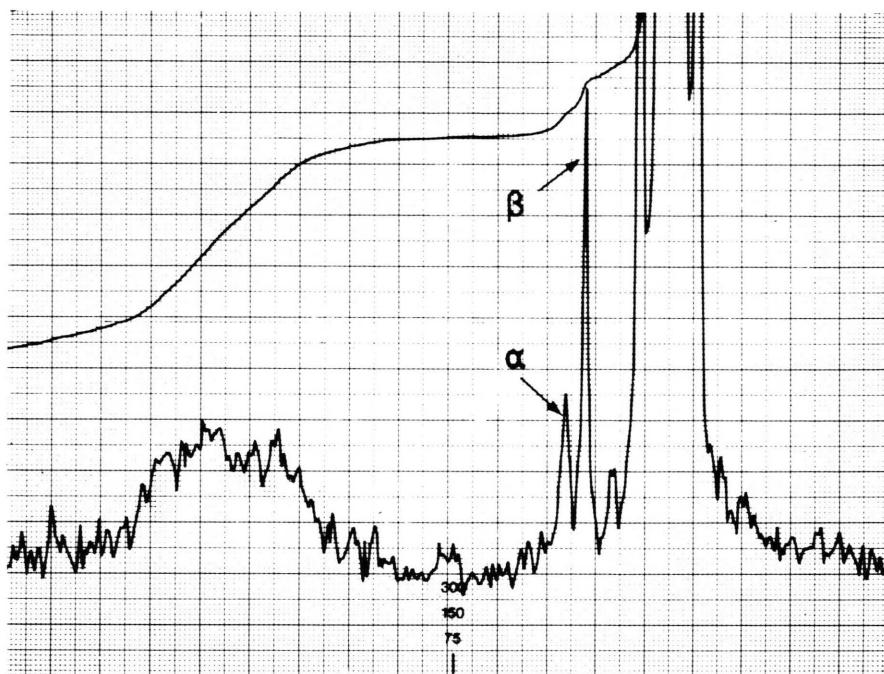


Abb. 8. ^{13}C -NMR-Spektrum einer desoxygenierten mit $^{13}\text{CO}_2$ begasten Hb-Lösung bei voller CO_2 -Sättigung und $\text{pH} = 7,57$.

gefunden. Dies bedeutet, daß bei der Reaktion von CO_2 mit Hb homologe kooperative Wechselwirkungen auftreten. Nur bei kooperativen Wechselwirkungen kann $\bar{n} > 1$ werden. Somit wird jede Bindungsstelle des Hämoglobins für CO_2 durch die übrigen CO_2 -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 $\text{R}-\text{NH}^{13}\text{COO}^-$ -Gruppen verursacht. Für R kann man nämlich die α -Kette oder die β -Kette einsetzen. Es ist natürlich nicht selbstverständlich, daß das Signal der $\alpha\text{-NH}^{13}\text{COO}^-$ -Gruppen ($\cong \alpha\text{-}^{13}\text{C}$ -Signal) mit der gleichen Empfindlichkeit gemessen wird, wie das Signal der $\beta\text{-NH}^{13}\text{COO}^-$ -Gruppen ($\cong \beta\text{-}^{13}\text{C}$ -Signal).

Morrow *et al.* [3] haben gezeigt, daß sich bei hohen pH-Werten die $\alpha\text{-}^{13}\text{C}$ - und $\beta\text{-}^{13}\text{C}$ -Signale auflösen lassen. Es wurde daher bei einem pH-Wert von 7,58 und einem PCO_2 von 35 kPa das ^{13}C -NMR-

Spektrum einer mit $^{13}\text{CO}_2$ begasten, desoxygenierten Hb-Lösung gemessen. Abb. 8 zeigt einen Ausschnitt von dem erhaltenen NMR-Spektrum. Peak α entspricht dem $\alpha\text{-}^{13}\text{C}$ - und Peak β dem $\beta\text{-}^{13}\text{C}$ -Signal.

Die Integration ergab, daß im Rahmen der Meßgenauigkeit die Intensitäten beider Signale gleich sind. Da bei einem PCO_2 von 35 kPa Hb vollständig aufgesättigt ist, folgt zwangsläufig, daß das $\alpha\text{-}^{13}\text{C}$ - und $\beta\text{-}^{13}\text{C}$ -Signal mit gleicher Empfindlichkeit gemessen werden.

Weiterhin werden bei einem pH von 7,2 selbst bei hohen CO_2 -Partialdrücken (> 27 kPa) nur vier CO_2 -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_2 -Werten eine merkliche Reaktion von CO_2 mit $\varepsilon\text{-NH}_2$ -Gruppen erfolgt. Da ein typisches Sättigungsverhalten beobachtet wurde (d. h. die CO_2 -Hb-Bindungskurve verläuft für $\text{PCO}_2 > 30$ kPa parallel zur PCO_2 -Achse) ist bei pH = 7,2 und $\text{PCO}_2 > 30$ kPa die Bindung von CO_2 an $\varepsilon\text{-NH}_2$ -Gruppen zumindest in dem beobachteten Bereich vernachlässigbar. Das NMR-Signal der ε -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-

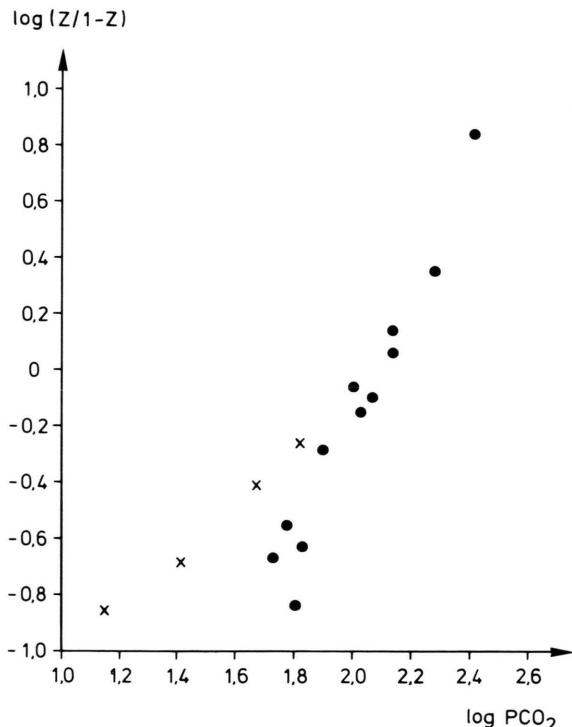


Abb. 9. Abhängigkeit von $\log (Z/(1-Z))$ von $\log PCO_2$. ●●● = eigene Werte ($\bar{n} = 2,1$); ××× = Werte von Perella et al. [6] ($\bar{n} = 0,92$).

gen nicht beobachtet. Die Annahme, daß Hb für einen PCO_2 größer als 27 kPa mit CO_2 voll aufgesättigt ist, ist somit gerechtfertigt.

Es wird auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet, daß die Anlagerung von CO_2 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_2 sich an die α -Ketten mit einer anderen Bindungskonstanten anlagert als an die β -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_2 an Hb einem völlig anderen Mechanismus folgt.

Nachdem gezeigt wurde, daß die ¹³C-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_2 -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_2 -Hb-Bindung. Die Ergebnisse sind auf CO_2 direkt übertragbar. Die detaillierte Analyse der O_2 -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_2 -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_2 -Partialdrucken 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_2 -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_2 -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 PCO₂-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 CO₂-Hb-Bindung ermöglicht und unterscheidet sich in dieser Beziehung entscheidend von der Analyse von Matthew *et al.* [12].

Die üblichen Vorstellungen zur CO₂-Hb-Bindungskurve müssen aufgrund der vorliegenden Befunde erheblich modifiziert werden. Im Grunde war auch eine nichtkooperative CO₂-Hb-Bindung nicht zu erwarten, nachdem lange bekannt ist, daß erstens die O₂-Hb-Bindung stark positiv kooperativ ist, und daß zweitens zwischen CO₂- und O₂-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.