

Vorlesung Medizinische Biochemie (13.04.18)

Hauptakteure der Sauerstoffversorgung: Hämoglobin und Myoglobin für den Transport und die Speicherung von O₂

Sven Lang, Universität des Saarlandes
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
sven.lang@uni-saarland.de

Schwerpunkte: Das „kleine 4 x 4“ der Sauerstoffakteure

Die Häm-Gruppe

- Synthesereaktionen
- Syntheseregulation
- Funktion
- Abbau

Allosterische Effektoren

- 2,3-Bisphosphoglycerat
- Protonenkonzentration
- Kohlendioxid
- Bohr-/Haldane-Effekt

Vertreter der Globinfamilie

- Myoglobin
- Hämoglobin
- Sauerstoffbindung
- Kooperativität

Assoziierte Krankheitsbilder

- Diabetes Mellitus
- Sichelzellanämie
- Thalassämie
- Kohlenmonoxidvergiftung

MIND-BLOWING

Millionen

280.000.000
(Hämoglobin pro Erythrozyt)

Billionen

25.000.000.000.000 (750 g)
(Menge an Erythrozyten pro Person)

Trilliarden

28.000.000.000.000.000.000.000
(O₂-bindestellen im Hb pro Person)

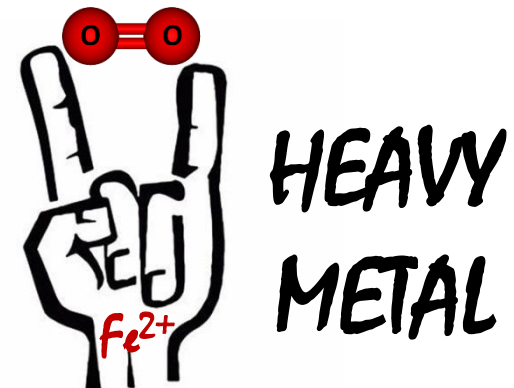
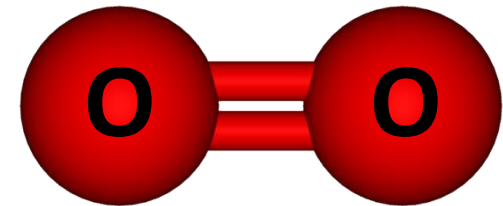
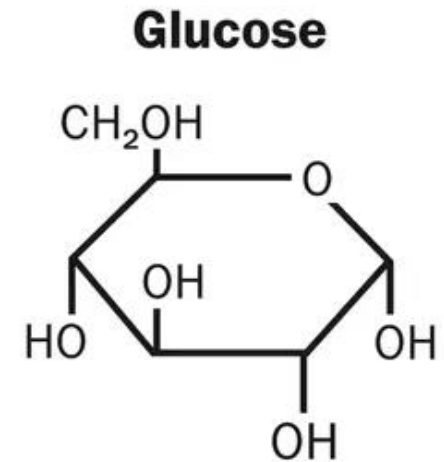
250.000.000.000
(Sterne in Milchstraße)

7,5
µm

∅ Haar:
70 µm

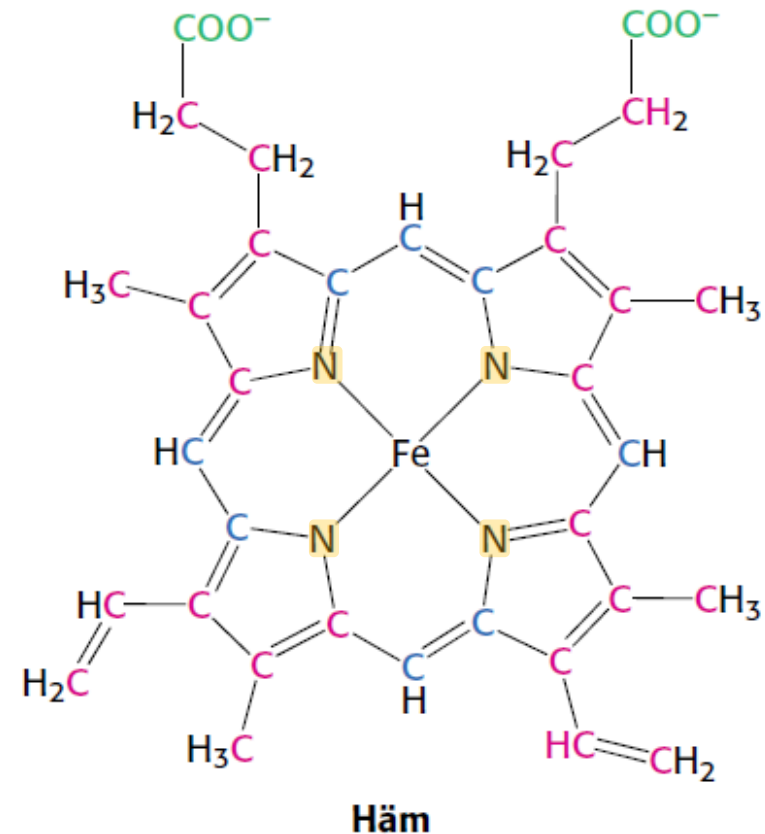
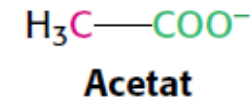
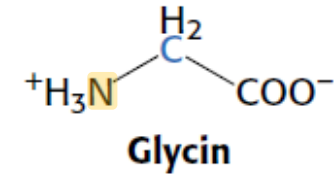
Warum aber benötigt man Sauerstoffakteure?

- Aerobe Oxidation von Glucose (Nahrung) liefert 15x mehr Energie als anaerobe Version
=> Glykolyse: 2 ATP/Glc
=> OXPHOS: 30 ATP/Glc
- Sauerstoff ist ein recht unpolares Molekül
=> geringe physikalische Wasserlöslichkeit im polaren (extra-) zellulären Milieu
=> Blutplasma (3 ml O₂/l); Vollblut (200 ml O₂/l)
- Reversibilität der Sauerstoffkoordination
=> Der wahre Star: Metallionen
=> Fe²⁺(Hb, Mb), Cu²⁺ (Hämocyanin)



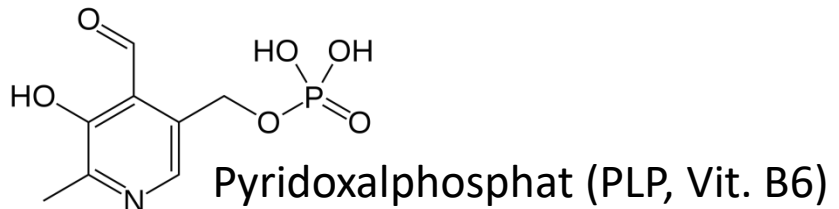
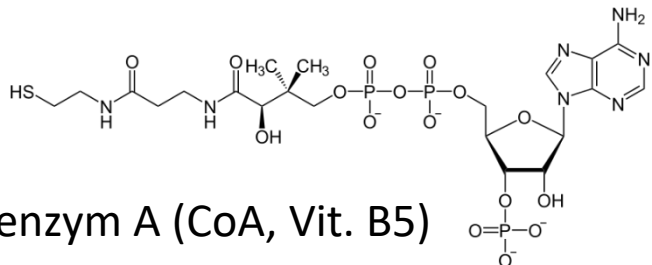
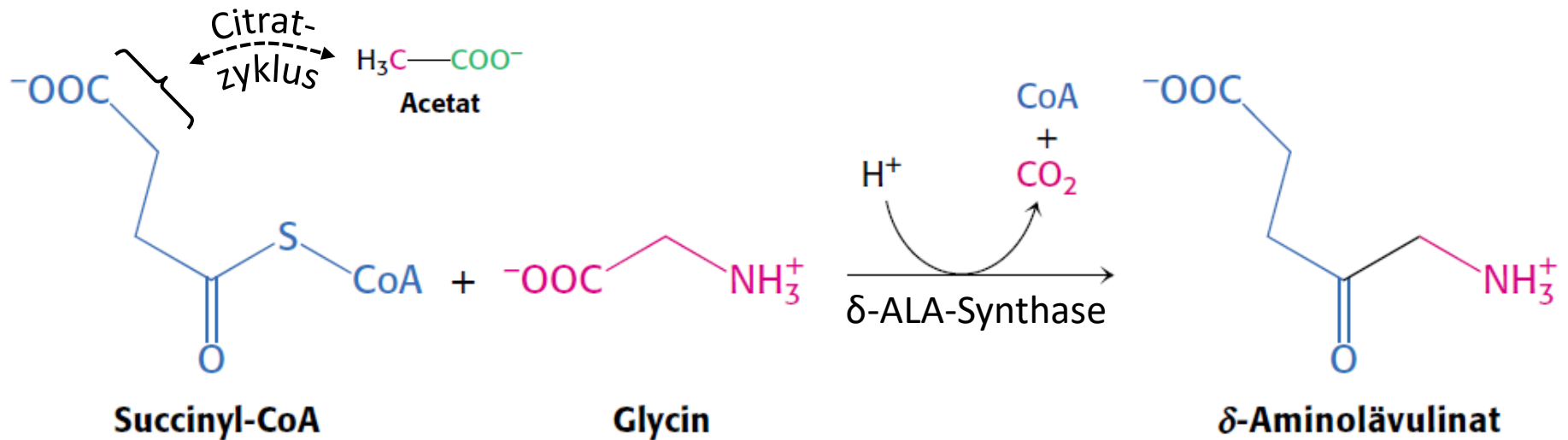
Produktion des Metallchelators: Hämbiosynthese

- Isotopenmarkierungsexperimente im Jahr 1945 durch David Shemin
=> ^{14}C -Glycin, ^{14}C -Acetat (Methyl/Carboxyl)
- Hämaufbau aus 34 C-Atomen
=> 8 C-Atome von α -C-Glycin
=> restliche 26 C-Atome von Acetat
- Hämcharakteristika
=> Vier Pyrrolringe (Tetrapyrrolring)
=> Methinbrücken verbinden Pyrrole
=> Methyl-, Vinyl-, Propionatreste
=> N-Atome koordinieren Eisen-Ion
=> Konjugierte Doppelbindungen
Rotfärbung Muskel, Blut



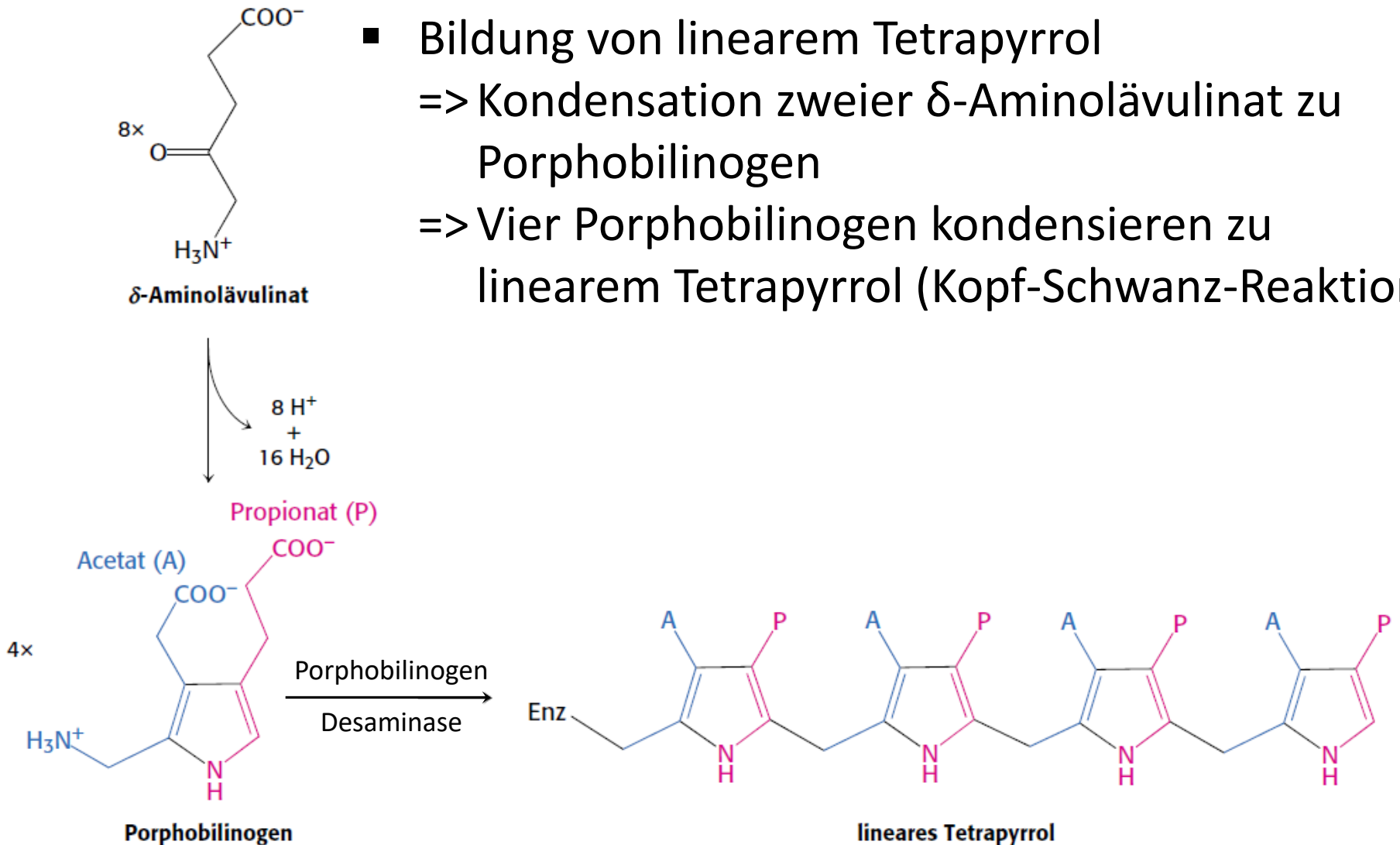
Hämbiosynthese: „committed step“

- Schritt 1: Bildung von δ -Aminolävulinat
=> Geschwindigkeitsbestimmender Schritt
=> Kondensation Glycin mit Succinyl-CoA
=> Katalysiert durch δ -ALA-Synthase

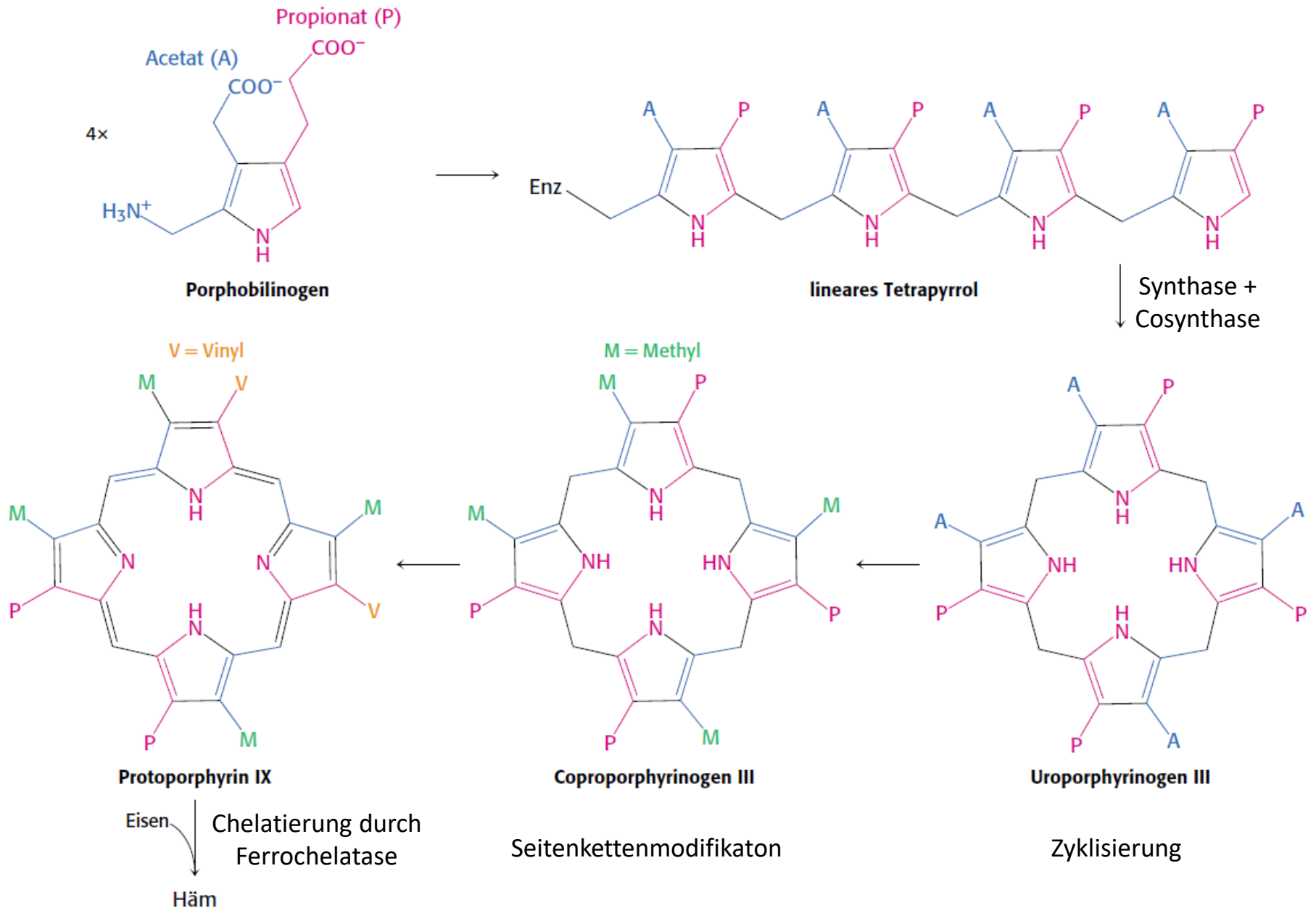


Hämbiosynthese

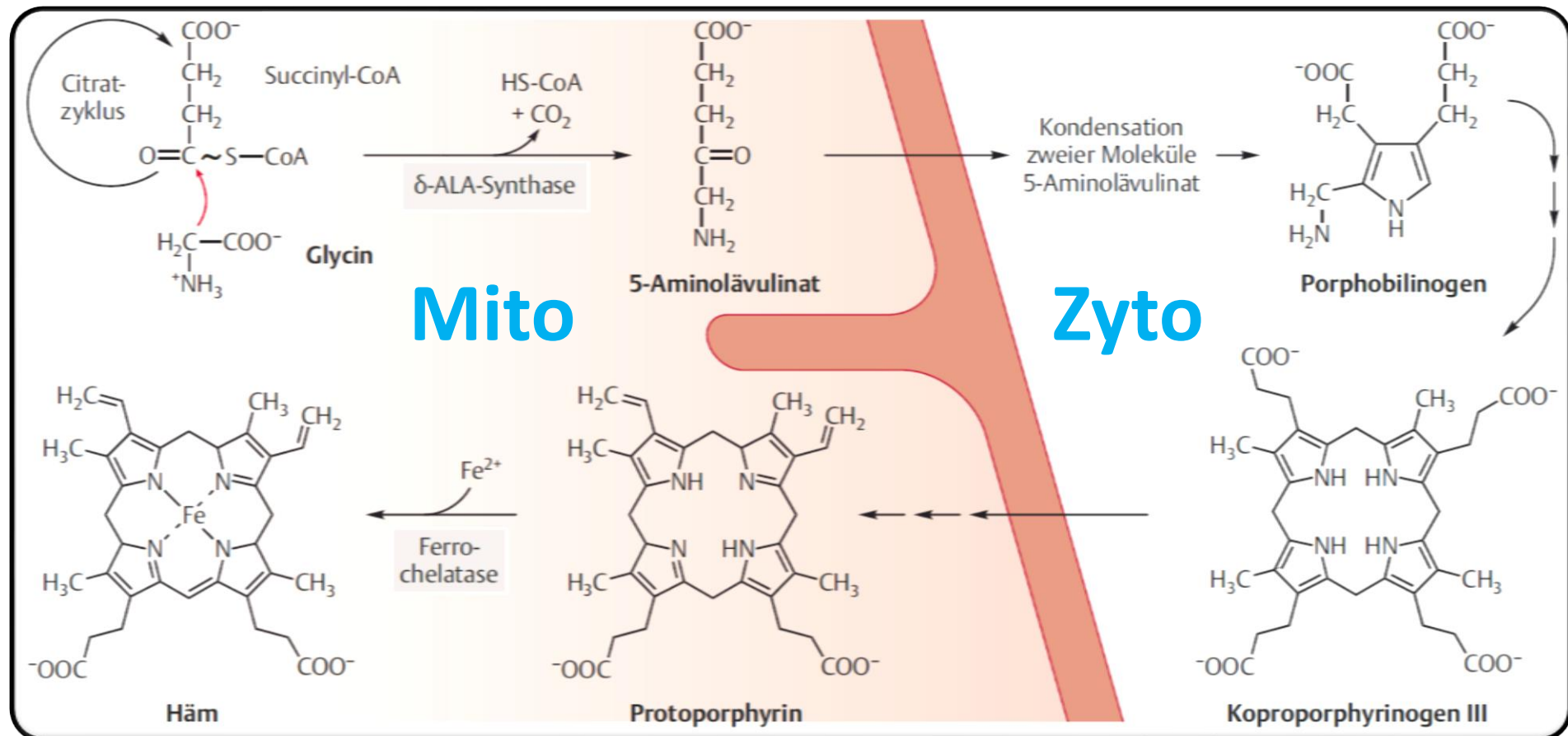
- Bildung von linearem Tetrapyrrol
=> Kondensation zweier δ -Aminolävulinat zu Porphobilinogen
=> Vier Porphobilinogen kondensieren zu linearem Tetrapyrrol (Kopf-Schwanz-Reaktion)



Hämsynthese: Zyklisierung, Modifikation, Eisen



Hämbiosynthese erfolgt in zwei Kompartimenten



- Gewebespezifische Regulation der Hämbiosynthese
- => Zwei δ -ALA-Synthase Paraloge (ALAS1 und ALAS2)
- => ALAS2 (Nicht-Erythrozyten-Zellen) \leftarrow EPO + Fe^{2+}
- => ALAS1 (Erythrozyten-Vorläufer) \leftarrow Häm

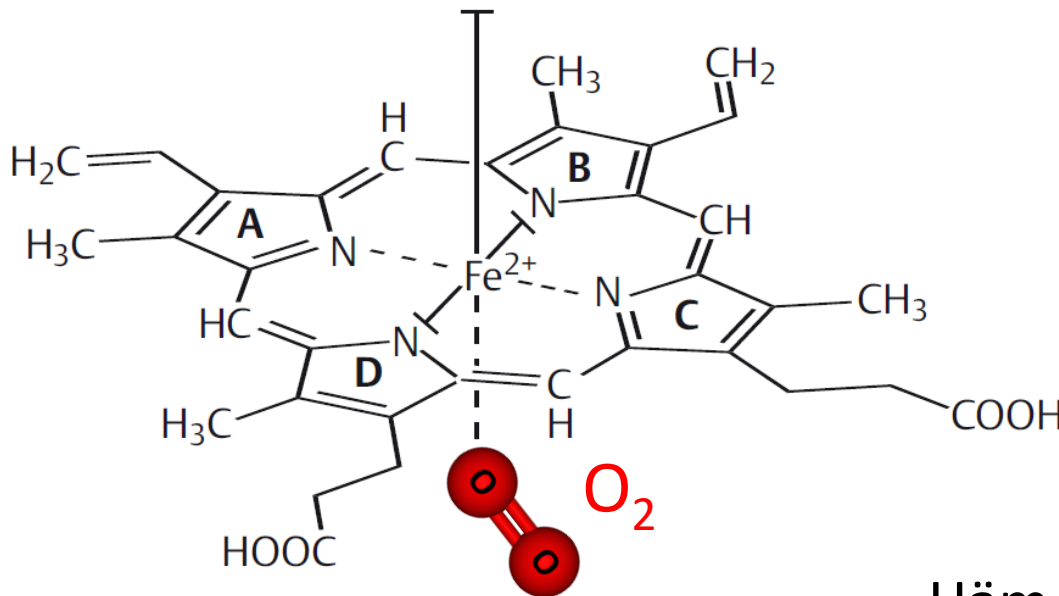
Häm ist eine prosthetische Gruppe in Enzymen

- Hämhaltige Enzymsysteme
 - => Cytochrome (P450, Atmungskette)
 - => Monooxygenasen, Peroxidasen
 - => Katalase, eNOS
 - => Chlorophylle
 - => Hämoglobin, Myoglobin

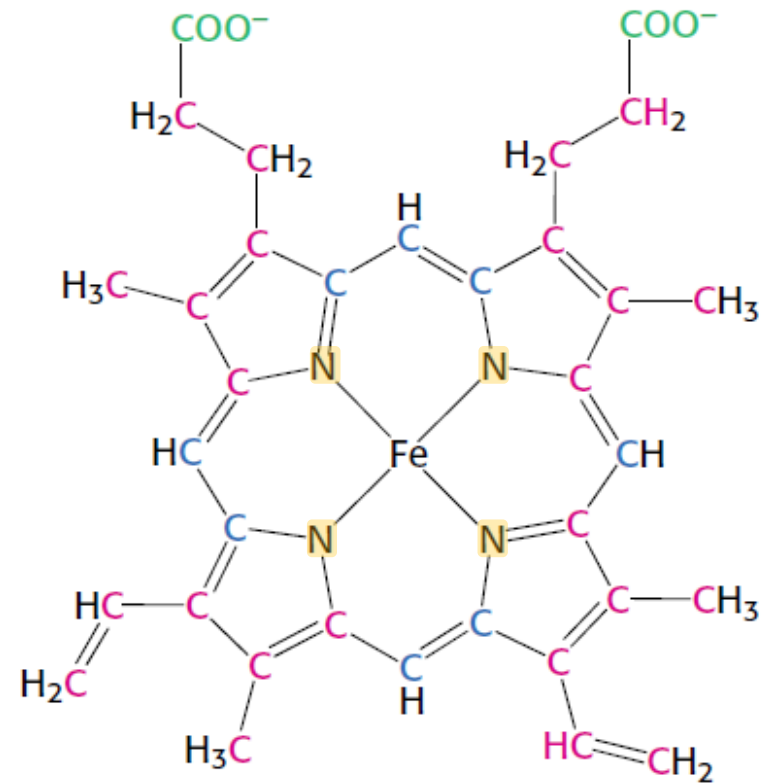
Prosthetische Gruppe:

Ein nicht-proteinöser Kofaktor der kovalent (hoher Affinität) an ein Enzym gebunden ist und dessen katalytische Funktion definiert.
(Apo-Enzym + Kofaktor = Holo-Enzym)

Globinpolypeptid (His F8)



Häm



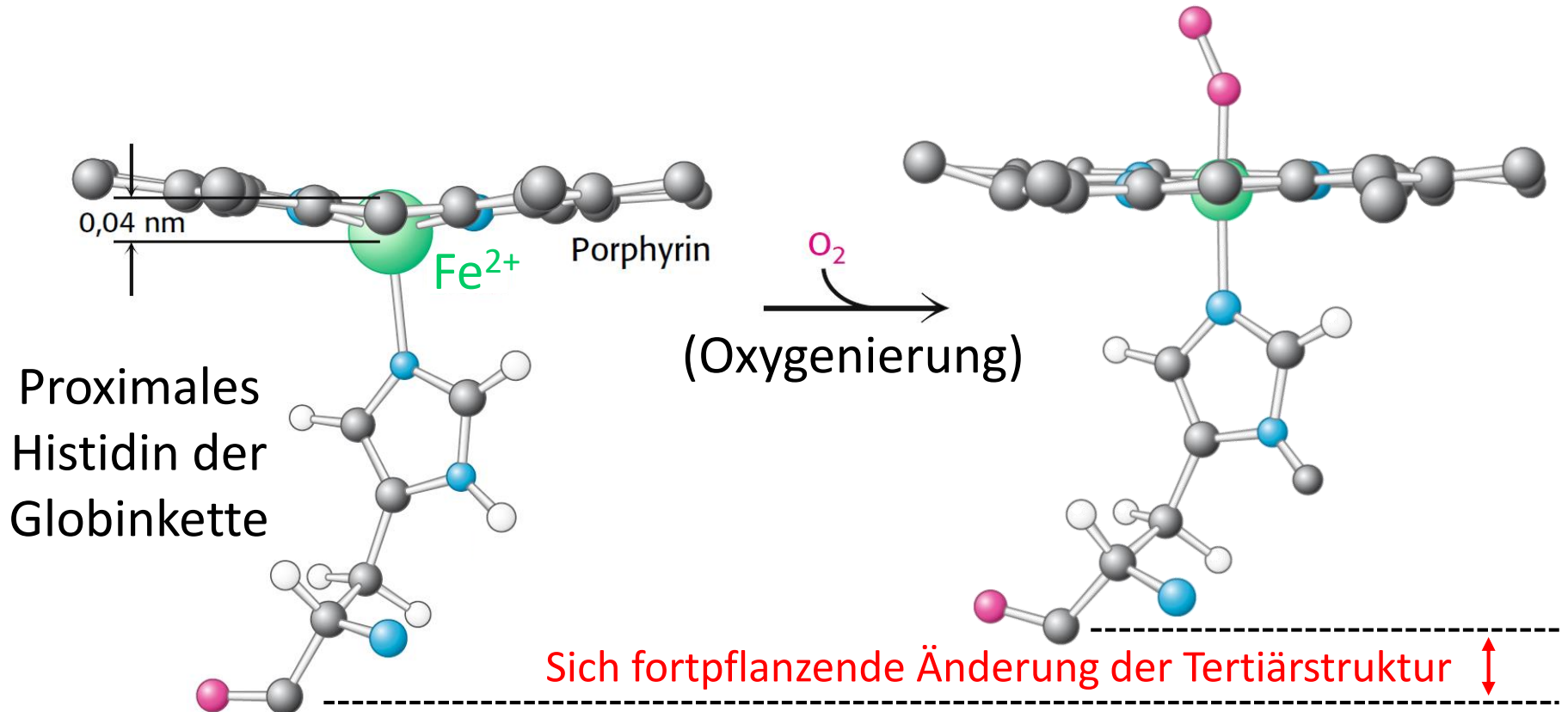
Ein kleiner Schritt für einen Sauerstoff, ein großer Schritt für die Menschheit

Deoxy-Häm

- Paramagnetischer high spin Zustand
- Gekrümmter Porphyrinring (*tensed*)
- Fe^{2+} (größer) außerhalb Ringsystem

Oxy-Häm

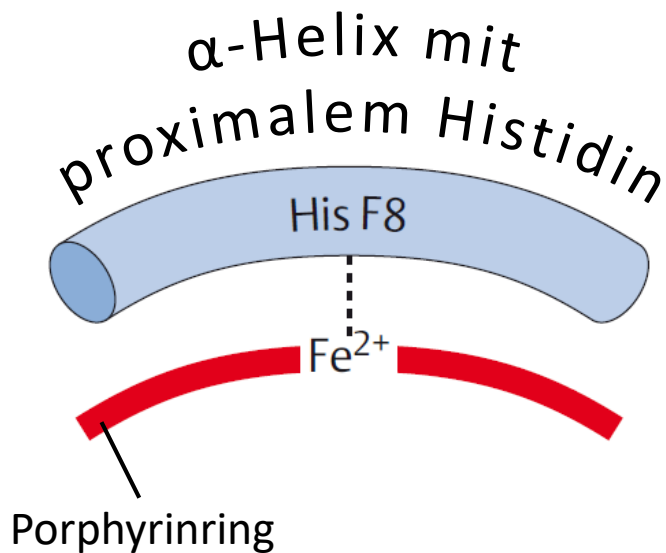
- Diamagnetischer low spin Zustand
- Flacher Porphyrinring (*relaxed*)
- Fe^{2+} (kleiner) im Ringsystem



Ein kleiner Schritt für einen Sauerstoff, ein großer Schritt für die Menschheit

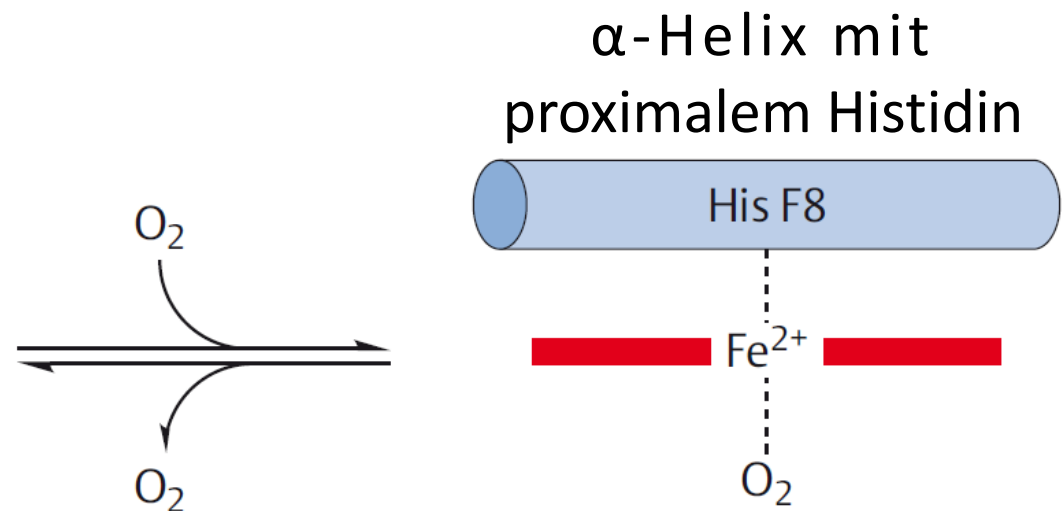
Deoxy-Häm

- Paramagnetischer high spin Zustand
- Gekrümmter Porphyrinring (*tensed*)
- Fe^{2+} (größer) außerhalb Ringsystem



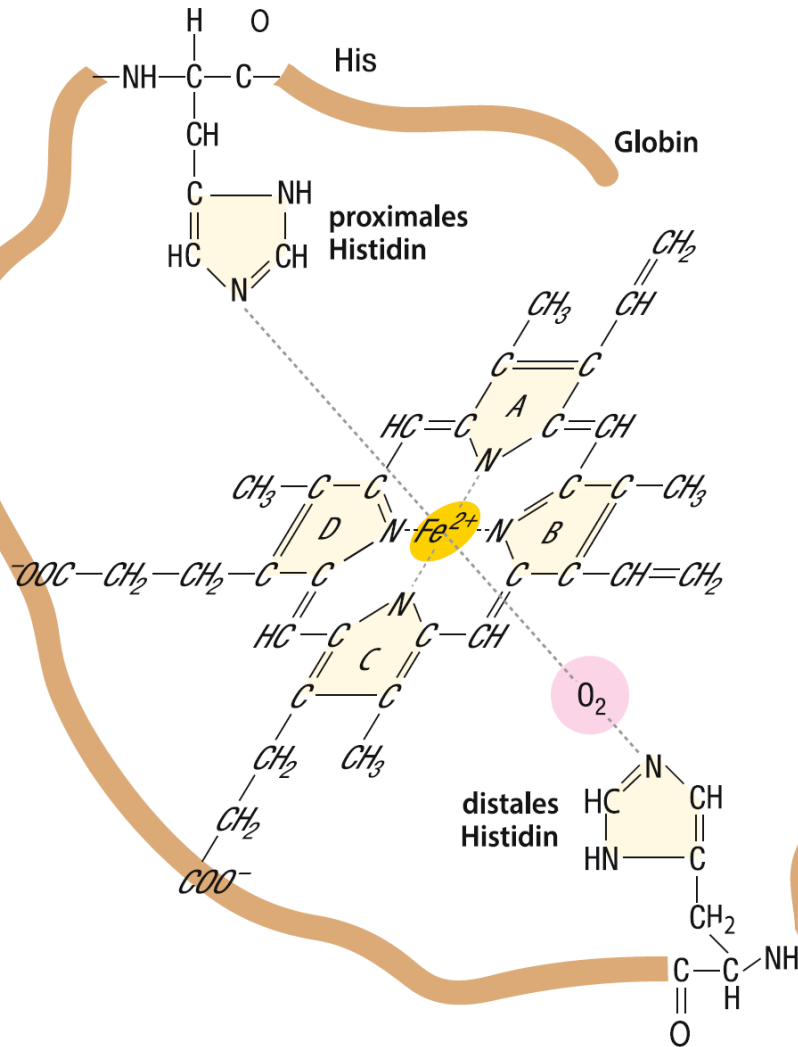
Oxy-Häm

- Diamagnetischer low spin Zustand
- Flacher Porphyrinring (*relaxed*)
- Fe^{2+} (kleiner) im Ringsystem

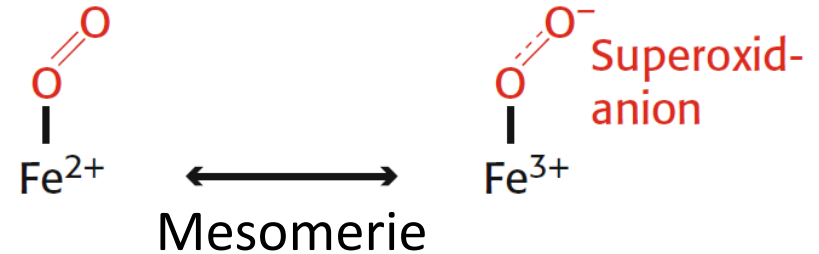


„Hebelwirkung“ des proximalen Histidins
(= 5. Koordinationsstelle des Fe^{2+}) bei Oxygenierung
vermittelt die Konformationsänderung der Globinkette

Ein distales Histidin zur Stabilisierung des O₂



- **Funktion des distalen Histidins**
 => strukturell konserviertes His
 => Schutz vor Fe²⁺ Oxidation
 => unterbindet Superoxidation

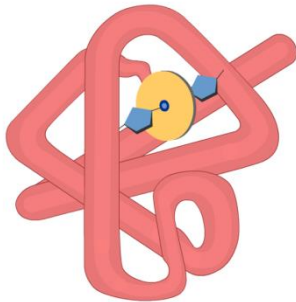


- **Probleme bei Fe²⁺ Oxidation**
 => Fe²⁺ (Ferro) → Fe³⁺ (Ferri)
 => O₂ → Superoxid (Radikal)
 => Häm → Hämatin (MetMb/MetHb)
 => KEINE O₂ Bindung mehr

Proteine der Globinfamilie: Myo- & Hämoglobin

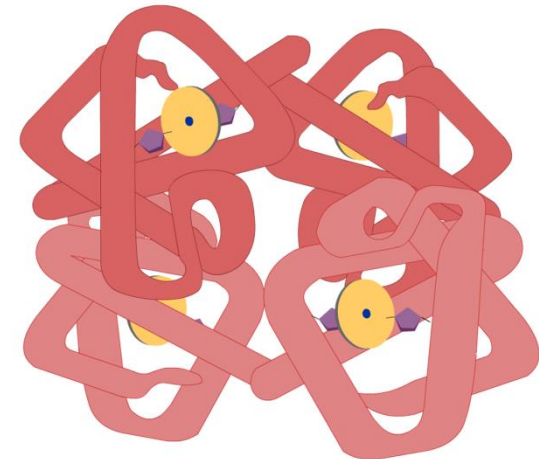
Myoglobin (Mb)

- Myo- (von griech. „müs“) → Muskel
- Roter Farbstoff der Muskulatur
- 1 Polypeptidkette (8 α -Helices A-H)
- 1 Hämgruppe
- O₂-Speicher in Muskelzellen (Zytosol)
- 1959 durch John Kendrew:
3D-Struktur Myoglobin (Pottwal)



Hämoglobin (Hb)

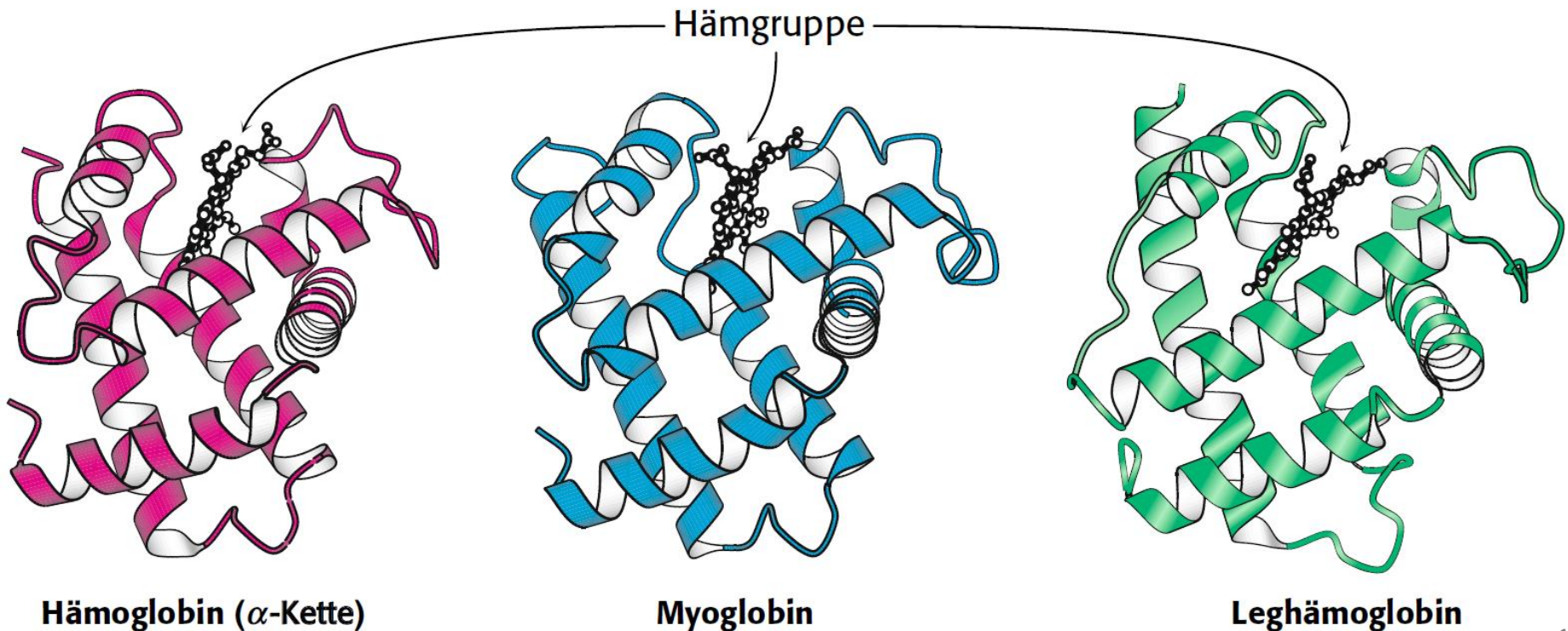
- Hämo- (von griech. „haima“) → Blut
- Roter Blutfarbstoff der Erythrozyten
- 4 Polypeptide (2 identische Dimere)
- pro Polypeptidkette eine Hämgruppe
- O₂-Transporter des Blutes
- 1960 durch Max Perutz:
3D-Struktur Hämoglobin (Pferdeherz)



Tertiärstruktur (Faltung) ist stärker konserviert als Primärstruktur (Aminosäureabfolge): $3^\circ > 1^\circ$

Hämoglobin α V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M F L S F P T T K T Y F P H F -----
Myoglobin G L S E G E W Q L V L N W W G K V E A D I P G H G Q E V L I R L F K G H P E T L E K F D K F K H L K S

 - D L S H G S A Q V K G H G K K V A D A L T N A V A H V D D M P N A L S A L S D L H A H K L R V D P V
 E D E M K A S E D L K K H G A T V L T A L G G I L K K K G H H E A E I K P L A Q S H A T K H K I P V K



Sauerstoffbindungskurve: Y vs. pO_2

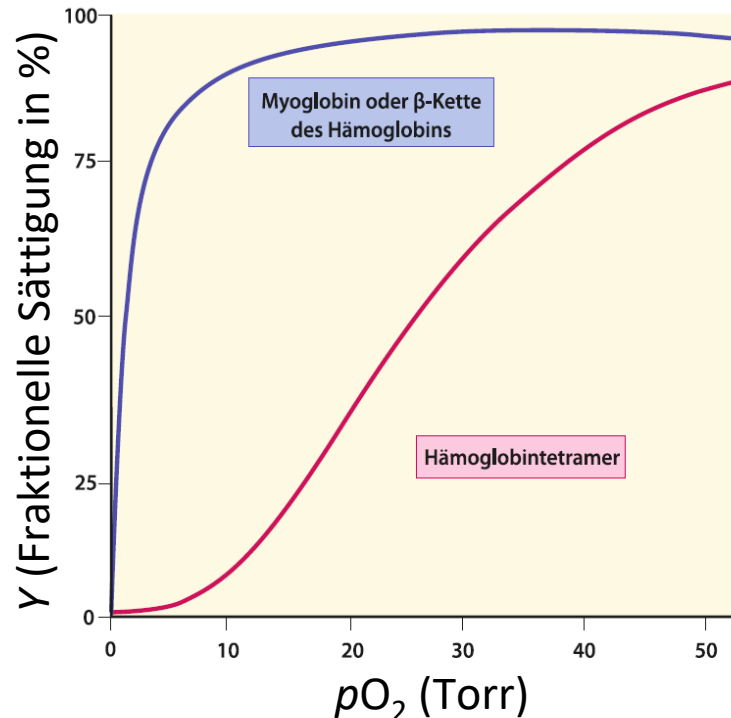
Myoglobin (Mb)

- Monomer
- 1 Polypeptidkette mit 153 aa
- Bindet O_2 durch Hämgruppe

Hämoglobin A (HbA)

- Tetramer
- 2α (je 141 aa) + 2β (je 146 aa) Ketten
- Bindet O_2 durch Hämgruppe(n)

→ ? Wie effizient binden beide den Sauerstoff ? ←



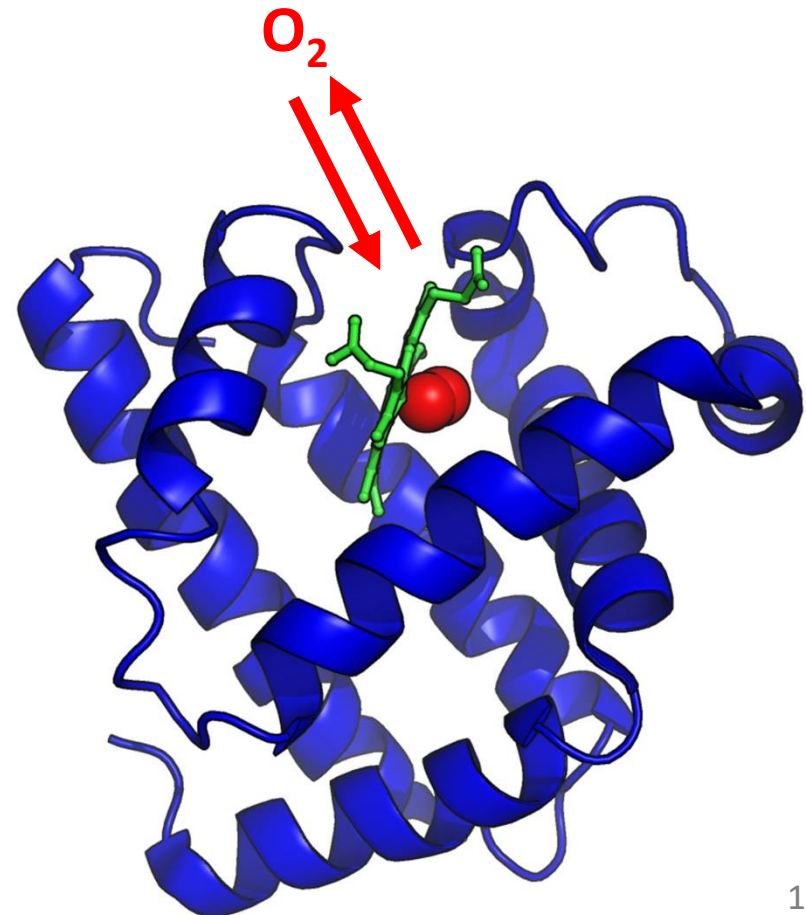
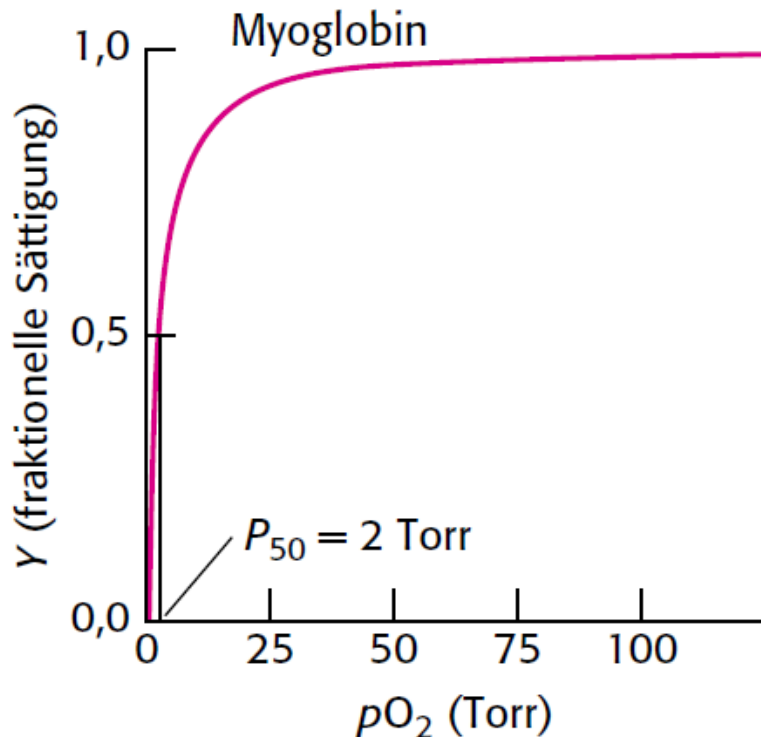
Fraktionelle Sättigung (Y):
Einheitsloser Zahlenwert der den Anteil aller möglichen Bindungsstellen angibt, welche gebundenen Sauerstoff enthalten.

Sauerstoffpartialdruck (pO_2):
Gemessen in Torr, der Maßeinheit für den Druck einer Quecksilbersäule (1 mm Hg). Benannt nach Evangelista Torricello (Erfinder des Quecksilberbarometers)

Hyperbolische Sauerstoffbindungskurve des Mb

Myoglobin (Mb)

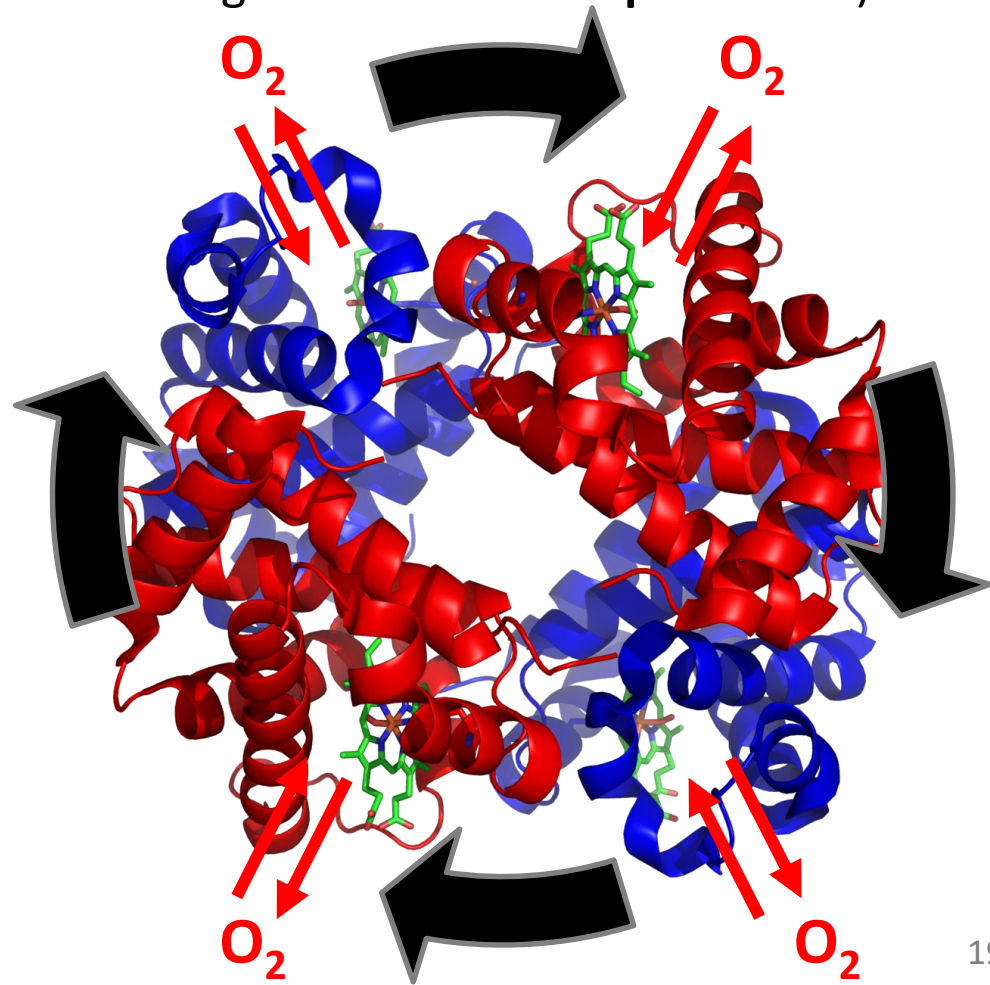
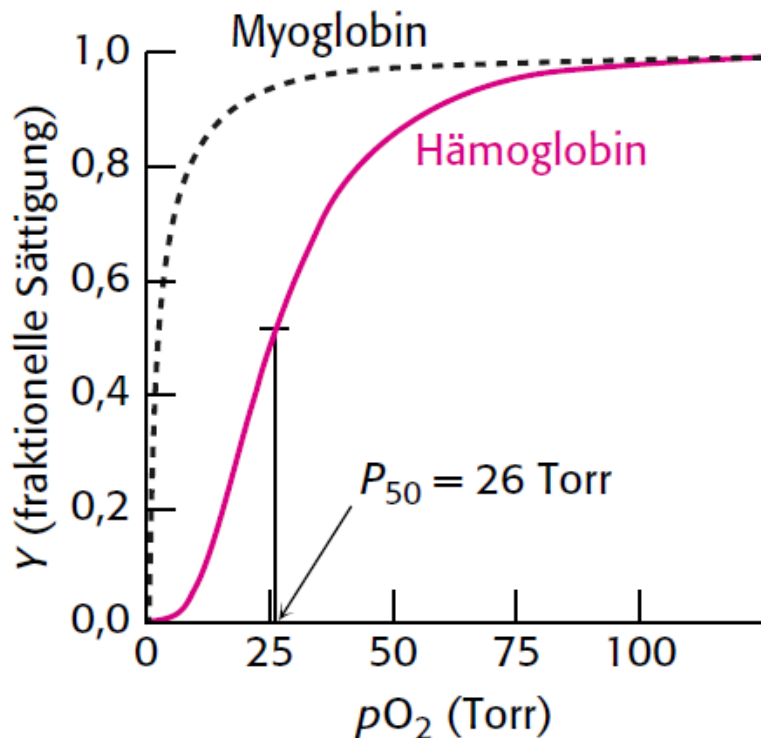
- Monomer, 1 Polypeptidkette mit 153 aa, Hämgruppe bindet O_2
- Hyperbolische Bindungskurve (= einfaches chemisches Gleichgewicht)
- Halbsättigung (P_{50}) bei 2 Torr



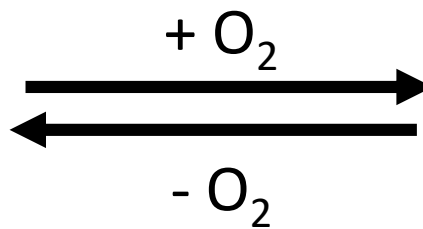
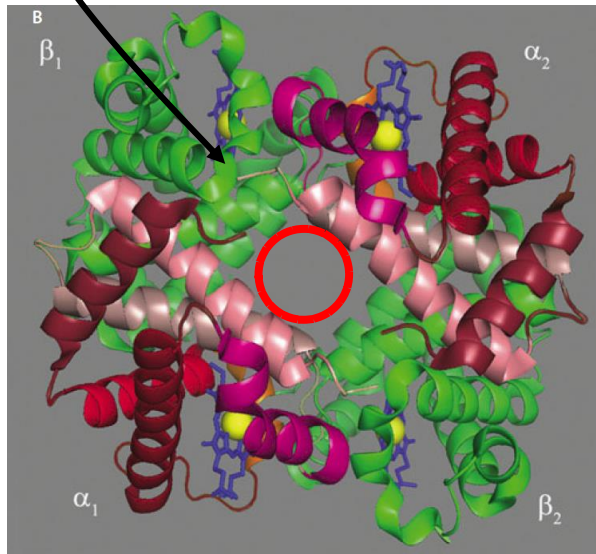
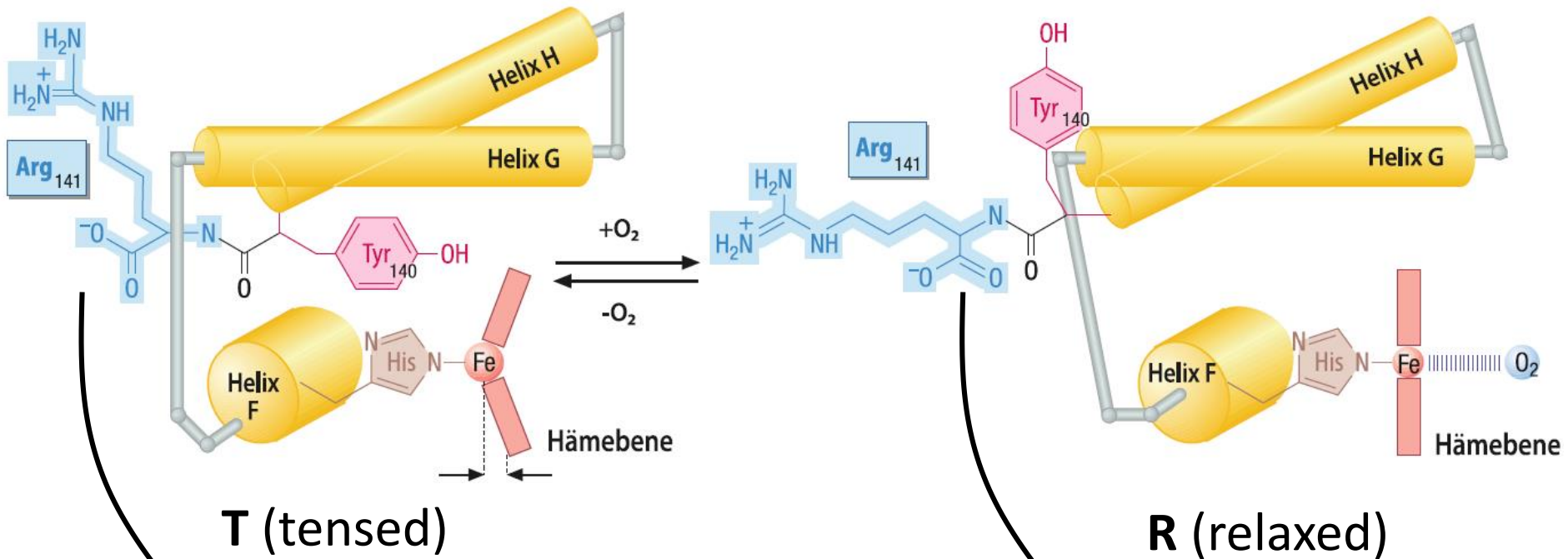
Sigmoidale Sauerstoffbindungskurve des Hb

Hämoglobin (Hb)

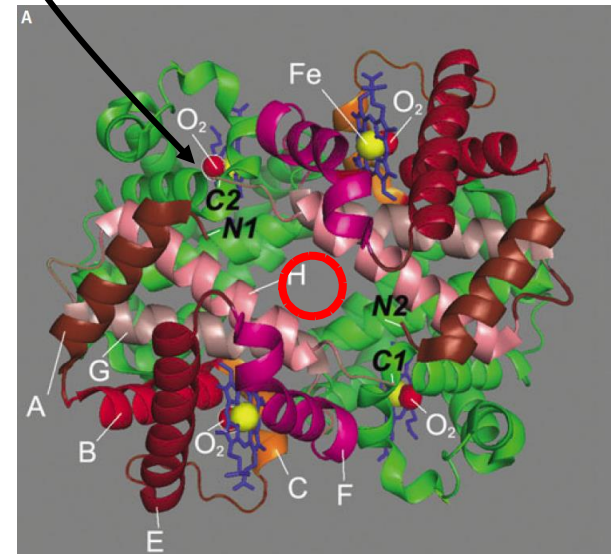
- Tetramer, 4 Polypeptidketten, 4 Hämgruppen binden O_2
- Sigmoidale Bindungskurve (= komplexes Gleichgewicht durch **Kooperativität**)
- Halbsättigung (P_{50}) bei 26 Torr



Kooperativität basiert auf struktureller Änderung



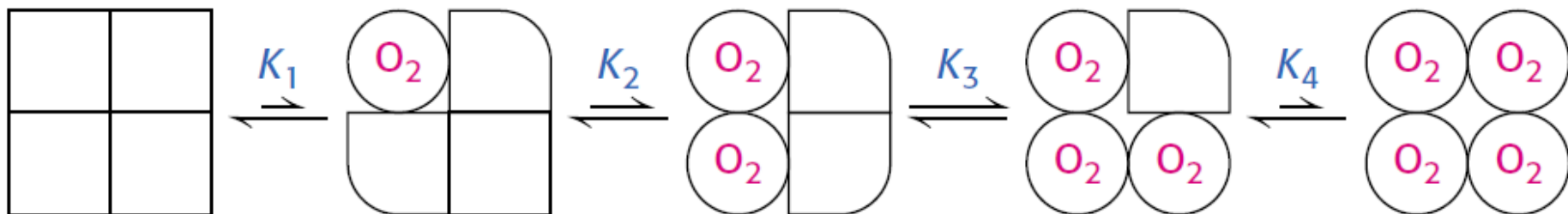
„Molekulare Lunge“
(Max Perutz)



Modellvorstellung der Kooperativität

Sequenzielles Modell

- Ligandbindung (O_2) ändert Konformation der Untereinheit
- Konformationsänderung bewirkt Änderung anderer Untereinheit ($\nearrow O_2$ -Affinität)
- Übergang T \rightarrow R-Form (intramolekulare Kommunikation)



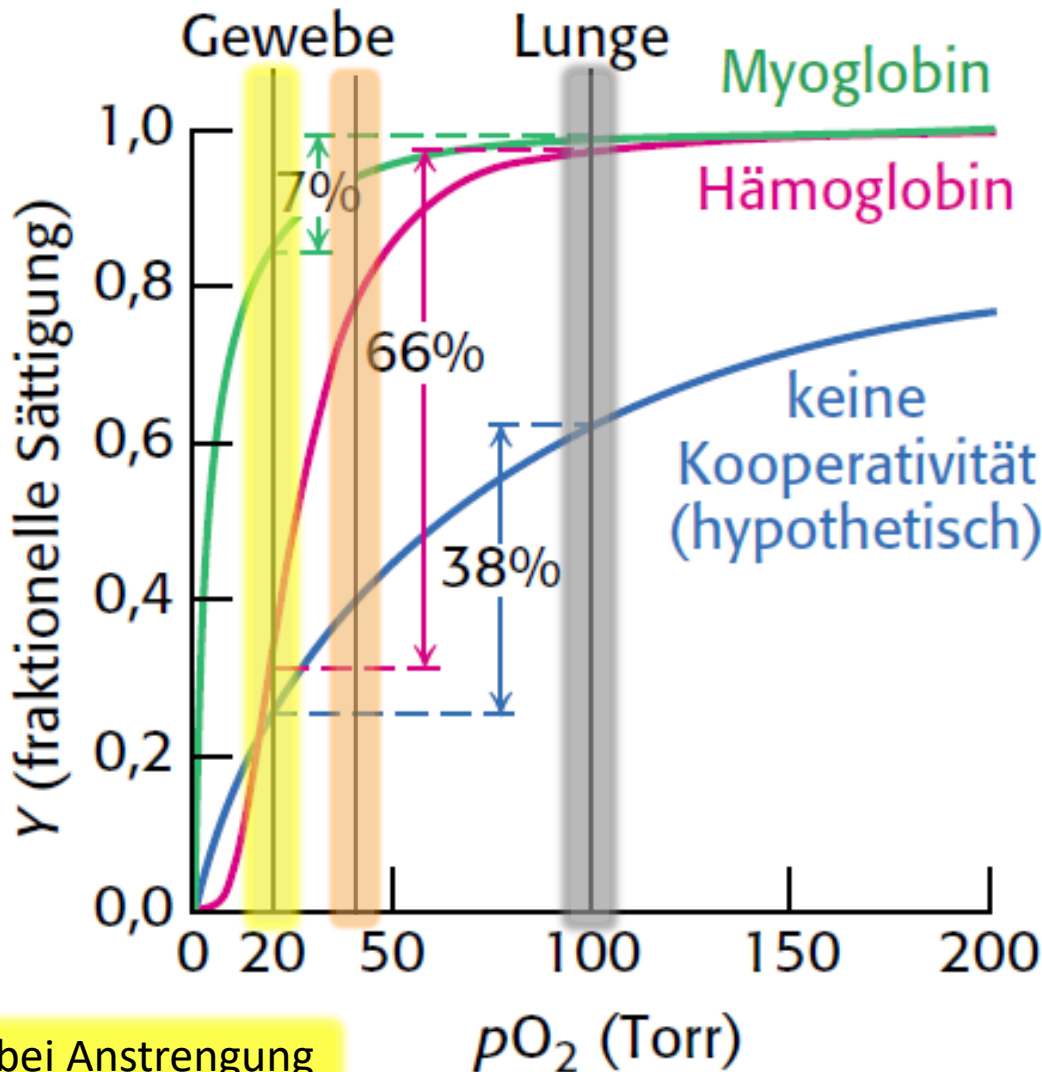
=> mit steigendem pO_2 steigt O_2 -Affinität des Hämoglobins

Puzzle-Analogie

Je mehr Teile bereits vorgelegt sind, desto leichter lassen sich fehlende Teile anfügen, quasi freie Stellen besetzen.



Vergleich der Sauerstofffreigabe von Mb und Hb



bei Anstrengung

bei Ruhe

Nichts in der Biologie macht Sinn außer im Licht der Evolution.

T. Dobzhansky (1900 – 1975)

Vorteil der Kooperativität

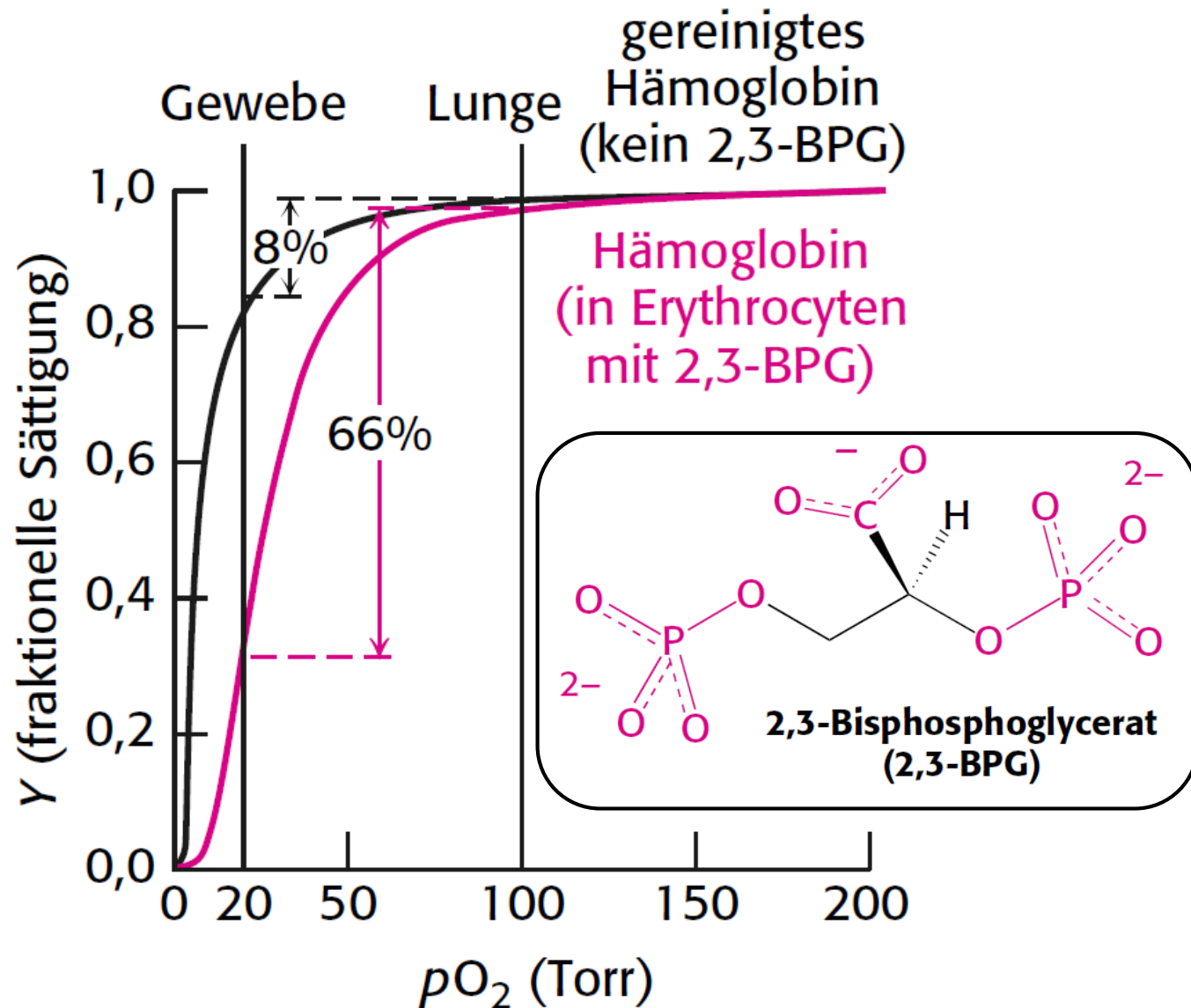
- Effiziente O₂-Freigabe im aktiven Gewebe
- Scheitelpunkt liegt nahe dem P₅₀ nahe dem pO₂ von Gewebe

Allosterischer Effektor: 2,3-Bisphosphoglycerat

Allosterischer Effektor:

Ein direkt bindender Ligand der die Enzymaktivität fernab des aktiven Zentrums beeinflusst.

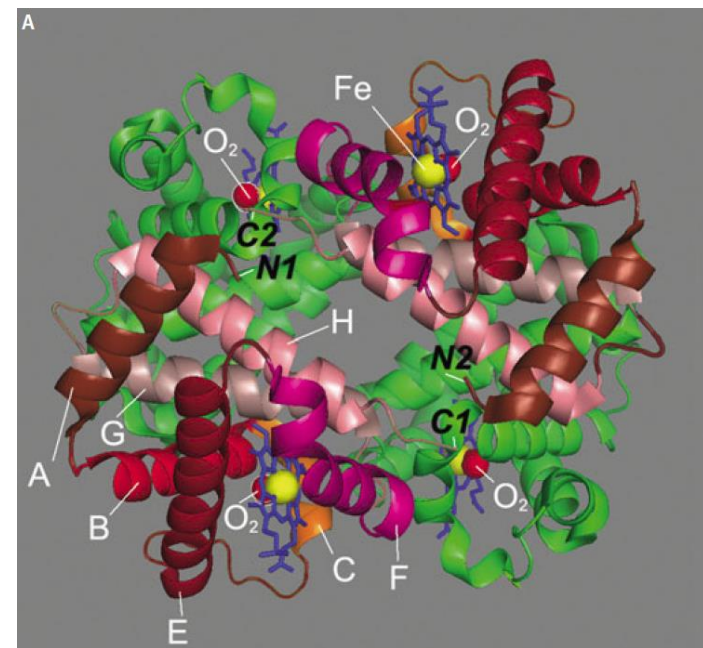
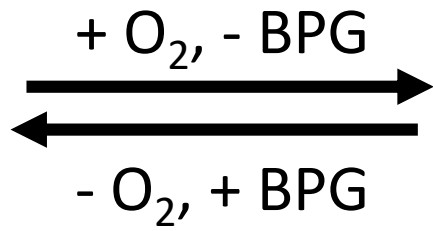
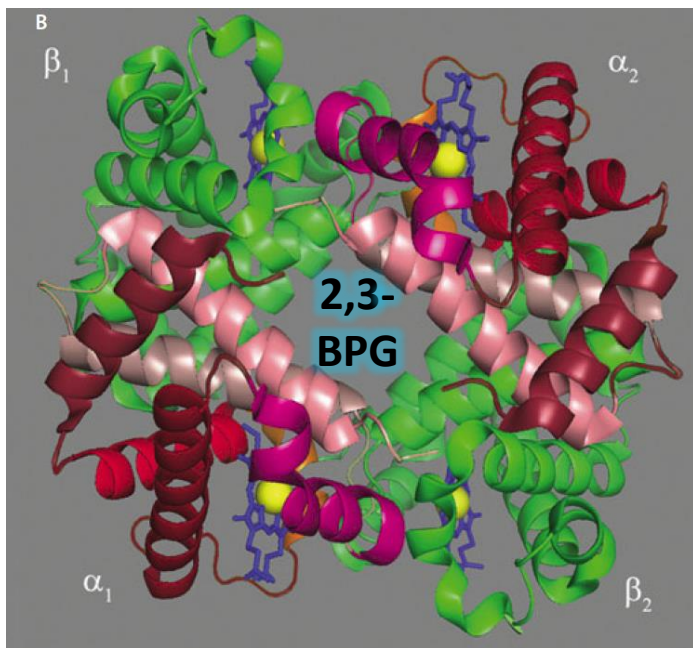
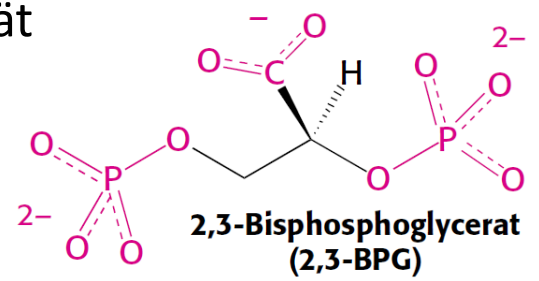
Von griech. „allos“ für andere und „stereos“ für Struktur.



Allosterischer Effektor #1: 2,3-Bisphosphoglycerat

2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG)

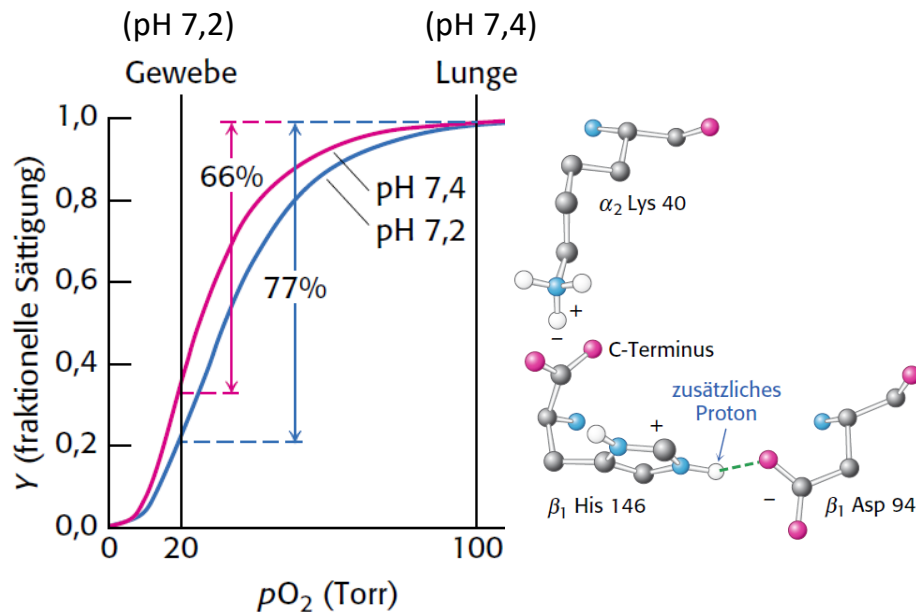
- R-Form des Hb unter physiologischen Bed. begünstigt (wenig O₂-Freisetzung)
- 2,3-BPG stabilisiert T-Form => reduziert Sauerstoffaffinität
- Ein 2,3-BPG bindet im zentralen Kanal des deoxyHb
- Verschiebt die O₂-Bindungskurve nach rechts
- Übergang T → R-Form verdrängt 2,3-BPG



Allosterischer Effektor #2 und #3: H⁺ und CO₂

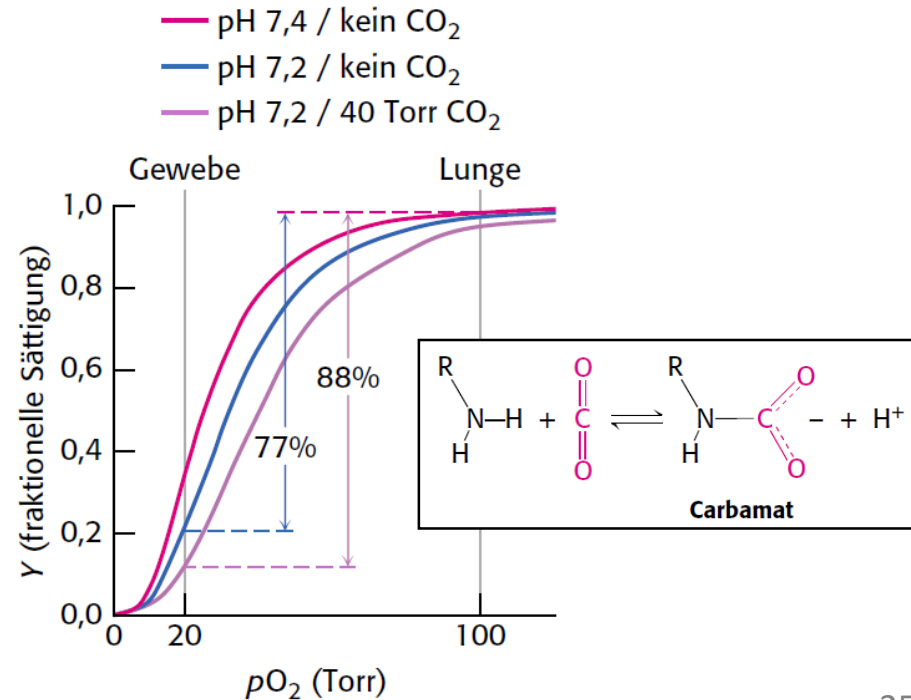
pH Wert (H⁺)

- Aktive Gewebe erzeugen H⁺ (↘ pH)
- Protonierung des β C-Terminus (His₁₄₆)
- Stabilisierung der T-Form (O₂-Abgabe)
- Rechtsverschiebung O₂-Bindungskurve



Kohlendioxid (CO₂)

- Aktive Gewebe erzeugen CO₂
- 1) CO₂ + H₂O → HCO₃⁻ + H⁺ (↘ pH)
- 2) Carbamatbildung an den N-Termini
- T-Form, Rechtsverschiebung (O₂-Abgabe)



Allosterischer Effektor #2 und #3: H⁺ und CO₂

pH Wert (H⁺)

- Aktive Gewebe erzeugen H⁺ (↘ pH)
- Protonierung des β C-Terminus (His₁₄₆)
- Stabilisierung der T-Form (O₂-Abgabe)
- Rechtsverschiebung O₂-Bindungskurve

Kohlendioxid (CO₂)

- Aktive Gewebe erzeugen CO₂
- 1) CO₂ + H₂O → HCO₃⁻ + H⁺ (↘ pH)
- 2) Carbamatbildung an den N-Termini
- T-Form, Rechtsverschiebung (O₂-Abgabe)

Bohr-Effekt

(Christian Bohr, 1904)

Haldane-Effekt

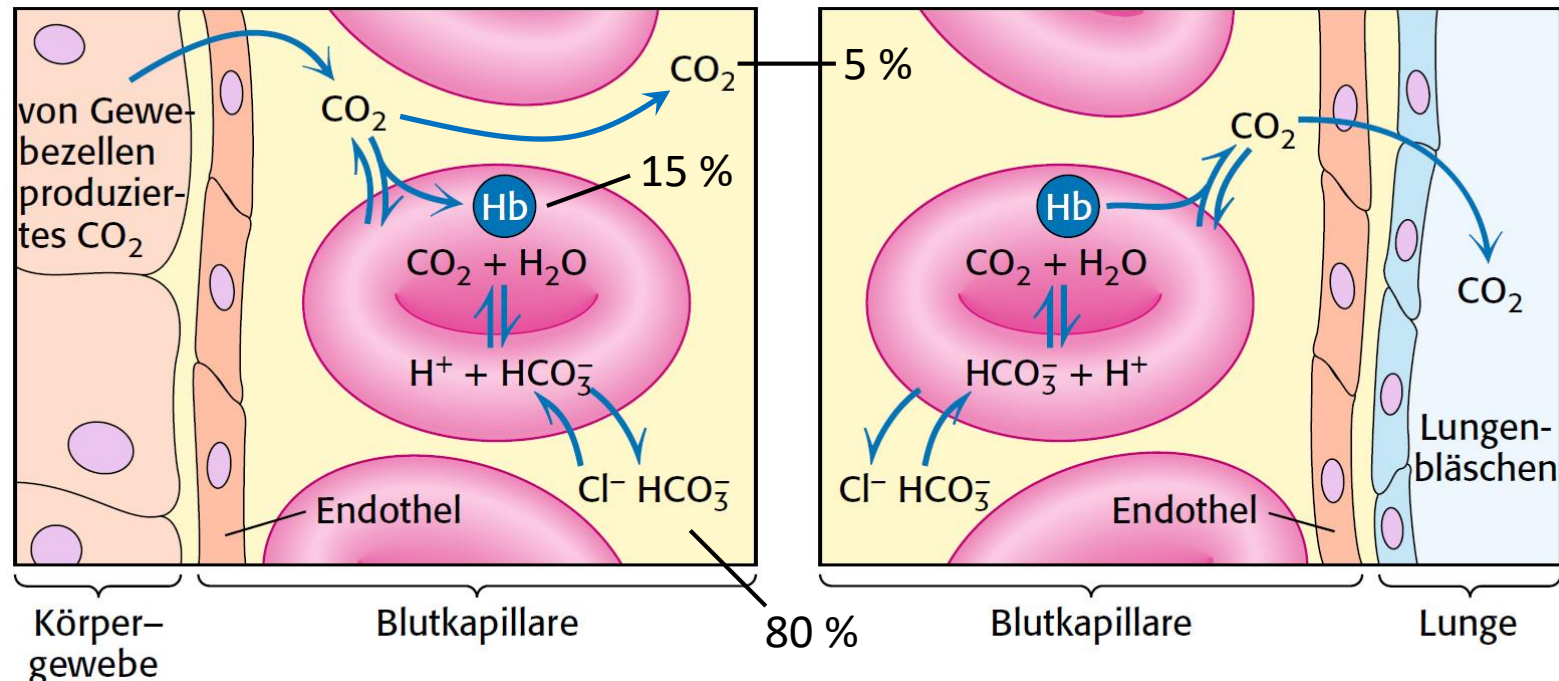
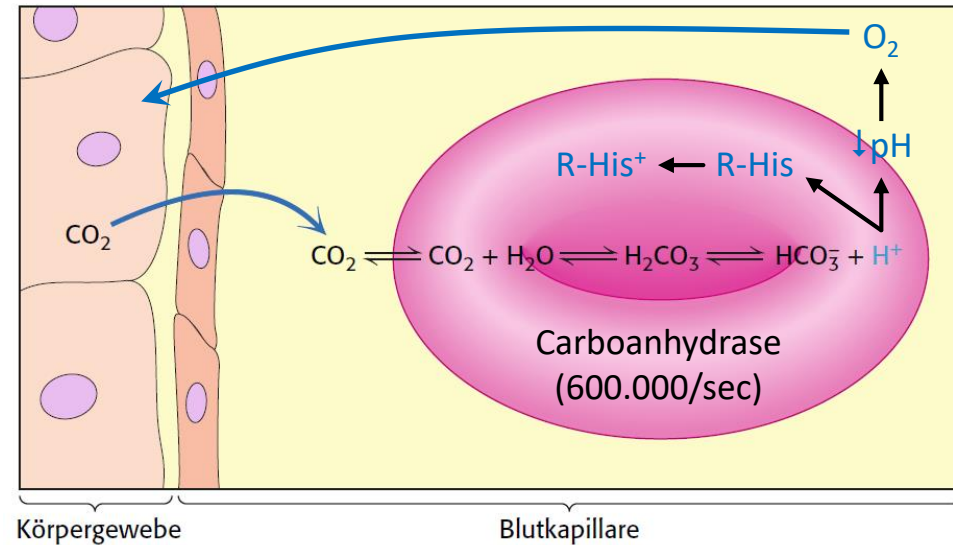
(John Haldane, ~1916)

Die allosterischen Effektoren 2,3-BPG, H⁺ und CO₂ wirken synergistisch. Alle drei verschieben die O₂-Bindungskurve des Hb weiter nach rechts.

Hämoglobin als Protonen- und CO₂-Puffer

Hämoglobin

- Histidinreich (38 His-Reste)
- Histidinreste (pK_s = 6) puffern H⁺
- ¼ der H⁺-Pufferkapazität des Blutes
- Carbamatbildung als CO₂ Puffer



Nicht-allosterische Änderung der Hb O₂-Affinität

Mögliche Ursachen und Optionen

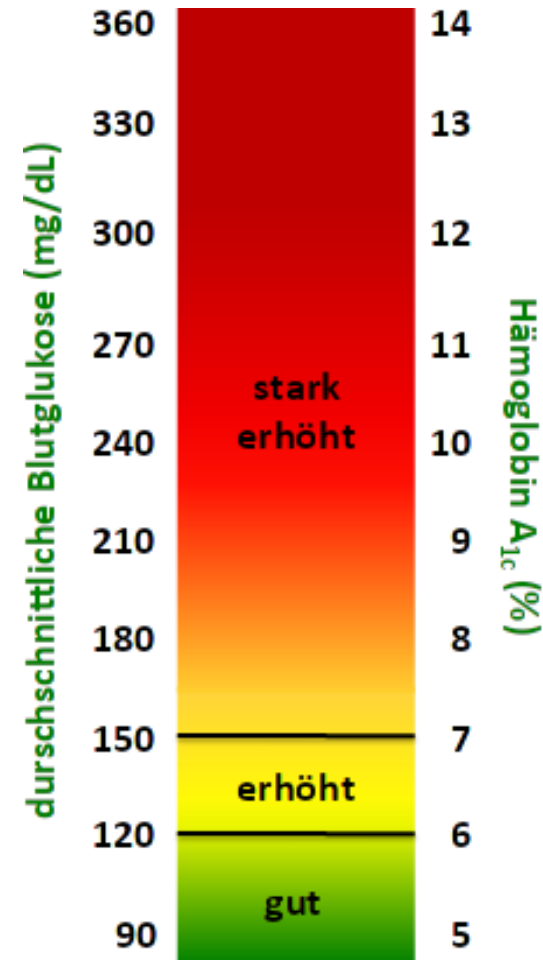
- Glykierung (posttranslationale Modifikation)
- Mutationen (Hämoglobinopathien: Sichelzellanämie, Thalassämie)
- Isoformen (Schwangerschaft)
- Kompetitive Strukturanaloga (Kohlenmonoxid)
- Oxidation (MetHb)

Glykierung und Diabetes Mellitus

Glykierung (\neq Glycosylierung)

- Kovalente, posttranslationale Modifikation
- Amadori-Umlagerung
- Nicht-enzymatische Anbindung von Hexose an die β -Untereinheit
- HbA mit Glykierung \Rightarrow HbA₁ (i.d.R. $< 6\%$ des Hb-Pools)
- Untertyp HbA_{1c} (Glykierung mit Glucose an Val1 der β -Untereinheit)
- Glykierung ist proportional der Blutzuckerkonzentration

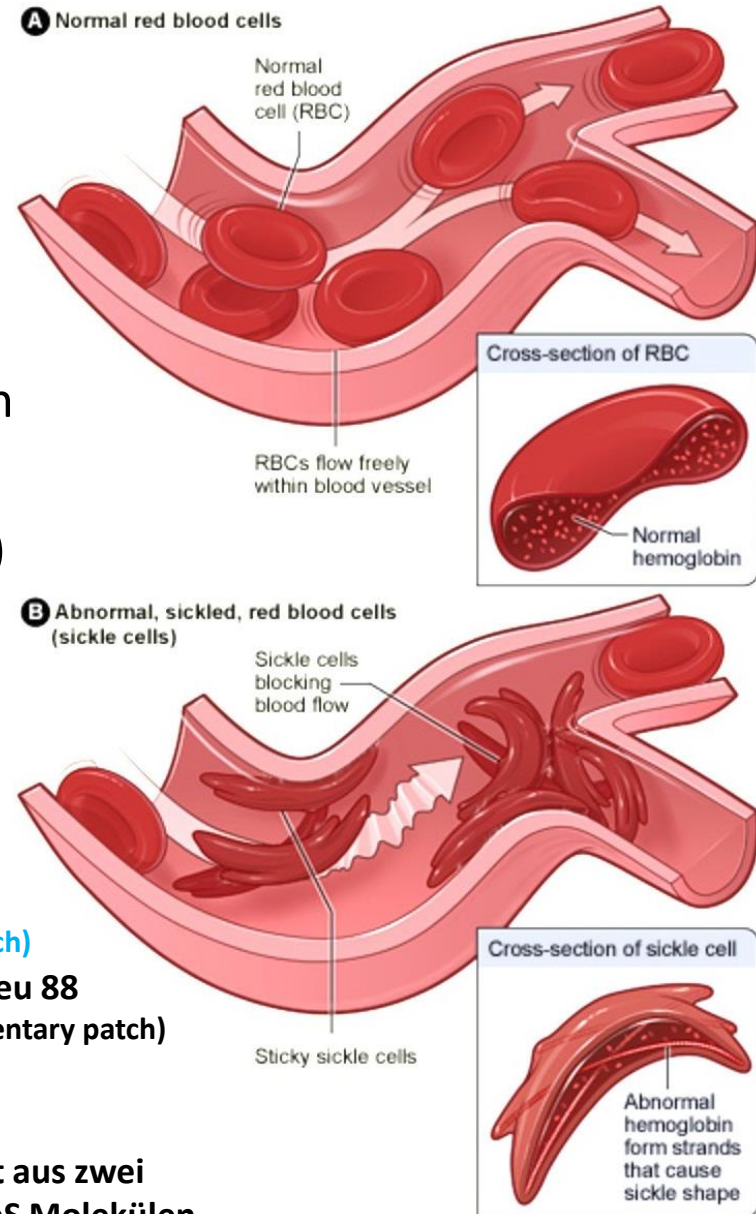
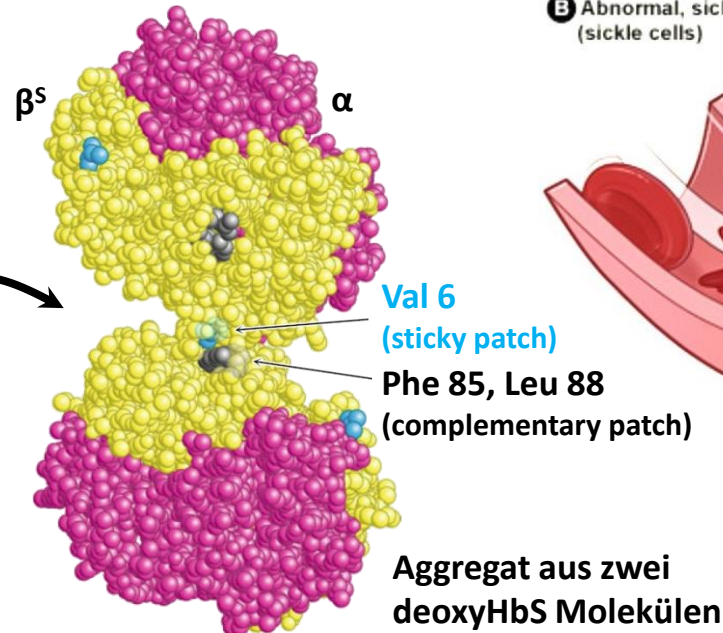
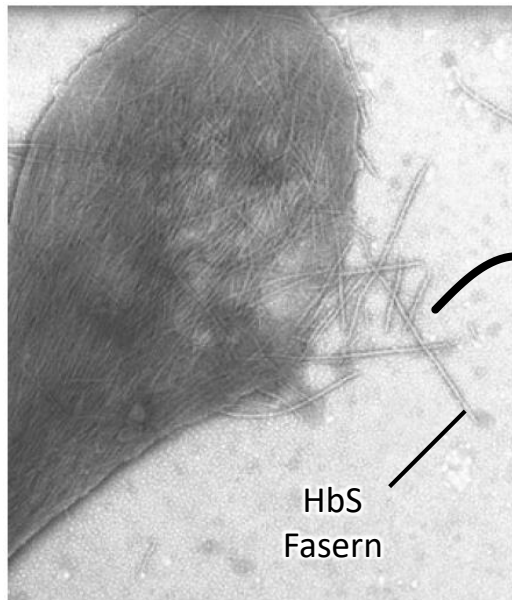
\Rightarrow **HbA_{1c} gibt retrospektive Auskunft über Ausmaß und Dauer einer Hyperglykämie bei Diabetes mellitus**



Hb Mutation #1: Sichelzellanämie

Sichelzellhämoglobin

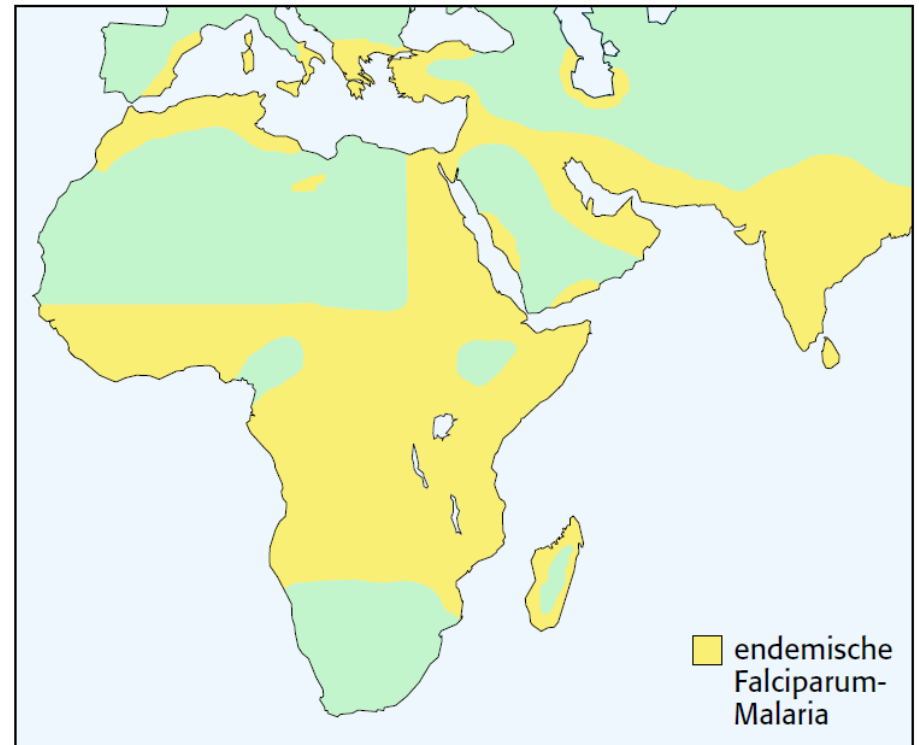
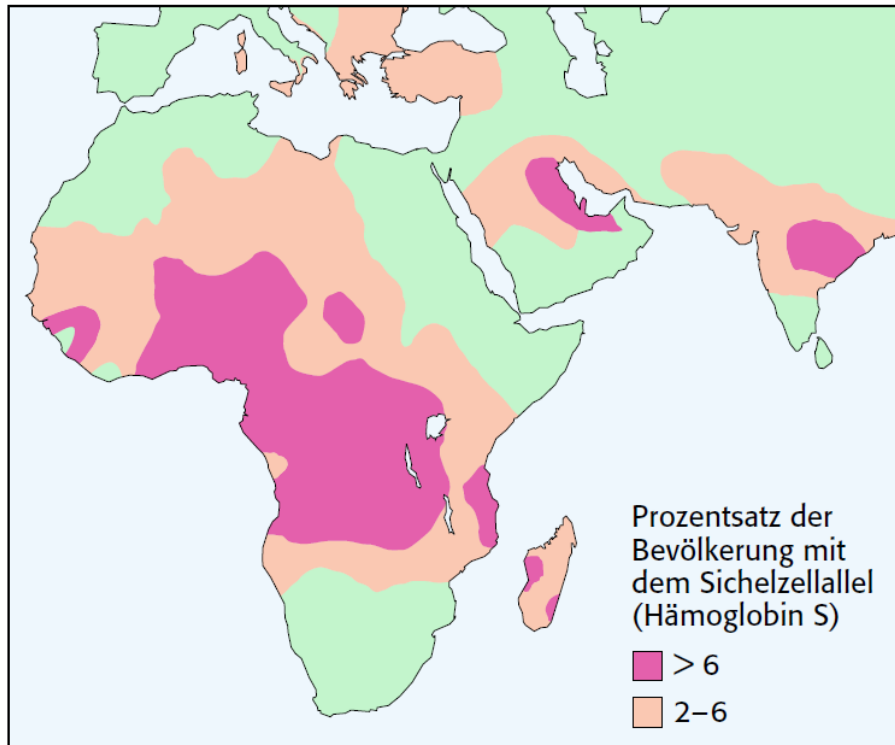
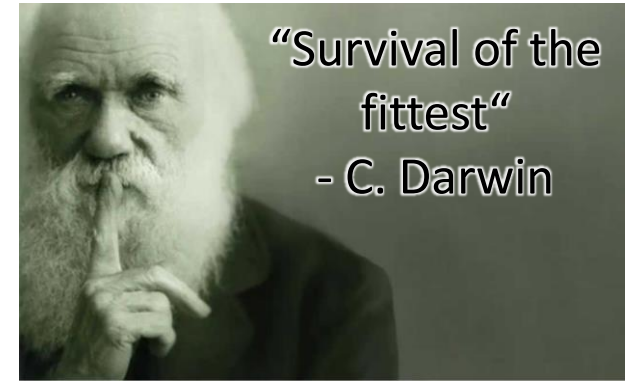
- Punktmutation (1956: Vernon Ingram)
- In β -Untereinheit: E6V (Glutamat \rightarrow Valin)
- Sichelzellhämoglobin (**HbS = $2\alpha + 2\beta^S$**)
- Aggregationsproblematik des deoxyHbS
- „Sticky patch“ \Rightarrow Faserbildung \Rightarrow Deformation
- Ischämie (Kapillarverschluss)
- Anämie (kürzere Lebensdauer der Sichelzellen)



Sichelzellmerkmal bewirkt Malariaresistenz

Malaria

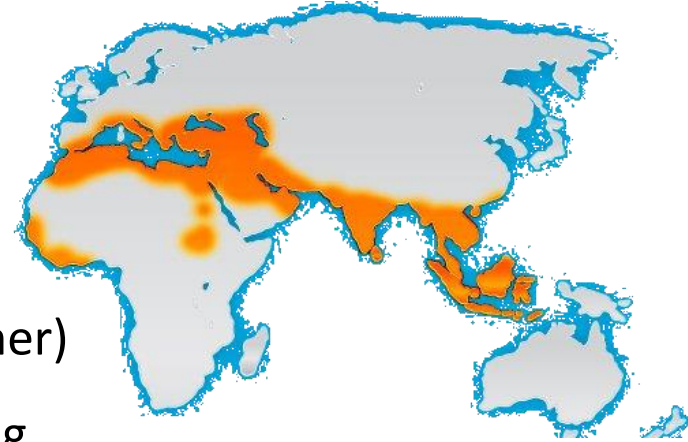
- *Plasmodium falciparum*
- Entwicklungsstadium in Erythrozyten
- Resistenz der HbS-Träger (Heterozygote; HbS^{+/-})



Hb Mutation #2: Thalassämien

α -Thalassämie (griech. „thalassa“ → Meer)

- Verminderte/fehlende Expression der α -Kette
- Ohne Synthese der α -Kette => Tod *in utero*
- Reduzierte Synthese der α -Kette => HbH (β -Tetramer)
- HbH mit hoher O_2 -Affinität => wenig O_2 -Freisetzung
- HbH instabil => Kurze Lebensdauer der Erythrozyten (Anämie)



β -Thalassämie

- Verminderte/fehlende Expression der β -Kette
- Ohne Synthese der β -Kette => β -Thalassaemia major
- α -Kette bilden Aggregate => Kurze Lebensdauer der Erythrozyten (Anämie)
- Kompensation durch Expression der Globingene γ (=> HbF) und δ (=> HbA₂)
- Bluttransfusion

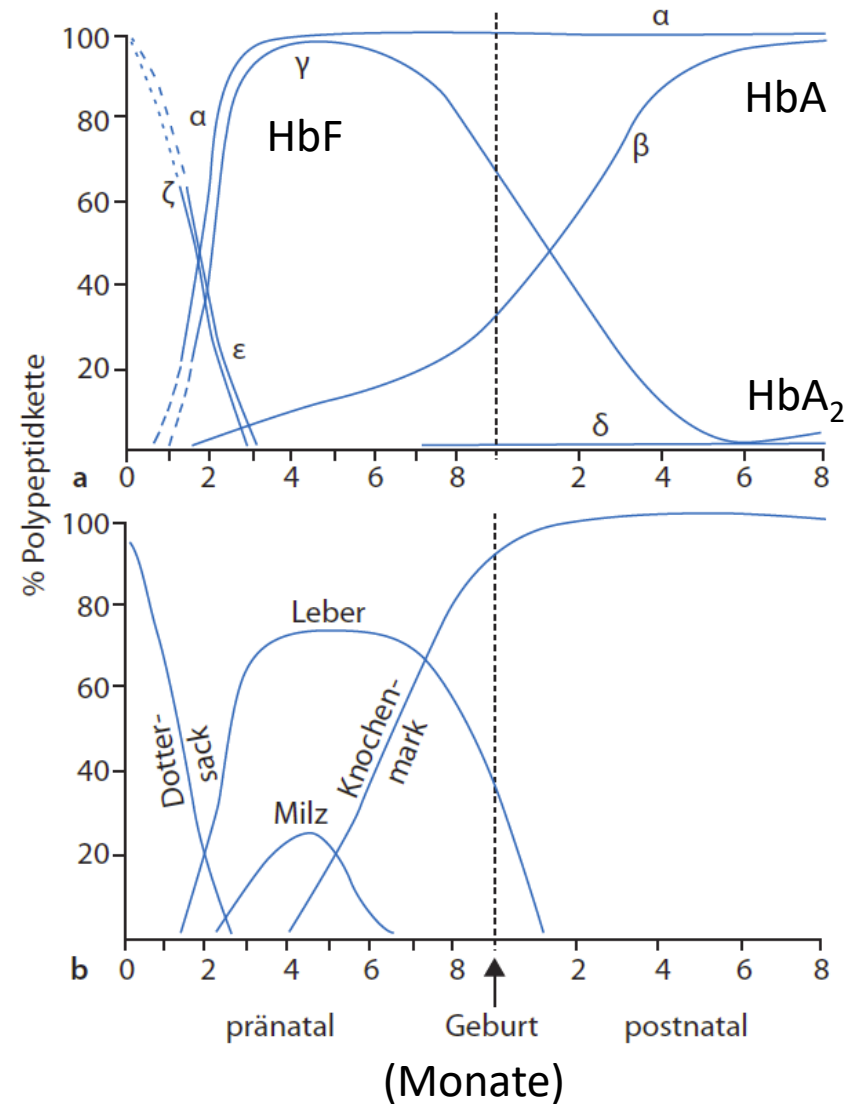
Unser Genom kodiert weitere Globingene

Hämoglobin-Isoformen

- Differenzielle Genaktivität
- Ontogenese (Embryonalentwicklung)

Übersicht: Menschlicher Hämoglobine vom Embryo bis zum Erwachsenen

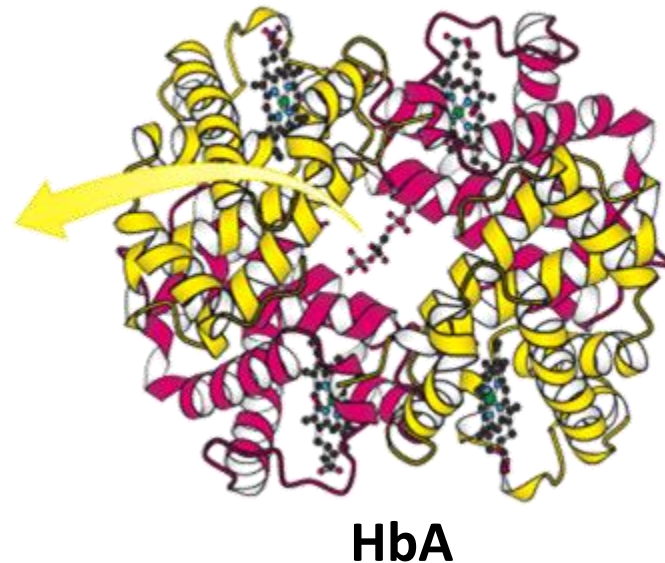
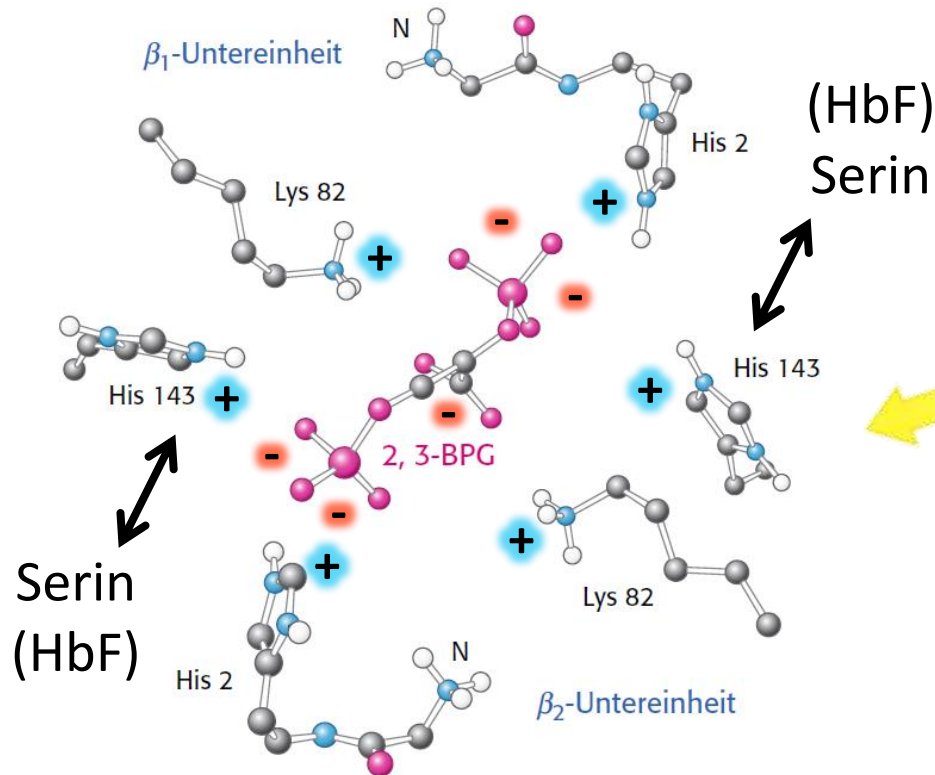
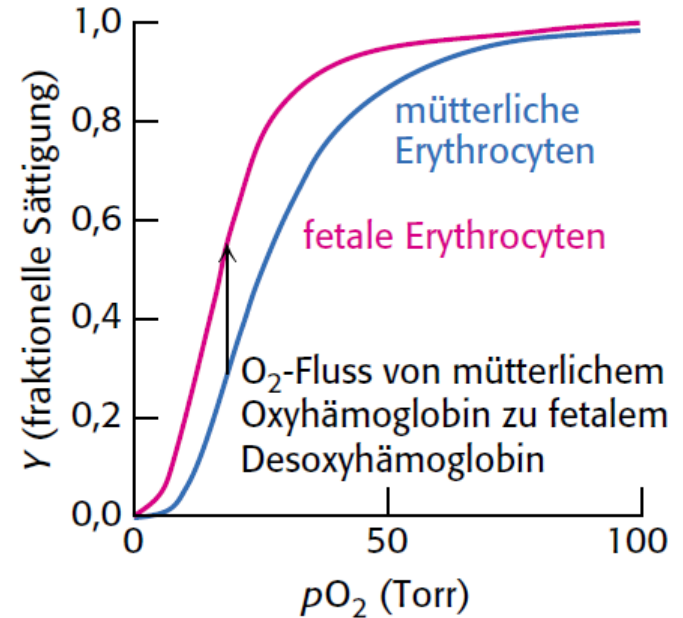
Stadium	Hämoglobin	Struktur
Embryo	Hb Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$
	Hb Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$
	Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$
Fetus	HbF	$\alpha_2\gamma_2$
		$\alpha_2\delta_2$
Adult	A (98 %)	$\alpha_2\beta_2$
	A ₂ (2 %)	$\alpha_2\delta_2$



Isoformen zeigen unterschiedliche O₂-Affinität

Besonderheiten des fetalen HbF

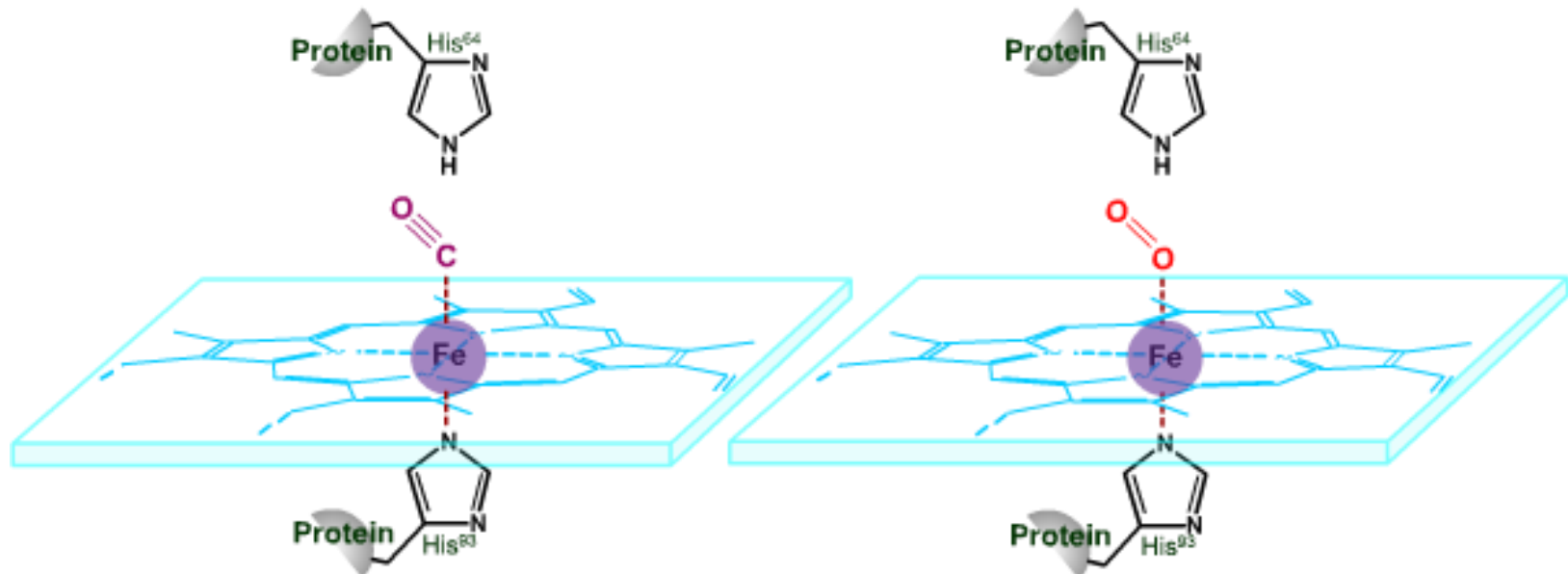
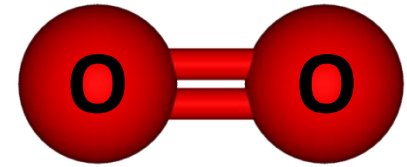
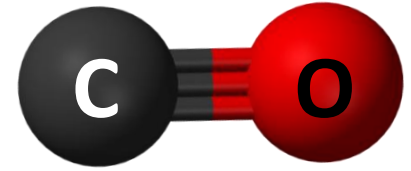
- O₂-Affinität HbF > HbA
- Reduzierte 2,3-BPG Bindungsaffinität
- γ -Globinkette trägt Serin anstelle His 143
- O₂-Bindungskurve nach links verschoben



Kompetitive Analoga reduzieren O₂-Affinität

Kohlenmonoxid (CO)

- Farb- und geruchsloses Gas
- Kompetitives Struktur analogon des O₂
- Konkurriert mit O₂ um Bindungsstelle am Häm
- Bindet 200x affiner an HbA (20.000x affiner an freies Häm)
- Hyperbare Sauerstofftherapie zur Verdrängung

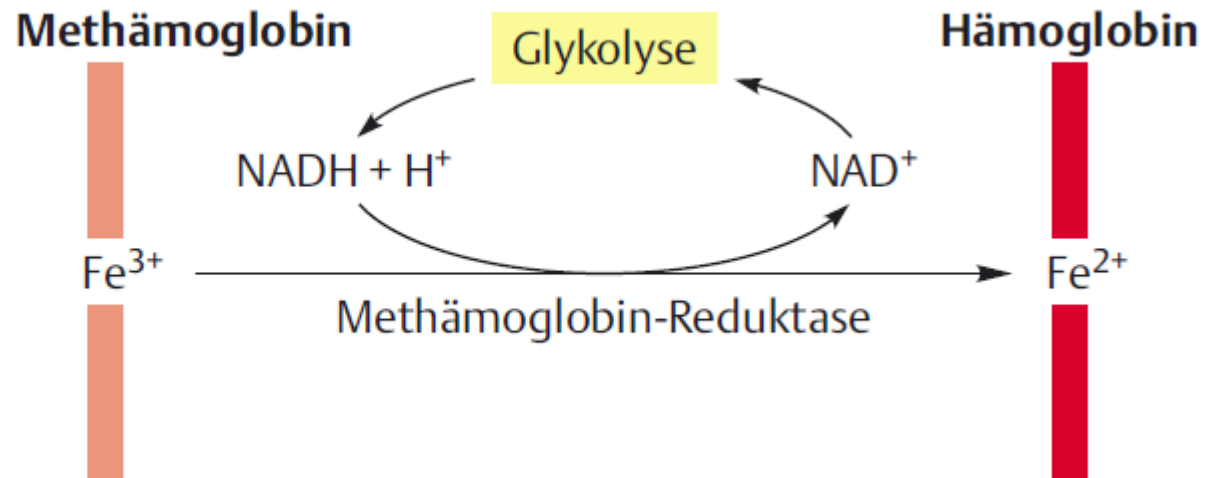
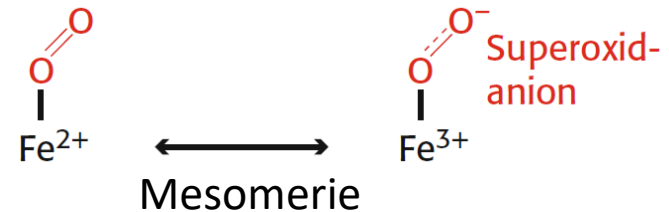
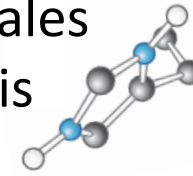


Oxidation des Häm erzeugt MetHb

Methämoglobin (MetHb)

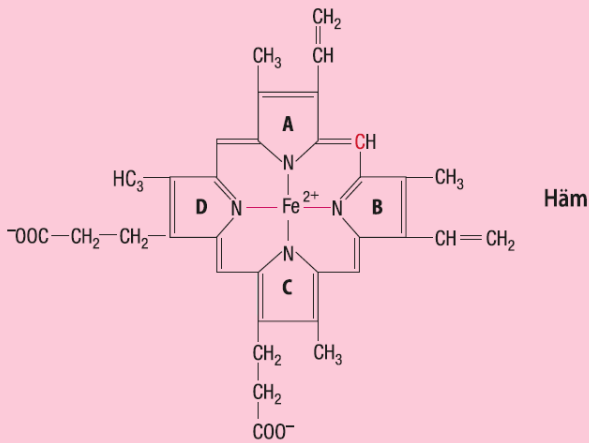
- Distales Histidin schützt vor Fe^{2+} Oxidation
- Fe^{2+} (Ferro) \rightarrow Fe^{3+} (Ferri) [durch O_2 und Nitrit]
- $\text{O}_2 \rightarrow$ Superoxid (Radikal)
- Häm \rightarrow Hämatin (Hb \rightarrow MetHb)
- **KEINE O_2 Bindung mehr**
- Reduktion durch a) Methämoglobin-Reduktase

Distales
His



a durch NADH

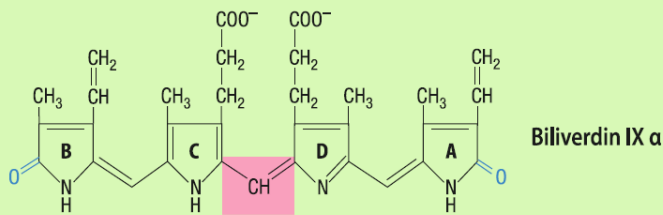
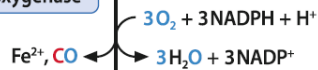
Das Farbspiel des Häm-Abbaus: der Bluterguß



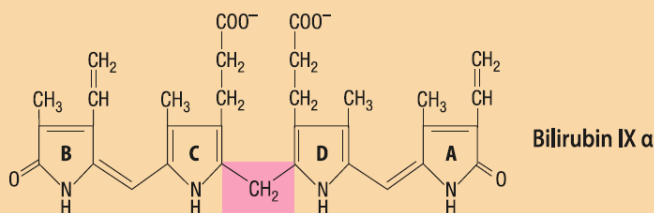
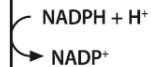
Häm-Abbau

- durch Makrophagen
- in Milz, Leber und Knochenmark
- Blut → Leber → Kolon

Hämoxygenase

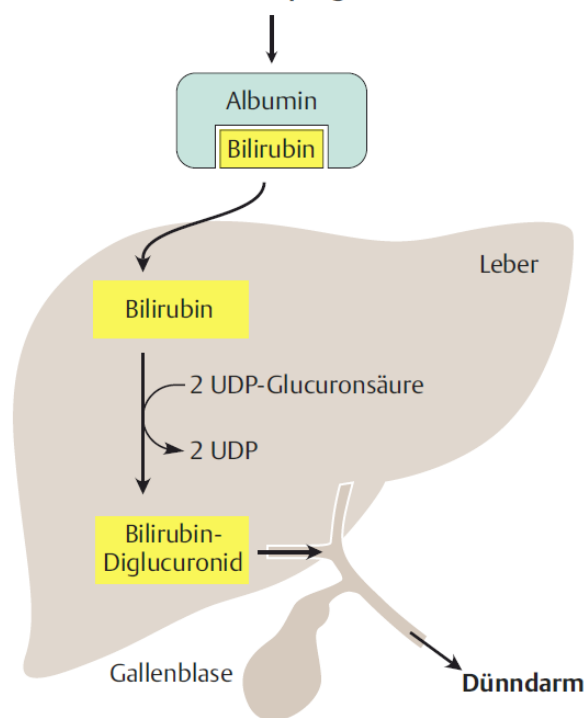


Biliverdin-Reduktase

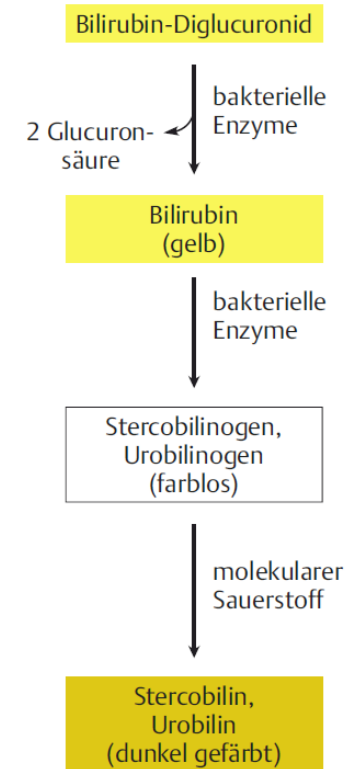


Transport und Konjugation des Bilirubins

Freisetzung von Bilirubin aus Makrophagen

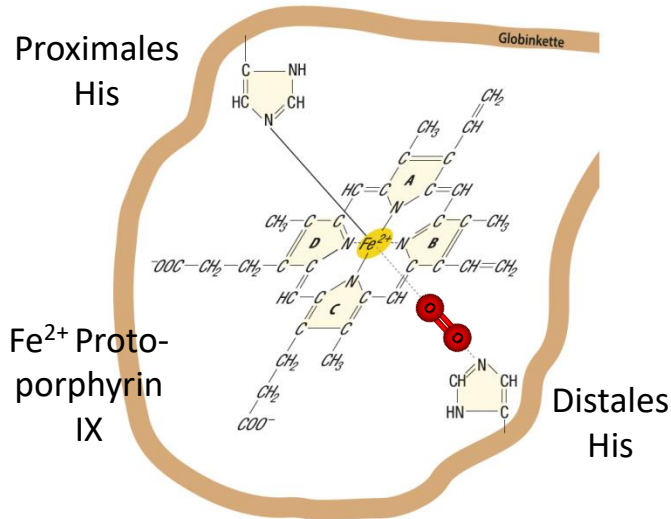


Abbau des Bilirubin-Diglucuronids im Kolon

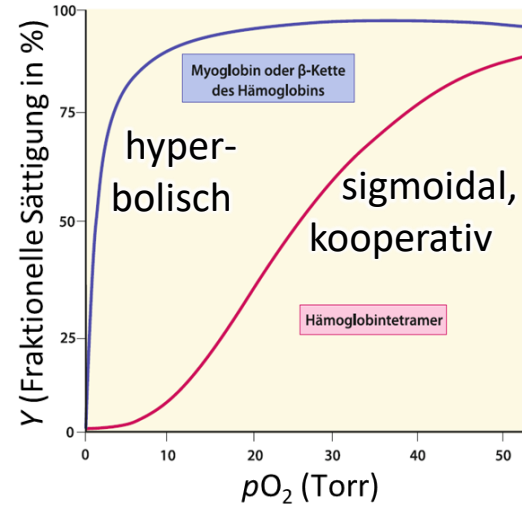


Quick recap... Sauerstofffaktore

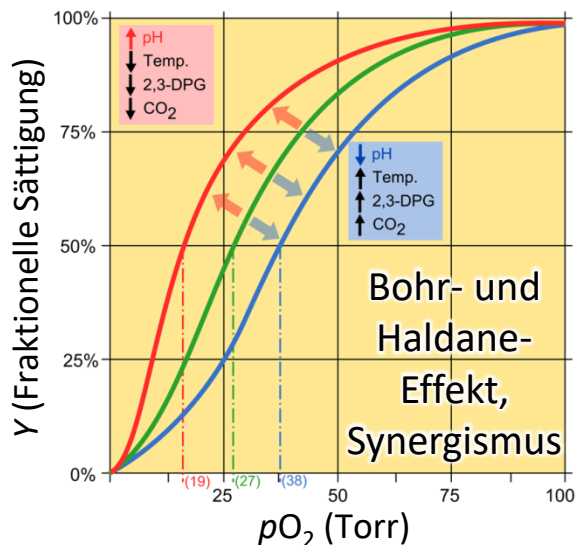
Die Häm-Gruppe



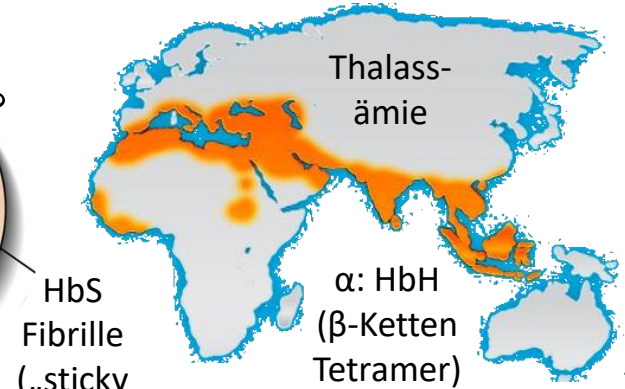
Vertreter der Globinfamilie



Allosterische Effektoren



Assoziierte Krankheitsbilder



HbS Fibrille („sticky patch“)

Quellenangaben

- Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9. Auflage
- Duale Reihe Biochemie, 4. Auflage
- Stryer Biochemie, 8. Auflage
- Biologie für Mediziner, 13. Auflage
- Internet